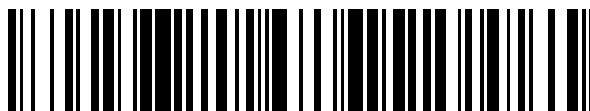


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 380**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

B01L 9/00 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2007 E 16174452 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3088083**

54 Título: **Método para realizar PCR con un cartucho con varias pistas**

30 Prioridad:

24.03.2006 US 786007 P

14.11.2006 US 859284 P

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

03.12.2018

73 Titular/es:

**HANDYLAB, INC. (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07147, US**

72 Inventor/es:

**HANDIQUE, KALYAN;
BRAHMASANDRA, SUNDARESH N.;
GANESAN, KARTHIK;
WU, BETTY;
PHADKE, NIKHIL;
PARUNAK, GENE y
WILLIAMS, JEFF**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 692 380 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para realizar PCR con un cartucho con varias pistas

5 **Campo técnico**

La tecnología descrita en el presente documento se refiere a un aparato integrado para procesar muestras que contienen polinucleótidos y llevar a cabo análisis de diagnóstico en las mismas. Más específicamente, la tecnología se refiere a un aparato para obtener un resultado de diagnóstico en una muestra biológica usando un cartucho microfluídico que recibe la muestra, junto con un sistema de mesa. En el presente documento también se describen métodos de uso de la tecnología.

Antecedentes

15 La industria del diagnóstico médico es un elemento crítico de la infraestructura sanitaria actual. Actualmente, sin embargo, los análisis de diagnóstico, no importa lo rutinarios que sean, se han convertido en un cuello de botella en la atención al paciente. Existen varias razones para esto. En primer lugar, habitualmente hay varias etapas en un análisis de diagnóstico entre recoger la muestra, y obtener un resultado de diagnóstico, que requieren diferentes niveles de habilidad por parte de los operadores, y diferentes niveles de complejidad del equipo. Por ejemplo, una muestra biológica, una vez extraída de un paciente, se debe poner en una forma adecuada para un régimen de procesamiento que normalmente implica usar reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un nucleótido de interés. Una vez amplificado, la presencia de un nucleótido de interés en la muestra necesita ser determinada de forma inequívoca. La preparación de muestras es un proceso que es susceptible de automatización pero también se lleva a cabo de forma relativamente rutinaria en casi cualquier ubicación. En cambio, etapas tales como PCR y detección de nucleótidos han estado, por regla general, solamente al alcance de individuos con formación especial que tienen acceso a equipo especializado. En segundo lugar, muchos análisis de diagnóstico solamente pueden realizarse con equipo altamente especializado que es tanto caro como manejable solamente por facultativos formados. Dicho equipo se encuentra en solamente unas pocas ubicaciones - a menudo sólo una en cualquier área urbana dada. Esto significa que la mayoría de los hospitales tienen que externalizar muestras a esas ubicaciones para análisis, incurriendo de este modo en costes de envío y retrasos por transporte, y posiblemente incluso pérdida o mezcla de muestras. En tercer lugar, cierto equipo especializado normalmente no está disponible "a demanda" sino que, en su lugar, funciona por lotes, retrasando de este modo el tiempo de procesamiento para muchas muestras, dado que éstas deben esperar a que una máquina se llene antes de que puedan ser analizadas.

35 El análisis de una muestra biológica para conseguir un diagnóstico particular normalmente incluye detectar uno o más polinucleótidos presentes en la muestra. Un ejemplo de detección es detección cualitativa, que se refiere, por ejemplo, a la determinación de la presencia del polinucleótido y/o la determinación de información relacionada con, por ejemplo, el tipo, tamaño, presencia o ausencia de mutaciones, y/o la secuencia del polinucleótido. Otro ejemplo de detección es detección cuantitativa, que se refiere, por ejemplo, a la determinación de la cantidad de polinucleótido presente. La detección puede incluir, por lo tanto, generalmente aspectos tanto cualitativos como cuantitativos. Detectar polinucleótidos cualitativamente a menudo implica establecer la presencia de cantidades extremadamente pequeñas en una muestra. Para mejorar la sensibilidad, por lo tanto, la cantidad de polinucleótido en cuestión a menudo se amplifica. Por ejemplo, algunos métodos de detección incluyen amplificación de polinucleótidos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una técnica de amplificación relacionada. Dichas técnicas usan un cóctel de ingredientes, que incluyen uno o más de una enzima, una sonda, y un agente de marcado. Por lo tanto, la detección de polinucleótidos puede requerir el uso de diversos reactivos diferentes, muchos de los cuales requieren manipulación sensible para mantener su integridad, tanto durante el uso como a lo largo del tiempo.

50 Entendiendo que el flujo de muestra se descompone en varias etapas clave, sería deseable considerar maneras de automatizar tantas de éstas como fuera posible y, deseablemente, facilitar la consecución de tantas como fuera posible con una única máquina que se puede poner a disposición, a petición, de muchos usuarios. Existe, por lo tanto, una necesidad de un método y un aparato para llevar a cabo etapas de preparación de muestras, PCR, y detección en muestras biológicas de tal manera que se lleven a cabo las menos etapas independientes posibles.

55 La descripción de los antecedentes de la tecnología en el presente documento se incluye para explicar el contexto de la tecnología. Esto no debe tomarse como una admisión de que cualquiera del material mencionado estaba publicado, era conocido, o formaba parte del conocimiento general común como en la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones. Los métodos y dispositivos de la técnica anterior se divulgan en los documentos US 5.863.502, US 2002/0068357 y EP 1574586.

Sumario

65 La presente invención se refiere a un método de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

También se divulga un aparato, que comprende: un compartimento de recepción configurado para recibir un cartucho microfluídico insertable; al menos una fuente de calor acoplada térmicamente al cartucho y configurada para aplicar calor a una o más regiones seleccionadas del cartucho en uno o más momentos seleccionados, con el fin de: crear una microgotita de una muestra biológica que contiene polinucleótidos contenida en el cartucho; hacer que la microgotita se mueva entre una o más posiciones en el cartucho microfluídico; lisar células, donde estén presentes en la muestra biológica, liberando de este modo polinucleótidos de las células; preparar uno o más de los polinucleótidos para amplificación; y amplificar uno o más de los polinucleótidos; un detector configurado para detectar la presencia de los uno o más polinucleótidos amplificados; y un procesador acoplado al detector y la al menos una fuente de calor, donde el procesador está configurado para controlar la aplicación de calor a las una o más regiones seleccionadas del cartucho microfluídico en uno o más momentos seleccionados.

El sistema del presente documento comprende, además, un sistema integrado, que comprende un aparato y un cartucho complementario, donde juntos, el aparato y el cartucho procesan una muestra que ha sido inyectada en el cartucho, y proporcionan un resultado de diagnóstico sobre la muestra.

El compartimento de recepción del aparato puede estar configurado para recibir selectivamente el cartucho microfluídico, tal como se describe adicionalmente en el presente documento y se ejemplifica mediante los dibujos adjuntos. Por ejemplo, el compartimento de recepción y el cartucho microfluídico pueden ser de forma complementaria, de modo que el cartucho microfluídico pueda ser recibido selectivamente en, por ejemplo, una única orientación. El cartucho microfluídico puede tener un miembro de colocación correcta que encaja en una característica complementaria del compartimento de recepción. Recibiendo selectivamente el cartucho, el compartimento de recepción puede ayudar a un usuario a colocar el cartucho, de modo que el aparato pueda operar apropiadamente sobre el cartucho. El compartimento de recepción también puede estar configurado de modo que diversos componentes del aparato que pueden operar sobre el cartucho microfluídico (bombas de calor, refrigeradores Peltier, elementos electrónicos que eliminan el calor, detectores, miembros de fuerza, y similares) puedan situarse para operar apropiadamente sobre el cartucho microfluídico. Por ejemplo, una fuente de calor por contacto puede estar situada en el compartimento de recepción, de modo que pueda estar acoplada térmicamente a una o más ubicaciones distintas de un cartucho microfluídico que puede estar recibido selectivamente en el compartimento de recepción.

La bomba de calor puede ser, por ejemplo, una fuente de calor tal como una resistencia, una bomba de calor reversible tal como un circuito de transferencia de calor lleno de líquido o un elemento termoelectrónico, una fuente de calor por radiación tal como una lámpara de xenón, y similares. La bomba de calor puede usarse no solamente para proporcionar calor a los elementos microfluídicos sino también para retirar calor de elementos microfluídicos tal como para reducir la actividad de ciertos reactivos, congelar líquido en un microcanal para cambiar su fase de líquida a sólida, reducir la presión de una cámara de aire para crear un vacío parcial, etc.)

En diversas realizaciones del aparato: el aparato puede incluir, además, un miembro de colocación correcta que es complementario al cartucho microfluídico, con lo que el compartimento de recepción recibe el cartucho microfluídico en una única orientación; el aparato puede incluir, además, un sensor acoplado a un procesador, el sensor configurado para detectar si el cartucho microfluídico puede ser recibido selectivamente.

El procesador puede ser programable para hacer funcionar el detector para detectar un polinucleótido o una sonda del mismo en un cartucho microfluídico ubicado en el compartimento de recepción.

El detector puede ser, por ejemplo, un detector óptico. Por ejemplo, el detector puede incluir una fuente de luz que emite luz en una banda de absorción de un colorante fluorescente y un detector de luz que detecta luz en una banda de emisión del colorante fluorescente, donde el colorante fluorescente corresponde a una sonda polinucleotídica fluorescente o un fragmento de la misma. Por ejemplo, el detector óptico puede incluir un diodo con filtro de paso de banda que emite selectivamente luz en la banda de absorción del colorante fluorescente y un fotodiodo con filtro de paso de banda que detecta selectivamente luz en la banda de emisión del colorante fluorescente; o por ejemplo, el detector óptico puede estar configurado para detectar independientemente una pluralidad de colorantes fluorescentes que tienen diferentes espectros de emisión fluorescente, donde cada colorante fluorescente corresponde a una sonda polinucleotídica fluorescente o un fragmento de la misma; o por ejemplo, el detector óptico puede estar configurado para detectar independientemente una pluralidad de colorantes fluorescentes en una pluralidad de ubicaciones diferentes en el cartucho, donde cada colorante fluorescente corresponde a una sonda polinucleotídica fluorescente o un fragmento de la misma.

El procesador puede ser, por ejemplo, programable para hacer funcionar la al menos una bomba de calor.

En diversas realizaciones, la al menos una bomba de calor puede ser una fuente de calor por contacto seleccionada entre un calefactor resistivo, un radiador, un intercambiador de calor fluido y un dispositivo de Peltier. La fuente de calor por contacto puede estar configurada en el compartimento de recepción para estar acoplada térmicamente a una ubicación distinta en un cartucho microfluídico recibido en el compartimento de recepción, con lo que la ubicación distinta puede calentarse selectivamente. Al menos una fuente de calor por contacto adicional puede estar incluida, donde las fuentes de calor por contacto pueden estar, cada una, configuradas en el compartimento de

- recepción para estar acopladas térmicamente de forma independiente a una ubicación distinta diferente en un cartucho microfluídico recibido en el compartimento de recepción, con lo que las ubicaciones distintas pueden calentarse independientemente. La fuente de calor por contacto puede estar configurada para estar en contacto físico directo con una ubicación distinta de un cartucho microfluídico recibido en el compartimento de recepción. En
- 5 diversas realizaciones, cada fuente de calor por contacto puede estar configurada para calentar una ubicación distinta que tiene un diámetro promedio en 2 dimensiones de aproximadamente 1 milímetro (mm) a aproximadamente 15 mm (normalmente de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm), o una ubicación distinta que tiene un área superficial de entre aproximadamente 1 mm² y aproximadamente 225 mm² (normalmente entre aproximadamente 1 mm² y aproximadamente 100 mm², o en algunas realizaciones entre aproximadamente 5
- 10 mm² y aproximadamente 50 mm²).
- En diversas realizaciones, el aparato puede incluir una capa flexible en la fuente de calor por contacto, configurada para acoplar térmicamente la fuente de calor por contacto con al menos una parte de un cartucho microfluídico recibido en el compartimento de recepción. La capa flexible puede tener un grosor de entre aproximadamente 0,05 y
- 15 aproximadamente 2 milímetros, y una dureza Shore de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 100.
- En diversas realizaciones, al menos una bomba de calor puede ser una fuente de calor por radiación configurada para dirigir calor a una ubicación distinta de un cartucho microfluídico recibido en el compartimento de recepción.
- 20 En diversas realizaciones, los uno o más miembros de fuerza están configurados para aplicar fuerza a al menos una parte de un cartucho microfluídico recibido en el compartimento de recepción.
- En diversas realizaciones, los uno o más miembros de fuerza pueden estar configurados para aplicar fuerza para acoplar térmicamente la al menos una bomba de calor a al menos una parte del cartucho microfluídico. Los uno o
- 25 más miembros de fuerza pueden estar configurados para hacer funcionar un miembro mecánico en el cartucho microfluídico, el miembro mecánico seleccionado entre el grupo que consiste en un depósito perforable, una válvula o una bomba.
- En diversas realizaciones, los uno o más miembros de fuerza pueden estar configurados para aplicar fuerza a una pluralidad de ubicaciones en el cartucho microfluídico. La fuerza aplicada por los uno o más miembros de fuerza puede dar como resultado una presión promedio en una interfaz entre una parte del compartimento de recepción y una parte del cartucho microfluídico de entre aproximadamente 5 kilopascales y aproximadamente 50 kilopascales, por ejemplo, la presión promedio puede ser de al menos aproximadamente 14 kilopascales. A al menos un miembro
- 30 de fuerza se le puede hacer funcionar manualmente. Al menos un miembro de fuerza puede acoplarse mecánicamente a una tapa en el compartimento de recepción, con lo que el funcionamiento de la tapa hace funcionar el miembro de fuerza.
- 35 En diversas realizaciones, el aparato puede incluir, además, una tapa en el compartimento de recepción, siendo la tapa accionable para excluir al menos parcialmente la luz ambiente del compartimento de recepción. La tapa puede ser, por ejemplo, una tapa deslizante. La tapa puede incluir el detector óptico. Una cara fundamental de la tapa en el detector óptico o en el compartimento de recepción puede variar desde la planeidad en menos de aproximadamente 100 micrómetros, por ejemplo, menos de aproximadamente 25 micrómetros. La tapa puede estar configurada para ser amovible del aparato. La tapa puede incluir un miembro de sujeción.
- 40 En diversas realizaciones, el aparato puede incluir, además, al menos un dispositivo de entrada acoplado al procesador.
- 45 En diversas realizaciones, el aparato puede incluir, además, una fase de calentamiento configurada para ser amovible del aparato, donde al menos una bomba de calor puede estar ubicada en la fase de calentamiento.
- 50 En diversas realizaciones, el cartucho puede incluir además un puerto de análisis. El puerto de análisis puede estar configurado para permitir que un sistema de muestras externo analice una muestra en el cartucho microfluídico; por ejemplo, el puerto de análisis puede ser un agujero o ventana en el aparato que puede aceptar una sonda de detección óptica que puede analizar una muestra *in situ* en el cartucho microfluídico.
- 55 En algunas realizaciones, el puerto de análisis puede estar configurado para dirigir una muestra desde el cartucho microfluídico a un sistema de muestras externo; por ejemplo, el puerto de análisis puede incluir un conducto en comunicación fluida con el cartucho microfluídico que dirige una muestra líquida a un aparato de cromatografía, un espectrómetro óptico, un espectrómetro de masas, o similares.
- 60 En algunas realizaciones, el aparato puede incluir un compartimento de recepción configurado para recibir un cartucho microfluídico en una única orientación; al menos una fuente de calor por radiación acoplada térmicamente al compartimento de recepción; al menos dos fuentes de calor por contacto configuradas en el compartimento de recepción para estar acopladas térmicamente a distintas ubicaciones, con lo que las ubicaciones distintas pueden calentarse selectivamente; uno o más miembros de fuerza configurados para aplicar fuerza a al menos una parte del
- 65 cartucho microfluídico recibido en el compartimento de recepción, donde al menos uno de los uno o más miembros

de fuerza puede estar configurado para aplicar fuerza para acoplar térmicamente las fuentes de calor por contacto a las ubicaciones distintas, y al menos uno de los uno o más miembros de fuerza puede estar configurado para hacer funcionar un miembro mecánico en el cartucho microfluídico, el miembro mecánico seleccionado entre el grupo que consiste en un depósito perforable; una tapa en el compartimento de recepción, siendo la tapa maniobrable para
 5
 10
 15

excluir al menos parcialmente la luz ambiente del compartimento de recepción, comprendiendo la tapa un detector óptico configurado para detectar independientemente uno o más colorantes fluorescentes, que opcionalmente tienen diferentes espectros de emisión fluorescentes, donde cada colorante fluorescente corresponde a una sonda polinucleotídica fluorescente o un fragmento de la misma; al menos un dispositivo de entrada seleccionado entre el grupo que consiste en un teclado, una superficie sensible al tacto, un micrófono y un ratón, al menos un medio de almacenamiento de datos seleccionado entre el grupo que consiste en una unidad de disco duro, una unidad de disco óptico, una interfaz de comunicación seleccionada entre el grupo que consiste en: una conexión en serie, una conexión en paralelo, una conexión en red inalámbrica, y una conexión en red por cable, un identificador de muestras seleccionado entre un lector de caracteres ópticos, un lector de código de barras, y un lector de marcas de radiofrecuencia; al menos una salida seleccionada entre una pantalla, una impresora, un altavoz; y un procesador acoplado al detector, el sensor, las fuentes de calor, la entrada y la salida.

Un cartucho microfluídico puede incluir una red microfluídica y un miembro de retención en comunicación fluida con la red microfluídica, siendo el miembro de retención selectivo para al menos un polinucleótido respecto a al menos un inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa. En algunas realizaciones, el cartucho microfluídico también incluye un miembro de colocación correcta.

20

En diversas realizaciones del cartucho microfluídico, el cartucho microfluídico puede incluir, además, una válvula de entrada de muestras en comunicación fluida con la red microfluídica. La válvula de entrada de muestras puede estar configurada para aceptar una muestra a un diferencial de presión en comparación con una presión ambiente de entre aproximadamente 20 kilopascales y 200 kilopascales, por ejemplo entre aproximadamente 70 kilopascales y 110 kilopascales.

25

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir un filtro en comunicación fluida con la válvula de entrada de muestras, estando el filtro configurado para separar al menos un componente de una mezcla de muestras introducida en la entrada de muestras.

30

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir al menos una bomba accionada térmicamente en comunicación fluida con la red microfluídica. La bomba accionada térmicamente puede incluir un material termoexpansivo seleccionado entre un gas, un líquido vaporizable a una temperatura entre 25 °C y 100 °C a 1 atmósfera, y un polímero de expancel.

35

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir al menos una válvula accionada térmicamente en comunicación fluida con la red microfluídica. La válvula accionada térmicamente puede incluir un material que tiene una transición de fase sólida a líquida a una temperatura entre 25 °C y 100 °C a 1 atmósfera.

40

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir al menos un depósito sellado que contiene un reactivo, un tampón o un disolvente. El depósito sellado puede ser, por ejemplo, un envase blíster autopercutor configurado para poner al reactivo, el tampón o el disolvente en comunicación fluida con la red microfluídica.

45

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir al menos un orificio de ventilación hidrófobo.

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir al menos un depósito configurado para recibir y contener residuos tales como fluidos y/o material particulado tal como restos celulares.

En diversas realizaciones, el miembro de retención puede incluir una polialquilenimina o una poliamida policatiónica, por ejemplo, polietilenimina, poli-L-lisina o poli-D-lisina. El miembro de retención puede estar en forma de una o más partículas. El miembro de retención puede ser amovible del cartucho microfluídico.

50

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir un reactivo de lisis. El reactivo de lisis puede incluir uno o más microgránulos liofilizados de tensioactivo, donde la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto el microgránulo liofilizado de tensioactivo con un líquido para crear una solución de reactivo de lisis. La red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto una muestra con el reactivo de lisis para producir una muestra lisada.

55

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede estar configurada para acoplar calor procedente de una fuente de calor externa a la muestra para producir la muestra lisada. Por ejemplo, la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto el miembro de retención y la muestra lisada para crear un miembro de retención cargado de polinucleótidos.

60

En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir, además, un filtro configurado para separar el miembro de retención cargado de polinucleótidos del líquido.

65

- 5 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir, además, un depósito que contiene un tampón de lavado, donde la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con el tampón de lavado, por ejemplo, el tampón de lavado puede tener un pH de al menos aproximadamente 10.
- 10 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir un depósito que contiene un tampón de liberación, donde el cartucho microfluídico puede estar configurado para poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con el tampón de liberación para crear una muestra con polinucleótidos liberados.
- 15 En diversas realizaciones, la red microfluídica puede estar configurada para acoplar calor procedente de una fuente de calor externa al miembro de retención cargado de polinucleótidos para crear la muestra con polinucleótidos liberados.
- 20 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir un depósito que contiene un tampón de neutralización, donde la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto la muestra con polinucleótidos liberados con el tampón de neutralización para crear una muestra con polinucleótidos neutralizados.
- 25 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa y una pluralidad de nucleótidos. La mezcla de reactivos de PCR puede estar en forma de uno o más microgránulos liofilizados, y la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto el microgránulo de PCR con líquido para crear una solución de mezcla de reactivos de PCR.
- 30 En diversas realizaciones, la red microfluídica puede estar configurada para acoplar calor procedente de una fuente de calor externa con la mezcla de reactivos de PCR y la muestra con polinucleótidos neutralizados en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir de la muestra con polinucleótidos neutralizados.
- 35 En diversas realizaciones, la mezcla de reactivos de PCR puede incluir, además, un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorógena selectiva para al menos una parte del plásmido.
- 40 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir un polinucleótido de control negativo, donde la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto independientemente cada uno de la muestra con polinucleótidos neutralizados y el polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear independientemente amplicones de PCR de la muestra con polinucleótidos neutralizados y amplicones de PCR del polinucleótido de control negativo.
- 45 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos, donde el cartucho microfluídico puede estar configurado para poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma con la sonda. La sonda puede ser una sonda de hibridación fluorógena. La sonda de hibridación fluorógena puede incluir una secuencia de polinucleótidos acoplada a un colorante informador fluorescente y un colorante extintor de fluorescencia. La mezcla de reactivos de PCR puede incluir, además, un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorógena de plásmido selectiva para al menos una parte del plásmido y el cartucho microfluídico puede estar configurado para permitir detección óptica independiente de la sonda de hibridación fluorógena y la sonda de hibridación fluorógena de plásmido.
- 50 En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que puede ser característica de un organismo, por ejemplo cualquier organismo que emplee polinucleótidos de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. De este modo, la sonda puede ser selectiva para cualquier organismo. Los organismos adecuados incluyen mamíferos (incluyendo seres humanos), aves, reptiles, anfibios, peces, animales domésticos, animales de granja, animales salvajes, organismos extintos, bacterias, hongos, virus, plantas, y similares. La sonda también puede ser selectiva para componentes de organismos que emplean sus propios polinucleótidos, por ejemplo mitocondrias. En algunas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para microorganismos, por ejemplo, organismos usados en la producción de alimentos (por ejemplo, levaduras empleadas en productos fermentados, mohos o bacterias empleadas en quesos, y similares) o patógenos (por ejemplo, de seres humanos, mamíferos domésticos o salvajes, aves domésticas o salvajes, y similares). En algunas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para organismos seleccionados entre el grupo que consiste en bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, levaduras, hongos, protozoos y virus.
- 55 En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que es característica de *Streptococcus* del grupo B.
- 60 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede estar configurado para permitir detección óptica de la sonda de hibridación fluorógena.
- 65

En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir, además, una etiqueta legible por ordenador. Por ejemplo, la etiqueta puede incluir un código de barras, una marca de radiofrecuencia o uno o más caracteres legibles por ordenador. La etiqueta puede estar formada de un material mecánicamente flexible. Por ejemplo, el material mecánicamente flexible de la etiqueta puede tener un grosor de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 2 milímetros y una dureza Shore de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 100.

En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede estar rodeado, además, por una bolsita sellada, durante la manipulación y el almacenamiento, y antes de ser insertado en la cámara. El cartucho microfluídico puede estar sellado en la bolsita con un gas inerte. La bolsita sellada también puede contener un paquete de desecante. El cartucho microfluídico puede ser desechable.

En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede contener uno o más carriles para muestras. Por ejemplo, un carril para muestras puede incluir una bomba accionada térmicamente, una válvula accionada térmicamente, una válvula de entrada de muestras, un filtro, y al menos un depósito. Los carriles pueden ser independientes entre sí, o pueden ser parcialmente dependientes, por ejemplo, los carriles pueden compartir uno o más reactivos tales como el reactivo de lisis.

En algunas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir un miembro de colocación correcta; y una red microfluídica. La red microfluídica incluye, en comunicación fluida: al menos una bomba accionada térmicamente; al menos una válvula accionada térmicamente; una válvula de entrada de muestras configurada para aceptar una muestra a un diferencial de presión en comparación con una presión ambiente de entre aproximadamente 70 kilopascales y 110 kilopascales; un miembro de retención selectivo para al menos un polinucleótido respecto a al menos un inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa, estando el miembro de retención en forma de una pluralidad de partículas formadas de una polialquilenimina o una poliamida policatiónica; un filtro configurado para separar el miembro de retención cargado de polinucleótidos del líquido; una pluralidad de depósitos, siendo al menos dicho un depósito un depósito de envase blíster autoperforante, sellado. La pluralidad de depósitos pueden contener entre ellos: un reactivo de lisis, estando la red microfluídica configurada para poner en contacto una muestra introducida en la entrada de muestras con el reactivo de lisis y el miembro de retención para crear un miembro de retención cargado de polinucleótidos; un depósito que contiene un tampón de lavado, estando la red microfluídica configurada para poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con el tampón de lavado; un depósito que contiene un tampón de liberación, estando la red microfluídica configurada para poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con el tampón de liberación para crear una muestra con polinucleótidos liberados; un tampón de neutralización, estando la red microfluídica configurada para poner en contacto la muestra con polinucleótidos liberados con el tampón de neutralización para crear una muestra con polinucleótidos neutralizados; una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa, un plásmido de control positivo, una sonda de hibridación fluorógena selectiva para al menos una parte del plásmido y una pluralidad de nucleótidos; y al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos, donde la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma con la sonda. Además, la red microfluídica puede estar configurada para acoplar calor procedente de una fuente de calor externa con la mezcla de reactivos de PCR y la muestra con polinucleótidos neutralizados en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir de la muestra con polinucleótidos neutralizados.

En diversas realizaciones, un sistema de análisis de polinucleótidos puede incluir tanto el cartucho microfluídico como el aparato, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

En diversas realizaciones, un kit de muestras de polinucleótidos puede incluir un cartucho microfluídico que comprende una red microfluídica y un miembro de retención en comunicación fluida con la red microfluídica, siendo el miembro de retención selectivo para al menos un polinucleótido respecto a al menos un inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa, un recipiente para muestras; y un miembro de transferencia de líquido tal como una jeringa.

En diversas realizaciones, el kit de muestras de polinucleótidos puede incluir, además, instrucciones para emplear el miembro de transferencia de líquido para transferir una muestra desde el recipiente para muestras hasta la red microfluídica.

En diversas realizaciones, el kit de muestras de polinucleótidos puede incluir, además, instrucciones para emplear el miembro de transferencia de líquido para dirigir una muestra desde el recipiente para muestras, y un volumen de aire al interior de la red microfluídica, estando el volumen de aire entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 5 ml.

En diversas realizaciones, el kit de muestras de polinucleótidos puede incluir, además, un filtro, y, por ejemplo, instrucciones para emplear el miembro de transferencia de líquido para dirigir una muestra desde el recipiente para muestras a través del filtro al interior de la red microfluídica.

- 5 En diversas realizaciones, el kit de muestras de polinucleótidos puede incluir, además, al menos una etiqueta legible por ordenador en el recipiente para muestras. La etiqueta puede incluir, por ejemplo, un código de barras, una marca de radiofrecuencia o uno o más caracteres legibles por ordenador. El cartucho microfluídico puede estar sellado en una bolsita con un gas inerte.
- 10 En diversas realizaciones, el kit de muestras de polinucleótidos puede incluir, además, un miembro de muestreo; un recipiente de transferencia; e instrucciones para poner en contacto el miembro de muestreo con una muestra biológica y para colocar el miembro de muestreo en el recipiente de transferencia.
- 15 En diversas realizaciones, el kit de muestras de polinucleótidos puede incluir, además, un tampón de muestras, y, por ejemplo, instrucciones para poner en contacto el miembro de muestreo y el tampón de muestras.
- En diversas realizaciones, el kit de muestras de polinucleótidos puede incluir, además, al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos, por ejemplo, la secuencia de polinucleótidos que es característica de un patógeno seleccionado entre el grupo que consiste en bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, levaduras, hongos, protozoos y virus.
- 20 En algunas realizaciones, el kit de muestras de polinucleótidos puede incluir un cartucho microfluídico que comprende una red microfluídica, un miembro de retención en comunicación fluida con la red microfluídica, y una sonda fluorógena, siendo el miembro de retención selectivo para al menos un polinucleótido respecto a al menos un inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa, siendo la sonda fluorógena selectiva para una secuencia de polinucleótidos que puede ser característica de un patógeno seleccionado entre el grupo que consiste en bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, levaduras, hongos, protozoos y virus; un recipiente para muestras; un miembro de transferencia de líquido; un miembro de muestreo; un recipiente de transferencia; un tampón de muestras; e instrucciones. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para: emplear el miembro de transferencia de líquido para transferir una muestra desde el recipiente para muestras hasta la red microfluídica; emplear el miembro de transferencia de líquido para dirigir una muestra desde el recipiente para muestras y un volumen de aire al interior de la red microfluídica, estando el volumen de aire entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 5 ml; emplear el miembro de transferencia de líquido para dirigir una muestra procedente del recipiente para muestras a través de un filtro al interior de la red microfluídica; y poner en contacto el miembro de muestreo con una muestra biológica y para colocar el miembro de muestreo en el recipiente de transferencia.
- 25 30
- 35 Un método para muestrear un polinucleótido puede incluir las etapas de poner en contacto el miembro de retención en el cartucho microfluídico con una muestra biológica, comprendiendo la muestra biológica al menos un polinucleótido, produciendo de este modo un miembro de retención cargado de polinucleótidos en el cartucho microfluídico; separar al menos una parte de la muestra biológica del miembro de retención cargado de polinucleótidos; y liberar al menos una parte de un polinucleótido del miembro de retención cargado de polinucleótidos, creando de este modo una muestra con polinucleótidos liberados.
- 40 En diversas realizaciones, el método puede incluir, además, una o más de las siguientes etapas: colocar el cartucho microfluídico en el compartimento de recepción del aparato; hacer funcionar el miembro de fuerza en el aparato para aplicar presión en una interfaz entre una parte del compartimento de recepción y una parte del cartucho microfluídico (por ejemplo, crear una presión entre aproximadamente 5 kilopascales y aproximadamente 50 kilopascales, o en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 14 kilopascales); emplear el miembro de fuerza para aplicar fuerza a un miembro mecánico en el cartucho microfluídico, el miembro mecánico seleccionado entre el grupo que consiste en un depósito perforable, una válvula o una bomba, para liberar al menos un reactivo, tampón, o disolvente a partir de un depósito en el chip microfluídico; y/o cerrar la tapa para hacer funcionar el miembro de fuerza, donde el miembro de fuerza puede estar acoplado mecánicamente a una tapa en el compartimento de recepción.
- 45 50
- 55 En algunas realizaciones, el método puede incluir, además, emplear un identificador de muestras para leer una etiqueta en el cartucho microfluídico o una etiqueta en la muestra biológica.
- En algunas realizaciones, el método puede incluir, además, introducir una muestra biológica impura en el cartucho microfluídico y separar la muestra biológica de la muestra biológica impura en el cartucho microfluídico, por ejemplo, usando un filtro en el cartucho, o la muestra biológica puede separarse de una muestra biológica impura antes de introducir la muestra biológica en el cartucho microfluídico.
- 60 En algunas realizaciones, el método puede incluir, además, lisar la muestra biológica, por ejemplo, usando calor, un reactivo de lisis, y similares. En algunas realizaciones, donde el cartucho microfluídico comprende uno o más microgránulos liofilizados de reactivo de lisis, el método puede incluir, además, reconstituir el microgránulo liofilizado de tensioactivo con líquido para crear una solución de reactivo de lisis.
- 65 En diversas realizaciones, el método puede incluir, además, una o más de las siguientes: calentar la muestra biológica en el cartucho microfluídico; presurizar la muestra biológica en el cartucho microfluídico en un diferencial de presión en comparación con presión ambiente de entre aproximadamente 20 kilopascales y 200 kilopascales, o en algunas realizaciones entre aproximadamente 70 kilopascales y 110 kilopascales.

En algunas realizaciones, la parte de la muestra biológica separada del miembro de retención cargado de polinucleótidos puede incluir al menos un inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa seleccionado entre el grupo que consiste en hemoglobina, péptido, compuestos fecales, ácido húmicos, compuestos mucosales, proteínas de unión a ADN, o un sacárido. En algunas realizaciones, el método puede incluir, además, separar el miembro de retención cargado de polinucleótidos de sustancialmente todo el inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasas en la muestra biológica.

En diversas realizaciones, el método puede incluir, además, una o más de las siguientes: dirigir un fluido en el cartucho microfluídico haciendo funcionar una bomba accionada térmicamente o una válvula accionada térmicamente; poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con un tampón de lavado; calentar el miembro de retención cargado de polinucleótidos a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C (en algunas realizaciones, la temperatura puede ser de 100 °C o menos); calentar el miembro de retención cargado de polinucleótidos durante menos de aproximadamente 10 minutos; poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con un tampón de liberación para crear una muestra con polinucleótidos liberados (por ejemplo, en algunas realizaciones, el tampón de liberación puede tener un volumen de menos de aproximadamente 50 microlitros, el tampón de liberación puede incluir un detergente, y/o el tampón de liberación puede tener un pH de al menos aproximadamente 10); y/o poner en contacto la muestra con polinucleótidos liberados con un tampón de neutralización para crear una muestra con polinucleótidos neutralizados.

En diversas realizaciones, el método puede incluir, además, una o más de las siguientes: poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados con una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa y una pluralidad de nucleótidos (en algunas realizaciones, la mezcla de reactivos de PCR puede incluir, además, un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorógena selectiva para al menos una parte del plásmido); en algunas realizaciones, la mezcla de reactivos de PCR puede estar en forma de uno o más microgránulos liofilizados, y el método puede incluir, además, reconstituir el microgránulo de PCR con líquido para crear una solución de mezcla de reactivos de PCR; calentar la mezcla de reactivos de PCR y la muestra con polinucleótidos neutralizados en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir de la muestra con polinucleótidos neutralizados; poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma con al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos; poner en contacto independientemente cada una de la muestra con polinucleótidos neutralizados y un polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear independientemente amplicones de PCR de la muestra con polinucleótidos neutralizados y amplicones de PCR del polinucleótido de control negativo; y/o poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma y el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR del mismo con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos.

En diversas realizaciones, el método puede incluir, además, una o más de las siguientes: determinar la presencia de una secuencia de polinucleótidos en la muestra biológica, correspondiendo la secuencia de polinucleótidos a la sonda, si la sonda es detectada en la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma; determinar un resultado contaminado si la sonda es detectada en el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR del mismo; y/o en algunas realizaciones, donde la mezcla de reactivos de PCR comprende, además, un plásmido de control positivo y una sonda plasmídica selectiva para al menos una parte del plásmido, incluyendo, además, el método determinar que se ha producido una reacción de PCR si la sonda plasmídica es detectada.

En diversas realizaciones, el método no comprende centrifugado del miembro de retención cargado de polinucleótidos.

En algunas realizaciones, el método para muestrear un polinucleótido puede incluir: colocar un cartucho microfluídico en el compartimento de recepción de un aparato; hacer funcionar un miembro de fuerza en el aparato para aplicar presión en una interfaz entre una parte del compartimento de recepción y una parte del cartucho microfluídico, funcionando la fuerza para liberar al menos un reactivo, tampón, o disolvente a partir de un depósito en el cartucho microfluídico; lisar una muestra biológica en el cartucho microfluídico para crear una muestra biológica lisada; poner en contacto un miembro de retención en un cartucho microfluídico con la muestra biológica lisada, comprendiendo la muestra biológica al menos un polinucleótido, produciendo de este modo un miembro de retención cargado de polinucleótidos en el cartucho microfluídico, donde el miembro de retención está en forma de una pluralidad de partículas de una polialquilenimina o una poliamida policatiónica; poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con un tampón de lavado; calentar el miembro de retención cargado de polinucleótidos a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C durante menos de aproximadamente 10 minutos; poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con un tampón de liberación para crear una muestra con polinucleótidos liberados. poner en contacto la muestra con polinucleótidos liberados con un tampón de neutralización para crear una muestra con polinucleótidos neutralizados; poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados con una mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir de la muestra con polinucleótidos neutralizados, comprendiendo la mezcla de reactivos de PCR una enzima polimerasa, un plásmido de control positivo, una sonda de hibridación fluorógena selectiva para al menos una parte del plásmido, y una pluralidad de nucleótidos, poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma con al menos una sonda fluorógena que puede ser

selectiva para una secuencia de polinucleótidos, donde la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que puede ser característica de un organismo seleccionado entre el grupo que consiste en bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, levaduras, hongos, protozoos y virus; y detectar la sonda fluorógena y determinar la presencia del organismo para el que la una sonda fluorógena puede ser selectiva.

5 En diversas realizaciones, un producto de programa informático incluye instrucciones legibles por ordenador en él para hacer funcionar el aparato.

10 En algunas realizaciones, un producto de programa informático incluye instrucciones legibles por ordenador en él para hacer que el sistema cree una muestra con polinucleótidos liberados a partir de una muestra biológica. Las instrucciones legibles por ordenador pueden incluir instrucciones para poner en contacto el miembro de retención con la muestra biológica en condiciones adecuadas para producir un miembro de retención cargado de polinucleótidos; separar al menos una parte de la muestra biológica del miembro de retención cargado de polinucleótidos; y liberar al menos una parte de un polinucleótido del miembro de retención cargado de polinucleótidos, creando de este modo una muestra con polinucleótidos liberados.

15 En diversas realizaciones, el producto de programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema: emita un indicador de la colocación del cartucho microfluídico en el compartimento de recepción; lea una etiqueta de la muestra o una etiqueta de cartucho microfluídico; emita indicaciones para que un usuario introduzca un identificador de muestras; emita indicaciones para que un usuario cargue un miembro de transferencia de muestras con la muestra biológica; emita indicaciones para que un usuario aplique un filtro al miembro de transferencia de muestras; emita indicaciones para que un usuario introduzca la muestra biológica en el cartucho microfluídico; emita indicaciones para que un usuario haga que la muestra biológica entre en contacto con un reactivo de lisis en el cartucho microfluídico; emita indicaciones para que un usuario coloque el cartucho microfluídico en el compartimento de recepción; emita indicaciones para que un usuario haga funcionar un miembro de fuerza en el aparato para aplicar presión en una interfaz entre una parte del compartimento de recepción y una parte del cartucho microfluídico; emita indicaciones para que un usuario cierre la tapa para hacer funcionar el miembro de fuerza; y/o emita indicaciones para que un usuario presurice la muestra biológica en el cartucho microfluídico inyectando a la muestra biológica un volumen de aire entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 5 ml.

20 En diversas realizaciones, el producto de programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema: lise la muestra biológica; lise la muestra biológica con un reactivo de lisis; reconstituya un microgránulo liofilizado de tensioactivo con líquido para crear una solución de reactivo de lisis; caliente la muestra biológica; separe el miembro de retención cargado de polinucleótidos de al menos una parte de la muestra biológica; separe el miembro de retención cargado de polinucleótidos de sustancialmente todos los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa en la muestra biológica; dirija un fluido en el cartucho microfluídico haciendo funcionar una bomba accionada térmicamente o una válvula accionada térmicamente; ponga en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con un tampón de lavado; caliente el miembro de retención cargado de polinucleótidos a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C (en algunas realizaciones, la temperatura puede ser de aproximadamente 100 °C o menor); caliente el miembro de retención cargado de polinucleótidos durante menos de aproximadamente 10 minutos; ponga en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con un tampón de liberación para crear una muestra con polinucleótidos liberados; y/o ponga en contacto la muestra con polinucleótidos liberados con un tampón de neutralización para crear una muestra con polinucleótidos neutralizados.

25 En diversas realizaciones, el producto de programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema: ponga en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados con una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa y una pluralidad de nucleótidos; caliente la mezcla de reactivos de PCR y la muestra con polinucleótidos neutralizados en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir de la muestra con polinucleótidos neutralizados; ponga en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma con al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos; ponga en contacto independientemente cada uno de la muestra con polinucleótidos neutralizados y un polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear independientemente amplicones de PCR de la muestra con polinucleótidos neutralizados y amplicones de PCR del polinucleótido de control negativo; ponga en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma y el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR del mismo con al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos; emita una determinación de la presencia de una secuencia de polinucleótidos en la muestra biológica, correspondiendo la secuencia de polinucleótidos a la sonda, si la sonda es detectada en la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma; y/o emita una determinación de un resultado contaminado si la sonda es detectada en el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR del mismo.

30 En diversas realizaciones, el producto de programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema lleve a cabo automáticamente una o más de las etapas del método.

En diversas realizaciones, donde la red microfluídica comprende dos o más carriles para muestras que incluyen, cada uno, una bomba accionada térmicamente, una válvula accionada térmicamente, una válvula de entrada de muestras, un filtro, y al menos un depósito, donde las instrucciones legibles por ordenador pueden estar configuradas para hacer funcionar independientemente cada dicho carril en el sistema.

5 En algunas realizaciones, el producto de programa informático incluye instrucciones legibles por ordenador en él para hacer que un sistema cree una muestra con polinucleótidos liberados a partir de una muestra biológica. El sistema puede incluir un cartucho microfluídico que comprende una red microfluídica y un miembro de retención en comunicación fluida con la red microfluídica, siendo el miembro de retención selectivo para al menos un polinucleótido respecto a al menos un inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa; y un aparato que comprende un compartimento de recepción configurado para recibir selectivamente el cartucho microfluídico; al menos una bomba de calor configurada para estar acoplada térmicamente al cartucho microfluídico en el compartimento de recepción; un detector; y un procesador programable acoplado al detector y la bomba de calor. 10 Las instrucciones legibles por ordenador pueden incluir instrucciones para: lisar una muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con un reactivo de lisis y calentar para producir una muestra lisada; poner en contacto el miembro de retención con la muestra biológica y/o la muestra lisada para producir un miembro de retención cargado de polinucleótidos; separar al menos una parte de la muestra biológica del miembro de retención cargado de polinucleótidos; poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con un tampón de lavado; poner en contacto el miembro de retención cargado de polinucleótidos con un tampón de liberación y/o calentar para liberar al menos una parte de un polinucleótido a partir del miembro de retención cargado de polinucleótidos, creando de este modo una muestra con polinucleótidos liberados; poner en contacto la muestra con polinucleótidos liberados con un tampón de neutralización para crear una muestra con polinucleótidos neutralizados; poner en contacto independientemente cada uno de la muestra con polinucleótidos neutralizados y un polinucleótido de control negativo con una mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear independientemente amplicones de PCR, comprendiendo la mezcla de reactivos de PCR una enzima polimerasa, una pluralidad de nucleótidos, un plásmido de control positivo y una sonda plasmídica selectiva para al menos una parte del plásmido; determinar que se ha producido una reacción de PCR si la sonda plasmídica es detectada; poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma y el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR del mismo con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos; determinar la presencia de una secuencia de polinucleótidos en la muestra biológica, correspondiendo la secuencia de polinucleótidos a la sonda, si la sonda es detectada en la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma; y determinar un resultado contaminado si la sonda es detectada en el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR del mismo.

35 Los detalles de una o más realizaciones de la tecnología se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la tecnología serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones. Símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

40 Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una visión general esquemática de un aparato descrito en el presente documento.

45 Las figuras 2A-2E muestran vistas en perspectiva de un aparato ejemplar, en diversas configuraciones, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

La figura 3 es una vista en despiece ordenado de componentes típicos de un aparato.

50 La figura 4 es un diagrama de bloques de un aparato.

La figura 5 es un diagrama de un módulo de detección fluorescente.

55 Las figuras 6A y 6B representan la ubicación, en diversas realizaciones, de un cartucho microfluídico después de la instalación en un aparato.

La figura 7 muestra una vista en perspectiva de un módulo calefactor amovible, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

60 Las figuras 8A - 8C muestran una vista en planta de circuitos del calefactor adyacentes a una zona de reacción de PCR; e imágenes térmicas de circuitos del calefactor en funcionamiento.

La figura 9 muestra una vista en perspectiva de un cartucho microfluídico, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

65 La figura 10 es una vista en perspectiva de un dispositivo microfluídico no de acuerdo con la invención.

- La figura 11 es una vista de sección transversal de una región de procesamiento para retener polinucleótidos y/o separar polinucleótidos de inhibidores.
- 5 La figura 12A es una vista en perspectiva de una compuerta.
- La figura 12B es una vista en perspectiva de una compuerta flexionada.
- La figura 13 es una vista de sección transversal de un accionador.
- 10 La figura 14A es una vista en perspectiva de un cartucho microfluídico no de acuerdo con la invención.
- La figura 14B es una vista de sección transversal lateral del cartucho microfluídico de las figuras 14A y 14B.
- 15 Las figuras 15A y 15B, tomadas conjuntamente, ilustran una vista en perspectiva de una red microfluídica del cartucho microfluídico de las figuras 14A y 14B.
- La figura 16 ilustra una serie de fuentes de calor para hacer funcionar componentes del cartucho microfluídico de las figuras 14A y 14B.
- 20 Las figuras 17 y 18 ilustran una válvula en los estados abierto y cerrado respectivamente.
- Las figuras 19A-19D ilustran una compuerta de mezcla de la red microfluídica de las figuras 6A y 6B y regiones adyacentes de la red.
- 25 Las figuras 20A-20C ilustran un depósito con mecanismo de accionamiento.
- Las figuras 21A-21C ilustran un depósito con mecanismo de accionamiento.
- La figura 22 ilustra un depósito con mecanismo de accionamiento.
- 30 Las figuras 23A-23B ilustran un depósito con mecanismo de accionamiento.
- Las figuras 24A-24B ilustran un depósito con mecanismo de accionamiento.
- 35 La figura 25 ilustra un depósito con mecanismo de accionamiento.
- La figura 26 ilustra un depósito con mecanismo de accionamiento.
- 40 Las figuras 27A y 27B ilustran realizaciones de un envase de reactivo con un miembro perforante.
- La figura 28 representa un aparato que puede funcionar como un pequeño sistema de análisis de polinucleótidos en tiempo real, de mesa.
- 45 La figura 29 representa un kit de muestras que puede usarse con un aparato.
- La figura 30 representa una bolsita para componentes de un kit de muestras.
- La figura 31 representa un cartucho microfluídico ejemplar.
- 50 La figura 32 representa el uso de un lector de código de barras para leer un código de barras en un cartucho microfluídico.
- La figura 33 representa el uso de un lector de código de barras para leer un código de barras en un recipiente para muestras.
- 55 La figura 34 representa la fijación de un filtro a un depósito de lisis de un cartucho microfluídico mediante una entrada de muestras, con lo que el contenido de la jeringa puede inyectarse en el cartucho microfluídico a través de un filtro.
- 60 La figura 35 representa la adición de aire a la jeringa con el fin de presurizar el cartucho microfluídico.
- La figura 36 representa la colocación de un cartucho microfluídico en un compartimento de recepción de un aparato.
- 65 Las figuras 37 y 38 representan el cierre de una tapa de un aparato.

- Las figuras 39 y 40 representan la retirada de un módulo calefactor/sensor de un aparato.
- La figura 41A es un gráfico de datos de sensor de calor en tiempo real de un aparato.
- 5 La figura 41B es un gráfico de datos de detector óptico en tiempo real de un aparato.
- La figura 42 es una representación esquemática de diversas cámaras y/o subunidades ejemplares en un cartucho microfluídico ejemplar.
- 10 La figura 43 es una representación esquemática de las etapas relativas a la PCR y la detección que se pueden realizar en un cartucho microfluídico ejemplar.
- La figura 44 es un esquema de un ensayo de PCR en tiempo real ejemplar basado en el ensayo TaqMan®.
- 15 La figura 45 es un esquema de plásmidos de control internos positivos que pueden emplearse.
- La figura 46 representa la mezcla de dos fluidos ("A" - azul y "B" - naranja).
- 20 Las figuras 47A y 47B representan una bomba accionada térmicamente 500 basada en un material de transición de fase (PTM por sus siglas en inglés) 510, en configuraciones cerrada (figura 47A) y abierta (figura 47B).
- Las figuras 47C y 47D muestran otro ejemplo de una bomba 501 con polímero expancel 511 en la cámara 513 que puede accionarse para hacer funcionar la compuerta 515.
- 25 La figura 48 representa componentes de un cartucho desechable basado en tecnología microfluídica, individual e integrado.
- La figura 49 representa perlas de captura de ADN que pueden emplearse.
- 30 Las figuras 50A-50J resaltan diversos elementos del cartucho microfluídico mostrado en las figuras 15A y 15B.
- La figura 51 es una vista lateral de un conjunto de palanca 1200, con palanca 1210, unidad de engranaje 1212 y miembro de fuerza 1214.
- 35 La figura 52 muestra una vista lateral del conjunto de palanca 1200, con un cartucho microfluídico en un compartimento de recepción.
- La figura 53 muestra un primer plano de un compartimento de recepción.
- 40 La figura 54 muestra un primer plano de la interfaz entre un cartucho microfluídico, conductor térmicamente, capa mecánicamente flexible, y una fase térmica.
- La figura 55 muestra una vista superior del conjunto 1200.
- 45 La figura 56 es un primer plano de la figura 55.
- Las figuras 57-59 son una serie de fotos de la palanca 1210 en acción. Puede mostrarse, además, en el conjunto de engranaje 1212 la leva 1228, que permite que la palanca 1210 aplique fuerza a la placa 1230 acoplada a los miembros de fuerza 1214.
- 50 Las figuras 60 y 61 muestran vistas de un cartucho microfluídico con depósitos autoperforantes 1228 y miembros mecánicos 1230 para accionar los depósitos auto-perforantes.
- Las figuras 62 y 63 muestran elementos de elementos detectores ópticos 1220 que incluyen fuentes de luz 1232 (por ejemplo, diodos emisores de luz), lentes 1234, detectores de luz 1236 (por ejemplo, fotodiodos) y filtros 1238.
- 55 La figura 64 ilustra un dispositivo microfluídico.
- 60 La figura 65 es una sección transversal del dispositivo microfluídico de la figura 64 tomada a lo largo de 5.
- FIG. 66 ilustra la retención de ADN de esperma de arenque.
- 65 La figura 67 ilustra la retención y liberación de ADN a partir de estreptococos del grupo B;

La figura 68 ilustra la respuesta de PCR de una muestra a partir de la cual se habían retirado inhibidores y de una muestra a partir de la cual no se habían retirado inhibidores.

5 La figura 69 ilustra la respuesta de PCR de una muestra preparada de acuerdo con la tecnología descrita en el presente documento y una muestra preparada usando un método de extracción de ADN comercial.

La figura 70A ilustra un diagrama de flujo que muestra etapas realizadas durante un método para separar polinucleótidos e inhibidores.

10 La figura 70B ilustra ADN de muestras sometidas al método de la figura 26A.

La figura 71 es un diagrama de flujo que perfila un conjunto de criterios ejemplares que pueden usarse mediante el algoritmo de decisión en el aparato 800 para interpretar los resultados, tal como se describe en el ejemplo 13.

15 Descripción detallada

Un sistema, cartucho microfluídico, kit, métodos y producto de programa informático, se describen adicionalmente a continuación.

20 El análisis de muestras biológicas a menudo incluye determinar si uno o más polinucleótidos (por ejemplo, un ADN, ARN, ARNm o ARNr) pueden estar presentes en la muestra. Por ejemplo, se puede analizar una muestra para determinar si un polinucleótido indicativo de la presencia de un patógeno particular (tal como una bacteria o un virus) puede estar presente. El polinucleótido puede ser una muestra de ADN genómico, o puede ser una muestra de ADN mitocondrial. Normalmente, las muestras biológicas pueden ser mezclas complejas. Por ejemplo, una muestra
25 puede proporcionarse como una muestra de sangre, una muestra de tejido (por ejemplo, un frotis de, por ejemplo, tejido nasal, bucal, anal o vaginal), un aspirado de biopsia, un lisado, como hongos, o como bacterias. Los polinucleótidos a determinar pueden estar contenidos dentro de partículas (por ejemplo, células (por ejemplo, glóbulos blancos y/o glóbulos rojos), fragmentos de tejido, bacterias (por ejemplo, bacterias gram positivas y/o bacterias gram negativas), hongos, esporas). Uno o más líquidos (por ejemplo, agua, un tampón, sangre, plasma sanguíneo, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, o disolvente orgánico) pueden ser normalmente parte de la muestra
30 y/o pueden añadirse a la muestra durante una etapa de procesamiento.

Los métodos para analizar muestras biológicas incluyen proporcionar una muestra biológica (por ejemplo, un frotis), liberar polinucleótidos a partir de partículas (por ejemplo, células tales como bacterias) de la muestra, amplificar uno o más de los polinucleótidos liberados (por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)), y
35 determinar la presencia (o ausencia) del uno o más polinucleótidos amplificados (por ejemplo, mediante detección de fluorescencia). Las muestras biológicas, sin embargo, normalmente incluyen inhibidores (por ejemplo, compuestos mucosales, hemoglobina, compuestos fecales, y proteínas de unión a ADN) que pueden inhibir la determinación de la presencia de polinucleótidos en la muestra. Por ejemplo, dichos inhibidores pueden reducir la eficiencia de amplificación de polinucleótidos mediante PCR y otras técnicas enzimáticas para determinar la
40 presencia de polinucleótidos. Si la concentración de inhibidores no se reduce con respecto a los polinucleótidos a determinar, el análisis puede producir resultados falsos negativos. Los métodos y sistemas relacionados en el presente documento para procesar muestras biológicas (por ejemplo, muestras que tienen uno o más polinucleótidos a determinar) normalmente son capaces de reducir la concentración de inhibidores con respecto a la
45 concentración de polinucleótidos a determinar mediante métodos descritos adicionalmente en el presente documento.

Diversos aspectos de un sistema y un cartucho microfluídico se describen en el presente documento. Divulgaciones adicionales de diversos componentes del mismo pueden encontrarse en la solicitud de Estados Unidos n.º de serie
50 11/580.267 (publicada como US 2007/0184547 A1), y en la solicitud provisional n.º de serie 60/859.284.

Visión general del sistema

Una visión general esquemática de un sistema 981 para llevar a cabo análisis descrito en el presente documento se muestra en la figura 1. La disposición geométrica de los componentes del sistema 981 mostrados en la figura 1 es
55 ejemplar y no pretende ser limitante. Un procesador 980, tal como un microprocesador, está configurado para controlar funciones de diversos componentes del sistema tal como se muestra, y está de este modo en comunicación con cada componente de este tipo. En particular, el procesador 980 está configurado para recibir datos sobre una muestra a analizar, por ejemplo, a partir de un lector de muestras 990, que puede ser un lector de
60 códigos de barras, un lector de caracteres ópticos, o un escáner de RFID (lector de marcas de radiofrecuencia). Por ejemplo, el identificador de muestras puede ser un lector de código de barras de mano. El procesador 980 está configurado para aceptar instrucciones del usuario desde una entrada 984, donde dichas instrucciones pueden incluir instrucciones para empezar a analizar la muestra, selecciones áridas de condiciones operativas. El
65 procesador 980 también está configurado para comunicarse con una pantalla 982, de modo que, por ejemplo, los resultados de los análisis sean transmitidos a la pantalla. Adicionalmente, el procesador 980 puede transmitir una o más preguntas que serán visualizadas en la pantalla 982 que urgen al usuario a proporcionar entrada en respuesta a

ellas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la entrada 984 y la pantalla 982 están integradas entre sí. El procesador 986 está opcionalmente configurado, además, para transmitir resultados de un análisis a un dispositivo de salida tal como una impresora, una pantalla visual, o un altavoz, o una combinación de los mismos. El procesador 980 está, además, opcionalmente aún conectado mediante una interfaz de comunicación tal como una interfaz de red a una red informática 988. La interfaz de comunicación puede ser una o más interfaces seleccionadas entre el grupo que consiste en: una conexión en serie, una conexión en paralelo, una conexión en red inalámbrica y una conexión en red por cable. De este modo, cuando el sistema está direccionado adecuadamente en la red, un usuario remoto puede acceder al procesador y transmitir instrucciones, introducir datos o recuperar datos, tales como pueden estar almacenados en una memoria (no mostrada) asociada con el procesador, o en algún otro medio legible por ordenador que esté en comunicación con el procesador.

Aunque no se muestra en la figura 1, en diversas realizaciones, la entrada 984 puede incluir uno o más dispositivos de entrada seleccionados entre el grupo que consiste en: un teclado, una superficie sensible al tacto, un micrófono, un panel táctil, un escáner de retina y un ratón.

Adicionalmente, en diversas realizaciones, el aparato puede comprender, además, un medio de almacenamiento de datos configurado para recibir datos procedentes de uno o más del procesador, un dispositivo de entrada, y una interfaz de comunicación, siendo el medio de almacenamiento de datos uno o más medios seleccionados entre el grupo que consiste en: una unidad de disco duro, una unidad de disco óptico, una tarjeta flash y un CD-Rom.

El procesador 980 está configurado, además, para controlar diversos aspectos del diagnóstico de muestras, como sigue en la visión general, y tal como se describe adicionalmente en el presente documento. El sistema está configurado para funcionar junto con un cartucho complementario 994, tal como un cartucho microfluídico. El cartucho está configurado, a su vez, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, para recibir una muestra biológica 996 en una forma adecuada para pruebas y análisis de diagnóstico. El cartucho está recibido por un compartimento de recepción 992 en el sistema. El compartimento de recepción está en comunicación con un calefactor 998 que está, a su vez, controlado por el procesador 980 de tal manera que regiones específicas del cartucho se calienten en momentos específicos durante las pruebas de diagnóstico y el análisis de una muestra. El procesador está configurado, además, para controlar un detector 999 que recibe una indicación de un diagnóstico procedente del cartucho 994. El diagnóstico puede ser transmitido al dispositivo de salida 986 y/o la pantalla 982, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Un procesador adecuado 980 puede diseñarse y fabricarse de acuerdo con, respectivamente, principios de diseño y métodos de procesamiento e semiconductores conocidos en la técnica.

El sistema mostrado en un esquema en la figura 1, como con otras realizaciones ejemplares descritas en el presente documento, es ventajoso dado que no requiere ubicaciones dentro del sistema, configuradas adecuadamente para el almacenamiento de reactivos. Tampoco requiere el sistema, u otras realizaciones ejemplares en el presente documento, puertos de entrada o de salida que estén configurados para recibir reactivos procedentes de, por ejemplo, recipientes almacenados externamente tales como frascos, latas, o depósitos. Por lo tanto, el sistema en la figura 1 está autónomo y funciona junto con un cartucho microfluídico, donde el cartucho tiene ubicaciones en su interior dedicadas al almacenamiento de reactivos.

El sistema de la figura 1 puede estar configurado para llevar a cabo funcionamiento en una única ubicación, tal como un entorno de laboratorio, o puede ser portátil de modo que pueda acompañar, por ejemplo, a un facultativo, u otro profesional sanitario, que puede visitar pacientes en diferentes ubicaciones. El sistema está dotado normalmente de un cable de alimentación de modo que pueda aceptar energía de CA de una red de suministro o generador. Un transformador opcional (no mostrado) incorporado en el sistema, o situado externamente entre una toma de energía y el sistema, transforma la energía de entrada de CA en una salida de CC para uso por el sistema. El sistema también puede estar configurado para funcionar usando una o más baterías y, por lo tanto, normalmente está equipado con un sistema de recarga de baterías, y diversos dispositivos de advertencia que alertan a un usuario si la energía de la batería se está volviendo demasiado baja para iniciar o completar de forma fiable un análisis de diagnóstico.

El sistema de la figura 1 puede estar configurado además, en otras realizaciones, para análisis de muestras multiplexado. En una configuración de ese tipo, múltiples ejemplos de un sistema, tal como se perfila en la figura 1, se hacen funcionar unos junto con otros para aceptar y para procesar múltiples cartuchos, donde cada cartucho ha sido cargado con una muestra diferente. Cada componente mostrado en la figura 1 puede estar, por lo tanto, presente tantas veces como muestras haya, aunque los diversos componentes pueden estar configurados en una carcasa común.

En otra configuración más, un sistema está configurado para aceptar y para procesar múltiples cartuchos, pero uno o más componentes en la figura 1 son comunes a múltiples cartuchos. Por ejemplo, un único dispositivo puede estar configurado con múltiples compartimentos de recepción de cartuchos, pero un procesador común y una interfaz del usuario configurada adecuadamente para permitir control concurrente, consecutivo o simultáneo de los diversos cartuchos. Es posible, además, que dicha realización, también utilice un único lector de muestras, y un único

dispositivo de salida.

En otra configuración más, un sistema tal como se muestra en la figura 1 está configurado para aceptar un único cartucho, pero donde el único cartucho está configurado para procesar más de 1, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6, muestras en paralelo, e independientemente entre sí. Tecnología ejemplar para crear cartuchos que puedan manejar múltiples muestras se describe en otra parte, por ejemplo; en la solicitud de Estados Unidos n.º de serie 60/859.284, incorporado en el presente documento por referencia.

Es consecuente, además, con la presente tecnología que un cartucho pueda estar marcado, por ejemplo, con un código de barras molecular indicativo de la muestra, para facilitar el rastreo de la muestra, y para minimizar el riesgo de mezcla de muestras. Métodos para dicho marcado se describen en otra parte, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 10/360.854 (publicada como US 2004/0157220 A1).

Sistemas ejemplares

Las figuras 2A - 2E muestran vistas en perspectiva exteriores de diversas configuraciones de un sistema ejemplar, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. La figura 2A muestra una vista en perspectiva de un sistema 2000 para recibir un cartucho microfluídico (no mostrado), y para causar y controlar diversas operaciones de procesamiento a realizar en una muestra introducida en el cartucho. Los elementos del sistema 2000 no están limitados a aquellos mostrados explícitamente. Por ejemplo, aunque no se muestra, el sistema 2000 puede estar conectado a un lector de códigos de barras de mano, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

EL sistema 2000 comprende una carcasa 2002, que puede estar hecha de metal, o un plástico endurecido. La forma de la carcasa mostrada en la figura 2A materializa características de estilo así como funcionales. Otras realizaciones de la invención pueden parecer algo diferentes, en su disposición de los componentes, así como su aspecto general, en términos de suavidad de líneas, y de acabado exterior, y textura. El sistema 2000 comprende, además, uno o más miembros de estabilización 2004. En la figura 2A se muestra una pata de estabilización, de las cuales varias están normalmente presentes, ubicadas en diversas regiones del lado inferior del sistema 2000 para proporcionar equilibrio y soporte. Por ejemplo, puede haber tres, cuatro, cinco, seis, u ocho de dichas patas de estabilización. Las patas pueden estar moldeadas en y hechas del mismo material que la carcasa 2002, o pueden estar hechas de uno o más materiales diferentes y unidas al lado inferior del sistema 2000. Por ejemplo, las patas pueden comprender un caucho que hace difícil que el sistema 2000 se deslice sobre una superficie sobre la que está situado, y también protege la superficie de rayones. El miembro o miembros de estabilización pueden asumir formas diferentes de patas, por ejemplo, rieles, correderas, o una o más almohadillas.

