



(10) **DE 10 2014 105 437 A1** 2015.10.22

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2014 105 437.7**
(22) Anmeldetag: **16.04.2014**
(43) Offenlegungstag: **22.10.2015**

(51) Int Cl.: **B01L 3/00** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
B81B 1/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(71) Anmelder:
**AMODIA Bioservice GmbH, 38106 Braunschweig,
DE**

(74) Vertreter:
**Gramm, Lins & Partner Patent- und
Rechtsanwälte PartGmbH, 30173 Hannover, DE**

(72) Erfinder:
Krause, Ulrich, 38102 Braunschweig, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:

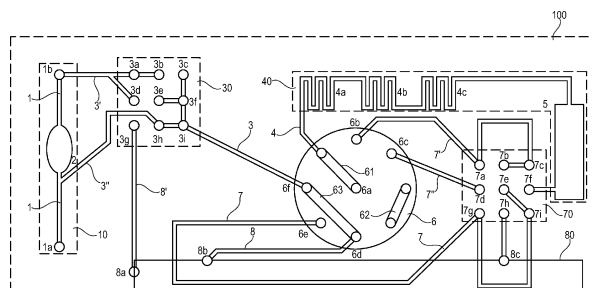
DE	28 18 302	A1
DE	10 2009 045 404	A1
DE	694 18 595	T2
DE	23 41 158	A
US	8 828 716	B2
US	2003 / 0 165 941	A1
US	2008 / 0 038 737	A1
US	2012 / 0 171 662	A1

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Mikrofluidik-Modul und Kassette für die immunologische und molekulare Diagnostik in einem Analyseautomaten**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Mikrofluidik-Modul (100) für sowohl die immunologische als auch die molekulare Diagnostik an Proben, bei dem in einem Grundkörper Kanäle (1, 3, 3', 3'', 4, 7, 7', 7'', 8, 8') und/oder Kavitäten (2, 5) mit Zuflüssen (1a, 1b, 3a-3i) für fluide Proben und Reagenzien sowie den Zuflüssen zugeordnete Behälter, Behälteraufnahmen oder Behälteransatzpunkte ausgebildet sind, und das einen Nachweis Kanal (80) zur Aufnahme eines testspezifischen Nachweismittels besitzt, der mit Kanälen (8, 7, 3) des Moduls verbindbar ist. Wesentlich für die Funktion ist ein zentrales Mehrwegeventil (6), das in steuerbarer Weise einzelne Kanäle (3, 4, 7, 7', 7'', 8) auf dem Modul verbindet. Die Kanäle gehören zu Kanalstrukturen, denen bestimmte Funktionen zugeordnet sind und die alle direkt oder indirekt mit dem Mehrwegeventil (6) verbunden sind, wobei zumindest Abschnitte der Kanalstrukturen und Kanäle Bezirke (10, 30, 40, 70) bilden, deren Kanäle (1, 3, 3', 3'', 4, 7, 7', 7'', 8, 8') und/oder Kavitäten (2, 5) zumindest teilweise nahe der Bodenfläche (120) angeordnet sind, um durch das Analysegerät gesteuerte Prozeduren innerhalb des Testverfahrens zu erlauben. Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Kassette (200) für die Aufnahme eines Mikrofluidik-Moduls (100), ein Reagenzienmodul (300) sowie ein Verfahren zur Durchführung sowohl immunologischer als wahlweise auch molekularer Tests mit Hilfe des Mikrofluidik-Moduls (100).



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Mikrofluidik-Modul für sowohl die immunologische als auch die molekulare Diagnostik an Proben in Form eines mikrofluidischen Chips, bei dem in einem Grundkörper Kanäle und/oder Kavitäten mit Zuflüssen und Abflüssen für fluide Proben und Reagenzien sowie diesen zugeordnete Behälter, Behälteraufnahmen oder Behälteransatzpunkte ausgebildet sind, wobei der Grundkörper u.a. einen Nachweiskanal zur Aufnahme eines testspezifischen Detektionsstreifens besitzt. Die Erfindung betrifft weiter eine zugehörige Kassette für die Aufnahme des Mikrofluidik-Moduls, die Gefäße enthält oder vorzugsweise zur Aufnahme von Gefäßen geeignet ist, die mit den Zuflüssen und Abflüssen des Mikrofluidik-Moduls kommunizieren, wobei die Gefäße zusammenhängend einteilig oder mehrteilig ausgebildet sind und die Volumina für Reagenzien und Proben bereitstellen. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Durchführung von Tests an Proben mit Hilfe des neuen vorzugsweise kassettengehaltenen Mikrofluidik-Moduls in einem Analysegerät.

Stand der Technik

[0002] Im Bereich der Diagnostik besteht ein zunehmendes Interesse an einfachen, gebrauchsfertigen, in sich geschlossenen, preisgünstigen Einweg-Artikeln zur Durchführung molekularbiologischer und immunologischer Analysen. Damit sollen diese sensitiven und spezifischen Methoden auch ohne spezialisiertes Labor und dafür speziell ausgebildetes Personal einsetzbar sein. Die Tendenz geht dabei zu einer Miniaturisierung sowohl der Geräte als auch der die Proben während des Tests aufnehmenden Strukturen. Es wurden zahlreiche Analysegeräte entwickelt, die die biologischen Proben in so genannten Kartuschen oder Kassetten beinhalten, welche nach dem Test entsorgt werden können. Das Analysegerät ist in der Lage, Proben und Reagenzien ggf. zuzuführen – sofern sie nicht in der Kassette vorliegen – und von den Zuflüssen oder Ports bis zum Detektionsbereich zu transportieren und zu bearbeiten. Die Bearbeitung kann u.a. in der Veranlassung von Mischvorgängen, Heiz- und Kühlbläufen, Messwertkontrollen, Begasungs- und Entlüftungsschritten und schließlich dem Auslesen eines Messergebnisses bestehen.

[0003] Die DE 600 14 676 T2 (Cepheid) offenbart z.B. eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Analyse flüssiger Proben, wobei Analyten aus lysierten Zellen oder Viren untersucht werden können.

[0004] Die WO 2005/028635 A2 offenbart ein automatisiertes System mit einer Extraktionskassette, in der ebenfalls eine Zelllysis erfolgt und auf der bereits mikrofluidische Strukturen verwirklicht sind, d.h. eine Miniaturisierung des Systems erfolgt.

[0005] In Anlehnung an eine aus der Elektronik stammende Terminologie hat sich für flache Kassettenbauteile, die in den vorgenannten Analysegeräten verwendbar sind und miniaturisierte Fluidleitungssysteme, Kavitäten u. dgl. enthalten, der Begriff „mikrofluidischer Chip“ bzw. „Mikrofluidik-Chip“ herausgebildet.

[0006] Inzwischen sind zahlreiche Komponenten für Mikrofluidik-Chips entwickelt worden. So offenbart beispielsweise die EP 2 404 676 A1 Verfahren, um fluide beispielsweise mit pneumatischen Mitteln und mit Ventilen und Membranen gezielt durch ein System von Fluidkanälen bewegen zu können.

[0007] Die DE 10 2008 002 674 B3 (IMM) beschreibt ein Mikroventil zur Steuerung von Fluidströmen in einem Mikrofluidik-System, insbesondere in einem Lab-On-a-Chip-System. Mit Hilfe eines relativ zu einem Substrat, z.B. der Chipplatte, beweglich angeordneten Ventilkörpers, der wenigstens einen Kanal besitzt, können Fluidleitungen bzw. Fluidkanäle in dem Substrat wahlweise verbunden oder getrennt werden. Gegenüber vorbekannten Ventilmodellen, die ebenfalls Kanäle sperren und freigeben konnten, wird eine verbesserte Dichtwirkung bereitgestellt, die auch für die Abdichtung eines Septums oder einer Entlüftungsmembran anstelle des Ventilkörpers genutzt werden kann.

[0008] Die DE 10 2009 045 404 A1 (IMM) offenbart die Ausbildung von Volumenabmesskanälen oder -strecken in Mikrofluidik-Leitungen auf mikrofluidischen Chips. Dies ermöglicht es, für die Analytik wichtige exakte Probenvolumina abzumessen.

[0009] Mit Hilfe solcher und ähnlicher Mittel sind bereits zahlreiche Mikrofluidik-Chips verwirklicht worden, u.a. solche für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion an DNA-Proben. Ein solcher PCR-Mikrofluidik-Chip ist beispielsweise aus der WO 2010/141139 A1 bekannt. Der Chip wird innerhalb einer Kassette verwendet, beides wird nach dem Test entsorgt.

[0010] Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist mittlerweile das wichtigste Werkzeug für die molekulare Diagnostik über Nukleinsäureanalyse. Sie ermöglicht es, nur wenige Zielmoleküle einer DNA immer wieder zu kopieren, bis eine nachweisbare Anzahl an Molekülen entstanden ist. Für den Nachweis von RNA wird eine reverse Transkriptase (RT-PCR) eingesetzt, bei der zunächst die RNA durch ein Enzym in DNA umgeschrieben wird. Bevor die Nukleinsäuren amplifiziert werden können, müssen sie zunächst aus einer Probe extrahiert werden. Dies erfordert die Abmessung und Zugabe der Probe sowie der Reagenzien, im allgemeinen einen Lysischritt zum Aufschließen von Zellwänden sowie die anschließende Reinigung und Aufkonzentrierung der

Nukleinsäuren. Die nachfolgenden Analysen werden häufig durch Inhibitoren im Probenmaterial gestört, daher ist eine optimierte Probenaufbereitung essenziell für die Analysequalität.

[0011] Der Standard-PCR-Prozess erfordert es, eine Probe abwechselnd bei drei verschiedenen Temperaturen zu inkubieren. Bei der höchsten Temperatur, die typischerweise 95 °C beträgt, denaturiert die DNA, d.h. die beiden Stränge der Doppelhelix trennen sich in zwei Einzelstränge. Bei der anschließenden Annealing-Temperatur, die an die Schmelztemperaturen der Primer angepasst werden muss, binden diese Primer passend an die DNA Einzelstränge. Bei der folgenden dritten Temperatur, die typischerweise 72 °C beträgt, verlängert die Polymerase die an die Einzelstränge gebundenen Primer so lange mit den passenden DNA-Bausteinen, bis aus dem Einzelstrang wieder ein Doppelstrang geworden ist. Dadurch verdoppelt sich mit jedem PCR-Zyklus die Anzahl der DNA-Moleküle, die durch die Primer ausgewählt wurden. Der PCR-Prozess erfordert eine zeitliche Steuerung der Temperaturwechsel sowie eine präzise Temperaturkontrolle.

[0012] Neben der PCR gibt es weitere Amplifikationsmethoden für DNA, die teilweise auch isotherm ablaufen können, auch diese Methoden benötigen jedoch eine exakte Kontrolle der Bedingungen.

[0013] Für die Detektion von DNA werden unterschiedliche Methoden eingesetzt. Klassisch ist eine elektrophoretische Trennung mit nachfolgender Anfärbung, die nicht gut zu miniaturisieren ist. Andere Nachweisverfahren setzen Fluoreszenzfarbstoffe ein. Eine relativ einfache optische Detektion wurde mit Hilfe sogenannter Lateral-Flow-Streifen (LFD, Lateral-Flow Dipsticks) möglich gemacht. Auf dem Lateral-Flow-Streifen sind Substanzen zur Detektion der Analyten lokalisiert. Der Analyt wird mit Hilfe einer Flüssigkeit längs des Streifens transportiert und konzentriert sich an den fixierten Nachweismolekülen auf, sodass im Falle einer Farbreaktion eine Detektion mit bloßem Auge erfolgen kann, während bei einer Fluoreszenzdetektion ein Auslesegerät erforderlich bleibt.

[0014] Die Integration von Extraktion, Amplifikation und Detektion auf einem mikrofluidischen Chip hat vielfältige Nachteile. Die Lösungen sind in der Regel für die Art der Proben spezifisch, d.h. sie sind beispielsweise nur für hochkonzentrierte DNA-Proben, wie Blutzellen oder Anreicherungskulturen geeignet. Die Reagenzien müssen teilweise von Hand auf den Chip überführt werden oder sie werden auf dem Chip gelagert. Die erste Variante erfordert ein entsprechendes Laborumfeld und gut geschultes Personal. Dieses Verfahren ist außerdem anfällig für Bedienungsfehler. Die Lagerung von Reagenzien auf dem Chip schränkt wegen deren Haltbarkeit die

Stückzahlen ein, mit denen gleichartige Chips produziert werden können. Hinzu kommt, dass einmal produzierte Chips nur für den ursprünglich geplanten Test eingesetzt werden können. Teilweise sind teure Reagenzien erforderlich. Zum Teil werden komplexe Ausleseverfahren eingesetzt. Chip-basierte Systeme für die molekulare Diagnostik sind daher immer noch aufwändig in der Handhabung, unflexibel und teuer.

[0015] Zusätzlich ist es häufig gewünscht, mit demselben Gerät auch immunologische Nachweise durchführen zu können. Hierfür müssen jedoch gesonderte Schritte durchgeführt werden. Häufig ist der Analyt (Antikörper oder Antigen) nur in geringer Konzentration in der Probe vorhanden und muss zunächst aufkonzentriert werden. Das kann beispielsweise mit immobilisierten Fang-Antikörpern geschehen. Immunologische Tests, die eine Detektion mit LFDs verwenden, werden häufig in Kunststoffkassetten angeboten.

[0016] Die US 2008/0280285 A1 offenbart mikrofluidische Chips, zugehörige Verfahren und Vorrichtungen für immunologische und/oder molekulargenetische Tests, die auf einem gemeinsamen Chip durchgeführt werden sollen. Der Chip befindet sich in einer Kassette, die die Zufuhr flüssiger Proben und Reagenzien über Ports in eine mikrofluidische Struktur ermöglicht. Ebenso ist die Steuerung des Analyseablaufs mit Hilfe eines Analysengeräts beschrieben. Vorzugsweise werden auf einem mikrofluidischen Chip wenigstens zwei Behandlungsabläufe durchgeführt, beispielsweise eine DNA-Isolierung und eine PCR-Amplifikation. Für verschiedene Tests auf einem Chip innerhalb einer Kassette wird die zugeführte Probe aufgeteilt und über parallele, mikrofluidische Strukturen zu diskreten Detektionszonen geleitet. Die Ergebnisse werden über einen Detektor ausgelesen. Es ist vorgesehen, dass auf mehreren parallelen, unabhängigen Wegen der mikrofluidischen Struktur auf Analyten der Gruppe DNA, RNA, Antikörper und Antigene getestet werden kann. Die Verfahren sind hochautomatisiert und spezialisiert. Für die verschiedenen Testkombinationen werden verschiedene individuell ausgelegte Chips benötigt, die auf komplexen und spezialisierten Analyseapparaten gehandhabt werden müssen. Für kleinere Labors ergeben sich hieraus Nachteile, da nur unter hohem Kostenaufwand alle möglichen Tests angeboten werden können.

[0017] Die Aufgabe der Erfindung bestand daher darin, die Nachteile im Stand der Technik zu vermeiden und universelle Mittel zur wahlweisen Durchführung verschiedener Tests zu entwickeln, die immunologische und molekulardiagnostische Tests umfassen und innerhalb eines Analysengeräts durchgeführt werden können.

Beschreibung der Erfindung

[0018] Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt erfindungsgemäß mit den Merkmalen des Mikrofluidik-Moduls nach Anspruch 1, der zugehörigen Kassette nach Anspruch 7, des Reagenzien-Moduls nach Anspruch 12 und des Verfahrens nach Anspruch 13.

[0019] Die Erfindung bietet somit eine Plattform, die je nach Konfiguration sowohl eine immunologische als auch eine molekulare Diagnostik erlaubt. Der Kern der Erfindung liegt in einem universellen Mikrofluidik-Modul, auf dem verschiedene Testkonfigurationen immunologischer und molekulardiagnostischer Art verwirklicht werden können. Der universelle Mikrofluidik-Chip wird vor Gebrauch mit dem für den Test passenden Nachweismittel, vorzugsweise einem Lateral-Flow-Streifen, versehen, und die Zugänge bzw. Ports des Chips werden, vorzugsweise innerhalb einer Kassette, mit Behältern für die den Analyten enthaltende Probe und ein oder mehrere Reagenzien bestückt. Alternativ können die Behälter auch integral mit dem Mikrofluidik-Modul verbunden sein, z.B. können die Behälter oberhalb der Kanalzugänge angeformt sein. Die Kassette wird in das für die Handhabung des universellen Chips ausgelegte Analysegerät eingelegt, und das für den jeweiligen Test geeignete Arbeitsprogramm wird gestartet. Durch die geschickte Verknüpfung von Standard-Behandlungsmethoden ist die Komplexität des Analysegeräts selbst gegenüber einem reinen PCR-Analysegerät nicht wesentlich gesteigert. Die Anpassung an die verschiedenen Tests erfolgt durch das Programm und die Steuerung des auf dem Chip lokalisierten zentralen Selektionsmittels in Form des Mehrwegeventils. Die Architektur des erfindungsgemäßen Chips bzw. Mikrofluidik-Moduls nutzt genau ein (Zahlwort) Mehrwegeventil. Dieses Mehrwegeventil stellt eine zentrale Schaltstelle auf dem Modul dar. Die Kanalstrukturen „Probenführung/Aufbereitung“, „Reagenzienführung“, „Temperierung/Amplifikation“, „Volumenabmessung“ und der Nachweiskanal sind alle direkt oder indirekt mit dem einen, zentralen Mehrwegeventil verbunden. Das heißt, Kanäle des jeweiligen Kanalsystems führen zu Anschlüssen des Ventils (direkte Verbindung) oder sind mit anderen Kanälen verbunden, die zu Anschlüssen des Ventils führen (indirekte Verbindung). In bestimmten Ausführungsformen sind z.B. Teile der „Reagenzienführung“ nur über die „Probenführung“ mit dem zentralen Mehrwegeventil verbunden. Ein und dasselbe universelle Chip-Design ermöglicht die Durchführung verschiedenster Tests auf identisch (universell) ausgebildeten Mikrofluidik-Chips. Proben und Reagenzien werden von außen zugeführt, und der Chip kann in größeren Stückzahlen gefertigt werden, da er vielfältig einsetzbar ist.

[0020] Die Ausdrücke „Zuflüsse“, „Zugänge“ und „Ports“ werden hier synonym eingesetzt.

