

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 067**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2008 E 08750065 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2089159**

54 Título: **Análisis**

30 Prioridad:

03.05.2007 US 915884 P
14.03.2008 US 36537

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2013

73 Titular/es:

CLONDIAG GMBH (100.0%)
LOBSTEDTER STRASSE 103-105
07749 JENA, DE

72 Inventor/es:

KAISER, THOMAS;
MÖBIUS, KLAUS-PETER;
SCHULZ, TORSTEN;
UHLIG, THOMAS;
VON SCHENK ZU SCHWEINSBERG,
ALEXANDER;
ERMANTRAUT, EUGEN y
TUCHSCHEERER, JENS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 404 067 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

Análisis.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a análisis (por ejemplo, análisis para determinar uno o más analitos en una muestra).

Antecedentes

10 Los análisis se pueden realizar para determinar la presencia de uno o más analitos en una muestra. Se pueden usar matrices para realizar múltiples análisis (por ejemplo, para cada uno de múltiples analitos diferentes) de una muestra. Las matrices típicas incluyen un sustrato que tiene múltiples zonas de ensayo separadas teniendo cada zona un compuesto sonda diferente, tal como un polinucleótido, anticuerpo o proteína. En uso, la matriz está en contacto con una muestra, que interacciona entonces con los sitios de la matriz. Para cada sitio, la interacción puede incluir, por ejemplo, la unión de un analito correspondiente a los compuestos sonda del sitio y/o una reacción química entre el analito correspondiente y los compuestos sonda. La reacción da como resultado un producto detectable (por ejemplo, un precipitado). La presencia y magnitud de interacción depende de si está presente en la muestra un analito correspondiente.

15 Típicamente, la interacción se detecta ópticamente (por ejemplo, por fluorescencia). Por ejemplo, la detección óptica se puede realizar usando un detector de imagen (por ejemplo, un CCD) que tenga múltiples elementos fotosensibles (por ejemplo, píxeles) separados entre sí en al menos una (por ejemplo, dos) dimensión. Cada uno de los elementos fotosensibles está colocado de forma que reciba la luz desde una localización espacial diferente del sustrato. De este modo, la luz detectada simultáneamente por múltiples elementos fotosensibles se puede combinar formando datos de imágenes en al menos una (por ejemplo, dos) dimensión del sustrato. Se pueden evaluar los datos de imágenes para determinar la presencia y/o magnitud de interacción en múltiple sitios de la matriz.

Sumario

25 La presente descripción se refiere a análisis (por ejemplo, análisis para determinar múltiples analitos en una muestra).

En un aspecto, un método comprende:

30 poner en contacto una matriz de zonas de ensayo separadas con una muestra líquida, estando dispuestas las zonas de ensayo entre una superficie interna de un primer sustrato y una superficie interna de un segundo sustrato de un dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo cada zona de ensayo un compuesto sonda configurado para participar en un análisis para determinar un analito diana,

reducir una distancia entre las superficies internas del primer y segundo sustratos en localizaciones correspondientes a las zonas de ensayo, y

35 secuencialmente determinar ópticamente la presencia de una interacción en cada una de las múltiples zonas de ensayo para las que se reduce la distancia entre las superficies internas en la localización correspondiente, siendo la interacción en cada zona de ensayo indicativa de la presencia en la muestra de un analito diana.

El método puede comprender además, para cada una de las múltiples zonas de ensayo, determinar la presencia de un analito respectivo basado en la interacción determinada ópticamente.

40 Para cada una de al menos algunas de las zonas de ensayo, la interacción en cada una de las múltiples zonas de ensayo puede ser una reacción de unión entre el analito y el compuesto sonda de la zona de ensayo.

La determinación óptica puede comprender la detección de luz de cada una de las zonas de ensayo, usando un detector de orden cero.

45 La detección de luz de cada una de las zonas de ensayo usando un detector de orden cero puede consistir esencialmente en la detección de luz con el detector de orden cero.