El sistema 2000 comprende, además, una pantalla 2006, que puede ser una pantalla de cristal líquido, tal como matriz activa, una OLED, o alguna otra forma adecuada. Puede presentar imágenes y otra información en color o en blanco y negro. La pantalla 2006 también puede ser una pantalla sensible al tacto y, por lo tanto, puede estar configurada para aceptar entrada procedente de un usuario en respuesta a diversos apuntes visualizados. La pantalla 2006 puede tener un revestimiento antirreflectante sobre ella para reducir los brillos y los reflejos de luces elevadas en un entorno de laboratorio. La pantalla 2006 también puede estar iluminada a partir de, por ejemplo, una luz posterior, para facilitar un visionado más fácil en un laboratorio oscuro.

El sistema 2000, tal como se muestra en la figura 2A, también comprende una tapa móvil 202, que tiene un asa 2008. La tapa 2010 puede deslizarse atrás y adelante. En la figura 2A, la tapa está en una posición hacia delante, con lo que está "cerrada". En la figura 2B, la tapa se muestra en una posición hacia atrás, donde la tapa está "abierta" y revela un compartimento de recepción 2014 que está configurado para recibir un cartucho microfluídico. Por supuesto, como apreciaría un experto en la materia, la tecnología descrita en el presente documento no está limitada a una tapa que se desliza, o una que se desliza atrás y adelante. También es posible el movimiento de lado a lado, como es una configuración donde la tapa está "abierta" cuando se sitúa hacia delante en el dispositivo. También es posible que la tapa sea una tapa articulada, o una que es totalmente amovible.

El asa 2008 realiza un papel de permitir a un usuario mover la tapa 2010 desde una posición a otra, y también realiza un papel de hacer que la presión sea empujada hacia abajo sobre la tapa, cuando está en una posición cerrada, de modo que pueda aplicarse presión a un cartucho en el compartimento de recepción 2014. En la figura 2C, el asa 2008 se muestra en una posición presionada hacia abajo, donde de este modo se aplica fuerza a la tapa 2014, y por lo tanto se aplica presión a un cartucho recibido en el compartimento de recepción debajo de la tapa.

En una realización, el conjunto de asa y tapa también está equipado con un sensor mecánico que no permite que el asa sea presionado hacia abajo cuando no hay ningún cartucho en el compartimento de recepción. En otra realización, el conjunto de asa y tapa está equipado con un pestillo mecánico que no permite que el asa se eleve cuando un análisis está en curso.

Una configuración adicional del sistema 2000 se muestra en la figura 2D, donde una puerta 2012 está en una posición abierta. La puerta 2012 se muestra en una posición cerrada en las figuras. 2A-C. La puerta es un

componente opcional que permite a un usuario acceder a un módulo calefactor 2020, y también una bandeja de entrada de medio legible por ordenador 2022. El sistema 2000 puede funcionar sin una puerta que cubra el módulo calefactor 2020 y la entrada del medio 2022, pero dicha puerta conlleva comodidad asociada a ella. Aunque la puerta 2012 se muestra articulada en la parte inferior, también puede estar articulada en uno de sus lados, o en su borde superior. La puerta 2012 puede ser, como alternativa, una cubierta amovible, en lugar de estar articulada. La puerta 2012, también puede estar situada en la parte posterior, o lateral del sistema 2000 por ejemplo, si se desea acceso al módulo calefactor y/o a la entrada del medio legible por ordenador en una cara diferente del sistema. También es consecuente con el sistema en el presente documento que al módulo calefactor, y a la entrada del medio legible por ordenador, se acceda mediante puertas diferentes en el mismo o en diferentes lados del dispositivo, y donde dichas puertas diferentes puedan ser articuladas o amovibles independientemente.

El módulo calefactor 2020 es preferentemente amovible, y se describe adicionalmente a continuación en el presente documento.

La entrada del medio legible por ordenador 2022 puede aceptar uno o más de diversos medios. En la figura 2D se muestra una forma ejemplar de entrada 2022, una bandeja de CD-Rom para aceptar un CD, DVD, o mini-CD, o mini-DVD, en cualquiera de los formatos usados habitualmente legibles, legibles-escritibles y escribibles. También es coherente con la descripción en el presente documento una entrada que pueda aceptar otra forma de medio, tal como un disco flexible, memoria flash tal como lápiz de memoria, flash compacta, tarjeta inteligente de datos, o tarjeta segura de datos, una memoria extraíble portátil, unidad USB portátil, disco zip, y otros. Dicha entrada también puede estar configurada para aceptar varias formas diferentes de medios. Dicha entrada 2022 está en comunicación con un procesador (tal como se describe en relación con la figura 1, aunque no mostrada en las figuras 2A-E), que puede leer datos a partir de un medio legible por ordenador cuando se inserta apropiadamente en la entrada.

La figura 2E muestra una vista en planta de una parte posterior del sistema 2000. Se muestran un orificio de ventilación de aire 2024, para dejar escapar el excedente de calor durante un análisis. Normalmente, en el interior del sistema 2000, y mediante orificio de ventilación de aire 2024 y no mostrado en la figura 2E, hay un ventilador. Otros puertos mostrados en la figura 2E son los siguientes: una toma de energía 2026 para aceptar un cable de alimentación que conectará el sistema 2000 a un suministro de electricidad; una conexión de Ethernet 2028 para enlazar el sistema 2000 a una red informática tal como una red de área local; una conexión de toma telefónica 2032 para enlazar el sistema 2000 a una red de comunicación tal como una red telefónica; uno o más puertos USB 2030, para conectar el sistema 2000 a uno o más dispositivos periféricos tales como una impresora, o una unidad de disco duro de un ordenador; un puerto de infrarrojos para comunicarse con, por ejemplo, un controlador remoto (no mostrado), para permitir a un usuario controlar el sistema sin usar una interfaz de pantalla táctil. Por ejemplo, un usuario podría enviar de forma remota órdenes de calendarización al sistema 2000 para hacer que comience un análisis en un momento específico en el futuro.

Características mostradas en la parte posterior del sistema 2000 pueden estar dispuestas de cualquier manera diferente, dependiendo de una configuración interna de diversos componentes. Adicionalmente, características mostradas estando en la parte posterior del sistema 2000, pueden presentarse opcionalmente en otra cara del sistema 2000, dependiendo de la preferencia de diseño. En la figura 2E se muestran conexiones ejemplares. Se entendería que diversas características más, incluyendo entradas, salidas, tomas y conexiones, pueden estar presentes en la cara posterior del sistema 2000, aunque no se muestran, o en otras caras del sistema 2000.

Una vista en despiece ordenado de una realización ejemplar del aparato se muestra en la figura 3, que muestra particularmente características internas del aparato 2000. El aparato 2000 puede comprender un medio legible por ordenador configurado con hardware/firmware que pueden emplearse para impulsar y monitorizar las operaciones en un cartucho usado con él, así como software para interpretar, comunicar y almacenar los resultados de un análisis de diagnóstico realizados en una muestra procesada en el cartucho. Con referencia a la figura 3, se muestran componentes típicos del aparato 2000 e incluyen, por ejemplo, componentes electrónicos de control 2005, módulo calefactor/sensor amovible 2020, detector 2009 tal como un módulo de detección fluorescente, pantalla de visualización u opcionalmente pantalla e interfaz del usuario combinadas 2006 (por ejemplo, una pantalla cristal líquido (LCD) sensible al tacto de calidad médica). En algunas realizaciones, la tapa 2010, el detector 2009, y el asa 2008 pueden denominarse colectivamente módulo deslizable 2007. Componentes adicionales del aparato 2000 pueden incluir uno o más elementos de fijación mecánicos tales como el marco 2019 para contener los diversos módulos (por ejemplo, el módulo calefactor/sensor 2020, y/o el módulo deslizable 2007) en alineamiento, y para proporcionar rigidez estructural. El módulo detector 2009 puede estar colocado en rieles para facilitar la apertura y la colocación del cartucho 2060 en el aparato 2000, y para facilitar el alineamiento de los elementos ópticos en el momento del cierre. El módulo calefactor/sensor 2020 también puede colocarse sobre rieles para retirada e inserción fáciles del conjunto.

Realizaciones del aparato 2000 también incluyen software (por ejemplo, para establecer una interfaz con los usuarios, llevar a cabo análisis y/o analizar los resultados del análisis), firmware (por ejemplo, para controlar el hardware durante análisis en el cartucho 812), y una o más interfaces de comunicación con periféricos mostradas colectivamente como 2031 para periféricos (por ejemplo, puertos de comunicación tales como USB/Serie/Ethernet para conectar a almacenamiento tal como disco compacto o disco duro, para conectar dispositivos de entrada tales

como un lector de código de barras y/o un teclado, para conectar a otros ordenadores o almacenamiento mediante una red, y similares).

5 Los componentes electrónicos de control 840, mostrados esquemáticamente en el diagrama de bloques en la figura 4, pueden incluir una o más funciones en diversas realizaciones, por ejemplo para, control principal 900, multiplexado 902, control de la pantalla 904, control del detector 906 y similares. La función de control principal puede servir como el núcleo de los componentes electrónicos de control 840 en el aparato 2000 y puede gestionar la comunicación y el control de las diversas funciones electrónicas. La función de control principal también puede apoyar la interfaz eléctrica y de comunicaciones 908 con un usuario o un dispositivo de salida tal como una impresora 920, así como funciones de diagnóstico óptico y seguridad. Junto con la función de control principal 900, la función multiplexora 902 puede controlar los datos del sensor 914 y la corriente de salida 916 para ayudar a controlar el módulo calefactor/sensor 2020. La función de control de la pantalla 904 puede controlar la salida a y, si es aplicable, interpretar la entrada desde la pantalla táctil LCD 846, que puede proporcionar, de este modo, una interfaz gráfica para el usuario en ciertas realizaciones. La función del detector 906 puede implementarse en componentes electrónicos de control 840 usando circuitos de control y procesamiento típicos para recopilar, digitalizar, filtrar y/o transmitir los datos a partir de un detector 2009 tal como uno o más módulos de detección de fluorescencia.

20 En diversas realizaciones, el módulo de detección fluorescente 2009 puede ser un sistema de detección de fluorescencia altamente sensible miniaturizado que puede, por ejemplo, ser capaz de análisis en tiempo real de una señal fluorescente que surge de un cartucho microfluídico situado adecuadamente, tal como se muestra en la figura 5. El módulo de detección 2009 puede emplear una o más fuentes de luz 2850 (por ejemplo, diodos emisores de luz (LED)), uno o más detectores 2852 (por ejemplo, fotodiodos), y uno o más filtros 2851 y/o lentes 2853. En algunas realizaciones, el módulo de detección 2009 puede contener múltiples (por ejemplo, seis) elementos de detección, donde cada elemento puede detectar una o más sondas fluorescentes.

30 En diversas realizaciones, el módulo deslizante 2007 del aparato 2000 puede alojar el módulo de detección 2009 (por ejemplo, sistema de detección óptico) así como conjunto mecánico/soporte de componentes ópticos 856 para presionar hacia abajo sobre el cartucho microfluídico 2020 cuando el asa 2008 del módulo deslizante 2007 es presionado hacia abajo. Las figuras 6A y 6B representan la ubicación, en diversas realizaciones, del cartucho microfluídico 2060 después de la inserción en el aparato 2000. El soporte de componentes ópticos 856 puede suspenderse desde la cubierta del módulo deslizante 2007 en uno o más (por ejemplo, 4) puntos. En el momento del cierre del módulo deslizante 2007 y el giro del asa 2008 del aparato 2000 hacia abajo, uno o más accionadores mecánicos 858 (por ejemplo, cuatro levas) pueden empujar hacia abajo la placa 860 contra uno o más (por ejemplo, 4) resortes 862. En el momento de la compresión, los resortes 862 pueden suministrar fuerza sobre el módulo detector 2009. Una superficie inferior 864 del módulo detector 2009 puede aplanarse (por ejemplo, dentro de 250 micras, normalmente dentro de 100 micras, más normalmente dentro de 25 micras), y la superficie 864 puede presionar sobre el cartucho 2060, que puede tener una capa flexible 868 (por ejemplo, dureza Shore de aproximadamente 50-70) con un grosor de 0,1-2,5 mm en ausencia de compresión, normalmente de aproximadamente 1,5 mm de grosor en ausencia de compresión. En consecuencia, la compresión del cartucho 2060, en combinación con la superficie plana 864, puede hacer a la presión, y por lo tanto el contacto térmico, más o menos uniforme sobre el cartucho microfluídico 2060. Uno o más resortes 862 en el módulo deslizante 2007 pueden suministrar una fuerza (por ejemplo, de 5 - 500 N, normalmente de aproximadamente 200 - 250 N) para generar una presión (por ejemplo, 2 psi) sobre la parte inferior del cartucho microfluídico 2060. La figura 6B también muestra que, cuando el módulo deslizante 2007 puede cerrarse, características mecánicas 863 del módulo deslizante 2007 pueden presionar hacia abajo sobre depósitos autoperforantes 866 del cartucho microfluídico 2060, haciendo que el contenido del depósito (por ejemplo, agua DI, reactivos de PCR) se liberen.

Módulo calefactor amovible

50 Un módulo calefactor amovible ejemplar 2020 se muestra en la figura 7. El módulo está configurado para suministrar calor localizado a diversas regiones seleccionadas de un cartucho recibido en el compartimento de recepción 2014. En la figura 7 se muestra un módulo calefactor que tiene una superficie rebajada 2044 que proporciona una plataforma para soportar un cartucho cuando está en el compartimento de recepción 2014. En una realización, el cartucho descansa directamente sobre la superficie 2044. La superficie 2044 se muestra rebajada, en la figura 7, pero no es necesario que lo esté.

60 El área 2044 está configurada para aceptar un cartucho microfluídico en una única orientación. Por lo tanto, el área 2044 puede estar equipada con un miembro de colocación correcta tal como una llave mecánica que impide a un usuario colocar un cartucho en el compartimento de recepción 2014 en la configuración errónea. En la figura 7 se muestra como llave mecánica ejemplar 2045 una esquina recortada diagonalmente del área 2044 en la que encaja una esquina recortada de forma complementaria de un cartucho microfluídico (véase, por ejemplo, la figura 9). Otros miembros de colocación correcta son coherentes con el aparato descrito en el presente documento: por ejemplo, una característica diseñada en uno o más bordes de un cartucho incluyendo aunque sin limitarse a: varias, tales como dos o más, esquinas recortadas, una o más muescas cortadas en uno o más bordes del cartucho de la figura 9; o una o más protuberancias fabricadas en uno o más bordes del cartucho de la figura 9. Miembros de colocación

correcta alternativos incluyen uno o más tetones o salientes diseñados en un lado inferior de un cartucho, complementarios a una o más tomas o agujeros rebajados en la superficie 2044. Miembros de colocación correcta alternativos incluyen una o más tomas o agujeros rebajados diseñados en un lado inferior de un cartucho, complementarios a uno o más tetones o salientes en la superficie 2044. En general, el patrón de características es tal que el cartucho posee al menos un elemento de asimetría, de modo que solamente pueda insertarse en una única orientación en el compartimento de recepción.

También se muestra en la figura 7 un agarre manual 2042 que facilita la retirada y la inserción del módulo calefactor por un usuario. El recorte 2048 permite a un usuario retirar fácilmente un cartucho del compartimento de recepción 2014 después de una serie de procesamiento donde, por ejemplo, al pulgar o al dedo de un usuario cuando se agarra la parte superior del cartucho, se le proporciona espacio cómodo mediante el recorte 2048. Ambos recortes 2042 y 2048 se muestran como rebajes semicirculares en la realización de la figura 7, pero se entendería que no están limitados de este modo en su forma. Por lo tanto, rebajes rectangulares, cuadrados, triangulares, ovales y de otra forma también son coherentes con un módulo calefactor tal como se describe en el presente documento.

En la realización de la figura 7, que está diseñada para ser compatible con el sistema de las figuras 2A-E, la parte frontal del módulo calefactor está a la izquierda de la figura. En la parte posterior del módulo calefactor 2020 hay una conexión eléctrica 2050, tal como una conexión RS-232, que permite que señales eléctricas se dirijan a calefactores ubicados en regiones específicas del área 2044 durante el procesamiento y análisis de muestras, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Por lo tanto, por debajo del área 2044 y no mostrada en la figura 7 puede estar una serie de fuentes de calor, tales como calefactores resistivos, que están configurados para alinearse con ubicaciones especificadas de un cartucho microfluídico insertado apropiadamente en el compartimento de recepción. La superficie 2044 es capaz de ser limpiada periódicamente para garantizar que cualesquiera derrames de líquido que puedan producirse durante la manipulación de muestras no causen ningún cortocircuito.

Otras características no esenciales del módulo calefactor 2020 son las siguientes. Uno o más orificios de ventilación de aire 2052 pueden estar situados en uno o más lados (tales como parte frontal, parte posterior o flancos) o caras (tales como parte superior o parte inferior) del módulo calefactor 2020, para permitir que el exceso de calor escape, cuando los calefactores debajo del compartimento de recepción 2014, están en funcionamiento. La configuración de los orificios de ventilación de aire en la figura 7 es ejemplar y se entendería que otros números y formas de los mismos son coherentes con la fabricación y el uso rutinarios de un módulo calefactor. Por ejemplo, aunque se muestran 5 orificios de ventilación de aire cuadrados, otros números tales como 1, 2, 3, 4, 6, 8 o 10 orificios de ventilación de aire son posibles, dispuestos en un lado, o distribuidas en dos o más lados y/o caras del módulo calefactor. En realizaciones adicionales, los orificios de ventilación de aire pueden ser circulares, rectangulares, ovales, triangulares, poligonales y tener vértices curvos o cuadrados, u otras formas más, incluyendo formas irregulares.

El módulo calefactor 2020 puede comprender, además, uno o más miembros de guiado 2047 que facilitan la inserción del módulo calefactor en un aparato tal como se describe adicionalmente en el presente documento para una realización en la que el módulo calefactor 2020 es amovible por un usuario. El módulo calefactor es ventajosamente amovible, dado que permite que el sistema 2000 se reconfigure fácilmente para un tipo de análisis diferente, tal como empleando un cartucho diferente con un miembro de colocación correcta y/o red microfluídica diferente, junto con la misma o una secuencia diferente de operaciones de procesamiento. En otras realizaciones, el módulo calefactor 2020 está diseñado para estar fijado y ser amovible solamente, por ejemplo, para limpieza, sustitución o mantenimiento, por el fabricante o un agente de mantenimiento autorizado, y no de forma rutinaria por el usuario. Los miembros de guiado pueden desempeñar uno o más papeles de garantizar que el módulo calefactor está alineado correctamente en el aparato, y garantizar que el módulo calefactor establece un encaje estrecho y no se mueve significativamente durante el procesamiento y análisis de una muestra, o durante el transporte del aparato. Los miembros de guiado mostrados en la realización de la figura 7 están en cualquier lado de compartimento de recepción 2044 y se estiran a lo largo de una fracción sustancial de la longitud del módulo 2020. Otros miembros de guiado son coherentes con el uso en el presente documento, e incluyen, aunque sin limitarse a, otros números de miembros de guiado tales como 1, 3, 4, 5, 6 u 8, y otras posiciones de los mismos, incluyendo situadas en el área 2051 del módulo 2020. Los miembros de guiado 2047 se muestran teniendo un grosor no constante a lo largo de sus longitudes. Es coherente en el presente documento que otros miembros de guiado puedan tener grosores esencialmente constantes a lo largo de sus longitudes.

Adyacente al compartimento de recepción 2014 hay un elemento calefactor no de contacto 2046, tal como una lámpara, instalada en un área rebajada 2053. El área rebajada 2053 también puede estar configurada con un reflector, o un revestimiento reflectante, de modo que tanta energía térmica y óptica procedente del elemento calefactor no de contacto 2046 como sea posible se dirija hacia fuera, hacia el compartimento de recepción 2014. El elemento 2046 es una lámpara térmica en ciertas realizaciones. El elemento 2046 está configurado para recibir energía eléctrica y, de este modo, calentarse a partir de los efectos de una resistencia eléctrica. El elemento 2046 proporciona una manera de calentar una región elevada de un cartucho recibido en el compartimento de recepción 2014. La región elevada del cartucho (véase, por ejemplo, la figura 9) puede contener una cámara de lisis, y la aplicación de calor procedentes del elemento calefactor no de contacto 2046 puede tener el efecto de lisis células dentro de la cámara de lisis.

En la figura 7 también se muestra una región óptica del material fluorescente, tal como material ópticamente fluorescente, 2049 en el área 2051 del módulo calefactor 2020. La región del material fluorescente está configurada para ser detectada por un sistema de detección descrito adicionalmente en el presente documento. La región 2049 se usa para verificar el estado de los componentes ópticos en el sistema de detección antes del procesamiento y el análisis de muestras y, por lo tanto, actúa como un control, o un patrón. Por ejemplo, en una realización una tapa del aparato (véase, por ejemplo, la figura 2A) cuando está en una posición abierta permite que la luz ambiente alcance la región 2049 y, de este modo, haga que el material fluorescente emita una frecuencia o espectro de luz característico que pueda medirse por el detector para, por ejemplo, fines de estandarización o calibración. En otra realización, en lugar de depender de la luz ambiente para hacer que el material fluorescente emita fluorescencia, se usa la fuente de luz del propio sistema de detección, tal como uno o más LED. La región 2049 está situada, por lo tanto, para alinearse con una posición de un detector. La región 2049 se muestra como rectangular, pero puede estar configurada en otras formas tal como cuadrada, circular, elíptica, triangular, poligonal y teniendo vértices curvos o cuadrados. Se entenderá, también, que la región 2049 puede estar situada en otros lugares en el módulo calefactor 2020, de acuerdo con la conveniencia y con el fin de ser complementaria al sistema de detección desplegado.

El módulo calefactor 2020 también comprende una serie de calefactores, situados debajo del área 2044 y no mostrados en la figura 7. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, dichos calefactores pueden ser calefactores resistivos, configurados para calentar específicamente y en momentos específicos, de acuerdo con señales eléctricas recibidas.

En particular y no mostrado en la figura 7, el módulo calefactor/sensor 2020 puede incluir, por ejemplo, una función de multiplexado 902 en una placa de circuitos de multiplexado discreta (placa MUX), uno o más calefactores (por ejemplo, un microcalefactor), uno o más sensores de temperatura (opcionalmente combinados entre sí como una única unidad calefactora/sensora con uno o más microcalefactores respectivos, por ejemplo, como fabricados de forma fotolitográfica en sustratos de sílice fundida), y un elemento calefactor no de contacto 2046. Los microcalefactores y el elemento calefactor no de contacto pueden proporcionar energía térmica que puede accionar diversos componentes microfluídicos en un cartucho microfluídico situado adecuadamente. Un sensor (por ejemplo, como un sensor de temperatura resistivo (RTD)) puede permitir monitorización en tiempo real de los microcalefactores y el uno o varios calefactores no de contacto 2046, por ejemplo a través de un mecanismo basado en retroalimentación para permitir el control de la temperatura. Uno o más microcalefactores pueden alinearse con componentes microfluídicos correspondientes (por ejemplo, válvulas, bombas, compuertas, cámaras de reacción) a calentar en un cartucho microfluídico situado adecuadamente. Un microcalefactor puede estar diseñado para ser ligeramente más grande que el uno o varios componentes microfluídicos correspondientes en el cartucho microfluídico de modo que, incluso aunque el cartucho pueda estar ligeramente mal alineado, tal como descentrado, del calefactor, los componentes individuales puedan calentarse eficazmente.

El calefactor no de contacto 2046 también puede servir como fuente de calor por radiación para calentar una sección de un cartucho microfluídico situado adecuadamente. Por ejemplo, una lámpara de xenón de 20 W puede usarse como elemento calefactor no de contacto 2046. En diversas realizaciones, el módulo calefactor/sensor 2020 puede ser específico de diseños de cartucho particulares y puede ser fácilmente sustituible a través del panel frontal del aparato 800. El módulo calefactor/sensor 2020 puede estar configurado para permitir la limpieza de la superficie de calentamiento 2044 con agentes de limpieza comunes (por ejemplo, una solución de lejía al 10 %).

Con referencia a las figuras 8A y 8B, se muestra un conjunto de calefactores ejemplar configurado para calentar, cíclicamente, la zona de reacción de PCR 1001. Debe entenderse que configuraciones de calefactor para accionar otras regiones de un cartucho microfluídico tales como otras compuertas, válvulas y accionadores, pueden estar diseñadas y desplegadas de acuerdo con principios similares a los que rigen los calefactores mostrados en las figuras 8A y 8B. Una zona de reacción de PCR ejemplar 1001, normalmente una cámara o canal que tiene un volumen $\sim 1,6 \mu\text{l}$, está configurada con un lado largo y un lado corto, cada uno con un elemento calefactor asociado. Una zona de reacción de PCR también puede denominarse como un reactor de PCR, en el presente documento. El aparato, por lo tanto, preferentemente incluye cuatro calefactores dispuestos a lo largo de los lados de, y configurados para calentar, una zona de reacción de PCR dada, tal como se muestra en la realización ejemplar de la figura 8A: calefactor superior largo 1005, calefactor inferior largo 1003, calefactor izquierdo corto 1007, y calefactor derecho corto 1009. El espacio pequeño entre el calefactor superior largo 1005 y el calefactor inferior largo 1003 da como resultado un gradiente de temperatura despreciable (menos de 1°C a través de la anchura del canal de PCR en cualquier punto a lo largo de la longitud de la zona de reacción de PCR) y por lo tanto una temperatura eficazmente uniforme por toda la zona de reacción de PCR. Los calefactores en los bordes cortos del reactor de PCR proporciona calor para contrarrestar el gradiente creado por los dos calefactores largos desde el centro del reactor hasta el borde del reactor.

Sería entendido por un experto en la materia que aún otras configuraciones de uno o más calefactores situados alrededor de una zona de reacción de PCR son coherentes con los métodos y aparatos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un lado "largo" de la zona de reacción puede estar configurado para ser calentado por dos o más calefactores. Se usan orientaciones y configuraciones específicas de calefactores para crear zonas de calentamiento uniformes incluso en sustratos que tienen mala conductividad térmica debido a la mala conductividad

térmica del vidrio, o el cuarzo, o se utilizan sustratos de sílice fundida para ayudar al funcionamiento independiente de diversos componentes microfluídicos tales como válvulas y el funcionamiento independiente de los diversos carriles de PCR. Sería entendido, además, por un experto en la materia, que los principios que subyacen en la configuración de calefactores alrededor de una zona de reacción de PCR son aplicables de forma similar a la disposición de calefactores adyacentes a otros componentes del cartucho microfluídico, tales como accionadores, válvulas y compuertas.

En ciertas realizaciones, cada calefactor tiene un sensor de temperatura asociado. En la realización de la figura 8A, se usa un único sensor de temperatura 1011 para ambos calefactores largos. Un sensor de temperatura 1013 para el calefactor izquierdo corto, y un sensor de temperatura 1015 para el calefactor derecho corto también se muestran. El sensor de temperatura en el medio del reactor se usa para proporcionar retroalimentación y controlar la cantidad de energía suministrada a los dos calefactores largos, mientras que cada uno de los calefactores cortos tienen un sensor de temperatura dedicado colocado adyacente a él con el fin de controlarlo. Los sensores de temperatura están configurados preferentemente para transmitir información acerca de la temperatura en sus inmediaciones al procesador en momentos tales que los calefactores no están recibiendo corriente que hace que se calienten. Esto puede conseguirse con el control apropiado de los ciclos de corriente.

Con el fin de reducir el número de elementos sensores o calefactores requeridos para controlar un calefactor de PCR, se pueden usar los calefactores para detectar así como para calentar, y de este modo obviar la necesidad de tener un sensor dedicado diferente para cada calefactor. En otra realización, cada uno de los cuatro calefactores puede estar diseñado para tener un vataje apropiado, y conectar los cuatro calefactores en serie o en paralelo para reducir el número de elementos controlables electrónicamente de 4 a solamente 1, reduciendo de este modo la carga sobre los circuitos electrónicos asociados.

La figura 8B muestra vistas expandidas de calefactores y sensores de temperatura usados junto con una zona de reacción de PCR de la figura 8A. Los sensores de temperatura 1001 y 1013 están diseñados para tener una resistencia a temperatura ambiente de aproximadamente 200-300 ohmios. Este valor de resistencia se determina controlando el grosor de la capa de metal depositada (por ejemplo, un sándwich de 400 Å TiW / 3.000Å Au / 400 Å TiW), y grabando químicamente la línea de metal de bobinado para tener una anchura de aproximadamente 10-25 µm y 20-40 mm de longitud. El uso de metal en esta capa le da un coeficiente de resistividad de temperatura del orden de 0,5 - 20 °C/ohmios, preferentemente en el intervalo de 1,5 - 3 °C/ohmios. Medir la resistencia a temperaturas más altas permite la determinación de la temperatura exacta de la ubicación de estos sensores.

La configuración para calentamiento uniforme, mostrada en la figura 8A para una única zona de reacción de PCR, también puede aplicarse a un cartucho de PCR multicarril en el que se producen múltiples reacciones de PCR independientes.

Cada calefactor puede estar controlado independientemente por un procesador y/o circuitos de control usados junto con el aparato descrito en el presente documento. La figura 8C muestra imágenes térmicas, desde la superficie superior de un cartucho microfluídico cuando es calentado por calefactores configurados como en las figuras 8A y 8B, cuando cada calefactor es activado, a su vez, de la siguiente manera: (A): superior largo solamente; (B) inferior largo solamente; (C) izquierdo corto solamente; (D) derecho corto solamente; y (E) los cuatro calefactores encendidos. El panel (F) muestra una vista de la zona de reacción y los calefactores a la misma escala que los otros paneles de imagen en la figura 8C. En la figura también se muestra una barra de temperatura.

Cartucho microfluídico

La figura 9 muestra una vista en perspectiva de un exterior de un cartucho microfluídico ejemplar 2060 para uso junto con el sistema descrito en el presente documento. Presente en el cartucho 2060 está al menos un envase de reactivos 2062. Se muestran cuatro de dichos envases de reactivos, aunque otros números de dichos envases, tales como aunque sin limitarse a uno, dos, tres, cinco, seis, ocho, diez y doce, son posibles, dependiendo de la aplicación. El cartucho 2060 comprende, además, una torre 2064 que contiene reactivos, y está equipada con una entrada 2066, tal como un Luer, a través de la cual puede introducirse una parte de una muestra biológica. La torre 2064 también puede comprender una o más cámaras tales como una cámara de lisis a granel 2065 y una cámara de residuos 2067. La cámara de residuos 2067 puede tener un orificio de ventilación 2069 para liberar gases tales como aire.

Aparte de la torre 2064, el cartucho 2060 es sustancialmente plano, de modo que pueda ser manipulado fácilmente por un operador y pueda ser emparejado fácilmente con un compartimento de recepción complementaria de un aparato, tal como se muestra en la figura 1.

El cartucho 2060 comprende, además, un puerto 2068 a través del cual un detector puede recibir una señal directa o indirectamente a partir de uno o más polinucleótidos en la muestra, durante el procesamiento o la amplificación, con el fin de proporcionar a un usuario un resultado de diagnóstico sobre la muestra.

El cartucho 2060 puede comprender, además, un miembro de colocación correcta tal como una llave mecánica, complementaria a un miembro de colocación correcta correspondiente en el compartimento de recepción. En la figura 9 se muestra un miembro de colocación correcta ejemplar 2071, una esquina recortada del cartucho.

- 5 El sistema integrado, tal como se describe en el presente documento, comprende un aparato configurado para recibir un cartucho microfluídico, y un cartucho microfluídico. Éste es coherente con el sistema descrito en el presente documento ya que una serie de diferentes configuraciones de cartucho microfluídico, y propósitos del mismo, son compatibles con aparatos configurados adecuadamente. De este modo, por ejemplo, aunque se describen beneficios donde un único cartucho es capaz de aceptar una muestra biológica recogida, preparar la muestra, incluyendo lisar células para liberar y recoger polinucleótidos contenidos en su interior, aplicar etapas preparatorias preamplificación a los polinucleótidos, amplificar los polinucleótidos, y hacer que los polinucleótidos amplificados sean detectados, también es coherente con las descripciones en el presente documento que pueden usarse otros cartuchos microfluídicos. Dichos otros cartuchos pueden estar configurados para llevar a cabo menos, tales como una o más, de las etapas mencionadas anteriormente y, de forma correspondiente, el aparato para uso con ellos está configurado para hacer que se lleven a cabo menos de dichas etapas. Debe entenderse por lo tanto, que cuando se presentan diversas configuraciones ejemplares de cartucho microfluídico en el presente documento, los diversos componentes del mismo pueden usarse de forma intercambiable (por ejemplo, una válvula ejemplar descrita en relación con un cartucho también puede usarse en una red descrita en relación con otro cartucho) ambos sin modificación, y con ajustes o modificaciones adecuadas de geometría o tamaño, según sea apropiado.

20 *Aspectos de cartuchos microfluídicos*

Por consiguiente, la tecnología en el presente documento también comprende un cartucho microfluídico que tiene los siguientes atributos. Por lo tanto, la tecnología incluye un cartucho microfluídico que está configurado para procesar uno o más polinucleótidos, por ejemplo, para concentrar el uno o varios polinucleótidos y/o para separar el uno o varios polinucleótidos de compuestos inhibidores, (por ejemplo, hemoglobina, péptidos, compuestos fecales, ácidos húmicos, compuestos mucosales, proteínas de unión a ADN, o un sacárido) que podrían inhibir la detección y/o la amplificación de los polinucleótidos.

30 El cartucho microfluídico puede estar configurado para poner en contacto los polinucleótidos y un compuesto relativamente inmovilizado que preferentemente se asocia con (por ejemplo, retiene) los polinucleótidos en oposición a los inhibidores. Un compuesto ejemplar es una poliamida poli-catiónica (por ejemplo, poli-L-lisina y/o poli-D-lisina), o polietilenimina (PEI), que puede unirse a una superficie (por ejemplo, superficies de una o más partículas). El compuesto retiene los polinucleótidos, de modo que los polinucleótidos y los inhibidores puedan separarse, tal como lavando la superficie a la que el compuesto y los polinucleótidos asociados están unidos. En el momento de la separación, la asociación entre el polinucleótido y el compuesto puede alterarse para liberar (por ejemplo, separar) los polinucleótidos del compuesto y la superficie.

40 En algunas realizaciones, la superficie (por ejemplo, superficies de una o más partículas) puede modificarse con una sustancia policatiónica tal como una poliamida o PEI, que puede unirse covalentemente a la superficie. La poliamida policatiónica puede incluir al menos uno de poli-L-lisina y poli-D-lisina. En algunas realizaciones, la poliamida policatiónica (por ejemplo, la al menos una de la poli-L-lisina y la poli-D-lisina) tiene un peso molecular promedio de al menos aproximadamente 7500 Da. La poliamida policatiónica (por ejemplo, la al menos una de la poli-L-lisina y la poli-D-lisina) puede tener un peso molecular promedio de menos de aproximadamente 35.000 Da (por ejemplo, un peso molecular promedio de menos de aproximadamente 30.000 Da (por ejemplo, un peso molecular promedio de aproximadamente 25.000 Da)). La poliamida policatiónica (por ejemplo, la al menos una de la poli-L-lisina y la poli-D-lisina) puede tener una mediana de peso molecular de al menos aproximadamente 15.000 Da. La poliamida policatiónica (por ejemplo, la al menos una de la poli-L-lisina y la poli-D-lisina) puede tener una mediana de peso molecular de menos de aproximadamente 25.000 Da (por ejemplo, una mediana de peso molecular de menos de aproximadamente 20.000 Da (por ejemplo, una mediana de peso molecular de aproximadamente 20.000 Da). Si el material policatiónico es PEI, su peso molecular está, preferentemente, en el intervalo de 600-800 Daltons.

55 En otras realizaciones, el cartucho microfluídico incluye una superficie que tiene una poliamida policatiónica o PEI unida a ella y un pasaje de introducción de muestras en comunicación con la superficie para poner en contacto la superficie con una muestra fluida.

En algunas realizaciones, el aparato incluye una fuente de calor configurada para calentar un líquido acuoso en contacto con la superficie a al menos aproximadamente 65 °C.

60 En algunas realizaciones, el cartucho incluye un depósito de líquido que tiene un pH de al menos aproximadamente 10 (por ejemplo, aproximadamente 10,5 o más). El cartucho puede estar configurado para poner en contacto la superficie con el líquido (por ejemplo, accionando una fuente de presión para mover el líquido).

65 Otro aspecto del cartucho microfluídico se refiere a un miembro de retención, por ejemplo, una pluralidad de partículas tales como perlas, que comprenden PEI, o poli-lisina unida, por ejemplo, poli-L-lisina, y métodos y sistemas relacionados. Un método ejemplar para procesar una muestra incluye poner en contacto un miembro de

- 5 retención con una mezcla que incluye proporcionar una mezcla que incluye un líquido y una cantidad de polinucleótido. El miembro de retención puede estar configurado para retener, preferentemente, polinucleótidos en comparación con el inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa. Sustancialmente todo el líquido en la mezcla puede retirarse del miembro de retención. Los polinucleótidos pueden liberarse del miembro de retención. El polinucleótido puede tener un tamaño de menos de aproximadamente 7,5 Mpb.
- El líquido puede ser un primer líquido, y retirar sustancialmente todo el líquido del miembro de retención puede incluir poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido.
- 10 Poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido puede incluir accionar una fuente de presión accionada térmicamente para aplicar una presión al segundo líquido. Poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido puede incluir abrir una válvula accionada térmicamente para colocar el segundo líquido en comunicación fluida con el miembro de retención.
- 15 El segundo líquido puede tener un volumen de menos de aproximadamente 50 microlitros, y puede incluir un detergente (por ejemplo, SDS).
- El miembro de retención puede incluir una superficie que tiene un compuesto configurado para unir polinucleótidos, preferentemente, a inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (dichos inhibidores incluyendo, por ejemplo, hemoglobina, péptidos, compuestos fecales, ácidos húmicos, compuestos mucosales, proteínas de unión a ADN o un sacárido).
- 20 La superficie puede incluir una poli-lisina (por ejemplo, poli-L-lisina y/o poli-D-lisina) o PEI.
- 25 Liberar polinucleótidos del miembro de retención puede incluir calentar el miembro de retención a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C (por ejemplo, a aproximadamente 65 °C). La temperatura puede ser insuficiente para hervir el líquido en presencia del miembro de retención durante el calentamiento. La temperatura puede ser de 100 °C o menos (por ejemplo, menos de 100 °C, aproximadamente 97 °C o menos). La temperatura puede mantenerse durante menos de aproximadamente 10 minutos (por ejemplo, durante menos de aproximadamente 5 minutos, durante menos de aproximadamente 3 minutos). La liberación puede realizarse sin centrifugado del miembro de retención.
- 30 En ciertas realizaciones, los inhibidores de PCR pueden retirarse rápidamente de muestras clínicas para crear una muestra lista para PCR. Los métodos en el presente documento pueden comprender, por lo tanto, la preparación de una muestra que contiene polinucleótidos que pueden estar sustancialmente libres de inhibidores. Dichas muestras pueden prepararse a partir de, por ejemplo, lisados impuros que resultan de técnicas de lisado térmicas, químicas, ultrasónicas, mecánicas, electrostáticas y otras. Las muestras pueden prepararse sin centrifugado. Las muestras pueden prepararse usando otros dispositivos microfluídicos o a mayor escala.
- 35 El miembro de retención puede usarse para preparar muestras de polinucleótidos para procesamiento adicional, tal como amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa. En ciertas realizaciones, más del 90 % de un polinucleótido presente en una muestra puede unirse al miembro de retención, liberarse y recuperarse.
- 40 En ciertas realizaciones, un polinucleótido puede unirse al miembro de retención, liberarse y recuperarse, en menos de aproximadamente 10 minutos (por ejemplo, menos de aproximadamente 7½ minutos, menos de aproximadamente 5 minutos, o menos de aproximadamente 3 minutos).
- 45 Un polinucleótido puede unirse a un miembro de retención, liberarse y recuperarse sin someter al polinucleótido, miembro de retención y/o inhibidores a centrifugado.
- 50 Separar los polinucleótidos e inhibidores generalmente excluye someter a los polinucleótidos, inhibidores, región de procesamiento, y/o miembro de retención a sedimentación (por ejemplo, centrifugado).
- 55 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa y una pluralidad de nucleótidos. La mezcla de reactivos de PCR puede estar en forma de uno o más microgránulos liofilizados, y la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto el microgránulo de PCR con líquido para crear una solución de mezcla de reactivos de PCR.
- 60 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede estar configurado para acoplar calor procedente de una fuente de calor externa con la mezcla de reactivos de PCR y la muestra con polinucleótidos neutralizados en condiciones de ciclado térmico adecuada para crear amplicones de PCR a partir de la muestra con polinucleótidos neutralizados.
- 65 En diversas realizaciones, la mezcla de reactivos de PCR puede incluir, además, un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorógena selectiva para al menos una parte del plásmido.

5 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir un polinucleótido de control negativo, donde la red microfluídica puede estar configurada para poner en contacto independientemente cada uno de la muestra con polinucleótidos neutralizados y el polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear independientemente amplicones de PCR de la muestra con polinucleótidos neutralizados y amplicones de PCR del polinucleótido de control negativo.

10 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos, donde el cartucho microfluídico puede estar configurado para poner en contacto la muestra con polinucleótidos neutralizados o un amplicón de PCR de la misma con la sonda. La sonda puede ser una sonda de hibridación fluorógena. La sonda de hibridación fluorógena puede incluir una secuencia de polinucleótidos acoplada a un colorante informador fluorescente y un colorante extintor de fluorescencia. La mezcla de reactivos de PCR puede incluir, además, un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorógena de plásmido selectiva para al menos una parte del plásmido y el cartucho microfluídico puede estar configurado para permitir la detección óptica independiente de la sonda de hibridación fluorógena y la sonda de hibridación fluorógena de plásmido.

15 En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que puede ser característica de un organismo, por ejemplo cualquier organismo que emplee polinucleótidos de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. Por lo tanto, la sonda puede ser selectiva para cualquier organismo. Los organismos adecuados incluyen mamíferos (incluyendo seres humanos), aves, reptiles, anfibios, peces, animales domésticos, animales de granja, animales salvajes, organismos extintos, bacterias, hongos, virus, plantas, y similares. La sonda también puede ser selectiva para componentes de organismos que emplean sus propios polinucleótidos, por ejemplo mitocondrias. En algunas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para microorganismos, por ejemplo, organismos usados en la producción de alimentos (por ejemplo, levaduras empleadas en productos fermentados, mohos o bacterias empleadas en quesos, y similares) o patógenos (por ejemplo, de seres humanos, mamíferos domésticos o salvajes, aves domésticas o salvajes, y similares). En algunas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para organismos seleccionados entre el grupo que consiste en bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, levaduras, hongos, protozoos y virus.

20 En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que puede ser característica de un organismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Staphylococcus* spp., por ejemplo, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus* resistente a vancomicina; *Streptococcus* (por ejemplo, α , β o γ -hemolíticos, Grupo A, B, C, D o G) tales como *S. pyogenes*, *S. agalactiae*; *E. faecalis*, *E. durans*, y *E. faecium* (anteriormente *S. faecalis*, *S. durans*, *S. faecium*); estreptococos del grupo D no enterocócicos, por ejemplo, *S. bovis* y *S. equines*; *Streptococci viridans*, por ejemplo, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mitior*, *A. milleri*, *S. constellatus*, *S. intermedius* y *S. anginosus*; *S. iniae*; *S. pneumoniae*; *Neisseria*, por ejemplo, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Neisseria* sp saprofitica; *Erysipelothrix*, por ejemplo, *E. rhusiopathiae*; *Listeria* spp., por ejemplo, *L. monocytogenes*, raramente *L. ivanovii* y *L. seeligeri*; *Bacillus*, por ejemplo, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. subtilis niger*, *B. thuringiensis*; *Nocardia asteroides*; *Legionella*, por ejemplo, *L. pneumonophila*, *Pneumocystis*, por ejemplo, *P. carinii*; *Enterobacteriaceae* tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*, *E. coli*O157:H7); *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia*, y similares, por ejemplo, *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhi*, *S. paratyphi* A, B (*S. schottmuelleri*), y C (*S. hirschfeldii*), *S. dublin*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. newport*, *S. infantis*, *S. agona*, *S. montevideo*, y *S. saint-paul*; *Shigella*, por ejemplo, subgrupos: A, B, C y D, tal como *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*; *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris* y *P. myxofaciens*), *Morganella* (*M. morganii*); *Providencia* (*P. rettgeri*, *P. alcalifaciens* y *P. stuartii*); *Yersinia*, por ejemplo, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Haemophilus*, por ejemplo, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. ducreyi*; *Brucella*, por ejemplo, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*; *Francisella*, por ejemplo, *F. tularensis*; *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. aeruginosa*, *P. paucimobilis*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. acidovorans*, *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia*; *Campylobacter*, por ejemplo, *C. fetus fetus*, *C. jejuni*, *C. pylori* (*Helicobacter pylori*); *Vibrio*, por ejemplo, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, y los vibrios no aglutinables; *Clostridia*, por ejemplo, *C. penfringens*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C. botulinum*; *Actinomyces*, por ejemplo, *A. israelii*; *Bacteroides*, por ejemplo, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. caccae* y *B. merdae*; *Prevotella*, por ejemplo, *P. melaninogenica*; género *Fusobacterium*; *Treponema*, por ejemplo *T. pallidum* subespecie *endemicum*, *T. pallidum* subespecie *pertenue*, *T. carateum* y *T. pallidum* subespecie *pallidum*; género *Borrelia*, por ejemplo, *B burgdorferi*; género *Leptospira*; *Streptobacillus*, por ejemplo, *S. moniliformis*; *Spirillum*, por ejemplo, *S. minus*; *Mycobacterium*, por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, el complejo *M. fortuitum* (*M. fortuitum* y *M. chelonae*), *M. leprae*, *M. asiaticum*, *M. chelonae* subesp. *abscessus*, *M. fallax*, *M. fortuitum*, *M. malmoense*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*; *Mycoplasma*, por ejemplo, *M. hominis*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*; *Mycoplasma*, por ejemplo, *M. genitalium*; *Ureaplasma*, por ejemplo, *U. urealyticum*; *Trichomonas*, por ejemplo, *T. vaginalis*; *Cryptococcus*, por ejemplo, *C. neoformans*; *Histoplasma*, por ejemplo, *H. capsulatum*; *Candida*, por ejemplo, *C. albicans*; *Aspergillus* sp; *Coccidioides*, por ejemplo, *C. immitis*; *Blastomyces*, por ejemplo *B. dermatitidis*; *Saracoccioides*, por ejemplo, *P. brasiliensis*; *Penicillium*, por ejemplo, *P. marneffei*; *Sporothrix*, por ejemplo, *S. schenckii*; *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia* y *Basidiobolus*; enfermedades causadas por *Bipolaris*,

Cladophialophora, Cladosporium, Drechslera, Exophiala, Fonsecaea, Phialophora, Xylohypha, Ochroconis, Rhinocladiella, Scolecobasidium y Wangiella; Trichosporon, por ejemplo, T. beigellii; Blastoschizomyces, por ejemplo, B. capitatus; Plasmodium, por ejemplo, P. falciparum, P. vivax, P. ovale y P. malariae; Babesia sp; protozoos del género Trypanosoma, por ejemplo, T. cruzi; Leishmania, por ejemplo, L. donovani, L. major L. tropica, L. mexicana, L. braziliensis, L. viannia braziliensis; Toxoplasma, por ejemplo, T. gondii; Amebas de los géneros Naegleria o Acanthamoeba; Entamoeba histolytica; Giardia lamblia; género Cryptosporidium, por ejemplo, C. parvum; Isospora belli; Cyclospora cayentanensis; Ascaris lumbricoides; Trichuris trichiura; Ancylostoma duodenale o Necator americanus; Strongyloides stercoralis Toxocara, por ejemplo, T. canis, T. cati; Baylisascaris, por ejemplo, B. procyonis; Trichinella, por ejemplo, T. spiralis; Dracunculus, por ejemplo, D. medinensis; género Filarioidea; Wuchereria bancrofti; Brugia, por ejemplo, B. malayi, o B. timori; Onchocerca volvulus; Loa loa; Dirofilaria immitis; género Schistosoma, por ejemplo, S. japonicum, S. mansoni, S. mekongi, S. intercalatum, S. haematobium; Paragonimus, por ejemplo, P. Westermani, P. Skriabini; Clonorchis sinensis; Fasciola hepatica; Opisthorchis sp; Fasciolopsis buski; Diphyllbothrium latum; Taenia, por ejemplo, T. saginata, T. solium; Echinococcus, por ejemplo, E. granulosus, E. multilocularis; Picornavirus, rinovirus ecovirus, coxsackievirus, virus de la gripe; paramixovirus, por ejemplo, tipos 1, 2, 3 y 4; adnovirus; Herpesvirus, por ejemplo, VHS-1 y VHS-2; virus varicella-zoster; virus linfotrófico T humano (tipo I y tipo II); Arbovirus y Arenavirus; Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae; Flavivirus; Hantavirus; encefalitis víricas (alfavirus por ejemplo, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental); fiebres hemorrágicas víricas (filovirus, por ejemplo, Ébola, Marburg, y arenavirus, por ejemplo, Lassa, Machupo); Viruela (variola); retrovirus por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2; virus del papiloma humano (VPH) tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35.

En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que puede ser característica de un organismo seleccionado entre el grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter Baumannii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecium*, enterococos resistentes a vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *Streptococcus viridans*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus del Grupo B*, *Streptococcus del Grupo C*, *Streptococcus del Grupo G*, *Streptococcus del Grupo F*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Gardenerella vaginalis*, *Micrococcus sps.*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella sps.*, *Chlamydia trachomatis*, *Peptostreptococcus productus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Lactobacillus fermentum*, *Eubacterium lentum*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Chlamydia spp.*, *Camplobacter spp.*, *Salmonella spp.*, viruela (variola mayor), Yersinia Pestis, *Virus herpes simple I* (VHS I), y *Virus herpes simple II* (VHS II).

En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que es característica de *Streptococcus del grupo B*.

La tecnología en el presente documento también comprende un cartucho microfluídico que tiene un componente para inhibir el movimiento de fluido. El componente comprende un canal, una primera masa de una sustancia térmicamente sensible (TRS por sus siglas en inglés) dispuesta en un primer lado del canal, una segunda masa de una TRS dispuesta en un segundo lado del canal opuesto al primer lado del canal, una fuente de presión de gas asociada con la primera masa de la TRS. El accionamiento de la fuente de presión de gas impulsa la primera masa del TRS al interior de la segunda masa de la TRS y obstruye el canal.

El cartucho microfluídico puede incluir una segunda fuente de presión de gas asociada con la segunda masa de la TRS. El accionamiento de la segunda fuente de presión de gas impulsa la segunda masa de TRS al interior de la primera masa de TRS. Al menos una (por ejemplo, ambas) de las primera y segunda masas de TRS puede ser una cera.

Otro aspecto del cartucho microfluídico incluye un componente para obstruir un canal de un cartucho microfluídico. Una masa de una TRS puede ser calentada e impulsada por el canal (por ejemplo, mediante presión de gas) al interior de una segunda masa de TRS. La segunda masa de TRS también puede ser impulsada (por ejemplo, mediante presión de gas) hacia la primera masa de TRS.

Otro aspecto del cartucho microfluídico es un accionador. El accionador incluye un canal, una cámara conectada al canal, al menos un depósito de líquido encapsulado dispuesto en la cámara, y un gas que rodea al depósito dentro de la cámara. Calentar la cámara expande el depósito de líquido encapsulado y presuriza el gas. Normalmente el líquido tiene un punto de ebullición de aproximadamente 90 °C o menos. El líquido puede ser un hidrocarburo que tiene aproximadamente 10 átomos de carbono o menos. El líquido puede estar encapsulado por un polímero.

Un accionador puede incluir múltiples depósitos de líquido encapsulado dispuestos en la cámara. Los múltiples depósitos pueden estar dispersados dentro de un sólido (por ejemplo, una cera). Los múltiples depósitos pueden estar dispuestos dentro de un recinto flexible (por ejemplo, un saco flexible).

Otro aspecto del cartucho microfluídico incluye presurizar un gas dentro de una cámara del dispositivo para crear una presión del gas suficiente para mover un líquido dentro de un canal del dispositivo microfluídico. Presurizar el

gas normalmente expande al menos un depósito de líquido encapsulado dispuesto dentro de la cámara. Expandir el al menos un depósito puede incluir calentar la sustancia sensible a la temperatura (TRS) que separa primer y segundo canales del dispositivo. El dispositivo puede estar configurado para mover un primer líquido a lo largo del primer canal de modo que una parte (por ejemplo, una parte central) del primer líquido pueda ser adyacente a la TRS, y para mover un segundo líquido a lo largo del segundo canal de modo que una parte (por ejemplo, una parte central) del segundo líquido pueda ser adyacente a la TRS. Una fuente de calor puede ser accionada para mover la TRS (por ejemplo, fundiendo, dispersando, fragmentando). Las partes centrales de los primer y segundo líquidos normalmente se combinan sin ser separados por una interfaz gaseosa. Normalmente, solamente un subconjunto del primer líquido y un subconjunto del segundo líquido pueden combinarse. Los líquidos se mezclan tras haberse movido a lo largo de un canal de mezcla. Los líquidos, cuando están combinados, deben moverse al menos longitudes de dos gotitas para conseguir una buena mezcla mediante interestratificación y difusión transversal (perpendicular a la longitud del microcanal) sin tener que depender de la difusión longitudinal sola para la mezcla (véase, también, por ejemplo, "Mathematical modeling of drop mixing in 'a slit-type microchannel", K Handique, y col., J. Micromech. Microeng., 11 548-554, (2001)). Moviendo la gota combinada la longitud de una gota, se hace que el líquido en el medio de la gota que se aleja se mueva a la parte frontal de la gota delantera y a continuación hacia la pared del canal. En el extremo posterior de la gota, el líquido se mueve desde la pared hacia el centro de la gota. Este movimiento de la gota da como resultado interestratificación entre los dos líquidos. Interestratificación adicional puede conseguirse repitiendo el método veces adicionales, tal como sobre longitudes de gota adicionales.

El cartucho microfluídico incluye, además, una partícula de reactivo liofilizada. En algunas realizaciones, las partículas liofilizadas incluyen múltiples partículas más pequeñas que tienen, cada una, una pluralidad de ligandos que preferentemente se asocian con polinucleótidos en comparación con inhibidores de PCR. Las partículas liofilizadas también pueden (o como alternativa) incluir reactivos de lisis (por ejemplo, enzimas) configurados para lisar células para liberar polinucleótidos. Las partículas liofilizadas también pueden (o como alternativa) incluir enzimas (por ejemplo, proteasas) que degradan proteínas.

Las células pueden lisarse combinando una solución de las células, por ejemplo, en una gotita microfluídica, con las partículas liofilizadas reconstituyendo de este modo las partículas. Los reactivos de lisis reconstituidos lisan las células. Los polinucleótidos se asocian con ligandos de las partículas más pequeñas. Durante la lisis, la solución puede calentarse (por ejemplo, por radiación usando una lámpara tal como una lámpara térmica, o mediante una fuente de calor por contacto).

En algunas realizaciones, las partículas liofilizadas incluyen reactivos (por ejemplo, cebadores, plásmidos de control, enzimas polimerasa) para realizar PCR.

Otro aspecto del cartucho microfluídico incluye un depósito de líquido capaz de contener un líquido (por ejemplo, un disolvente, un tampón, un reactivo, o combinaciones de los mismos). En general, el depósito puede tener una o más de las siguientes características, tal como se describe adicionalmente en la publicación de solicitud internacional n.º WO2006/079082.

El depósito puede incluir una pared que puede ser manipulada (por ejemplo, presionada o hundida) para reducir un volumen dentro del depósito. Por ejemplo, el depósito puede incluir un miembro perforante (por ejemplo, un miembro similar a una aguja o puntiagudo o afilado de otro modo) que rompe otra parte del depósito (por ejemplo, una parte de la pared) para liberar líquido. El miembro perforante puede ser interno al depósito, de modo que el miembro perforante rompa la pared desde una superficie interna del depósito (por ejemplo, la pared) hacia fuera.

En general, la pared resiste el paso de líquido o vapor a su través. En algunas realizaciones, la pared carece de capacidad de estiramiento. La pared puede ser flexible. La pared puede ser, por ejemplo, una capa metálica, por ejemplo, una capa de papel metalizado, un polímero, o un laminado que incluye una combinación de los mismos. La pared puede formarse mediante formación al vacío (por ejemplo, aplicando un vacío y calor a una capa de material para estirar la capa contra una superficie de moldeo). La superficie de moldeo puede ser cóncava de modo que la pared pueda estar dotada de una superficie generalmente convexa.

Líquidos ejemplares contenidos por el depósito incluyen agua y soluciones acuosas que incluyen una o más sales (por ejemplo, cloruro de magnesio, cloruro sódico, tampón Tris, o una combinación de los mismos). El depósito puede retener el líquido (por ejemplo, sin evaporación sustancial del mismo) durante un periodo de tiempo (por ejemplo, al menos 6 meses o al menos un año). En algunas realizaciones, menos del 10 % (por ejemplo, menos de aproximadamente el 5 %) en peso del líquido se evapora a lo largo de un año.

El miembro perforante puede ser una parte integrante de una pared del depósito. Por ejemplo, el depósito puede incluir una pared que tiene una proyección interna, que puede estar en contacto con líquido en el depósito. El depósito también incluye una segunda pared opuesta al miembro perforante. Durante el accionamiento, el miembro perforante puede ser impulsado a través de la segunda pared (por ejemplo, de dentro hacia fuera) para liberar el líquido.

65

5 En algunas realizaciones, una cantidad máxima de líquido retenido por un depósito puede ser menos de aproximadamente 1 ml. Por ejemplo, un depósito puede contener aproximadamente 500 microlitros o menos (por ejemplo, 300 microlitros o menos). En general, un depósito contiene al menos aproximadamente 25 microlitros (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 microlitros). El depósito puede introducir dentro aproximadamente el 10 % de la cantidad de líquido pretendida (por ejemplo, $50 \pm 5 \mu\text{l}$).

10 El depósito puede suministrar una cantidad predeterminada de líquido que puede estar sustancialmente libre de aire (por ejemplo, sustancialmente libre de gas). En el momento de la introducción del líquido, el líquido sustancialmente libre de aire y/o de gas produce pocas o ninguna burbujas lo suficientemente grandes para obstruir el movimiento del líquido dentro del dispositivo microfluídico. El uso de un miembro perforante interno al depósito puede mejorar una capacidad del depósito para suministrar líquidos sustancialmente libres de aire y/o gas.

15 En algunas realizaciones, el depósito puede ser accionado para liberar líquido presionando (por ejemplo, con el dedo o el pulgar de uno o mediante accionamiento por presión mecánica). La presión puede aplicarse directamente a una pared del depósito o a un émbolo que tiene un miembro perforante. En diversas realizaciones, puede requerirse presión mínima para accionar el depósito. Puede usarse un sistema automatizado para accionar (por ejemplo, presionar sobre) una pluralidad de depósitos simultáneamente o en secuencia.

20 El accionamiento del depósito puede incluir impulsar un miembro perforante a través de una pared del depósito. En algunas realizaciones, el depósito no incluye un miembro perforante. En su lugar, la presión interna generada dentro del depósito rompe una pared del depósito permitiendo que el líquido entre en el dispositivo microfluídico.

25 Tras accionar un depósito para introducir líquido en el dispositivo microfluídico, el líquido generalmente no se extrae de vuelta al depósito. Por ejemplo, en el momento del accionamiento, el volumen del depósito puede disminuir a cierto mínimo pero en general no aumenta para extraer líquido de vuelta al depósito. Por ejemplo, el depósito puede permanecer replegado tras el accionamiento. En dichas realizaciones, la pared flexible puede ser flexible pero carece de histéresis, elasticidad, o capacidad de estiramiento. Como alternativa o en combinación, el depósito puede captar aire a partir de un orificio de ventilación sin extraer nada del líquido.

30 El depósito preserva la reactividad y la composición de los reactivos en su interior (por ejemplo, los productos químicos dentro del depósito pueden mostrar poco o ningún cambio de reactividad durante 6 meses o un año).

35 La pared flexible del depósito puede limitar o impedir la fuga de productos químicos a su través. El depósito puede ensamblarse independientemente de un cartucho microfluídico y a continuación fijarse al cartucho microfluídico.

Cartucho microfluídico ejemplar para procesar polinucleótidos

40 Con referencia a la figura 10, una parte de un cartucho microfluídico ejemplar 200 adecuada para uso con el sistema descrito en el presente documento incluye primera, segunda y tercera capas 205, 207 y 209 que definen una red microfluídica 201 que tiene diversos componentes configurados para procesar una muestra que incluye uno o más polinucleótidos a detectar. El cartucho 200 normalmente procesa la muestra, entre otros aspectos, incrementando la concentración de un polinucleótido a determinar y/o reduciendo la concentración de inhibidores con respecto a la concentración de polinucleótido a determinar. Las diversas características del cartucho 200 pueden incorporarse en conjunto, o con una modificación adecuada, en configuraciones alternativas de cartucho que llevan a cabo procesamiento de polinucleótidos junto con diversas otras operaciones.

Fabricación del cartucho

50 El cartucho microfluídico 200 puede fabricarse según se desee. Normalmente, las capas 205, 207, y 209 pueden estar formadas por un material polimérico. Los componentes de la red 201 pueden estar formados normalmente moldeando (por ejemplo, mediante moldeo por inyección) las capas 207, 209. La capa 205 puede ser normalmente un material polimérico flexible (por ejemplo, un laminado) que puede fijarse (por ejemplo, con adhesivo y/o térmicamente) a la capa 207 para sellar los componentes de la red 201. Las capas 207 y 209 pueden fijarse entre sí usando adhesivo. Otros métodos de fabricación de cartuchos adecuados para aplicación en el presente documento pueden encontrarse descritos en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/859.284, presentada el 14 de noviembre de 2006 e incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.

Red microfluídica

60 Una disposición ejemplar de componentes de la red 201 es la siguiente, tal como se describe adicionalmente en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2006/0166233.

65 La red 201 incluye una entrada 202 mediante la cual material de muestra puede ser introducido en la red y una salida 236 mediante la cual puede retirarse una muestra procesada (por ejemplo, expulsada por o extraída de) la red 201. Un canal 204 se extiende entre la entrada 202 y una unión 255. Una válvula 206 puede estar situada a lo largo del canal 204. Un canal del depósito 240 se extiende entre la unión 255 y un accionador 244. Las compuertas 242 y

246 pueden estar situadas a lo largo del canal 240. Un canal 257 se extiende entre la unión 255 y una unión 259. Una válvula 208 puede estar situada a lo largo del canal 257. Un canal del depósito 246 se extiende entre la unión 259 y un accionador 248. Compuertas 250 y 252 pueden estar situadas a lo largo del canal 246. Un canal 261 se extiende entre la unión 259 y una unión 263. Una válvula 210 y un orificio de ventilación hidrófobo 212 pueden estar situados a lo largo del canal 261: Un canal 256 se extiende entre la unión 263 y un accionador 254. Una compuerta 258 puede estar situada a lo largo del canal 256.

Un canal 214 se extiende entre la unión 263 y una cámara de procesamiento 220, que tiene una entrada 265 y una salida 267. Un canal 228 se extiende entre la salida de la cámara de procesamiento 267 y un depósito de residuos 232. Una válvula 234 puede estar situada a lo largo del canal 228. Un canal 230 se extiende entre la salida de la cámara de procesamiento 267 y la salida 236.

Componentes particulares de la red microfluídica 201 se describen además de la siguiente manera.