[0021] Es gehört weiterhin zum Kern der Erfindung, dass auf dem Mikrofluidik-Chip funktionelle Bereiche gebildet werden, hier auch als „Bezirke“ bezeichnet, die Standardabschnitte der Testverfahren repräsentieren. Diese umfassen jeweils mikrofluidische Kanäle bzw. Fluidleitungen, ggf. Kavitäten, ggf. Zu- und Abläufe sowie in bestimmten Bezirken Mittel zum Bewegen der im System befindlichen Fluide aus Proben, Reagenzien und deren Mischungen. Einzelne Bezirke sind so angeordnet bzw. die zugehörigen Kanäle oder Kanalsysteme so räumlich zusammengefasst, dass spezielle programmgesteuerte Operationen, z.B. Temperieren, in den Bezirken durchgeführt werden können.

[0022] Jeder funktionelle Bereich oder Bezirk ist unmittelbar mit dem zentralen Mehrwegeventil verknüpft und das Mehrwegeventil verknüpft je nach Testverfahren und Testschritt einzelne ausgewählte Bezirke miteinander und bewirkt dabei zum Beispiel Fluidabmessung und Fluidtransport. Der abschließende Transport erfolgt zum ebenfalls über das Mehrwegeventil zugänglichen Nachweiskanal mit dem Detektionsmittel, nämlich dem Lateral-Flow-Streifen. Durch die Aufteilung des Mikrofluidik-Chips in funktionelle Bezirke und die Verknüpfung dieser Bezirke über das Mehrwegeventil als Selektionsmittel ist jeder denkbare Test darstellbar, der die Schritte einer immunologischen oder einer molekulardiagnostischen Analyse umfasst.

[0023] Mit Hilfe des mikrofluidischen Systems des Mikrofluidik-Chips können wenigstens die folgenden Verfahrensschritte verwirklicht werden:

- Zuführen der Probe mit dem Analyten,
- soweit erforderlich, Zuführen von Nachweisreagenzien,
- Mischen von Substanzen, beispielsweise Probe und Reagenzien, mit Hilfe von Mischkavitäten oder Mischstrecken,
- Transportieren von Fluiden, Überführen von Probenvolumina, beispielsweise durch pneumatischen Transport,
- Separieren des Analyten mit physikalischen Mitteln,
- Abmessen von Probenmengen/-volumina,
- Temperieren von Probenvolumina in Kavitäten oder Kanalstrukturen,
- Begasen und/oder Entgasen des Fluids über Membrane und Ventile
- Auslesen des Ergebnisses, beispielsweise optisch.

[0024] Das Mikrofluidik-Modul nach dieser Erfindung ist ein mikrofluidischer Chip, auf dem der gewünschte Test innerhalb mikrofluidischer Strukturen ausgeführt wird. Dieses Mikrofluidik-Modul für die immunologische und molekulare Diagnostik an Proben weist folgende wesentliche Bestandteile auf:

- einen vorzugsweise im Wesentlichen plattenförmigen Grundkörper und in dem Grundkörper Kanäle und/oder Kavitäten, die Strukturen nach Art eines Fließreaktors bilden. Die mikrofluidischen Kanäle besitzen Querschnittsflächen von ca. bis zu einem Quadratmikrometer, so dass der gesamte Test miniaturisiert ist und innerhalb dieser Mikrokanäle und Kavitäten durchgeführt werden kann. Die in den Kanälen transportierten typischen Volumina liegen im Bereich von Mikrolitern. Allerdings können auch wesentlich größere Volumina aus Reservoirs durch die Mikrokanäle in andere Reservoirs transportiert werden. Die gesamte Struktur bildet ein „Lab-on-a-Chip“;
- Zuflüsse für fluide Proben und Reagenzien sowie den Zuflüssen zugeordnete Behälter, Behälteraufnahmen oder Behälteransatzpunkte. Dabei werden die Probe oder Proben und die ggf. erforderlichen Reagenzien für den jeweiligen Test in den Behältern vorgehalten und von dort über sogenannte Ports, d.h. über Zuflüsse zu den einzelnen Kanälen, der mikrofluidischen Struktur zugeführt;
- einen Nachweiskanal zur Aufnahme eines test-spezifischen Nachweismittels, vorzugsweise eines Lateral-Flow Streifens, der mit weiteren Kanälen und insbesondere verschiedenen Bezirken des Moduls verbindbar ist, vorzugsweise mit jedem der Bezirke wahlweise;
- ein Mehrwegeventil, das in steuerbarer Weise einzelne Kanäle verbindet oder abschließt, wobei jede diskrete Ventileinstellung einem Kanalmuster auf der Struktur entspricht;
- vorzugsweise eine an dem Grundkörper ausgebildete Bodenfläche für den Kontakt zu einem zugehörigen Analysegerät, wobei einzelne Kanäle und/oder Kavitäten zumindest teilweise oder abschnittsweise nahe der Bodenfläche angeordnet sind, um eine Manipulation oder Detektion durch Elemente des Analysegeräts innerhalb von durch das Analysegerät gesteuerten Prozeduren zu erlauben – die Elemente können beispielsweise Heizer, Kühler, Magnete, Lichtschranken oder spektroskopische oder optische Detektionsmittel sein;
- Kanalstrukturen, nämlich wenigstens eine Kanalstruktur für die Probenführung einschließlich einer für bestimmte Tests erforderlichen Aufbereitung, eine Kanalstruktur für die Reagenzienzuführung, eine Kanalstruktur für eine Temperierung und/oder DNA-Amplifikation und eine Kanalstruktur für eine definierte Volumenabmessung eines durch bestimmte Kanalabschnitte bewegten Fluids, die alle direkt oder indirekt mit dem Mehrwegeventil verbunden sind, wobei zumindest Abschnitte der Kanalstrukturen nach ihrer Funktion oder verfahrensmäßigen Behandlung zusammenhängend angeordnete Bezirke bilden – die Kanalstrukturen können dabei ggf. überlappen, d.h. be-

- stimtete Kanäle können für mehrere Funktionen gemeinsam genutzt werden;
- eine Anbindung des Nachweiskanal zumindest an die Volumenabmessung und die Proben- und Reagenzienzuführung über das Mehrwegeventil.

[0025] Das Mehrwegeventil des Mikrofluidik-Moduls ist vorzugsweise als Drehventil oder als Schiebeventil ausgebildet. Es ist ein Mikroventil mit einem Ventilsitz und einem Ventilkörper, bei dem wenigstens einzelne der zuvor beschriebenen Kanäle oder Kanalstrukturen in den Ventilsitz münden, wobei in dem Ventilkörper Verbindungskanäle vorhanden sind, mit deren Hilfe dann bestimmte Kanäle auf dem Modul verbunden oder nicht verbunden werden. Das Mehrwegeventil kann beispielsweise zulassen, dass zwei benachbart zum Ventil laufende Kanäle verbunden werden. Durch Drehen oder Schieben des Ventils wird gesteuert, ob und welche benachbarten Kanäle verbunden werden. Die genaue Konfiguration der Verbindungs- und Trennmöglichkeiten hängt vom Aufbau der Kanalstruktur auf dem Modul ab. In der Praxis kann beispielsweise ein Mehrwegeventil verwendet werden, wie es in der DE 10 2008 002 674 B3, die oben bereits gewürdigt wurde, beschrieben ist. Der Inhalt der DE 10 2008 002 674 B3 wird deshalb ausdrücklich durch Bezugnahme in diese Offenbarung mit einbezogen, da der Fachmann die dortige Anleitung zur Ausgestaltung des Mehrwegeventils hier ohne weiteres nutzen kann.

[0026] Vorzugsweise besitzt das Mehrwegeventil Ventilstellungen, mit denen wenigstens die folgenden Bezirke mit ihren zugehörigen Kanälen und Kanalstrukturen verbunden werden können:

- der Bezirk für die Probenführung mit dem Nachweiskanal;
- der Bezirk für die Probenführung mit dem Bezirk zur Volumenabmessung;
- der Bezirk für die Probenführung mit dem Bezirk zur Temperierung;
- der Bezirk zur Temperierung mit dem Bezirk zur Volumenabmessung;
- der Bezirk zur Volumenabmessung mit dem Nachweiskanal.

[0027] Es kann auch vorgesehen sein, dass jeder Bezirk wahlweise mit jedem anderen Bezirk verbunden werden kann, wobei der Nachweiskanal als ein Bezirk anzusehen ist (Nachweisbezirk). Es kann weiterhin vorgesehen sein, dass Untereinheiten von Bezirken mit dem Mehrwegeventil und hierüber mit anderen Bezirken verbunden werden können. Beispielsweise kann der Bezirk für die Volumenabmessung in Unterabschnitte unterteilt sein, diese können beispielsweise für die Entgasung von Kanalabschnitten genutzt werden.

[0028] Erfindungsgemäß ist genau ein Mehrwegeventil auf dem Mikrofluidik-Modul vorhanden, das

mit seinen verschiedenen Einstellungen die genannten Bezirke einschließlich des Nachweiskanals in verschiedenen möglichen Kombinationen miteinander verbinden kann. Dies schließt die Anwesenheit weiterer einfacher Ventile oder Hähne auf dem Modul nicht aus.

[0029] Die Auswahl, welche Kanäle im jeweiligen Analyseschritt verbunden oder getrennt werden, erfolgt programmgesteuert durch ein zugehöriges Analysegerät.

[0030] Das erfindungsgemäße Mikrofluidik-Modul wird innerhalb eines zugehörigen Analysegeräts gehandhabt. Derartige Geräte sind grundsätzlich bekannt und müssen hier nicht im Einzelnen beschrieben werden. Ein Analysegerät für PCR-Tests, das eine mit einem Mikrofluidik-Chip ausgerüstete Kassette handhaben kann, ist beispielsweise in der WO 2010/141139 A1 dargestellt. Im Stand der Technik sind zahlreiche weitere Geräte bekannt, die an die unterschiedlichen Testzwecke angepasst sind.

[0031] Für die jeweiligen, gemäß dieser Erfindung wahlweise durchzuführenden Tests besitzt das zugehörige Analysegerät Programme, nach denen die Verfahrensschritte ablaufen gelassen werden. Dabei wird unter anderem für jeden Schritt eine Ventilstellung vorgegeben, die mit Hilfe des Analysegeräts und des darauf laufenden Programms eingestellt wird. In bevorzugter Ausführungsform besitzt das Analysegerät daher einen Stellmotor und ein Stellglied, z.B. einen Bolzen, der am Ventilkörper angreifen und das Mehrwegeventil dadurch verstellen kann. Ferner sorgt das Analysegerät für den programmgesteuerten Transport der Probe bzw. des in der Kanalstruktur befindlichen Fluids oder Gemisches mit geeigneten Mitteln. Auch diese Mittel sind grundsätzlich bekannt. So zeigt z.B. die EP 2 404 676 A1 Mittel für den gezielten Fluidtransport innerhalb von Mikrokanälen. Die DE 10 2009 045 404 A1 zeigt sowohl Mittel zum Abmessen von Fluidvolumina in Mikrokanälen als auch die Art und Weise, wie die abgemessenen Fluide transportiert werden. Auch der Offenbarungsgang der DE 10 2009 045 404 A1 wird deshalb durch Bezugnahme hier mit aufgenommen. Der Fachmann kann daraus ohne weiteres technische Details für die Ausbildung von gasdichten Absperrmitteln und Volumenabmessstrecken übernehmen.

[0032] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind – vorzugsweise durch geeignete Anordnung und Zuordnung geeigneter Mittel in dem Analysegerät in Relation zu dem eingesetzten Mikrofluidik-Modul – Mittel zum Transportieren eines Fluids durch Kanäle des Moduls an geeignete Ansatzpunkte des Moduls anschließbar, insbesondere Mittel zum Aufbringen von Unter- oder Überdruck, Mittel zum Zuführen von Druckluft in einzelne Kanäle und Mittel zum flüssigkeitsdichten Abführen von Ga-

sen aus einzelnen Kanälen. Letzteres kann beispielsweise mit Hilfe der in der DE 10 2008 002 674 B3 und der DE 10 2009 045 404 A1 gezeigten Absperrmittel geschehen, die flüssigkeitsundurchlässige und gasdurchlässige Membranen nutzen, um gezielt Gas entweichen zu lassen.

[0033] Das Mikrofluidik-Modul nach der Erfindung kann in eine Kassette eingesetzt bzw. mit dieser zusammengesetzt werden, wobei dann die Einheit aus der Kassette mit dem Mikrofluidik-Modul in eine dazu passende Ausnehmung im Analysengerät eingesetzt wird. Die Einheit aus Kassette und Mikrofluidik-Modul wird in der Ausnehmung im Analysengerät gehalten und positioniert, letzteres insbesondere bezüglich der erforderlichen Manipulationen durch das Gerät.

[0034] Die Erfindung umfasst für die Lösung der Aufgabe demnach auch eine Kassette für die Aufnahme des Mikrofluidik-Moduls, die erfindungsgemäß für einen form- und/oder kraftschlüssigen Einsatz in eine Halterung eines zugehörigen Analysengeräts ausgebildet ist. Sie bildet ein Interface zwischen Mikrofluidik-Modul und Analysegerät, um die durch das Analysegerät programmgesteuerte Durchführung von Tests auf dem Mikrofluidik-Modul zu erlauben.

[0035] Die Handhabung derartiger Kassetten ist grundsätzlich im Stand der Technik bekannt. Das Modul nach der Erfindung wird entweder in eine Kassette eingesetzt, die einzelne Behälter für Proben und Reagenzien umfasst, die den Zuflüssen am Modul zugeordnet sind, oder in eine Kassette, die ein gesondertes, zusammenhängendes Reagenzien-Modul enthält, wie unten näher beschrieben, oder in eine Leerkassette, wenn die Behälter Teil des Mikrofluidik-Moduls selbst sind und in Zuordnung zu den Zugängen (Ports) mit diesen verbunden sind.

[0036] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung auch eine Kassette, die ein Mikrofluidik-Modul umfasst, das mit einem testspezifischen Nachweismittel ausgerüstet ist. Das testspezifische Nachweismittel ist vorzugsweise ein Nachweisstreifen und insbesondere ein Lateral-Flow-Streifen (LFD).

[0037] Die Kassette ist vorzugsweise mit einem oder mehreren Behältern ausgestattet, die einteilig oder mehrteilig ausgebildet und in Zuordnung zu Zuflüssen des Mikrofluidik-Moduls angeordnet sind und die Volumina für Reagenzien und Proben bereitstellen. Eine solche Kassette mit Behältern kann beispielsweise als ein einheitliches Spritzgussteil oder in sonstiger Weise einteilig ausgebildet sein. Nach einer anderen vorteilhaften Ausgestaltung werden separate Einzelbehälter oder zusammenhängende Mehrfachbehälter formschlüssig und/oder kraftschlüssig in eine passend dafür geformte Kassette eingesetzt.

[0038] In besonders bevorzugter Ausführungsform der Erfindung sind die Behälter innerhalb eines zusammenhängenden Reagenzien-Moduls ausgebildet, wobei das Reagenzien-Modul mit dem Mikrofluidik-Modul auf der der Bodenfläche des Mikrofluidik-Moduls abgewandten Seite so verbindbar ist, dass die integrierten Behälter mit den Volumina für Reagenzien und Proben an den Behälteransatzpunkten des Mikrofluidik-Moduls aufsitzen, um die Proben und Reagenzien über die Zuflüsse den Kanälen und ggf. vorhandenen Kavitäten zuführen zu können. Das Reagenzien-Modul kann in die Kassette integriert sein, es kann auch einstückig mit der Kassette ausgebildet sein. Alternativ können sowohl das Mikrofluidik-Modul als auch das Reagenzien-Modul in eine vorzugsweise für alle Tests universell ausgebildete Kassette – die dann einen Rahmen bildet – eingesetzt werden. Die Behälter sitzen oberhalb sogenannter „Ports“ des Mikrofluidik-Moduls. Unter einem „Port“ wird hier jeder Zugang zu einem Kanal bzw. Kanalsystem z.B. in Form eines einfachen Zuflusses („Stichkanal“) oder eines absperzbaren Zuflusses (mit Eingangsventil) verstanden.

[0039] Schließlich umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Durchführung sowohl immunologischer als auch molekularer Tests mit Hilfe des erfindungsgemäßen Mikrofluidik-Moduls innerhalb eines Analysegeräts, wobei ein Nachweismittel in dem Mikrofluidik-Modul vorgelegt wird und wenigstens eine Probe und gegebenenfalls Reagenzien in einer das Mikrofluidik-Modul umfassenden Kassette oder in dem Mikrofluidik-Modul selbst vorgelegt sind und dem Kanalsystem des Mikrofluidik-Moduls gerätgesteuert zugeführt werden und wobei die Probe und gegebenenfalls die Reagenzien gesteuert durch das Analysegerät durch mikrofluidische Kanäle geleitet und schließlich nach Durchführung wenigstens einer der gerätgesteuerten Operationen: – Transportieren, Waschen, Aufreinigen, Selektieren markierter Moleküle (beispielsweise magnetisch markierter Moleküle mit einem Magneten), Durchmischen (z.B. einer Probe, beispielsweise durch Sprudeln), Vermischen mit Reagenzien, Reagierenlassen, Temperieren, Heizen, Kühlen und Abmessen – dem Nachweismittel zugeführt werden. Hierfür wird ein auf dem Analysegerät installierter testspezifischer Programmablauf aus Schritten zusammengestellt, die in Bezirken des Mikrofluidik-Moduls ablaufen und die über ein Mehrwegeventil, in das Kanäle der Bezirke münden, ausgewählt und in einer Verfahrensschrittfolge verknüpft werden. Die verschiedenen möglichen Tests (immunologisch oder molekular) können wahlweise auf dem universell ausgelegten Mikrofluidik-Modul durchgeführt werden.