El método puede comprender además, para cada una de las múltiples localizaciones para las que se redujo la distancia entre las superficies internas del primer y segundo sustratos, aumentar subsiguientemente la distancia entre las superficies internas después de la etapa de determinación óptica en la zona de ensayo.

50 La reducción de una distancia puede comprender secuencialmente reducir la distancia entre las superficies internas del primer y segundo sustratos en localizaciones correspondientes a las zonas de ensayo. En esta realización, el método puede comprender además, para cada una de las múltiples localizaciones para las que se redujo la distancia

entre las superficies internas del primer y segundo sustratos, aumentar subsiguientemente la distancia entre las superficies internas después de la etapa de detección óptica de la unión en la zona de ensayo.

5 La determinación óptica puede comprender secuencialmente la detección de la interacción en cada una de las múltiples zonas de ensayo para las que se reduce la distancia entre las superficies internas en la correspondiente localización. En una realización, la detección óptica comprende detectar simultáneamente luz procedente de no más de un número N de zonas de ensayo, donde $N \leq 5$ o $N \leq 3$ o $N = 1$. Alternativamente, la determinación óptica comprende detectar luz procedente de cada una de las zonas de ensayo usando un detector de orden cero. La detección de luz procedente de cada una de las zonas de ensayo usando un detector de orden cero puede consistir esencialmente en la detección de luz con el detector de orden cero.

10 La detección óptica puede comprender trasladar el dispositivo microfluídico con respecto a una zona de detección óptica de un detector óptico usado para realizar la determinación óptica.

La reducción de una distancia comprende trasladar el dispositivo microfluídico con respecto a un elemento que aplica una fuerza de compresión al dispositivo microfluídico. El traslado del dispositivo microfluídico con respecto al elemento puede comprender girar al menos una porción del miembro.

15 Cada zona de ensayo puede ser alargada y definir un eje principal. Además, el traslado del dispositivo microfluídico puede comprender trasladar el dispositivo a lo largo de un eje de traslación generalmente perpendicular al eje principal de cada una de las múltiples zonas de ensayo. Por ejemplo, el eje de traslación y el eje principal de las múltiples zonas de ensayo son perpendiculares con una desviación de 10° o menos o incluso de 5° o menos.

20 Además, el eje de traslación y el eje principal de la mayor parte o incluso de todas las zonas de ensayo pueden ser generalmente perpendiculares.

El método puede comprender además, durante la etapa de traslado, la lectura de la información contenida en un código de referencia del dispositivo microfluídico y la determinación basándose en la información leída de una propiedad de cada una de las múltiples zonas de ensayo.

25 La determinación puede comprender determinar, para cada una de las múltiples zonas de ensayo, un valor indicativo de cuándo la zona de ensayo está en una zona de detección de un detector óptico usado para realizar la detección óptica. Además, la determinación puede comprender determinar una propiedad fisicoquímica de zonas de ensayo del dispositivo microfluídico. Por ejemplo, la propiedad fisicoquímica es indicativa de un analito que puede ser determinado en cada una de las múltiples zonas de ensayo. Además, la determinación puede comprender determinar una identidad de reactivos almacenados dentro del dispositivo microfluídico antes de su uso.

30 La relación entre una longitud a lo largo del eje principal y una anchura a lo largo de una dimensión perpendicular de las zonas de ensayo puede ser al menos 2,5 o incluso al menos 5.

La etapa de detección óptica se puede realizar sin poner primero en contacto las zonas de ensayo con un líquido exento de la muestra después de la etapa de puesta en contacto.

La determinación óptica puede comprender excitar y detectar fluorescencia procedente de las zonas de ensayo.

35 En otro aspecto, un método comprende:

poner en contacto una matriz de zonas de ensayo separadas con una muestra, estando dispuestas las zonas de ensayo entre la primera y segunda superficies, comprendiendo cada zona de ensayo un compuesto sonda configurado para participar en un análisis para determinar un analito respectivo,

40 reducir una distancia entre las superficies internas en localizaciones correspondientes a las zonas de ensayo, y

secuencialmente determinar ópticamente el resultado del análisis en cada una de las múltiples zonas de ensayo para las que se reduce la distancia entre las superficies internas en la localización correspondiente.