Cámara de procesamiento

Con referencia también a la figura 11, la cámara de procesamiento 220 incluye una pluralidad de partículas (por ejemplo, perlas, microesferas) 218 configuradas para retener polinucleótidos de la muestra en un primer conjunto de condiciones (por ejemplo, una primera temperatura y/o un primer pH) y para liberar los polinucleótidos en un segundo conjunto de condiciones (por ejemplo, una segunda temperatura más elevada y/o un segundo pH más básico). Normalmente, los polinucleótidos pueden estar retenidos, preferentemente, en comparación con inhibidores que pueden estar presentes en la muestra. Las partículas 218 pueden estar configuradas como un miembro de retención 216 (por ejemplo, una columna) a través del cual debe pasar el material de muestra (por ejemplo, polinucleótidos) cuando se mueve entre la entrada 265 y la salida 267 de la región de procesamiento 220.

Un filtro 219 impide que las partículas 218 pasen aguas abajo de la región de procesamiento 220. Un canal 287 conecta el filtro 219 con la salida 267. El filtro 219 tiene un área superficial dentro de la región de procesamiento 220 que puede ser mayor que el área de sección transversal de la entrada 265. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la relación del área superficial del filtro 219 dentro de la cámara de procesamiento 220 respecto al área de sección transversal de la entrada 265 (área de sección transversal que es normalmente aproximadamente el mismo que el área de sección transversal del canal 214) puede ser al menos aproximadamente 5 (por ejemplo, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30). En algunas realizaciones, el área superficial del filtro 219 dentro de la región de procesamiento 220 puede ser al menos aproximadamente 1 mm^2 (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 mm^2 , al menos aproximadamente 3 mm^2). En algunas realizaciones, el área de sección transversal de la entrada 265 y/o el canal 214 puede ser aproximadamente $0,25 \text{ mm}^2$ o menos (por ejemplo, aproximadamente $0,2 \text{ mm}^2$ o menos, aproximadamente $0,15 \text{ mm}^2$ o menos, aproximadamente $0,1 \text{ mm}^2$ o menos). El área superficial más grande presentada por el filtro 219 al material que fluye a través de la cámara de procesamiento 220 ayuda a impedir la coagulación de la región de procesamiento mientras se evitan incrementos significativos del volumen de vacíos (descrito a continuación en el presente documento) de la región de procesamiento.

Las partículas 218 pueden modificarse con al menos un ligando que retiene polinucleótidos (por ejemplo, preferentemente en comparación con inhibidores). Normalmente, los ligandos retienen polinucleótidos a partir de líquidos que tiene un pH de aproximadamente 9,5 o menos (por ejemplo, aproximadamente 9,0 o menos, aproximadamente 8,75 o menos, aproximadamente 8,5 o menos). A medida que una solución de muestra se mueve a través de la cámara de procesamiento 220, los polinucleótidos pueden estar retenidos mientras el líquido y otros componentes de la solución (por ejemplo, inhibidores) pueden estar menos retenidos (por ejemplo, no retenidos) y salir de la región de procesamiento. En general, los ligandos liberan polinucleótidos cuando el pH puede ser de aproximadamente 10 o mayor (por ejemplo, aproximadamente 10,5 o mayor, aproximadamente 11,0 o mayor). En consecuencia, los polinucleótidos pueden liberarse de las partículas modificadas con ligando al líquido circundante.

Ligandos ejemplares en partículas 218 incluyen, por ejemplo, poliamidas (por ejemplo, poliamida policatiónicas tales como poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli-DL-ornitina) y PEI. Otros ligandos incluyen, por ejemplo, intercaladores, poli-intercaladores, poliaminas de unión al surco menor (por ejemplo, espermidina), homopolímeros y copolímeros que comprenden una pluralidad de aminoácidos, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los ligandos tienen un peso molecular promedio de al menos aproximadamente 5.000 Da (por ejemplo, al menos aproximadamente 7.500 Da, de al menos aproximadamente 15.000 Da). En algunas realizaciones, los ligandos tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 50.000 Da o menos (por ejemplo, aproximadamente 35.000, o menos, aproximadamente 27.500 Da o menos). En algunas realizaciones, el ligando puede ser un ligando de polilisina unido a la superficie de la partícula mediante un enlace amida.

En ciertas realizaciones, los ligandos en las partículas 218 pueden ser resistentes a degradación enzimática, tal como degradación por enzimas proteasas (por ejemplo, mezclas de endo- y exo-proteasas tales como pronasa) que escinden enlaces peptídicos. Los ligandos resistentes a proteasa ejemplares incluyen, por ejemplo, poli-D-lisina y otros ligandos que pueden ser enantiómeros de ligandos susceptibles al ataque enzimático.

Las partículas 218 pueden estar formadas normalmente por un material al que pueden asociarse los ligandos. Materiales ejemplares a partir de los cuales pueden formarse las partículas 218 incluyen materiales poliméricos que pueden modificarse para unir un ligando. Los materiales poliméricos típicos proporcionan o pueden modificarse para proporcionar grupos carboxílicos y/o grupos amino disponibles para unir ligandos. Los materiales poliméricos ejemplares incluyen, por ejemplo, poliestireno, polímeros de látex (por ejemplo, látex revestido de policarboxilato), poliácridamida, óxido de polietileno, y derivados de los mismos. Los materiales poliméricos que pueden usarse para formar partículas 218 se describen en la patente de Estados Unidos N.º 6.235.313 de Mathiowitz y col. Otros materiales incluyen vidrio, sílice, agarosa, y materiales modificados con amino-propil-tri-etoxi-silano (APES).

Partículas ejemplares que pueden modificarse con ligandos adecuados incluyen partículas de carboxilato (por ejemplo, perlas magnéticas modificadas con carboxilato (perlas magnéticas modificadas con carboxilato Sera-Mag, N.º de parte 3008050250, Seradyn) y microesferas modificadas con carboxilato Polybead disponibles de Polyseience, n.º de catálogo 09850). En algunas realizaciones, los ligandos incluyen poli-D-lisina y las perlas comprenden un polímero (por ejemplo, látex revestido de policarboxilato). En otras realizaciones, los ligandos incluyen PEI.

En general, la relación de masa de partículas con respecto a la masa de polinucleótidos retenidos por las partículas puede ser no mayor de aproximadamente 25 o más (por ejemplo, no más de aproximadamente 20, no más de aproximadamente 10). Por ejemplo, en algunas realizaciones, aproximadamente 1 gramo de partículas retiene aproximadamente 100 miligramos de polinucleótidos.

Normalmente, el volumen total de la cámara de procesamiento 220 (incluyendo partículas 218) entre la entrada 265 y el filtro 219 puede ser de aproximadamente 15 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 microlitros o menos, aproximadamente 5 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos). En una realización ejemplar, el volumen total de la región de procesamiento 220 puede ser de aproximadamente 2,3 microlitros. En algunas realizaciones, las partículas 218 ocupan al menos aproximadamente el 10 por ciento (por ejemplo, al menos aproximadamente el 15 por ciento) del volumen total de la región de procesamiento 220. En algunas realizaciones, las partículas 218 ocupan aproximadamente el 75 por ciento o menos (por ejemplo, aproximadamente el 50 por ciento o menos, aproximadamente el 35 por ciento o menos) del volumen total de la cámara de procesamiento 220.

En algunas realizaciones, el volumen de la cámara de procesamiento 220 que puede estar libre para ser ocupado por líquido (por ejemplo, el volumen de vacíos de la cámara de procesamiento 220 que incluye intersticios entre las partículas 218) puede ser aproximadamente igual al volumen total menos el volumen ocupado por las partículas. Normalmente, el volumen de vacíos de la región de procesamiento 220 puede ser de aproximadamente 10 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 7,5 microlitros o menos, aproximadamente 5 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos). En algunas realizaciones, el volumen de vacíos puede ser de aproximadamente 50 nanolitros o más (por ejemplo, aproximadamente 100 nanolitros o más, aproximadamente 250 nanolitros o más). Por ejemplo, en una realización ejemplar, el volumen total de la cámara de procesamiento 220 puede ser de aproximadamente 2,3 microlitros, el volumen ocupado por las partículas puede ser de aproximadamente 0,3 microlitros, y el volumen libre a ocupar por líquido (volumen de vacíos) puede ser de aproximadamente 2 microlitros.

Las partículas 218 normalmente tienen un diámetro promedio de aproximadamente 20 micras o menos (por ejemplo, aproximadamente 15 micras o menos, aproximadamente 10 micras o menos). En algunas realizaciones, las partículas 218 tienen un diámetro promedio de al menos aproximadamente 4 micras (por ejemplo, al menos aproximadamente 6 micras, al menos aproximadamente 8 micras).

En algunas realizaciones, un volumen del canal 287 entre el filtro 219 y la salida 267 puede ser sustancialmente más pequeño que el volumen de vacíos de la cámara de procesamiento 220. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el volumen del canal 287 entre el filtro 219 y la salida 267 puede ser aproximadamente el 35 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 25 % o menos, aproximadamente el 20 % o menos) del volumen de vacíos. En una realización ejemplar, el volumen del canal 287 entre el filtro 219 y la salida 267 puede ser de aproximadamente 500 nanolitros.

La densidad de partículas puede ser normalmente al menos aproximadamente 10^8 partículas por mililitro (por ejemplo, aproximadamente 10^9 partículas por mililitro). Por ejemplo, una región de procesamiento con un volumen total de aproximadamente 1 microlitro puede incluir aproximadamente 10^3 perlas.

El filtro 219 normalmente tiene poros con un diámetro más pequeño que el diámetro de las partículas 218. En una realización ejemplar, el filtro 219 tiene poros que tienen una anchura promedio de aproximadamente 8 micras, donde las partículas 218 tienen un diámetro promedio de aproximadamente 10 micras.

En algunas realizaciones, al menos algunas (por ejemplo, todas) de las partículas pueden ser magnéticas. En realizaciones alternativas, pocas (por ejemplo, ninguna) de las partículas son magnéticas.

65

En algunas realizaciones, al menos algunas de (por ejemplo, todas) las partículas pueden ser sólidas. En algunas realizaciones, al menos algunas (por ejemplo, todas) las partículas pueden ser porosas (por ejemplo, las partículas pueden tener canales que se extienden al menos parcialmente dentro de ellas).

5 Componentes adicionales que pueden encontrarse en la red microfluídica 201 son los siguientes.

Canales

10 Los canales de la red microfluídica 201 normalmente tienen al menos una dimensión de sección transversal por debajo del milímetro. Por ejemplo, los canales de la red 201 pueden tener una anchura y/o una profundidad de aproximadamente 1 mm o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 micras o menos, aproximadamente 500 micras, o menos, aproximadamente 250 micras o menos).

Válvulas

15 Una válvula puede ser un componente que tiene un estado normalmente abierto que permite al material pasar a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la válvula (por ejemplo, aguas arriba de la válvula) hasta una posición en el otro lado de la válvula (por ejemplo, aguas abajo de la válvula). En el momento del accionamiento, la válvula cambia a un estado cerrado que impide que el material pase a lo largo del canal desde un lado de la válvula
20 al otro. Por ejemplo, en la figura 10, la válvula 206 incluye una masa 251 de una sustancia térmicamente sensible (TRS) que puede ser relativamente inmóvil a una primera temperatura y más móvil a una segunda temperatura (por ejemplo, un material de transición de fase (PTM) de un punto de fusión conocido, normalmente aproximadamente 60 °C, o aproximadamente 75 °C, o aproximadamente 90 °C, tal como una cera de parafina, soldadura, etc.). Una cámara 253 puede estar en comunicación gaseosa con la masa 251. Tras calentar el gas (por ejemplo, aire) en la
25 cámara 253 y calentar la masa 251 de TRS a la segunda temperatura, la presión de gas dentro de la cámara 253 mueve la masa 251 al interior del canal 204 obstruyendo el paso del material a lo largo del mismo. Otras válvulas de la red 201 tienen una estructura similar y funcionan de manera similar a la válvula 206.

30 Una masa de TRS puede ser una masa esencialmente sólida o una aglomeración de partículas más pequeñas que cooperan para obstruir el paso. Ejemplos de TRS incluyen una aleación eutéctica (por ejemplo, una soldadura), cera (por ejemplo, una olefina), polímeros, plásticos, y combinaciones de los mismos. Las primera y segunda temperaturas pueden ser insuficientemente elevadas para dañar materiales, tales como capas de polímero del cartucho 200. Generalmente, la segunda temperatura puede ser menos de aproximadamente 90 °C y la primera temperatura puede ser menor que la segunda temperatura (por ejemplo, aproximadamente 70 °C o menos).

35 Una compuerta puede ser un componente que puede tener un estado cerrado que no permite que el material pase a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la compuerta a otro lado de la compuerta, y un estado abierto que permite que el material pase a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la compuerta a otro lado de la compuerta. El accionamiento de una compuerta abierta puede hacer cambiar a la compuerta a un estado
40 cerrado en el que no se permite pasar al material desde un lado de la compuerta (por ejemplo, aguas arriba de la compuerta) al otro lado de la compuerta (por ejemplo, aguas abajo de la compuerta). Tras el accionamiento, una compuerta cerrada puede cambiar a un estado abierto en el que se permite al material pasar de un lado de la compuerta (por ejemplo, aguas arriba de la compuerta) al otro lado de la compuerta (por ejemplo, aguas abajo de la compuerta). Por ejemplo, la compuerta 242 en la figura 10 incluye una masa 271 de TRS situada para obstruir el
45 paso de material entre la unión 255 y el canal 240. Tras calentar la masa 271 a una segunda temperatura, la masa cambia de estado (por ejemplo, mediante fusión, mediante dispersión, mediante fragmentación y/o disolución) para permitir el paso de material entre la unión 255 y el canal 240.

50 En diversas realizaciones, una red microfluídica 201 puede incluir una compuerta estrecha 380 tal como se muestra en la figura 12A donde un canal de carga de compuerta 382 usado para cargar cera desde un agujero de carga de cera 384 hasta una unión de compuerta 386 puede ser más estrecho (por ejemplo, aproximadamente 150 μm de ancho y 100 micras de profundidad). Un canal aguas arriba 388 así como un canal aguas abajo 390 de la unión de compuerta 386 pueden hacerse anchos (por ejemplo, $\sim 500 \mu\text{m}$) y profundos (por ejemplo, $\sim 500 \mu\text{m}$) para ayudar a garantizar que la cera se detienen en la unión de compuerta 386. La cantidad de material de compuerta fundido y
55 movido fuera de la unión de compuerta 386 puede minimizarse para apertura óptima de la compuerta 380. Dado que puede usarse un calefactor externo al cartucho para fundir la sustancia térmicamente sensible en la compuerta 380, un alineamiento erróneo del calefactor podría hacer que la cera en el canal de carga de compuerta 382 se funda también. Por lo tanto, estrechar la dimensión del canal de carga puede incrementar la fiabilidad de la apertura de compuerta. En el caso de cantidades excesivas de cera fundida en la unión de compuerta 386 y el canal de carga de
60 compuerta 382, el área de sección transversal incrementada del canal aguas abajo 390 adyacente a la unión de compuerta 386 puede impedir que la cera atasque el canal aguas abajo 390 durante la apertura de la compuerta 380. Las dimensiones del canal aguas arriba 388 en la unión de compuerta 386 pueden hacerse similares al canal aguas abajo 390 para garantizar la correcta carga de cera durante la fabricación de la compuerta.

65 En diversas realizaciones, la compuerta puede estar configurada para minimizar el área efectiva o espacio ocupado por la compuerta dentro de la red, tal como la compuerta doblada 392 tal como se muestra en la figura 12B.

Minimizar el área efectiva o espacio ocupado por la compuerta dentro de la red puede incrementar la densidad de una red microfluídica dada y puede reducir, de este modo, el coste por parte, proporcionar una red más compacta, minimizar la longitud o el volumen de canales de la red, o similares. Otras configuraciones más son posibles, aunque no se muestran explícitamente en los dibujos, de acuerdo con disposiciones específicas de la red microfluídica.

5 En el cartucho microfluídico de la figura 10, la parte de canal 240 entre las compuertas 242 y 246 forma un depósito de fluido 279 configurado para contener un líquido (por ejemplo, agua, un líquido orgánico, o combinación de los mismos). Durante el almacenamiento, las compuertas 242 y 246 limitan (por ejemplo, impiden) la evaporación de líquido dentro del depósito de fluido. Durante el funcionamiento del cartucho 200, el líquido del depósito 279 puede usarse normalmente como líquido de lavado para retirar inhibidores de la región de procesamiento 220 mientras se dejan polinucleótidos asociados con partículas 218 (figura 11). Normalmente, el líquido de lavado puede ser una solución que tiene uno o más componentes adicionales (por ejemplo, un tampón, quelante, tensioactivo, un detergente, una base, un ácido, o una combinación de los mismos). Soluciones ejemplares incluyen, por ejemplo, una solución de Tris 10-50 mM a pH 8,0, EDTA 0,5-2 mM, y SDS al 0,5 % - 2 %, una solución de Tris 10-50 mM a pH 8,0, EDTA de 0,5 a 2 mM, y Triton X-100 al 0,5 % - 2 %.

20 La parte de canal 247 entre las compuertas 250 y 252 forma un depósito de fluido 281 configurado como el depósito 279 para contener un líquido (por ejemplo, una solución) con evaporación limitada o ninguna. Durante el funcionamiento del cartucho 200, el líquido del depósito 281 puede usarse normalmente como líquido de liberación en el que polinucleótidos que habían sido retenidos por las partículas 218 pueden liberarse. Un líquido de liberación ejemplar puede ser una solución de hidróxido (por ejemplo, una solución de NaOH) que tiene una concentración de, por ejemplo, entre aproximadamente 2 mM hidróxido (por ejemplo, NaOH aproximadamente 2 mM) e hidróxido aproximadamente 500 mM (por ejemplo, NaOH aproximadamente 500 mM). En algunas realizaciones, el líquido en el depósito 281 pueden ser una solución de hidróxido que tiene una concentración de aproximadamente 25 mM o menos (por ejemplo, una concentración de hidróxido de aproximadamente 15 mM).

30 Los depósitos 279, 281 normalmente contienen, cada uno independientemente, al menos aproximadamente 0,375 microlitros de líquido (por ejemplo, al menos aproximadamente 0,750 microlitros, al menos aproximadamente 1,25 microlitros, al menos aproximadamente 2,5 microlitros). En algunas realizaciones, los depósitos 279, 281 contienen, cada uno independientemente, aproximadamente 7,5 microlitros o menos de líquido (por ejemplo, aproximadamente 5 microlitros o menos, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 3 microlitros o menos).

Accionadores

35 Un accionador puede ser un componente que proporciona una presión de gas que puede mover material (por ejemplo, material de muestra y/o material de reactivo) entre una ubicación en una red por ejemplo, la red 201, y otra ubicación. Por ejemplo, con referencia a la figura 13, el accionador 244 incluye una cámara 272 que tiene una masa 273 de material térmicamente expansivo (TEM) en su interior. Cuando se calienta, el TEM se expande disminuyendo el volumen libre dentro de la cámara 272 y presurizando el gas (por ejemplo, aire) que rodea a la masa 273 dentro de la cámara 272. Normalmente, compuertas tales como las compuertas 246 y 242 en la red 201 pueden ser accionadas con el accionador 244. En consecuencia, el gas presurizado impulsa al líquido en el depósito de fluido 279 hacia la unión 255. En algunas realizaciones, el accionador 244 puede generar un diferencial de presión de más de aproximadamente 3 psi (por ejemplo, al menos aproximadamente 4 psi, al menos aproximadamente 5 psi) entre el accionador y la unión 255.

45 En una realización, mostrada en la figura 13, el TEM incluye una pluralidad de depósitos de líquido sellados (por ejemplo, esferas) 275 dispersadas dentro de un portador 277. Normalmente, el líquido puede ser un líquido con presión de vapor elevada (por ejemplo, isobutano y/o isopentano) sellando dentro de una cubierta (por ejemplo, una cubierta polimérica formada por monómeros tales como cloruro e vinilideno, acrilonitrilo y metacrilato de metilo). El portador 277 tiene propiedades (por ejemplo, flexibilidad y/o una capacidad de ablandarse (por ejemplo, fundirse) a temperaturas más elevadas) que permiten la expansión de los depósitos 275 sin permitir que los depósitos pasen a lo largo del canal 240. En algunas realizaciones, el portador 277 puede ser una cera (por ejemplo, una olefina) o un polímero con una temperatura de transición vítrea adecuada. Normalmente, los depósitos constituyen al menos aproximadamente el 25 por ciento en peso (por ejemplo, al menos aproximadamente 35 por ciento en peso, al menos aproximadamente 50 por ciento en peso) del TEM. En algunas realizaciones, los depósitos constituyen aproximadamente el 75 por ciento en peso o menos (por ejemplo, aproximadamente el 65 por ciento en peso o menos, aproximadamente el 50 por ciento en peso o menos) del TEM. Depósitos de líquido sellados adecuados pueden obtenerse a partir de Expancel (disponible de Akzo Nobel).

60 Cuando el TEM puede calentarse (por ejemplo, a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C (por ejemplo, a al menos aproximadamente 75 °C, o al menos aproximadamente 90 °C)), el líquido se vaporiza e incrementa el volumen de cada depósito sellado y de la masa 273. El portador 277 se ablanda permitiendo que la masa 273 se expanda. Normalmente, la TEM puede calentarse a una temperatura de menos de aproximadamente 150 °C (por ejemplo, aproximadamente 125 °C o menos, aproximadamente 110 °C o menos, aproximadamente 100 °C o menos) durante el accionamiento. En algunas realizaciones, el volumen del TEM se expande al menos aproximadamente 5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20

veces, al menos aproximadamente 30 veces).

Orificios de ventilación

5 Un orificio de ventilación hidrófobo (por ejemplo, el orificio de ventilación 212) puede ser una estructura que permite que el gas salga de un canal mientras limita (por ejemplo, impide) que el líquido salga del canal. Normalmente, los orificios de ventilación hidrófobos incluyen una capa de material hidrófobo poroso (por ejemplo, un filtro poroso tal como una membrana hidrófoba porosa de Osmonics) que define una pared del canal. Tal como se describe a continuación en el presente documento, los orificios de ventilación hidrófobos pueden usarse para situar una microgotita de muestra en una ubicación deseada dentro de la red 201.

15 Los orificios de ventilación hidrófobos de la presente tecnología están preferentemente contruidos de modo que la cantidad de aire que escapa a través de ellos pueda maximizarse mientras se minimiza el volumen del canal por debajo de la superficie del orificio de ventilación. Por consiguiente, es preferible que el orificio de ventilación pueda construirse para tener una membrana hidrófoba de gran área superficial y una sección transversal poco profunda del microcanal debajo de la superficie del orificio de ventilación.

20 Los orificios de ventilación hidrófobos normalmente tienen una longitud de al menos aproximadamente 2,5 mm (por ejemplo, al menos aproximadamente 5 mm, al menos aproximadamente 7,5 mm) a lo largo de un canal. La longitud del orificio de ventilación hidrófobo puede ser normalmente al menos aproximadamente 5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces) mayor que una profundidad del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la profundidad del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo puede ser de aproximadamente 300 micras o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 micras o menos, aproximadamente 200 micras o menos, aproximadamente 150 micras o menos).

25 La profundidad del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo puede ser normalmente de aproximadamente el 75 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 65 % o menos, aproximadamente el 60 % o menos) de la profundidad del canal aguas arriba y aguas abajo del orificio de ventilación hidrófobo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la profundidad del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo puede ser de aproximadamente 150 micras y la profundidad del canal aguas arriba y aguas abajo del orificio de ventilación hidrófobo puede ser de aproximadamente 250 micras.

35 Una anchura del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo puede ser normalmente al menos aproximadamente el 25 % más amplia (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 % más amplia) que una anchura del canal aguas arriba del orificio de ventilación y aguas abajo del orificio de ventilación. Por ejemplo, en una realización ejemplar, la anchura del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo puede ser de aproximadamente 400 micras y la anchura del canal aguas arriba y aguas abajo del orificio de ventilación puede ser de aproximadamente 250 micras.

40 En uso, el cartucho 200 puede estar normalmente asociado térmicamente con una serie de fuentes de calor configuradas para hacer funcionar diversos componentes (por ejemplo, válvulas, compuertas, accionadores, y región de procesamiento 220) del cartucho. En algunas realizaciones, las fuentes de calor pueden estar controladas por un procesador en un sistema tal como el descrito adicionalmente en el presente documento, que funciona para recibir y para monitorizar el cartucho durante el uso. El procesador (por ejemplo, un microprocesador) está configurado para accionar las fuentes de calor individualmente y en momentos diferentes, de acuerdo con un protocolo deseado. Procesadores configurados para hacer funcionar cartuchos microfluídicos, adecuados para uso o para modificación para uso en el presente documento, se describen en la solicitud de estados Unidos n.º 09/819.105, presentada el 28 de marzo de 2001 (ahora patente de Estados Unidos N.º 7.010.391). En otras realizaciones, las fuentes de calor pueden ser integrales con el propio cartucho.

50 Al cartucho 200 se le puede hacer funcionar de la siguiente manera. Las válvulas de la red 201 pueden fabricarse en un estado abierto. Las compuertas de la red 201 pueden fabricarse en un estado cerrado. Una muestra de fluido, tal como una muestra biológica tal como se describe adicionalmente en el presente documento, que comprende polinucleótidos puede introducirse en la red 201 mediante la entrada 202. Por ejemplo, la muestra puede introducirse con una jeringa que tiene un accesorio Luer. La jeringa proporciona presión para mover inicialmente la muestra dentro de la red 201. La muestra pasa a lo largo de canales 204, 257, 261 y 214 a la entrada 265 de la región de procesamiento 220. La muestra pasa a través de la región de procesamiento 220, sale mediante la salida 267, y pasa a lo largo del canal 228 hasta la cámara de residuos 232. Cuando el borde posterior (por ejemplo, la interfaz líquido-gas aguas arriba) de la muestra alcanza el orificio de ventilación hidrófobo 212, la presión proporcionada por el dispositivo de introducción (por ejemplo, la jeringa) puede liberarse de la red 201 deteniendo el movimiento adicional de la muestra.

65 Normalmente, la cantidad de muestra introducida puede ser de aproximadamente 500 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 microlitros o menos, aproximadamente 100 microlitros o menos, aproximadamente 50 microlitros o menos, aproximadamente 25 microlitros o menos, aproximadamente 10 microlitros o menos). En algunas realizaciones, la cantidad de muestra puede ser de aproximadamente 2 microlitros o menos (por ejemplo,

aproximadamente 0,5 microlitros o menos).

Los polinucleótidos que entran en la región de procesamiento 220 pasan a través de intersticios entre las partículas 218. Los polinucleótidos de la muestra contactan con el miembro de retención 216 y pueden ser retenidos preferentemente en comparación con líquido de la muestra, y ciertos otros componentes de la muestra (por ejemplo, inhibidores). Normalmente, el miembro de retención 220 retiene al menos aproximadamente el 50 % de polinucleótidos (por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que entró en la región de procesamiento 220. El líquido de la muestra e inhibidores presentes en la muestra salen de la región de procesamiento 220 mediante la salida 267 y entran en la cámara de residuos 232. La región de procesamiento 220 puede estar normalmente a una temperatura de aproximadamente 50 °C o menos (por ejemplo, 30 °C o menos) durante la introducción de la muestra.

El procesamiento continúa lavando el miembro de retención 216 con líquido del depósito 279 para separar inhibidores restantes de polinucleótidos retenidos por el miembro de retención 216. Para lavar el miembro de retención 216, la válvula 206 puede cerrarse y las compuertas 242, 246 del primer depósito 240 pueden abrirse. El accionador 244 puede ser accionado para mover el líquido de lavado dentro del depósito 279 a lo largo de los canales 257, 261 y 214, a través de la región de procesamiento 220, y al interior del depósito de residuos 232. El líquido de lavado mueve la muestra que puede haber permanecido dentro de los canales 204, 257, 261 y 214 a través de la región de procesamiento y al interior de la cámara de residuos 232. Una vez que el borde posterior del líquido de lavado alcanza el orificio de ventilación 212, la presión del gas generada por el accionador 244 puede ser ventilada y el movimiento adicional del líquido puede detenerse.

El volumen de líquido de lavado movido por el accionador 244 a través de la región de procesamiento 220 puede ser normalmente al menos aproximadamente 2 veces el volumen de vacíos de la región de procesamiento 220 (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 veces el volumen de vacíos) y puede ser aproximadamente 10 veces el volumen de vacíos o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 veces el volumen de vacíos o menos). La región de procesamiento puede estar normalmente a una temperatura de aproximadamente 50 °C o menos (por ejemplo, 30 °C o menos) durante el lavado. Los fluidos de lavado ejemplares incluyen líquidos descritos con respecto a los depósitos 279 y 281, en el presente documento.

El procesamiento continúa liberando polinucleótidos a partir del miembro de retención 216. Normalmente, el líquido de lavado procedente del depósito 279 puede sustituirse por líquido de liberación (por ejemplo, una solución de hidróxido) procedente del depósito 281 antes de liberar los polinucleótidos. La válvula 208 puede cerrarse y las compuertas 250, 252 pueden abrirse. El accionador 248 puede accionarse, moviendo de este modo el líquido de liberación dentro del depósito 281 a lo largo de los canales 261, 214 y al interior de la región de procesamiento 220 y en contacto con el miembro de retención 216. Cuando el borde posterior del líquido de liberación procedente del depósito 281 alcanza el orificio de ventilación hidrófobo 212, la presión generada por el accionador 248 puede ventilarse deteniendo el movimiento adicional del líquido. El volumen de líquido movido por el accionador 248 a través de la región de procesamiento 220 normalmente puede ser al menos aproximadamente igual al volumen de vacíos de la región de procesamiento 220 (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 veces el volumen de vacíos) y puede ser aproximadamente 10 veces el volumen de vacíos o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 veces el volumen de vacíos o menos).

Una vez que el miembro de retención 216 con polinucleótidos retenidos se ha puesto en contacto con líquido procedente del depósito 281, una etapa de liberación puede ser realizada normalmente. Normalmente; la liberación incluye calentar líquido de liberación presente dentro de la región de procesamiento 216. Generalmente, el líquido puede calentarse a una temperatura insuficiente para llevar a ebullición el líquido en presencia del miembro de retención. En algunas realizaciones, la temperatura puede ser de 100 °C o menos (por ejemplo, menos de 100 °C, aproximadamente 97 °C o menos). En algunas realizaciones, la temperatura puede ser de aproximadamente 65 °C o más (por ejemplo, aproximadamente 75 °C o más, aproximadamente 80 °C o más, aproximadamente 90 °C o más). En algunas realizaciones, la temperatura se mantiene durante aproximadamente 1 minuto o más (por ejemplo, aproximadamente 2 minutos o más, aproximadamente 5 minutos o más, aproximadamente 10 minutos o más). En algunas realizaciones, la temperatura puede mantenerse durante aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, aproximadamente 15 minutos o menos, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 5 minutos o menos). En una realización ejemplar, la región de procesamiento 220 puede calentarse a entre aproximadamente 65 y 90 °C (por ejemplo, a aproximadamente 70 °C) durante entre aproximadamente 1 y 7 minutos (por ejemplo, durante aproximadamente 2 minutos). Dichas temperaturas y tiempos varían de acuerdo con la muestra y pueden seleccionarse en consecuencia por un experto en la materia.

Los polinucleótidos pueden liberarse al líquido presente en la región de procesamiento 220 (por ejemplo, los polinucleótidos pueden ser normalmente liberados en una cantidad de líquido de liberación que tiene un volumen aproximadamente igual que el volumen de vacíos de la región de procesamiento 220). Normalmente, los polinucleótidos pueden ser liberados en aproximadamente 10 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos) de líquido.

- 5 En ciertas realizaciones, la relación del volumen de muestra original movido a través de la región de procesamiento 220 con respecto al volumen de líquido al que pueden ser liberados los polinucleótidos puede ser de al menos aproximadamente 10 (por ejemplo, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 1000). En algunas realizaciones, los polinucleótidos procedentes de una muestra que tiene un volumen de aproximadamente 2 ml pueden estar retenidos dentro de la región de procesamiento, y ser liberados en aproximadamente 4 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 3 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos, aproximadamente 1 microlitro o menos) de líquido.
- 10 El líquido en el que los polinucleótidos pueden ser liberados normalmente incluye al menos aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que entró en la región de procesamiento 220. La concentración de polinucleótidos presentes en el líquido de liberación puede ser mayor que en la muestra original dado que el volumen de líquido de liberación puede ser normalmente menor que el volumen de la muestra
- 15 de líquido original movida a través de la región de procesamiento. Por ejemplo, la concentración de polinucleótidos en el líquido de liberación puede ser al menos aproximadamente 10 veces mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente 25 veces mayor, al menos aproximadamente 100 veces mayor) que la concentración de polinucleótidos en la muestra introducida en el cartucho 200. La concentración de inhibidores presentes en el líquido en el que los polinucleótidos pueden ser liberados puede ser, en general, menor que la concentración de inhibidores
- 20 en la muestra de fluido original en una cantidad suficiente para incrementar la eficiencia de amplificación para los polinucleótidos.
- El intervalo de tiempo entre la introducción de la muestra que contiene polinucleótidos en región de procesamiento 220 y la liberación de los polinucleótidos al líquido de liberación puede ser normalmente de aproximadamente 15
- 25 minutos o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 5 minutos o menos).
- El líquido que incluye los polinucleótidos liberados puede retirarse de la región de procesamiento 220 de la siguiente manera. Las válvulas 210 y 234 pueden estar cerradas. Las compuertas 238 y 258 pueden estar abiertas. El accionador 254 puede accionarse para generar presión que mueve el líquido y los polinucleótidos desde la región de
- 30 procesamiento 220, al canal 230, y hacia la salida 236. El líquido con polinucleótidos puede retirarse usando, por ejemplo, una jeringa o dispositivo de muestreo automatizado. Dependiendo del líquido en contacto con el miembro de retención 216 durante la liberación de polinucleótidos, la solución con polinucleótido liberado puede neutralizarse con una cantidad de tampón (por ejemplo, un volumen igual de tampón Tris-HCl 25 - 50 mM pH 8,0).
- 35 Aunque la liberación de los polinucleótidos se ha descrito incluyendo una etapa de calentamiento, los polinucleótidos pueden liberarse sin calentamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el líquido del depósito 281 tiene una fuerza iónica, pH, concentración de tensioactivo, composición, o combinación de los mismos que libera los polinucleótidos del miembro de retención a temperatura ambiente, sin necesidad de calentamiento adicional.
- 40 Aunque los polinucleótidos se han descrito siendo liberados en un único volumen de líquido presente dentro de la región de procesamiento 220, pueden usarse otras configuraciones. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden liberarse con la introducción concomitante (por etapas o continua) de fluido en y/o a través de la región de procesamiento 220. En dichas realizaciones, los polinucleótidos pueden ser liberados al líquido que tiene un
- 45 volumen de aproximadamente 10 veces o menos (por ejemplo, aproximadamente 7,5 veces o menos, aproximadamente 5 veces o menos, aproximadamente 2,5 veces o menos, aproximadamente 2 veces o menos) que el volumen de vacíos de la región de procesamiento 220.
- Aunque los depósitos 279, 281 se han descrito conteniendo líquidos entre primera y segunda compuertas, pueden usarse otras configuraciones. Por ejemplo, el líquido para cada depósito puede estar contenido dentro de una bolsita
- 50 (por ejemplo, un envase blíster, tal como se describe adicionalmente en el presente documento) aislada de la red 201 mediante una membrana generalmente impermeable. La bolsita puede estar configurada de modo que un usuario pueda romper la membrana impulsando líquido en los depósitos 279, 281 donde los accionadores 244, 248 puedan mover el líquido durante el uso.
- 55 Aunque las regiones de procesamiento se han descrito teniendo dimensiones a escala de microlitro, pueden usarse otras dimensiones. Por ejemplo, regiones de procesamiento con superficies (por ejemplo, partículas) configuradas para retener preferentemente polinucleótidos en oposición a inhibidores pueden tener grandes volúmenes (por ejemplo, muchas decenas de microlitros o más, al menos aproximadamente 1 mililitro o más). En algunas realizaciones, la región de procesamiento tiene escala de mesa.
- 60 Aunque la región de procesamiento 220 se ha descrito teniendo un miembro de retención formado por múltiples partículas modificadas en superficie, pueden usarse otras configuraciones. Por ejemplo, incluye un miembro de retención configurado como una pluralidad de superficies (por ejemplo, paredes o deflectores) a través de la cual pasa una muestra. Las paredes o deflectores pueden modificarse para retener preferentemente polinucleótidos.
- 65

Aunque la región de procesamiento 220 se ha descrito como un componente de una red microfluídica, pueden usarse otras configuraciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el miembro de retención puede retirarse de una región de procesamiento para procesamiento en otro lugar. Por ejemplo, el miembro de retención puede ponerse en contacto con una mezcla que comprende polinucleótidos e inhibidores en una ubicación y a continuación moverse a otra ubicación en la que los polinucleótidos pueden retirarse del miembro de retención.

Aunque los depósitos 275 se han mostrado como dispersados dentro de un portador, pueden usarse otras configuraciones. Por ejemplo, los depósitos 275 pueden estar encerrados dentro de un recinto flexible (por ejemplo, una membrana, por ejemplo, un recinto tal como un saco). En algunas realizaciones, los depósitos pueden estar sueltos dentro de la cámara 272. En dichas realizaciones, el accionador 244 puede incluir un miembro poroso que tiene poros demasiados pequeños para permitir el paso de depósitos 275 pero suficiente grandes para permitir que el gas salga de la cámara 272.

Cartucho microfluídico ejemplar que tiene una cámara de lisis

Un cartucho microfluídico adicional con diversos componentes se describen en la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 60/553.553 presentada el 17 de marzo de 2004 de Parunak, y col, y la publicación de solicitud de patente n.º 2005-0084424.

Aunque se han descrito cartuchos microfluídicos que están configurados para recibir polinucleótidos ya liberados de células, cartuchos microfluídicos para uso en el presente documento también pueden estar configurados para liberar polinucleótidos de células (por ejemplo, lisando las células). Por ejemplo, con referencia a las figuras 14A, 14B, 15A y 15B, un cartucho microfluídico 300 incluye una cámara de lisis de muestras 302 en la que las células pueden lisarse para liberar polinucleótidos en su interior. El cartucho microfluídico 300 incluye, además, capas de sustrato L1-L3, una red microfluídica 304 (de la cual solamente se ven partes en la figura 14A), y depósitos de reactivo líquido R1-R4. Los depósitos de reactivo líquido R1-R4 contienen reactivos líquidos (por ejemplo, para procesar material de muestra) y pueden estar conectado a la red 304 mediante puertos para reactivo RP1-RP4. El cartucho microfluídico 300 puede ser, por lo tanto, un entorno autónomo que comprende todos los reactivos y materiales necesarios para realizar etapas de preparación, lisis de células, aislamiento de polinucleótidos, procesamiento pre-amplificación, amplificación, y detección de una muestra. En algunas realizaciones, se introduce una muestra que tiene uno o más de los reactivos requeridos mezclados con ella; en cuyo caso los reactivos restantes se almacenan en el cartucho. Los reactivos y otros materiales pueden almacenarse en el cartucho 300 en depósitos de reactivo líquido R1-R4, canales o cámaras microfluídicas en una red microfluídica, y/o en una cámara de lisis 302.

La red 304 puede estar sustancialmente definida entre las capas L2 y L3 pero se extiende en parte entre las tres capas L1-L3. La red microfluídica 304 incluye diversos componentes microfluídicos tal como se describe adicionalmente en el presente documento, incluyendo canales Ci, válvulas Vi, válvulas dobles V'i, compuertas Gi, compuertas de mezcla MG_i, orificios de ventilación Hi, accionadores de gas (por ejemplo, bombas) Pi, una primera región de procesamiento B1, una segunda región de procesamiento B2, zonas de detección Di, orificios de ventilación de aire AV_i, y zonas de residuos Wi.

Las figuras 15A, 15B, muestran dos mitades complementarias de una red microfluídica ejemplar 304. Sería entendido por un experto en la materia, que la división de la red en dos mitades separadas es arbitraria, y puramente para facilidad de ilustración. La disposición de componentes mostrada en las figuras 15A, 15B es ejemplar; sería entendido por un experto en la materia que otras disposiciones de este tipo, tales como diferentes disposiciones geométricas de los mismos componentes, o diferentes disposiciones de diferentes componentes pueden ser construidas por un experto en la materia, para conseguir las etapas descritas en el presente documento.

Los componentes de la red 304 pueden ser normalmente accionados térmicamente. Tal como se ve en la figura 16, una red de fuentes de calor ejemplar 312 incluye fuentes de calor (por ejemplo, fuentes de calor resistivas) que tienen ubicaciones que corresponden a diversos componentes accionados térmicamente de la red microfluídica 304. Por ejemplo, las ubicaciones de las fuentes de calor HP_i corresponden a las ubicaciones de los accionadores Pi, las ubicaciones de las fuentes de calor HG_i corresponden a las ubicaciones de las compuertas Gi y las compuertas de mezcla MG_i, las ubicaciones de fuentes de calor HV_i corresponden a las ubicaciones de las válvulas Vi y válvulas dobles V'i, y las ubicaciones de fuentes de calor HD_i corresponden a las ubicaciones de las cámaras de procesamiento Di, todas de la red 304. En uso, los componentes del cartucho 300 pueden estar dispuestos en contacto térmico con fuentes de calor correspondientes de la red 312, que pueden hacerse funcionar normalmente usando un procesador tal como se ha descrito anteriormente para el cartucho 200. La red de fuentes de calor 312 puede ser integral con o independiente del cartucho 300 tal como se ha descrito para el cartucho 200. Por ejemplo, la red de fuentes de calor 312 puede estar integrada en un módulo calefactor 2020, tal como por debajo del compartimento de recepción 2014 de una manera que se alinee con una red de un cartucho dispuesto en su interior.

Componentes adicionales del cartucho microfluídico ejemplar 300 son los siguientes.

Orificios de ventilación de aire

Los orificios de ventilación de aire AVi pueden permitir que el gas (por ejemplo, aire) desplazado por el movimiento de líquidos dentro de la red 304 sea ventilado de modo que la acumulación de presión no inhiba los movimientos deseados de los líquidos. Por ejemplo, el orificio de ventilación de aire AV2 permite que el líquido se mueva a lo largo del canal C14 y al interior del canal C16 ventilando gas aguas abajo del líquido a través del orificio de ventilación AV2.

Válvulas

Las válvulas Vi pueden tener un estado normalmente abierto que permite que el material pase a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la válvula (por ejemplo, aguas arriba de la válvula) hasta una posición en el otro lado de la válvula (por ejemplo, aguas abajo de la válvula). Las válvulas Vi pueden tener una estructura similar a las válvulas del cartucho microfluídico 200, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Tal como se ve en las figuras 17 y 18, las válvulas dobles Vi' también pueden tener un estado normalmente abierto que permite que el material pase a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la válvula (por ejemplo, aguas arriba de la válvula) hasta una posición en el otro lado de la válvula (por ejemplo, aguas abajo de la válvula). Tomando la válvula doble V11' de la figura 17 y 18 como ejemplo, las válvulas dobles Vi' incluyen primera y segunda masas 314, 316 de una TRS (por ejemplo, una aleación eutéctica o cera) separadas entre sí a cada lado de un canal (por ejemplo, el canal C14). Normalmente, las masas de TRS 314, 316 pueden estar desplazadas una con respecto a otra (por ejemplo, una distancia de aproximadamente el 50 % de una anchura de las masas de TRS o menos). El material que se mueve a través de la válvula abierta pasa entre las primera y segunda masas de TRS 314, 316. Cada masa de TRS 314, 316 puede estar asociada con una cámara respectiva 318, 320, que normalmente incluye un gas (por ejemplo, aire).

Las masas de TRS 314, 316 y las cámaras 318, 320 de la válvula doble Vi' pueden estar en contacto térmico con una fuente de calor correspondiente HV11' de la red de fuentes de calor 312. Accionar la fuente de calor HV11' hace que las masas de TRS 314, 316 pasen a un segundo estado más móvil (por ejemplo, un estado parcialmente fundido) e incrementa la presión de gas dentro de las cámaras 318, 320. La presión del gas impulsa las masas de TRS 314, 316 a través del canal C11 y cierra la válvula HV11' (figura 18). Normalmente, las masas 314, 316 se combinan al menos parcialmente para formar una masa 322 que obstruye el canal C11.

Volviendo a las figuras 15A, 15B, las compuertas Gi pueden tener un estado normalmente cerrado que no permite que pase material a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la compuerta hasta otro lado de la compuerta. Las compuertas Gi pueden tener una estructura similar a la descrita para las compuertas del cartucho 200.

Tal como se ve en las figuras. 19A-19D para una parte ejemplar de una red microfluídica, compuertas de mezcla MGi pueden permitir que dos volúmenes de líquido se combinen (por ejemplo, se mezclen) dentro de la red 304. Las compuertas de mezcla MGi se describen adicionalmente a continuación.

Accionadores

Los accionadores Pi pueden proporcionar una presión de gas para mover material (por ejemplo, material de muestra y/o material de reactivo) entre una ubicación de la red 304 y otra ubicación. Los accionadores Pi pueden ser de forma similar a los accionadores del cartucho 200. Por ejemplo, cada accionador Pi incluye una cámara con una masa 273 de TEM que puede calentarse para presurizar gas dentro de la cámara. Cada accionador Pi incluye una compuerta correspondiente Gi (por ejemplo, la compuerta G2 del accionador P1) que impide que el líquido entre en la cámara del accionador. La compuerta puede accionarse normalmente (por ejemplo, abrirse) para permitir que la presión creada en la cámara del accionador entre en la red microfluídica.

Cámaras de residuos

Las cámaras de residuos Wi pueden recibir residuos líquidos (por ejemplo, de desbordamiento) que resulta de la manipulación (por ejemplo, movimiento y/o mezcla) de líquidos dentro de la red 304. Normalmente, cada cámara de residuos Wi tiene un orificio de ventilación de aire asociado que permite que el gas desplazado por el líquido que entra en la cámara se ventile.

Regiones de procesamiento

La primera región de procesamiento B1 de la red 304 puede ser un componente que permite que los polinucleótidos se concentren y/o se separen de inhibidores de una muestra. La región de procesamiento B1 puede estar configurada y operada como la región de procesamiento 220 del cartucho 200. En algunas realizaciones, la primera región de procesamiento B1 incluye un miembro de retención (por ejemplo, múltiples partículas (por ejemplo, microesferas o perlas), un miembro poroso, múltiples paredes) que tienen al menos una superficie modificada con

5 uno o más ligandos tal como se ha descrito para la región de procesamiento 220. Por ejemplo, el ligando puede incluir una o más poliamidas (por ejemplo, poliamidas policatiónicas tales como poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli-DL-ornitina), o polietilenimina. En algunas realizaciones, las partículas del miembro de retención pueden estar dispuestas en la cámara de lisis 302 y pueden moverse a la región de procesamiento B1 junto con el material de muestra.

10 La segunda región de procesamiento B2 puede ser un componente que permite al material (por ejemplo, material de muestra) combinarse con compuestos (por ejemplo, reactivos) para determinar la presencia de uno o más polinucleótidos. En algunas realizaciones, los compuestos incluyen uno o más reactivos de PCR (por ejemplo, cebadores, plásmidos de control, y enzimas polimerasa).

Partículas liofilizadas

15 En algunas realizaciones, los compuestos para determinar la presencia de uno o más polinucleótidos pueden almacenarse dentro de una región de procesamiento tal como B2 como una o más partículas liofilizadas (por ejemplo, microgránulos). Las partículas generalmente tienen una vida en almacenamiento a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C) de al menos aproximadamente 6 meses (por ejemplo, al menos aproximadamente 12 meses). El líquido que entra en la segunda región de procesamiento B2 disuelve (por ejemplo, reconstituye) los compuestos liofilizados.

20 Normalmente, las una o varias partículas liofilizadas de la región de procesamiento B2 tienen un volumen promedio de aproximadamente 5 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 3 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos). En algunas realizaciones, las una o varias partículas liofilizadas de la región de procesamiento B2 tienen un diámetro promedio de aproximadamente 4 mm o menos (por ejemplo, aproximadamente 3 mm o menos, aproximadamente 2 mm o menos) En una realización ejemplar, las una o varias partículas liofilizadas tienen un volumen promedio de aproximadamente 2 microlitros y un diámetro promedio de aproximadamente 1,35 mm. En otras realizaciones, las partículas liofilizadas pueden tener un diámetro de aproximadamente 5 mm o menos (por ejemplo, aproximadamente 2,5 mm o menos, aproximadamente 1,75 mm o menos).

30 Partículas liofilizadas para determinar la presencia de uno o más polinucleótidos normalmente incluyen múltiples compuestos. En algunas realizaciones, las partículas liofilizadas incluyen uno o más compuestos usados en una reacción para determinar la presencia de un polinucleótido y/o para incrementar la concentración del polinucleótido. Por ejemplo, partículas liofilizadas pueden incluir una o más enzimas para amplificar un polinucleótido, como mediante PCR.

35 Las partículas liofilizadas ejemplares incluyen reactivos ejemplares para la amplificación de polinucleótidos asociados con bacterias Streptococcus del grupo B (GBS). En algunas realizaciones, las partículas liofilizadas incluyen uno o más de un crioprotector, una o más sales, uno o más cebadores (por ejemplo, Cebador de GBS F y/o Cebador de GBS R), una o más sondas (por ejemplo, sonda de GBS - FAM), uno o más plásmido de control internos, uno o más controles de especificidad (por ejemplo, ADN de Streptococcus pneumoniae como control para PCR de GBS), uno o más reactivos de PCR (por ejemplo, dNTP y/o dUTP), uno o más agentes bloqueantes o de carga (por ejemplo, proteínas inespecíficas (por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA), ARNasaA, o gelatina), y una polimerasa (por ejemplo, Taq Polimerasa libre de glicerol). Por supuesto, otros componentes (por ejemplo, otros cebadores y/o controles de la especificidad) pueden usarse para la amplificación de otros polinucleótidos.

50 Los crioprotectores generalmente ayudan a incrementar la estabilidad de las partículas liofilizadas y ayudan a prevenir el daño a otros compuestos de las partículas (por ejemplo, impidiendo la desnaturalización de enzimas durante la preparación y/o el almacenamiento de las partículas). En algunas realizaciones, el crioprotector incluye uno o más azúcares (por ejemplo, uno o más disacáridos (por ejemplo, trehalosa, melizitosa, rafinosa)) y/o uno o más polialcoholes (por ejemplo, manitol, sorbitol).

55 Las partículas liofilizadas pueden prepararse según se desee. Un método para fabricar partículas liofilizadas incluye formar una solución de reactivos de la partícula y un crioprotector (por ejemplo, un azúcar o poli-alcohol). Normalmente, los compuestos de las partículas liofilizadas pueden combinarse con un disolvente (por ejemplo, agua) para preparar una solución, que puede colocarse a continuación (por ejemplo, gota a gota, en alícuotas discretas (por ejemplo, gotas) tal como mediante una pipeta) sobre una superficie hidrófoba enfriada (por ejemplo, una película de diamante o una superficie de politetrafluoroetileno). En general, la temperatura de la superficie puede reducirse a cerca de la temperatura del nitrógeno líquido (por ejemplo, aproximadamente -150 °F o menos, aproximadamente -200 °F o menos, aproximadamente 275 °F o menos), tal como mediante el uso de un baño de refrigeración de un reactivo criógeno directamente debajo. La solución puede dispensarse sin poner en contacto el agente criógeno. La solución se congela como partículas discretas. Las partículas congeladas pueden someterse a un vacío, normalmente mientras siguen congeladas, para una presión y un tiempo suficientes para retirar el disolvente (por ejemplo, mediante sublimación) de los microgránulos. Dichos métodos se describen adicionalmente en la publicación de patente internacional n.º WO 2006/119280.

65

En general, las concentraciones de los compuestos en la solución a partir de la cual se preparan las partículas pueden ser mayores que cuando se reconstituyen en el cartucho microfluídico. Normalmente, la relación de la concentración de la solución con respecto a la concentración reconstituida puede ser al menos aproximadamente 3 (por ejemplo, al menos aproximadamente 4,5). En algunas realizaciones, la relación puede ser aproximadamente 6.

Una solución ejemplar para preparar microgránulos liofilizados para uso en la amplificación de polinucleótidos indicativa de la presencia de GBS puede prepararse combinando un crioprotector (por ejemplo, 120 mg de trehalosa en forma de polvo seco), una solución tampón (por ejemplo, 48 microlitros de una solución de Tris 1 M a pH 8,4, KCl 2,5 M, y MgCl₂ 200 mM), un primer cebador (por ejemplo, 1,92 microlitros de Cebador de GBS F 500 micromolar (Invitrogen)), un segundo cebador (por ejemplo, 1,92 microlitros de Cebador de GBS R 500 micromolar (Invitrogen)), una sonda (por ejemplo, 1,92 microlitros de Sonda de GBS - FAM 250 micromolar (IDT/Biosearch Technologies)), una sonda de control (por ejemplo, 1,92 microlitros de Cal Orange 560 250 micromolar (Biosearch Technologies)), un plásmido plantilla (por ejemplo, 0,6 microlitros de una solución de 105 copias de plásmido por microlitro), un control de especificidad (por ejemplo, 1,2 microlitros de una solución de 10 nanogramos por microlitro (por ejemplo, aproximadamente 5.000.000 copias por microlitro) de ADN de streptococcus pneumoniae (ATCC)), reactivos de PCR (por ejemplo, 4,8 microlitros de una solución 100Q milimolar de dNTP (Epicenter) y 4 microlitros de una solución 20 milimolar de dUTP (Epicenter)), un agente espesante (por ejemplo, 24 microlitros de una solución de 50 miligramos por mililitro de BSA (Invitrogen)), una polimerasa (por ejemplo, 60 microlitros de una solución de 5 U por microlitro de Taq Polimerasa libre de glicerol (Invitrogen / Eppendorf)) y un disolvente (por ejemplo, agua) para preparar aproximadamente 400 microlitros de solución. Aproximadamente 200 alícuotas de aproximadamente 2 microlitros cada una de esta solución pueden congelarse y desolvatarse tal como se ha descrito anteriormente para preparar 200 microgránulos. Cuando están reconstituidas, las 200 partículas componen una solución de reacción de PCR que tiene un volumen total de aproximadamente 2,4 mililitros.

Depósitos de reactivo

Tal como se ve en la figura 14, los depósitos de reactivo Ri pueden estar configurados para contener reactivos líquidos (por ejemplo, agua, solución tampón, solución de hidróxido) separados de la red 304 hasta que estén listos para usarlos. Los depósitos R1 incluyen un recinto 329 que define un espacio sellado 330 para contener líquidos. Cada espacio 330 puede estar separado del puerto para reactivos RPi y la red 304 por una pared inferior 333 del recinto 329. Un material de cobertura 341 (por ejemplo, un laminado, adhesivo o capa polimérica) puede recubrir una pared superior del recinto.

Una parte del recinto 329 puede estar formada como un mecanismo de accionamiento (por ejemplo, un miembro perforante 331) orientado hacia la pared inferior 333 de cada recinto. Cuando el cartucho 300 puede usarse, depósitos de reactivo Ri pueden ser accionados presionando hacia abajo el miembro perforante 331 para perforar la pared 333. El miembro perforante 331 puede ser presionado hacia abajo por un usuario (por ejemplo, con un pulgar) o por el sistema operativo usado para hacer funcionar el cartucho 300.

La pared 333 puede estar formada normalmente por un material que tiene una velocidad de transmisión de vapor baja (por ejemplo, Aclar, un laminado metalizado (por ejemplo aluminio), un plástico, o un laminado de papel metalizado) que puede romperse o perforarse. El depósito 330 contiene una cantidad de líquido adecuada para el cartucho 300. Por ejemplo, el depósito puede contener hasta aproximadamente 200 microlitros. El miembro perforante 331 puede suponer una parte (por ejemplo, hasta aproximadamente el 25 %) de ese volumen. El material del laminado dentro del blíster que puede tocar el reactivo corrosivo tal como hidróxido sódico básico no debe correrse incluso después de seis a doce meses de exposición.

En general, los depósitos Ri pueden formarse y llenarse según se desee. Por ejemplo, la pared superior del recinto puede estar sellada a la pared inferior 333 (por ejemplo, mediante adhesivo y/o sellado térmico). Puede introducirse líquido en el depósito mediante, por ejemplo, una abertura en el extremo inferior del miembro perforante 331. Después del llenado, la abertura puede sellarse (por ejemplo, mediante sellado por calor a través de la aplicación localizada de calor o mediante la aplicación de un material de sellado (por ejemplo, material de cobertura 341)).

Cuando la pared 333 puede ser perforada, fluido procedente del depósito entra en la red 333. Por ejemplo, tal como se ve en las figuras 14 y 15, líquido procedente del depósito R2 entra en la red 304 por el puerto RP2 y se desplaza a lo largo de un canal C2. La compuerta G3 impide que el líquido pase a lo largo del canal C8. El exceso de líquido pasa a lo largo del canal C7 y al interior de la cámara de residuos W2. Cuando el borde posterior del líquido procedente del depósito R2 pasa por el orificio de ventilación hidrófobo H2, la presión creada dentro del depósito puede ser ventilada deteniendo el movimiento adicional del líquido. En consecuencia, la red 304 recibe una alícuota de reactivo líquido que tiene un volumen definido por el volumen del canal C2 entre una unión J1 y una unión J2. Cuando el accionador P1 puede ser accionado, esta alícuota de reactivo puede moverse adicionalmente dentro de la red 304. Los depósitos de reactivo R1, R3 y R4 pueden estar asociados con canales, orificios de ventilación hidrófobos, y accionadores correspondientes.

En la configuración mostrada, el depósito de reactivo R1 normalmente contiene un líquido de liberación (por ejemplo, una solución de hidróxido tal como se ha descrito anteriormente para el cartucho 200) para liberar polinucleótidos

retenidos dentro de la región de procesamiento B1. El depósito de reactivo R2 normalmente contiene un líquido de lavado (por ejemplo, una solución tampón tal como se ha descrito anteriormente para el cartucho 200) para retirar compuestos no tratados (por ejemplo, inhibidores) de la región de procesamiento B1 antes de liberar los polinucleótidos. El depósito de reactivo R3 normalmente contiene un tampón de neutralización (por ejemplo, tampón Tris-HCl 25 - 50 mM a pH 8,0). El depósito de reactivo R4 normalmente contiene agua desionizada.

Aunque los depósitos se han mostrado teniendo un miembro perforante formado por una pared del depósito, otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el depósito incluye un miembro perforante similar a una aguja que se extiende a través de una pared superior del depósito al interior del espacio sellado hacia una pared inferior del depósito. La pared superior del depósito puede estar sellada en el miembro perforante similar a una aguja (por ejemplo, con un adhesivo, una epoxi). En uso, la pared superior puede presionarse hacia abajo impulsando el miembro perforante a través de la pared inferior empujando al líquido en el espacio sellado para entrar en una red microfluidica.

Aunque los depósitos se han descrito incluyendo un mecanismo de accionamiento (por ejemplo, un miembro perforante), otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una pared inferior del espacio sellado del depósito incluye una parte debilitada que recubre una abertura a una red microfluidica. El material de la pared inferior (por ejemplo, laminado, película polimérica, o papel metalizado) que recubre la abertura puede ser lo suficientemente grueso para impedir la pérdida del líquido dentro del espacio sellado pero lo suficientemente fino para romperse tras la aplicación de presión al líquido en su interior. Normalmente, el material que recubre la abertura puede ser más fino que el material adyacente. Como alternativa o además, el material debilitado puede formarse dejando este material relativamente sin soportar en comparación con el material circundante de la pared inferior.

Aunque los depósitos se han descrito teniendo un espacio sellado formado en parte por una pared del espacio sellado, otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, con referencia a la figura 20A, un depósito incluye un mecanismo de accionamiento similar a un émbolo (por ejemplo, un miembro perforante 342) y un espacio sellado similar a una junta 343 que tiene capas superior e inferior 344, 345 respectivamente (por ejemplo, capas de laminado superior e inferior). El líquido puede sellarse entre las capas superior e inferior. El espacio sellado puede estar rodeado por una estructura de soporte 346 (por ejemplo, una junta toroidal) que soporta el espacio sellado en sus superficies periféricas superior e inferior.

Con referencia a la figura 20B, el miembro perforante 342 se muestra estando presionado hacia abajo hasta que el miembro perforante 342 ha perforado las capas tanto superior como inferior, poniendo el líquido en comunicación con la red microfluidica. Un orificio de ventilación 346 adyacente al émbolo permite al gas atrapado entre el miembro perforante y la capa superior del espacio sellado escapar sin ser empujado al interior de la red microfluidica.

Con referencia a la figura 20C, el miembro perforante 342 se muestra estando completamente accionado. Una parte del miembro perforante ha desplazado un volumen correspondiente de líquido desde el espacio sellado y ha introducido el volumen de líquido predeterminado en el cartucho microfluidico.

Aunque los depósitos se han descrito teniendo un espacio sellado que puede ser estacionario con respecto a un miembro perforante, otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, la figura 21A ilustra un depósito que tiene un espacio sellado 347 que puede fijarse (por ejemplo, ser integral) con respecto a un mecanismo de accionamiento que tiene un miembro móvil 348 (por ejemplo, un émbolo) y un miembro perforante 349 soportado por un soporte del miembro perforante 350 que puede ser estacionario con respecto al espacio sellado. Normalmente, el espacio sellado puede estar definido por una cavidad dentro del miembro móvil y una pared inferior 351 que sella el líquido dentro del espacio sellado. El miembro perforante puede estar configurado para romper la pared inferior cuando el miembro móvil puede ser presionado hacia abajo. El soporte del miembro perforante tiene una forma generalmente complementaria a la cavidad del miembro móvil. El soporte del miembro perforante incluye un canal 352 conectado a una red microfluidica para permitir que el fluido liberado del espacio cerrado entre en la red microfluidica.

Con referencia a la figura 21B, el miembro móvil ha sido presionado hacia abajo, de modo que el miembro perforante acabe de romper la capa inferior del espacio sellado. Con referencia a la figura 21C, el depósito ha sido presionado hacia abajo completamente sobre el miembro perforante y el soporte del miembro perforante. El volumen de fluido desplazado desde el depósito generalmente corresponde al volumen del soporte del miembro perforante que entra en el espacio cerrado. Un canal 353 permite que el aire desplazado por el miembro móvil salga.

Aunque los depósitos se han descrito teniendo un miembro perforante que puede fijarse con respecto a alguna parte del depósito, otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, con referencia a la figura 22, un depósito incluye un mecanismo de accionamiento 354 (por ejemplo, un miembro perforante tal como un miembro perforante similar a una aguja) que puede no estar fijado con respecto al depósito. Un espacio sellado 355 del depósito puede estar definido por una pared superior 356 e incluye un canal 357 que se extiende a través de una parte de un sustrato 361 en el que puede estar definida una red microfluidica. Una pared inferior 358 del espacio sellado separa el espacio sellado de un canal 359 de la red microfluidica. El miembro perforante ocupa el canal 357 del espacio sellado, de modo que la punta perforante 360 del miembro perforante descansa contra la pared inferior 358. Hundir la pared

superior 356 del depósito impulsa al miembro perforante 354 a través de la pared inferior y empuja al líquido dentro del espacio sellado al interior de la red microfluídica.

5 Como otro ejemplo, las figuras 23A y 23B ilustran un depósito que incluye un mecanismo de accionamiento (por ejemplo, un miembro perforante) que puede fijarse inicialmente a un interior de una pared superior del depósito pero se separa al menos parcialmente de la pared superior tras el accionamiento del depósito.

10 Como otro ejemplo más, las figuras 24A y 24B ilustran un depósito que incluye un miembro perforante 364 que puede estar fijado inicialmente a un interior 365 de una pared superior 366 del depósito pero sustancialmente se separa (por ejemplo, se separa completamente) de la pared superior tras el accionamiento del depósito.