[0040] Vorzugsweise ist das Verfahren so ausgestaltet, dass nach dem Zuführen einer Probe, die in Abhängigkeit vom gewählten Testverfahren mit Reagenzien vermischt wurde oder nicht und die optio-

nal einem Aufreinigungs-, Aufkonzentrierungs- und/oder Selektionsverfahren unterworfen wurde, durch einen mikrofluidischen Kanal zu dem Mehrwegeventil eine durch das gewählte, zum Testverfahren passende Analyseprogramm gesteuerte Auswahl getroffen wird, nach der das Mehrwegeventil durch Verbinden bestimmter Kanäle in den einzelnen Analyseschritten aus folgenden Verfahrensschritten ausgewählt und diese in geeigneter Reihenfolge durchführt:

- Abmessen eines Probevolumens,
- Aufreinigen einer Probe,
- Selektieren markierter Moleküle, beispielsweise magnetisch markierter Zielmoleküle mit Hilfe eines Magneten,
- Waschen, beispielsweise eines selektierten und fixierten Analyten,
- Aufkonzentrieren von Zielmolekülen/Analyten,
- Amplifizieren von DNA, vorzugsweise mittels PCR,
- Hybridisieren von DNA mit Sonden,
- Umschreiben von RNA in DNA durch reverse Transkriptase, bevor die behandelte Probe, ebenfalls vermittelt über das Mehrwegeventil, dem Nachweisschritt innerhalb eines Nachweiskanals zugeführt wird.

[0041] Die Komponenten Reagenzien-Modul und Mikrofluidik-Modul sind vorzugsweise als Einmalartikel ausgebildet. Auch die Kassette kann als Einmalartikel ausgebildet sein.

[0042] Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, die mit Hilfe der Figuren illustriert sind. Es zeigen:

[0043] Abb. 1: ein Fließdiagramm mit den Schritten verschiedener auf dem Mikrofluidik-Modul möglicher Testverfahren;

[0044] Abb. 2: Prinzipskizze zur Aufteilung des Mikrofluidik-Chips für die Realisierung der Testmöglichkeiten nach **Abb. 1**;

[0045] Abb. 3: schematische Darstellung des Mikrofluidik-Moduls mit Ventilstellung für bestimmte immunologische Tests;

[0046] Abb. 4: schematische Darstellung des Mikrofluidik-Moduls aus **Abb. 3** mit Ventilstellungen nach **Abb. 4a** und **Abb. 4b** für weitere immunologische Tests;

[0047] Abb. 5: schematische Darstellung des Mikrofluidik-Moduls wie in **Abb. 3** und **Abb. 4** mit Ventilstellungen nach **Abb. 5a** bis **Abb. 5c** für ein PCR-Nachweisbeispiel;

[0048] Abb. 6: Detailskizzen 1) bis 5) zu den in den Beispielen genutzten Einstellungen des Mehrwegeventils (Schnittansichten durch den Ventilkörper)

[0049] Abb. 7: schematische Querschnittsansicht eines Ausschnitts des Analysegeräts mit darin positionierter Kassette und Mikrofluidik-Modul;

[0050] Abb. 8: schematische Darstellungen zum Flüssigkeits- bzw. Probentransport aus den Gefäßen über den Ports zu anderen über Ports angeordneten Gefäßen – Einzelskizzen 1) bis 4), Querschnitte von der Seite.

[0051] Abb. 1 zeigt ein Fließdiagramm, in dem verschiedene Testverfahren dargestellt sind, die auf dem neuen Mikrofluidik-Modul alternativ durchgeführt werden können. Hierfür ist das Modul zuvor mit dem zugehörigen Nachweismittel auszurüsten, und es sind auf das jeweilige Testverfahren abgestimmte Reagenzien sowie schließlich die Probe in bestimmte Behälter einzufüllen, die zugehörigen Ports auf dem Mikrofluidik-Modul zugeordnet sind. Die Behälter können in einem Reagenzien-Modul blockartig zusammengefasst sein. **Abb. 1** zeigt sechs Testabläufe in der Abfolge ihrer Einzelschritte.

[0052] Methode a): ist ein einfacher immunologischer Nachweis, bei dem das Vorhandensein eines bestimmten Analyten unmittelbar durch ein Nachweisreagenz angezeigt werden kann. Bei diesem Testverfahren ist es lediglich notwendig, ein Aliquot der Probe zum Nachweismittel zu bewegen. Bei diesem Nachweisverfahren wird nur ein sehr geringer Bruchteil des Chipaufbaus und der mikrofluidischen Struktur auf dem Modul genutzt. Dennoch ist es vorteilhaft, dass auf ein und demselben Modul auch eine einfache Untersuchung, wie „Methode a)“ durchgeführt werden kann. Es ist für die Person, die den Test durchführt, sehr bequem und es ist weniger fehleranfällig, mit einem einzigen Analysegerät zu arbeiten und dies für jeden Test mit gleichartigen und in der Handhabung bekannten Einmalartikeln zu bestücken.

[0053] Methode b): ist ein immunologischer Test, bei dem die Probe zusätzlich ein Aufreinigungs- oder Separationsverfahren durchläuft. In diesem Fall wird im Vergleich zur Methode a) zusätzlich ein Bezirk des Mikrofluidik-Moduls genutzt, auf dem mit Hilfe von dafür vorgesehenen Reagenzien und einem bestimmten Ablaufschema innerhalb der Fluidikkanäle dieses Bezirks eine Aufreinigung oder Separation durchgeführt wird.

[0054] Methoden c1 und c2): sind Verfahren zum molekularen Nachweis eines Analyten mittels DNA-Amplifikation. Im Vergleich zu den immunologischen Verfahren kommen hier Schritte zum Abmessen der Probe vor und nach der Amplifikation hinzu sowie zur Durchführung des Verfahrens selbst, das u.a. einen Bezirk auf dem Mikrofluidik-Modul erfordert, der für genaues Temperieren, d.h. auch Heizen und ggf. Kühlen, ausgelegt ist. Die Methoden c1) und c2) un-

terscheiden sich durch das Vorhandensein bzw. Fehlen eines Hybridisierungsschritts. Der Vergleich der Abläufe zeigt, dass zusätzliche Wegstrecken oder Schleifen ohne weiteres berücksichtigt werden können.

[0055] Methoden d) und e): zeigen Abläufe für DNA-Amplifikationsverfahren an Ribonukleinsäuren. Auch in diesen Fällen wird das Verfahren im Vergleich zum DNA-Nachweis abgewandelt, um einen Schritt für die Behandlung mit reverser Transcriptase einbeziehen zu können.

[0056] Im Stand der Technik wurde die parallele oder alternative Bearbeitung der hier grundsätzlich gezeigten Testverfahren sehr häufig durch weitgehend parallele Fluidik-Wege ermöglicht. Hierdurch ergaben sich sehr komplexe Aufbauten der Mikrofluidik-Chips. Allein durch die Dimensionierung bestimmter Bauteile war eine universelle Nutzung in der Regel ausgeschlossen. Wie **Abb. 2** zeigen wird, ist die alternative Durchführung der in den Fließbildern gezeigten Verfahren bei der Erfindung dadurch möglich, dass die Verfahren mit ihren aus ein oder mehreren Teilschritten bestehenden Behandlungsschritten auf dem Modul mit Hilfe einer sternförmig über ein zentrales Mehrwegeventil koordinierten Struktur bearbeitet werden. Durch die sternförmige Anordnung von Bezirken, die die Hauptbearbeitungsschritte der Verfahren repräsentieren, vereinfacht sich das Modul durch Mehrfachnutzung der Kanäle und wird universell verwendbar. Die Testverfahren werden einerseits durch gezielten Stofftransport innerhalb der Fluidikkanäle, wie grundsätzlich bereits bekannt, und andererseits durch die Steuerung des als Selektionsmittel und Verbindungsmittel verwendeten Mehrwege-Mikroventils bewerkstelligt.

[0057] Beispiele für Methoden a) bis e) werden unten im Beispielteil angegeben.

[0058] Abb. 2 zeigt eine andere Art von Fließbild, nämlich die Realisierung der in **Abb. 1** gezeigten Methoden auf dem Chip durch die räumliche Zusammenfassung bestimmter Strukturen zu Bezirken auf dem Chip sowie die Selektion und Verknüpfung dieser Bezirke innerhalb des Testablaufs über ein zentrales Mehrwegeventil. Gestrichelte Kästen zeigen an, dass in diesen Bezirken von Extern, d.h. von außerhalb der Chip-Ebene Material in die Mikrofluidik-Struktur eingeführt werden kann. Dies geschieht in der Regel über Ports, d.h. bei Bedarf absperrbare Zugänge, über die aus einzelnen, separaten Behältern, oder aus am Modul angeformten Behältern oder aus einem Lagerungs- bzw. Vorratsmodul, das im Rahmen dieser Erfindung auch als Reagenzien-Modul bezeichnet wird, Proben, Reagenzien, Hilfsstoffe usw. eingeführt werden können. In einem ersten Bezirk in der Abbildung links ist die Probenzufuhr und Proben(vor)behandlung dargestellt. Die zu un-

tersuchende Probe wird in jedem Falle oberhalb eines zugehörigen Ports in einen Behälter eingeführt. Sie kann von dort unmittelbar über einen Kanal dem Mehrwegeventil und ihrer weiteren Behandlung zugeführt werden. Ebenso ist es möglich, die Probe einem Behälter zuzuführen, der erste Reagenzien zur Behandlung dieser Probe enthält. In dem Probenbehälter kann auch ein Mischen durchgeführt werden. Von diesem ersten Weg „Probe-zu-Mehrwegeventil“ abzweigend ist ein Bezirk für die Probenaufbereitung vorgesehen. Aus weiteren Behältern können Aufreinigungsreagenzien oder erste Behandlungsreagenzien hinzugefügt werden, und es findet eine erste Behandlung oder Aufbereitung der Probe statt, bevor diese dem Mehrwegeventil zur Auswahl weiterer Schritte zugeführt wird. Wie durch gestrichelte Kästen angedeutet, sind weitere Ports und zugehörige Behälter für die Zufuhr weiterer verschiedenster Reagenzien vorhanden (RT, PCR, Nachweis). Es ist besonders bevorzugt, wenn die Ports und Behälter in einem räumlich einheitlichen Bezirk angeordnet sind, damit die zugehörigen Behälter platzsparend in einem Reagenzien-Modul zusammengefasst werden können. Probe(n) und Reagenzien können aber auch in mehreren, ggf. auch räumlich voneinander getrennten Bezirken angeordnet sein. Der Bezirk mit den Reagenzienports kann vorzugsweise auch die Ports für die Aufreinigungs- und Nachweisreagenzien enthalten, die hier der Übersicht halber an gesonderter Stelle aufgeführt sind. Zu den Reagenzien dieses Bezirks zählen u.a. die reverse Transcriptaselösung (RT-Reagenz), PCR-Reagenzien, wie der PCR-Mastermix und ggf. Sonden, Waschpuffer, Elutionspuffer, Laufpuffer, Neutralisierungspuffer, u.a. mehr. Auch die Reagenzienzufuhr ist über Kanäle mit dem Mehrwegeventil verbunden. Diese Kanäle verzweigen sich ggf. in Richtung Probenaufbereitung und Probenbereitstellung.

[0059] In einem weiteren Bezirk sind grundsätzlich als solches bekannte mikrofluidische Mittel für das Durchführen von DNA-Analysen auf einem Mikrofluidik-Chip angeordnet. Diese Mittel umfassen in der Regel Kanäle und/oder Kavitäten, die ein gezieltes Temperieren während der Behandlungsschritte ermöglichen. Auch dieser PCR-Bezirk ist unmittelbar an das Mehrwegeventil angeschlossen und wird bei Bedarf von diesem angesteuert, indem Verbindungen von der Probenzuführung zu diesem Bereich einerseits und zwischen Temperierungs- bzw. Amplifizierungs-Bereich und weiteren Bereichen andererseits hergestellt werden. In einem weiteren Bezirk sind Abmessstrecken zum Abmessen der Probe vor oder nach Behandlungsschritten angeordnet. Es ist besonders vorteilhaft, die Abmessmittel und -strecken in einem geschlossenen Bezirk vorzuhalten, da dort Ventile und Membranabdeckungen erforderlich sind, die sich günstig in einem Bezirk zusammenfassen lassen. Der Bezirk für die Volumenabmessung kann in mehrere, einzeln zugängliche Unterbe-

zirke aufgeteilt sein. Dieser Bezirk stellt zugleich den funktionellen Bereich für die Systementlüftung dar. Auch die Abmessstrecke oder Abmessstrecken sind wiederum direkt mit dem Mehrwegeventil verbunden. Schließlich führt wenigstens ein Kanal vom Mehrwegeventil zu dem Bereich, in dem der Nachweis stattfindet. Dies ist vorzugsweise eine hier als Nachweiskanal bezeichnete längliche Vertiefung für die Nachweismittel. Vorzugsweise kann in den Nachweiskanal ein Lateral-Flow-Streifen eingelegt werden, andere Nachweisformen, z.B. die Adsorption an lose Säulenmaterialien, sind jedoch möglich.

[0060] Die genauere Ausgestaltung der Wege auf dem Mikrofluidik-Modul wird in den **Abb. 3** bis **Abb. 5** dargestellt.

[0061] Zunächst werden anhand von **Abb. 3** erste Aspekte der Struktur des universellen Mikrofluidik-Moduls erläutert sowie die Handhabung immunologischer Proben auf diesem Modul. In einem ersten Bezirk **10** des Moduls sind die Probenzuführung und eine erste Probenaufbereitung zusammengefasst. Es wäre ebenfalls möglich, die Probenvorbereitung und -zufuhr von der Probenaufbereitung in zwei Bezirke zu trennen, was hier jedoch nicht erfolgt ist. Innerhalb des Bezirks **10** gibt es zwei Ports **1a** und **1b**, d.h. Zugänge zur mikrofluidischen Struktur, auf die nicht dargestellte Behälter aufgesetzt werden, die ein zur Aufnahme der zu untersuchenden Probe und ggf. erster mit der Probe unmittelbar zu vermischender Reagenzien geeignetes Volumen besitzen. Die Probenzufuhr erfolgt in diesem Beispiel immer zu Port **1a**. Das Volumen des Gefäßes zu Port **1a** kann wesentlich größer sein als das Volumen des Kanals **1** zwischen Port **1a** und Port **1b** und das Volumen der Kavität **2** zusammengenommen. Das Gefäß zu Port **1b** hat daher vorzugsweise eine entsprechende Größe wie das Gefäß über **1a**, sodass auch größere Probevolumina von **1a** über einen ersten mikrofluidischen Kanal **1** in das Gefäß über **1b** geschleust werden können. Auf dem Wege von **1a** zu **1b** passiert die Probe eine Struktur zur Verlangsamung der Strömung, die in diesem Beispiel durch eine Volumenerweiterung zu einer Kavität **2** bereitgestellt wird. Selbstverständlich sind an dieser Stelle andere Mittel, wie beispielsweise mehrere hintereinander gelegene Kavitäten einsetzbar.

[0062] In einem neben dem Bezirk **10** liegenden bzw. an diesen angrenzenden Bezirk **30** sind Ports **3a** bis **3i** angeordnet, auf die Behälter für die Zufuhr verschiedener Reagenzien aufgesetzt werden können. In diesem Beispiel handelt es sich um neun Ports, es können jedoch ohne weiteres mehr oder weniger Ports verwendet werden. Die Ports **3a** bis **3i** sind über eine Kanalstruktur **3** mit Kanälen **3**, **3'** und **3''** über die Kavität **2** untereinander, sowie mit der Probenzuführungs- und -aufbereitungszone **10** mit Kanal **1** verbunden. Zusätzlich ist die Kanalstruktur **3** aus Bezirk

30 mit dem Mehrwegeventil **6** verbunden, um von dort mit weiteren Strukturen verknüpft werden zu können. Hierdurch wird sichergestellt, dass die Reagenzien sowohl über Kanal **1** und Kavität **2** mit der Probe vermischt werden können, als auch über das Mehrwegeventil **6** anderen Strukturen zugeführt werden können. Von Port **3g** führt ein Kanal **8'** zum Anschluss **8a** an dem Nachweiskanal **80** für die Nachweisstrecke. Soweit erforderlich kann über Port **3g** Laufpuffer für einen Nachweisstreifen oder ein anderes Nachweismittel, zum Beispiel in Form eines losen Materials (miniaturisierte Säule) zugeführt werden.

[0063] Das Mehrwegeventil **6** ist hier als Drehventil ausgebildet und besitzt einen zylindrischen Ventilkörper in einem im Substrat des Mikrofluidik-Chips **100** ausgebildeten Ventilsitz. Es besitzt in diesem Beispiel sechs Ein- bzw. Ausgänge **6a** bis **6f**, nämlich einen zentralen Zugang **6a** sowie fünf am Umfang angeordnete Zugänge, die durch Drehen des Ventilkörpers mit den zum Ventil **6** führenden Kanälen ausgerichtet werden können. Der Ventilkörper besitzt drei Verbindungskanäle, die es ermöglichen, jede für die durchzuführenden Tests erforderliche Auswahl an Kanalverknüpfungen zu treffen. Das Mehrwegeventil **6** bewerkstelligt dies mit drei Verbindungskanälen, einem ersten Verbindungskanal **61** vom zentralen Zugang **6a** zu einem peripheren Ventileingang, einem zweiten Verbindungskanal **62**, der zwei am Umfang nebeneinander zum Ventil führende Kanäle miteinander verknüpfen kann, und einem dritten Verbindungskanal **63**, der einen zum Mehrwegeventil **6** führenden Kanal mit dem übernächsten zum Ventil **6** führenden Kanal verknüpfen kann, hier die Zugänge **6d** und **6f**. Im vorliegenden Beispiel sind die Verbindungskanäle **61** und **62** ungenutzt, und es wird lediglich die Verknüpfung zwischen Kanal **3** und Kanal **8** zum Zugang **8b** auf dem Nachweiskanal **80** hergestellt. Alle weiteren zum Mehrwegeventil **6** von den Bezirken kommenden Kanäle enden tot, sind also bei dem jeweiligen Behandlungsschritt des Nachweisverfahrens unbeteiligt.

[0064] Die Bezirke **40** und **70** werden im Zuge von **Abb. 4** erläutert.

BEISPIELE ZU IMMUNOLOGISCHEN TESTVERFAHREN

[0065] Im Folgenden werden zwei Beispiele angegeben, wie immunologische Tests mit dem in **Abb. 3** und **Abb. 4** gezeigten Ausführungsbeispiel des universellen Mikrofluidik-Moduls durchgeführt werden können.