El método puede comprender además, para cada una de las múltiples zonas de ensayo, determinar la presencia de un analito respectivo basándose en el resultado del análisis.

45 Para cada una de al menos algunas de las zonas de ensayo, el resultado del análisis puede ser indicativo de una reacción de unión entre el analito y el compuesto sonda de la zona de ensayo.

La determinación óptica puede comprender la detección de luz procedente de cada una de las zonas de ensayo usando un detector de orden cero.

50 La detección de luz procedente de cada una de las zonas de ensayo usando un detector de orden cero puede consistir esencialmente en detectar luz con el detector de orden cero.

El método puede comprender además, para cada una de las múltiples localizaciones para las que se redujo la distancia entre las superficie internas, el aumento subsiguiente de la distancia entre las superficies internas después de la etapa de determinación óptica en la zona de ensayo.

5 La reducción de una distancia puede comprender secuencialmente reducir la distancia entre las superficies internas en localizaciones correspondientes a las zonas de ensayo.

En otro aspecto, un sistema comprende:

10 un lector de un dispositivo microfluídico configurado para recibir un dispositivo microfluídico que comprende una matriz de zonas de ensayo separadas, estando dispuestas las zonas de ensayo entre una superficie interna de un primer sustrato y una superficie interna de un segundo sustrato del dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo cada zona de ensayo un compuesto sonda configurado para participar en un análisis para determinar un analito diana,

un detector óptico configurado para detectar luz procedente de al menos una de las zonas de ensayo cuando al menos una zona de ensayo es una zona de detección del dispositivo microfluídico,

15 un elemento trasladador configurado para trasladar al menos uno de los dispositivos microfluídicos y la zona de detección del detector óptico con relación al otro,

un compresor configurado para reducir una distancia entre las superficies internas del primer and segundo sustratos en localizaciones correspondientes a la zona de detección del dispositivo óptico,

un procesador configurado para recibir una señal procedente del detector óptico, siendo la señal indicativa de la luz detectada en una zona de ensayo.

20 El sistema se puede configurar para detectar ópticamente de modo simultáneo luz procedente de no más de un número N de zonas de ensayo, donde $N \leq 5$ o $N \leq 3$ o $N = 1$.

El detector puede ser un detector de fluorescencia.

25 En otro aspecto, un dispositivo de análisis comprende un primer y segundo sustratos que definen un canal entre ellos, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo el canal una matriz de zonas de ensayo separadas, comprendiendo cada zona de ensayo un compuesto sonda configurado para participar en un análisis para determinar un analito diana.

En otro aspecto, un artículo de fabricación comprende:

un sustrato, y

30 múltiples zonas de ensayo alargadas, comprendiendo cada zona de ensayo un compuesto sonda respectivo configurado para participar en un análisis para determinar un analito diana, definiendo cada zona de ensayo un eje principal y una anchura perpendicular a él, siendo los ejes principales de las zonas de ensayo generalmente paralelos.

En otro aspecto, un método comprende:

introducir una muestra líquida en el ánima de un capilar, e

35 introducir al menos una porción de la muestra líquida en una red microfluídica del dispositivo microfluídico, reduciendo una presión que actúa sobre una interfase muestra líquida-gas de la muestra líquida.

El método puede comprender además, después de la etapa de introducción de la muestra líquida en el ánima del capilar, la conexión del capilar a un dispositivo microfluídico, permaneciendo la muestra líquida dentro del capilar.

40 La reducción de la presión se puede realizar comprimiendo al menos una porción de la red microfluídica para desplazar el gas de ella y descomprimiendo subsiguientemente al menos una porción de la red microfluídica.

La red microfluídica puede estar definida al menos en parte por y entre el primer y segundo sustratos generalmente planos, siendo deformable al menos uno de los sustratos por la aplicación de una presión externa para comprimir al menos una porción de la red microfluídica y tendiendo al menos un sustrato a volver a su posición previa al liberar la presión externa permitiendo la descompresión de al menos una porción de la red microfluídica.