15 Aunque los depósitos se han descrito teniendo un espacio cerrado que puede estar fijado o ser integral de otro modo con una parte del depósito, otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, con referencia a la figura 25, un depósito incluye un espacio cerrado similar a una cápsula 367 definido por una pared externa 368. La pared externa puede estar formada, en general, por un material que tiene una velocidad de transmisión de vapor baja. El depósito también incluye un mecanismo de accionamiento que tiene un miembro móvil 369 con un miembro perforante 370 que perfora el espacio cerrado hasta para liberar el líquido en su interior. El líquido pasa a lo largo de un canal 372 que conduce a una red microfluídica. Un canal 371 permite que el gas (por ejemplo, aire) en caso contrario atrapado por el miembro móvil, salga.

20 Aunque los depósitos se han descrito recubriendo en general una entrada a una red microfluídica, otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, con referencia a la figura 26, un depósito incluye un espacio cerrado 373 en el que el líquido puede almacenarse y una parte de conexión 374 conectarse a una entrada 376 de una red microfluídica. El espacio cerrado 373 y la parte de conexión 374 pueden estar separadas por una junta rompible 375 (por ejemplo, una junta débil). En general, la junta rompible 375 impide que el líquido o vapor salga del espacio cerrado. Sin embargo, tras la aplicación de presión al líquido (por ejemplo, hundiendo una pared 377 del espacio cerrado), la junta rompible 375 se rompe permitiendo al líquido pasar a través de la junta débil hasta la parte de conexión y al interior de la red microfluídica 378.

30 Una realización adicional más de un depósito con un miembro perforante se muestra en la figura 27A, que muestra un depósito 2701 que tiene una envuelta externa 2703 y un elemento perforante 2704 que pueden estar, ambos, hechos de la misma pieza de material. Dicha envuelta y elemento perforante combinados pueden formarse a partir de muchos procesos conocidos por un experto en la materia. Procesos especialmente preferidos pueden ser termoformado al vacío y moldeo por inyección. El elemento perforante 2704 puede ser de forma generalmente cónica, con el ápice adyacente a una membrana 2702; su ápice preferentemente no supera las 0,040". El elemento perforante perforará la membrana 2702 y liberará el líquido procedente del depósito 2701 cuando la envuelta externa puede presionarse hacia abajo. Dimensiones representativas se muestran en la figura 27A. El depósito puede estar construido de modo que la superficie superior puede estar a nivel, con una pieza protectora plana 2705 que cubre la base de la forma cónica del elemento perforante 2704.

40 Otra realización más de un depósito con un miembro perforante se muestra en la figura 27B, que muestra un depósito 2711 que tiene una envuelta externa de una sola pieza 2712 y el elemento perforante 2714. Dichos envuelta y elemento perforante combinados pueden formarse a partir de muchos procesos conocidos por un experto en la materia. Procesos especialmente preferidos pueden ser termoformado al vacío y moldeo por inyección. El elemento perforante 2714 puede ser de forma troncocónica, con su lado más estrecho adyacente a la membrana 2713. Como alternativa, el elemento perforante 2714 puede comprender varios elementos perforantes diferentes, dispuestos dentro de un espacio cónico. Preferentemente puede haber cuatro de dichos elementos perforantes donde múltiples elementos pueden estar presentes.

50 Debe entenderse que las dimensiones del depósito, el elemento perforante, la envuelta y el moldeo mostradas en las figuras 27A y 27B como cantidades decimales en pulgadas son ejemplares. En particular, las dimensiones pueden ser tales que la envuelta no se repliegue bajo su propio peso y normalmente no sea tan resistente para prohibir el hundimiento del miembro perforante cuando se requiere durante el funcionamiento del cartucho.

55 Además, los materiales de las diversas realizaciones también pueden seleccionarse de modo que el cartucho tenga una vida en almacenamiento de aproximadamente un año. Por esto, se entiende que el grosor de los diversos materiales puede ser tal que resistan la pérdida, a través de medios tales como difusión, del 10 % del volumen de líquido contenido en su interior durante un periodo de vida en almacenamiento deseado.

60 Preferentemente, el volumen del depósito puede ser de aproximadamente 150 μ l antes de que una envuelta sea presionada hacia abajo. Tras el hundimiento de una envuelta, el volumen puede deformarse preferentemente a alrededor de la mitad de su volumen original.

65 Se observará que llenar completamente el envase blíster con un reactivo líquido - sin ningún espacio restante para una burbuja de aire, da como resultado un blíster que requiere aplicación de una fuerza significativamente mayor de lo que es preferible. Por consiguiente, el uno o varios blísteres se llenan normalmente a aproximadamente el 80 - 95

% de su volumen, reservando de este modo aproximadamente el 5 - 20 %, normalmente el 10 - 15 % del volumen para aire. De este modo, en una realización, un blíster que tiene un volumen total de 200 μ l se llena con 170 μ l de líquido.

5 *Cámara de lisis*

Una cámara de lisis ejemplar 302, tal como se muestra en las figuras 14A y 14B, se muestra en una configuración de torre, que sobresale desde un plano del cartucho microfluidico 300. La cámara de lisis 302 puede dividirse en una cámara de lisis primaria 306 y una cámara de residuos 308. En una realización, las cámaras primaria y de residuos 306, 308 están separadas entre sí de modo que el material no pueda pasar de una de la cámaras al interior de la otra cámara sin pasar a través de al menos una parte de la red 304. La cámara de lisis primaria 306 incluye un puerto de entrada de muestra SP1 para introducir una muestra en la cámara 306, un puerto de salida de muestra SP2 que conecta la cámara 306 a la red 304, y reactivo liofilizado LP que interactúa con el material de muestra dentro de la cámara 306, tal como se describe en el presente documento. El puerto SP2 se muestra en la figura 14A estando en la parte inferior de la cámara 302. La figura 15B muestra una posición del SP2 con respecto al resto de la red microfluidica 304. El puerto de entrada SP1 incluye una válvula de una vía que permite que el material (por ejemplo, material de muestra y gas) entre en la cámara 306 pero limita (por ejemplo, impide) que el material salga de la cámara 308 por el puerto SP1. Normalmente, el puerto SP1 incluye un accesorio (por ejemplo, un accesorio Luer) configurado para acoplarse con un dispositivo de entrada de muestras (por ejemplo, una jeringa) para formar una junta hermética a gases. La cámara primaria 306 normalmente tiene un volumen de aproximadamente 5 mililitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 4 mililitros o menos). Antes del uso, la cámara primaria 306 puede llenarse normalmente con un gas (por ejemplo, aire).

La cámara de residuos 308 incluye una parte de residuos W6 mediante la cual el líquido puede entrar en la cámara 308 procedente de la red 304 y un orificio de ventilación 310 mediante el cual el gas desplazado por el líquido que entra en la cámara 308 puede salir.

Partículas de reactivo de lisis

Las partículas de reactivo liofilizado LP de la cámara de lisis 302 incluyen uno o más compuestos (por ejemplo, reactivos) configurados para liberar polinucleótidos a partir de células (por ejemplo, lisando las células). Por ejemplo, las partículas LP pueden incluir una o más enzimas configuradas para reducir (por ejemplo, desnaturalizar) proteínas (por ejemplo, proteinasas, proteasas (por ejemplo, pronasa), tripsina, proteinasa K, enzimas líticas de fagos (por ejemplo, PlyGBS)), lisozimas (por ejemplo, una lisozima modificada tal como ReadyLyse), enzimas específicas de células (por ejemplo, mutanolisina para lisar estreptococos del grupo B)).

En algunas realizaciones, las partículas LP como alternativa o adicionalmente incluyen componentes para retener polinucleótidos en comparación con inhibidores. Por ejemplo, las partículas LP pueden incluir múltiples partículas 218 modificadas en superficie con ligandos, tal como se ha descrito anteriormente para la cámara de procesamiento del cartucho 200. Las partículas LP pueden incluir enzimas que reducen polinucleótidos que podrían competir con un polinucleótido a determinar para unirse a sitios en las partículas modificadas en superficie. Por ejemplo, para reducir ARN que podría competir con ADN a determinar, las partículas LP pueden incluir una enzima tal como una ARNasa (por ejemplo, ARNasaA ISC BioExpress (Amresco)).

En una realización ejemplar, las partículas LP incluyen un crioprotector, partículas modificadas con ligandos configurados para retener polinucleótidos en comparación con inhibidores, y una o más enzimas.

Normalmente, las partículas LP tienen un volumen promedio de aproximadamente 35 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 27,5 microlitros o menos, aproximadamente 25 microlitros o menos, aproximadamente 20 microlitros o menos). En algunas realizaciones, las partículas LP tienen un diámetro promedio de aproximadamente 8 mm o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 mm o menos, aproximadamente 4 mm o menos) En una realización ejemplar, las una o varias partículas liofilizadas tienen un volumen promedio de aproximadamente 20 microlitros y un diámetro promedio de aproximadamente 3,5 mm.

Las partículas LP pueden prepararse según se desee. Normalmente, las partículas pueden prepararse usando un crioprotector y superficie hidrófoba enfriada tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento para otras partículas de reactivo. Por ejemplo, una solución para preparar partículas LP puede prepararse combinando un crioprotector (por ejemplo, 6 gramos de trehalosa), una pluralidad de partículas modificadas con ligandos (por ejemplo, aproximadamente 2 mililitros de una suspensión de partículas modificadas con carboxilato con ligandos de poli-D-lisina), una proteasa (por ejemplo, 400 miligramos de pronasa), una ARNasa (por ejemplo, 30 miligramos de ARNasaA (actividad de 120 U por miligramo), una enzima que digiere peptidoglucano (por ejemplo, ReadyLyse (por ejemplo, 160 microlitros de una solución de 30.000 U por microlitro de ReadyLyse)), una enzima específica de células (por ejemplo, mutanolisina (por ejemplo, 200 microlitros de una solución de 50 U por microlitro de mutanolisina), y un disolvente (por ejemplo, agua) para preparar aproximadamente 20 mililitros. Aproximadamente 1.000 alícuotas de aproximadamente 20 microlitros cada una de esta solución pueden congelarse y desolvatarse tal como se ha descrito anteriormente para preparar 1.000 microgránulos. Cuando se reconstituyen, los microgránulos

pueden usarse normalmente para preparar un total de aproximadamente 200 mililitros de solución.

Funcionamiento ejemplar del cartucho microfluídico

5 En uso, diversos componentes del cartucho 300 pueden hacerse funcionar de la siguiente manera. Las válvulas Vi y Vi' de la red 304 pueden estar configuradas en el estado abierto. Las compuertas Gi y las compuertas de mezcla MGi de la red 304 pueden estar configuradas en el estado cerrado. Los puertos para reactivo R1-R4 pueden ser presionados hacia abajo, por ejemplo, mediante aplicación de fuerza mecánica, para introducir reactivos líquidos en la red 304, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Una muestra puede introducirse en la
10 cámara de lisis 302 mediante el puerto SP1 y combinarse con partículas liofilizadas LP dentro de la cámara de lisis primaria 306. Normalmente, la muestra incluye una combinación de partículas (por ejemplo, células) y una solución tampón. Por ejemplo, una muestra ejemplar incluye aproximadamente 2 partes de sangre completa respecto a aproximadamente 3 partes de solución tampón (por ejemplo, una solución de Tris 20 mM a pH 8,0, EDTA 1 mM, y SDS al 1 %). Otra muestra ejemplar incluye estreptococos del grupo B y una solución tampón (por ejemplo, una
15 solución de Tris 20 mM a pH 8,0, EDTA 1 mM, y Triton X-100 al 1 %).

En general, el volumen de muestra introducido puede ser más pequeño que el volumen total de la cámara de lisis primaria 306. Por ejemplo, el volumen de muestra puede ser aproximadamente el 50 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 35 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos) del volumen total de la cámara 306. Una muestra típica tiene un volumen de aproximadamente 3 mililitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 1,5 mililitros o menos). Un volumen de gas (por ejemplo, aire) puede introducirse, en general, en la cámara primaria 306
20 junto con la muestra. Normalmente, el volumen de gas introducido puede ser de aproximadamente el 50 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 35 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos) del volumen total de la cámara 306. El volumen de muestra y gas se combinan para presurizar el gas ya presente dentro de la cámara 306. La válvula 307 de puerto SP1 impide que el gas salga de la cámara 306. Dado que las compuertas G3, G4, G8 y G10 pueden estar en el estado cerrado, se puede impedir que la muestra presurizada entre en la red 304 mediante el puerto SP2.
25

La muestra disuelve las partículas LP en la cámara 306. Los reactivos de lisis reconstituidos (por ejemplo, ReadyLyse, mutanolisina) comienzan a lisar células de la muestra que liberan polinucleótidos. Otros reactivos (por ejemplo, enzimas proteasas tales como pronasa) comienzan a reducir o desnaturalizar inhibidores (por ejemplo, proteínas) dentro de la muestra. Los polinucleótidos procedentes de la muestra comienzan a asociarse con (por ejemplo, unirse a) ligandos de partículas 218 liberados a partir de partículas LP. Normalmente, la muestra dentro de la cámara 306 puede calentarse (por ejemplo, a al menos aproximadamente 50 °C, a al menos aproximadamente 60 °C) durante un periodo de tiempo (por ejemplo, durante aproximadamente 15 minutos o menos, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 7 minutos o menos) mientras se produce la lisis. En algunas realizaciones, la energía óptica puede usarse al menos en parte para calentar el contenido de la cámara de lisis 306. Por ejemplo, el sistema operativo usado para hacer funcionar el cartucho 300 puede incluir una fuente de luz 399 (por ejemplo, una lámpara que emite principalmente luz en el infrarrojo) dispuesta en contacto térmico y/u óptico con la cámara 306. Dicha fuente de luz puede ser esa mostrada en conexión con el módulo calefactor 2020, figura 7, número de referencia 2046. La cámara 306 incluye un sensor de temperatura TS usado para monitorizar la temperatura de la muestra dentro de la cámara 306. La salida de la lámpara puede incrementarse o reducirse basándose en la temperatura determinada con el sensor TS.
30

Continuando con el funcionamiento del cartucho 300, G2 puede accionarse (por ejemplo, abrirse) proporcionando una trayectoria entre el puerto SP2 de la cámara de lisis primaria 306 y el puerto W6 de la cámara de residuos de lisis 308. La trayectoria se extiende a lo largo del canal C9, el canal C8, a través de la región de procesamiento B1, y el canal C11. La presión dentro de la cámara 306 impulsa el material de la muestra lisada (que contiene lisado, polinucleótidos unidos a partículas 218, y otros componentes de la muestra) a lo largo de la trayectoria. Las partículas 218 (con polinucleótidos) pueden ser retenidas dentro de la región de procesamiento B1 (por ejemplo, mediante un filtro) mientras que el líquido y otros componentes de la muestra fluyen al interior de la cámara de residuos 308. Después de un periodo de tiempo (por ejemplo, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 minutos), la presión en la cámara de lisis 306 puede ventilarse abriendo la compuerta G1 para crear una segunda trayectoria entre los puertos SP2 y W6. Las válvulas dobles V1' y V8' pueden cerrarse para aislar la cámara de lisis 302 de la red 304.
45
50
55

El funcionamiento del cartucho 300 continúa accionando la bomba P1 y abriendo las compuertas G2, G3 y G9. La bomba P1 impulsa el líquido de lavado en el canal C2 aguas abajo de la unión J1 a través de la región de procesamiento B1 y al interior de la cámara de residuos W5. El líquido de lavado retira inhibidores y otros compuestos no retenidos por las partículas 218 de la región de procesamiento B1. Cuando el borde posterior del líquido de lavado (por ejemplo, la interfaz aguas arriba) pasa el orificio de ventilación hidrófobo H14, la presión procedente del accionador P1 se ventila de la red 304, deteniendo el movimiento adicional del líquido. Las válvulas dobles V2' y V9' pueden cerrarse.
60

El funcionamiento continúa accionando la bomba P2 y abriendo las compuertas G6, G4 y G8 para mover el líquido de liberación desde el depósito de reactivo R1 al interior de la región de procesamiento B1 y en contacto con las
65

partículas 218. El orificio de ventilación de aire AV1 ventila presión delante del líquido de liberación en movimiento. El orificio de ventilación hidrófobo H6 ventila presión detrás del borde posterior del líquido de liberación, deteniendo el movimiento adicional del líquido de liberación. Las válvulas dobles V6' y V10' pueden cerrarse.

5 El funcionamiento continúa calentando la región de procesamiento B1 (por ejemplo, calentando las partículas 218) para liberar los polinucleótidos a partir de las partículas 218. Las partículas pueden calentarse tal como se ha descrito anteriormente para el cartucho 200. Normalmente, el líquido de liberación incluye aproximadamente hidróxido 15 mM (por ejemplo, solución de NaOH) y las partículas pueden calentarse a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 2 minutos para liberar los polinucleótidos a partir de las partículas 218.

10 El funcionamiento continúa accionando la bomba P3 y abriendo las compuertas G5 y G10 para mover el líquido de liberación desde la región de proceso B1 aguas abajo. El orificio de ventilación de aire AV2 ventila la presión del gas aguas abajo del líquido de liberación permitiendo que el líquido se mueva al interior del canal C16. El orificio de ventilación hidrófobo H8 ventila presión desde aguas arriba del líquido de liberación deteniendo el movimiento adicional. La válvula doble V11' y la válvula V14 pueden cerrarse.

15 Con referencia a las figuras 19A-19D, la compuerta de mezcla MG11 puede usarse para mezclar una parte del líquido de liberación que incluye polinucleótidos liberados a partir de partículas 218 y tampón de neutralización procedente del depósito de reactivo R3. La figura 19A muestra la región de la compuerta de mezcla MG11 antes de presionar hacia abajo el depósito de reactivo R3 para introducir el tampón de neutralización en la red 304. La figura 20 19B muestra la región de la compuerta de mezcla MG11, después de que el tampón de neutralización se ha introducido en los canales C13 y C12. La válvula doble V13' puede cerrarse para aislar la red 304 del depósito de reactivo R3. La válvula doble V12' puede cerrarse para aislar la red 304 de la cámara de residuos W3. El tampón de neutralización contacta con un lado de una masa 324 de TRS de la compuerta MG11.

25 La figura 19C muestra la región de la compuerta de mezcla MG11 después de que el líquido de liberación se ha movido al interior del canal C16. Las dimensiones de la red microfluídica 304 (por ejemplo, las dimensiones del canal y la posición del orificio de ventilación hidrófobo H8) pueden estar configuradas de modo que la parte de líquido de liberación situada entre las uniones J3 y J4 de los canales C16 y C14 corresponda aproximadamente al volumen de líquido en contacto con las partículas 218 durante la etapa de liberación. En algunas realizaciones, el volumen de líquido situado entre las uniones J3 y J4 pueden ser menos de aproximadamente 5 microlitros (por ejemplo, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos). En una realización ejemplar, el volumen de líquido de liberación entre las uniones J3 y J4 puede ser de aproximadamente 1,75 microlitros. Normalmente, el líquido entre las uniones J3 y J4 incluye al menos aproximadamente el 50 % de polinucleótidos (al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que entró en la región de procesamiento B1. La válvula V14 puede cerrarse para aislar la red 304 del orificio de ventilación de aire AV2.

40 Antes de accionar la compuerta de mezcla MG11, el líquido de liberación en la unión J4 y el tampón de neutralización en la unión J6 entre los canales C13 y C12 pueden estar separados por la masa 324 de TRS (por ejemplo, los líquidos normalmente no están separados por un volumen de gas). Para combinar el líquido de liberación y el tampón de neutralización, la bomba P4 y las compuertas G12, G13 y MG11 pueden ser accionadas. La bomba P4 impulsa el volumen de líquido de neutralización entre las uniones J5 y J6 y el volumen de líquido de liberación entre las uniones J4 y J3 al interior del canal de mezcla C15 (figura 19D). La masa 324 de TRS normalmente se dispersa y/o se funde permitiendo que los dos líquidos se combinen. Los líquidos combinados incluyen una interfaz aguas abajo 335 (formada por la unión J3) y una interfaz aguas arriba (formada por la unión J5). La presencia de estas interfaces permite una mezcla más eficiente (por ejemplo, recirculación del líquido combinado) que si las interfaces no estuvieran presentes. Tal como se ve en la figura 19D, la mezcla normalmente comienza cerca de la interfaz entre los dos líquidos. El canal de mezcla C15 puede ser normalmente al menos aproximadamente tan largo (por ejemplo, al menos aproximadamente dos veces tan largo) como una longitud total de los líquidos combinados dentro del canal.

55 El volumen de tampón de neutralización combinado con el líquido de liberación puede determinarse mediante las dimensiones del canal entre las uniones J5 y J6. Normalmente, el volumen de líquido de neutralización combinado puede ser aproximadamente el mismo que el volumen de líquido de liberación combinado. En algunas realizaciones, el volumen de líquido posicionado entre las uniones J5 y J6 puede ser menos de aproximadamente 5 microlitros (por ejemplo, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos). En una realización ejemplar, el volumen de líquido de liberación entre las uniones J5 y J6 puede ser de aproximadamente 2,25 microlitros (por ejemplo, el volumen total del líquido de liberación y el tampón de neutralización puede ser de aproximadamente 4 microlitros).

60 Volviendo a las figuras 15A, 15B, el líquido de liberación y tampón de neutralización combinados se mueven a lo largo del canal de mezcla C15 y al interior del canal C32 (ventilado aguas abajo por el orificio de ventilación de aire AV8). El movimiento continúa hasta que la interfaz aguas arriba de los líquidos combinados pasa el orificio de ventilación hidrófobo H11, que ventila presión procedente del accionador P4 deteniendo el movimiento adicional de los líquidos combinados.

65

Continuando con el funcionamiento del cartucho 300, el accionador P5 y las compuertas G14, G15 y G17 pueden ser accionadas para disolver las partículas de PCR liofilizadas presente en la segunda región de procesamiento B2 en agua procedente del depósito de reactivo R4. El orificio de ventilación hidrófobo H10 ventila la presión procedente del accionador P5 aguas arriba del agua deteniendo el movimiento adicional. La disolución de un microgránulo de reactivo de PCR normalmente se produce en aproximadamente 2 minutos o menos (por ejemplo, en aproximadamente 1 minuto o menos). La válvula V17 puede cerrarse.

Continuando con el funcionamiento del cartucho 300, el accionador P6 y la compuerta G16 pueden accionarse para impulsar los compuestos disueltos de la partícula liofilizada desde la región de procesamiento B2 al interior del canal C31, donde los reactivos disueltos se mezclan para formar una solución de partículas liofilizadas disueltas homogéneas. El accionador P6 mueve la solución al interior de los canales C35 y C33 (ventilados aguas abajo por el orificio de ventilación de aire AV5). El orificio de ventilación hidrófobo H9 ventila la presión generada por el accionador P6 aguas arriba de la solución deteniendo el movimiento adicional. Las válvulas V18, V19, V20' y V22' pueden cerrarse.

Continuando con el funcionamiento del cartucho 300, el accionador P7 y las compuertas G18, MG20 y G22 pueden accionarse para combinar (por ejemplo, mezclar) una parte del líquido de liberación neutralizado en el canal 32 entre la compuerta MG20 y la compuerta G22 y una parte de la solución de partículas liofilizadas disueltas en el canal C35 entre la compuerta G18 y MG20. Los líquidos combinados se desplazan a lo largo de un canal de mezcla C37 y al interior de la región de detección D2. Un orificio de ventilación de aire AV3 ventila presión del gas aguas abajo de los líquidos combinados. Cuando la interfaz aguas arriba de los líquidos combinados pasa el orificio de ventilación hidrófobo H13, la presión procedente del accionador P7 puede ser ventilada y los líquidos combinados pueden situarse dentro de la región de detección D2.

El accionador P8 y las compuertas MG2, G23 y G19 pueden accionarse para combinar una parte del agua procedente del depósito de reactivo R4 entre MG2 y la compuerta G23 con una segunda parte de la solución de partículas liofilizadas disueltas en el canal C33 entre la compuerta G19 y MG2. Los líquidos combinados se desplazan a lo largo de un canal de mezcla C41 y al interior de la región de detección D1. Un orificio de ventilación de aire AV4 ventila presión del gas aguas abajo de los líquidos combinados. Cuando la interfaz aguas arriba de los líquidos combinados pasa el orificio de ventilación hidrófobo H12, la presión procedente del accionador P8 puede ser ventilada y los líquidos combinados pueden situarse dentro de la región de detección D1.

Continuando con el funcionamiento del cartucho 300, las válvulas dobles V26' y V27' pueden cerrarse para aislar la región de detección D1 de la red 304 y las válvulas dobles V24' y V25' pueden cerrarse para aislar la región de detección D2 de la red 304. El contenido de cada región de detección (líquido de liberación neutralizado con polinucleótidos de muestra en la región de detección D2 con reactivos de PCR procedentes de la solución de partículas liofilizadas disueltas y agua desionizada con reactivos de PCR procedente de la solución de partículas liofilizadas disueltas en la región de detección D1) puede someterse a etapas de calentamiento y enfriamiento para amplificar polinucleótidos (si están presentes en la región de detección D2). Las válvulas dobles de cada región de detección impiden la evaporación del contenido de la región de detección durante el calentamiento. Los polinucleótidos amplificados pueden detectarse normalmente usando detección de fluorescencia. Por lo tanto, normalmente por encima de una o ambas de las regiones de detección D1, D2, hay una ventana (como, por ejemplo, en la figura 9) que permite la detección de fluorescencia procedente de una sustancia fluorescente en la mezcla de reacción cuando un detector se sitúa por encima de la ventana.

Aunque los cartuchos para llevar a cabo diversas fases de procesar muestras se han mostrado y descrito en el presente documento teniendo una configuración generalmente plana, pueden usarse otras configuraciones y son coherentes con un sistema integrado tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un cartucho que tiene una configuración generalmente similar a un tubo o similar a un vial se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006-0166233.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1: Aparato para el procesamiento de polinucleótidos

Este ejemplo no limitante describe diversas realizaciones ejemplares de un aparato, sistema, cartucho microfluídico, kit, métodos, y producto de programa informático, tal como se muestra en las figuras 28 - 40.

Por ejemplo, la figura 28 es un diagrama de un aparato 800 que puede funcionar como un sistema de análisis de polinucleótidos en tiempo real, de mesa y pequeño. Dicho sistema puede realizar diversos análisis en polinucleótidos, por ejemplo, analizar muestras de pacientes en busca de elementos distintivos de una o más enfermedades infecciosas. El aparato puede funcionar, por ejemplo, como un sistema de análisis de polinucleótidos en tiempo real para uso en el mercado del diagnóstico clínico para ayudar al personal clínico a analizar y tratar pacientes antes de que abandonen el entorno médico. El aparato 800 puede incluir, por ejemplo, una carcasa que

tiene una salida de visualización 802, una tapa 804 que tiene un asa 805, y un lector de código de barras 806. Con referencia a las figuras 28 y 36, el aparato 800 también puede incluir un compartimento de recepción 807, que puede estar cubierto por la tapa 804. En diversas realizaciones, el aparato 800 puede ser portátil, por ejemplo, el aparato 800 puede pesar aproximadamente 10 kg y puede tener dimensiones de aproximadamente 25 cm de ancho por 40 cm de profundo por 33 cm de alto.

El aparato 800 se usará con un kit de muestras 810, mostrado en la figura 29. El kit de muestras 810 puede incluir, por ejemplo, un cartucho microfluidico 812 con una etiqueta opcional 813 (por ejemplo, una etiqueta con código de barras), un recipiente para muestras 814 con una etiqueta opcional 815 (por ejemplo, una etiqueta con código de barras), un filtro opcional 818, una punta de pipeta opcional 820 y una jeringa opcional 822. Con referencia a la figura 30, uno o más componentes del kit de muestras 810 (por ejemplo, el cartucho microfluidico 812) pueden envasarse, por ejemplo, en una bolsita sellada 824 que puede estar opcionalmente herméticamente sellada con un gas inerte tal como argón o nitrógeno.

El cartucho microfluidico 812, tal como se representa en la figura 31, puede incluir una entrada de muestras 826, una pluralidad de depósitos autoperforantes 828, un depósito de lisis 830, un depósito de residuos 832, una etiqueta opcional 813 (por ejemplo, un código de barras), y un miembro de colocación correcta 836 (por ejemplo, una esquina biselada). Con referencia a las figuras 31 y 36, el miembro de colocación correcta 836 puede encajar en una característica de miembro de colocación correcta complementaria 809 del compartimento de recepción 907 en el aparato 800, que puede usarse para facilitar la orientación del cartucho 812 cuando se inserta en el aparato 800. En algunos ejemplos, el cartucho microfluidico 812 puede estar diseñado para ser ligeramente más pequeño (por ejemplo, 50-300 micras, normalmente 200-300 micras) que el pocillo 807 en el módulo calefactor/sensor 842 para facilitar la colocación y la retirada del cartucho microfluidico 812.

Con referencia a las figuras 32 y 33, las etiquetas, por ejemplo, códigos de barras 813 y 815, en el cartucho microfluidico 812 y/o el recipiente para muestras 814 pueden ser registradas por el aparato 800, normalmente antes de realizar un análisis, por ejemplo, introduciendo el código de una etiqueta manualmente usando un lector de código de barras 806.

En preparación para analizar una muestra, la punta de pipeta 820 del kit 810 puede unirse a la jeringa 822, y puede extraerse una muestra del recipiente para muestras 814 al interior de la jeringa 822. Con referencia a la figura 34, el filtro 818 puede unirse a continuación al depósito de lisis 830 del cartucho microfluidico 812 mediante la entrada de muestras 826 (por ejemplo, usando un cierre Luer con una válvula de pico de pato en la entrada de muestras 826) y el contenido (por ejemplo, una mezcla de muestra/aire) de la jeringa 822 pueden inyectarse en el cartucho microfluidico 812 a través del filtro 818. Aire adicional (por ejemplo, 1-3 ml) puede ser extraído al interior de la jeringa 822 (tal como se muestra en la figura 35) de modo que el cartucho microfluidico 812 pueda presurizarse (por ejemplo, 5-50 libras por pulgada cuadrada (psi) con respecto a la presión ambiente, normalmente entre 5-25 psi, más normalmente entre 10-15 psi, con respecto a la presión ambiente). El cartucho microfluidico 812 puede contener tampones, reactivos y similares, por ejemplo, en el depósito de lisis 830 en forma de líquidos, sólidos, microgránulos de reactivo liofilizado, y similares. El cartucho microfluidico 812 puede agitarse para mezclar la muestra inyectada con los tampones, reactivos, etc.

Con referencia a la figura 35, el cartucho microfluidico 812 puede presurizarse usando la jeringa 822 y el filtro 818 con aire añadido. El cartucho microfluidico 812 puede colocarse en el compartimento de recepción 907 del aparato 800, tal como se muestra en la figura 36, y puede asentarse en una única orientación en el compartimento de recepción 907 del aparato 800 debido a la interacción entre el miembro de colocación correcta 836 en el cartucho microfluidico 812 y el miembro de colocación correcta complementario 809 en el compartimento de recepción 907.

Tal como se muestra en las figuras 37 y 38, el cierre de la tapa 804 del aparato 800 puede servir para bloquear la luz ambiente procedente del compartimento de muestras. Adicionalmente, el cierre de la tapa 804 puede colocar un detector óptico contenido en la tapa 804 en posición con respecto al cartucho microfluidico 812. Además, la tapa 804 del aparato puede cerrarse para aplicar presión al cartucho microfluidico 812 para garantizar el contacto térmico en el pocillo 807 con el módulo calefactor/sensor 842. Con referencia a las figuras 39 y 40, el módulo calefactor/sensor 842 del aparato 800 puede ser amovible para limpieza, mantenimiento, o para la sustitución por una fase de calentamiento personalizada para un cartucho microfluidico particular 812.

Ejemplo 2: Aparato para el procesamiento de polinucleótidos

Este ejemplo no limitante describe diversas realizaciones de un aparato, sistema, cartucho microfluidico, kit, métodos, y producto de programa informático, en particular, diversos aspectos del uso del aparato 800 tal como se describe en el ejemplo 1 relacionados con aspectos ejemplares del método y el producto de programa informático.

Con referencia a las figuras 28-40, el aparato 800 puede incluir o estar configurado con un producto de programa informático en forma de software de control. El software puede proporcionar al aparato un "MODO PREPARADO" (por ejemplo, modo en espera) cuando no está siendo usado para el análisis donde el aparato 800 puede enchufarse y puede esperar la entrada por parte del usuario. Un operador puede abrir por deslizamiento la tapa 804

usando el asa 805 hasta su posición completamente abierta. El software y el aparato 800 pueden estar configurados para indicar, en la salida de visualización 802, que la tapa 804 está abierta y el aparato 800 está preparado. El software y el aparato 800 pueden estar configurados para realizar un autoanálisis de hardware y/o software. El software y el aparato 800 pueden estar configurados para solicitar la introducción de una ID de usuario y pantalla de contraseña, por ejemplo, para permitir a un usuario iniciar sesión usando una interfaz de pantalla táctil (por ejemplo, tocando teclas de un teclado emulado en la salida de visualización 802), escaneando un código de barras que representa al usuario, tal como el que se encuentra en una placa de ID, con el lector de código de barras 806, y similares.

Un usuario puede retirar a continuación el cartucho microfluídico 812 y el recipiente para muestras 814 de la bolsita sellada 824. El software y el aparato 800 pueden estar configurados para solicitar que el código de barras 813 en el cartucho microfluídico 812 y/o el código de barras 815 en el recipiente para muestras 814 sean escaneados usando el lector de código de barras 806, como en las figuras 32 y 33, antes de realizar cualquier análisis. El software y el aparato 800 pueden estar configurados para realizar análisis de cualificación basados en los códigos de barras (por ejemplo, para determinar si el cartucho microfluídico 812 y el recipiente para muestras 814 procedían de la misma bolsita sellada 824, si el kit 810 ha superado una fecha de caducidad, si el kit 810 puede estar configurado para usarlo con una secuencia de análisis particular que será llevada a cabo por el software y el aparato 800 y similares) antes de realizar análisis de ácido nucleico. La salida de visualización 802 puede avanzar a continuación a una pantalla que requiere una entrada, tal como un identificador del paciente. El aparato 800 también puede permitir que la información del paciente sea introducida escaneando un código de barras (por ejemplo, en una pulsera de ID médica asignada al paciente) usando el lector de código de barras 806. La salida de visualización 802 puede proporcionar información al usuario respecto, por ejemplo, a resultados de un análisis que se realizó previamente, opciones de selección para análisis a realizar, y similares. Los ejemplos de información que se puede proporcionar incluyen, aunque sin limitarse a: una determinación de análisis (por ejemplo, resultado positivo/negativo), un resultado de control interno (por ejemplo, positivo y/o negativo), y/o resultados del paciente. En este ejemplo, también se le puede instar al usuario a permitir que el aparato 800 realice tareas adicionales con los datos de análisis, tal como registrar o transmitir los datos a una impresora, dispositivo de almacenamiento, o a un ordenador, y similares.

Diversas realizaciones del software y el aparato 800 pueden estar configuradas para permitir a un usuario realizar una o más funciones opcionales (por ejemplo, ajustes al aparato 800 o el software) incluyendo, aunque sin limitarse a: modificar los ajustes del usuario, modificar los ajustes de cierre de sesión, ajustar el reloj del sistema, modificar los ajustes de la pantalla, modificar los requisitos de CC, ajustar las preferencias de notificación, configurar una impresora conectada, configurar una conexión de red, enviar datos mediante una conexión de red, seleccionar o adaptar protocolos de análisis de datos, o similares.

En diversas realizaciones, el software puede incluir una interfaz del usuario y firmware del dispositivo. El software de la interfaz del usuario puede permitir aspectos de interacción con el usuario incluyendo, aunque sin limitarse a, introducir información sobre el paciente/la muestra, monitorizar el progreso del análisis, advertencias de error, imprimir resultados del análisis, subida de resultados a bases de datos, actualización del software, y similares. El firmware del dispositivo puede hacer funcionar el aparato 800 durante los análisis analíticos y puede tener una parte genérica que puede ser independiente del análisis y una parte específica del análisis que está siendo realizado. La parte específica del análisis ("protocolo") puede especificar las operaciones microfluídicas y su orden para conseguir el análisis. La figura 41A muestra una captura de pantalla de una interfaz ejemplar que presenta datos del sensor de calor en tiempo real. La figura 41B muestra una captura de pantalla de una interfaz ejemplar que presenta datos del detector óptico en tiempo real.

Ejemplo 3: Aparato para el procesamiento de polinucleótidos

Este ejemplo no limitante describe diversas realizaciones del aparato, sistema, cartucho microfluídico, kit, métodos, y producto de programa informático reivindicados. En una realización, el aparato 800, mostrado en la figura 28, puede ser un dispositivo de PCR en tiempo real, autónomo basado en tecnología microfluídica para diagnóstico rápido y preciso de patógenos (por ejemplo, colonización por *Streptococcus* del grupo B (GBS) en mujeres prenatales). En una realización ejemplar, cuando el cartucho microfluídico 812 (figura 31) puede instalarse, el aparato 800 puede accionar operaciones en cartucho, detectar y analizar los productos de una amplificación por PCR y/o presentar los resultados en una interfaz del usuario gráfica. El cartucho microfluídico 812 puede incluir una pluralidad de cámaras y/o subunidades, para realizar diversas tareas, con intervención limitada o ninguna por el usuario. La figura 42 es una representación esquemática de las diversas cámaras y/o subunidades en un cartucho microfluídico ejemplar 812. El cartucho microfluídico 812 puede aceptar muestras clínicas sin procesar (por ejemplo, frotis vaginal/rectal sumergido en tampón de transporte en el caso de GBS) mediante la entrada de muestras 826, que puede ser un puerto de inyección de estilo Luer. Las muestras de frotis clínico que contienen células y restos humanos y bacterianos pueden recogerse de forma rutinaria en 2 ml de tampón de transporte. Sin embargo, pequeños volúmenes (por ejemplo, del orden de unos pocos microlitros) pueden procesarse fácilmente en dispositivos microfluídicos. La incorporación de una interfaz entre macro- y micro-operaciones puede permitir la adaptación de la tecnología microfluídica para el diagnóstico clínico. Tras la inyección de una muestra, el cartucho puede colocarse en el aparato 800 y operaciones adicionales; por ejemplo, preparación de muestras, medición/mezcla de reactivos, y

amplificación/detección por PCR, pueden realizarse de manera automatizada y sin manos.

La figura 43 es una representación esquemática de las etapas relacionadas con PCR y detección que pueden realizarse en un cartucho microfluidico ejemplar 812. En diversas realizaciones, las etapas para procesar muestras para detección y diagnóstico de patógenos basadas en PCR (por ejemplo, GBS a partir de frotis vaginales/rectales) pueden incluir: lisis para liberar ADN (por ejemplo, lisis de células de GBS para liberar polinucleótidos), captura y concentración de ADN, y minimización de inhibidores y competidores para limpiar el ADN para compatibilidad con PCR. Los inhibidores presentes en muestras clínicas pueden incrementar el riesgo de un resultado falso negativo para análisis de diagnóstico basados en PCR a menos que su influencia pueda mitigarse a través de limpieza de muestras.

La lisis de células puede conseguirse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, activación por calor y/o química. En algunas realizaciones, después de que una muestra de 1,0 +/- 0,2 ml pueda inyectarse en el depósito de lisis 830 mediante la entrada de muestras 826, el aparato 800 puede hacer que la muestra se mezcle con reactivos de lisis procedentes del reactivo de almacenamiento húmedo 838 y se caliente (por ejemplo, durante 7 minutos) en el depósito de lisis 830. Usando este protocolo, se ha conseguido más del 90 % de eficiencia de lisis para GBS y otras células bacterianas. Los reactivos de lisis pueden incorporar también una matriz de afinidad por ADN basada en perlas de látex de policarbonato - poliestireno modificadas con poliamida catiónica (por ejemplo, el miembro de retención 821) para capturar el ADN cargado negativamente que puede ser liberado durante el proceso lítico. Las perlas de afinidad pueden unirse a ADN cargado negativamente con afinidad muy elevada mientras que potenciales inhibidores de PCR pueden no conseguir unirse o pueden ser retirados durante posteriores etapas de lavado.

En una realización ejemplar, el aparato 800 también puede automatizar la captura y la limpieza del ADN a partir de lisado de muestra impuro (por ejemplo, lisado de muestra de GBS) para generar ADN "listo para PCR". El contenido del depósito de lisis 830 (por ejemplo, muestra de 1,0 +/- 0,2 ml y reactivos) puede transferirse a la cámara de procesamiento de ADN 840. Perlas de afinidad con ADN unido procedente de la muestra introducida pueden atraparse usando una columna de perlas en línea (por ejemplo, un filtro con tamaño de poro específico) y una bomba en cartucho puede usarse para lavar las perlas de afinidad para retirar fracciones unidas inespecíficamente, así como inhibidores solubles realizando un intercambio de tampón. El ADN unido puede liberarse mediante métodos conocidos, por ejemplo, calentando las perlas de afinidad (por ejemplo, a 80 °C) y/o usando un tampón de liberación. El ADN intacto puede recuperarse con esta liberación de etapa única en volumen muy pequeño (3-4 µl) consiguiendo de este modo una concentración significativa del ADN diana original. Otros métodos conocidos en la técnica pueden ser empleados por el sistema para conseguir lisis de células y captura, lavado y liberación de ADN.

En el ejemplo descrito en este caso, la base para el ensayo de PCR en tiempo real usado es el ensayo TaqMan®, cuyo funcionamiento esquemático es tal como se representa en la figura 44. Sin embargo, pueden usarse otras técnicas de ensayo conocidas en la técnica (por ejemplo, fluorescencia de SYBR-Green I). La reacción de PCR de TaqMan® aprovecha la actividad nucleasa 5' de ciertas polimerasas de ADN para escindir una sonda de TaqMan® durante la PCR. La sonda de TaqMan® contiene un colorante informador en el extremo 5' de la sonda y un colorante extintor en el extremo 3' de la sonda. Durante la reacción, la escisión de la sonda puede separar el colorante informador y el colorante extintor, lo que puede dar como resultado una mayor fluorescencia del informador. La acumulación de los productos de PCR puede detectarse directamente monitorizando el incremento de fluorescencia del colorante informador. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante informador al colorante extintor puede dar como resultado la supresión del informador (la emisión de fluorescencia puede ser mediante transferencia de energía de tipo Förster). Durante la PCR, si la diana de interés puede estar presente, la sonda puede hibridar entre los sitios de cebador directo e inverso. La ADN polimerasa normalmente puede escindir la sonda entre el informador y el extintor si la sonda hibrida con la diana. Los fragmentos de la sonda pueden desplazarse a continuación desde la diana, y la polimerización de la cadena puede continuar. El extremo 3' de la sonda puede bloquearse para impedir la extensión de la sonda durante PCR.

Este proceso puede producirse normalmente, por ejemplo, en cada ciclo térmico y no debe interferir en la acumulación exponencial de producto. El incremento de la señal de fluorescencia puede detectarse normalmente si la secuencia diana puede ser complementaria a la sonda y puede amplificarse durante PCR. El ensayo TaqMan® puede ofrecer una rigurosidad de dos veces (el cebador normalmente se une y la sonda normalmente se une a la secuencia diana) y por lo tanto la detección de cualquier amplificación inespecífica puede reducirse o eliminarse.

Conjuntos de cebadores y sonda de PCR en tiempo real para GBS (*Streptococcus agalactiae*) se han diseñado y puestos a prueba usando muestras clínicas. Los reactivos de PCR pueden incluir un par de cebadores de hibridación específicos de la parte del gen *cfb* entre las posiciones 328 y 451 que codifican el factor CAMP (Christie, Atkins y Munch-Petersen, véase, por ejemplo, *Boll Ist Sieroter Milan*, (Jul.-Ago. de 1955); 34(7-8): 441-52). El factor CAMP es una proteína extracelular difundible y es producida por la mayoría de GBS. El gen que codifica el factor CAMP, el gen *cfb* (número de entrada en el GenBank: X72754), puede estar presente en aislado de GBS y ha sido usado para el desarrollo de una identificación basada en PCR de GBS (Danbing K., y col., (2000), *Clinical Chemistry*, 46, 324-331). Además, una sonda fluorógena de estilo TaqMan® específica también se ha diseñado y puesto a prueba, en un ejemplo, para reconocer la secuencia amplificada entre los cebadores que permita detección

en tiempo real usando mediciones de fluorescencia.

Con el fin de evaluar el proceso de limpieza de ADN y monitorizar el rendimiento de los cebadores de la invención en el tiempo de ejecución, pueden emplearse plásmidos de control interno positivos (por ejemplo, tal como se representa en la figura 45). En diversas realizaciones, los cebadores de GBS específicos han sido empleados para construir plásmidos de control interno de la siguiente manera. Un trozo de secuencia de ADN aleatoria flanqueada por los cebadores de PCR específicos fue generado mediante síntesis de oligonucleótidos. Cualquier posible homología entre esta secuencia y otras secuencias de ADN especialmente ADN de *Strep. agalactiae*, disponible en el Genbank se comprobó cuidadosamente. Una sonda de estilo TaqMan® fluorógena se diseñó para reconocer los amplicones generados a partir de esta secuencia y un fluoróforo (Cal Orange 560 o análogo) diferente del usado para ADN de secuencia diana de GBS (FAM o análogo), se usó para detección fluorescente de color doble simultánea. En ciertas realizaciones, la cantidad del plásmido de control interno que se incluirá en la reacción de PCR se optimizó para permitir la amplificación del producto de control interno sin efectos perjudiciales significativos sobre la amplificación específica de GBS. En algunos ejemplos, la especificidad de las sondas para controles internos también se analizó y se optimizó por PCR usando el ADN purificado a partir de los patógenos incluidos en la lista de análisis de reactividad cruzada especificada previamente y ADN de GBS.

En una realización ejemplar, un sistema robusto para llevar a cabo termociclado rápido usando un volumen microfluídico, se diseñó, se desarrolló y se implementó en un formato microfluídico. Los volúmenes microfluídicos que pueden acomodarse varían entre aproximadamente 0,01 μl y aproximadamente 10 μl , donde la limitación principal en el límite inferior es la sensibilidad de detección. Los volúmenes ejemplares están en el intervalo de 0,5 - 4,5 μl . Otros volúmenes ejemplares más son 2 μl . Las figuras 41A y 41B muestran capturas de pantalla de la salida de un aparato ejemplar 800 (por ejemplo, tal como se ve en la LCD sensible al tacto 846). La figura 41A muestra un módulo de PCR microfluídico que experimenta termociclado rápido y la figura 41B muestra un ensayo de PCR en tiempo real. Estos datos pueden estar disponibles para el usuario del aparato 800 o pueden estar ocultos. En este caso, los cartuchos de GBS también se diseñaron para acomodar dos cámaras de PCR para permitir incorporar un control negativo incorporado con cada muestra analizada para mejorar la fidelidad del resultado. En algunos ejemplos, la química se ha optimizado y se ha desarrollado un sistema de detección compatible para permitir PCR múltiple de dos colores, facilitando de este modo el uso de controles positivos internos para comprobar la eficiencia de preparación de muestras y el rendimiento apropiado de la instrumentación asociada. Debido a masas térmicas muy pequeñas y algoritmos de control de retroalimentación eficientes, puede ser posible realizar termociclado ultrarrápido, de modo que una PCR de 50 ciclos típica pueda completarse en aproximadamente 20 minutos. El calor requerido para el termociclado puede ser proporcionado por el módulo calefactor/sensor 842 y detección multiplexada en tiempo real puede ser llevada a cabo por el módulo óptico (por ejemplo, el módulo de detección fluorescente 844).

En diversas realizaciones, cualquier número (por ejemplo, 0, 1, 2 o todos) de los reactivos para realizar la PCR pueden incorporarse en el cartucho en un formato liofilizado. En el momento del uso, los reactivos de PCR liofilizados pueden reconstituirse usando, por ejemplo, agua desionizada, que puede almacenarse en el cartucho microfluídico 812 en un formato de blíster (por ejemplo, en un depósito autoperforante 828). Los reactivos de PCR reconstituídos pueden dividirse en alícuotas en, por ejemplo, dos partes. En diversas realizaciones, ADN listo para PCR (emitido del módulo de preparación de muestras) puede mezclarse con una alícuota y enviarse al primer canal de PCR para PCR en tiempo real (PCR de muestra). Agua DI que contiene ADN no diana puede mezclarse con la segunda alícuota de los reactivos de PCR y puede enviarse a la otra cámara de PCR (PCR negativa) para servir como control negativo.

Ejemplo 4: Aparato para el procesamiento de polinucleótidos

En diversas realizaciones, un sistema microfluídico (por ejemplo, el cartucho microfluídico 812) puede incluir componentes tales como microbombas para mover/mezclar gotas de líquido, microrreactores para realizar reacciones bioquímicas iniciadas térmicamente, y microválvulas o microcompuertas para permitir el control de las operaciones de bombeo de líquido, así como para aislar regiones del cartucho tales como las cámaras de PCR durante el termociclado.

En algunas realizaciones, puede usarse un sistema de manipulación de gotas de líquido para producir inyección y movimiento de muestras de líquido basándose en bombas accionadas térmicamente (por ejemplo bombeo termo-neumático) que puede ser accionadas electrónicamente sin el uso de válvulas mecánicas. Por ejemplo, calentando el aire atrapado dentro de cámaras que pueden estar conectadas al canal principal, puede generarse una presión de aire significativa para bombeo termo-neumático. Incrementar la temperatura del aire puede hacer que la presión dentro de la cámara se eleve hasta que la presión pueda ser suficientemente elevada para separar una gota (medir una alícuota) y moverla a la ubicación deseada. Esta técnica puede implementarse como un mecanismo de accionamiento en el cartucho y puede usar, por ejemplo, cámaras moldeadas, canales y calefactores. Normalmente, esto puede evitar piezas móviles mecánicas y puede facilitar la fabricación. La figura 46 muestra fotos de una demostración que muestra la mezcla de dos fluidos ("A" - azul y "B" - naranja) usando el sistema de manipulación de gotas descrito anteriormente. Las bombas de presión P1 y P2 pueden activarse de manera controlada con precisión, lo que puede empujar a los líquidos a moverse como gotas discretas rodantes alternas a lo largo del canal M, donde

pueden mezclarse, y finalmente situarse en la cámara C, donde puede tener lugar la PCR.

En algunas realizaciones, materiales térmicamente expansivos tales como gas, líquido vaporizable fácilmente (por ejemplo, vaporizable entre 25 °C y 100 °C a 1 atmósfera), y/o un polímero que se expande térmicamente (por ejemplo, Expancel) pueden introducirse en bombas accionadas térmicamente (por ejemplo, cámaras de aire termoneumáticas), lo que puede minimizar el tamaño de las bombas para generar presiones diferenciales mayores de 5 psi. Estos materiales pueden expandirse, por ejemplo, en más del 100 % cuando puede alcanzarse una temperatura umbral, haciendo que éste llene parcial o completamente la cámara termoneumática causando compresión adicional del aire.

Por ejemplo, las figuras 47A y 47B representan una bomba accionada térmicamente 500 basándose en un material de transición de fase (PTM) 510 (un PTM de un punto de fusión conocido (por ejemplo, 60 °C/ 75 °C/ 90 °C) tal como una cera de parafina, soldadura, Expancel, o similares), en una configuración cerrada (figura 47A) y una abierta (figura 47B). El PTM 510 puede estar constreñido a una ubicación específica. La ubicación específica puede ser una cámara sellada 512 con el PTM 510 (normalmente aproximadamente 50-100 µl) depositado sobre un laminado. Tras calentar la bomba a una temperatura por encima de 120 °C, el PTM 510 se expande de forma irreversible (hasta 40 veces su tamaño original), comprimiendo el aire dentro de la cámara 512, desplazando el aire de la cámara, y haciendo que la compuerta adyacente 514 se abra. Las figuras 47C y 47D muestran otro ejemplo de una bomba 501 con polímero expancel 511 en la cámara 513 que puede ser accionada para hacer funcionar la compuerta 515.

Una muestra clínica ejemplar introducida en el cartucho microfluídico 812 puede tener un volumen de aproximadamente 1 mililitro. Después de la lisis enzimática/térmica de las células, el ADN liberado puede estar unido a microperlas de afinidad. Estas microperlas pueden ser, por ejemplo, del orden de 10 micras de tamaño. En diversas realizaciones, una cantidad total de perlas en el intervalo de unos pocos millones puede usarse por cartucho microfluídico 812 para concentración de ADN. En algunos casos, una presión mínima de 10 psi (por ejemplo, 10 psi, 11 psi o 15 psi) puede usarse para concentrar las perlas contra un área de filtro en línea de unos pocos milímetros (tamaño de poro de 8 micras) en unos pocos minutos (por ejemplo 3 minutos). Esta presión puede generarse, por ejemplo, inyectando aire extra (por ejemplo, 1-3 ml) en la cámara de lisis a granel del cartucho microfluídico 812. En algunas realizaciones, una válvula de pico de pato de una vía en la entrada Luer puede usarse para minimizar o impedir que la presión de aire escape a través de la entrada.

Reactivos que pueden emplearse para la preparación de muestras y reacciones de PCR pueden bombearse al interior de la red microfluídica presionando hacia abajo las cúpulas del blíster de reactivo mediante la corredera del instrumento durante el uso del instrumento.

En realizaciones ejemplares, las enzimas empleadas normalmente para lisis celular, cápsula de ADN, y para realizar PCR en tiempo real pueden liofilizarse en microgránulos y almacenarse en diferentes ubicaciones del cartucho. El contacto de aire puede minimizarse almacenando los microgránulos en el cartucho microfluídico 812, por ejemplo, en una cámara purgada con nitrógeno o en una estructura de canal sellada en ambos extremos del microcanal mediante compuertas térmicas. Los tampones empleados normalmente para preparación de muestras, hidratación de reactivos y PCR pueden almacenarse en blísteres para reactivo sellados herméticamente (por ejemplo, los depósitos autopercorantes 828). Los materiales usados para preparar el blíster para reactivos pueden tener una barrera al vapor de la humedad elevada y pueden minimizar la pérdida de líquido durante el almacenamiento del cartucho durante un año. Los residuos generados a partir de la muestra clínica así como los diversos tampones de lavado pueden almacenarse incorporados en el cartucho en cámaras y microcanales (por ejemplo, el depósito de residuos 832, que pueden ser normalmente be resistentes a las fugas).

Ejemplo 5 Aspectos de PCR en tiempo real

Una pluralidad de etapas que pueden usarse para el diagnóstico basado en PCR en tiempo real, preciso de patógenos (por ejemplo, colonización por *Streptococcus* del grupo B (GBS) en mujeres prenatales) se integraron en un único cartucho desechable basado en tecnología microfluídica, tal como se muestra en la figura 48. Etapas ejemplares que pueden realizarse en una operación de estilo “entra una muestra; sale un resultado” en dicho cartucho incluyen: lisis a granel; captura, lavado y liberación de ADN; y preparación y ejecución de PCR. En diversas realizaciones de este cartucho, la muestra y los reactivos pueden estar contenidos incorporados en el cartucho microfluídico 812 (tal como se muestra en la figura 31) y no hay normalmente necesidad de interacción manual con la operación excepto, por ejemplo, durante el acto de inyectar la muestra en el dispositivo. Orificios de ventilación hidrófobos situados estratégicamente pueden estar incluidos para retirar el aire atrapado durante el procesamiento y reactivos normalmente empleados para el ensayo pueden envasarse como perlas liofilizadas en el cartucho. Los líquidos requeridos para reconstitución pueden almacenarse en bolsitas blíster que los liberan en el momento del uso.

En diversas realizaciones, muestras (por ejemplo, muestras de GBS) pueden introducirse a través de la entrada de muestras 826, que puede tener un accesorio Luer para acomodar una jeringa. Un pre-filtro (por ejemplo, unido a la jeringa) puede usarse para retirar al menos una parte de impurezas en bruto de la muestra y, en algunas realizaciones, la muestra (por ejemplo, 1 ml) puede lisarse en la cámara de lisis usando calor y/o enzimas líticas.

Enzimas tales como pronasa, proteinasa K, y ARNasaA pueden usarse (por ejemplo, durante la etapa de lisis) para retirar la materia proteínica inhibidora y moléculas de ARN competidoras. Con referencia a la figura 49, perlas de captura de ADN también pueden estar incluidas en la mezcla maestra. La muestra líquida lisada (por ejemplo, que contiene los GBS y/o y otro ADN unido a perlas de afinidad) puede retrofluir al interior del cartucho microfluídico desde la salida de la cámara de lisis. En algunos ejemplos, las perlas de afinidad con ADN capturado pueden ser retenidas por un filtro en línea, mientras que los restos no deseados y el exceso de líquido pueden ser enviados a la cámara de residuos. En dichas realizaciones, las perlas usadas pueden ser no magnéticas, o magnéticas, y el filtro se selecciona para discriminar partículas por tamaño. En otras realizaciones, las perlas son magnéticas, y están concentradas en una ubicación particular del cartucho microfluídico, tal como una cámara o un canal, aplicando un campo magnético configurado para concentrar líneas de flujo en la ubicación en cuestión. El imán empleado puede ser un electroimán, tal como el controlado por el procesador para encenderlo y apagarlo en momentos especificados durante el análisis de muestras. El imán puede ser, como alternativa, un imán permanente, tal como uno que se mueve dentro y fuera del lugar cuando se requiere.

En algunas realizaciones, la cámara de residuos está equipada con un agente antiespumante, tales como simeticona. Puede producirse una vigorosa formación de burbujas en la cámara de residuos, dado que el líquido entra en ella a alta velocidad y, tras la mezcla con aire en la cámara de residuos, forma espuma. Es indeseable que la espuma desborde de la cámara de residuos. La presencia de un agente desespumante puede mitigar este fenómeno. El agente desespumante puede estar presente en forma de polvo, comprimido, microgránulo, o partícula.

En algunas realizaciones, las perlas pueden someterse a lavado para retirar materia no unida y unida inespecíficamente y el ADN limpiado puede liberarse en un compartimento de pequeño volumen ($\sim 3 \mu\text{l}$) y concentrarse (por ejemplo, en un factor de aproximadamente 300). En diversas realizaciones, el ADN concentrado puede mezclarse a continuación con los reactivos de PCR apropiados y/o ser enviado a un canal de PCR para PCR en tiempo real. Un plásmido de control interno (junto con su sonda análoga) también puede incluirse en el primer canal de PCR, que puede actuar como control positivo. En un segundo canal de PCR (si está presente), agua DI que contiene ADN no diana y el control interno puede mezclarse junto con los reactivos de PCR, para actuar como control negativo.

Un usuario puede introducir una muestra en la muestra de lisis a granel a través de una válvula de pico de pato Luer (por ejemplo, la entrada de muestras 826), agitar suavemente para disolver microgránulos del reactivo de lisis, e introducir una cantidad en exceso de aire (por ejemplo, 0,25-0,75 ml) en la cámara de lisis para sobrepresurizar la cámara de lisis. La presión absoluta (P) generada en la cámara de lisis que tiene un volumen de cámara, $V_{\text{cámara}}$, está relacionada con la cantidad de muestra líquida inyectada, V_{muestra} , y el volumen de aire extra inyectado, $V_{\text{aire extra}}$, mediante la fórmula:

$$P = \frac{P_{\text{atm}} (V_{\text{cámara}} - V_{\text{muestra}})}{(V_{\text{cámara}} + V_{\text{muestra}} + V_{\text{aire extra}})}$$

El cartucho microfluídico 812 puede colocarse a continuación en el aparato 800 y el módulo deslizante 848 cerrarse. Al cerrarse, el módulo deslizante 848 puede presionar los blísteres para reactivo (por ejemplo, depósitos autoperforantes 828), haciendo que estallen y liberen los reactivos (por ejemplo, tampón de lavado, tampón de liberación, tampón de neutralización y agua) al interior de los canales con reactivos.

En diversas realizaciones, el aparato 800 puede realizar cualquiera o todas de las siguientes etapas. En referencia a las figuras 50A-50J en los sucesivos, diversos elementos también pueden estar ubicados con los mismos indicadores en las figuras 15A y 15B. Con referencia a la figura 50A, válvulas (V3, V4, V5, V7, V12, V13, V15, V16, V23) a ambos lados del canal que contiene los 4 reactivos pueden cerrarse y la lámpara de lisis a granel puede activarse para calentar la cámara de lisis a granel, por ejemplo, a 60 °C durante 7 minutos (por ejemplo, usando el sensor de temperatura L en la figura 50B para retroalimentación). Con referencia a la figura 50B, la compuerta G1 puede abrirse para drenar, durante una cantidad predeterminada de tiempo (por ejemplo, 2-5 minutos dependiendo del tipo de muestra), el líquido (que contiene lisado, ADN unido a perlas de afinidad por ADN, etc.) a través del filtro de captura de perlas al interior de la cámara de residuos. Las perlas de ADN pueden quedar atrapadas contra el filtro en línea mientras que el otro líquido fluye hasta la cámara de residuos. La compuerta G7 puede abrirse para ventilar el exceso de líquido y/o de presión en la cámara de lisis al interior de la cámara de residuos. Las válvulas V1 y V8 pueden cerrarse para bloquear la cámara de lisis y la cámara de residuos, respectivamente.

Con referencia a la figura 50C, en algunos ejemplos, las perlas atrapadas pueden lavarse bombeando tampón de lavado a través de la columna de perlas usando la bomba E1 y abriendo las compuertas G2, G3 y G9 para situar tampón de lavado aguas abajo del orificio de ventilación hidrófobo H2. Las válvulas que aíslan el canal de tampón de lavado (por ejemplo, V2) y los residuos de tampón de lavado (por ejemplo, V9) pueden cerrarse.

Con referencia a la figura 50D, tampón de liberación puede bombearse, usando la bomba E2 y abriendo las compuertas G6, G4 y G8 para llenar una columna de perlas y situar el tampón de liberación aguas abajo del orificio de ventilación de aire H1. Las válvulas que bloquean el canal de tampón de liberación (por ejemplo, V6) y el canal aguas abajo de la columna de perlas (por ejemplo, V10) pueden cerrarse y las perlas calentarse a, por ejemplo, 70

°C durante 2 minutos lo que puede liberar el ADN de las perlas de afinidad por ADN.

Con referencia a la figura 50E, el ADN liberado puede bombearse, usando la bomba E3 y abriendo las compuertas G5 y G10 hasta una posición aguas abajo del orificio de ventilación hidrófobo H4, momento en el que las válvulas V11 y V14 pueden cerrarse. Con referencia a la figura 50F, una parte del ADN liberado (entre la unión G11 y a1) y una parte del tampón de neutralización (entre G11 y a2) pueden mezclarse usando la bomba E4 y abriendo las compuertas G12, G11 y G13. La mezcla del tapón de líquido compuesto entre a1 y a2 puede ocurrir después de que pueda ser bombeado a través del canal de mezcla de neutralización y situado aguas abajo del orificio de ventilación hidrófobo H4. G11 puede ser una compuerta de volumen muerto nulo que lleva dos canales de líquido cercanos entre sí sin atrapar burbujas de aire durante la combinación de los dos tapones de líquido. Las dos válvulas (V21 y V22) en los extremos de la muestra neutralizada pueden cerrarse y, ahora con referencia a la figura 50G, agua DI puede bombearse usando la bomba E5 y abriendo las compuertas G14, G15 y G17 para disolver el microgránulo de reactivo de PCR. El líquido puede situarse usando el orificio de ventilación hidrófobo H12. Después de un periodo de tiempo suficientemente largo para la completa disolución del microgránulo de reactivo de PCR liofilizado (por ejemplo, aproximadamente un minuto) la válvula V17 puede cerrarse.

Con referencia a la figura 50H, enzima disuelta puede bombearse a través del canal de mezcla de enzimas usando la bomba E6, abriendo la compuerta G16, y usando el orificio de ventilación hidrófobo H5 para ayudar a la colocación del fluido. En diversas realizaciones, la enzima mezclada puede distribuirse (por ejemplo, en 2 partes iguales) para múltiples reacciones a la sección de mezcla de PCR de la muestra así como a la sección de mezcla de PCR negativa, momento en el cual, las válvulas V18, V20 y V19 pueden cerrarse.