BEISPIEL 1 – Methode a)

Immunologischer Nachweis des Schwangerschaftshormons hCG aus Urin

[0066] Es wird Bezug genommen auf **Abb. 3**. Das Mikrofluidik-Modul **100** liegt ausgestattet mit einem für den immunologischen Nachweis des Schwangerschaftshormons hCG geeigneten Teststreifen vor. Dabei handelt es sich um einen Lateral-Flow-Streifen (LFD: "lateral flow dipstick", deutsch auch LF-Streifen). Der Streifen wird vom Hersteller des Mikrofluidik-Moduls oder ggf. in einem Labor kurz vor dem Test in die Ausnehmung (den Nachweiskanal **80**) eingelegt, die danach abgedeckt wird.

[0067] Das Mikrofluidik-Modul **100** ist dafür ausgelegt, dass auf die Zugänge zu den einzelnen mikrofluidischen Strömungsleitungen oder Kanälen **1** und **3** bis **8**, an sogenannten Ports **1a**, **1b** und **3a** bis **3i**, Behälter für Probenlösungen und Reagenzien aufgesteckt werden können. Viele Analysengeräte sind dafür ausgelegt, eine Kassette aufzunehmen, die das Mikrofluid-Modul **100** enthält oder mit diesem zusammengesetzt ist. Die Kassette kann so ausgebildet sein, dass sie den einzelnen Fluidbehältern Halt gibt. Auch können die Behälter in einem so genannten Reagenzien-Modul zusammengefasst sein, um die Handhabung zu vereinfachen. Dies ist unten noch näher ausgeführt.

[0068] Im vorliegenden Falle wird nur ein einziger Behälter für die Urinprobe benötigt, der auf den Port **1a** aufgesetzt werden muss. Hierfür kann entweder ein einzelner Behälter auf Port **1a** aufgesetzt werden oder es kann die genannte, hier nicht dargestellte Kassette mit dem Mikrofluidik-Modul zusammengesteckt werden, wonach die zu untersuchende Urinprobe in das Gefäß zu Port **1a** eingefüllt und das Gefäß danach verschlossen wird. Die derart abgeschlossene Kassette wird in das zugehörige Analysengerät eingelegt. Anschließend wird die zur Analyse passende Ablaufsteuerung gestartet, die folgende Schritte durchführt: die Flüssigkeit aus dem Behälter zu Port **1a** wird durch Kanal **1** und die Kanäle **3''** und **3** unter den Ports **3h** und **3i** hindurch zur Ventilverbindung **6f**, dann durch den Verbindungskanal **63**, von Ventilverbindung **6d** über Kanal **8** zum Nachweiskanaleingang **8b** bewegt und damit dem Nachweismittel, also hier dem LFD, zugeführt. Die Bewegung der Flüssigkeit, nämlich der Urinprobe, kann beispielsweise pneumatisch erfolgen. Die Ports **1b** und **3a** bis **3i** sind während des Flüssigkeitstransports verschlossen; die Entlüftung erfolgt über Port **7h** (s.u.). Zunächst wird in diesem Beispiel der Behälter oberhalb von Port **1a** mit Druckluft beaufschlagt, die die Probe durch die genannten Kanäle zum Nachweisbereich **80** transportiert. Um die Probe mit dem Analyten daran zu hindern, an der Stelle der Abzweigung des Kanals von Kanal **1** in eine für andere Zwecke

dort vorhandene Kavität **2** und weiter in Richtung der Ports **1b** und **3a**, **3b** und **3d** zu fließen, werden die Ports **1b**, **3a**, **3b** und **3d** mit Absperrmitteln bzw. verschlossenen Ventilen versperrt. Die in der Kavität **2** und den dahinter liegenden Kanälen **1** und **3** befindliche Luft verhindert dann, dass die Probenflüssigkeit in diesen Bereich eindringt. Die in Fließrichtung vor der Urinprobe befindliche Luft entweicht über die Entlüftung des Nachweiskanals **80** über den Anschluss **8c** und die damit verbundene und durch eine gasdurchlässige Membran verschlossene Öffnung **7h**. Sobald die Probe sich im Nachweiskanal **80** befindet und den Lateral-Flow-Streifen benetzt, beginnt sich dieser von selbst zu entwickeln und zeigt nach einer gewissen Zeit das Testergebnis an. Die Auslesung erfolgt optisch durch ein Fenster oder mit einer optischen bzw. spektroskopischen Einrichtung am Analysegerät. Diese Verfahren sind grundsätzlich bekannt und werden hier nicht im Einzelnen ausgeführt. Wie ersichtlich, wird bei diesem Beispiel nur ein sehr geringer Teil der Struktur des Mikrofluidik-Moduls **100** verwendet, während weitere Bereiche durch die Stellung des Mehrwegeventils **6** stillgelegt sind, durch ihre Position unbeteiligt sind, oder durch Druckluft freigehalten werden. Auch das Programm, das auf dem Analysegerät abläuft, ist einfach: Verbinden der Ventileinlässe **6f** und **6d** mittels Verbindungskanal **63**, Verschließen der Ports **1b**, **3a** bis **3i**, Öffnen der gasdurchlässig verschlossenen Öffnung **7h**, Überdruck anlegen auf Port **1a**, Entwicklung des LFD abwarten.

BEISPIEL 2 – METHODE b)

Immunologischer Nachweis aus
Blut unter Aufreinigung der Probe

[0069] Es wird Bezug genommen auf **Abb. 4a**. Die **Abb. 4 (Abb. 4a, Abb. 4b)** zeigt dasselbe Ausführungsbeispiel für ein Mikrofluidik-Modul **100** wie **Abb. 3**, nur mit anderen, in **Abb. 4a** und **Abb. 4b** verschiedenen Stellungen des Ventils **6**. Wie zu Beispiel 1 beschrieben, wird das Mikrofluidik-Modul **100** zunächst mit einem für das Testverfahren geeigneten Lateral-Flow-Streifen versehen, die Kassette wird zusammengesteckt und die Gefäße oberhalb folgender Ports werden wie folgt befüllt:

Gefäß zu Port **1a** – mit paramagnetischen Partikeln mit einer Oberfläche, die mit CaptAvidin beschichtet ist und einen mit Biotin gekoppelten Antikörper gegen das nachzuweisende Ziel-Antigen enthält
Gefäß zu Port **3a** – Waschpuffer
Gefäß zu Port **3d** – Elutionspuffer
Gefäß zu Port **3i** – Neutralisierungspuffer
Gefäß zu Port **3g** – für die immunologische Detektion auf dem LFD geeigneter Laufpuffer

[0070] Nachdem die Kassette wie angegeben zusammengefügt wurde oder die einzelnen Gefäße auf die Ports aufgesteckt wurden, wird die zu untersuchende Blutprobe in das Gefäß **1a** gegeben, das ver-

schlossen wird. Die Kassette wird in das Analysegerät eingelegt und die zur Analyse gemäß diesem Beispiel passende Ablaufsteuerung wird gestartet. Es werden folgende Schritte durchgeführt:

In das Gefäß zu Port **1a** wird von unten Luft gepumpt, um durch die Bewegung die Durchmischung der paramagnetischen Partikel in der Analytenlösung zu gewährleisten. Dabei reagiert der Antikörper mit dem Zielantigen aus dem Blut und das an den Antikörper gekoppelte Biotin mit dem CaptAvidin auf den paramagnetischen Partikeln. Danach wird die Flüssigkeit aus dem Gefäß zu Port **1a** in ein leeres Gefäß zu Port **1b** bewegt. Dies kann wie oben beschrieben pneumatisch geschehen. Auf dem Weg dorthin wird die Probenflüssigkeit durch die Kavität **2** geführt, die durch ihre Querschnittserweiterung eine Struktur zur Verlangsamung der Strömung darstellt. Unterhalb der Kavität **2** befindet sich in der Kassettenhalterung des Steuergeräts ein Magnet. Es kann sich um einen durch das Analyseprogramm gezielt zur Kavität **2** hin- und von der Kavität **2** wegbewegbaren Dauermagneten, einen permanent dort befindlichen Dauermagneten oder einen schaltbaren Elektromagneten handeln. Die Anziehungskraft des Magneten auf die paramagnetischen Partikel muss groß genug sein, um die Partikel, an die das nachzuweisende Antigen gebunden ist, in der Kavität **2** festzuhalten, während die restliche Flüssigkeit der Probe in das Gefäß zu Port **1b** bewegt wird. Anstelle der in dieser Abbildung dargestellten Kavität **2** kann sich eine andere Struktur, bspw. eine mäandrierende Kanalstruktur oder ähnliches befinden. Wesentlich ist, dass die magnetgebundenen Antigene dort festgehalten werden, während die flüssige Probe im Übrigen ungehindert in Richtung **1b** weiterströmen kann. Anschließend wird der Waschpuffer aus dem Gefäß zu Port **3a** durch die Kanäle **3'** und **1** und die Kavität **2** in Richtung des Gefäßes zu Port **1a** bewegt. Dabei werden die Partikel in Kavität **2** durch den Magneten festgehalten und „gewaschen“. Substanzen, die möglicherweise die folgenden Reaktionen stören, aber nicht an die Partikel gebunden sind, werden hingegen gelöst und damit in Gefäß **1a** weiterbewegt. Nachdem dies erfolgt ist, wird der Elutionspuffer aus dem Gefäß zu Port **3d** in das Gefäß zu Port **3i** mit dem Neutralisierungspuffer bewegt. Bei seinem Transport durch die Kavität **2** löst der Elutionspuffer die Bindung zwischen dem CaptAvidin auf den Partikeln und dem Biotin. Die so freigesetzten biotinylierten Antikörper werden im Elutionspuffer gelöst und mit ihm zusammen in das Gefäß zu **3i** transportiert. Dort neutralisiert der Neutralisierungspuffer den pH-Wert der Lösung. Die daraufhin in dem Gefäß zu Port **3i** vorhandene Flüssigkeit wird über die Ventilverbindung **6f** und den Verbindungskanal **62** zu Ventilanschluss **6e** und von dort über den Kanal **7** unterhalb der Nachweiszone **80** und nicht mit dieser Nachweiszone verbunden zu der mit einer gasdurchlässigen Membran verschlossenen Öffnung **7e** bewegt. Die ebenfalls gasdurchlässig verschlossenen Öffnungen **7g** und **7i** sind während die-

ses Vorgangs geräteseitig gasdicht abgesperrt. Die Probenflüssigkeit kann nicht durch die Membranen entweichen. Danach stellt das Multifunktionsventil eine Verbindung von Anschluss **6e** zu Anschluss **6d** her, wie in **Abb. 4b** gezeigt, sodass durch einen Überdruck auf den Anschluss **7i** (oder **7g**) ein definiertes Volumen der im Kanal zwischen **6e** und **7i** (bzw. **7g**) befindlichen Flüssigkeit über die Öffnung **8b** auf den Lateral-Flow-Streifen bewegt werden kann. Die Struktur **70** auf dem Mikrofluidik-Modul **100** bildet eine Struktur mit Abmessstrecken, die zum Abmessen von Probenvolumina in verschiedenen Stadien eines Tests genutzt werden kann. Durch die Struktur **70** mit den Kanälen **7**, **7'**, **7''** und den Ventilen oder Absperrrichtungen **7a** bis **7i** werden die in **Abb. 1** als „Abmessen“ bezeichneten Testschritte durchgeführt. Die Öffnungen **7a** bis **7i** sind jeweils gasdurchlässig verschlossen und gesteuert durch das Analysegerät nach den jeweiligen Erfordernissen gasdicht absperrbar. Sie stellen daher Absperrrichtungen bzw. Ventile dar. Wenn das abgemessene Volumen der Probenflüssigkeit, die die biotinylierten Antikörper enthält, komplett auf dem Lateral-Flow-Streifen in dem Nachweiskanal **80** angekommen ist, wird der Laufpuffer aus dem Gefäß zu Port **3g** auf Öffnung **8a** des Lateral-Flow-Streifenbereichs **80** bewegt. Der LFD beginnt sich zu entwickeln und zeigt nach einer gewissen Zeit das Testergebnis an.

BEISPIEL 3 – Methode c1)

Molekularer Nachweis von Legionellen-DNA aus einem Wasserfilter mittels PCR.

[0071] Es wird Bezug genommen auf **Abb. 5**. Darin ist wiederum dasselbe Ausführungsbeispiel eines Mikrofluidik-Moduls nach der Erfindung dargestellt; **Abb. 5a** bis **Abb. 5c** zeigen verschiedene Einstellungen des Mehrweventils **6**.

[0072] Das Mikrofluidik-Modul **100** ist vor dem Test mit einem für molekulare Diagnostik geeigneten Lateral-Flow Streifen versehen worden. Die in die Kassette einzusetzenden Gefäße, die sich in einem Reagenzien-Modul befinden können, werden wie folgt befüllt:

Gefäß zu **1a** – paramagnetische Partikel mit einer Oberfläche aus Silica sowie einem Lysis-Puffer;
 Gefäß zu **1b** – passender Bindungspuffer;
 Gefäß zu **3h** – passender Elutionspuffer;
 Gefäß zu **3a** – Waschpuffer;
 Gefäß zu **3d** – Waschpuffer;
 Gefäß zu **3i** – PCR-Mastermix, bestehend aus zwei Oligonukleotiden, die von ihrer Sequenz her als Primerpaar für eine spezifische Legionellen-PCR geeignet sind und von denen eines markiert ist und das andere nicht markiert ist, daneben für die PCR notwendige Polymerase und sonstige Substanzen wie z.B. Magnesium-Chlorid;

Gefäß zu **3f** – Sonden-Oligonukleotid mit einer zweiten Markierung, dessen Sequenz so an den durch das Primerpaar amplifizierten Abschnitt der Legionellen-DNA bindet, dass sich ein doppelmarkierter DNA-Komplex bilden kann. Die Markierungen des einen Primers und der Sonde sind dabei so gestaltet, dass eine Markierung von der Fänger-Substanz auf den Partikeln des Lateral-Flow Streifens festgehalten wird und die andere Markierung von der auf der Membran des Lateral-Flow Streifens immobilisierten Fänger-Substanz;

Gefäß zu **3g** – ein für die molekulare Detektion geeigneter Laufpuffer für den Lateral-Flow Streifen.

[0073] Zur Durchführung der Analyse wird die Kassette, wie in den vorigen Beispielen beschrieben, vom Anwender zusammengesteckt. Der zu untersuchende Wasserfilter wird in das Gefäß zu Port **1a** eingelegt und das Gefäß wird verschlossen. Die abgeschlossene Kassette wird in das Analysegerät eingelegt und die zu dieser Analyse passende Ablaufsteuerung wird gestartet. Es werden folgende Schritte durchgeführt:

Es wird nun Bezug genommen auf **Abb. 5a**. In das Gefäß zu Port **1a** wird von unten Luft gepumpt, um durch die Bewegung das Ablösen der Bakterienzellen vom Wasserfilter und die Durchmischung der paramagnetischen Partikel in der Lösung zu verbessern. Parallel dazu wird die Lösung in dem Gefäß zu Port **1a** durch einen geeignet im Analysegerät angeordneten Heizer für eine festgelegte Dauer soweit erhitzt, dass die DNA unter den Bedingungen des Lysis-Puffers aus den Zellen freigesetzt wird. Im nächsten Schritt wird der Bindungspuffer aus dem Gefäß zu Port **1b** in das Gefäß zu Port **1a** bewegt. Die Legionellen-DNA bindet unter den Bedingungen des Bindungspuffers an die Silica-Oberfläche der paramagnetischen Partikel. Anschließend wird die Flüssigkeit aus Gefäß **1a** in das Gefäß **1b** bewegt. Auf dem Wege dorthin passiert die Flüssigkeit die Kavität **2**, unter der sich – wie oben schon dargestellt – ein Magnet befindet. Wiederum werden die mit den paramagnetischen Partikeln gekoppelten Teilchen in der Struktur der Kavität **2** festgehalten, während die restliche Flüssigkeit im Gefäß zu **1b** bewegt wird. Anschließend wird der Waschpuffer aus dem Gefäß zu **3a** durch die Kavität **2** und damit über die Partikel in Richtung des Gefäßes zu Port **1a** bewegt. Dabei werden die Partikel in der Kavität **2** durch den Magneten festgehalten. Substanzen, die möglicherweise die folgenden Reaktionen stören und nicht an die Partikel gebunden sind, werden gelöst und damit weiter transportiert und in Gefäß zu **1a** überführt. Dieser Vorgang wird mit dem Waschpuffer aus dem Gefäß zu **3d** wiederholt. Danach wird der Elutionspuffer aus dem Gefäß zu Port **3h** in die Struktur mit der Kavität **2** bewegt. Unter dem Einfluss dieses Puffers löst sich die DNA von den Partikeln. Anschließend wird die Lösung, die nun die freigesetzte DNA aber keine Partikel enthält, in Richtung des Anschlusses **7b** bewegt, wobei das

Mehrwegeventil **6** über den Verbindungskanal **63** eine Verbindung zwischen den Anschlüssen **6f** und **6b** herstellt. Die Luft vor dem Flüssigkeitstropfen entweicht durch die für Gase durchlässige Membran auf der Öffnung **7b** bis der Pfropfen diese für Flüssigkeit undurchlässige Membran berührt. Die Probenflüssigkeit strömt dabei unter den gasdurchlässig verschlossenen, aber geräteseitig gasdicht abgesperrten Öffnungen **7a** und **7c** hindurch.

[0074] Es erfolgt nun eine programmgesteuerte Drehung des Mehrwegeventils **6** in der Weise, dass eine Verbindung zwischen den Anschlüssen **6f** und **6e** hergestellt wird, eine Ventilstellung, wie im vorausgegangenen Beispiel für einen immunologischen Test in **Abb. 4a** gezeigt. Mit Hilfe von Überdruck auf die Anschlüsse **7e**, **7g** und **7i** kann nun der restliche Anteil der Flüssigkeit aus dem Kanal **3** zwischen **6f**, **3i** und **3h** durch die Kavität **2** und Kanal **1** in das Gefäß zu **1b** gespült werden. Im folgenden Schritt stellt das Mehrwegeventil **6** programmgesteuert wieder eine Verbindung zwischen den Anschlüssen **6f** und **6b** durch Verbindungskanal **63** her, wie in **Abb. 5a** gezeigt. Mit Überdruck auf den Anschluss **7c** (oder **7a**) kann nun ein definiertes Volumen der im Kanal **7'** zwischen **6b** und **7c** (bzw. **7a**) befindlichen Flüssigkeit in das Gefäß zu **3i** mit dem PCR-Mastermix bewegt werden. Damit ist der PCR-Ansatz hergestellt, der die nachzuweisende Legionellen-DNA, die Polymerase, die beiden Primer und die restlichen für eine PCR notwendigen Reagenzien enthält.