En diversas realizaciones, con referencia a la figura 50I, una parte del ADN neutralizado (entre la unión G20 y b1) y una parte de la enzima (entre G20 y b2) pueden mezclarse usando la bomba E7 y abriendo las compuertas G18, G20 y G22. La mezcla del tapón de líquido compuesto entre a1 y a2 puede ocurrir después de que pueda bombearse a través del canal de mezcla de neutralización y situarse aguas abajo del orificio de ventilación hidrófobo H6. Una parte del agua DI (entre la unión G21 y c1) y una parte de la enzima (entre G21 y c2) puede mezclarse usando la bomba E8 y abriendo las compuertas G19, G21 y G23. La mezcla del tapón de líquido compuesto puede producirse entre c1 y c2, después de que pueda ser bombeada a través del canal de mezcla de neutralización y situada agua abajo del orificio de ventilación hidrófobo H7.

Con referencia a la figura 50J, las válvulas de PCR V24, 25, 26, 27, en algunos ejemplos, pueden cerrarse para realizar PCR de muestras y PCR de control negativo. En diversas realizaciones, luz (por ejemplo, fluorescencia) puede ser detectada usando el sistema óptico en la corredera. En algunos ejemplos, el software puede determinar la presencia de diana (por ejemplo, GBS) en la muestra basándose en datos de fluorescencia y puede notificar los resultados.

Ejemplo 6: Aparato para el procesamiento de polinucleótidos

Este ejemplo no limitante muestra vistas CAD de diversas realizaciones ejemplares del aparato, sistema, cartucho microfluídico, kit, métodos y producto de programa informático, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

La figura 51 muestra una vista lateral de un conjunto de palanca 1200, con palanca 1210, unidad de engranaje 1212 y miembro de fuerza 1214. El conjunto 1200 puede usarse para cerrar la tapa del aparato y (a través de los miembros de fuerza 1214) aplicar fuerza a un cartucho microfluídico 1216 en el compartimento de recepción 1217. Un miembro de fuerza es visible en esta vista recortada, pero puede usarse cualquier número, por ejemplo cuatro. Los miembros de fuerza pueden ser, por ejemplo, un accionador que funciona por resorte manual tal como se muestra, un accionador mecánico automático, un material con suficiente flexibilidad y rigidez mecánicas (por ejemplo, un tapón elastomérico duro), y similares. La fuerza aplicada al cartucho microfluídico 1216 puede dar como resultado una presión en la superficie del cartucho microfluídico 1216 de al menos aproximadamente 0,7 psi a aproximadamente 7 psi (entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 kilopascales), o en algunas realizaciones aproximadamente 2 psi (aproximadamente 14 kilopascales).

La figura 52 muestra una vista lateral del conjunto de palanca 1200, con el cartucho microfluídico 1216 en el compartimento de recepción 1217. Una bomba de calor 1219 (por ejemplo, una bombilla de xenón tal como se muestra) puede funcionar como una fuente de calor radiante dirigida en un depósito de entrada de muestras 1218, donde el calor puede lisar las células en el depósito 1218. Una capa mecánicamente flexible, conductora térmicamente 1222 puede estar en una interfaz entre el cartucho microfluídico 1216 y la fase térmica 1224. Normalmente, el cartucho microfluídico 1216 y la fase térmica 1224 pueden ser planos en sus respectivas superficies de interfaz, por ejemplo, planas dentro de aproximadamente 100 micras, o más normalmente dentro de aproximadamente 25 micras. La capa 1222 puede mejorar el acoplamiento térmico entre el cartucho microfluídico 1216 y la fase térmica 1224. Los elementos detectores ópticos 1220 pueden estar dirigidos a la superficie superior del cartucho microfluídico 1216.

La figura 53 muestra un primer plano del compartimento de recepción 1217.

La figura 54 muestra un primer plano de la interfaz entre el cartucho microfluídico 1216, la capa mecánicamente flexible, conductora térmicamente 1222 y la fase térmica 1224.

5 La figura 55 muestra una vista superior del conjunto 1200. Además de miembros mecánicos 1214, pueden emplearse miembros guía 1226.

La figura 56 es un primer plano de la figura 55.

10 Las figuras 57-59 son una serie de fotos de la palanca 1210 en acción. Puede mostrarse además en el conjunto de engranaje 1212 la leva 1228, que permite a la palanca 1210 aplicar fuerza a la placa 1230 acoplada a los miembros de fuerza 1214.

15 Las figuras 60 y 61 muestran vistas del cartucho microfluídico 1216 con depósitos autoperforantes 1228 y miembros mecánicos 1230 para accionar los depósitos autoperforantes.

20 Las figuras 62 y 63 muestran elementos de elementos detectores ópticos 1220 que incluyen fuentes de luz 1232 (por ejemplo, diodos emisores de luz), lentes 1234, detectores de luz 1236 (por ejemplo, fotodiodos) y filtros 1238. Los filtros pueden ser, por ejemplo, filtros de paso de banda, los filtros en las fuentes de luz correspondientes a la banda de absorción de una o más sondas fluorógenas y los filtros en los detectores correspondientes a la banda de emisión de las sondas fluorógenas.

Ejemplo 7: Preparación del miembro de retención

25 Perlas magnéticas con superficie de carboxilato (Sera-Mag magnéticas modificadas carboxilato, n.º de parte 3008050250, Seradyn) a una concentración de aproximadamente 10^{11} ml⁻¹ se activaron durante 30 minutos usando N-hidroxilsuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) en una solución tampón de ácido 2-(N-morfolinio)-etanosulfónico (MES) 500 mM a pH 6,1. Las perlas activadas se incubaron con poli-L-lisina (PLL) de 3.000 Da o 300.000 Da de peso molecular promedio. Después de 2 lavados para retirar la PLL no unida, las perlas estaban listas para usarlas.

30

Ejemplo 8: Cartucho microfluídico

35 Con referencia a las figuras 64 y 65, se fabricó un cartucho microfluídico 300 para demostrar la separación de polinucleótidos de inhibidores. El cartucho 300 comprende primera y segunda partes de sustrato 302', 304', que comprenden, respectivamente, primera y segunda capas 302a', 302b' y 304a', 304b'. Las primera y segunda capas 302a', 302b' definen un canal 306' que comprende una entrada 310' y una salida 312'. Las primera y segunda capas 304a', 304b' definen un canal 308' que comprende una entrada 314' y una salida 316'. Las primera y segunda partes de sustrato 302', 304' se emparejaron usando adhesivo 324' de modo que la salida 312' comunicaba con la entrada 314' con un filtro 318' situado entre ellas. Una parte de la salida 312' se llenó con las perlas activadas preparadas anteriormente para proporcionar una región de procesamiento 320' que comprende un miembro de retención (las perlas). Una pipeta 322' (figura 66) fijada mediante adhesivo 326' facilitaba la introducción de la muestra.

40

45 En uso, la muestra introducida mediante la entrada 310' pasaba a lo largo del canal y a través de la región de procesamiento 320'. El exceso de material de muestra pasaba a lo largo del canal 308' y salía del dispositivo 300' mediante la salida 316'. Los polinucleótidos fueron retenidos preferentemente por las perlas en comparación con los inhibidores. Una vez que se había introducido la muestra, líquidos adicionales, por ejemplo, un líquido de lavado y/o un líquido para uso para liberar los polinucleótidos retenidos se introdujeron mediante la entrada 326'.

45

Ejemplo 9: Retención de ADN

50

55 La retención de polinucleótidos por las perlas modificadas con poli-L-lisina del dispositivo 300' se demostró preparando dispositivos respectivos que comprenden regiones de procesamiento que tienen un volumen de aproximadamente 1 µl que incluye aproximadamente 1000 perlas. Las perlas se modificaron con poli-L-lisina de entre aproximadamente 15.000 y 30.000 Da. Cada región de procesamiento se llenó con un líquido que comprendía ADN de esperma de arenque (aproximadamente 20 µl de muestra con una concentración de aproximadamente 20 mg/ml) colocando de este modo las perlas y el líquido en contacto. Después de que el líquido y las perlas habían estado en contacto durante 10 minutos, el líquido se retiró de cada región de procesamiento y se sometió a PCR el tiempo real cuantitativa para determinar la cantidad de ADN de esperma de arenque presente en el líquido.

55

60 Se realizaron dos controles. En primer lugar, una región de procesamiento en caso contrario idéntica se rellenó con perlas sin modificar, es decir, perlas que eran idénticas a las perlas de poli-L-lisina excepto por las etapas de activación y de incubación de poli-L-lisina. El líquido que comprendía ADN de esperma de arenque se puso en contacto con estas perlas, se le dejó reposar durante 10 minutos, se retiró, y se sometió a PCR en tiempo real cuantitativa. En segundo lugar, el líquido que comprendía el ADN de esperma de arenque ("el líquido no procesado") se sometió a PCR en tiempo real cuantitativa.

65

Con referencia a la figura 66, los primer y segundo controles mostraban respuestas esencialmente idénticas que indicaban la presencia de ADN de esperma de arenque en el líquido puesto en contacto con las perlas no modificadas y en el líquido no procesado. El líquido que se había puesto en contacto con las 3.000 perlas de poli-L-lisina mostraba una respuesta inferior indicando que las perlas modificadas habían retenido sustancialmente todo el ADN de esperma de arenque. La respuesta de PCR del líquido que se había puesto en contacto con las perlas de poli-L-lisina de 300.000 Da mostraba una respuesta de amplificación que era al menos aproximadamente un 50 % mayor que para las perlas de 3.000 Da, indicando que la modificación superficial del peso molecular inferior era más eficiente en la retención del ADN de esperma de arenque.

10 **Ejemplo 10: Liberación de ADN a partir de perlas modificadas de Poli-L-lisina**

Dispositivos que tenían regiones de procesamiento se rellenaron con perlas modificadas de poli-L-lisina de 3.000 Da. El líquido que contenía polinucleótidos obtenidos de estreptococos del grupo B (GBS) se puso en contacto con las perlas y se incubó durante 10 minutos como anteriormente para el ADN de esperma de arenque. Este líquido se había obtenido sometiendo a aproximadamente 10.000 bacterias de GBS en 10 µl de tampón Tris 20 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1 % a lisis térmica a 97 °C durante 3 min.

Después de 10 minutos, el líquido en contacto con las perlas se retiró haciendo fluir aproximadamente 10 µl de solución de lavado (Tris-EDTA pH 8,0 con Triton al 1 % X 100) a través de la región de procesamiento. Posteriormente, se añadió aproximadamente 1 µl de solución de NaOH 5 mM a la región de procesamiento. Este proceso dejó la región de procesamiento rellena, llena con la solución de NaOH en contacto con las perlas. La solución en contacto con las perlas se calentó a 95 °C. Después de 5 minutos de calentamiento a 95 °C, la solución en contacto con las perlas se retiró eluyendo la región de procesamiento con un volumen de solución igual a tres veces el volumen de vacíos de la región de procesamiento.

Con referencia a la figura 67, cinco alícuotas de solución se sometieron a amplificación por PCR en tiempo real cuantitativa. Las alícuotas E1, E2 y E3 contenían, cada una, aproximadamente 1 µl de líquido. La alícuota L corresponde a líquido de la muestra original que había pasado a través de la región de procesamiento. La alícuota W era líquido obtenido de solución de lavado sin calentar. La alícuota E1 corresponde al volumen muerto del dispositivo 300, aproximadamente igual al volumen del canal 308. Por lo tanto, el líquido de la alícuota E1 estaba presente en el canal 308 y no en contacto con las perlas durante el calentamiento. Este líquido había pasado a través de la región de procesamiento antes del calentamiento. La alícuota E2 comprende líquido que estaba presente dentro de la región de procesamiento y en contacto con las perlas durante el calentamiento. La alícuota E3 comprende líquido usado para retirar la alícuota E2 de la región de procesamiento.

Tal como se ve en la figura 67, más del 65 % del ADN de GBS presente en la muestra inicial fue retenido por y liberado de las perlas (alícuota E2). La alícuota E2 también demuestra la liberación de más del 80 % del ADN que había sido retenido por las perlas. Menos de aproximadamente el 18 % del ADN de GBS pasaba a través de la región de procesamiento sin ser capturado. La solución de lavado sin calentamiento comprendía menos del 5 % del ADN de GBS (alícuota W).

Ejemplo 11: Separación de polinucleótidos e inhibidores

Las células bucales del revestimiento de las mejillas proporcionan una fuente de material genético humano (ADN) que puede usarse para la detección de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Una muestra que contenía células bucales se sometió a lisis térmica para liberar ADN de dentro de las células. El dispositivo 300 se usó para separar el ADN de inhibidores concomitantes tal como se ha descrito anteriormente. Una muestra limpiada correspondiente a la alícuota E2 de la figura 67 se sometió a reacción en cadena de la polimerasa. Una muestra de control o impura tal como la obtenida a partir de la lisis térmica también se amplificó.

Con referencia a la figura 68, la muestra limpiada mostraba una respuesta de PCR sustancialmente mayor en menos ciclos que la muestra de control. Por ejemplo, la muestra de limpieza superaba una respuesta de 20 dentro de 32 ciclos, mientras que la muestra de control requería aproximadamente 45 ciclos para alcanzar la respuesta de muestra.

La sangre actúa como una matriz de muestra en diversos análisis de diagnóstico incluyendo detección de agentes de enfermedades infecciosas, marcadores de cáncer y otros marcadores genéticos. La hemoglobina presente en muestras de sangre es un potente inhibidor documentado de PCR. Dos muestras de sangre de 5 ml se lisaron en tampón Tris 20 mM pH 8, EDTA 1 mM, SDS al 1 % y se introdujeron en respectivos dispositivos 300, que se hicieron funcionar tal como se ha descrito anteriormente para preparar dos muestras de limpieza. Una tercera muestra de sangre de 5 ml se lisó y se preparó usando un método de extracción de ADN comercial Puregene, Gentra Systems, MN. Las muestras limpiadas respectivas y la muestra sometida al método de extracción comercial se usaron para un análisis de discriminación alélica (reactivos CYP2D6*4, Applied Biosystems, CA). Cada muestra contenía una cantidad de ADN correspondiente a aproximadamente 1 ml de sangre.

Con referencia a la figura 69, las muestras limpiada y extraída comercialmente mostraban una respuesta de PCR similar, demostrando que la región de procesamiento del dispositivo 300' retiraba de forma eficiente inhibidores de las muestras de sangre.

5 Ejemplo 12: Miembro de retención resistente a proteasa

La preparación de muestras de polinucleótidos para procesamiento adicional a menudo incluye someter a las muestras a tratamiento con proteasa en el que una proteasa escinde enlaces peptídicos de proteínas en la muestra. Una proteasa ejemplar es pronasa, una mezcla de endo- y exo-proteasas. La pronasa escinde la mayoría de los enlaces peptídicos. Ciertos ligandos, tales como poli-L-lisina pueden ser susceptibles a rotura por pronasa y otras proteasas. Por lo tanto, las muestras generalmente no se someten a tratamiento con proteasa en presencia del miembro de retención si los ligandos unidos a él son susceptibles a las proteasas.

La poli-D-lisina, el enantiómero dextrógiro de poli-lisina resiste la escisión por pronasa y otras proteasas. Se estudió la capacidad de un miembro de retención que comprende poli-D-lisina unida para retener ADN incluso cuando se somete a un tratamiento con proteasa.

Se prepararon ocho (8) muestras. Un primer grupo de 4 muestras contenían 1000 células de GBS en 10 µl de tampón. Un segundo grupo de 4 muestras contenía 100 células de GBS en 10 µl de tampón. Cada una de las 8 muestras se calentó a 97 °C durante 3 min para lisar las células de GBS. Se crearon cuatro (4) conjuntos de muestras a partir de las muestras calentadas. Cada conjunto de muestras contenía 1 muestra de cada uno de los primer y segundo grupos. Las muestras de cada conjunto de muestras se trataron de la siguiente manera.

Con referencia a la figura 70A, las muestras del conjunto de muestras 1 se sometieron a incubación con pronasa para preparar muestras escindidas con proteína respectivas, que se calentaron a continuación para inactivar las proteasas. Las muestras calentadas, escindidas con proteína se pusieron en contacto con miembros de retención respectivos, que comprenden, cada uno, un conjunto de perlas modificadas con poli-L-lisina. Después de 5 minutos, los conjuntos de perlas respectivos se lavaron con 5 microlitros de una solución de NaOH 5 mM para separar inhibidores y productos de escisión con proteína del ADN unido. Los conjuntos de perlas respectivos se pusieron en contacto, cada uno, con una segunda alícuota de solución de NaOH y se calentaron a 80 °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con ADN liberado se neutralizaron con un volumen igual de tampón. Las soluciones neutralizadas se analizaron para determinar la eficiencia de recuperación de ADN. Los resultados se promediaron y se muestran en la figura 70B.

Las muestras del conjunto de muestras 2 se sometieron a incubación con pronasa para preparar muestras escindidas con proteína respectivas, que se calentaron a continuación para inactivar las proteasas. Las muestras calentadas, escindidas con proteína se pusieron en contacto con miembros de retención respectivos que comprenden, cada uno, un conjunto de perlas modificadas con poli-D-lisina. Después de 5 minutos, los conjuntos de perlas respectivos se lavaron con 5 microlitros de una solución de NaOH 5 mM para separar inhibidores y productos de escisión de proteínas, del ADN unido. Los conjuntos de perlas respectivos se pusieron en contacto, cada uno, con una segunda alícuota de solución de NaOH y se calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con ADN liberado se neutralizaron con un volumen igual de tampón. Las soluciones neutralizadas se analizaron para determinar la eficiencia de la recuperación de ADN. Los resultados se promediaron y se muestran en la figura 70B.

Las muestras del conjunto de muestras 3 se sometieron a incubación con pronasa para preparar muestras escindidas con proteína respectivas. Las proteasas no se desactivaron térmica o químicamente. Las muestras escindidas con proteína se pusieron en contacto con miembros de retención respectivos que comprenden, cada uno, un conjunto de perlas modificadas con poli-L-lisina. Después de 5 minutos, los conjuntos de perlas respectivos se lavaron con 5 microlitros de una solución de NaOH 5 mM para separar inhibidores y productos de escisión de proteínas, del ADN unido. Los conjuntos de perlas respectivos se pusieron en contacto, cada uno, con una segunda alícuota de solución de NaOH y se calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con polinucleótidos liberados se neutralizaron, cada una, con un volumen igual de tampón. Las soluciones neutralizadas se analizaron para determinar la eficiencia de la recuperación de ADN. Los resultados se promediaron y se muestran en la figura 70B.

Las muestras del conjunto de muestras 4 se sometieron a incubación con pronasa para preparar muestras escindidas con proteína respectivas. Las proteasas no se desactivaron térmica o químicamente. Las muestras escindidas con proteína se pusieron en contacto con miembros de retención respectivos que comprenden, cada uno, un conjunto de perlas modificadas con poli-D-lisina. Después de 5 minutos, los conjuntos de perlas respectivos se lavaron con 5 microlitros de una solución de NaOH 5 mM para separar inhibidores y productos de escisión de proteínas, del ADN unido. Los conjuntos de perlas respectivos se pusieron en contacto, cada uno, con una segunda alícuota de solución de NaOH y se calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con polinucleótidos liberados se neutralizaron, cada una, con un volumen igual de tampón. Las soluciones neutralizadas se analizaron para determinar la eficiencia de la recuperación de ADN. Los resultados se promediaron y se muestran en la figura 70B.

Tal como se ve en la figura 70B, un promedio de más del 80 % de ADN de las células de GBS se recuperó usando el conjunto de muestras 4 en el que las muestras se pusieron en contacto con perlas modificadas con poli-D-lisina y se sometieron a incubación con pronasa en presencia de las perlas sin inactivación de proteasa. La eficiencia de recuperación para el conjunto de muestras 4 puede ser más de dos veces tan elevada como para cualquiera de las otras muestras. Específicamente, las eficiencias de recuperación para los conjuntos de muestras 1, 2, 3 y 4, fueron del 29 %, 32 %, 14 % y 81,5 %, respectivamente. Las eficiencias demuestran que pueden obtenerse elevadas eficiencias de recuperación para muestras sometidas a incubación con proteasa en presencia de un miembro de retención que retiene ADN.

10 **Ejemplo 13: Manual del operador para aparato para el procesamiento de polinucleótidos**

Este ejemplo no limitante describe, en forma de un manual del operador, diversas realizaciones del aparato, cartucho microfluídico, kit, métodos y producto de programa informático reivindicados, en particular dirigido a un sistema de único cartucho que incluye un ensayo de PCR microfluídico para la detección cualitativa de microorganismos, tales como Streptococcus del grupo B (GBS). Descripciones adicionales pertinentes al análisis de GBS se presentan en el ejemplo 14.

Kit de preparación de muestras, que puede incluir

- 20 Vial de muestras que comprende tampón y conservante
- Hisopo de recogida con instrucciones para autorrecogida por el paciente.
- Un número (por ejemplo, 25) de jeringas con filtro
- Viales que contienen tampón.
- Etiquetas de ID del paciente para los viales de recogida
- 25 Jeringas de 3 cc.
- Cartucho microfluídico, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Kits de muestra de control externa, que pueden incluir

- 30 Espécimen de frotis de control positivo que contiene muestra en el límite de detección de, por ejemplo, bacterias GBS en forma deshidratada;
- Viales que contienen tampón con identificación POSITIVA en el vial;
- Viales que contienen tampón con identificación NEGATIVA en el vial; y
- 35 Jeringas.

Equipo:

- 40 Sistema con lector de código de barras, ambos de los cuales tal como se describe adicionalmente en el presente documento, equipado con, por ejemplo, un cable de alimentación de 115 V o 220 V.

Equipo opcional adicional:

- 45 Impresora con conexión USB
- Conexión a la red del hospital

Uso ejemplar e indicaciones de uso

- 50 La descripción en este ejemplo, es adecuado para analizar muestras para la presencia de GBS, detalles de lo cual se proporcionan en el ejemplo 14.

Explicación de la aplicación de análisis

- 55 El aparato y los materiales pueden usarse para analizar en busca diversos patógenos y microorganismos, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Un ejemplo es analizar para GBS, tal como se describe adicionalmente en el ejemplo 14. Los análisis pueden ser realizados en el entorno cercano al paciente por facultativos que no estén formados exhaustivamente en procedimientos de laboratorio. Una rutina de CC puede estar incorporada en la interfaz del usuario del sistema para proporcionar Garantía de Calidad continua para el análisis de GBS. El análisis también puede realizarse en un laboratorio de estadística de un hospital central, siempre
- 60 que el análisis de la muestra se produzca dentro del periodo de tiempo requerido por el facultativo que solicita el análisis.

Advertencias y precauciones ejemplares

- 65 Otras advertencias y precauciones específicas de GBS se presentan en el ejemplo 14.

- En algunas realizaciones, si un paciente está siendo tratado actualmente con antibióticos, el análisis puede ser un indicador no fiable de una patología.
- Normalmente, evitar el uso del kit de cartucho/muestra más allá de la fecha de caducidad.
- Normalmente, evitar usar un cartucho que se abrió previamente. La exposición al aire y la humedad puede degradar los reactivos. Evitar abrir el cartucho hasta después de que la muestra esté lista para inyectarla.
- Normalmente, usar nuevos materiales de jeringa para la preparación de las muestras.
- Normalmente, usar los hisopos y el tampón proporcionados en el kit de análisis. En algunas realizaciones, otras marcas de hisopos de recogida pueden interferir en el rendimiento del análisis
- Cuando un espécimen debe almacenarse, refrigeración a 4 °C durante un periodo de hasta 24 horas está indicada normalmente.
- Normalmente, usar prendas protectoras y guantes desechables mientras se manipulan los componentes del sistema y el espécimen.
- Normalmente, usar una técnica aséptica. Puede ser especialmente importante usar nuevos guantes desechables para evitar la contaminación del espécimen de análisis o los materiales de análisis.
- Normalmente, evitar inyectar la muestra con presión elevada. Se prefiere inyección suave.
- Normalmente, manipular especímenes usando precauciones universales de acuerdo con procedimientos hospitalarios seguros para especímenes potencialmente infecciosos.
- Normalmente, usar agentes de limpieza recomendados cuando se limpia el sistema.
- Normalmente, evitar limpiar el cartucho de análisis con cualquier producto químico de limpieza si se producen derrames. Si fuera necesario, usar un pañuelito de laboratorio seco para retirar los líquidos.

Condiciones de almacenamiento y estabilidad típicas

Descripción del producto	Condición de uso/almacenamiento	Estabilidad	Condición de transporte
Sistema	15-35 °C, intervalo operativo	NA	-10 °C a 65 °C
Kits de muestreo de GBS	4-40 °C. No congelar.	Fecha de caducidad	Temp > 4 °C
Espécimen del Paciente o CC en tampón (húmedo)	a 15-30 °C	8 horas	
Espécimen del paciente o CC en tampón (húmedo)	a 4 °C	24 horas	
Espécimen del paciente en recipiente (seco)	a 15-30 °C	24 horas	
Espécimen del paciente en recipiente (seco)	a 4 °C		
GBS cartuchos sin abrir	4-30 °C. No congelar,	Fecha de caducidad	Temp > 4 °C
GBS cartuchos sin abrir	No usar.	60 minutos máximo	
GBS Kits de control	15-30 °C	Fecha de caducidad	Protección TBD

Recogida de especímenes ejemplar

- Precaución: Evitar tocar el extremo de Dacron® del hisopo con los dedos.
- Retirar el hisopo del envase
- Limpiar el exceso de secreciones vaginales.
- Insertar el hisopo 2 cm en la vagina (pase frontal).
- Insertar el mismo hisopo 1 cm en el ano (pase posterior)
- Colocar el hisopo en el envase de transporte si se almacena en seco.

Preparación de especímenes ejemplar

- Usar una técnica aséptica cuando se manipulan materiales de análisis y el espécimen.
- Confirmar que el tampón de muestra no ha caducado.
- Sumergir el hisopo vigorosamente 20 veces en el vial que contiene 1 cc de tampón
- Retirar y desechar el hisopo.
- Etiquetar el vial con la ID del paciente y la hora de recogida, si se requiere mediante procedimiento clínico estándar.
- Precaución: evitar abrir el envase del cartucho hasta estar listo para usarlo. Los reactivos incluidos pueden ser sensibles a la luz y la humedad.

Instrucciones de manejo del sistema ejemplares

- Se puede mostrar la pantalla de sistema preparado.
- Tocar la pantalla para detener el salvapantallas.
- 5 • Levantar el asa y abrir la tapa del sistema para comenzar.
- Un autoanálisis del sistema puede comenzar una vez que la tapa está completamente abierta y un indicador de “abierto”, si está presente, está encendido.
- Inspeccionar el sistema para cualesquiera cartuchos usados restantes de un análisis previo.
- Iniciar sesión con la ID de usuario y contraseña.
- 10 • Escanear el código de barras del vial de recogida de muestras.
- Abrir el cartucho de análisis. Escanear el código de barras del cartucho.
- El sistema puede presentar un mensaje de error si los materiales han caducado y/o si el vial de espécimen y los materiales de análisis no están emparejados apropiadamente
- Confirmar la ID de la muestra con información del paciente.
- 15 • Introducir la ID del paciente y otra información identificativa hospitalaria, si se solicita.

Instrucciones ejemplares para transferir la muestra al cartucho:

- Ponerse un nuevo par de guantes.
- 20 • Colocar el vial de muestra en el contador.
- Unir la punta a la jeringa. Extraer toda la muestra al interior de la jeringa. Extraer 2 cc adicionales de aire a la jeringa.
- Retirar la punta y unir el filtro.
- Inyectar 1 cc de muestra en el cartucho usando la jeringa y 2 cc adicionales de aire.
- 25 • Precaución: usar presión suave para inyectar la muestra para evitar salpicaduras desde la muestra.
- Instrucciones ejemplares para realizar el análisis:
- Agitar suavemente el cartucho atrás y adelante hasta que los microgránulos se disuelvan.
- Colocar el cartucho en el sistema
- Cerrar la cubierta del sistema
- 30 • (El análisis puede comenzar inmediatamente)
- Resultados
- Cuando el análisis está completo, los resultados pueden estar disponibles para visualización o impresión.
- Desechado de materiales: El cartucho y el kit de recogida usados pueden tratarse como riesgo biológico

35 Preparación de los materiales para el envío

El cartucho debe envasarse normalmente en materiales protectores contra riesgo biológico tal como se describe mediante las Normas Internacionales.

40 Procedimiento de limpieza ejemplar para el sistema

Una solución de lejía al 10 % (hipoclorito sódico al 0,5 %), seguida por un aclarado con agua limpia puede usarse para desinfectar, así como para reducir la potencia de contaminación con ADN.

45 La contaminación con ADN puede conseguirse normalmente limpiando con lejía o materiales adecuados para eliminar la contaminación con ADN. También pueden usarse eliminadores de ácido nucleico Chemicon™ después de limpiar con desinfectantes ordinarios.

50 Normalmente, alcohol o toallitas sanitarias ordinarias no reducirán la contaminación con ADN del instrumento.

Verificación del lote de reactivo ejemplar

Propósito - evaluación de los lotes del cartucho y el kit de muestra y verificación del rendimiento total del sistema.

55 Recomendación: tras la recepción de un nuevo lote de cartuchos o kits de muestra, puede ejecutarse un conjunto de control de calidad para confirmar, por ejemplo, si el conjunto de reactivos incluye (1) control externo y (1) control externo negativo.

Rutina de control de calidad ejemplar

60 El control positivo externo sirve para monitorizar y calibrar la sensibilidad de las etapas de preparación del espécimen y el ensayo, y puede usarse para minimizar el riesgo de resultados falsos negativos. Si el análisis falla, puede invalidar los resultados de ese lote de cartuchos, y se debe notificar la fabricante.

Propósito - verificación del rendimiento total del sistema que incluye evaluación de técnica de manipulación de la muestra. El análisis puede realizarse a un intervalo preestablecido seleccionado por el usuario.

5 Recomendación: cuando se realiza el análisis, ejecutar un conjunto de CC que incluye (1) Control externo positivo y (1) Control externo negativo, si el análisis de CC no consigue proporcionar los resultados esperados, hay que ponerse en contacto con el fabricante.

Instrucciones de rutina de control de calidad ejemplares

10 ■ Ir a la pantalla de control de calidad
 ■ Introducir la ID del usuario
 ■ Seleccionar verificación de la técnica de CC, Nuevo lote de reactivo, ejecutar CC diario en las muestras tal como se indica en las pantallas.

15 Autoanálisis del sistema

El sistema puede realizar un análisis de inicio del sistema cuando se le suministra energía. Como rutina de arranque de cada muestra de análisis del paciente o muestra de CC, el sistema puede ejecutar un autoanálisis para determinar, por ejemplo, que los componentes electrónicos, el sistema óptico, calefactores y sensores de temperatura están funcionando como debieran.

Controles internos ejemplares (en el cartucho)

25 Reactivos que pueden usarse en el ensayo pueden estar incluidos en el cartucho para reducir el potencial de errores de manipulación del usuario y contaminación. Dos tipos de estrategias de controles positivo y negativo en el cartucho pueden estar incorporadas dentro de cada cartucho microfluidico para monitorizar el rendimiento del ensayo de PCR individual. Dos ejemplos son:

30 **1) Plásmido de control interno positivo (ICP):** un plásmido de control interno puede proporcionar un control de la integridad de los reactivos de ensayo de PCR así como ser un indicador de la presencia de sustancias inhibitoras de PCR en el espécimen, es decir puede ser un control para resultados falsos negativos. Durante el termociclado, la amplificación de esta región puede producir una señal fluorógena distinta en ambos carriles de PCR. El fallo en amplificar la secuencia de control interno, en ausencia de una muestra positiva, puede ser indicativo de un fallo de la mezcla de reactivos o la presencia de inhibidores de PCR en el espécimen. Esto puede invalidar los resultados del análisis tal como se indica mediante un código de error en el instrumento. "IND" puede visualizarse para notificar un resultado indeterminado.

40 **2) Carril de PCR de control interno negativo:** Un carril paralelo puede usarse para ejecutar una segunda PCR con reactivos de la misma mezcla sin ninguna muestra. Esto puede proporcionar un control contra resultados falsos positivos debido a la contaminación de los reactivos. Un resultado fallido en el carril de control negativo puede invalidar el resultado y puede ser indicado por un código de error en el instrumento. "IND" puede visualizarse para notificar un resultado indeterminado.

45 PCR en tiempo real ejemplar para detección de ADN de GBS

En diversas realizaciones, el análisis puede usar reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la amplificación de secuencias de un gen *cfb* de GBS recuperadas de muestras clínicas e hibridación específica de diana fluorógena para la detección del ADN amplificado. El gen *cfb* codifica el factor CAMP, una proteína extracelular difundible que está presente normalmente en aislados de GBS. El análisis de detección de Streptococcus del grupo B (GBS) también puede ser un tipo integrado, de muestra sin procesar a resultado, de ensayo de amplificación de ácido nucleico. Una sonda fluorógena TaqMan puede usarse para detectar los amplicones de PCR. Los reactivos usados en el ensayo pueden estar incluidos en el cartucho para reducir el potencial de errores de manipulación del usuario y contaminación.

55 Precauciones potenciales ejemplares

En algunas realizaciones, el sistema de análisis puede no estar cualificado para identificar dianas tales como ADN de GBS, en especímenes diferentes de especímenes vaginales y/o rectales. Los especímenes de orina y sangre pueden no estar cualificados.

60 En algunas realizaciones, un paciente sometido a un tratamiento con antibióticos puede no ser capaz de obtener un correcto diagnóstico con este u otros análisis de diagnóstico.

65 En algunas realizaciones, el análisis puede no producir un cultivo de GBS adecuado para identificación directa de las bacterias por un microbiólogo. En algunas realizaciones, el análisis puede no proporcionar resultados de susceptibilidad que son necesarios para recomendar un tratamiento para personas alérgicas a penicilina.

Sustancias interferentes potenciales ejemplares

En algunas realizaciones, orina y secreciones vaginales si están presentes en cantidades muy grandes, pueden interferir en el análisis.

5 Normalmente, no es probable que contaminantes de las muestras tales como contaminación con sangre, meconio, y líquido amniótico interfieran en el análisis.

10 Normalmente, en este momento no se conoce que la interferencia por fármacos (tales como los presentes en secreciones vaginal y rectal), diferentes de antibióticos, interfiera en la PCR.

Características e interpretación de rendimiento ejemplares

15 El diagrama de flujo en la figura 71 perfila un conjunto ejemplar de criterios que pueden ser usados por el algoritmo de decisión en el instrumento para interpretar los resultados. Las reacciones de PCR (Muestra y Control) pueden ser interpretadas como positivas o negativas para la diana en cuestión. Un algoritmo lógico puede usarse para determinar si la muestra es definitivamente Positiva o Negativa o Indeterminada.

Sustancias que reaccionan de forma cruzada ejemplares

20 Al especificidad de los cebadores y las sondas puede analizarse con PCR en tiempo real (ensayo Taqman) usando ADN genómicos aislados de los siguientes organismos: nueve serotipos de GBS (serotipo Ia, 1b, Ic, II, III, IV, V, VI y VII; *American Type Culture Collection* y *National Center for Streptococcus*, Canadá); 10 aislados de GBS clínicos; 60 muestras clínicas; una amplia variedad de cepas bacterianas gram-positivas y gram-negativas así como dos cepas de levadura y VRS de tipo 1 y 2.

Microorganismos ejemplares

PATÓGENO	Tipo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacterias Gram -
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacterias Gram -
<i>Kiebsiella oxytoca</i>	Bacterias Gram -
<i>Kiebsiella pneumoniae</i>	Bacterias Gram -
<i>Escherichia coli</i> (aislado clínico 1)	Bacterias Gram -
<i>Escherichia coli</i> (aislado clínico 2)	Bacterias Gram -
<i>Acinetobacter baumannnd</i>	Bacterias Gram -
<i>Serra. marcescens</i>	Bacterias Gram -
<i>Entembacter aerogenes</i>	Bacterias Gram +
<i>Enterococcus Maclean</i>	Bacterias Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i> (aislado clínico 1)	Bacterias Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i> (aislado clínico 2)	Bacterias Gram +
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bacterias Gram +
<i>Streptococcus viridans</i>	Bacterias Gram +
<i>Listena monocytogenes</i>	Bacterias Gram +
<i>Enterococcus sps.</i>	Bacterias Gram +
<i>Cendida glabrata</i>	Levadura
<i>Candida albicans</i>	Levadura
<i>Streptococcus Grupo C</i>	Bacterias Gram +
<i>Streptococcus Grupo G</i>	Bacterias Gram +
<i>Streptococcus Grupo F</i>	Bacterias Gram +
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacterias Gram +
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bacterias Gram +
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (C-)	Bacterias Gram +
<i>Gardenerella vaginalis</i>	Bacterias Gram +
<i>Micrococcus spa</i>	Bacterias Gram +
<i>Haemophilus influenza</i> °	Bacterias Gram -
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Bacterias Gram -
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Bacterias Gram -

PATÓGENO	Tipo
<i>Salmonella sps.</i>	Bacterias Gram -
<i>Chlamytha trachomatis</i>	Bacterias Gram -
<i>Peptostreptococcus product.</i>	Bacterias Gram +
<i>Peptostreptococcus anaerobe.</i>	Bacterias Gram +
<i>Lactobacillus lennenum</i>	Bacterias Gram +
<i>Eubacterium lentum</i>	Bacterias Gram +
<i>Virus herpes simple I (VHS I)</i>	Virus
<i>Virus herpes simple II (VHS II)</i>	Virus

Diagrama de solución de problemas ejemplar

Problema	Posible Causa	Posible acción
El control positivo lee un resultado negativo. Ninguna otra indicación.	Muestra no procesada adecuadamente.	Revisar el método de muestreo. Analizar de nuevo.
	Lisis a granel no realizada, reactivos degradados.	Analizar un nuevo lote de cartucho. Revisar la ubicación de almacenamiento del cartucho (<30C). Contactar con HandyLab.
El control negativo lee un positivo. Ninguna otra indicación.	Contaminación	Limpiar el Instrumento. Revisar el método de muestreo. Analizar de nuevo.
Error: IND (resultado indeterminado-fallo de CI)	Fallo de CI, PCR no realizada.	Analizar un nuevo lote de cartuchos.
Error: IND (resultado indeterminado)	Resultado limítrofe – CI superado.	Analizar de nuevo con nueva muestra del paciente.

5 Ejemplo 14: Manual del operador para aparato para el procesamiento de polinucleótidos

Este ejemplo no limitante describe, en forma de instrucciones para el usuario, diversas realizaciones del aparato, cartucho microfluídico, kit, métodos, y producto de programa informático reivindicados, en particular dirigidos a un cartucho microfluídico para uso en un ensayo de PCR microfluídico que incluye la detección cualitativa de microorganismos tales como Streptococcus del grupo B.

La presencia de Estreptococos del grupo B (GBS) sigue siendo una causa principal de infección neonatal grave a pesar del gran avance en la prevención desde los años 1990 con sepsis, neumonía, y meningitis que afectan al bebé después del nacimiento. El sistema de análisis de GBS puede usarse para la detección cualitativa rápida de ADN de Streptococcus del grupo B (GBS) en muestras vaginales/rectales.

Uso ejemplar e indicaciones para uso

En diversas realizaciones, el sistema de análisis de GBS puede usarse para la detección cualitativa y rápida de microorganismos en muestras clínicas, tales como ADN de Streptococcus del grupo B (GBS) en muestras vaginales/rectales.

Las indicaciones para uso típicas del análisis de GBS incluyen, por ejemplo, un análisis de cribado rápido en el régimen de atención prenatal para la paciente de maternidad para determinar la necesidad de tratamiento con antibiótico durante el parto, tal como se describe mediante las directrices del CDC (*Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guideline from CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 16 de agosto de 2002; 51 (N.º RR-11); 1-24). El análisis puede proporcionar resultados rápidos en el centro de atención o en un laboratorio central con servicio de entrega de resultado rápida durante la fase de intraparto y preparto del paciente de maternidad. El análisis también puede usarse para detectar ADN de GBS en muestras vaginales o rectales de cualquier sujeto del que se sospecha que tiene infección por GBS. Véase también Mark A. Bums, Brian N. Johnson, Sundares N. Brahmasandra, Kalyan Handique, James R. Webster, Madhavi Krishnan, Timothy S. Sammarco, Piu M. Man, Darren Jones, Dylan Heldsinger, Carlos H. Mastrangelo, David T. Burke “An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device” *Science*, Vol. 282, 16 de octubre de 1998.

35 Explicación de la aplicación del análisis

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades recomienda cribado prenatal universal para colonización por GBS vaginal/rectal de todas las mujeres a las 35-37 semanas de gestación con el fin de determinar la necesidad de antibióticos profilácticos durante el parto y el alumbramiento. La actual recomendación del CDC es el método de

análisis basado en cultivo (Método de cultivo estándar), cuyos resultados están normalmente disponibles en 48-72 horas, en comparación con aproximadamente 30 minutos para el presente análisis. En análisis puede utilizar preparación de muestras automatizadas y PCR en tiempo real para identificar el gen *cfb* en el genoma de GBS que es una secuencia de identificación establecida que codifica el factor CAMP. El factor CAMP es una proteína extracelular normalmente presente en aislados de GBS. El factor CAMP puede usarse para la identificación creíble de bacterias GBS en muestras clínicas mediante el método de cultivo. Este análisis puede realizarse en el entorno cercano al paciente por facultativos que no están formados exhaustivamente en procedimientos de laboratorio. Una rutina de CC puede incorporarse en la interfaz del usuario para proporcionar Garantía de Calidad continua para el análisis de GBS. El análisis también puede realizarse en un laboratorio estadístico de hospital central siempre que el análisis de la muestra se produzca dentro del periodo de tiempo requerido por el departamento de maternidad.

Posibles contraindicaciones

El análisis de GBS puede estar contraindicado para personas con alergia al poliéster contenido en el hisopo de recogida de especímenes.

Advertencias y precauciones ejemplares

Las advertencias en el presente documento pueden ser adicionales a las de aplicación general mostradas en el ejemplo 13, en el presente documento.

- El análisis de GBS puede no proporcionar resultados de susceptibilidad que se recomiendan para mujeres alérgicas a la penicilina.
- Puesto que normalmente es necesario empezar con los antibióticos IV al menos 4 horas antes del parto, y en ausencia de datos de GBS preparto, puede ser importante recoger muestras y empezar el análisis de GBS en cuanto sea posible después de que la paciente entra en la zona de Parto y Alumbramiento del hospital.
- En algunas realizaciones, si una paciente está siendo tratada actualmente con antibióticos, el análisis puede ser un indicador no fiable de patología.
- El tampón puede contener azida sódica como conservante. Supone un riesgo para la salud si es ingerida.
- Normalmente, análisis el espécimen en el plazo de, por ejemplo, 8 horas desde el muestreo y almacenamiento en el tampón. En la situación en la que un espécimen debe almacenarse, puede usarse refrigeración a 4 °C durante un periodo de hasta 24 horas.
- Normalmente, evitar el uso de los materiales de análisis más allá de la fecha de caducidad.
- Normalmente, evitar abrir el cartucho hasta después de que la muestra está lista para ser inyectada. Normalmente, evitar usar un cartucho si la bolsa metalizada protectora está abierta. En algunas realizaciones, la exposición a la luz, el aire y la humedad puede degradar los reactivos.
- Normalmente, usar hisopos, jeringa y tampón proporcionados en el kit de análisis. En algunas realizaciones, otras marcas de hisopo de recogida de GBS pueden interferir en el rendimiento del análisis.
- Normalmente, los materiales son solamente de un solo uso; reutilizar los materiales pueden dar resultados erróneos.
- Evitar abrir el envase del cartucho hasta estar listo para el análisis. Los reactivos incluidos pueden ser sensibles a la luz y la humedad. Evitar usar si el sello del envase está roto y la bolsa de papel metalizado ya no está expandido (hinchada).

Kit de recogida de muestras ejemplar

- A. Hisopo
- B. Tubos que contienen tampón de recogida de muestras.
- C. Puntas de cánula
- D. Jeringas (por ejemplo, de 3 cc)
- E. Filtros de jeringa
- F. Cartucho microfluídico de GBS

Instrucciones de recogida de especímenes y suspensión en tampón ejemplares

- Precaución: Normalmente, usar solamente el kit de recogida; evitar tocar el extremo del hisopo con los dedos.
- Retirar el hisopo del envase.
- Limpiar el exceso de secreciones vaginales.
- Insertar el hisopo 2 cm en la vagina (pase frontal).
- Insertar el mismo hisopo 1 cm en el ano (pase posterior).
- Confirmar que el vial de tampón de muestra (B) no ha caducado.
- Sumergir el hisopo (A) vigorosamente arriba y abajo 20 veces en el vial que contiene tampón.
- Retirar y desechar el hisopo.
- Etiquetar el vial con información de ID del paciente

Preparación ejemplar de muestras para análisis

- La punta de la cánula (C) puede unirse a la jeringa (D)
- Extraer parte o toda la muestra al interior de la jeringa.
- 5 • Se puede extraer aire adicional (por ejemplo, 2 ml).
- La punta de la cánula (C) puede sustituirse por el filtro (E).
- El envase del cartucho puede abrirse en los puntos de desgarro marcados en el envase.
- Los códigos de barras del vial de muestra (B) y el cartucho (F) pueden escanearse con el escáner del sistema. El sistema puede avisar si los materiales han caducado.
- 10 • La información de identificación del paciente puede introducirse, en caso necesario.
- Se puede disponer el cartucho sobre la superficie plana o sostenerlo plano con Luer en posición vertical. Normalmente, asegurarse de que el cartucho permanece con el lado de la etiqueta hacia arriba durante el procedimiento.
- 15 • La muestra (incluyendo el exceso de aire) puede inyectarse en el cartucho usando el conjunto de jeringa/filtro. Puede usarse presión de inyección suave para evitar salpicaduras desde la muestra.
- El conjunto de jeringa/filtro puede retirarse del cartucho.
- El cartucho puede agitarse suavemente de un lado a otro aproximadamente 10 veces hasta que los microgránulos dentro de la cámara de muestra se disuelvan y se mezclen.
- 20 • El cartucho puede colocarse en el sistema
- La cubierta del sistema puede cerrarse y el asa puede bloquearse en posición baja. (El análisis puede comenzar automáticamente)

Resultados

- 25 Cuando el ensayo está completo, los resultados pueden visualizarse claramente. Los resultados pueden imprimirse o almacenarse según lo determinado mediante procedimientos de laboratorio.

Desechado ejemplar de materiales

- 30 El cartucho y el kit de recogida deben tratarse como riesgo biológico.

Rutina de control de calidad de laboratorio recomendada ejemplar

Verificación del análisis ejemplar

- 35 A intervalos semanales, se pueden ejecutar (1) control externo positivo y (1) control externo negativo. Un conjunto de CC para confirmar el rendimiento total del sistema. Este procedimiento también está recomendado cuando se forman nuevos usuarios.

Indicaciones de rutina de control de calidad ejemplares:

- 40 Pueden analizarse muestras tal como se indica en las pantallas de visualización. Si un análisis de CC no consigue producir los resultados esperados, se puede contactar con el fabricante.
- 45 El control positivo externo puede incluir una alícuota liofilizada de células de *Streptococcus agalactiae* (GBS) que se reconstituyen en el momento de ejecución del análisis con tampón de recogida de muestras. El número de células de GBS en el control positivo externo puede ser aproximadamente igual al límite mínimo detectable (LMD) del análisis.
- 50 Análisis de control de calidad ejemplares también incluyen un CC de autoanálisis del sistema, tal como se describe en el ejemplo 14.

Controles internos (en cartucho) ejemplares

- 55 Reactivos típicos para el ensayo pueden estar incluidos en el cartucho para reducir el potencial de errores de manipulación del usuario y contaminación. Dos tipos de estrategias de control positivo y negativo en cartucho pueden estar incorporados dentro de cada cartucho microfluídico, para monitorizar el rendimiento de ensayos de PCR individuales.
- 60 Un plásmido de control interno positivo ejemplar para GBS es una molécula de ADN circular bicatenaria que contiene una región de 96 pb compuesta por una única secuencia de ADN de 39 pb flanqueada por las secuencias directa e inversa del gen *cfb*, puede estar incluido en la mezcla maestra liofilizada junto con una segunda sonda fluorógena distinta específica para esta secuencia única. El fallo en amplificar la secuencia de control interno, en ausencia de una muestra de GBS positiva, puede ser indicativo de un fallo de la mezcla de reactivos o la presencia de inhibidores de PCR en el espécimen.
- 65

PCR en tiempo real ejemplar para la detección de ADN de GBS

El análisis puede utilizar reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la amplificación de una secuencia del gen *cfb* de GBS recuperada de muestras clínicas. Una sonda Taqman® específica de diana fluorógena puede usarse para la detección del ADN amplificado. El gen *cfb* codifica el factor CAMP, una proteína extracelular difundible que normalmente está presente en aislados de GBS. El análisis de detección de Streptococcus del grupo B (GBS) puede ser un tipo integrado, de muestra sin procesar a resultado de ensayo de amplificación de ácido nucleico. Los reactivos típicos para el ensayo pueden estar incluidos en el cartucho para reducir el potencial de errores de manipulación del usuario y contaminación cruzada.

Posibles limitaciones del análisis ejemplares

En algunas realizaciones, el sistema de análisis puede no estar cualificado para identificar ADN de GBS en especímenes diferentes de especímenes vaginales/rectales. Por ejemplo, especímenes de orina y de sangre pueden no estar cualificados en algunas realizaciones.

En algunas realizaciones, una paciente sometida a tratamiento con antibióticos puede no ser capaz de obtener un correcto diagnóstico de GBS.

En algunas realizaciones, el análisis puede no producir un cultivo de GBS adecuado para identificación directa de las bacterias por un microbiólogo.

Características de rendimiento e interpretación ejemplares

El 10-30 % de las mujeres embarazadas están colonizadas con GBS. Se determina que el límite de colonización de GBS es aproximadamente 1000 copias de ADN/muestra determinadas mediante amplificación de la secuencia del gen *cfb*. El usuario es remitido al diagrama de flujo de la figura 71 para aplicación de criterios ejemplares para interpretación del resultado, donde la diana en cuestión es GBS y plásmido de CI.

Posibles sustancias interferentes ejemplares

En algunas realizaciones, orina o secreciones vaginales, o moco, si está presente en grandes cantidades, pueden interferir en el análisis.

En algunas realizaciones, no es probable que la contaminación de las muestras con sangre, meconio, o líquido amniótico interfiera en el ensayo.

En algunas realizaciones, en este momento no se conoce que la interferencia por fármacos (tales como los presentes en secreciones vaginal y rectal), diferentes de antibióticos, interfiera en la PCR.

Interpretación de resultados y valores ejemplares esperados

El 10-30 % de las mujeres embarazadas pueden estar colonizadas con GBS. Se puede determinar que el límite de colonización por GBS es aproximadamente 1000 copias de ADN/muestra, determinado mediante amplificación de la secuencia del gen *cfb*.

Las reacciones de PCR pueden interpretarse como positivas o negativas para GBS y control interno. Un algoritmo lógico puede usarse para determinar si la muestra es Positiva o Negativa o Indeterminada.

Información de almacenamiento y estabilidad

Descripción	Condición de uso/almacenamiento	Estabilidad
Espécimen de la paciente en tampón (húmedo)	a 15-30 °C	8 horas
Espécimen de la paciente en tampón (húmedo)	a 4 °C	24 horas
Espécimen de la paciente (almacenamiento en seco)	a 15-30 °C	24 horas
Cartuchos de GBS –sin abrir	4-30 °C	Fecha de caducidad
Cartuchos de GBS –abiertos	No usar.	60 minutos máx.

Se han descrito una serie de realizaciones de la tecnología. No obstante, se entenderá que pueden realizarse diversas modificaciones sin alejarse del espíritu y del alcance de la tecnología. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Las realizaciones de la invención pueden describirse con referencia a las siguientes oraciones numeradas, con características preferentes establecidas en las oraciones dependientes:

1. Un aparato, que comprende:

una bahía receptora configurada para recibir un cartucho microfluídico insertable;
al menos una fuente de calor térmicamente acoplada al cartucho y configurada para aplicar calor a una o varias
5 regiones seleccionadas del cartucho en uno o varios momentos seleccionados, para:

crear una microgota de una muestra biológica que contenga polinucleótidos en el cartucho; hacer que las
microgotas se muevan entre una o varias posiciones sobre el cartucho microfluídico; lisar células, donde esté
10 presente la muestra biológica, liberando así los polinucleótidos de las células; preparar uno o varios
polinucleótidos de amplificación; y amplificar uno o varios de los polinucleótidos;

un detector configurado para detectar la presencia de uno o varios polinucleótidos amplificados; y
un procesador acoplado al detector y al menos una fuente de calor, donde el procesador está configurado para
15 controlar la aplicación de calor en una o varias regiones seleccionadas del cartucho microfluídico en uno o varios
momentos seleccionados.

2. El aparato de la oración 1, que comprende, además, un miembro de registro que es complementario al cartucho
microfluídico, por lo que la bahía receptora recibe el cartucho microfluídico en una única orientación.

3. El aparato de la oración 1, que comprende, además, un sensor acoplado al procesador, el sensor configurado
20 para detectar si se recibe el cartucho microfluídico.

4. El aparato de la oración 1, donde el detector es un detector óptico.

5. El aparato de la oración 4, donde el detector óptico comprende una fuente de luz que emite una luz en una banda
de absorción de un tinte fluorescente y un detector de luz que detecta luz en una banda de emisión de tinte
25 fluorescente, donde el tinte fluorescente se une a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de la
misma.

6. El aparato de la oración 5, donde el detector óptico emite luz de manera selectiva en la banda de absorción y el
30 tinte fluorescente, y detecta selectivamente luz en la banda de emisión del tinte fluorescente.

7. El aparato de la oración 1, donde el procesador se puede programar para hacer operar el detector para detectar
un polinucleótido o una sonda del mismo en el cartucho microfluídico recibido en la bahía receptora.

8. El aparato de la oración 1, donde la al menos una fuente de calor comprende al menos dos fuentes de calor de
contacto, donde las fuentes de calor de contacto están configuradas cada una para acoplarse térmicamente de
40 manera independiente a una región seleccionada diferente del cartucho microfluídico, por lo que las diferentes
regiones seleccionadas se calientan de manera independiente.

9. El aparato de la oración 8, donde al menos una de las fuentes de calor de contacto se selecciona desde un
calentador resistivo, un radiador, un intercambiador de calor microfluídico, y un dispositivo Peltier.

10. El aparato de la oración 8, donde las fuentes de calor de contacto están configuradas para estar en contacto
45 físico directo con las regiones seleccionadas del cartucho microfluídico recibido en la bahía receptora.

11. El aparato de la oración 10, donde al menos una de las regiones seleccionadas del cartucho tiene un área en
contacto con al menos una fuente de aproximadamente 1 mm^2 y aproximadamente 225 mm^2 .

12. El aparato de la oración 11, donde el área está entre aproximadamente 1 mm^2 y aproximadamente 100 mm^2 .

13. El aparato de la oración 8, que comprende, además, una capa compatible en al menos dos fuentes de calor de
contacto, donde la capa compatible está configurada para acoplar térmicamente la fuente de calor de contacto con
55 una o varias regiones seleccionadas del cartucho microfluídico recibido en la bahía receptora.

14. El aparato de la oración 13, donde la capa compatible tiene un espesor de entre aproximadamente 0,05 y
aproximadamente 2 milímetros y una dureza de Shore de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 100.

15. El aparato de la oración 1, donde al menos una fuente de calor es una capa resistiva.

16. El aparato de la oración 1, que comprende, además, una fase de calentamiento configurada para poder
60 desmontarse del aparato donde al menos una dicha fuente de calor está ubicada en la fase de calentamiento.

17. El aparato de la oración 1, que comprende, además, una tapa en la bahía receptora, siendo la tapa operable
65 para excluir al menos parcialmente la luz ambiental de la bahía receptora.

18. El aparato de la oración 17, donde la tapa es una tapa deslizante.
19. El aparato de la oración 17, donde la tapa comprende el detector.
- 5 20. El aparato de la oración 17, donde una cara principal de la tapa está en contacto con el cartucho microfluídico.
21. El aparato de la oración 20, donde la cara principal de la tapa en contacto con el cartucho microfluídico varía de planaridad en menos de aproximadamente 100 micrómetros.
- 10 22. El aparato de la oración 17, donde la tapa está configurada para ser desmontable del aparato.
23. El aparato de la oración 17, donde la tapa comprende un miembro de retención.
24. El aparato de la oración 1, que comprende, además, uno o varios miembros de fuerza configurados para aplicar fuerza a al menos una porción de un cartucho microfluídico recibido en la bahía receptora.
- 15 25. El aparato de la oración 24, donde el uno o varios miembros de fuerza están configurados para aplicar fuerza para acoplar térmicamente la al menos una bomba de calor a al menos una porción del cartucho microfluídico.
- 20 26. El aparato de la oración 24, donde el uno o varios miembros de fuerza están configurados para hacer operar un miembro mecánico en el cartucho microfluídico.
27. El aparato de la oración 26, donde el miembro mecánico es un depósito perforable.
- 25 28. El aparato de la oración 24, donde el uno o varios miembros están configurados para aplicar fuerza a una pluralidad de ubicaciones en el cartucho microfluídico.
29. El aparato de la oración 24, donde la fuerza aplicada por el uno o varios miembros de fuerza da como resultado en una presión promedio en una interfaz entre una porción de la bahía receptora y una porción del cartucho microfluídico de entre aproximadamente 5 kilopascales y aproximadamente 50 kilopascales.
- 30 30. El aparato de la oración 29, donde la presión promedio es al menos aproximadamente 14 kilopascales.
31. El aparato de la oración 24, donde al menos un miembro de fuerza se hace operar manualmente.
- 35 32. El aparato de la oración 24, donde al menos un miembro de fuerza se acopla mecánicamente a una tapa en la bahía receptora, por lo que la operación de la tapa opera el miembro de fuerza.
33. El aparato de la oración 1, que comprende, además, al menos un dispositivo de entrada acoplado al procesador, siendo el dispositivo de entrada seleccionado del grupo que consiste en un teclado, una superficie sensible al tacto, un micrófono, un trackpad, un escáner de retina, un lector de huellas dactilares, y un ratón.
- 40 34. El aparato de la oración 1, que comprende, además, un medio de almacenamiento de datos configurado para recibir datos desde uno o varios de entre un procesador, un dispositivo de entrada, y una interfaz de comunicación, estando el medio de almacenamiento seleccionado del grupo que consiste en: una unidad de disco duro, una unidad de disco óptico, una tarjeta flash, y un CD-Rom.
- 45 35. El aparato de la oración 1, que comprende, además, una interface de comunicación acoplada al procesador, estando la interfaz de comunicación selecciona entre el grupo que consiste en: una conexión en serie, una conexión en paralelo, una conexión de red inalámbrica, una conexión de red cableada.
- 50 36. El aparato de la oración 1, que comprende, además, al menos un identificador de muestra acoplado al procesador, estando el identificador de muestra selecciona de entre: un lector óptico de caracteres, un lector de código de barras, y un lector de etiquetas de frecuencia de radio.
- 55 37. El aparato de la oración 27, donde el identificador de muestra es un lector de código de barras de mano.
38. El aparato de la oración 1, que comprende, además, al menos un dispositivo de salida acoplado al procesador, estando el dispositivo de salida seleccionado de entre una pantalla visual, una impresora, y un altavoz.
- 60 39. El aparato de la oración 1, donde los polinucleótidos se amplifican por un método seleccionado de entre el grupo que consiste en: reacción en cadena de polimerasa; TMA; SDA; NASBA; LCR; y Amplificaciones de Ciclo de Balanceo.
- 65 40. El aparato de la oración 1, donde el cartucho está configurado para:

- recibir una cantidad de muestra biológica que contenga uno o varios polinucleótidos; crear una microgota de muestra biológica;
 lisar células, donde esté presente la muestra biológica, liberando así los polinucleótidos de las células;
 preparar uno o varios polinucleótidos de amplificación;
 5 y amplificar uno o varios de los polinucleótidos; y
 permitir la detección de uno o varios polinucleótidos amplificados.
41. El aparato de la oración 1, donde el cartucho comprende: cantidades suficientes de uno o varios reactivos para:
 10 lisar células en la muestra;
 preparar los polinucleótidos para la amplificación; y amplificar los polinucleótidos.
42. El aparato de la oración 41, donde los reactivos se mantienen en uno o varios recipientes de retención de reactivos.
 15
43. El aparato de la oración 41, donde uno o varios de los reactivos se mantienen en una cámara o canal microfluídicos.
44. El aparato de la oración 1, donde el cartucho comprende: uno o varios componentes microfluídicos configurados para actuar sobre volúmenes microfluídicos de muestra que contiene polinucleótido antes, durante y después de la amplificación de uno o varios polinucleótidos de la muestra, estando el uno o varios componentes microfluídicos seleccionados de un grupo que consiste en: uno o varios canales configurados para permitir el paso de los volúmenes microfluídicos; uno o varios accionadores configurados para mover los volúmenes microfluídicos; una o varias cámaras configuradas para mantener los volúmenes microfluídicos; y uno o varios componentes configurados para inhibir el movimiento de los volúmenes microfluídicos.
 20
 25
45. El aparato de la oración 41, donde el uno o varios componentes configurados para inhibir el movimiento de los volúmenes microfluídicos comprenden:
 30 una válvula microfluídica configurada para transformar de un estado abierto a un estado cerrado; y una puerta microfluídica configurada para transformar de un estado abierto a un estado cerrado.
46. El aparato de la oración 8, donde el cartucho comprende, además, una capa compatible configurada para acoplar térmicamente la fuente de calor de contacto con una o varias regiones seleccionadas del cartucho microfluídico recibido en la bahía receptora.
 35
47. El aparato de la oración 41, donde las cantidades suficientes de reactivos usados para PCR están en forma liofilizada.
- 40 48. El aparato de la oración 40, donde la muestra biológica contiene cantidades de ciertos reactivos.
49. El aparato del cartucho de la oración 40 donde el cartucho está configurado adicionalmente para almacenar los residuos generados durante el procesamiento de la muestra y los residuos generados por la muestra biológica.
 45

REIVINDICACIONES

1. Un método, que comprende:

- 5 insertar un cartucho microfluídico con varias pistas (994) en una bahía receptora (992) de un aparato (981), donde cada pista del cartucho microfluídico con varias pistas (994) comprende una zona de reacción PCR (1001) configurada para aceptar una muestra que contiene polinucleótido, y donde el aparato (981) comprende una pluralidad de conjuntos de calentadores, cada conjunto de calentadores acoplado a una zona de reacción PCR (1001) en el cartucho con varias pistas, comprendiendo cada conjunto de calentadores una pluralidad de
10 calentadores (1003, 1005, 1007, 1009) juntos configurados para mantener una temperatura sustancialmente uniforme a través de la zona de reacción PCR (1001); realizar las reacciones PCR independientes en las muestras que contienen polinucleótidos en las zonas de reacción PCR (1001) del cartucho con varias pistas (994), donde realizar las reacciones PCR independientes comprende controlar independientemente cada calentador (1003, 1005, 1007, 1009), usando un procesador (980) del aparato (981), con el fin de calentar cíclicamente cada zona de reacción PCR (1001) bajo condiciones de ciclos térmicos, mantener una temperatura sustancialmente uniforme a través de cada zona de reacción PCR (1001) durante cada fase del ciclo térmico; y detectar, usando un detector (999) del aparato (981), la presencia de uno o varios polinucleótidos en el cartucho con varias pistas (994).
- 20 2. El método de la reivindicación 1, donde detectar comprende emitir una luz en una banda de absorción de un tinte fluorescente, y detectar luz en una banda de emisión de un tinte fluorescente, donde el tinte fluorescente corresponde a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de la misma.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, donde detectar comprende detectar independientemente una pluralidad de tintes en una pluralidad de diferentes ubicaciones del cartucho microfluídico (994), donde cada tinte fluorescente corresponde a un polinucleótido fluorescente o un fragmento del mismo.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, donde la pluralidad de calentadores (1003, 1005, 1007, 1009) comprende al menos dos fuentes de calor de contacto, y donde insertar comprende acoplar térmicamente de manera independiente cada uno de las dos fuentes de calor de contacto a una región seleccionada diferente del cartucho microfluídico (994).
- 35 5. El método de la reivindicación 4, donde las diferentes regiones seleccionadas se calientan de manera independiente.
6. El método de la reivindicación 4, donde las al menos dos fuentes de calor de contacto están en contacto físico directo con una de las zonas de reacción PCR (1001) en el cartucho con varias pistas (994).
- 40 7. El método de la reivindicación 1, donde la pluralidad de calentadores (1003, 1005, 1007, 1009) comprende cuatro calentadores (1003, 1005, 1007, 1009), y donde insertar comprende acoplar térmicamente los cuatro calentadores (1003, 1005, 1007, 1009) a cuatro lados de la zona de reacción PCR (1001).
- 45 8. El método de la reivindicación 7, donde los cuatro calentadores (1003, 1005, 1007, 1009) comprende un primer calentador (1003) separado del segundo calentador (1005) por un hueco, siendo el hueco lo suficientemente pequeño como para mantener un gradiente de temperatura de menos de 1 °C de ancho de la zona de reacción PCR (1001) en el cartucho con varias pistas (994) en cualquier punto a lo largo de una longitud de la zona de reacción PCR (1001), comprendiendo los cuatro calentadores (1003, 1005, 1007, 1009) además, un tercer calentador (1007) y un cuarto calentador (1009), siendo la longitud del tercer y cuarto calentador (1007, 1009) inferior a la longitud del primer y del segundo calentador (1003, 1005).
- 50 9. El método de la reivindicación 1, donde cada conjunto de calentadores comprende, además, uno o varios sensores de temperatura (1011, 1013, 1015) configurados para controlar la potencia suministrada a la pluralidad de calentadores (1003, 1005, 1007, 1009), y donde el método comprende, además, transmitir información de temperatura desde el uno o varios sensores de temperatura (1011, 1013, 1015) al procesador (980).
- 55 10. El método de la reivindicación 1, donde el cartucho con varias pistas (994) comprende uno o varios componentes configurados para inhibir el movimiento de volúmenes microfluídicos de la muestra que contiene polinucleótido.
- 60 11. El método de la reivindicación 1, donde el cartucho con varias pistas (994) comprende uno o varios componentes, estando el uno o varios componentes seleccionados de un grupo que comprende: uno o varios canales configurados para permitir el paso de los volúmenes microfluídicos; uno o varios accionadores configurados para mover los volúmenes microfluídicos; una o varias cámaras configuradas para mantener el volumen microfluídico.
- 65 12. El método de la reivindicación 10, donde el uno o varios componentes configurados para inhibir el movimiento de los volúmenes microfluídicos comprende una válvula microfluídico, y donde el método comprende, además,

transformar la válvula microfluídico de un estado abierto a un estado cerrado.