[0075] Die Polymerase-Kettenreaktion wird innerhalb der Struktur bzw. des Bezirks **40** verwirklicht. Bezirk **40** enthält eine mäandernde Kanalstruktur aus den Teilabschnitten **4a**, **4b** und **4c** sowie hier zusätzlich eine Kavität **5** für weitere Funktionen, zum Beispiel Auffangen oder Ausgleichen. Durch darunterliegende Heizer im Analysegerät werden diese Bezirke auf die für den jeweiligen Arbeitsschritt erforderlichen Temperaturen aufgeheizt, und zwar Abschnitt **4a** auf die Schmelztemperatur der Primer, Abschnitt **4b** auf 72°C und Abschnitt **4c** auf 95°C. Der PCR-Ansatz wird aus Gefäß **3i** über Kanal **3** zur Verbindung **6f** des Mehrwegeventils **6** und von dort über Verbindungskanal **61** zum Ventilzugang **6a** transportiert, wie in **Abb. 5b** gezeigt. Von dort gelangt der PCR-Ansatz in die Mäander-Struktur mit den Teilbereichen **4a**, **4b** und **4c** bis die Flüssigkeit eine hinter **4c** angeordnete, in der Zeichnung nicht dargestellte, Lichtschranke auslöst.

[0076] Es erfolgt nun im PCR-Ansatz die Denaturierung. Danach wird die zu untersuchende Flüssigkeit in die Teilstruktur **4a** bewegt, wo das Annealing der Primer an die nachzuweisende DNA stattfindet. Danach wird die zu untersuchende Flüssigkeit in Detailstruktur **4b** bewegt, wo die Polymerase die Primer anhand der vorliegenden Legionellen-DNA zu einem Doppelstrang komplettiert, sofern der Test posi-

tiv verläuft (Elongation). Die Abfolge der Teilschritte: Denaturieren, Annealing und Elongation entspricht einem PCR-Zyklus und wird so oft wiederholt, bis die im Programm definierte Anzahl von PCR-Zyklen erreicht ist. Nach Abschluss der letzten Elongation wird die Flüssigkeit, die jetzt viele markierte Amplifikate enthält, über das Mehrwegeventil **6** über Verbindungskanal **61** von **6a** zu **6f** in Richtung **3f** bewegt und in dem darüber liegenden Gefäß aufgefangen, wo die Probenflüssigkeit nun die Oligonukleotid-Sonden aufnimmt. Danach wird die Lösung wieder zurück in die Mäander-Struktur bewegt, bis die Flüssigkeit in der Teilstruktur **4c** positioniert ist. Hier denaturieren die markierten Amplifikate. Ein Transport auf die Teilstruktur **4a** temperiert die Lösung so, dass die markierten Sonden an die markierten Amplifikate hybridisieren. Die Flüssigkeit mit den so doppelt markierten Amplifikaten der Legionellen-DNA wird nach programmgesteuerter Drehung des Mehrwegeventils **6** wie nun in **Abb. 5c** gezeigt durch den Verbindungskanal **61** von **6a** zu **6e** in den Kanal **7** bis zu der mit einer gasdurchlässigen Membran verschlossenen Öffnung **7e** bewegt. Die Flüssigkeit kann nicht durch diese Membran entweichen. Anschließend wird das Mehrwegeventil **6** programmgesteuert so eingestellt, dass wieder eine Verbindung von **6e** zu **6d** über Verbindungskanal **62** hergestellt wird, wie in **Abb. 5a** gezeigt. Durch einen Überdruck auf den Anschluss **7i** (oder **7g**) wird ein definiertes Volumen der im Inneren des Kanals **7** zwischen **6e** und **7i** (bzw. **7g**) befindlichen Flüssigkeit über Kanal **8** und die Öffnung **8b** auf den Lateral-Flow Streifen bewegt. Wenn dieses Volumen der Flüssigkeit, die die doppelt markierten DNA-Komplexe enthält, komplett auf dem Lateral-Flow Streifen ist, wird der Laufpuffer aus dem Gefäß zu Port **3g** durch Kanal **8'** und über Öffnung **8a** der Nachweiszone **80** auf den Lateral-Flow Streifen bewegt. Dieser beginnt daraufhin sich zu entwickeln und zeigt nach einer gewissen Zeit das Testergebnis an.

BEISPIEL 4 – Methode c2)

Molekularer Nachweis von Legionellen-DNA aus einem Wasserfilter mittels Hybridisierung während der PCR.

[0077] In diesem Beispiel sind die in Beispiel 3 beschriebenen Sonden unmittelbar im PCR-Mastermix enthalten. Es reicht dann ein abschließender Erwärmungsschritt im Anschluss an die vollständig in Zone **40** durchgeführte Polymerase-Kettenreaktion, um die Hybridisierung ablaufen zu lassen. Die separate Aufnahme des Hybridisierungsmixes kann daher entfallen. Im Übrigen ist der Testablauf wie in Beispiel 3 anhand von **Abb. 5** beschrieben.

BEISPIEL 5 – Methode d)

Serotypen-Differenzierung von Dengue Viren mittels Zweischritt-RT-PCR.

[0078] Da Dengue Viren zu den RNA-Viren gehören, muss RNA erst in DNA umgeschrieben werden, bevor diese DNA mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion wie oben detektiert werden kann. Das Umschreiben erfolgt üblicherweise mit einem als „reverse Transkriptase“ (RT) bezeichneten Enzym. Im Vergleich mit der im vorigen Beispiel beschriebenen DNA-Detektion (s. **Abb. 5**) sind folgende Änderungen erforderlich:

Das Mikrofluidik-Modul **100** wird vom Hersteller mit einem für den molekularen Nachweis von vier Zielmolekülen geeigneten Lateral-Flow Streifen versehen. Das Gefäß zu **3c** enthält einen RT-Mastermix, der aus dem RT-Enzym, den geeigneten Puffer-Reagenzien sowie den für die reverse Transkriptase notwendigen Oligonukleotiden besteht. Das Gefäß zu Port **3i** enthält einen PCR-Mastermix, der zum einen aus vier Oligonukleotid-Paaren besteht, die von ihrer Sequenz her für je eine spezifische PCR der vier Dengue-Serotypen geeignet sind und von denen ein Oligo markiert ist und das andere nicht. Neben den acht Oligonukleotiden enthält der PCR-Mastermix noch die für die PCR notwendige Polymerase und sonstige Substanzen wie z. B. Magnesium-Chlorid. Das Gefäß zu Port **3f** enthält vier Sonden-Oligonukleotide mit jeweils einer zweiten Markierung, deren Sequenz so an die durch Primer-Paare amplifizierte Abschnitte der Dengue-DNA bindet, dass sich doppelt markierte DNA-Komplexe bilden können. Die Markierungen des jeweils einen Primers und der jeweiligen Sonden sind dabei so gestaltet, dass eine Markierung von der Fänger-Substanz auf den Detektionspartikeln des LF-Streifens festgehalten wird und die anderen Markierungen von jeweils einer der auf der Membran des LF-Streifen immobilisierten Fänger-Substanzen.

[0079] Der Ablauf unterscheidet sich von Beispiel 3 lediglich darin, dass der RT-Schritt eingefügt wird. Dazu wird die erste abgemessene Flüssigkeitsmenge in das Gefäß zu Port **3c** geleitet und nicht in das zu **3i**, bevor der so entstandene Mix in Teilstruktur **4a**, die wie in den übrigen Beispielen geeignet temperiert ist, inkubiert wird. Nach einer definierten Zeit wird dieser Mix in das Gefäß zu Port **3i** geleitet, wo er sich mit dem PCR-Mastermix vermischt. Ab diesem Schritt folgt das weitere Prozedere dem Ablauf wie im Beispiel 3. Im Unterschied zu Beispiel 3 kann der in diesem Beispiel verwendete LF-Streifen für jeden Serotyp eine Linie anzeigen.

BEISPIEL 6 – Methode e)

Dengue Viren mit Serotypen, nachgewiesen mittels Einschritt-RT-PCR.

[0080] Dieser RNA-Nachweis nutzt Enzyme, die sowohl RT- als auch PCR-Aktivität besitzen. Im Vergleich mit der in Beispiel 5 beschriebenen RNA-Detektion mit getrennten RT- und PCR-Schritten („Zweischritt“) sind folgende Änderungen erforderlich: Das Gefäß zu Port **3i** enthält einen RT-PCR-Mastermix, der aus dem Enzym, den geeigneten Pufferreagenzien sowie den oben beschriebenen Oligonukleotiden besteht. Der Ablauf entspricht dem Ablauf der in Beispiel 5 beschriebenen RNA-Detektion mit getrennten RT- und PCR-Schritten („Zweischritt“), wobei die erste abgemessene Flüssigkeitsmenge in das Gefäß zu Port **3i** geleitet wird, bevor die RT-Inkubation erfolgt. Weiterhin entfallen die Schritte zur Aufnahme des PCR-Enzyms. Das Vorgehen entspricht der Prozedur beim DNA-Nachweis, ergänzt um einen zusätzlichen Inkubationsschritt vor der PCR.

[0081] **Abb. 6** zeigt die in den Beispielen genutzten Ventilstellungen des Mehrwegeventils **6** in einer Schnittansicht durch den Ventilkörper in der Ebene der Kanäle, um nochmals zu verdeutlichen, dass die verschiedenen erforderlichen Wege auf dem Mikrofluidik-Chip **100**, wie zuvor dargestellt, mit Hilfe eines einzigen, im Beispiel drehbaren Ventils verwirklicht werden können. Die **Abb. 6.1**) bis **Abb. 6.5**) zeigen das Mehrwegeventil **6** in verschiedenen Stellungen des Drehkörpers bei festem Ventilsitz mit den Kanalzugangspunkten **6a** bis **6f**, die hinter der Schnittebene liegen und hier zur Orientierung gestrichelt dargestellt sind. In den hier nicht dargestellten Ventilsitz treten sechs Kanäle der mikrofluidischen Struktur ein, von denen fünf an den peripheren Zugangspunkten **6b** bis **6f** münden und ein Kanal am zentralen Zugangspunkt **6a**. Die peripheren Zugangspunkte sind jedoch nicht gleichmäßig über den Umfang des Ventilsitzes verteilt, was die Möglichkeit bietet, bestimmte Kanäle abzusperrern, während andere mit Hilfe der Verbindungskanäle **61**, **62** und **63** auf dem Ventil überbrückt und dadurch miteinander verbunden werden. Die Verbindungskanäle **61**, **62** und **63** sind so ausgestaltet, dass der zum zentralen Eingang **6a** führende Kanal wahlweise mit einem der peripher eintretenden Kanäle verbunden werden kann, und zwar je nach Ventilstellung mit jedem dieser Kanäle. Verbindungskanal **62** ermöglicht das Verbinden zweier benachbarter peripher eintretender Kanäle und Verbindungskanal **63** ermöglicht das Verbinden eines peripher eintretenden Kanals mit dem übernächsten peripher eintretenden Kanal. Die Anordnung der Verbindungskanäle ist dadurch so gewählt, dass ganz bestimmte Verbindungsmuster verwirklicht werden können. Dies ermöglicht die Durchführung verschiedenster Testkonfigurationen.

[0082] Selbstverständlich ist es möglich, das Ventil anders auszugestalten. Anstelle des Drehventils kann auch ein Schiebeventil vorgesehen sein, was jedoch eine andere Aufteilung der Bezirke **10**, **30**, **40** und **70** relativ zum Nachweisbereich **80** erfordert.

[0083] **Abb. 7** veranschaulicht sehr schematisch die Position einer Kassette **200** mit einem Mikrofluidik-Modul **100** innerhalb eines Analysengerätes **400** mit einer für die Kassette **200** vorgesehenen Ausnehmung **410**. Die Ausnehmung **410** ist gewöhnlich so gestaltet, dass die Kassette **200** passgenau eingelegt werden kann. Das Mikrofluidik-Modul **100** besitzt eine ebene Bodenplatte **120**, mit der sie auf einer gegengleich geformten (Kassetten-)Halterung **420** des Geräts **400** aufliegt. Hierdurch ist es möglich, über die Kontaktfläche der Halterung **420** gezielt Einfluss auf die bodennahe Kanalstruktur im Mikrofluidik-Modul **100** zu nehmen, wie nachfolgend noch beschrieben. Die Kassettenhalterung innerhalb des Geräts **400** umfasst hier die Dichtblöcke **430** mit den Teilstrukturen **430'**, **430''** und **430'''**, die die Kassette von „oben“, das heißt von der Behälter- und Reagenzien-Modulseite gegen die Halterung **420** drücken und fixieren. Der Dichtblock **430** besteht aus dichten Untereinheiten, nämlich den Dichtblöcken **430'** und **430'''**, die die Öffnungen an der Oberseite der Ports des Mikrofluidik-Moduls zugeordneten Gefäße, die sich hier innerhalb eines Reagenzien-Moduls **300** befinden, abdichten, und dem zweiten Dichtblock **430''** oberhalb der durch die Membranen verschlossenen Öffnungen **7a** bis **7i**. Das Analysegerät **400** umfasst neben Mitteln zum Halten der Kassette **200** einschließlich des Mikrofluidik-Moduls **100** einen Stellmotor und ein Stellglied **406** für das Mehrwegeventil **6**, mindestens eine Pumpe für Gas und/oder Flüssigkeiten, Heizer, optional eine oder mehrere Lichtschranken, Druck- und Temperatur-Sensoren, einen Magneten und Mittel für die Ablaufsteuerung. Der Bereich **20** für die Anordnung des Magneten unterhalb der Kavität **2** des Mikrofluidik-Moduls **100** ist mit gestrichelten Linien angedeutet. Weiterhin sind die Bereiche **41**, **42** und **43** mit gestrichelten Linien angegeben, in denen sich die Heizer für die Temperierung des PCR-Bereichs **40** befinden. In diesem Beispiel vorhandene Lichtschranken sind hier mit den Pfeilen **44** bis **46** angedeutet, zum Beispiel **44** am Ende des Bezirks **4c** des PCR-Kanal-systems. Für die Handhabung des in den Beispielen näher erläuterten universellen Mikrofluidik-Moduls **100** und der zugehörigen Kassette **200** umfasst die Halterung weiterhin wenigstens eine Druckluftzuführung **11** für die Beaufschlagung von Komponenten mit Druck und beispielsweise die Durchmischung der Flüssigkeit in Probengefäß zu Port **1a** mit Luft. Weitere Mittel zur Handhabung von der Halterungsseite **420** sind ebenso möglich wie von der Seite des Dichtblocks **430**. Mit zwei Pumpen, die hier sowohl Über- als auch Unterdruck erzeugen können, und mehreren Schaltventilen kann in Kombination mit den

Dichtungsblöcken **430'**, **430''** und **430'''** gewährleistet werden, dass sämtliche Öffnungen der Kassette **200** bzw. des Reagenzien-Moduls **300** individuell mit jeweils unterschiedlichen Drücken versehen werden können. Diese Drücke werden durch die Druck-Sensoren gemessen und überwacht. Durch den Stellmotor mit Stellglied **406** wird der Drehkörper **600** des Mehrwegeventils **6** bewegt und es wird gesteuert, welche Ventilöffnungen über die hier summarisch mit **60** bezeichneten Verbindungskanäle **61**, **62**, **63** verbunden werden. Zusätzliche Lichtschranken **45**, **46** zeigen an, wenn sich Flüssigkeit in ihrem Fokus befindet und erlauben so die Positionierung der Flüssigkeit innerhalb des PCR-Bezirks **40** oberhalb der Temperierungszonen **41** bis **43**. Die Ablaufsteuerung setzt ansonsten in üblicher Weise einzelne Schritte eines Programms in Aktionen bestimmter Geräteelemente um. Das Setzen einer Temperatur für einen Heizer innerhalb der Zonen **41** bis **43** führt beispielsweise dazu, dass der Strom durch diesen Heizer in Abhängigkeit vom Messwert des Temperatursensors (hier nicht dargestellt) geregelt wird, sodass die gewünschte Temperatur konstant bleibt. Weitere Programmschritte sind das Setzen eines Zustands eines Schaltventils, das Drehen des Mehrwegeventils **6** in eine definierte Position, das Positionieren einer Flüssigkeit innerhalb der Kassette **200** usw. Durch Kombination dieser Schritte können komplexe Abläufe verwirklicht werden. Die Ablaufsteuerung kann bestimmte Programmschritte mit üblichen Bedingungen, wie „wenn – dann“ oder „so lange – bis“ verknüpfen. Dadurch lassen sich die Arbeitsschritte unter definierten Bedingungen reproduzieren. Die Probe kann dann innerhalb der Kassette sämtliche Schritte durchlaufen, die für eine diagnostische Analyse erforderlich sind. Wie zuvor beschrieben, werden mit Hilfe der Dichtblöcke **430'**, **430'''** Dichtungen für die Öffnungen der Gefäße zu den einzelnen Ports im Mikrofluidik-Modul **100** hergestellt. Durch diese Dichtblöcke **430'**, **430'''** hindurch wird gezielt Druckluft zur Verfügung gestellt, um die in den Gefäßen befindlichen Flüssigkeiten mit Hilfe von Druckluft in das Kanalsystem des Mikrofluidik-Moduls **100** zu befördern. Die mögliche Aufgabe von Druckluft ist durch die Pfeile an Positionen **11** und **31** dargestellt. Der diesbezügliche Verfahrensablauf wird anhand von **Abb. 8** noch näher erläutert. Weiterhin wird bei dem oben schon beschriebenen Ausführungsbeispiel Druckluft für die Beaufschlagung der geräteseitig durch die Ventile absperrbaren, mit gasdurchlässigen Membranen versehenen Öffnungen **7a** bis **7i** benötigt. Diese Druckluftzufuhr ist mit den Pfeilen an Position **71** verdeutlicht. In dem hier gezeigten Beispiel sind die Gefäße zu den einzelnen Ports des Mikrofluidik-Moduls **100** in einem Reagenzien-Modul **300** zusammengefasst. Dabei kann es sich um ein einheitliches Bauteil handeln, dass bspw. ein Spritzgussteil ist, in dem die Gefäße oder Behälter für die Aufnahme von Probe und Reagenzien ausgeformt sind. Das Reagenzienmodul **300** wird in einem Stück gehandhabt und auf das Mi-

crofluidik-Modul **100** aufgesetzt. Es kann einstückig mit der hier gezeigten Kassette **200** verbunden sein.

[0084] Abb. 8 zeigt den Transport von Flüssigkeiten, nämlich der Probe und der Reagenzien, aus den Gefäßen zu den Ports in die Mikrofluidik-Kanäle im Einzelnen. **Abb. 8.1)** zeigt den Transport einer Probe aus dem Gefäß zu Port **1a** über die Kavität **2** in ein Gefäß mit entsprechendem Volumen zu Port **1b**. Zur Illustration sind zusätzlich flüssigkeitsgefüllte Gefäße zu den Ports **3a** und **3b** gezeigt, deren Verschlüsse **32** verschlossen sind. Durch die Abdichtung dieser Reagenziengefäße wird ein Abfließen der Reagenzienflüssigkeit nach unten durch die Ports **3a** und **3b** verhindert. Für den Transport der Probe von **1a** nach **1b** werden Verschlüsse **12** der zugehörigen Gefäße geöffnet und es wird eine Druckdifferenz zwischen diesen Verschlüssen **12** eingestellt. Dabei wird der höhere Druck auf das gefüllte Probengefäß zu Port **1a** aufgegeben und die Flüssigkeit wird hierdurch in Richtung des niedrigeren Druckes durch Kanal **1** und Kavität **2** zu Port **1b** in das darüber liegende zunächst leere Gefäß gedrückt. Diese Bewegung erfolgt so lange, wie die Druckdifferenz aufrechterhalten wird. Der Transport wird bis zur vollständigen Überführung der Probe in das Gefäß zu **1b** fortgesetzt.

[0085] Abb. 8.2) zeigt den Transport eines Waschpuffers aus dem Gefäß zu Port **3a** durch Kanal **3** und Kavität **2** bis in das Gefäß zu Port **1a**. Wie in **Abb. 8.1** schon dargestellt, sind Gefäße mit geschlossenen Verschlüssen **32** bzw. **12** unbeteiligt. Für den hier durchzuführenden Transport wird das Gefäß zu Port **3a**, das den Waschpuffer enthält, geöffnet. Über den Verschluss **32** wird ein Druck p_2 aufgegeben, der größer ist als der Druck p_1 auf dem geöffneten Probengefäß zu Port **1a**. Die im Gefäß zu Port **3a** befindliche Flüssigkeit, nämlich der Waschpuffer, wird hierdurch durch Kanal **3** und Kavität **2** in das zuvor leere Gefäß zu Port **1a** bewegt. **Abb. 8.3)** und **Abb. 8.4)** zeigen entsprechende Vorgänge für den Transport des Waschpuffers von **3b** über **2** nach **1a** und den Zustand des hier beispielhaft dargestellten Systems nach Ablauf der drei vorstehend beschriebenen Schritte.

[0086] Der Transport innerhalb der Abmessstrecken **7, 7', 7''** erfolgt auf ähnliche Weise. Befüllt wird eine Abmessstrecke dadurch, dass zum ersten das Mehrwegeventil **6** eine Verbindung zwischen dem zur Abmessstrecke gehörenden Ventilansatzpunkt (**6b** bzw. **6e**) und demjenigen Ventilansatzpunkt herstellt, der mit dem Kanal verbunden ist, in dem sich die Flüssigkeit gerade befindet. Zum zweiten muss der mit einer gasdurchlässigen Membran verschlossene Anschluss am Ende der Abmessstrecke (**7b, 7d** bzw. **7e**) geräteseitig geöffnet sein. Und zum dritten muss ein Port, der sich aus Sicht der Abmessstrecke auf der anderen Seite der Flüssigkeit befindet, mit Druckluft beaufschlagt werden. Dadurch wird die Flüssig-

keit aus ihrer Position solange durch Mehrwegeventil und die Kanalstruktur **7, 7', 7''** im Bezirk **70** getrieben, bis die Flüssigkeit an die gasdurchlässige, flüssigkeitsundurchlässige Membran am Ende der Abmessstrecke (**7b, 7d** oder **7e**) stößt. Durch das Öffnen eines Ports jenseits der Abmessstrecke und die Aufgabe von Druckluft auf eine der Membranen der Abmessstrecke (**7b, 7c, 7d** oder **7a** bzw. **7e, 7i** oder **7g**) kann ein definiertes Volumen der Flüssigkeit ebenso wieder zurückgetrieben werden, das heißt das abgemessene Flüssigkeitsvolumen kann zu einem anderen Arbeitsschritt weitertransportiert werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- DE 60014676 T2 [0003]
- WO 2005/028635 A2 [0004]
- EP 2404676 A1 [0006, 0031]
- DE 102008002674 B3 [0007, 0025, 0025, 0032]
- DE 102009045404 A1 [0008, 0031, 0031, 0032]
- WO 2010/141139 A1 [0009, 0030]
- US 2008/0280285 A1 [0016]

Patentansprüche

1. Mikrofluidik-Modul (**100**) für sowohl die immunologische als auch die molekulare Diagnostik an Proben, bei dem in einem Grundkörper Kanäle (**1, 3, 3', 3'', 4, 7, 7', 7'', 8, 8'**) und/oder Kavitäten (**2, 5**) mit Zuflüssen (**1a, 1b, 3a-3i**) für fluide Proben und Reagenzien sowie den Zuflüssen zugeordnete Behälter, Behälteraufnahmen oder Behälteransatzpunkte ausgebildet sind, und das einen Nachweiskanal (**80**) zur Aufnahme eines testspezifischen Nachweismittels besitzt, verbunden oder verbindbar mit Kanälen (**8, 7, 3, 8'**) des Moduls ist, gekennzeichnet durch:

- genau ein Mehrwegeventil (**6**), das in steuerbarer Weise einzelne Kanäle (**3, 4, 7, 7', 7'', 8**) verbindet;
- Kanalstrukturen, nämlich wenigstens Kanäle und/oder Kavitäten für die Probenführung (**1, 3**) einschließlich einer für bestimmte Tests erforderlichen Aufbereitung (**1, 2, 3**), Kanäle für die Reagenzienzuführung (**3, 3', 3''**), eine Kanalstruktur mit Kanälen (**4, 4a, 4b, 4c, 5**) für eine Temperierung und/oder eine DNA-Amplifikation und eine Kanalstruktur (**7, 7', 7''**) für eine definierte Volumenabmessung eines durch bestimmte Kanalabschnitte bewegten Fluids, die alle direkt oder indirekt mit dem einen Mehrwegeventil (**6**) verbunden sind, wobei zumindest Abschnitte der Kanalstrukturen und Kanäle nach ihrer Funktion oder verfahrensmäßigen Behandlung zusammenhängend angeordnete Bezirke (**10, 30, 40, 70**) bilden
- eine Anbindung des Nachweiskanal (**80**) zumindest an die Volumenabmessung (**70**) und die Proben- und Reagenzienzuführung (**10; 1, 2; 30; 3; 8**) über das Mehrwegeventil (**6**).

2. Mikrofluidik-Modul (**100**) nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine an dem Grundkörper ausgebildete Bodenfläche (**120**) für den Kontakt zu einem zugehörigen Analysegerät besitzt und dass einzelne Kanäle (**1, 3, 3', 3'', 4, 7, 7', 7'', 80**) und/oder Kavitäten (**2, 5**) zumindest abschnittsweise nahe der Bodenfläche (**120**) angeordnet sind, um eine Manipulation oder Detektion durch Elemente (**20, 41-46**) des Analysegeräts (**400**) innerhalb von durch das Analysegerät gesteuerten Prozeduren zu erlauben.

3. Mikrofluidik-Modul (**100**) nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Mehrwegeventil (**6**) als Drehventil oder als Schiebeventil ausgebildet ist.

4. Mikrofluidik-Modul (**100**) nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Mehrwegeventil (**6**) Ventilstellungen besitzt, mit denen wenigstens die folgenden Bezirke (**10, 30; 40; 70; 80**) mit ihren zugehörigen Kanalstrukturen und Kanälen (**1, 2, 3, 3', 3'', 4, 4a, 4b, 4c, 5; 7; 7', 7'', 8, 8'**) verbunden werden können:
der Bezirk für die Probenführung (**10; 1, 2, 3, 3', 3''**) mit dem Nachweiskanal (**80**); der Bezirk für die Pro-

benführung (**10; 1, 2, 3, 3', 3''**) mit dem Bezirk zur Volumenabmessung (**70**); der Bezirk für die Probenführung (**10; 1, 2, 3, 3', 3''**) mit dem Bezirk zur Temperierung (**40**); der Bezirk zur Temperierung (**40**) mit dem Bezirk zur Volumenabmessung (**70**); der Bezirk zur Volumenabmessung (**70**) mit dem Nachweiskanal (**80**).

5. Mikrofluidik-Modul (**100**) nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Mehrwegeventil (**6**) Einstellungen besitzt, um die genannten Bezirke (**10, 30, 40, 70, 80**) einschließlich des Nachweiskanal (**80**) in verschiedenen möglichen Kombinationen miteinander zu verbinden.

6. Mikrofluidik-Modul (**100**) nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass Mittel zum Transportieren eines Fluids durch Kanäle des Moduls anschließbar sind, insbesondere Mittel zum Aufbringen von Unter- oder Überdruck, Mittel zum Zuführen von Druckluft in einzelne Kanäle und Mittel zum flüssigkeitsdichten Abführen von Gasen aus einzelnen Kanälen.

7. Kassette (**200**) für die Aufnahme eines Mikrofluidik-Moduls (**100**) nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die für einen form- und/oder kraftschlüssigen Einsatz in eine Halterung (**420**) eines zugehörigen Analysegeräts (**400**) ausgebildet ist.

8. Kassette (**200**) nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Kassette (**200**) ein Interface zwischen Mikrofluidik-Modul (**100**) und Analysegerät (**400**) darstellt, um die durch das Analysegerät (**400**) programmgesteuerte Durchführung von Tests auf dem Mikrofluidik-Modul (**100**) zu erlauben.

9. Kassette (**200**) nach Anspruch 7 oder 8, die ein Mikrofluidik-Modul (**100**) nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält, das mit einem testspezifischen Nachweismittel, insbesondere einem Nachweistreifen, besonders bevorzugt einem Lateral-Flow-Streifen (LFD), ausgerüstet ist.

10. Kassette (**200**) nach einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Kassette mit einem oder mehreren Behältern ausgestattet ist, die einteilig oder mehrteilig ausgebildet und in Zuordnung zu Zuflüssen (**1a, 1b, 3a-3i**) des Mikrofluidik-Moduls (**100**) angeordnet sind und die Volumina für Reagenzien und Proben bereitstellen.

11. Kassette (**200**) nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Behälter innerhalb eines zusammenhängenden Reagenzienmoduls (**300**) ausgebildet sind, wobei das Reagenzienmodul (**300**) mit dem Mikrofluidik-Modul (**100**) auf der der Bodenfläche (**120**) des Mikrofluidik-Moduls abgewandten Seite so verbindbar ist, dass integrierte Behälter mit den Volumina für Reagenzien und Proben an den Be-

hälteransatzpunkten des Mikrofluidik-Moduls aufsitzen, um die Proben und Reagenzien über die Zuflüsse (1a, 1b, 3a–3i) der Kanäle (1, 3, 3', 3'') und/oder Kavitäten (2) zuzuführen zu können.

12. Reagenzienmodul (300) mit darin ausgebildeten Behältern in einer Anordnung, die es erlaubt, Reagenzien und Proben, die in den in das Reagenzienmodul (300) integrierten Behältern vorgelegt werden, über die Behälteransatzpunkte (1a, 1b, 3a–3i) eines entsprechend ausgebildeten Mikrofluidik-Moduls (100) nach einem der Ansprüche 1 bis 6 den Kanälen (1, 3, 3', 3'') und/oder Kavitäten (2, 5) des Moduls zuzuführen.

13. Verfahren zur Durchführung sowohl von immunologischen als auch von molekularen Tests mit Hilfe des Mikrofluidik-Moduls (100) nach einem der Ansprüche 1 bis 6 innerhalb eines Analysegeräts (400), wobei ein Nachweismittel in dem Mikrofluidik-Modul (100) vorgelegt wird und wenigstens eine Probe und gegebenenfalls Reagenzien in einer das Mikrofluidik-Modul (100) umfassenden Kassette (200) nach einem der Ansprüche 7 bis 10 oder in dem Mikrofluidik-Modul selbst vorgelegt sind und dem Kanalsystem des Mikrofluidik-Moduls (100) gerätgesteuert zugeführt werden und wobei die Probe und gegebenenfalls die Reagenzien gesteuert durch das Analysegerät (400) durch mikrofluidische Kanäle (1, 3, 4, 7, 8) geleitet und schließlich nach Durchführung einer Auswahl der gerätgesteuerten Operationen: Transportieren, Waschen, Aufreinigen, Selektieren markierter Moleküle, Durchmischen, Vermischen mit Reagenzien, Reagieren lassen, Temperieren, Heizen, Kühlen und Abmessen dem Nachweismittel zugeführt werden, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein auf dem Analysegerät (400) installierter testspezifischer Programmablauf aus Schritten zusammengestellt wird, die in Bezirken (10, 30, 40, 70, 80) des Mikrofluidik-Moduls (100) ablaufen und die über ein Mehrwegeventil (6), in das Kanäle der Bezirke münden, ausgewählt und in einer Verfahrensschrittfolge verknüpft werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach dem Zuführen einer Probe, die in Abhängigkeit vom gewählten Testverfahren mit Reagenzien vermischt wurde oder nicht und die optional einem Aufreinigungs-, Aufkonzentrierungs- und/oder Selektionsverfahren unterworfen wurde, durch einen mikrofluidischen Kanal (1, 3) zu dem Mehrwegeventil (6) eine durch das gewählte, zum Testverfahren passende Analyseprogramm gesteuerte Auswahl getroffen wird, nach der das Mehrwegeventil (6) durch Verbinden bestimmter Kanäle (3, 4, 7, 8) in den einzelnen Analyseschritten aus folgenden Verfahrensschritten ausgewählt und diese in geeigneter Reihenfolge durchführt:
Transportieren eines Probevolumens, Abmessen eines Probevolumens, Aufreinigen einer Probe, Se-

lektieren markierter Moleküle, Waschen und/oder Aufkonzentrieren eines Analyten, Amplifizieren von DNA, vorzugsweise mittels PCR, Hybridisieren von DNA mit Sonden, Umschreiben von RNA in DNA durch reverse Transkriptase, bevor die behandelte Probe, ebenfalls vermittelt über das Mehrwegeventil (6), dem Nachweisschritt innerhalb eines Nachweiskanals (80) zugeführt wird.