5 13. El método de la reivindicación 12, donde el uno o varios componentes configurados para inhibir el movimiento de los volúmenes microfluídicos comprende, además, una puerta microfluídica configurada para transformar de un estado cerrado a un estado abierto.

10 14. El método de la reivindicación 12, donde la válvula microfluídica comprende una masa sensible al calor, y donde transformar la válvula microfluídica de un estado abierto a un estado cerrado comprende calentar la masa de sustancia sensible al calor de una primera temperatura a una segunda temperatura.

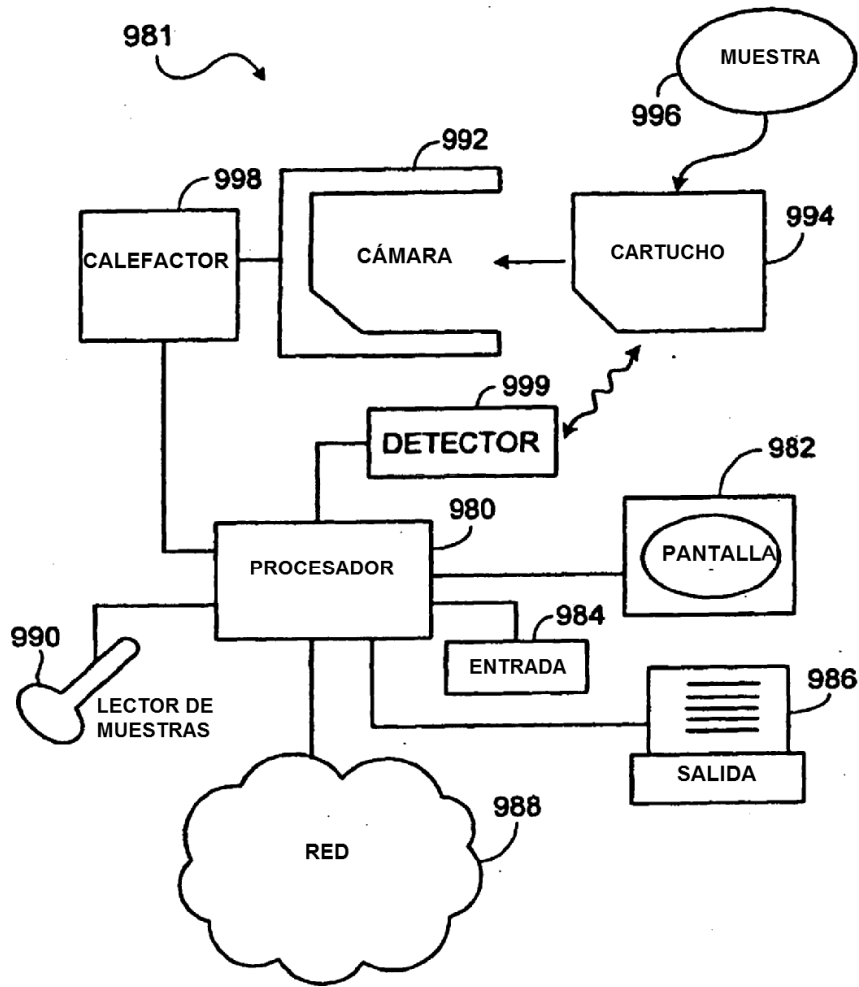


FIG. 1

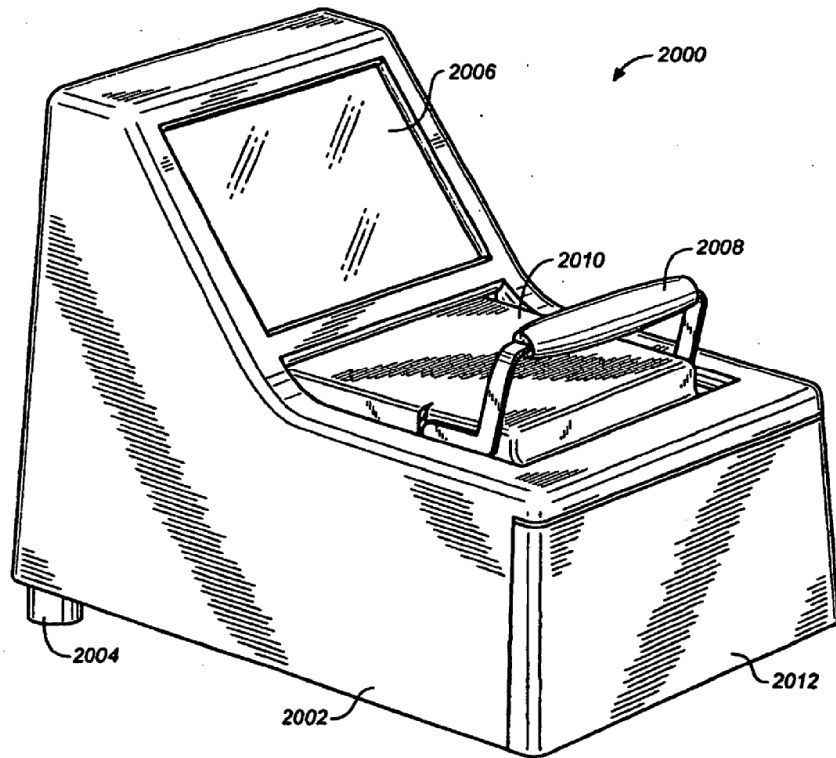


FIG. 2A

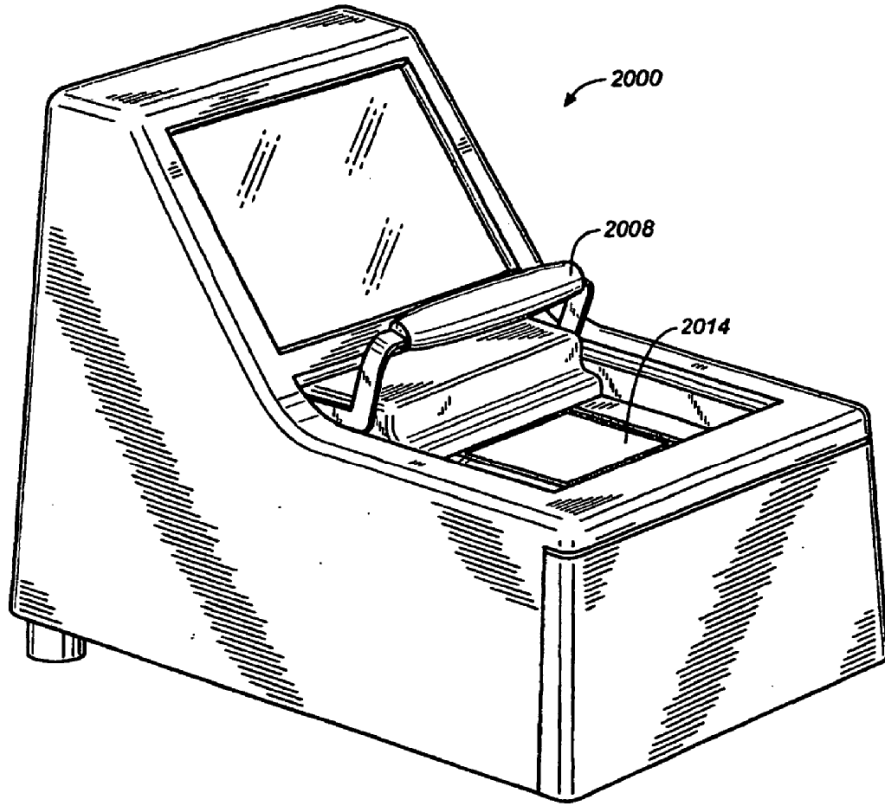


FIG. 2B

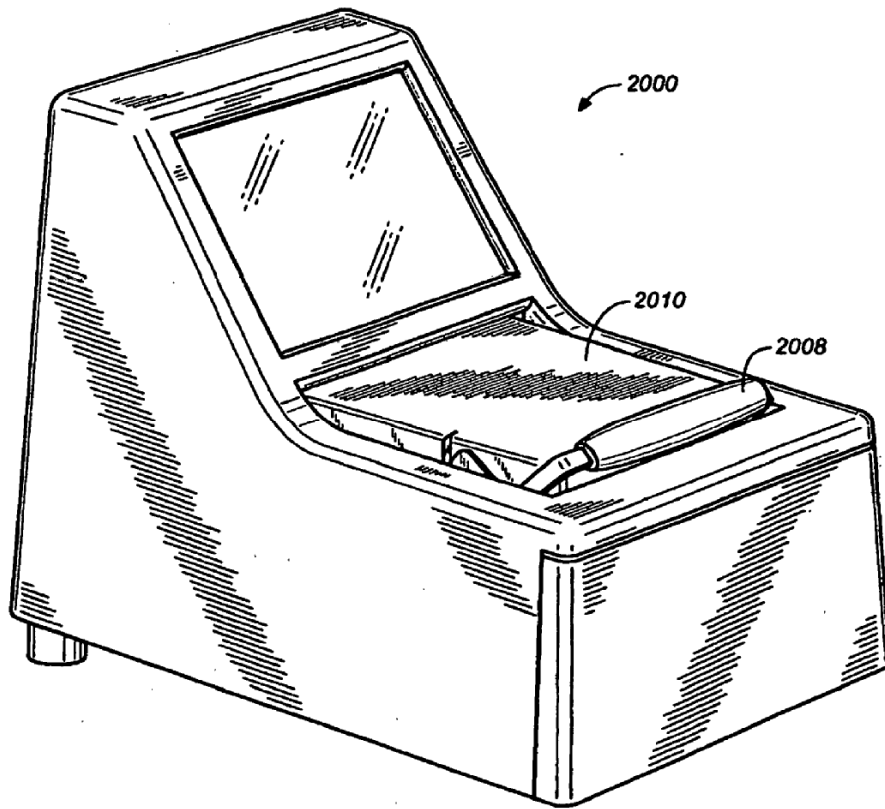


FIG. 2C

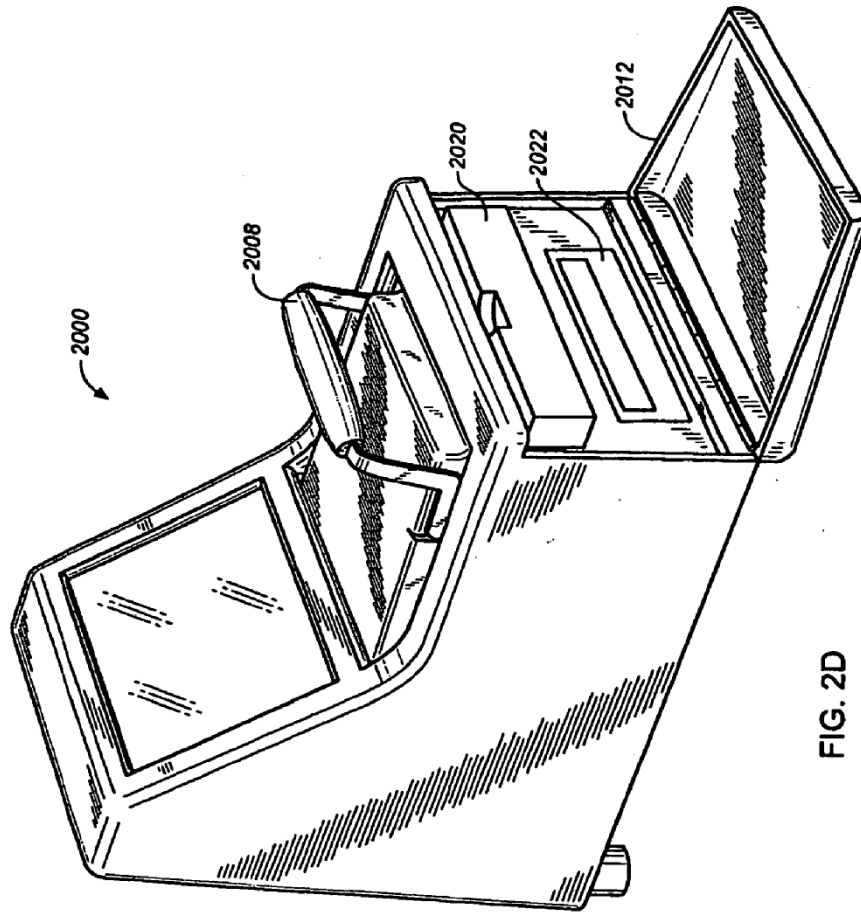


FIG. 2D

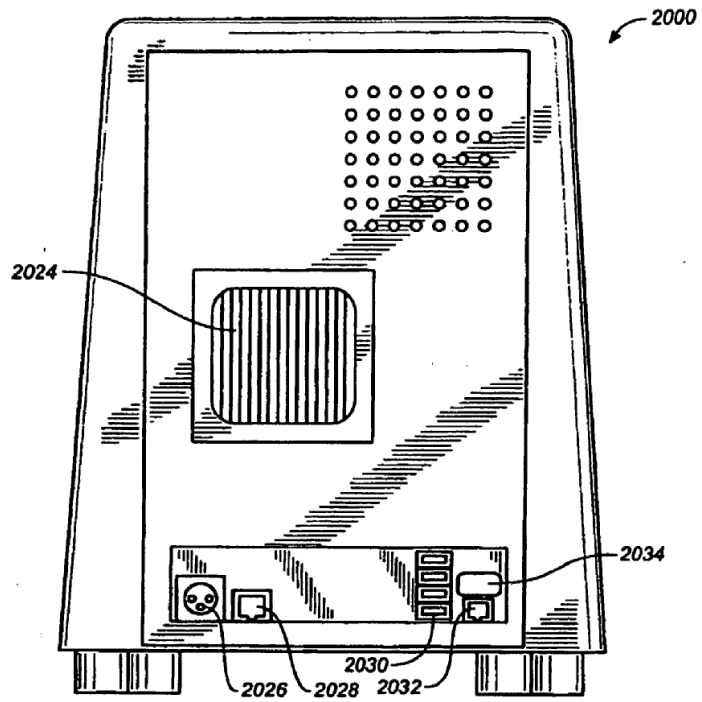


FIG. 2E

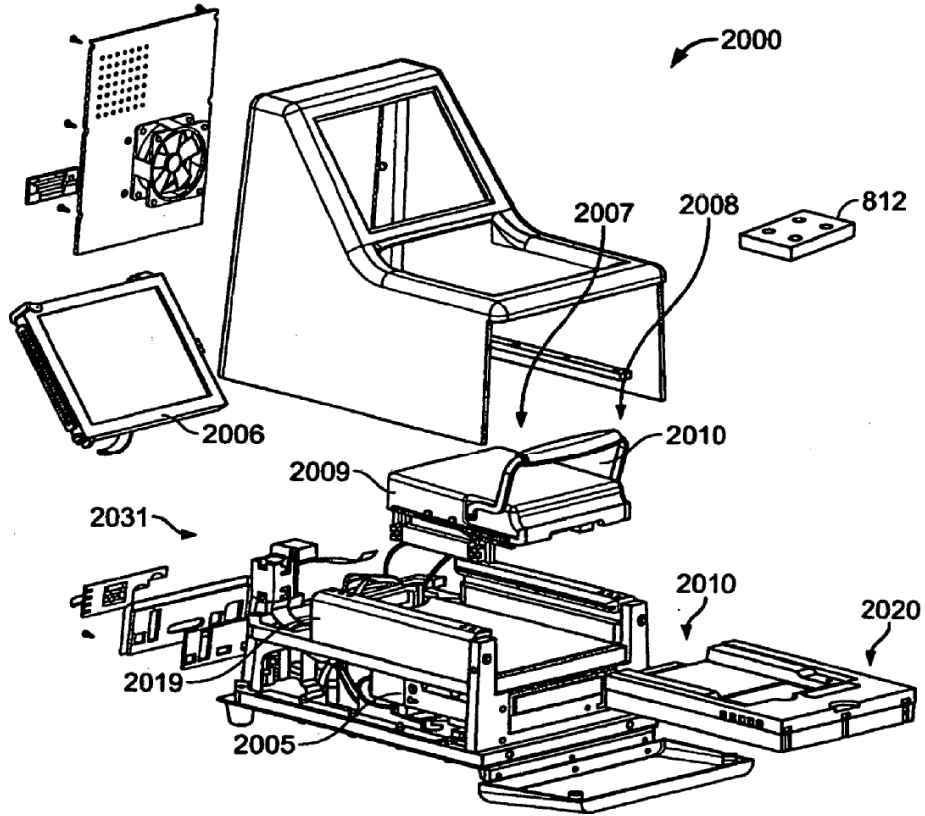


FIG. 3

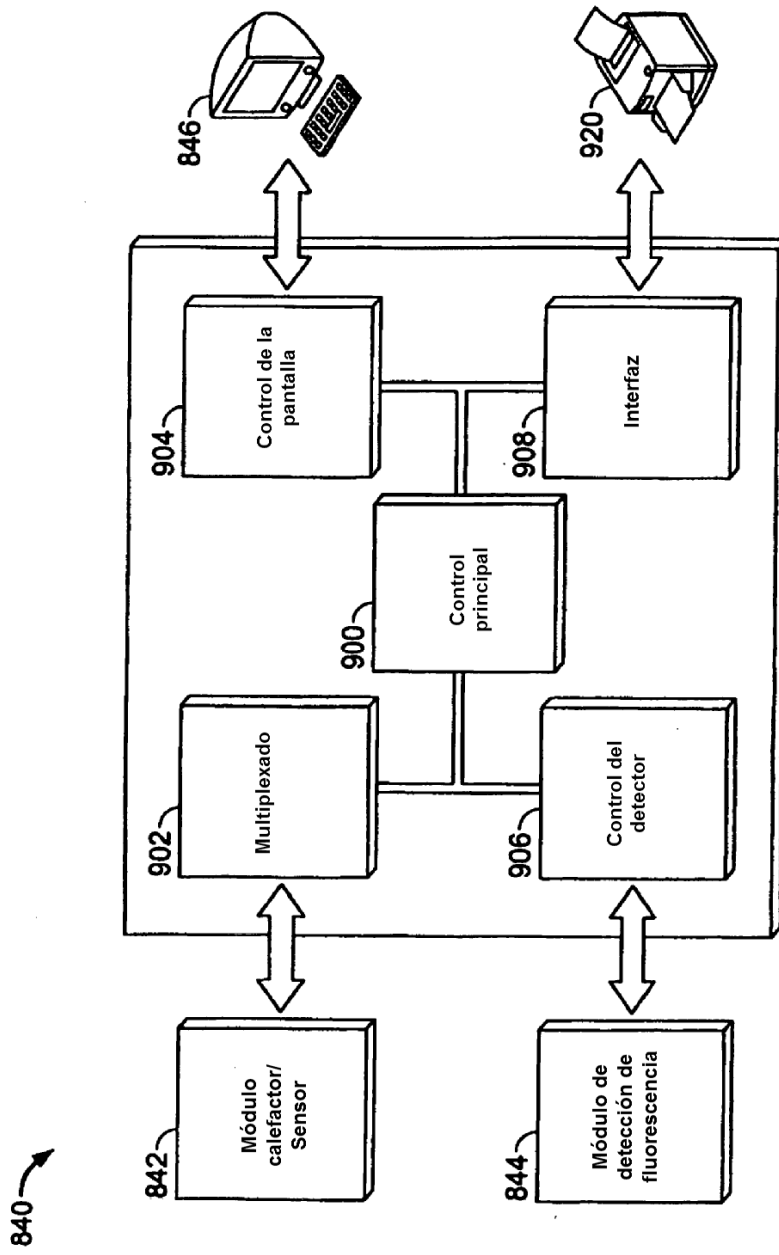


FIG. 4

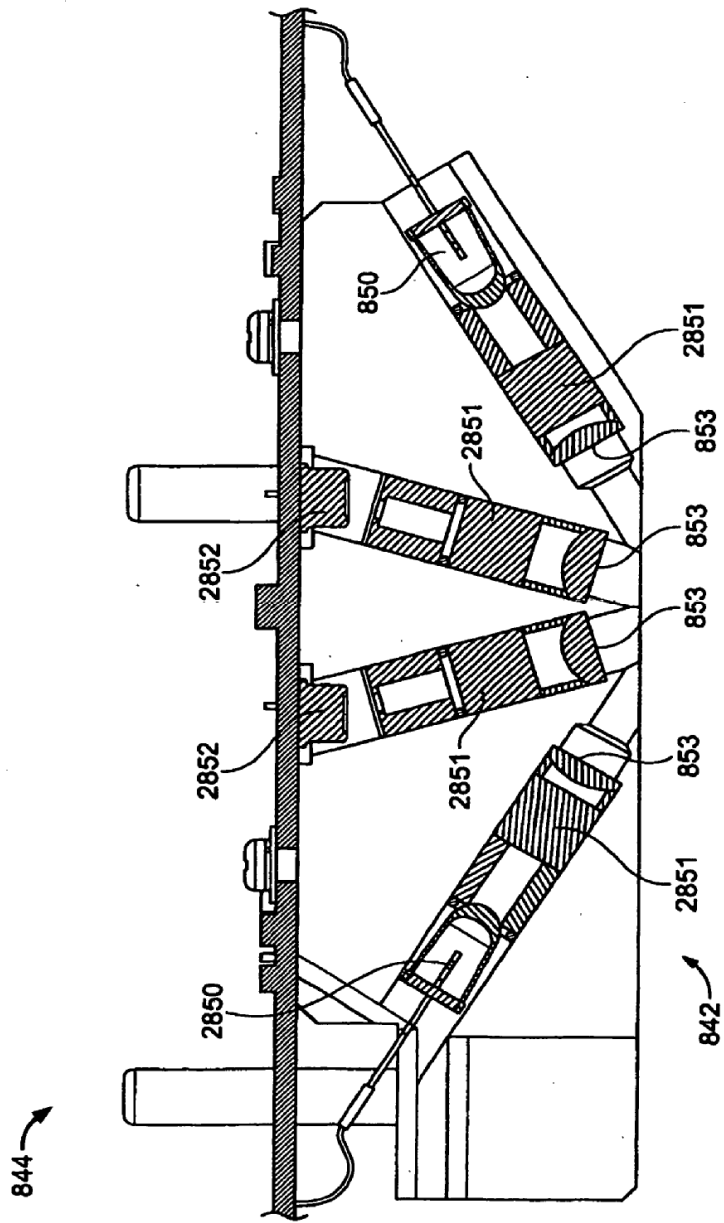


FIG. 5

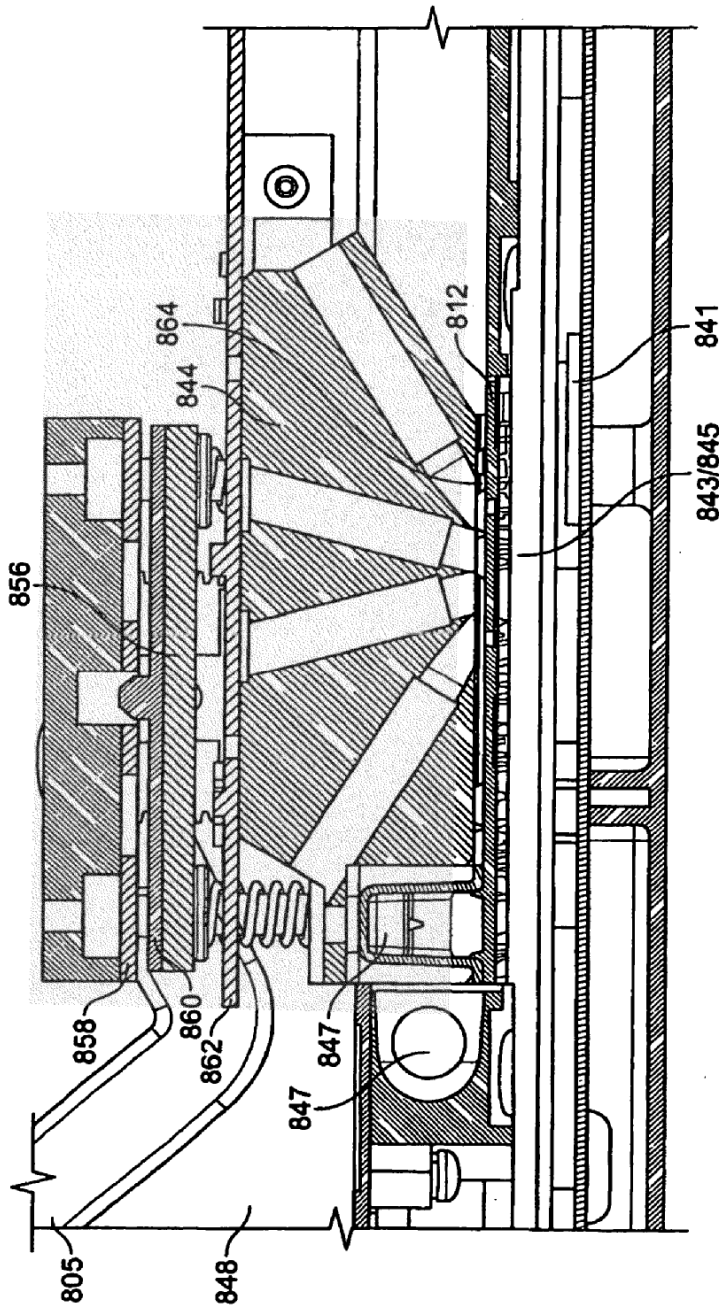


FIG. 6A

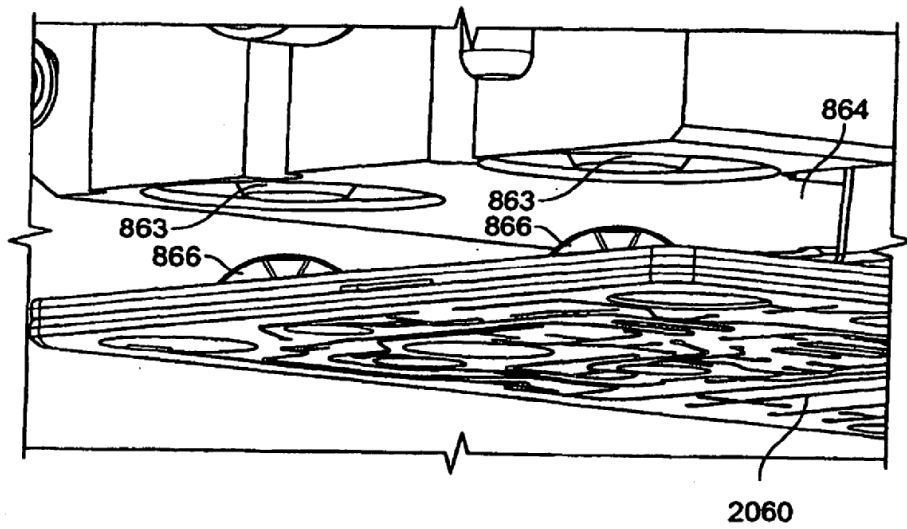


FIG. 6B

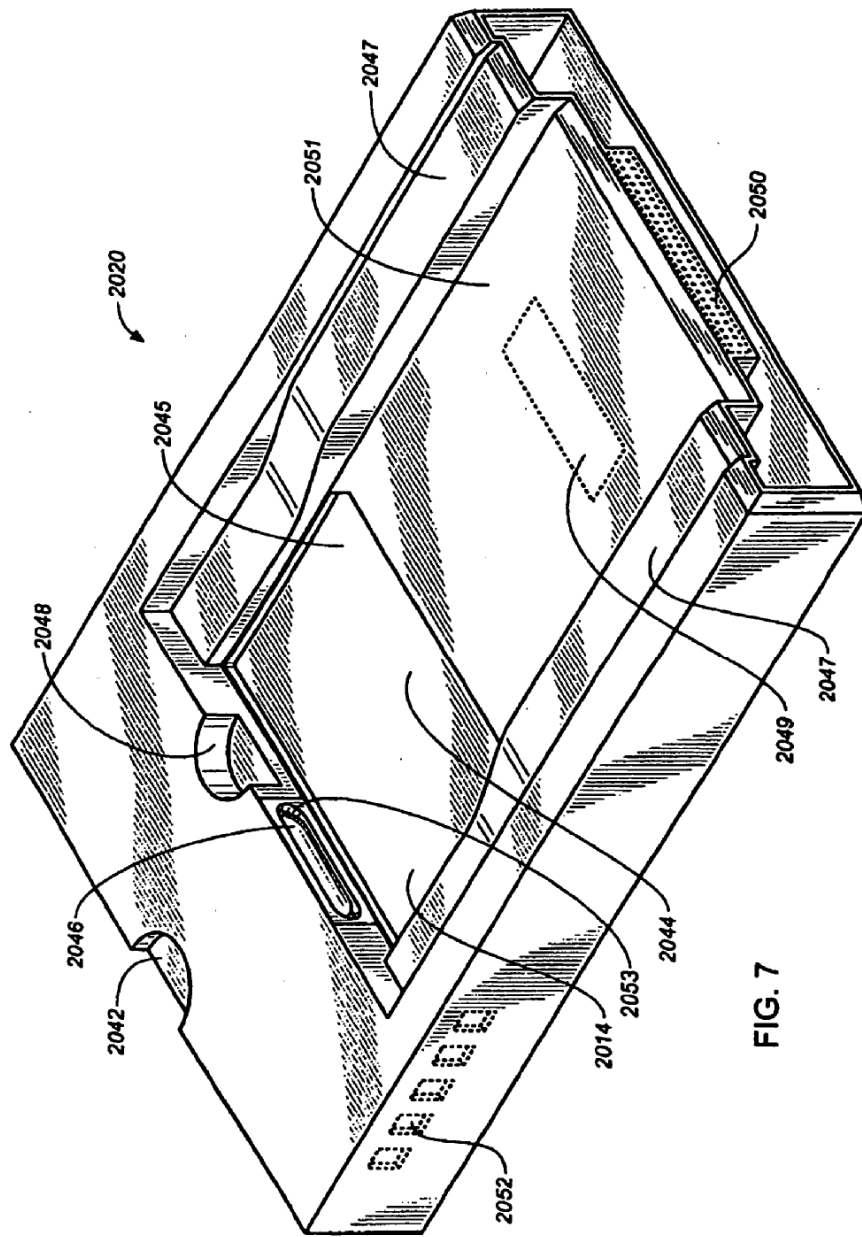


FIG. 7

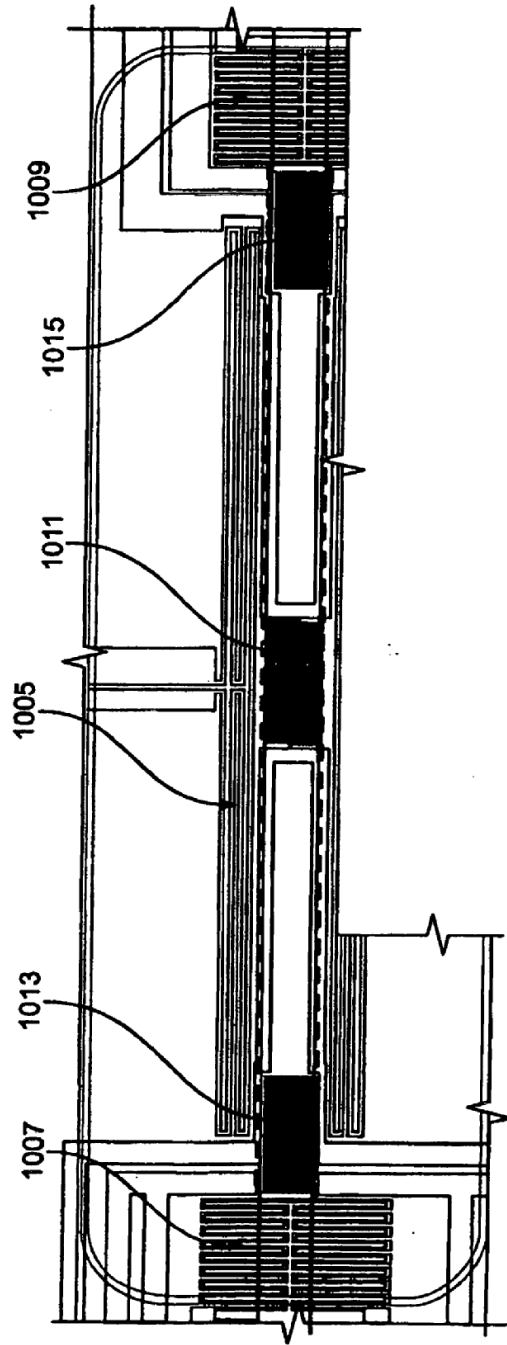


FIG. 8A

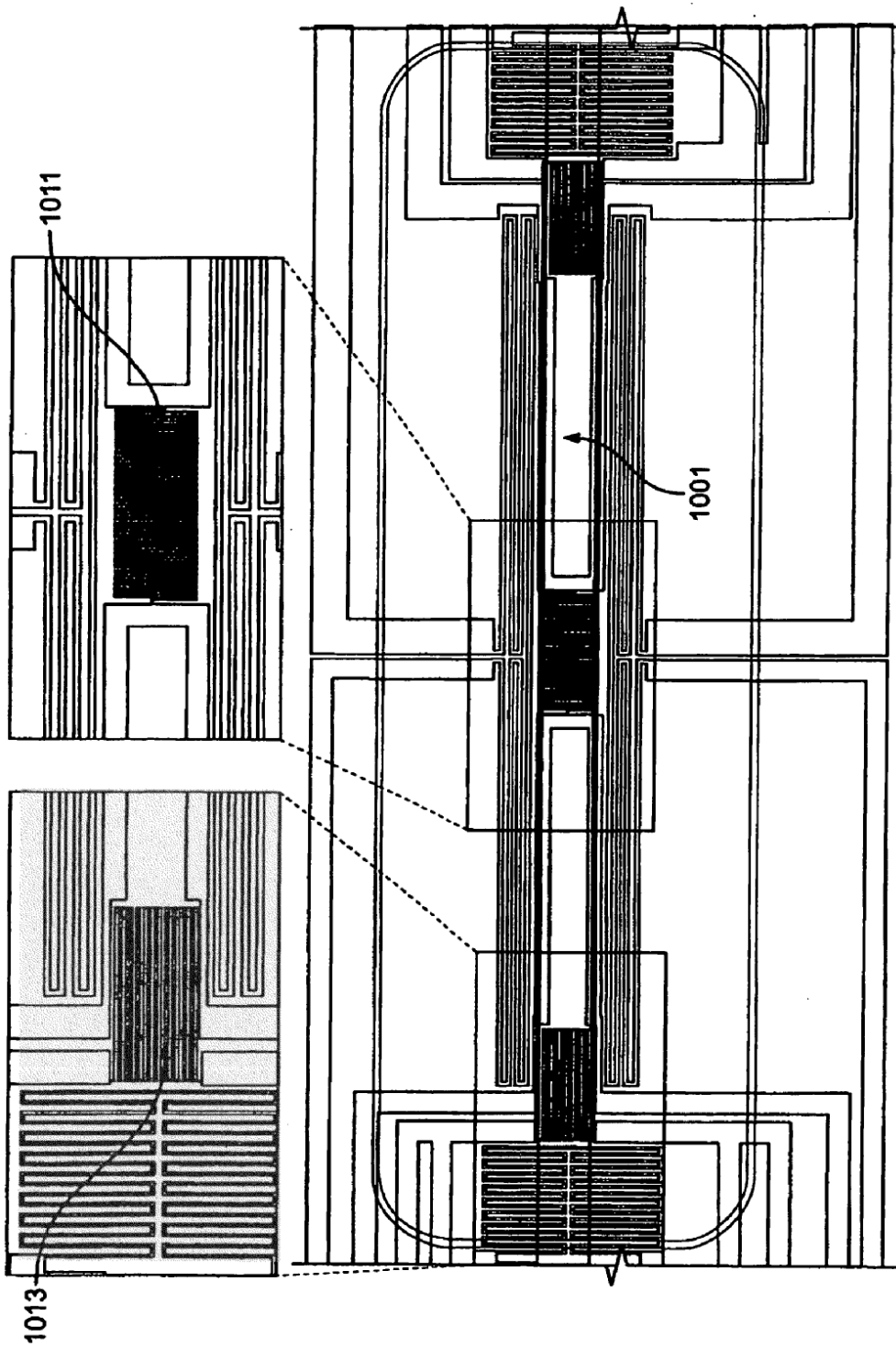


FIG. 8B

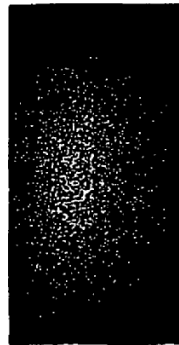


FIG. 8C-1

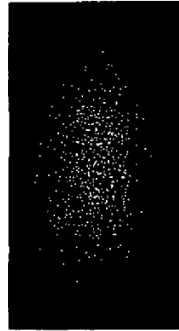


FIG. 8C-2



FIG. 8C-3



FIG. 8C-4

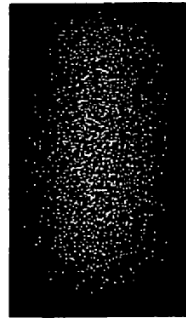


FIG. 8C-5

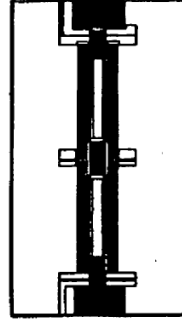
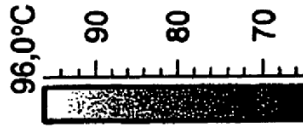