Es folgen 11 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

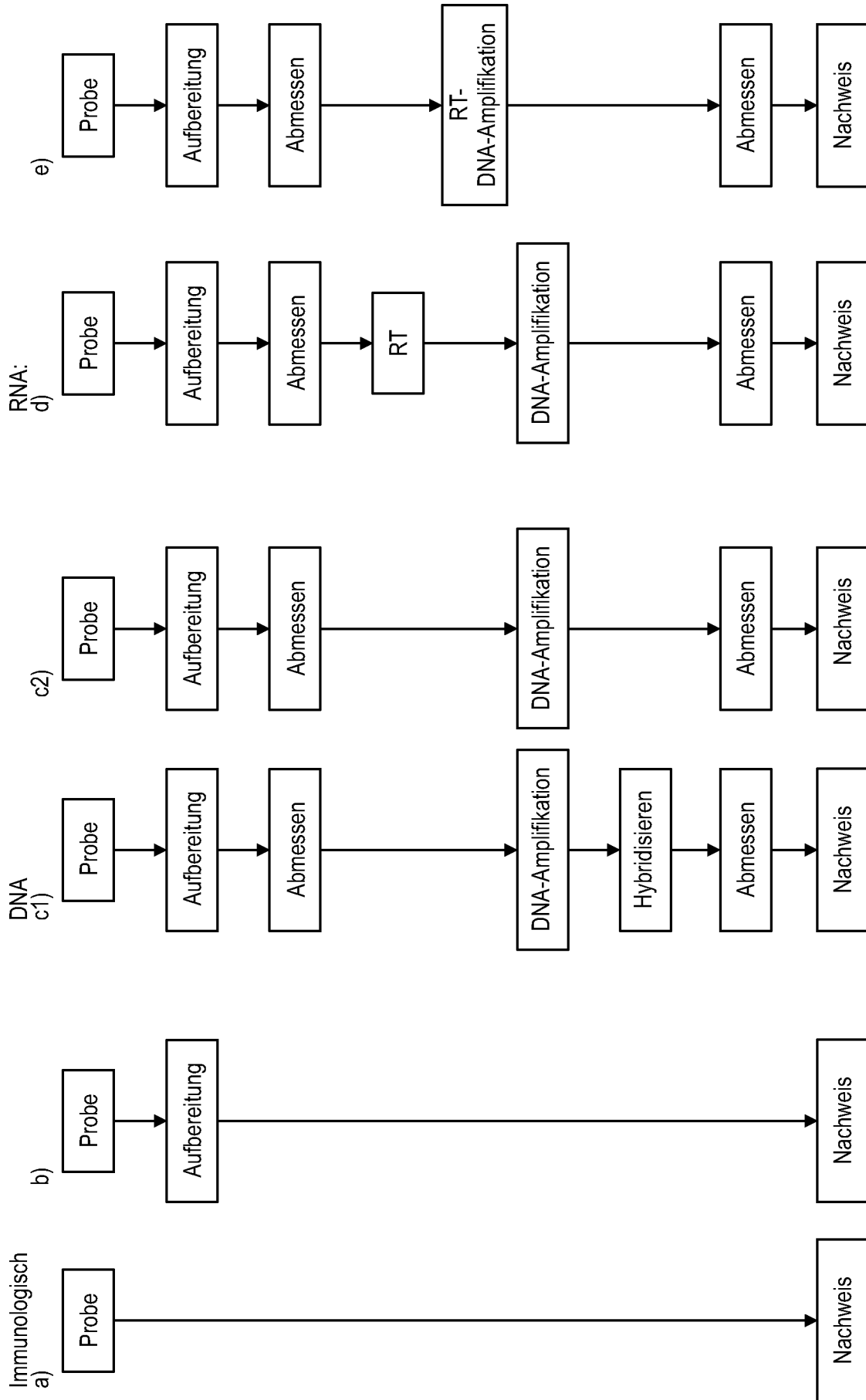


Fig. 1

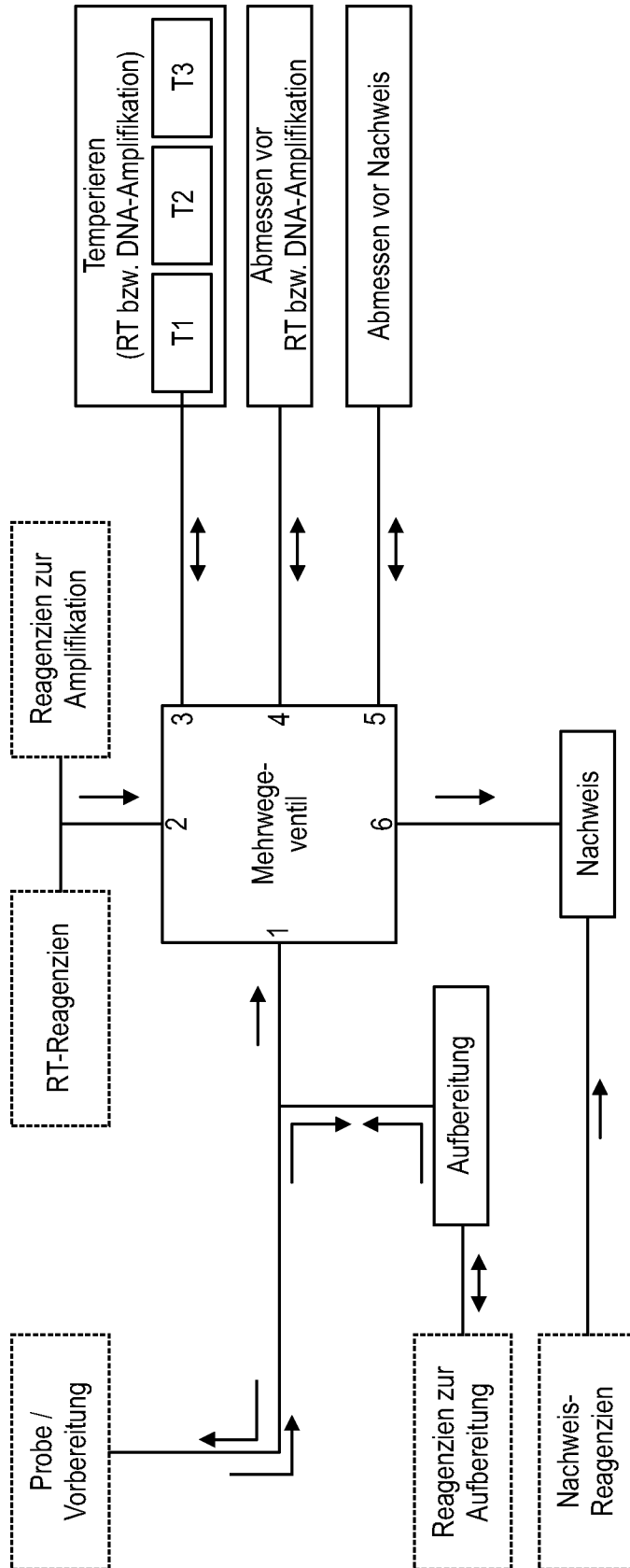


Fig. 2

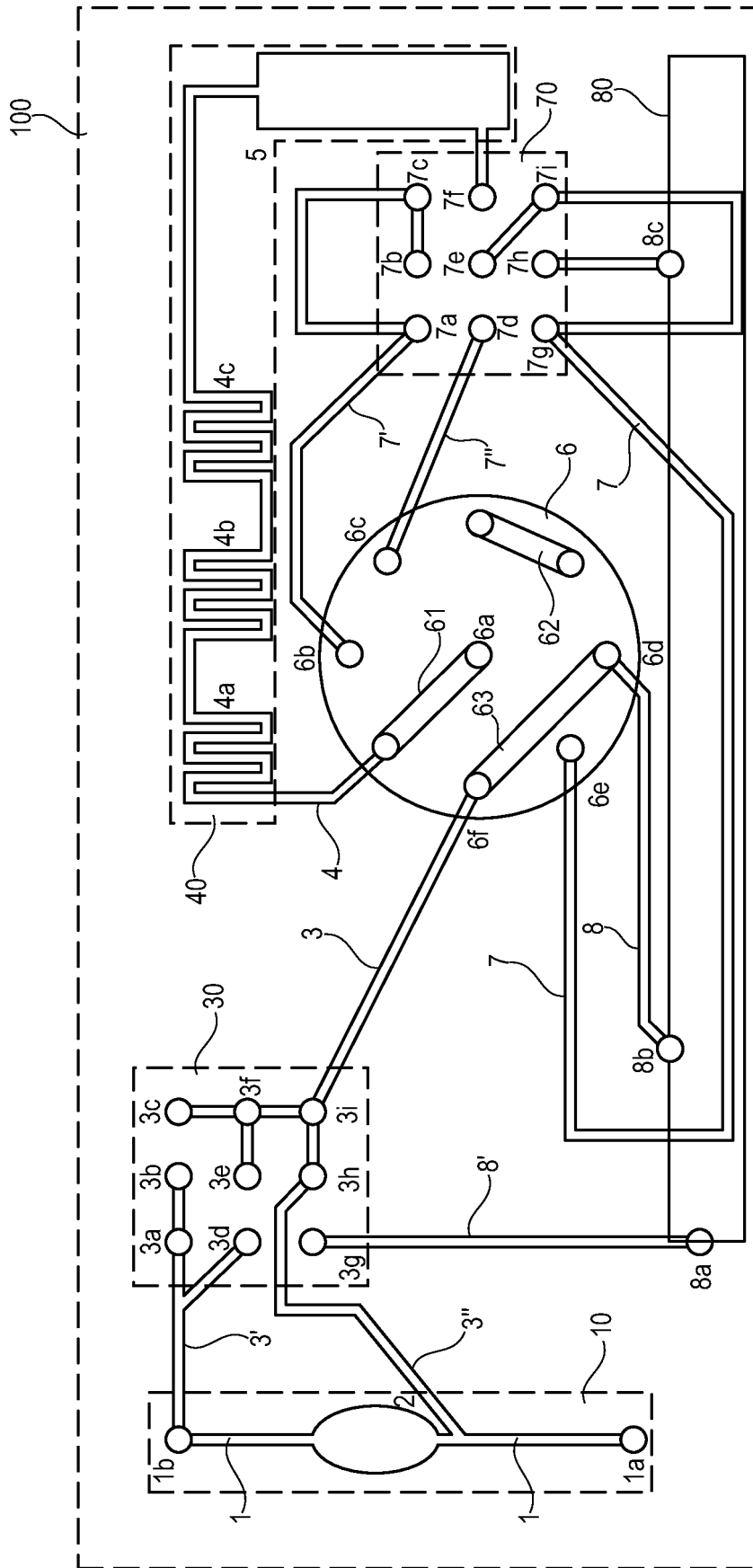


Fig. 3

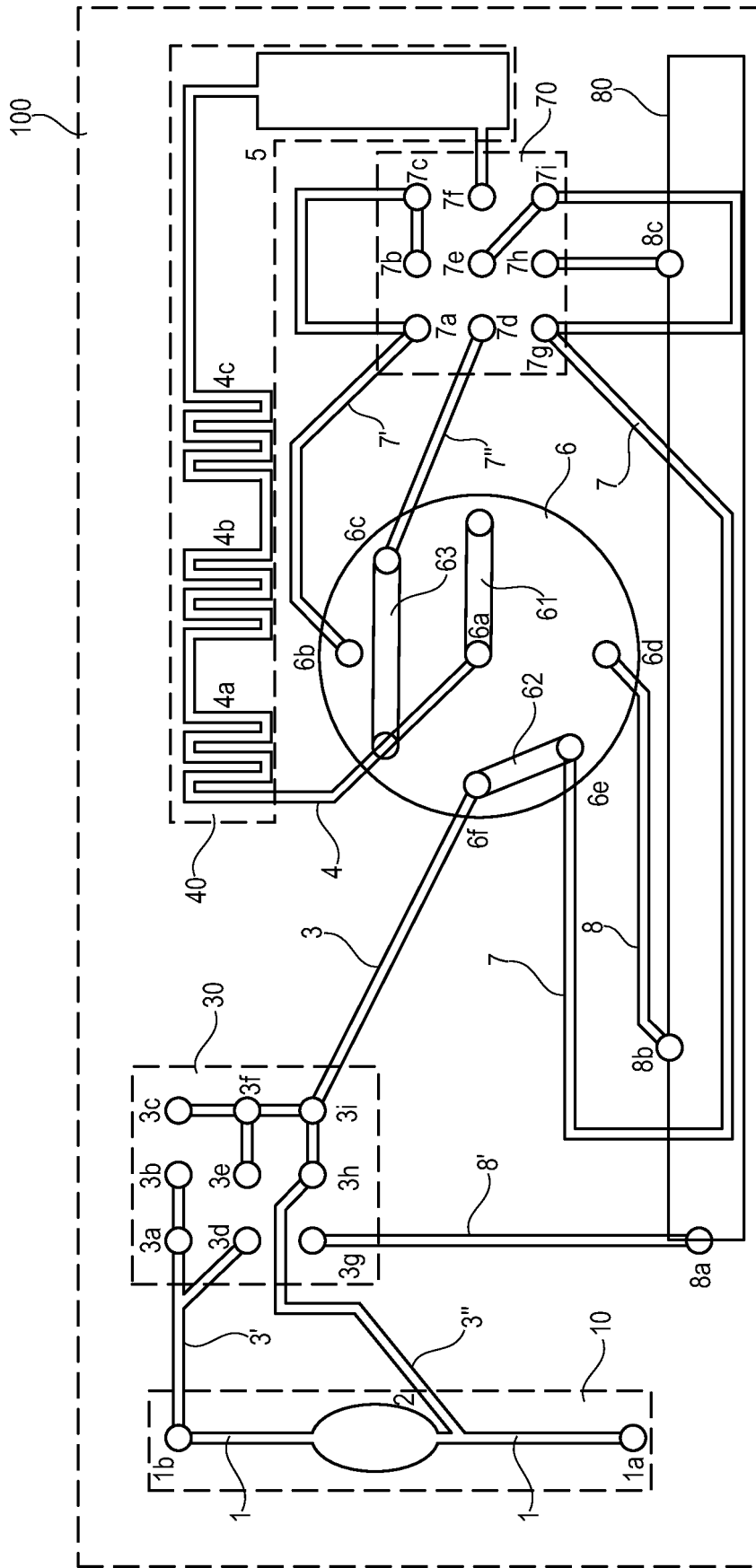


Fig. 4a

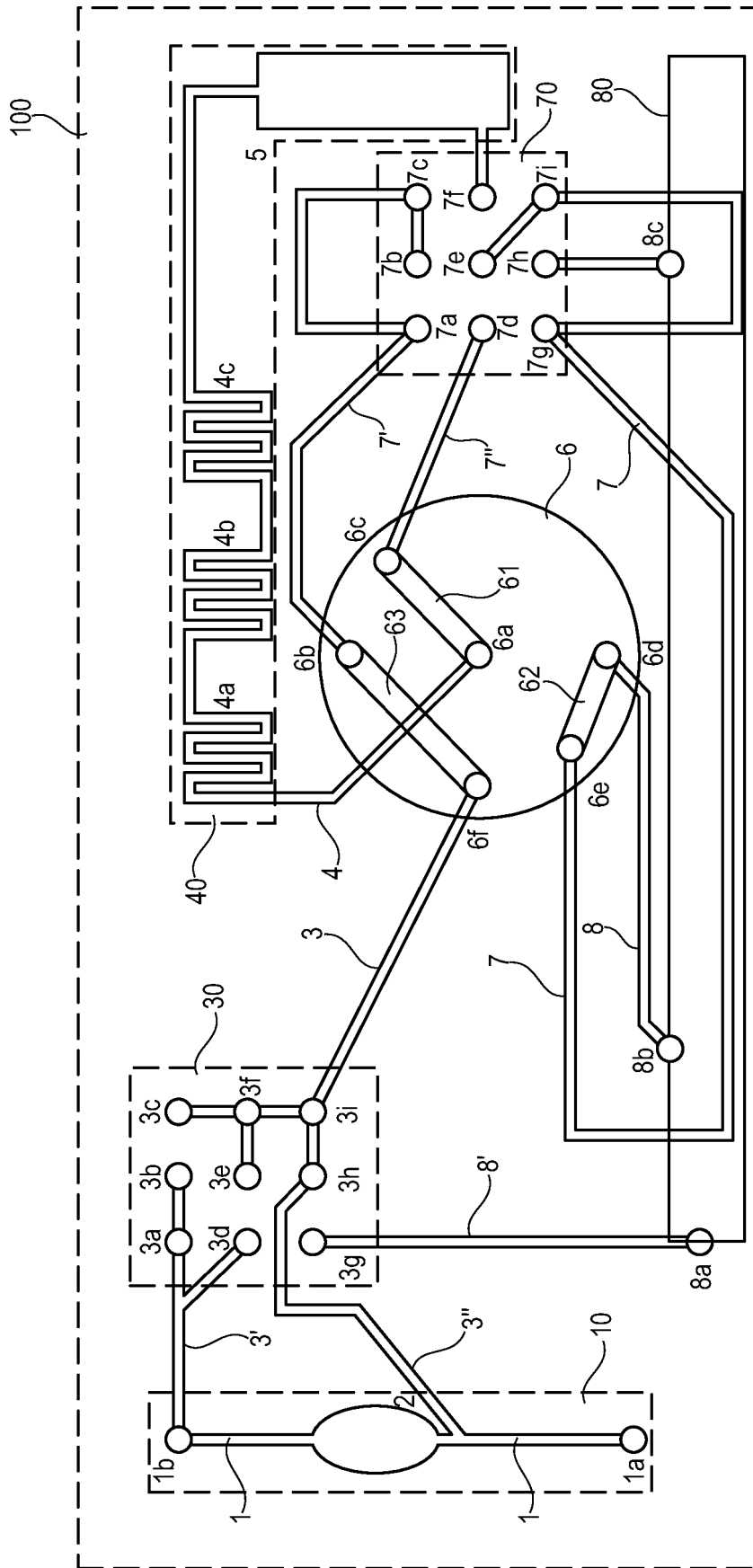


Fig. 4b

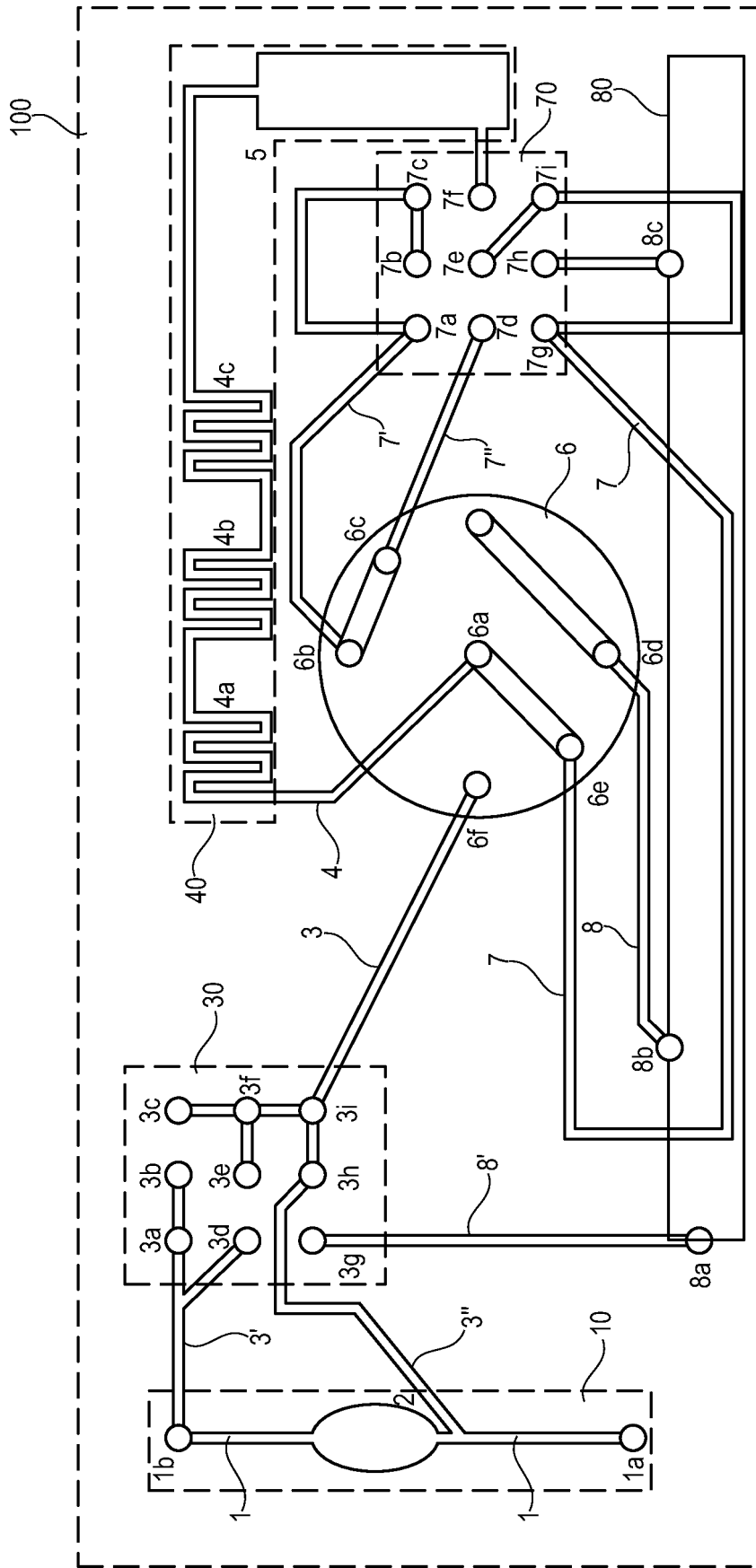


Fig. 5c

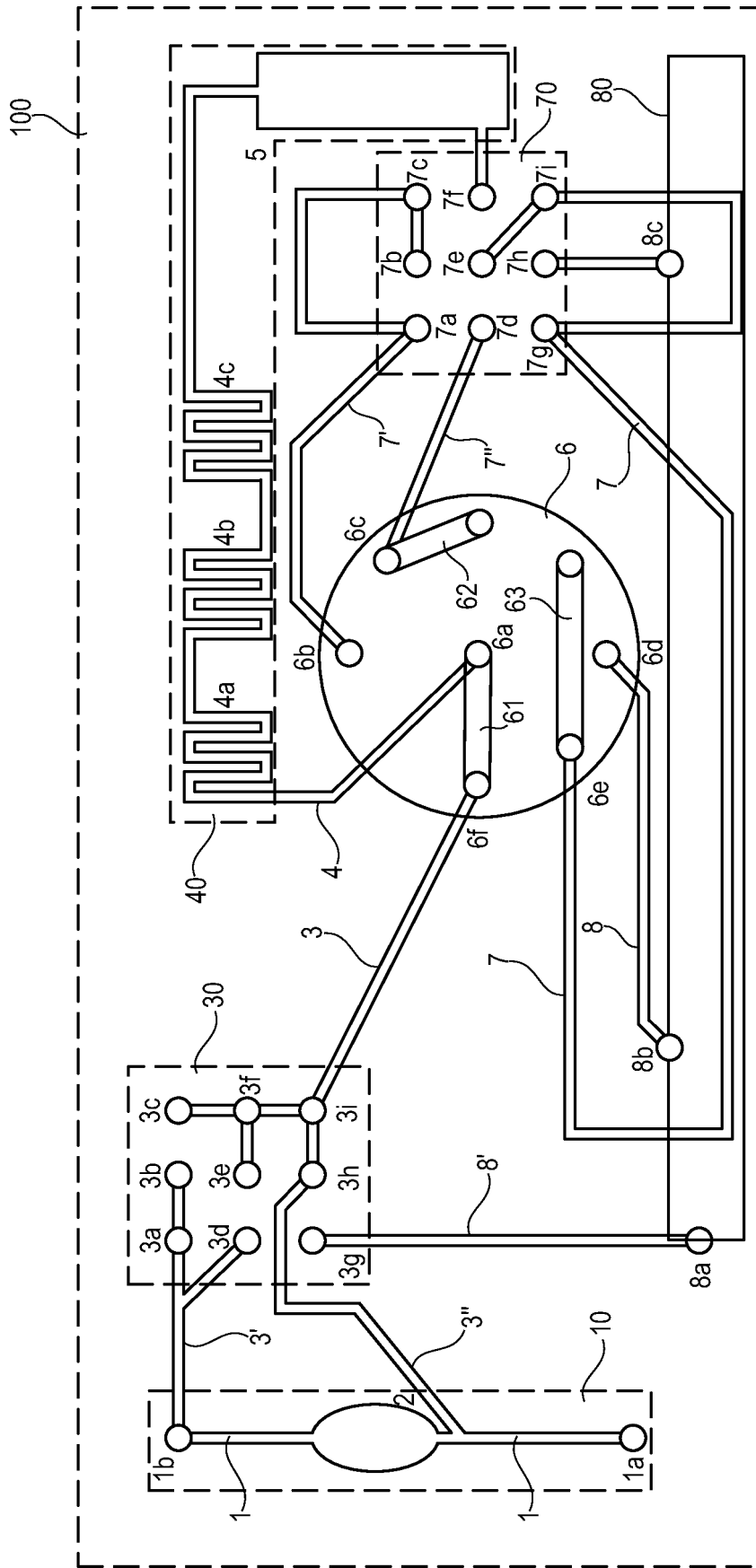


Fig. 5b

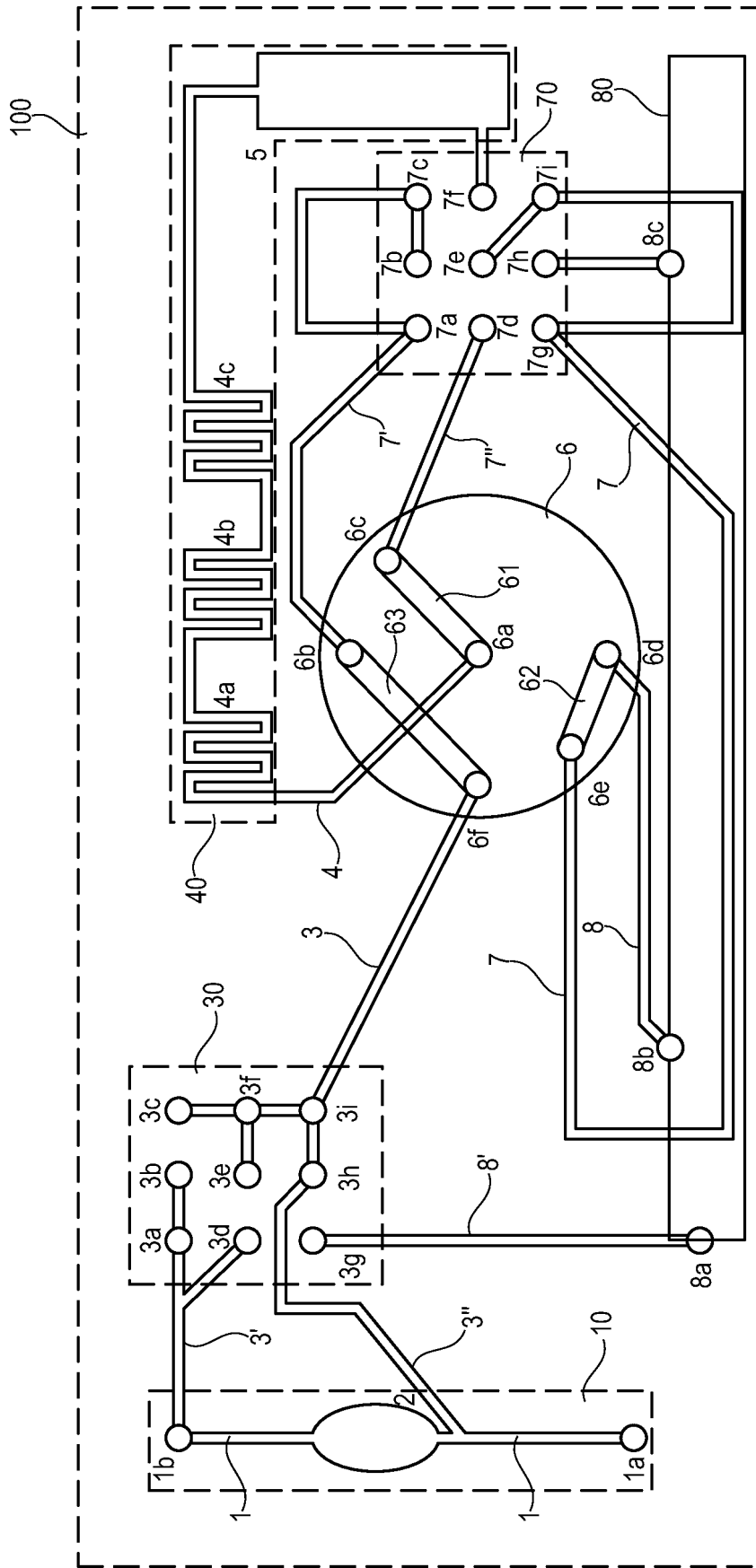
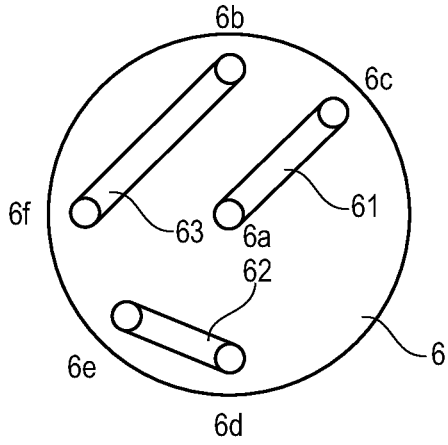
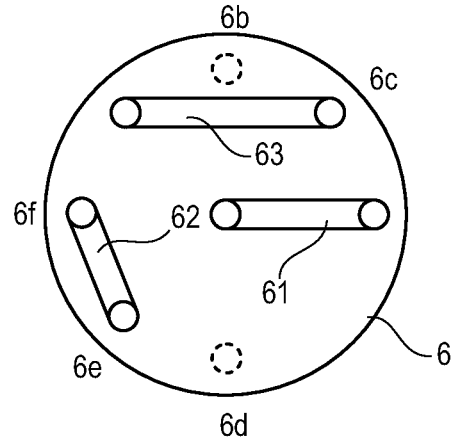


Fig. 5a

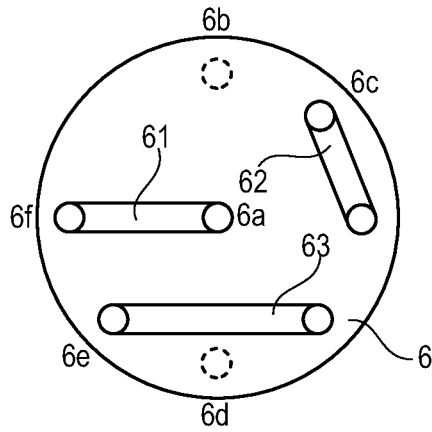
1) Transport von 6f nach 6b



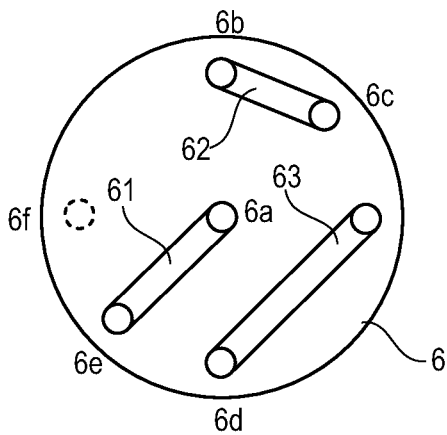
2) Transport von 6f nach 6e



3) Transport von 6f nach 6a



4) Transport von 6a nach 6e



5) Transport von 6e nach 6d

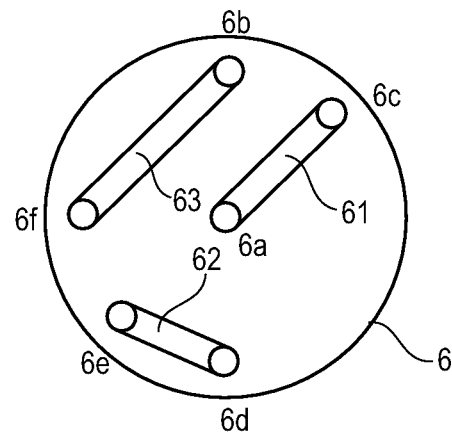


Fig. 6

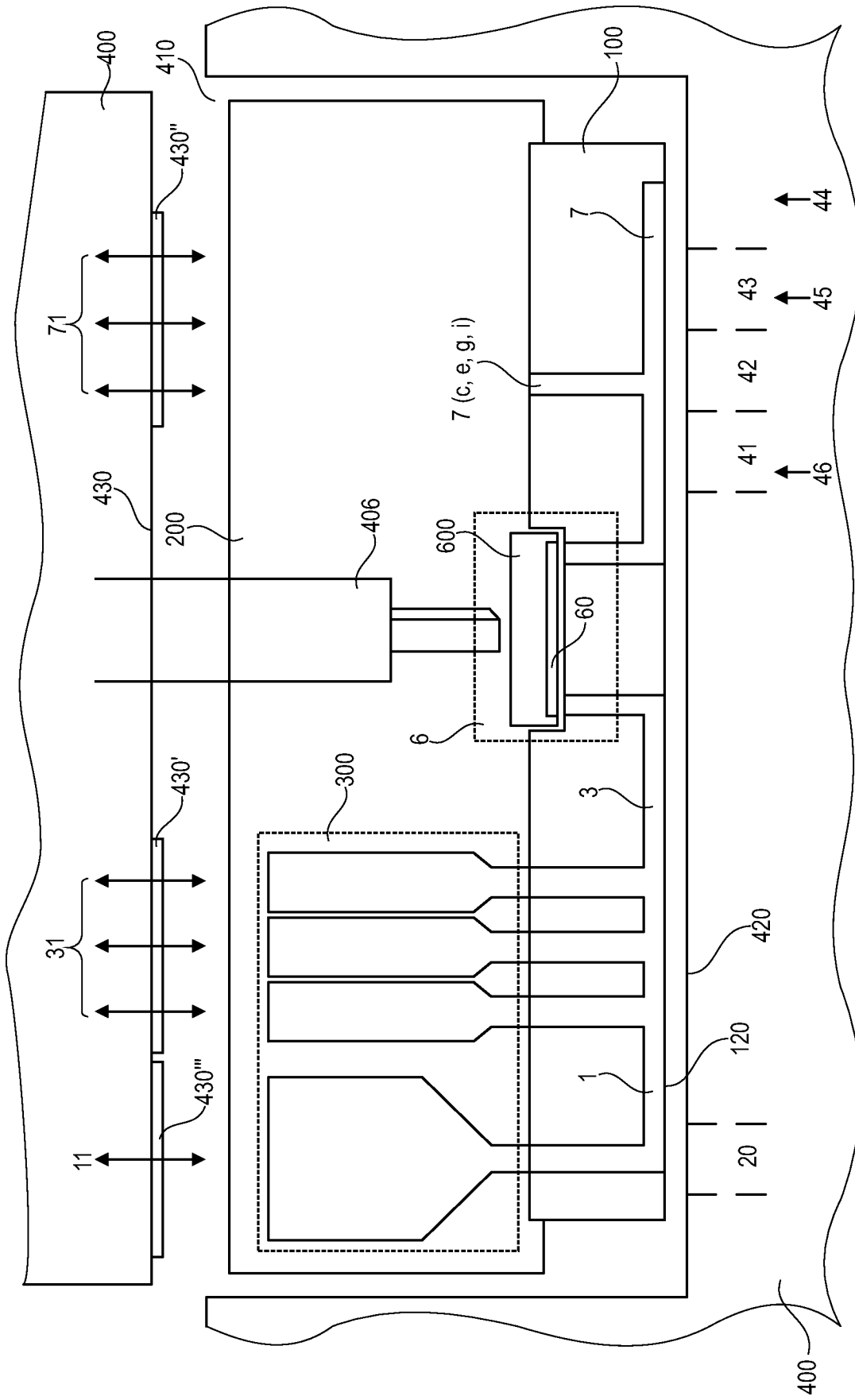


Fig. 7

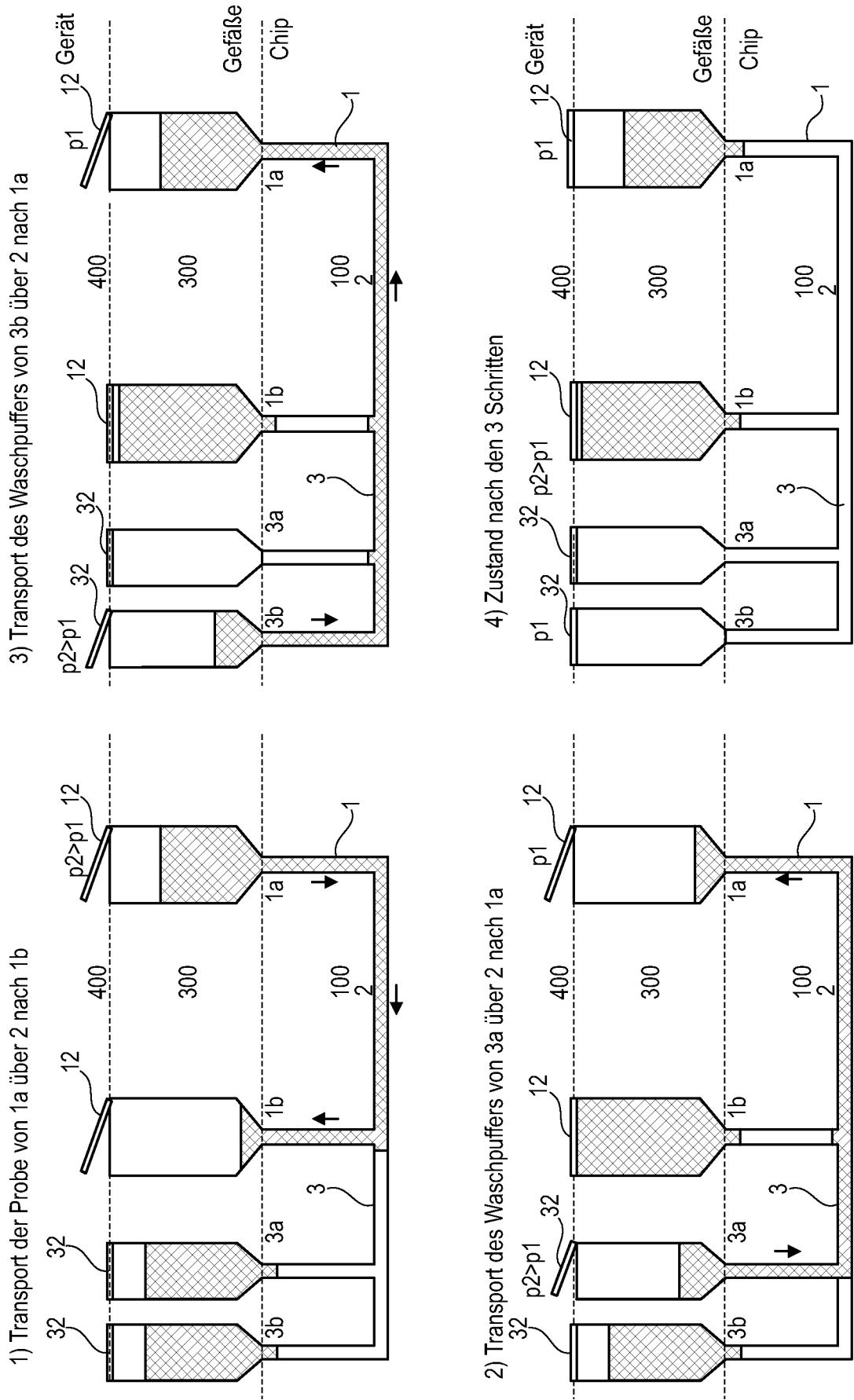


Fig. 8