FIG. 8C-6



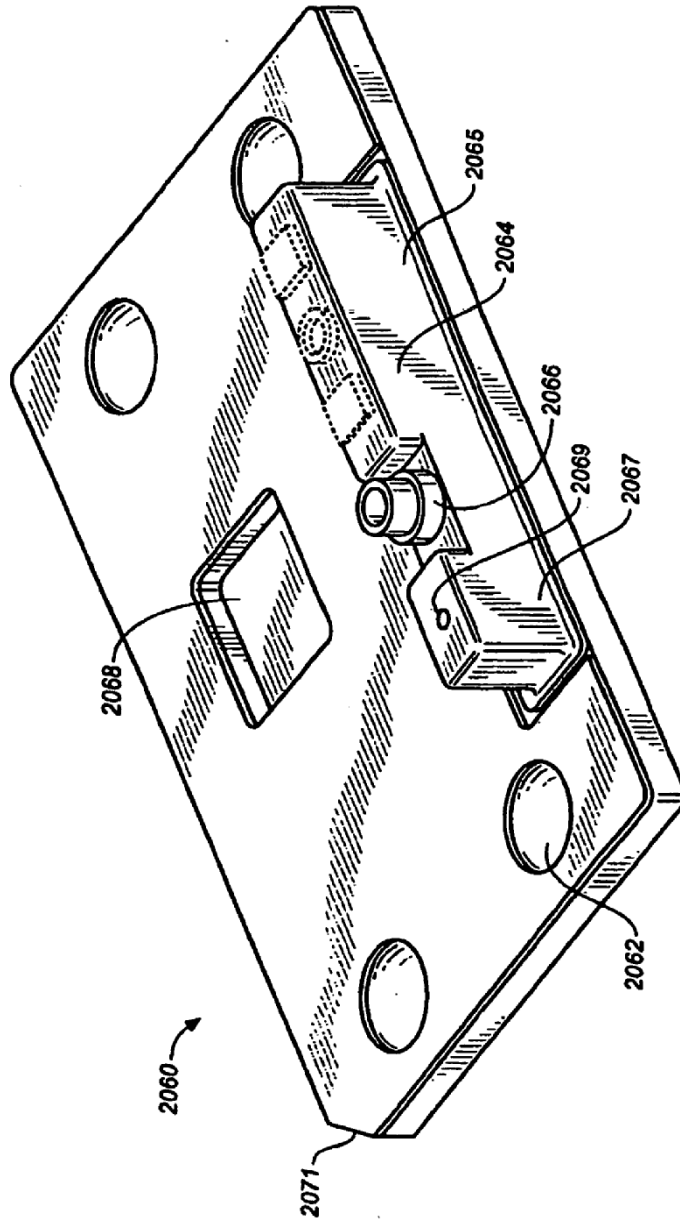


FIG. 9

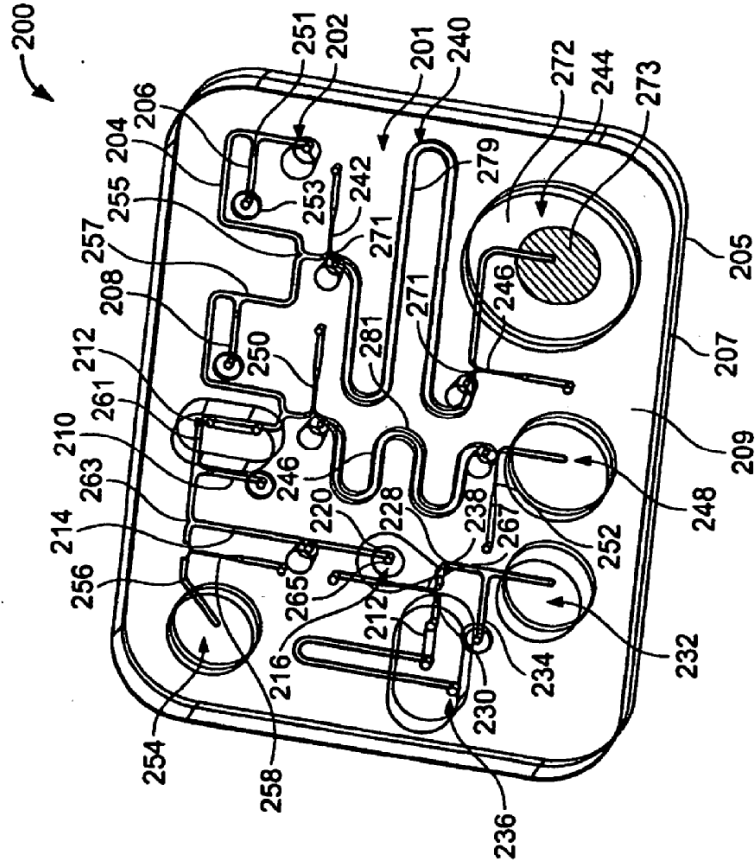


FIG. 10

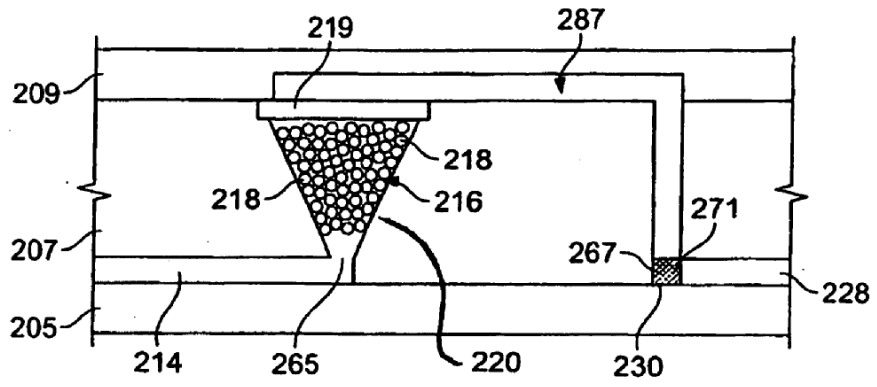


FIG. 11

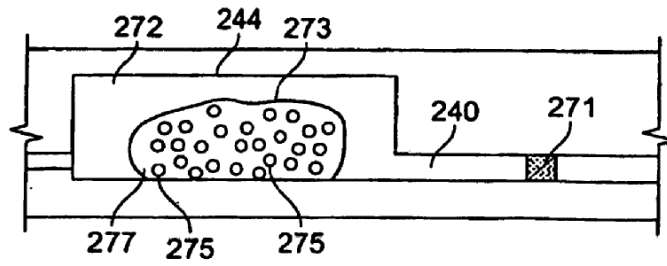


FIG. 13

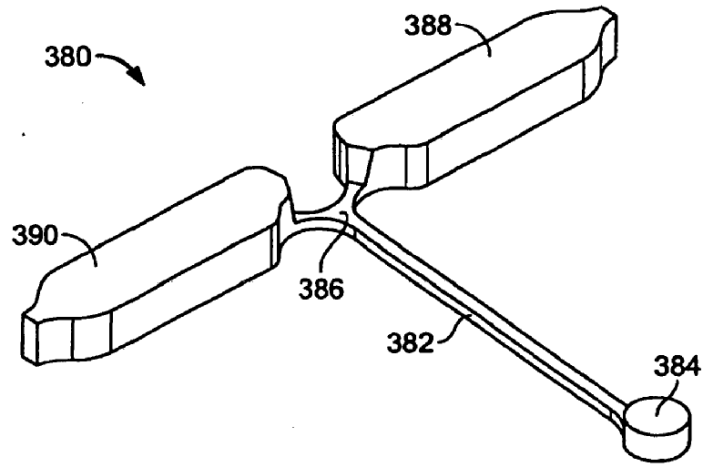


FIG. 12A

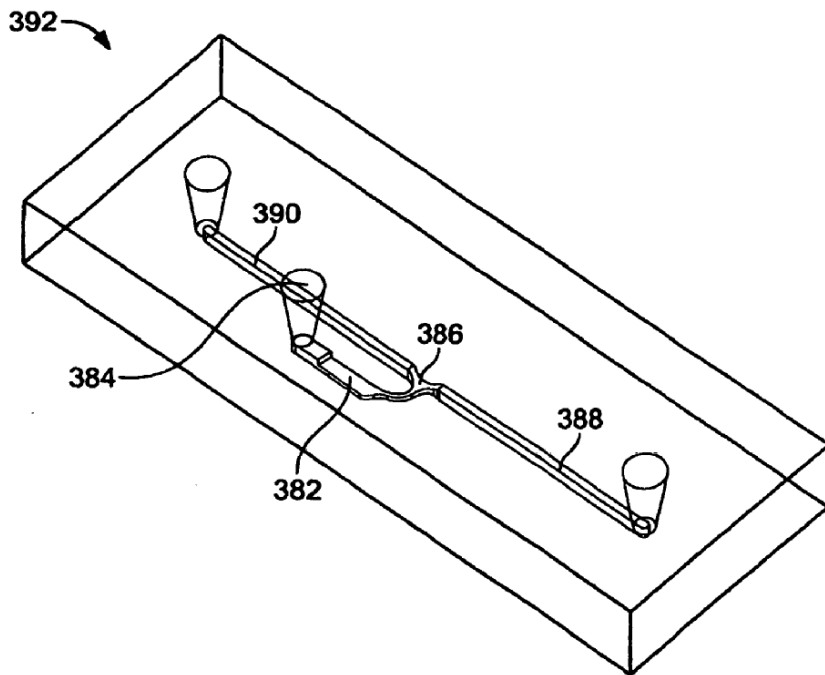


FIG. 12B

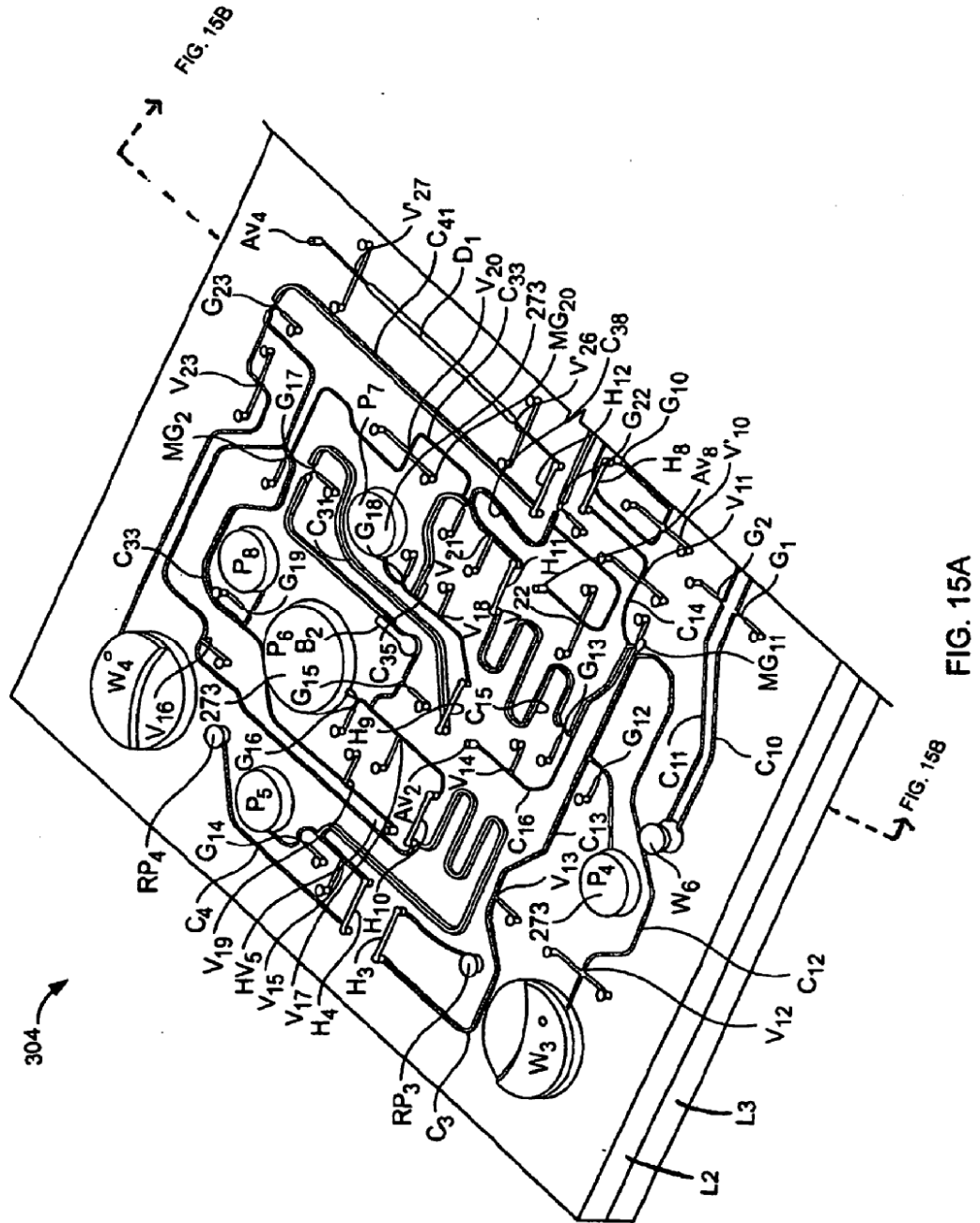


FIG. 15A

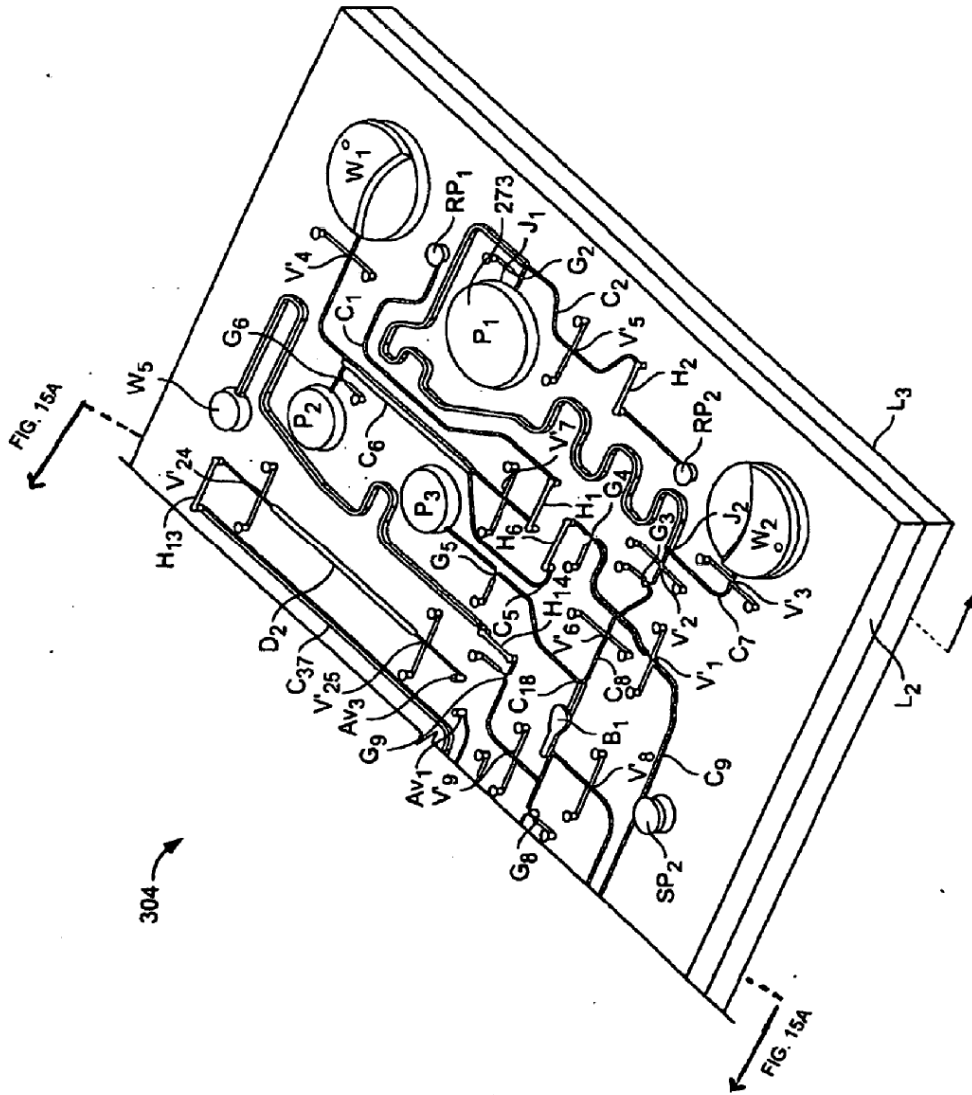


FIG. 15B

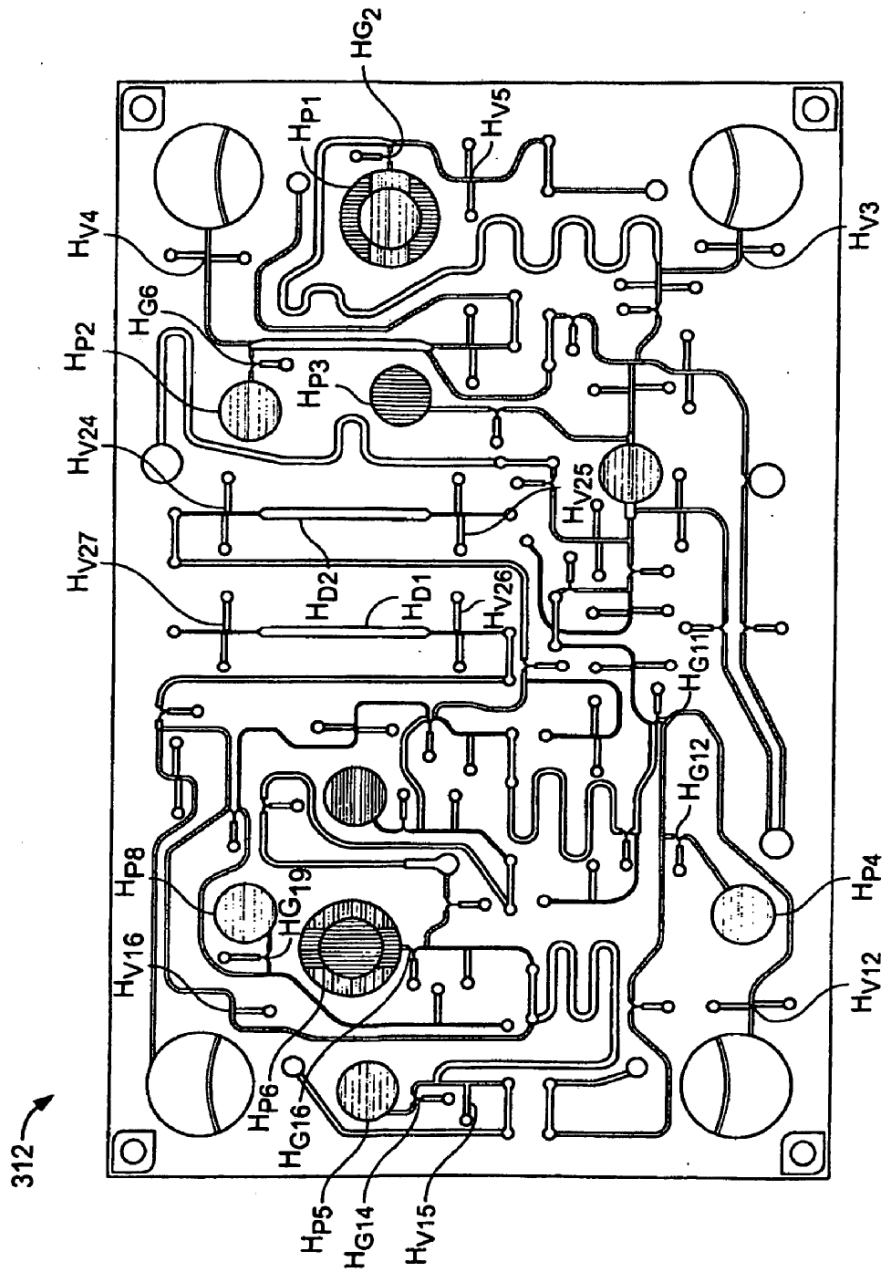


FIG. 16

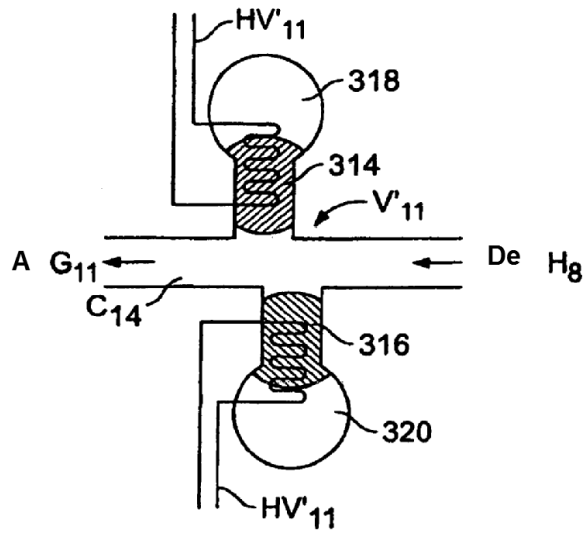


FIG. 17

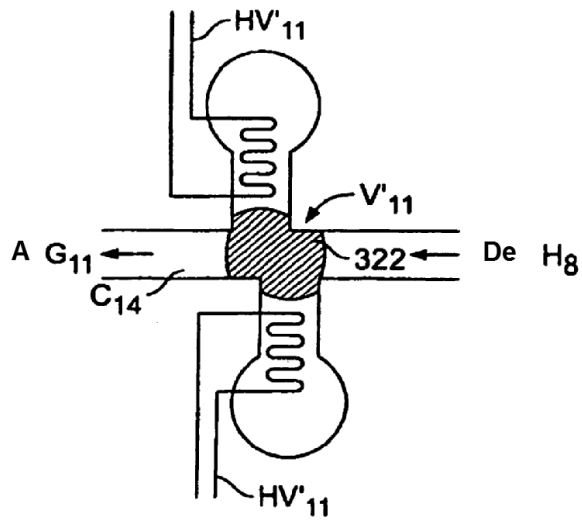


FIG. 18

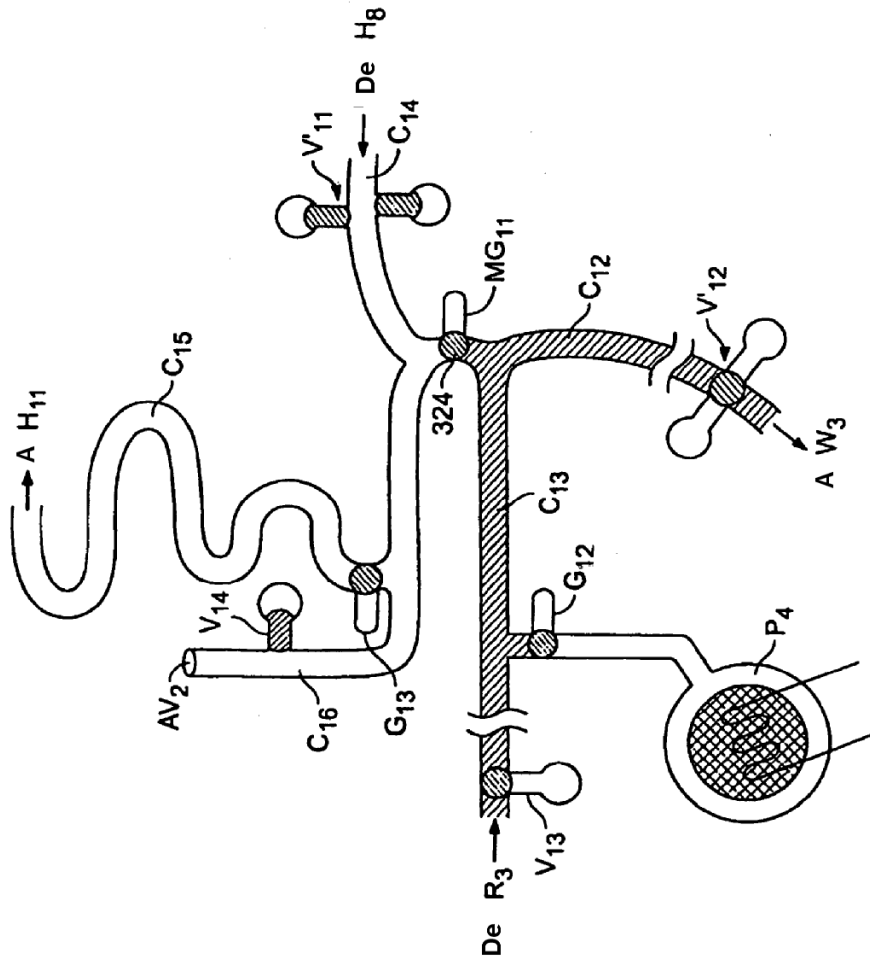


FIG. 19B

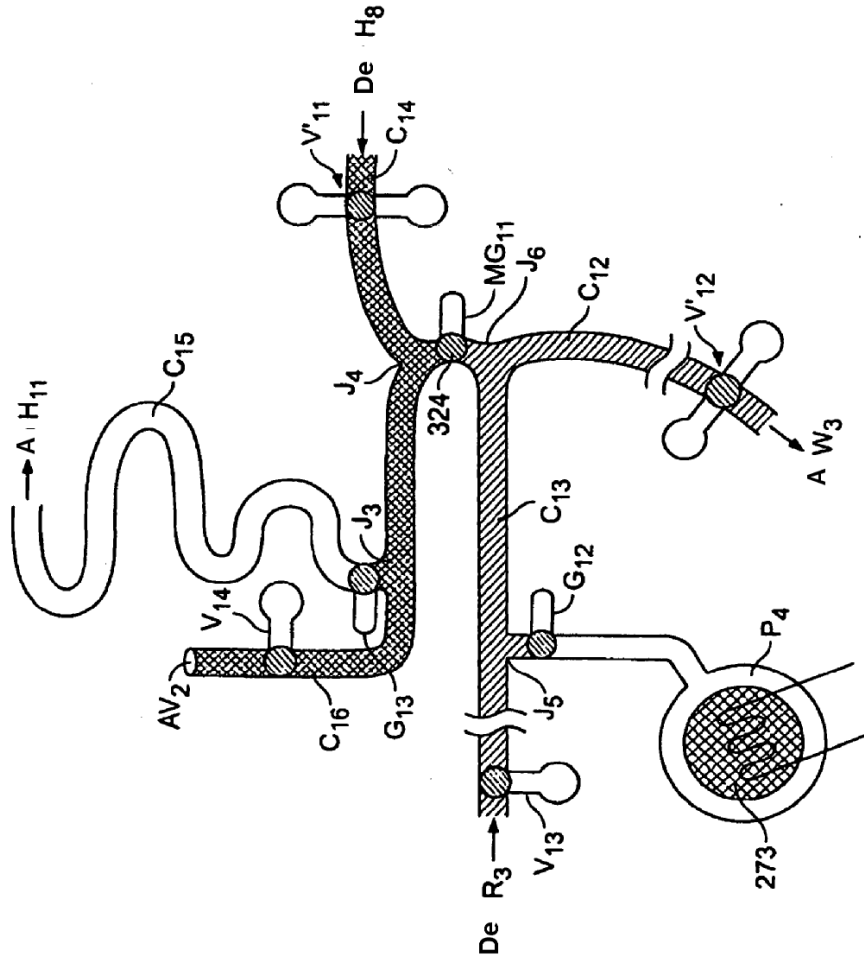


FIG. 19C

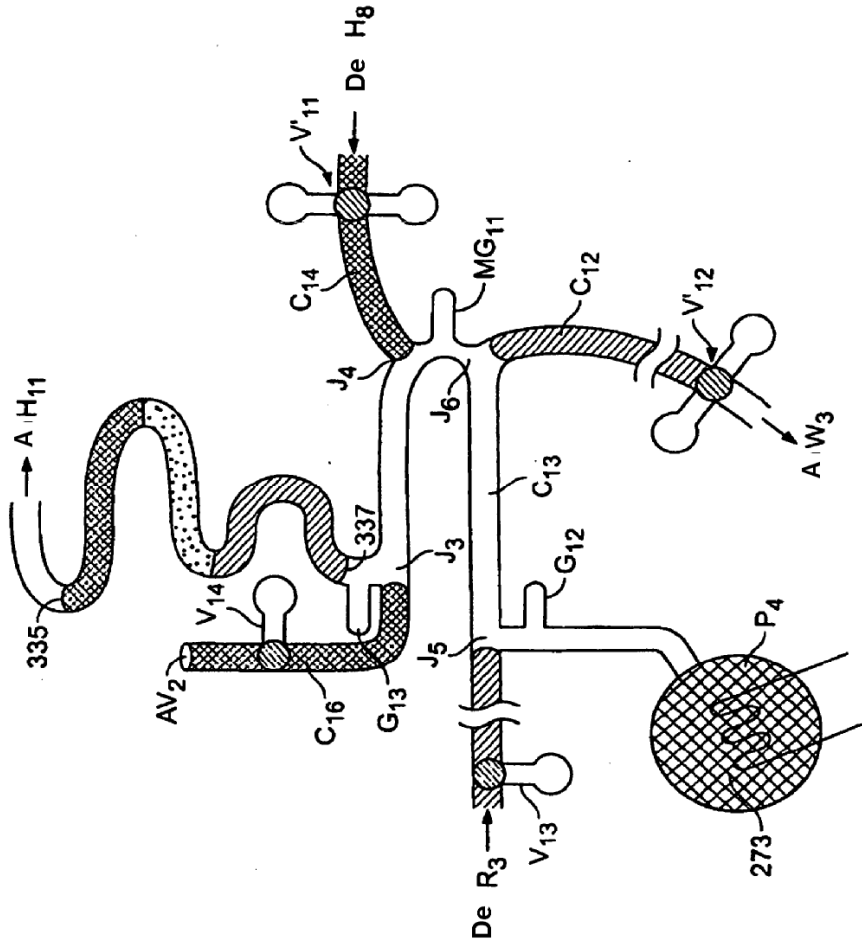


FIG. 19D

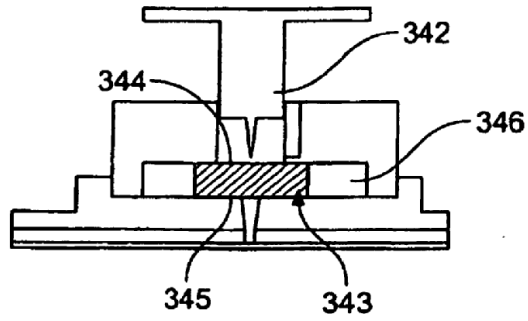


FIG. 20A

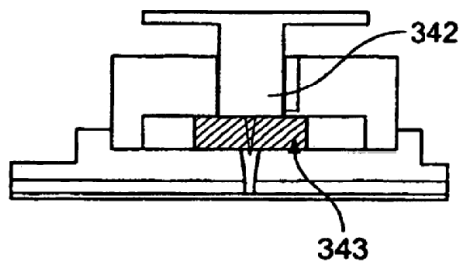


FIG. 20B

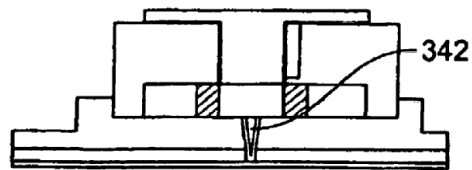


FIG. 20C

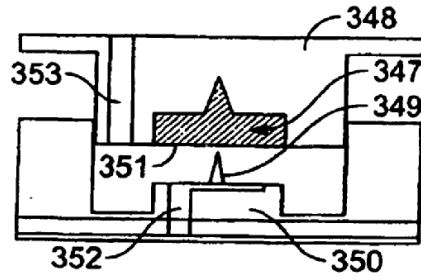


FIG. 21A

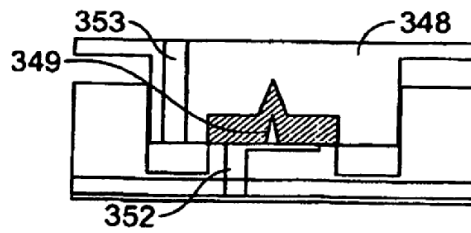


FIG. 21B

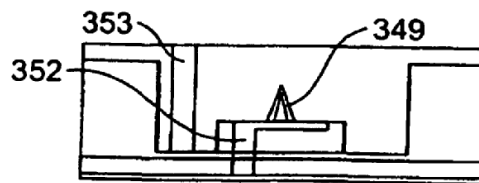


FIG. 21C

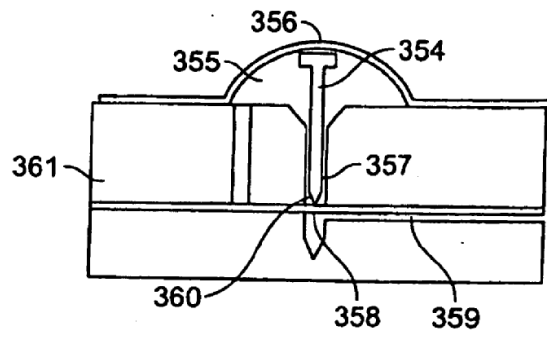


FIG. 22

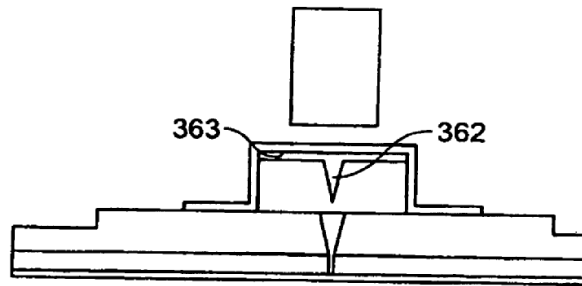


FIG. 23A

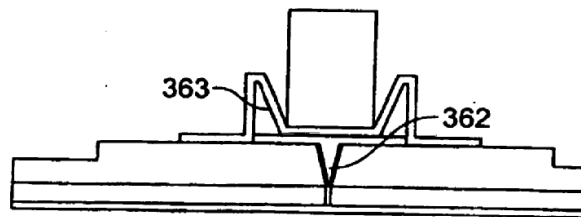


FIG. 23B

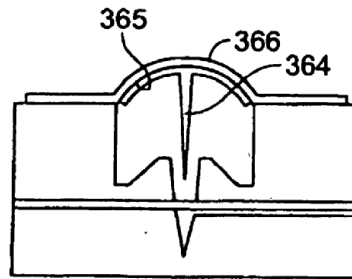


FIG. 24A

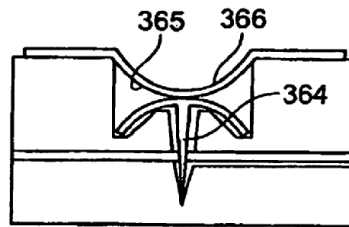


FIG. 24B

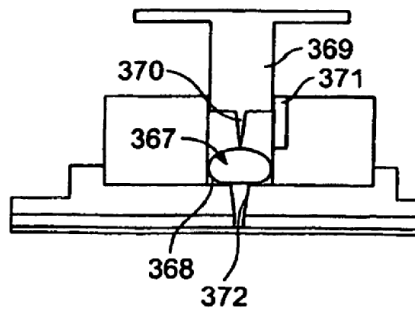


FIG. 25

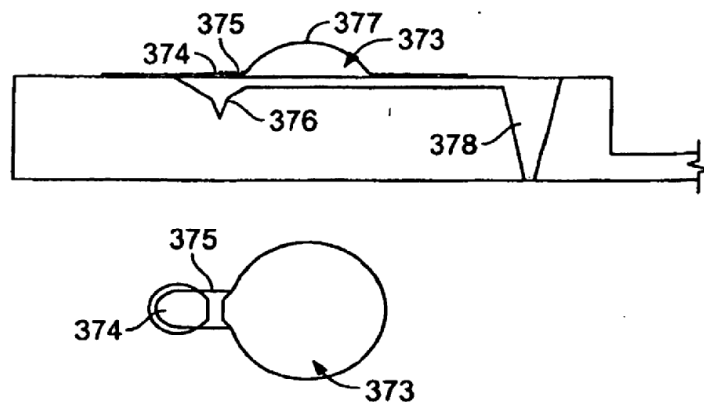


FIG. 26

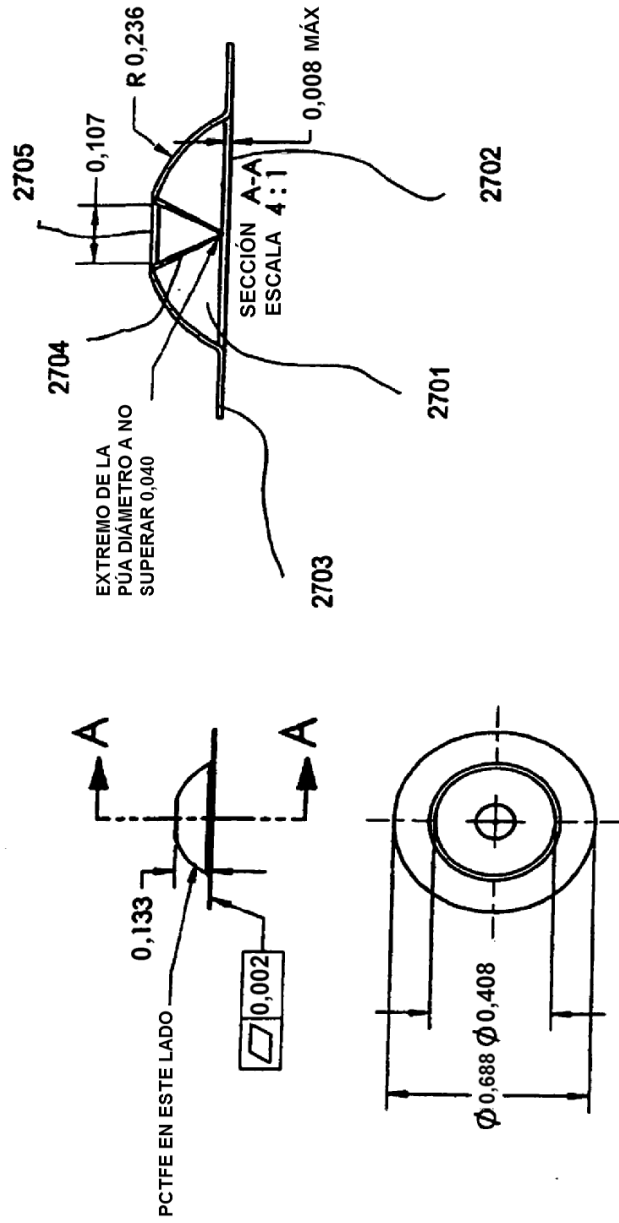


FIG. 27A

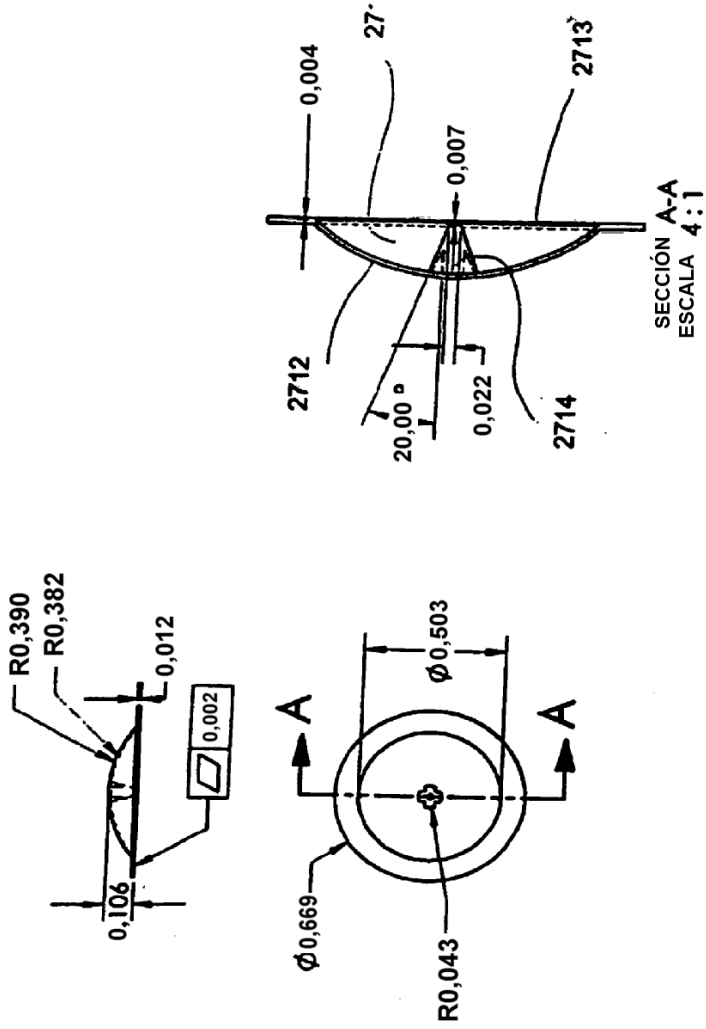


FIG. 27B

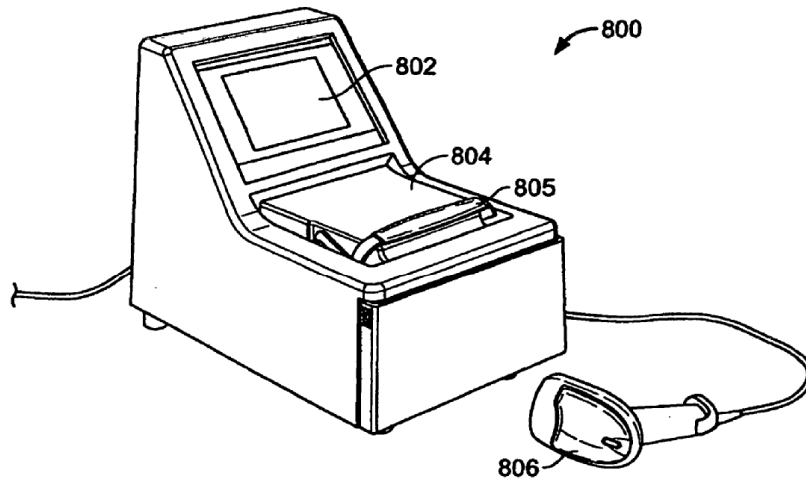


FIG. 28

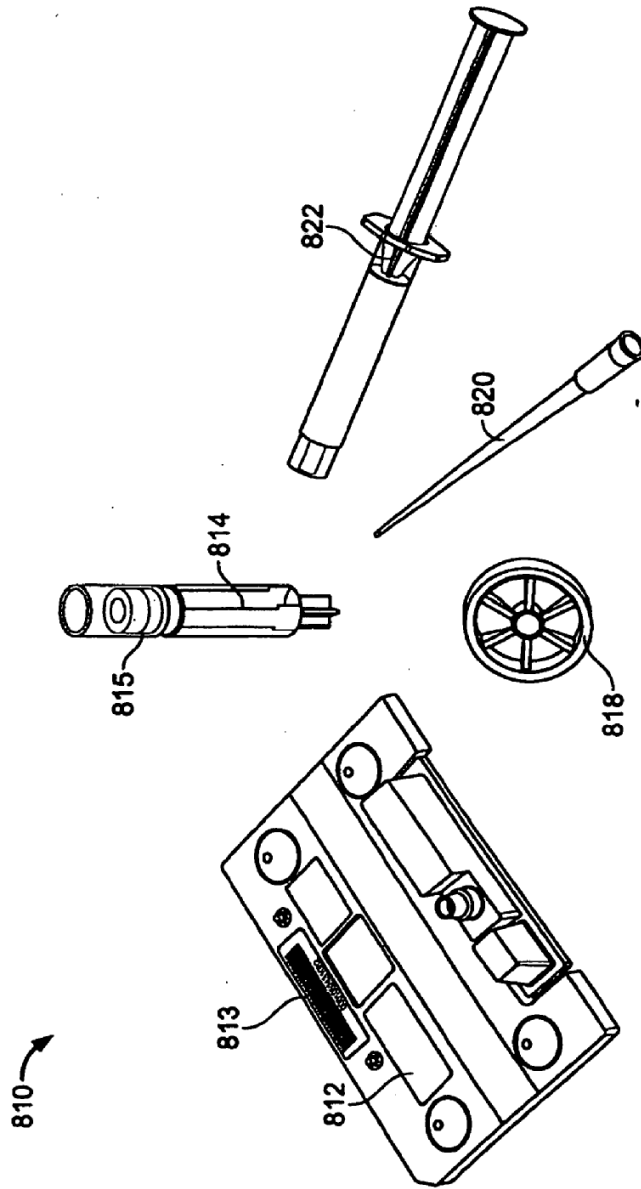


FIG. 29

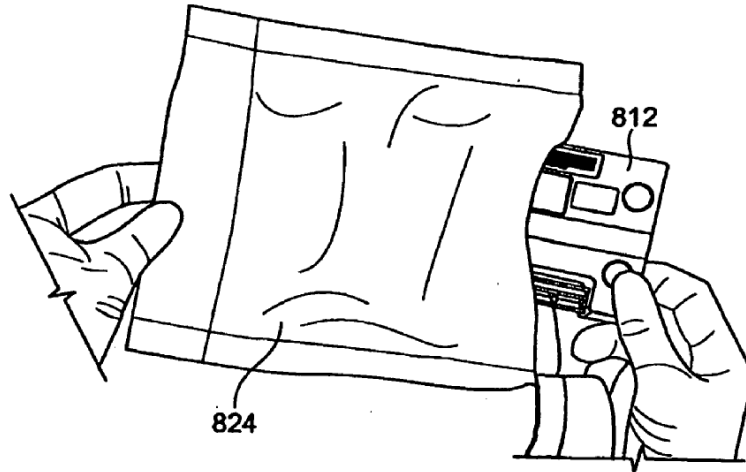


FIG. 30

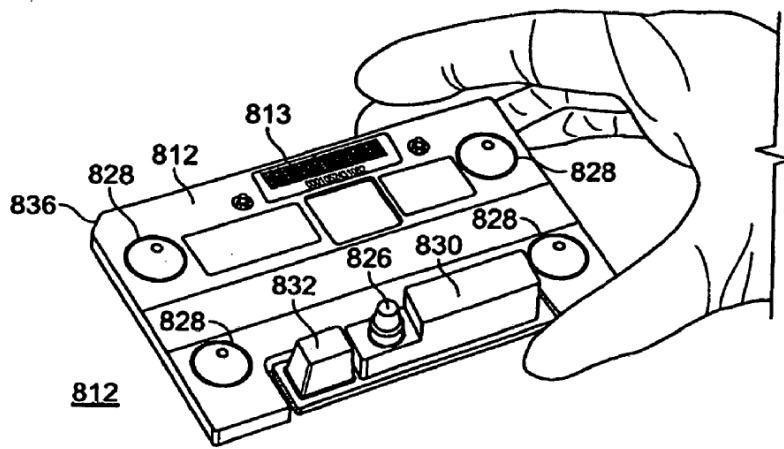


FIG. 31

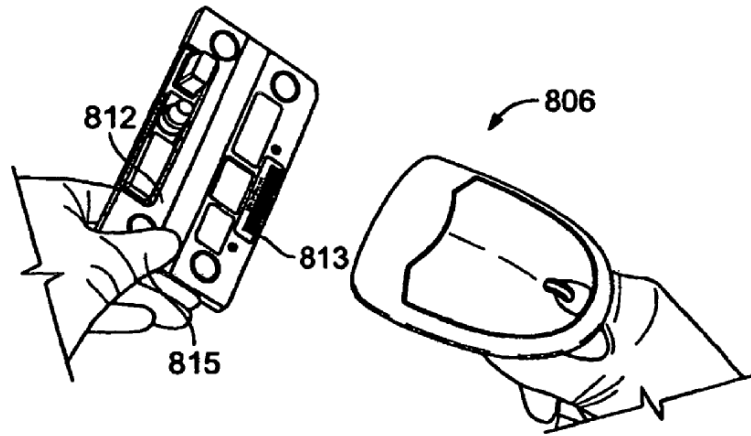


FIG. 32

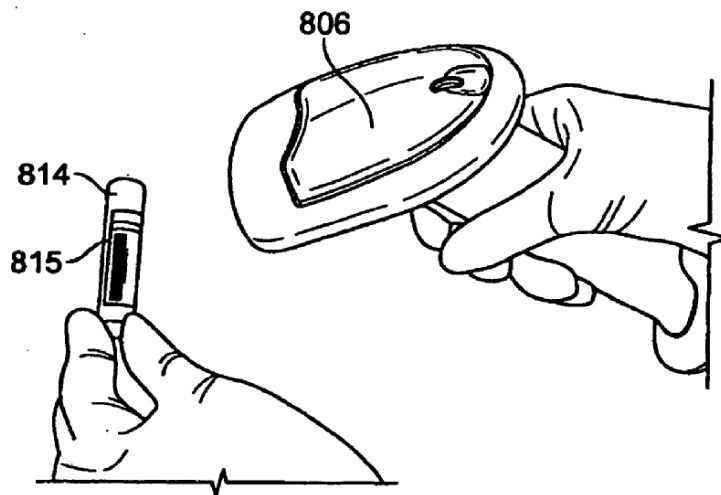


FIG. 33

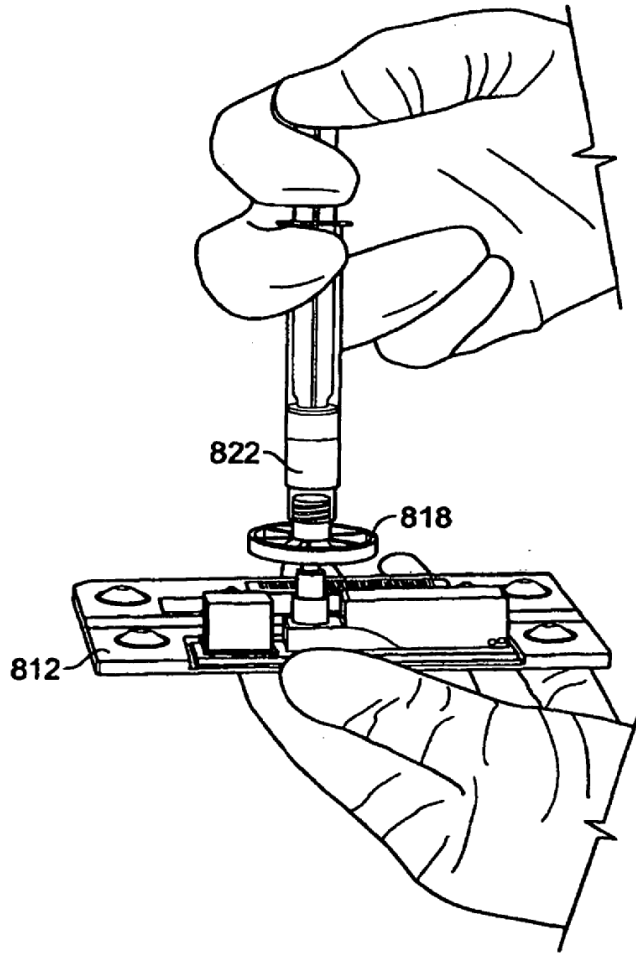


FIG. 34

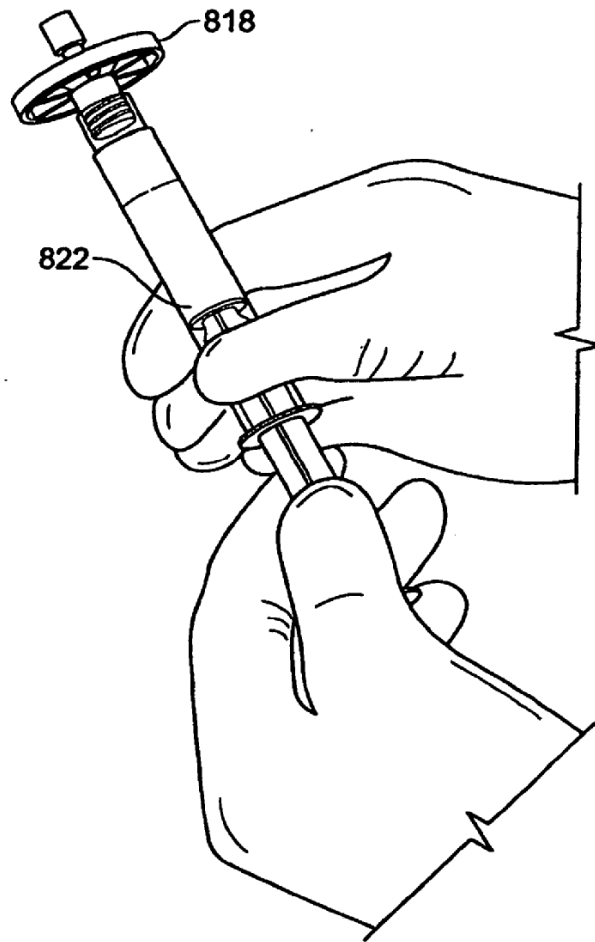


FIG. 35

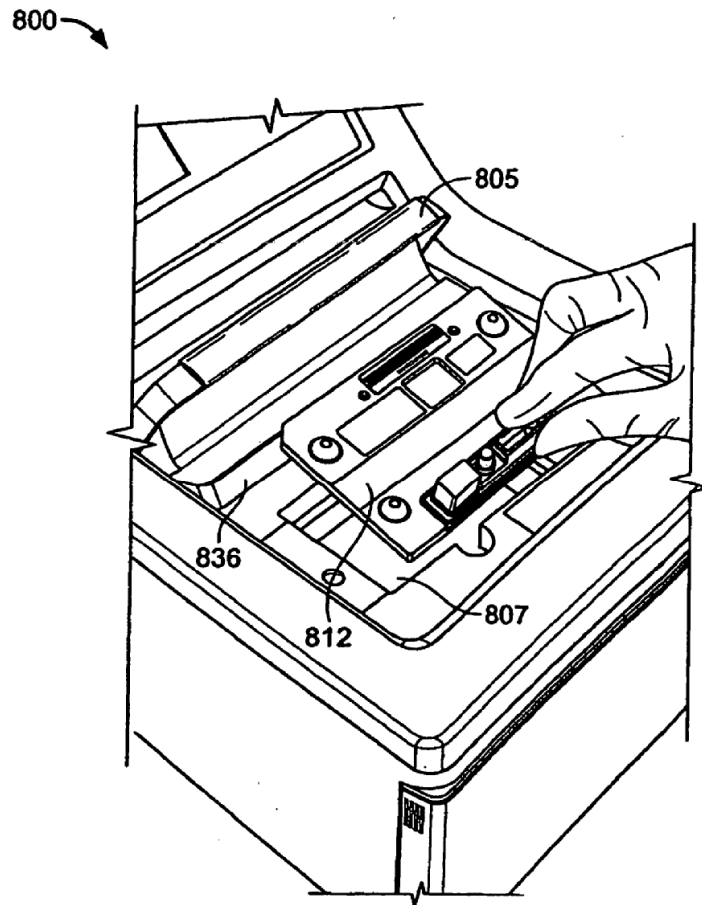


FIG. 36

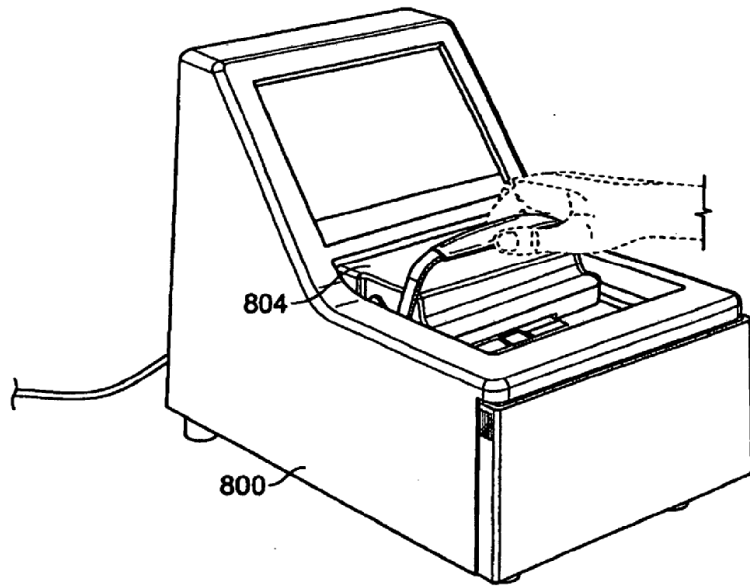


FIG. 37

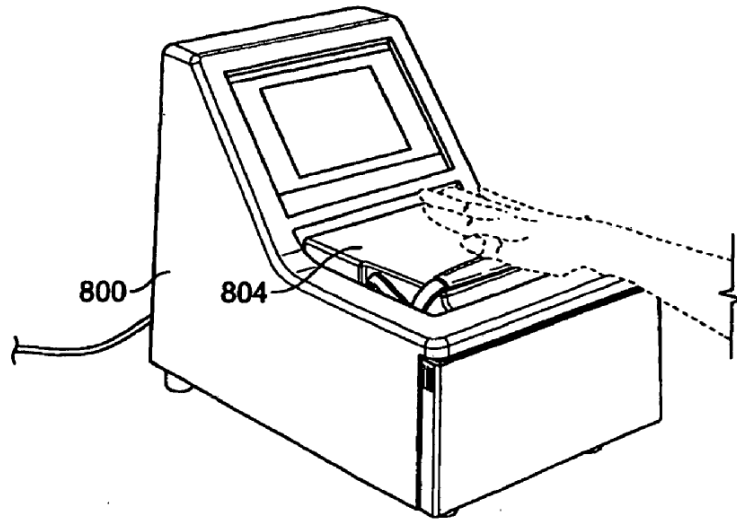


FIG. 38

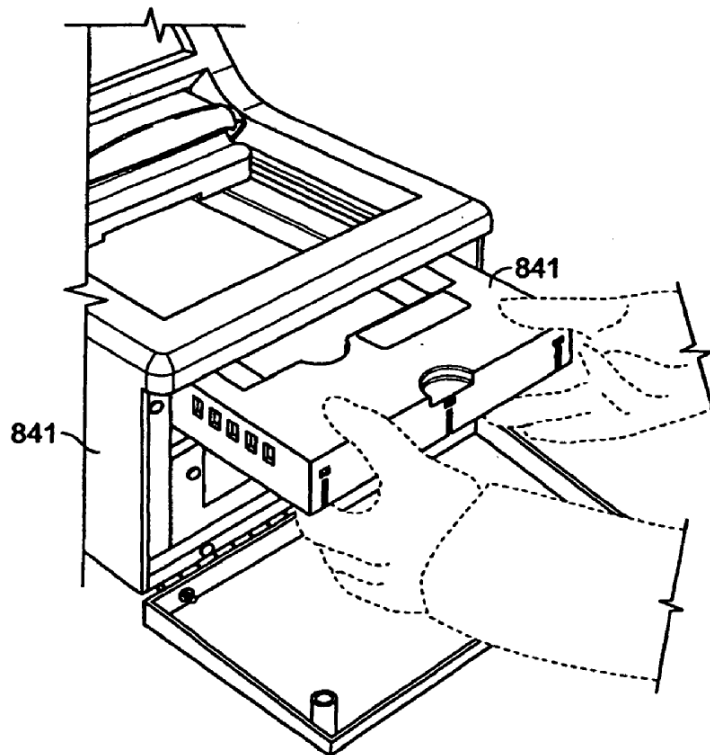


FIG. 39

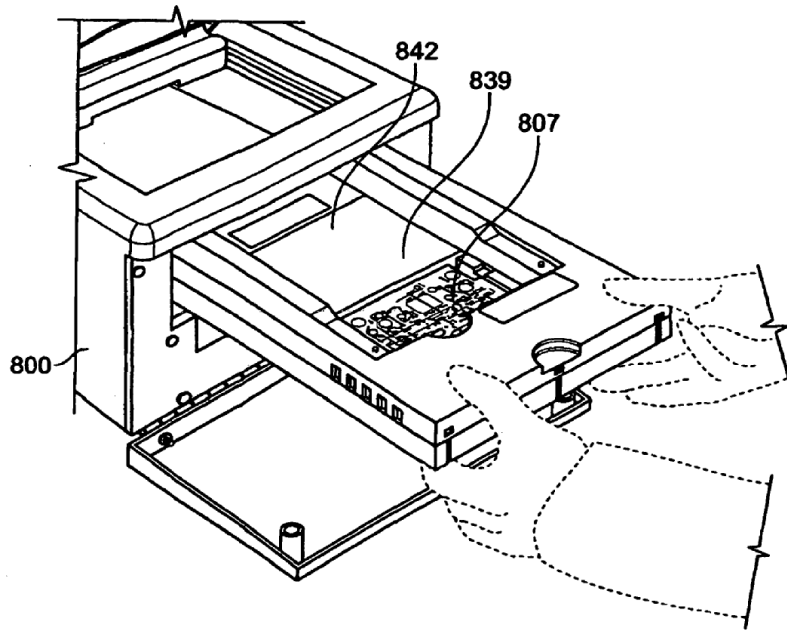


FIG. 40

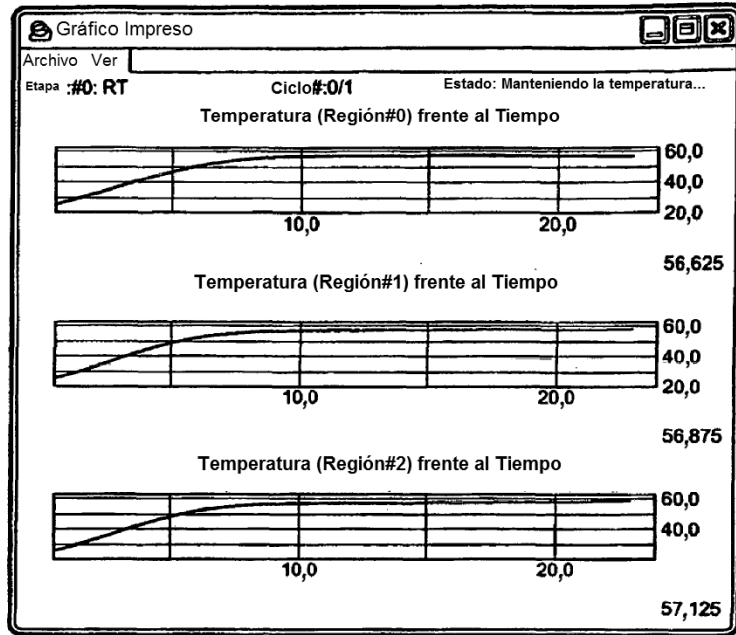


FIG. 41A

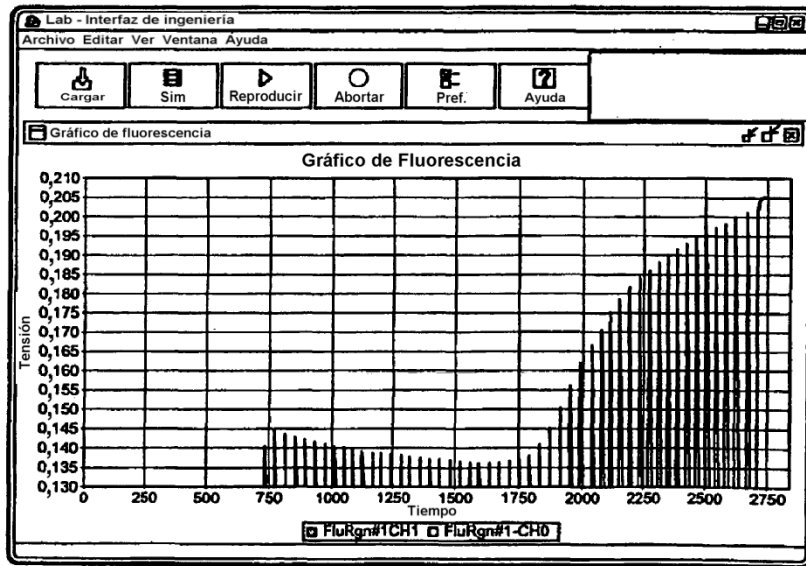


FIG. 41B

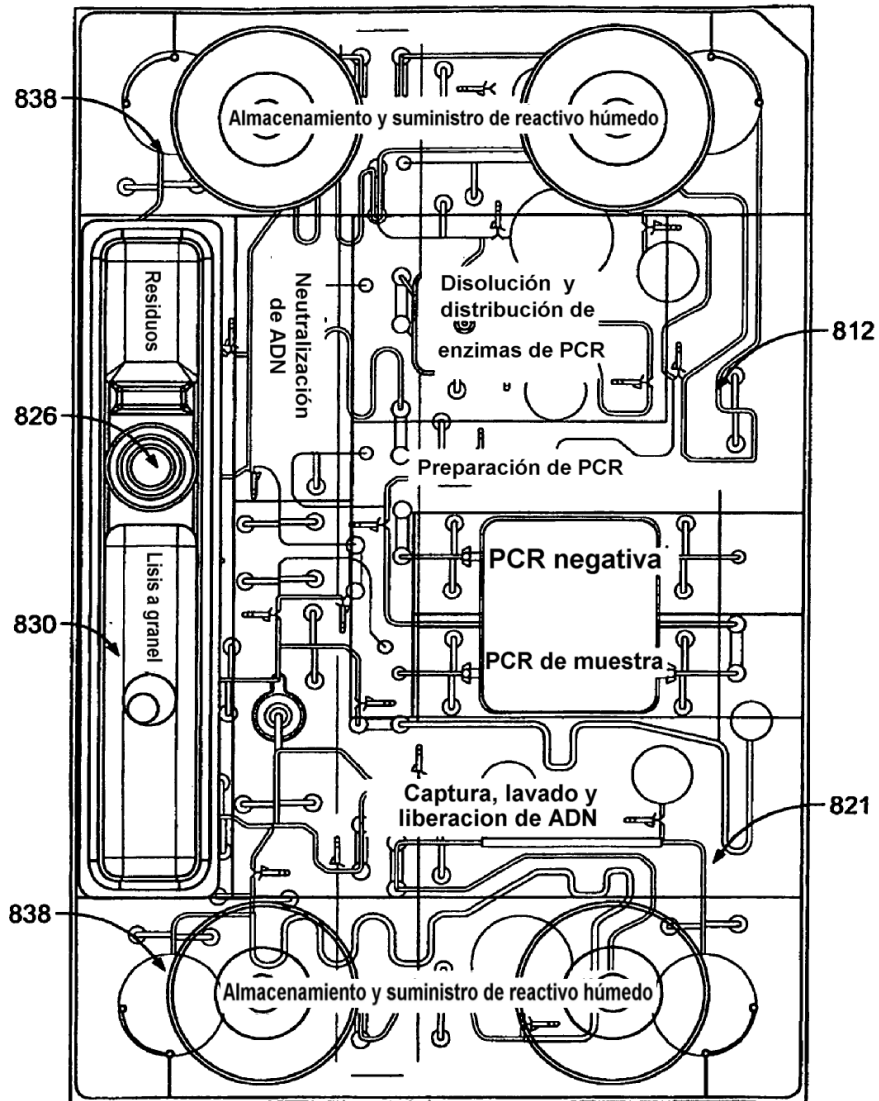


FIG. 42

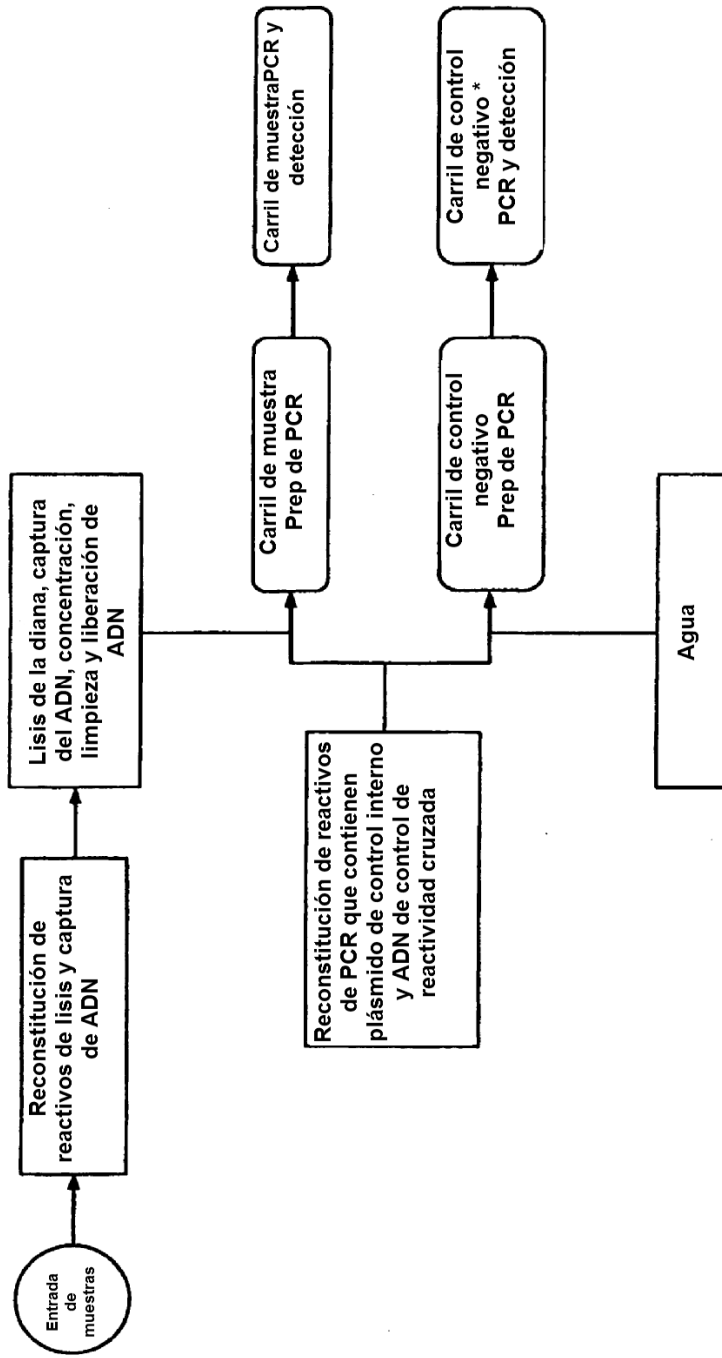


FIG. 43

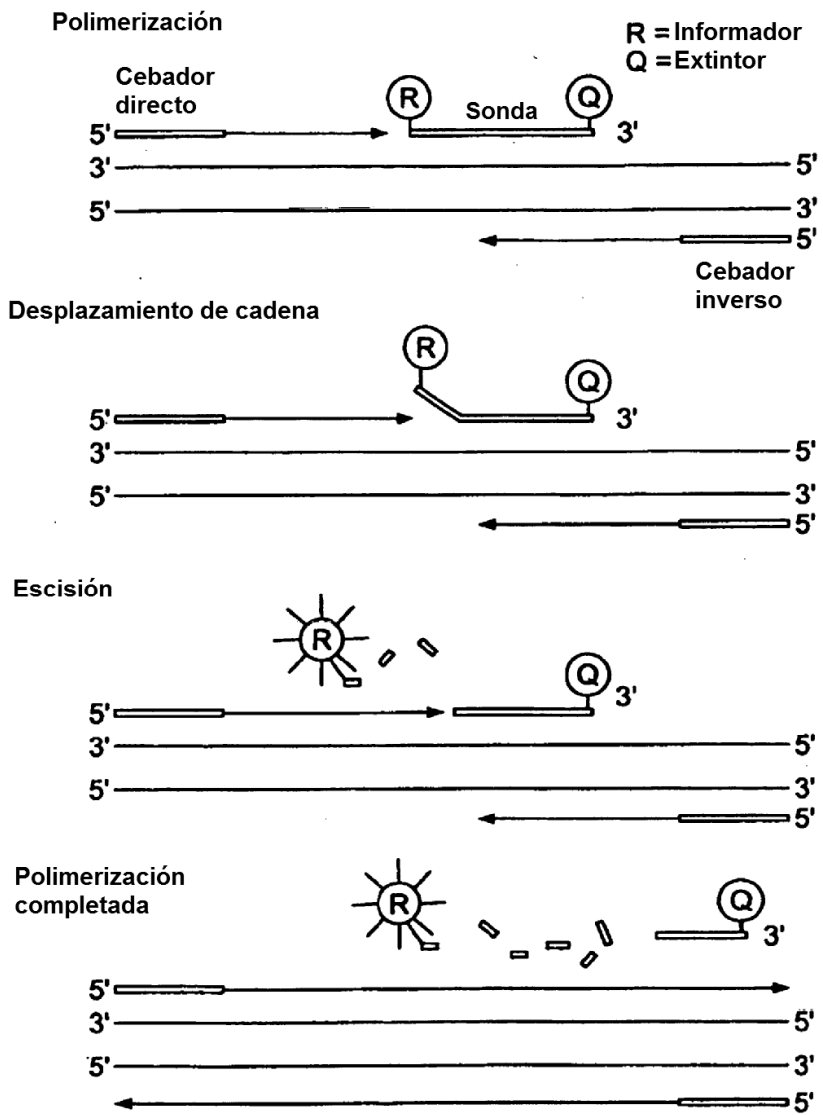


FIG. 44

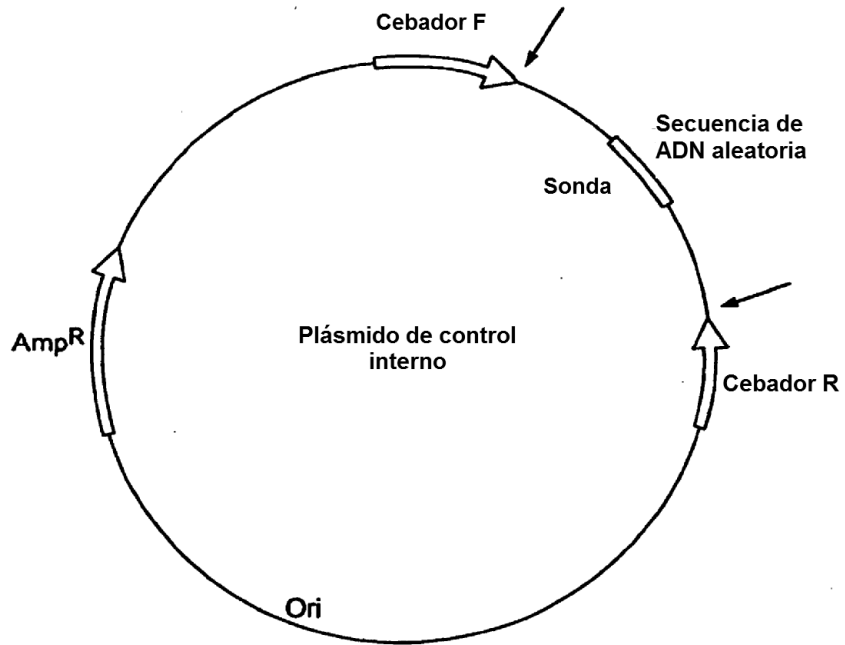


FIG. 45

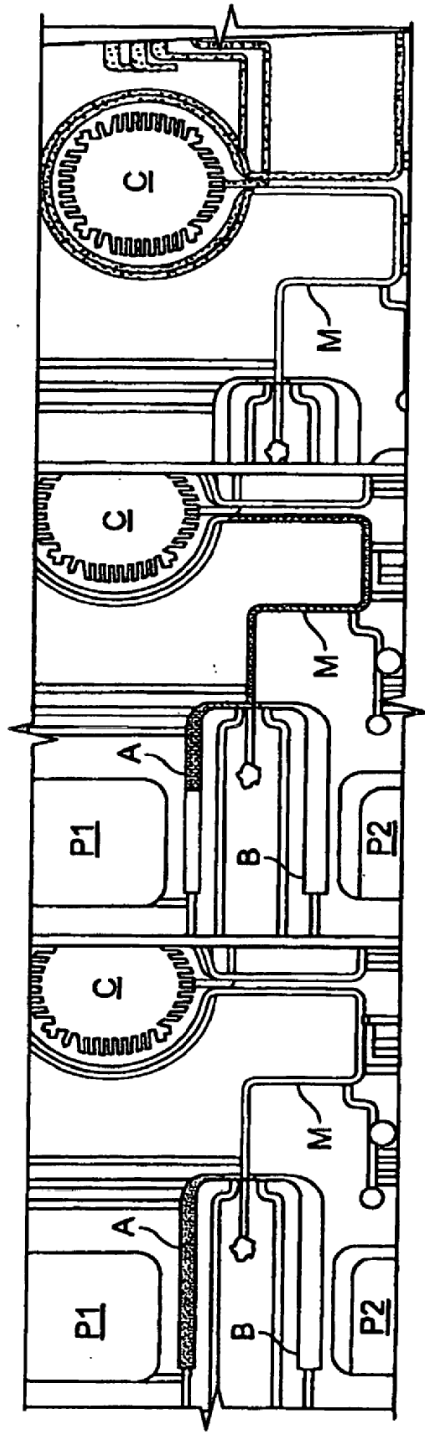


FIG. 46

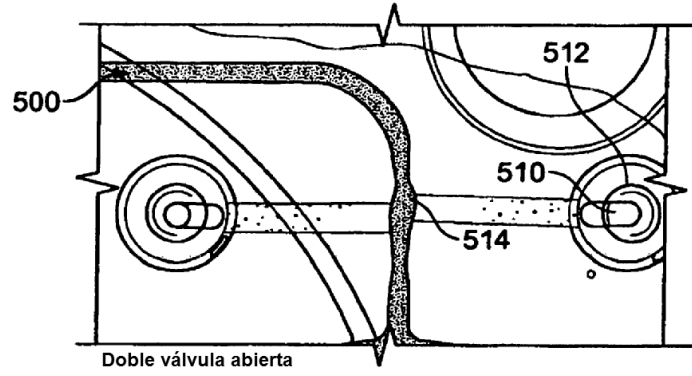


FIG. 47A

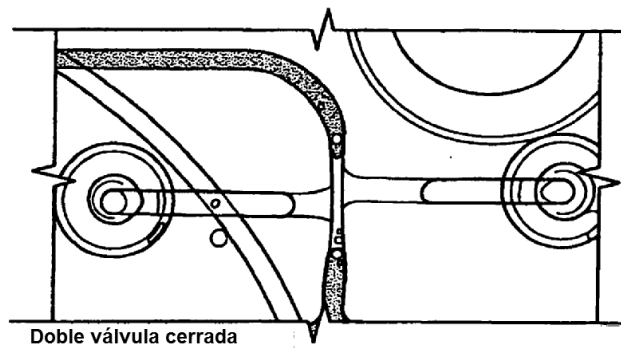


FIG. 47B

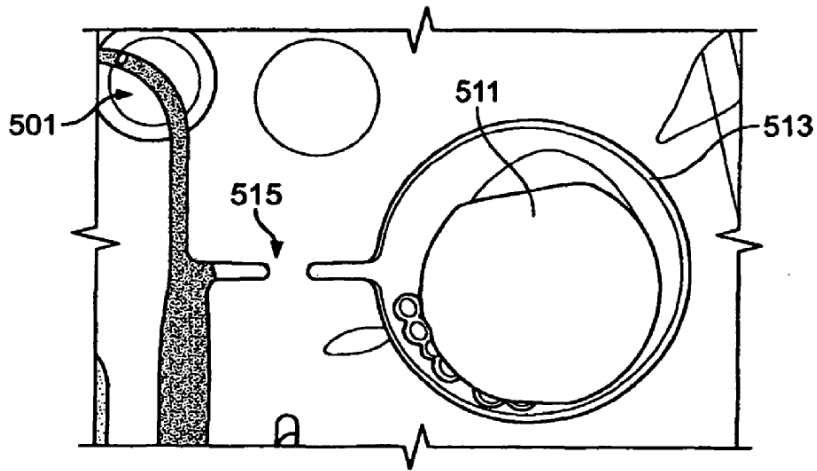


FIG. 47C

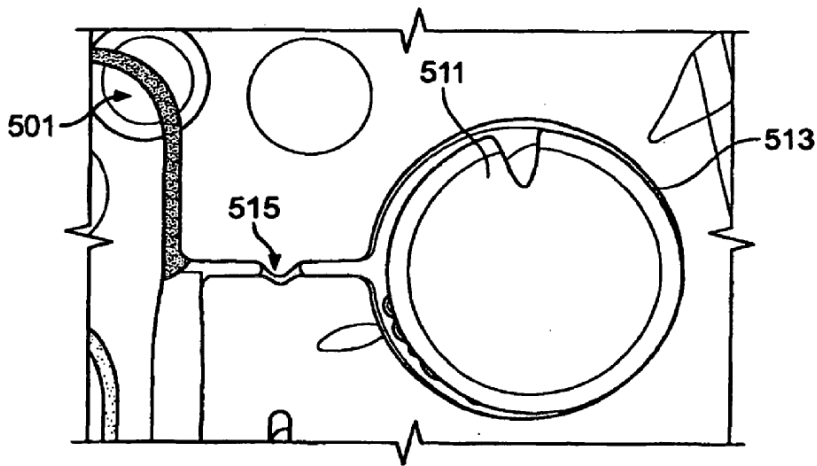


FIG. 47D

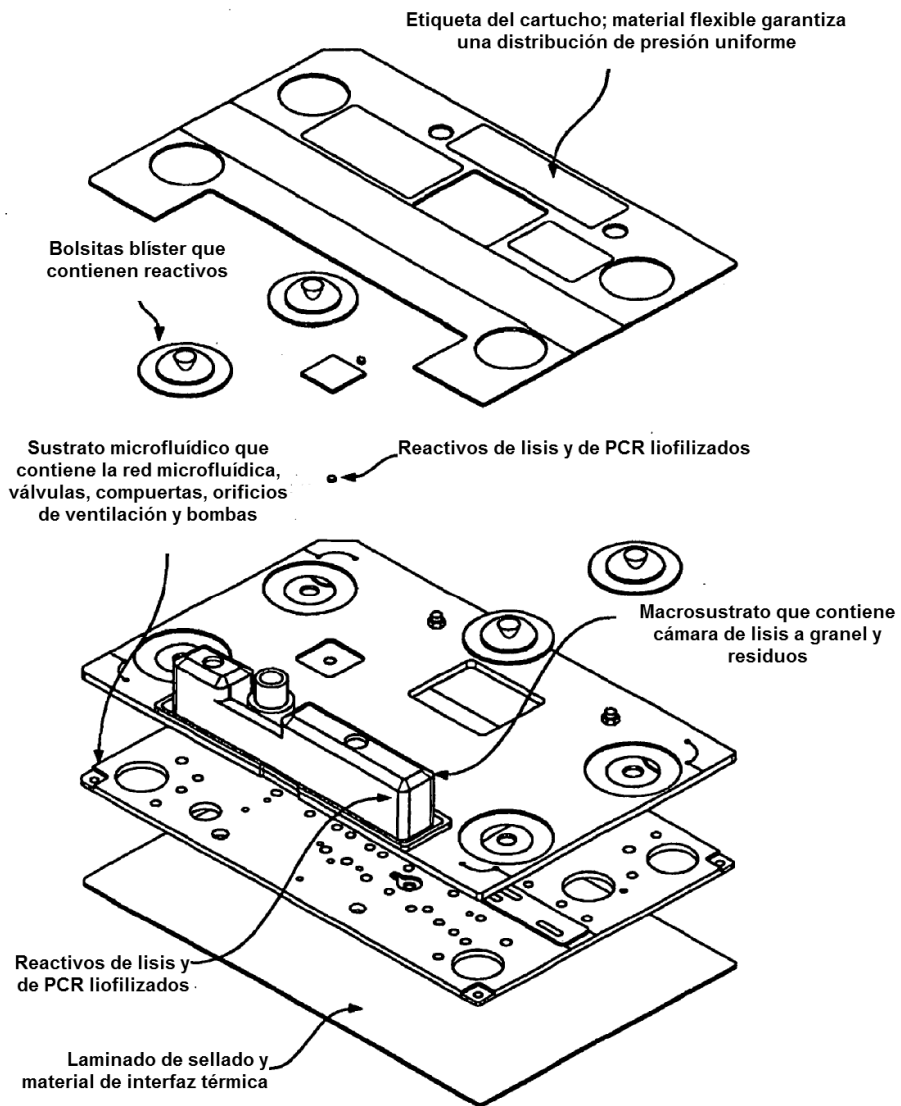
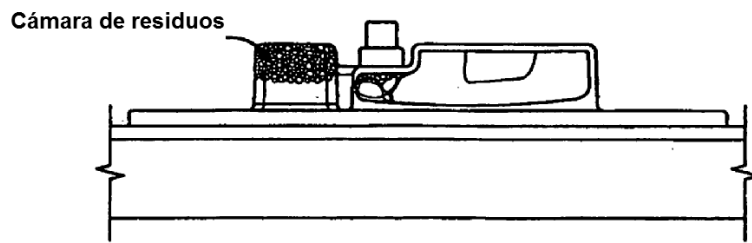
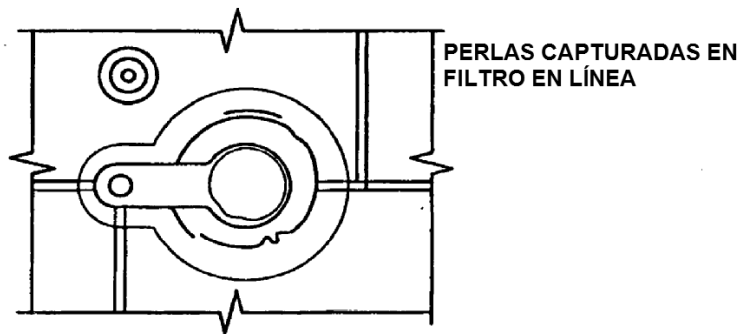
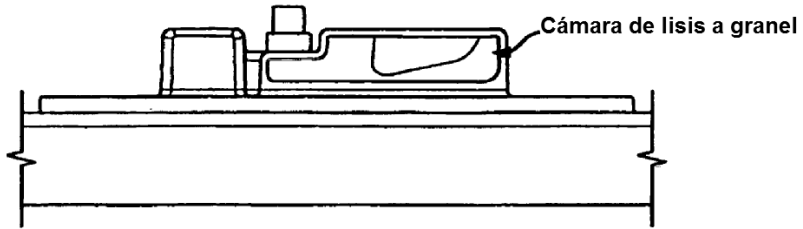


FIG. 48

Antes de la captura por perlas de ADN



Después de la captura por perlas de ADN

FIG. 49

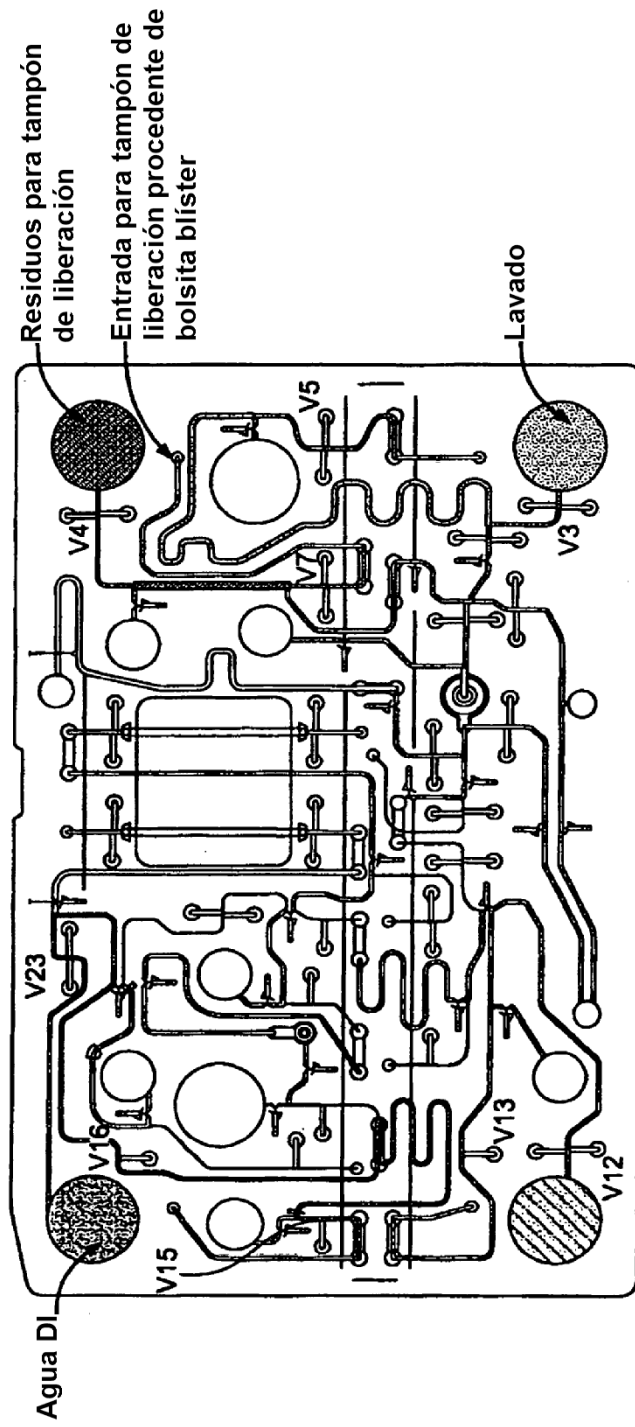


FIG. 50A

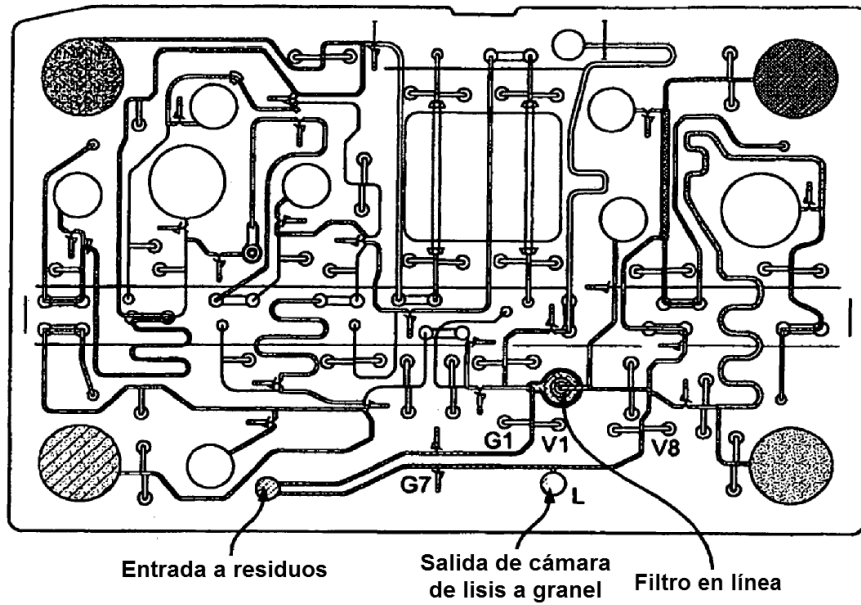


FIG. 50B

Residuos para tampón de lavado

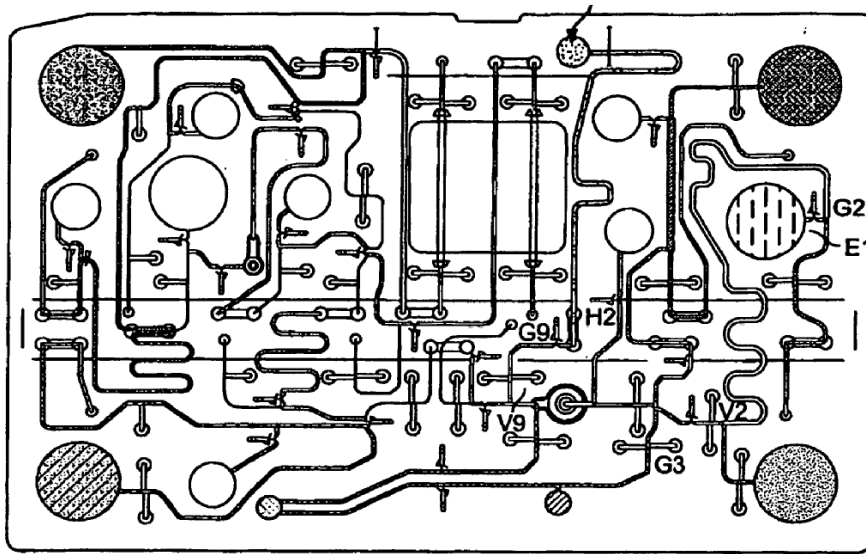
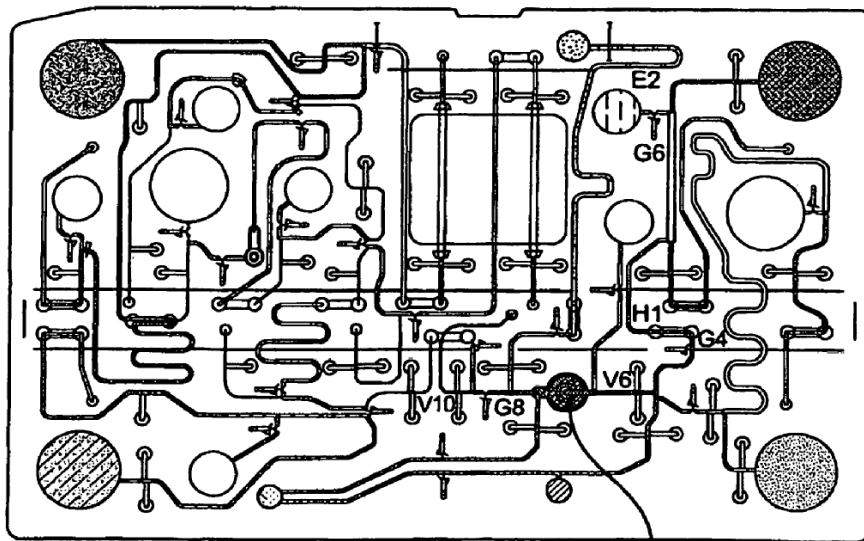


FIG. 50C



Columna de perlas

FIG. 50D

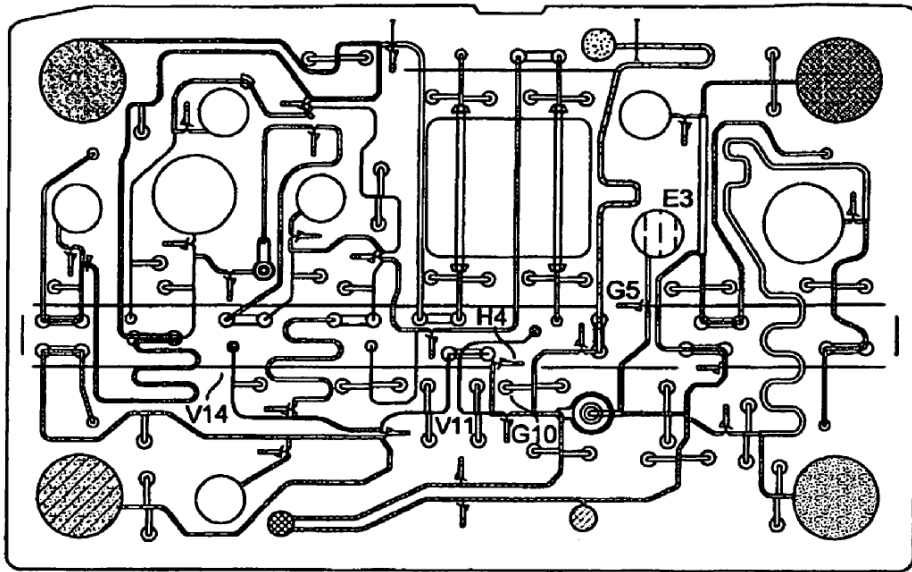
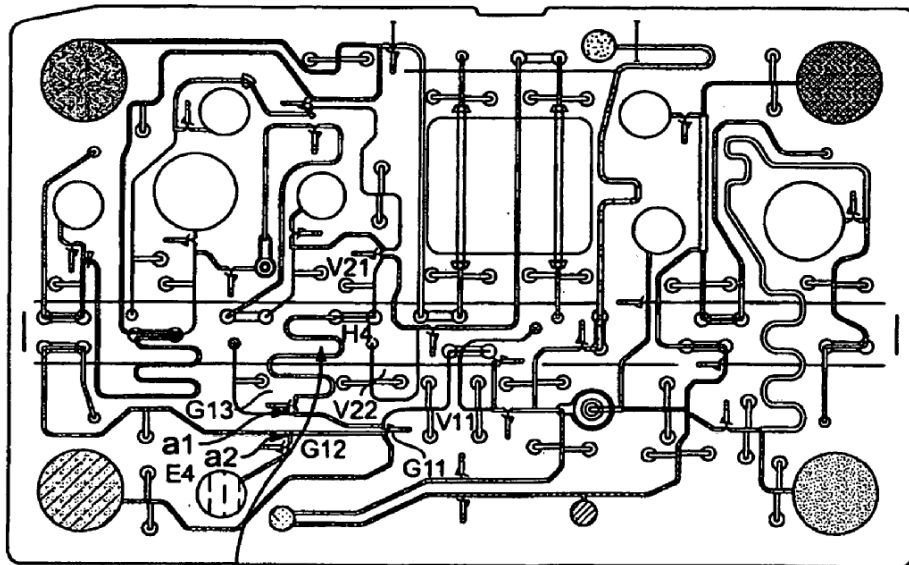


FIG. 50E



Canal de mezcla
de neutralización

FIG. 50F

Microgránulos de reactivo de PCR

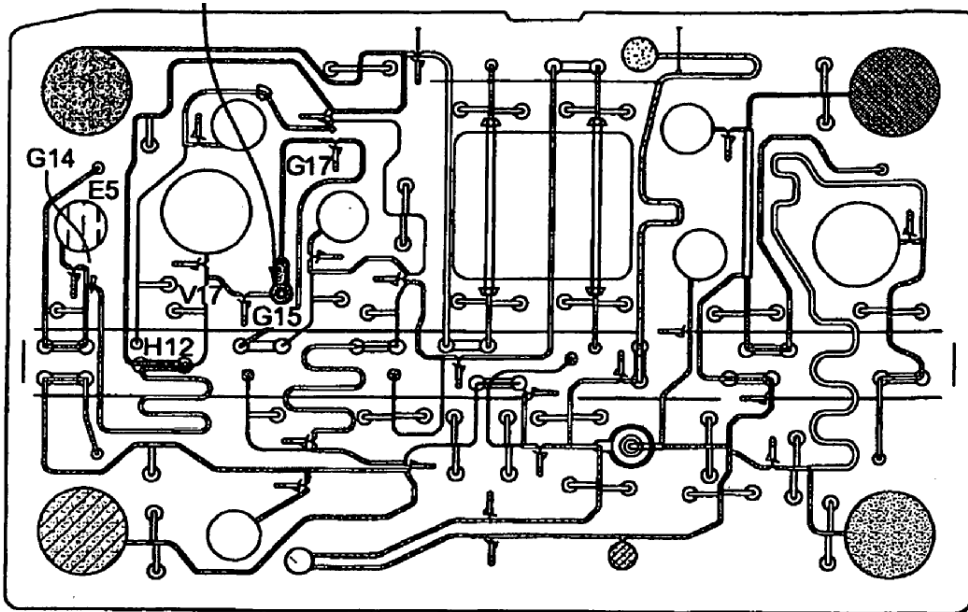


FIG. 50G

Canal de mezcla de enzimas

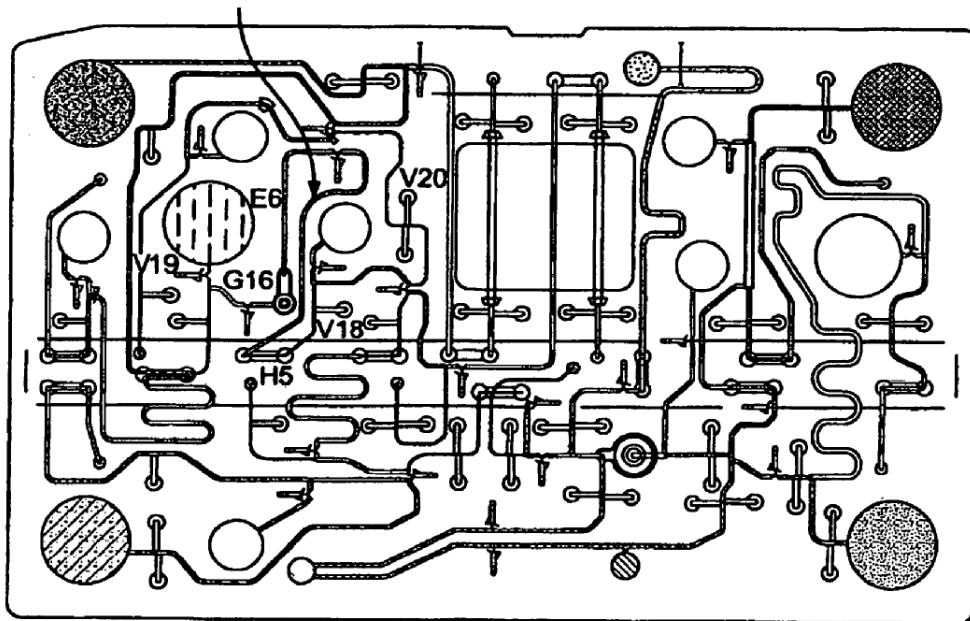


FIG. 50H

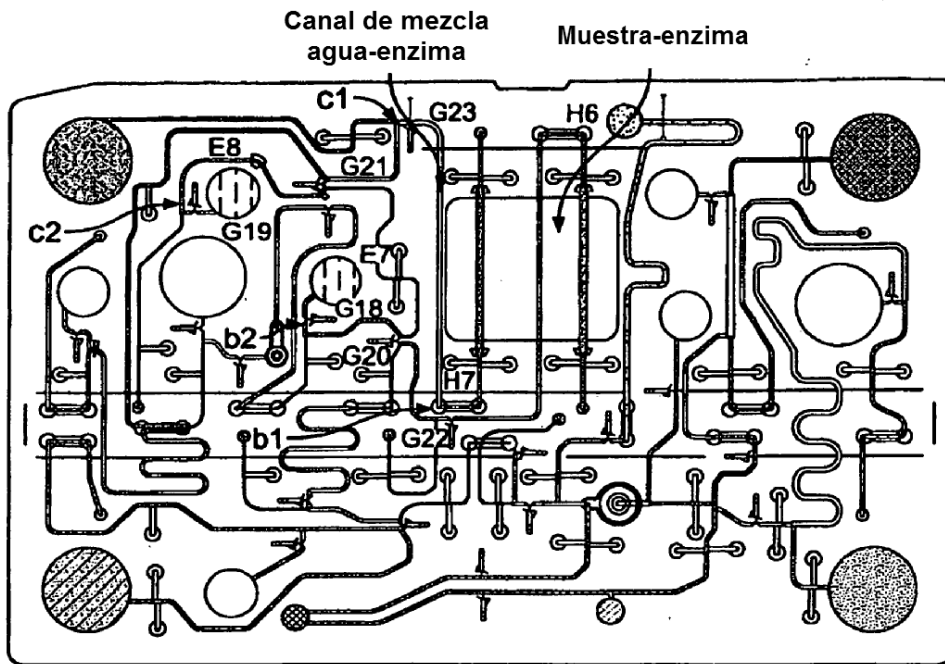


FIG. 50I

Control negativo con
control interno

PCR de muestra con
control interno

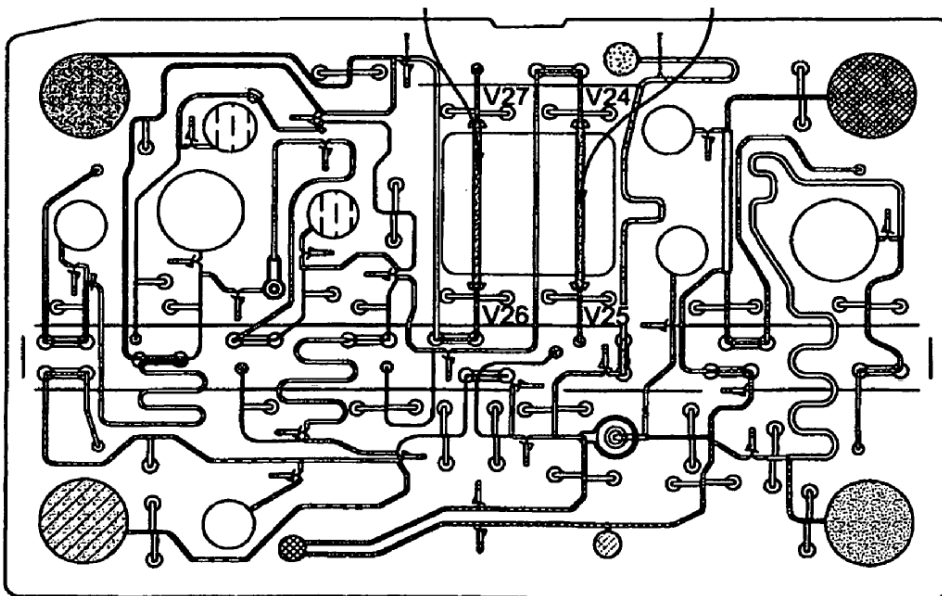


FIG. 50J

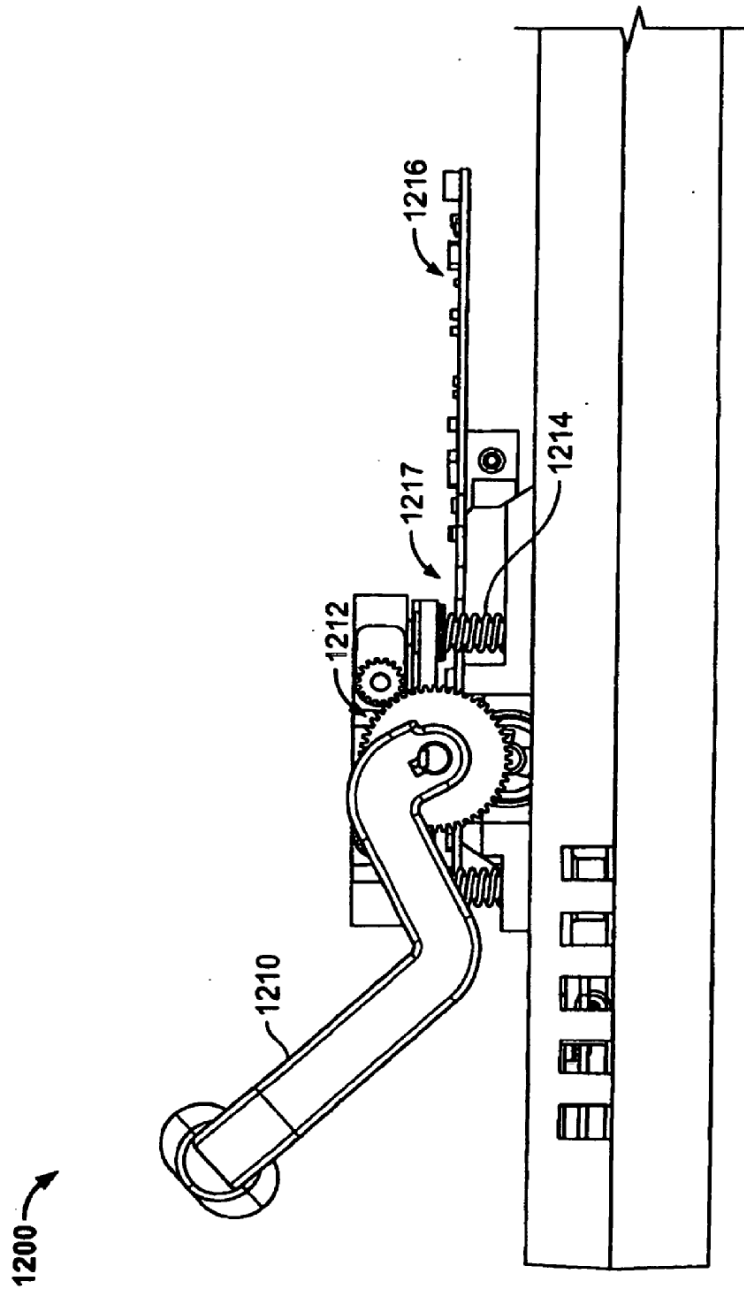


FIG. 51

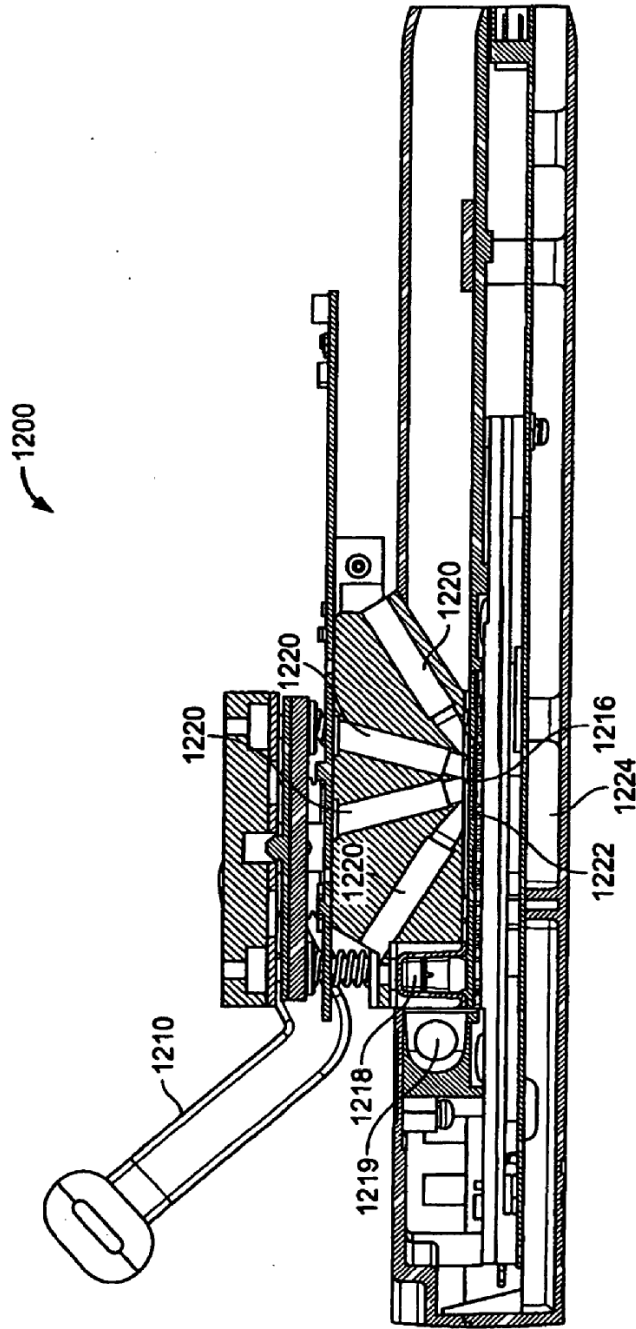


FIG. 52

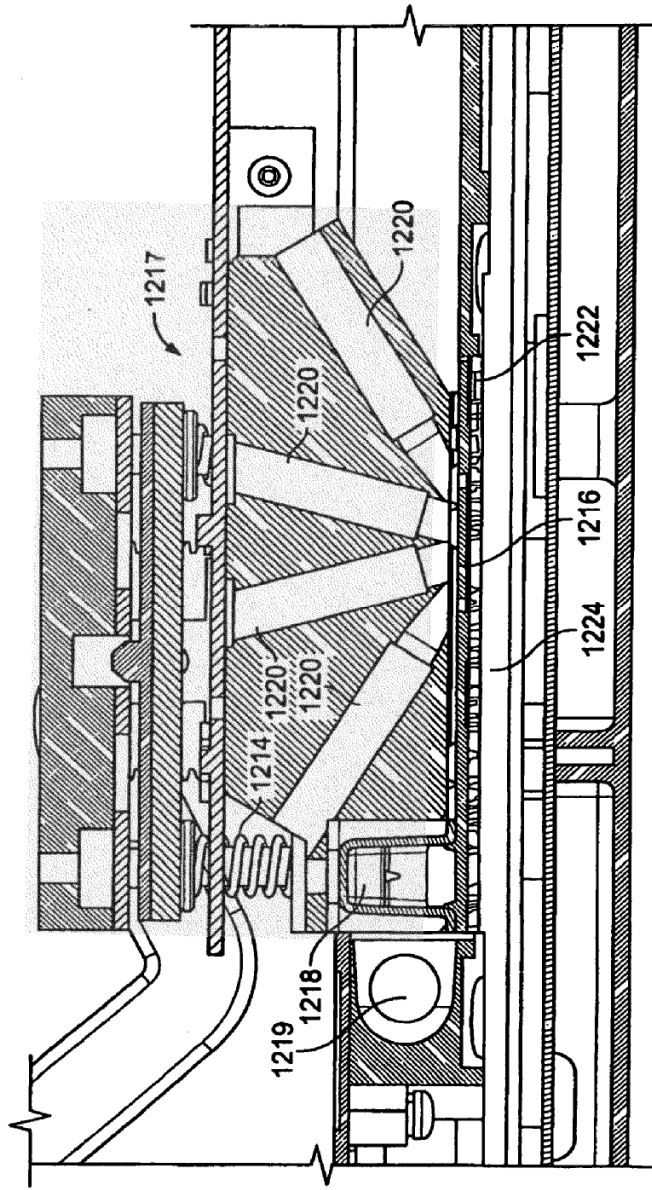


FIG. 53

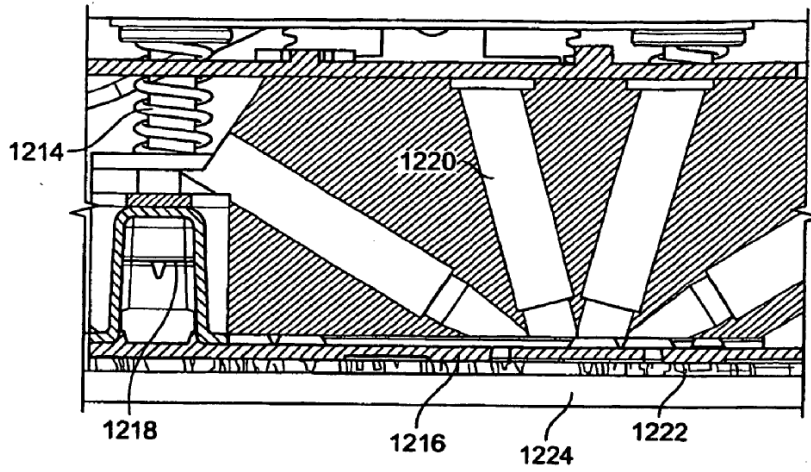


FIG. 54

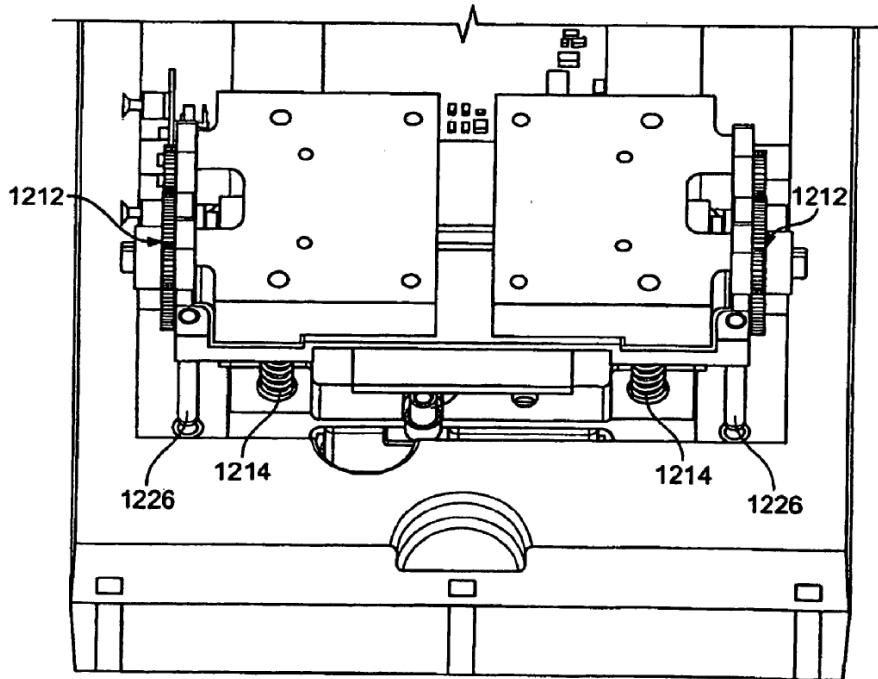


FIG. 55

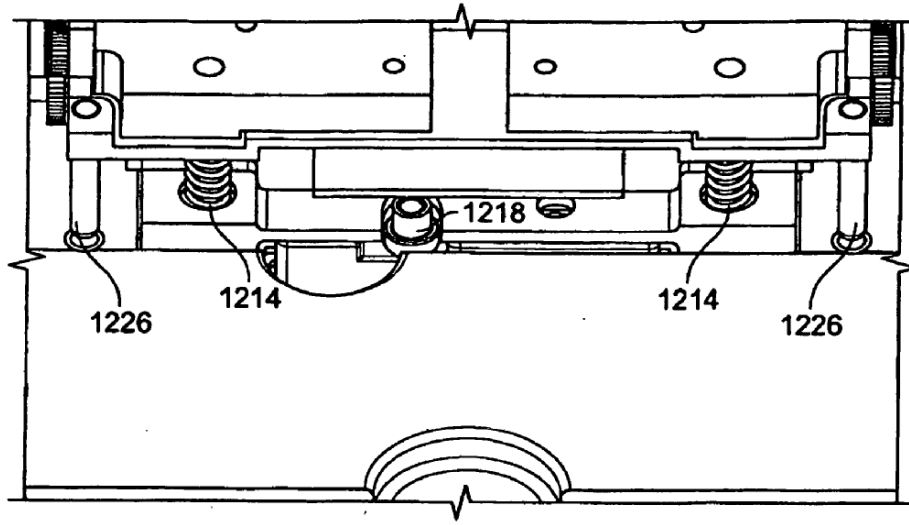


FIG. 56

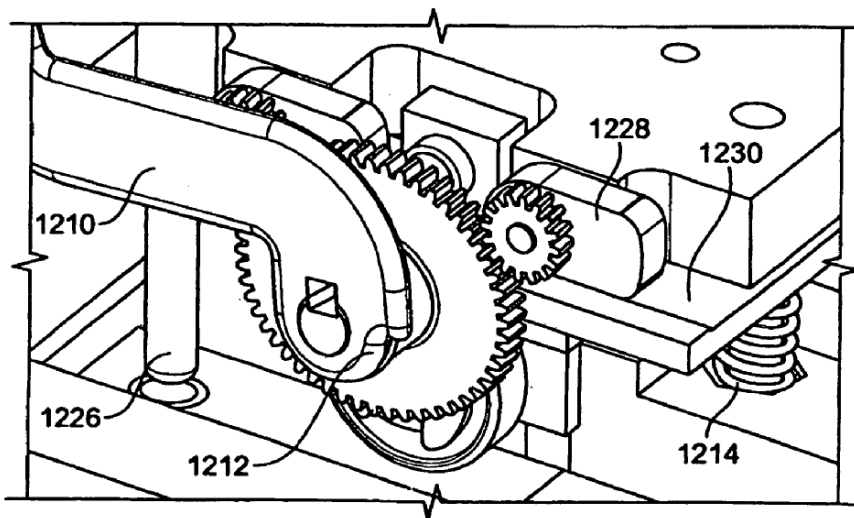


FIG. 57

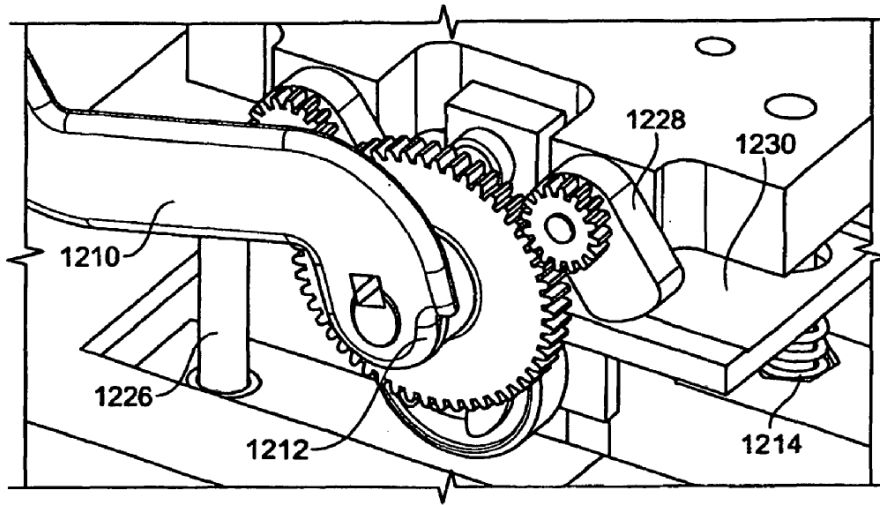


FIG. 58

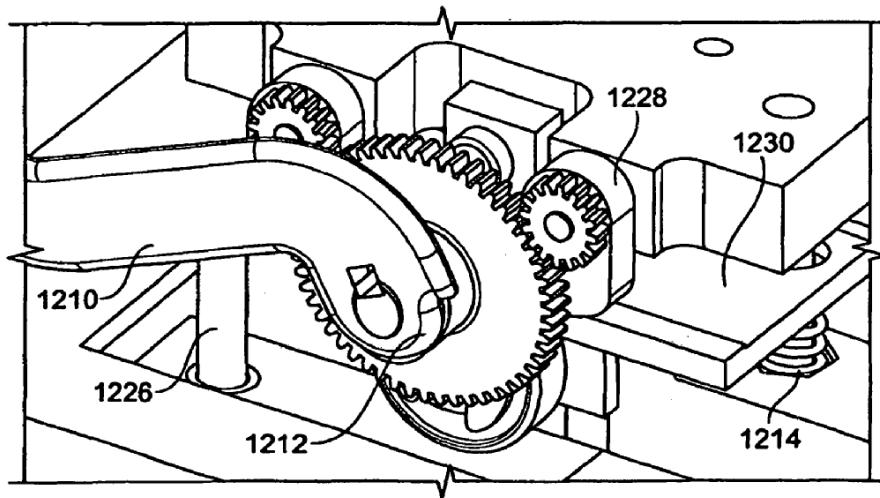


FIG. 59

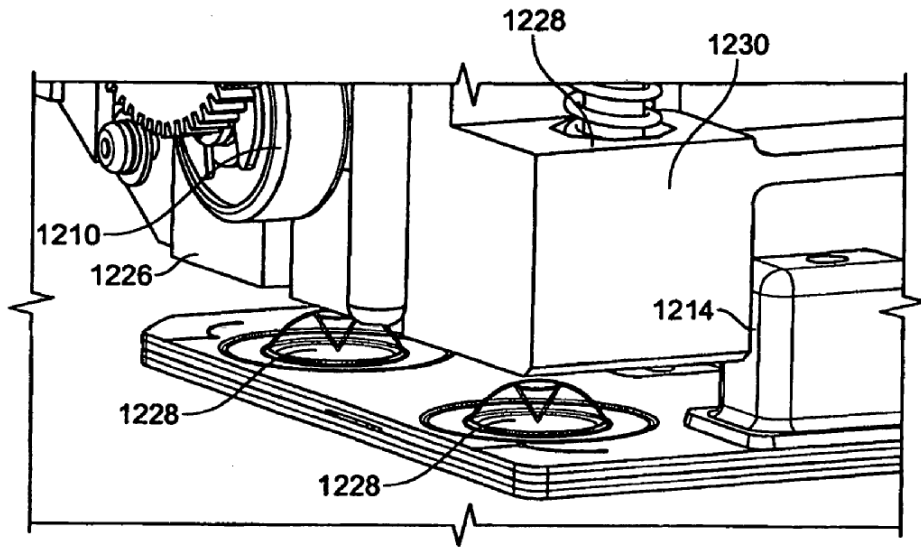


FIG. 60

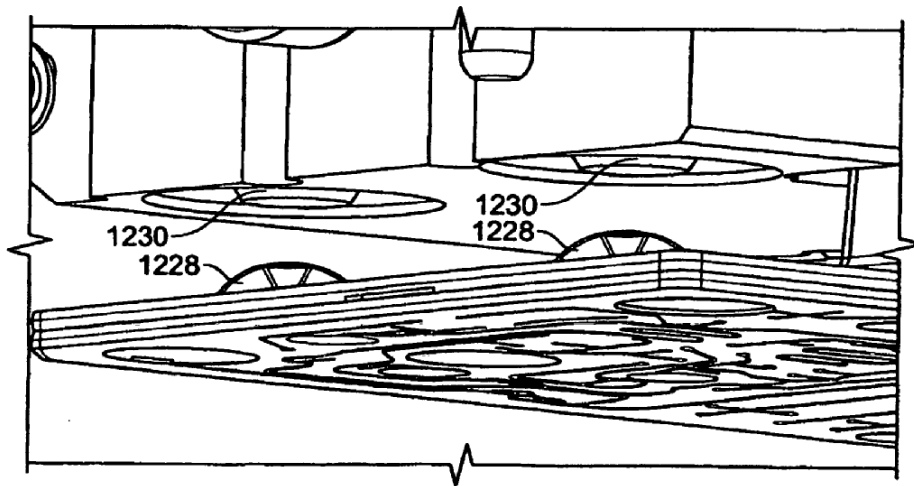


FIG. 61

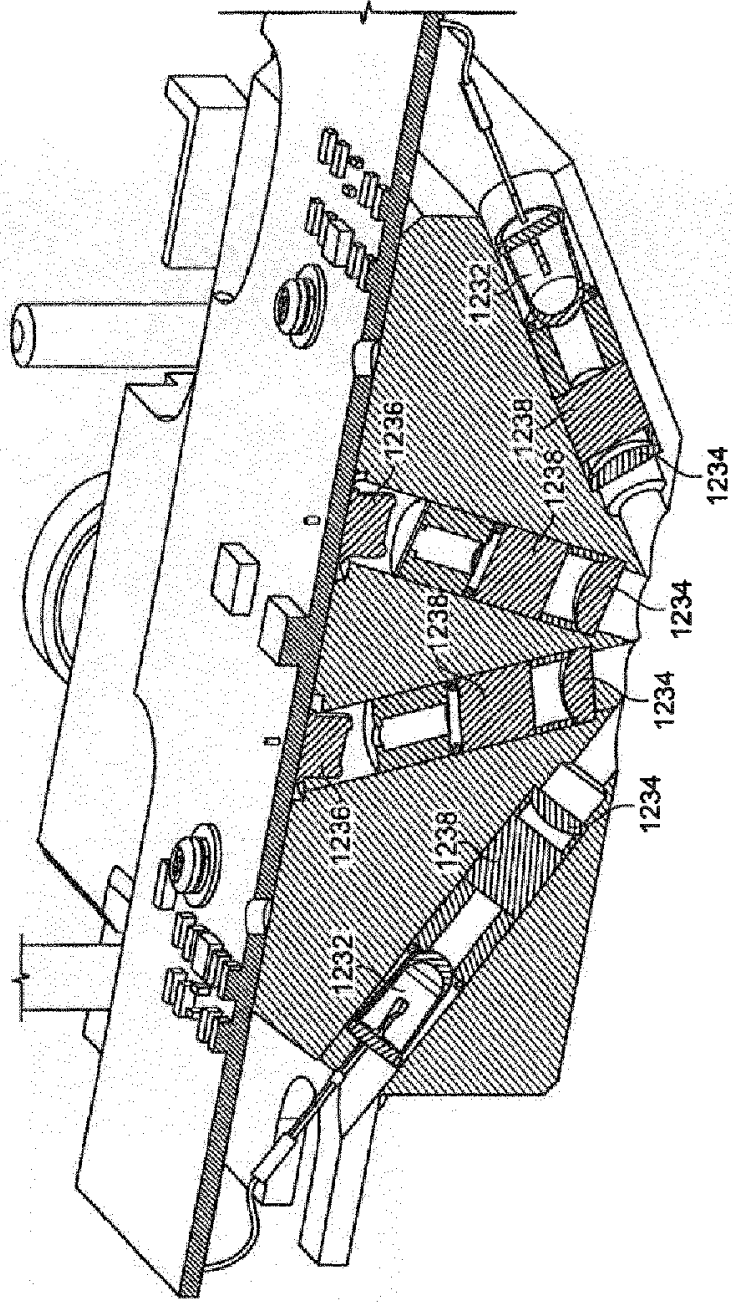


FIG. 62

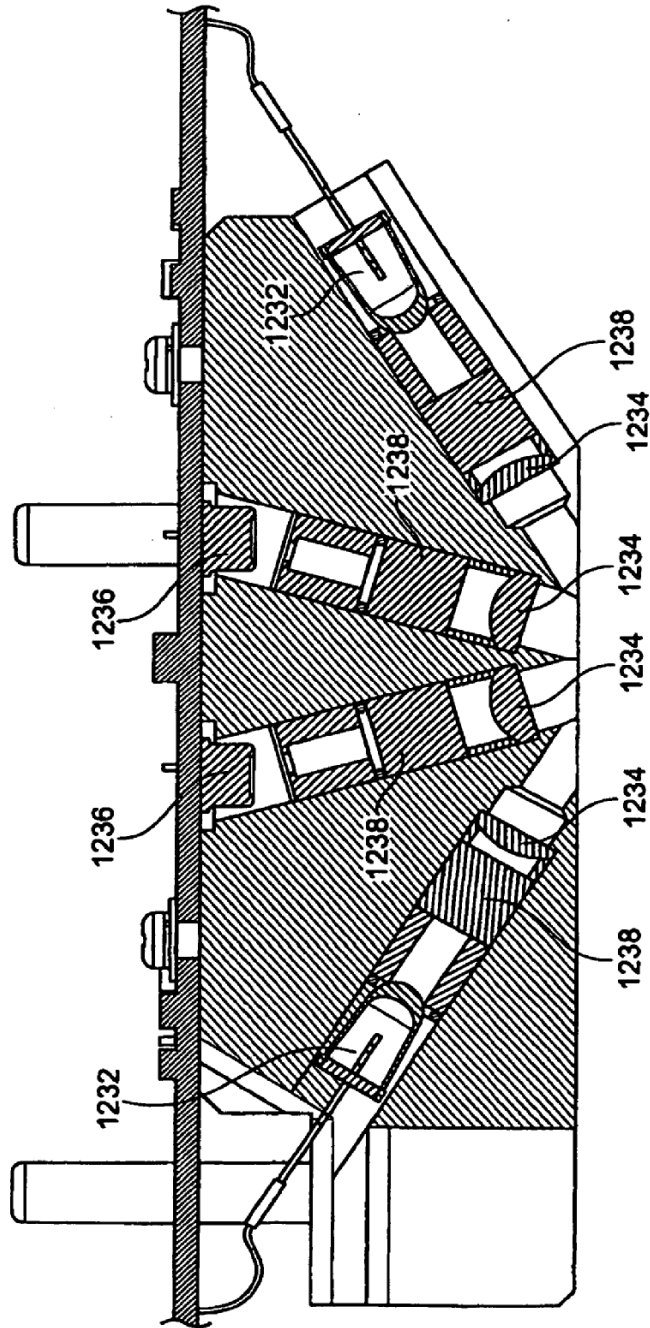


FIG. 63

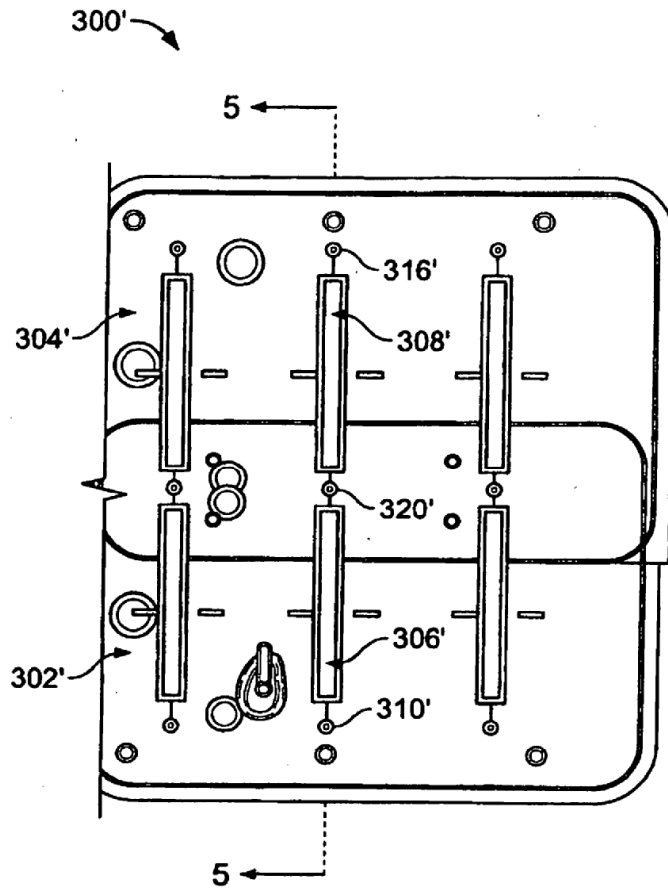


FIG. 64

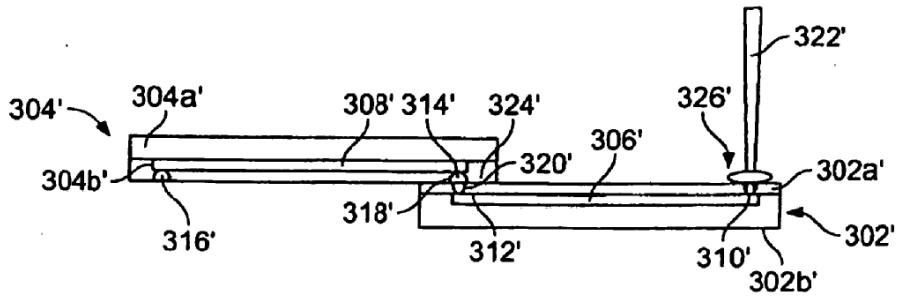


FIG. 65

Captura de ADN mediante perlas de poli-L-lisina

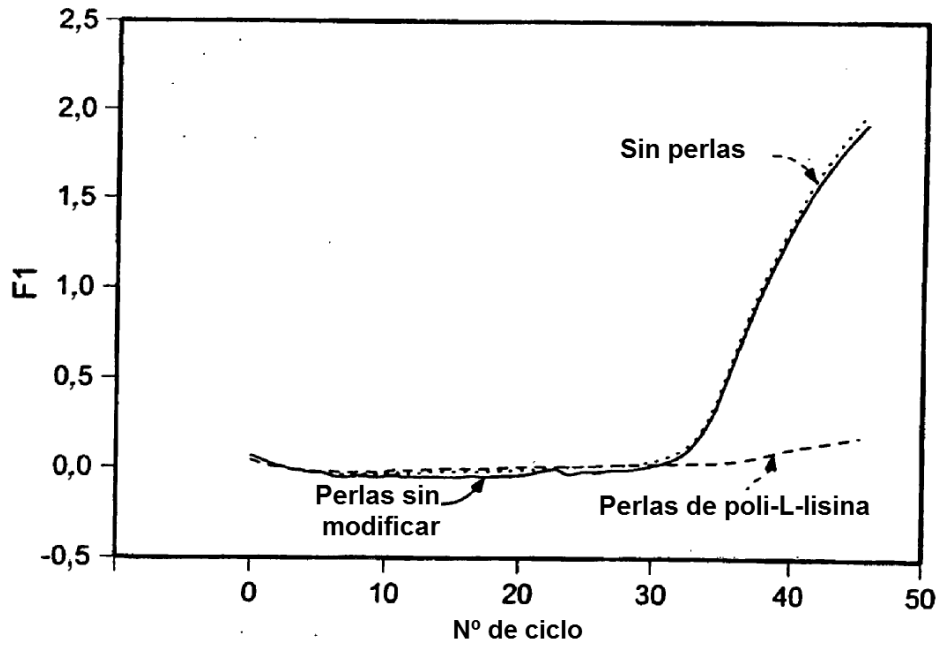


FIG. 66

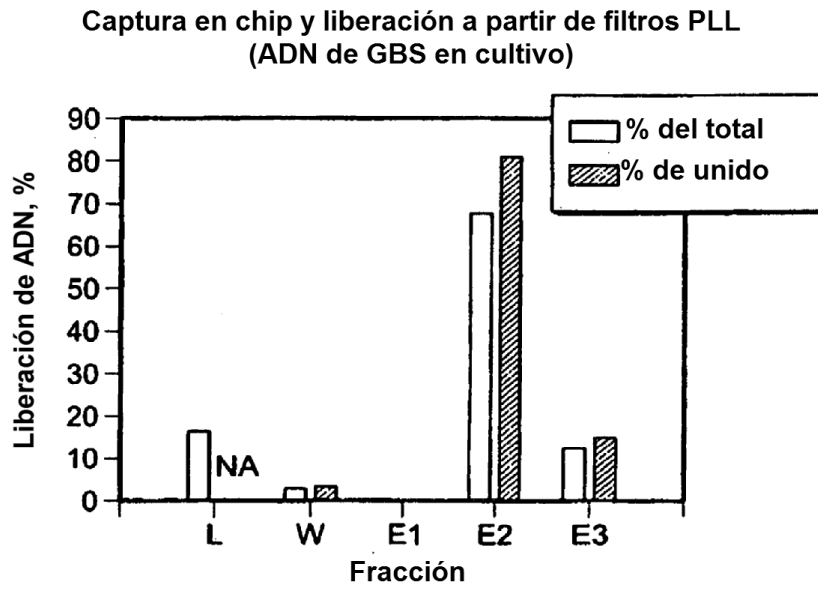


FIG. 67

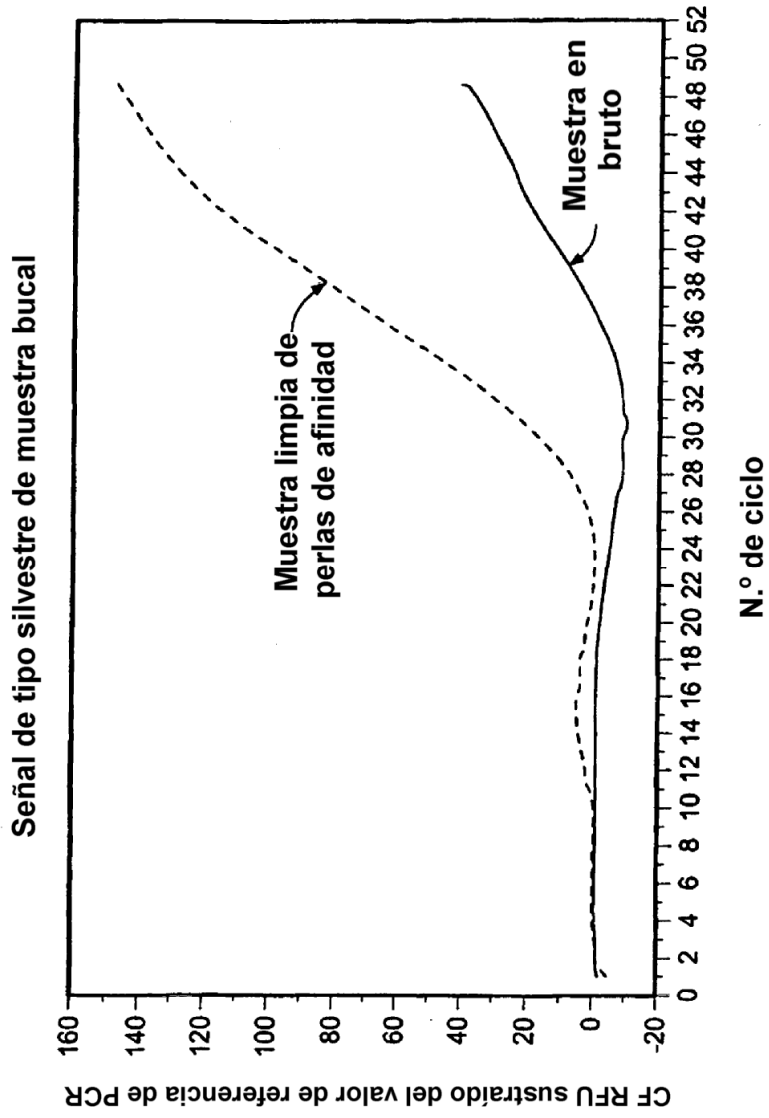


FIG. 68

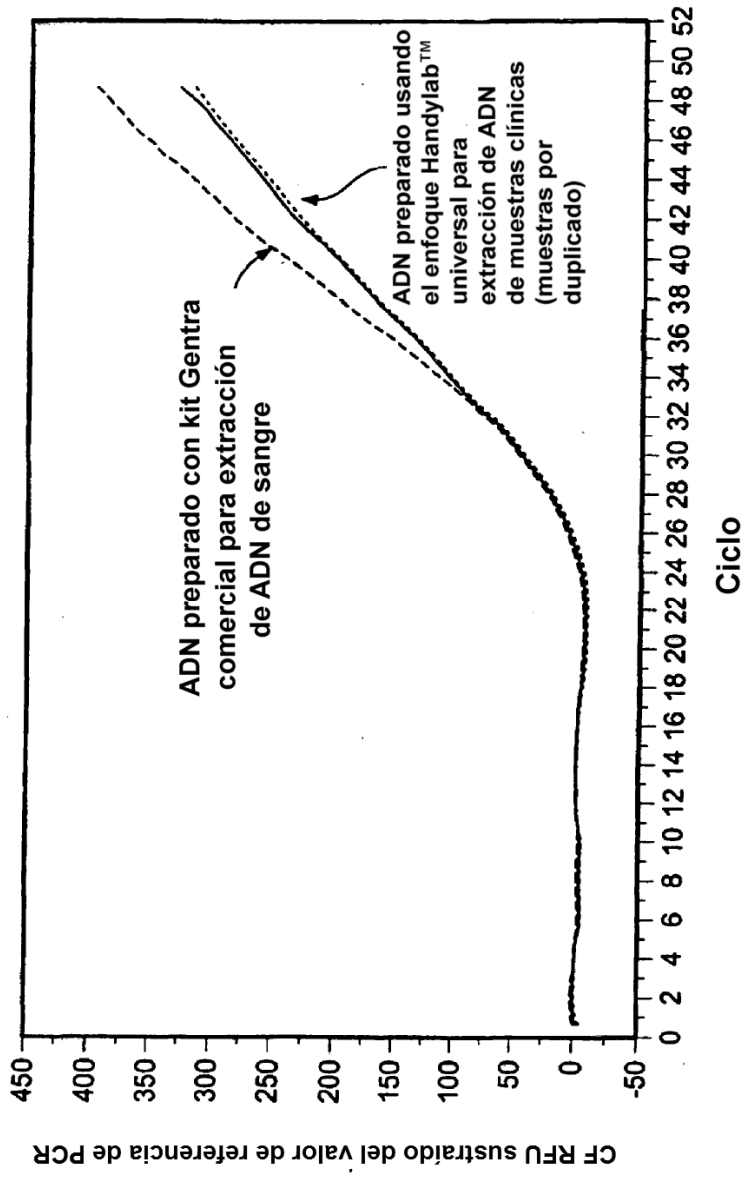


FIG. 69

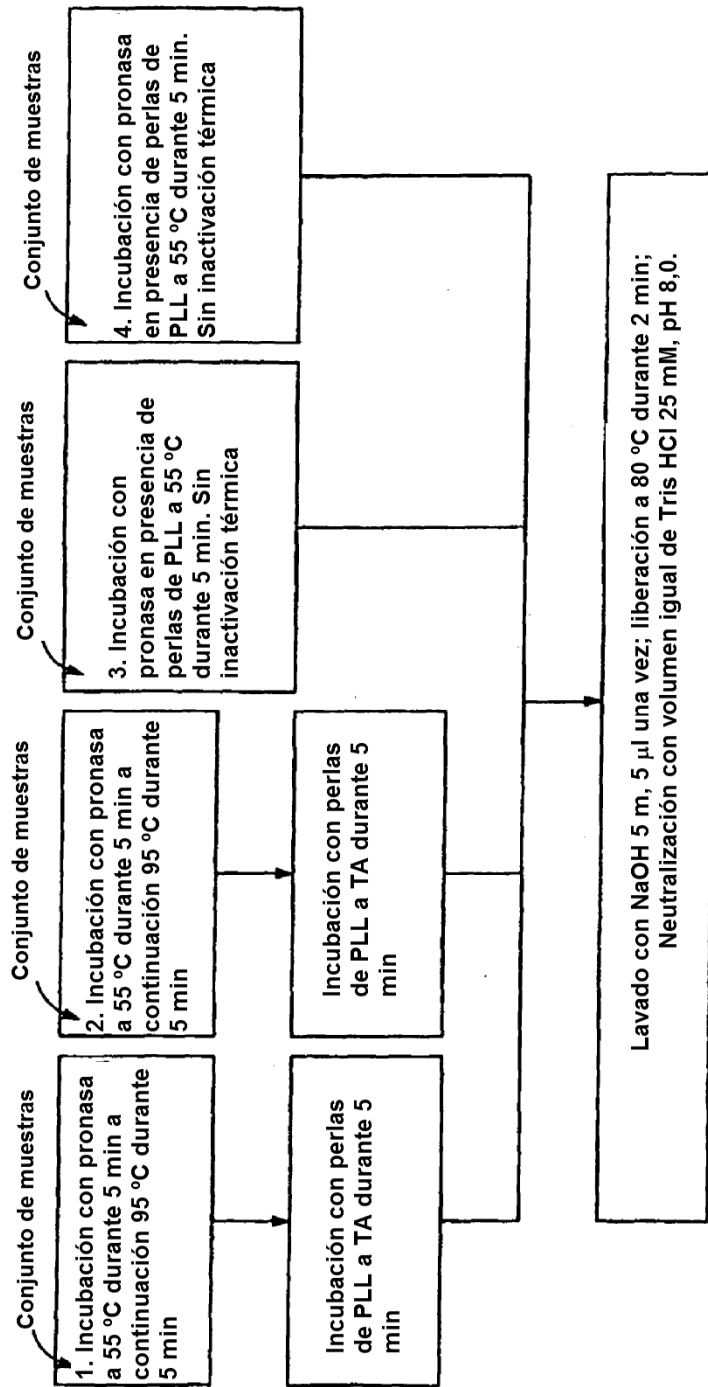


FIG. 70A

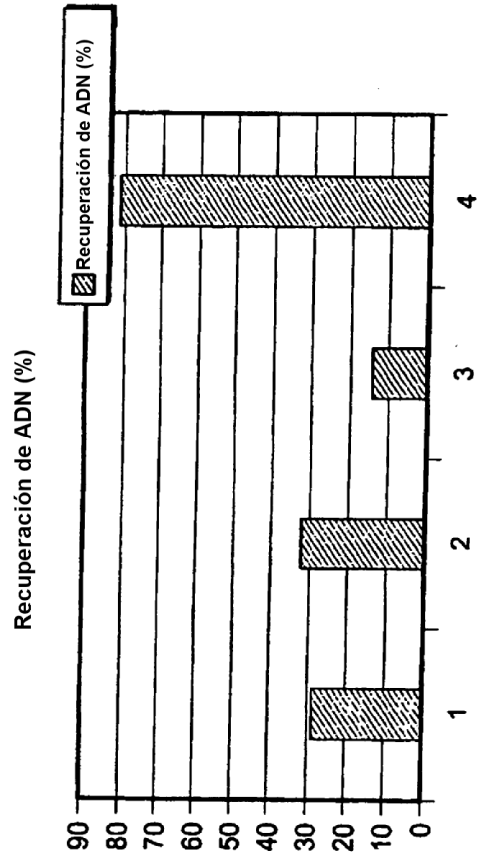


FIG. 70B

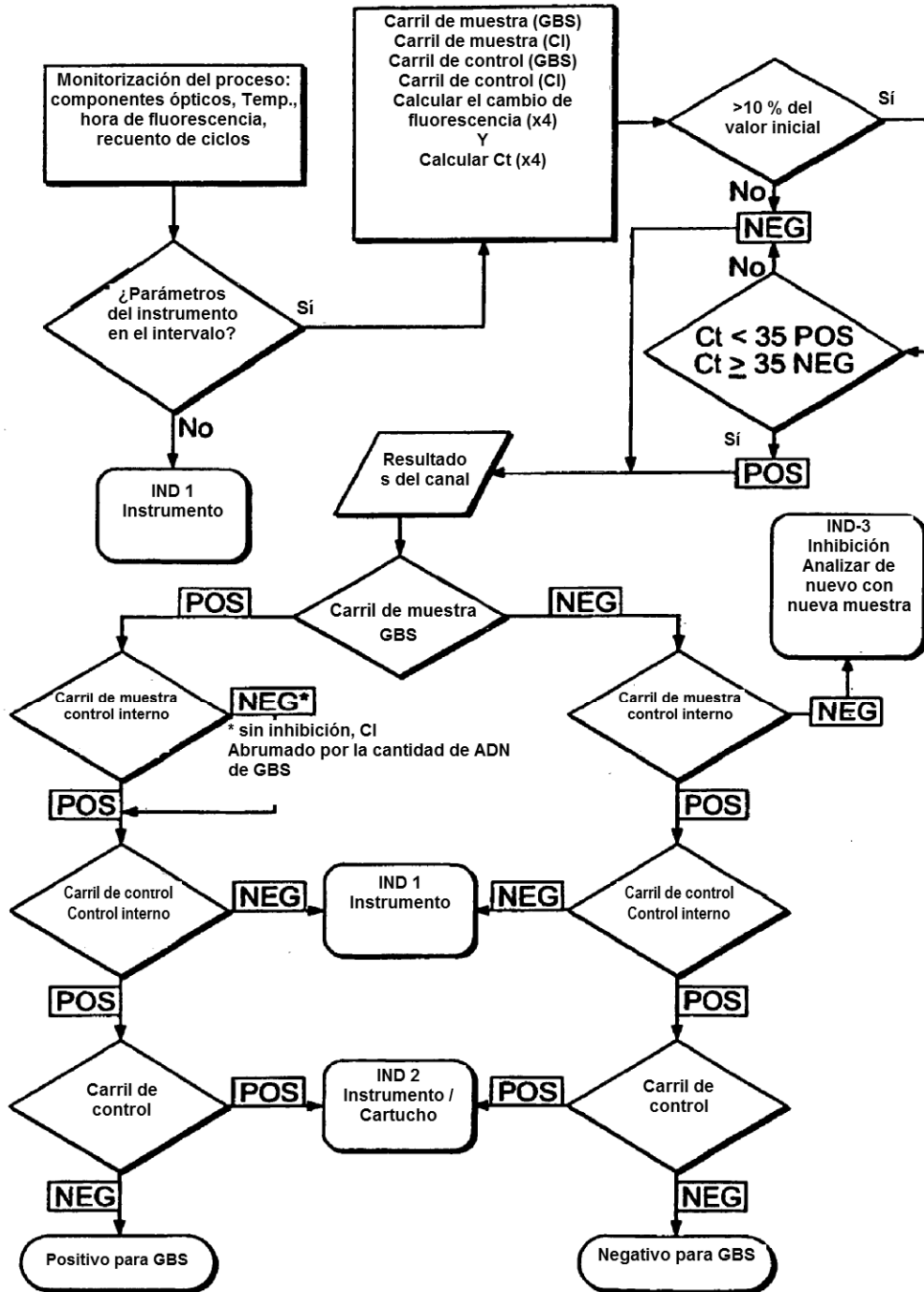


FIG. 71