45 Además, la red microfluídica puede estar definida al menos en parte por un canal microfluídico que incluye una entrada y una región de detección en comunicación de fluido con la entrada y una trayectoria del flujo microfluídico en comunicación de fluido con la región de detección, en donde la trayectoria del flujo microfluídico tiene una pared que es al menos deformable por aplicación de presión externa para comprimir al menos una porción de la trayectoria del flujo microfluídico y la pared tiende a volver a su posición previa al liberar la presión externa permitiendo la descompresión de al menos una porción de la trayectoria del flujo microfluídico.

50

El método puede comprender además combinar la muestra líquida con uno o más reactivos presentes dentro de la red microfluídica formando una mezcla. La mezcla puede comprender al menos 90% de la muestra líquida que fue introducida en la red microfluídica. El uno o más reactivos incluyen un marcador detectable que reacciona con la muestra formando un complejo que incluye el marcador y un analito presente en la muestra.

- 5 El método puede comprender además detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto de la muestra líquida, estando presente el subconjunto dentro de una zona de detección del dispositivo microfluídico.

- 10 El método puede comprender además desplazar el subconjunto de muestra líquida de la zona de detección e introducir un subconjunto diferente de la muestra líquida en la zona de detección y detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro del subconjunto diferente. El desplazamiento del subconjunto y la introducción del subconjunto diferente se pueden realizar comprimiendo al menos una porción de la red microfluídica, siendo desplazada la porción comprimida al menos parcialmente a lo largo de la red desde la zona de detección. La compresión de al menos una porción puede comprender comprimir una primera porción de la red microfluídica y, sin liberar primero completamente la compresión, mover un sitio de la compresión a lo largo de la red
15 microfluídica una distancia suficiente para realizar las etapas de desplazamiento e introducción.

El método puede comprender además la realización de la etapa de detección óptica de una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro del subconjunto diferente sin liberar primero completamente la compresión de la red microfluídica.

- 20 El método puede comprender además, las etapas intermedias de introducción de la muestra líquida en el ánima del capilar y la introducción de al menos la porción de la muestra líquida en la red microfluídica, impidiendo que la muestra líquida salga del capilar. El impedimento de que la muestra líquida salga del capilar puede comprender el aumento de la presión que actúa sobre la interfase muestra líquida-gas.

En algunas realizaciones, la red microfluídica no soporta el flujo capilar de la muestra líquida. Una superficie interior de la red microfluídica que está definida por al menos uno del primer y segundo sustratos puede ser hidrófoba.

- 25 El analito puede ser una partícula, por ejemplo, una célula.

El método puede comprender además mover al menos uno del dispositivo microfluídico y un detector óptico uno con respecto al otro y detectar subsiguientemente una señal óptica indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto diferente de la muestra líquida.

- 30 El capilar puede ser un capilar de extremo a extremo que comprende un primer y segundo extremos abiertos, el ánima del capilar comprende un volumen total V y la etapa de introducción de al menos una porción de la muestra líquida comprende introducir al menos 90% de la muestra líquida en la red microfluídica.

En otro aspecto, un método comprende:

- 35 introducir una muestra líquida en una red microfluídica dispuesta entre una superficie interna de un primer sustrato y una superficie interna de un segundo sustrato de un dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas,

formar una mezcla que comprenda al menos una porción de la muestra líquida y un marcador óptico reduciendo secuencialmente una distancia entre las superficies internas del primer y segundo sustratos en múltiples posiciones dentro de la red microfluídica,

- 40 formar múltiple complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiple partículas y al menos uno de los marcadores ópticos, y

detectar complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.

El método puede comprender además la detección de complejos presentes dentro de cada uno de los múltiples subconjuntos diferentes de la mezcla.

- 45 Un volumen total de los múltiples subconjuntos diferentes puede ser al menos 90% de un volumen de la muestra líquida introducida en el dispositivo microfluídico.

El método puede comprender además introducir un volumen total V de muestra líquida en el dispositivo microfluídico y en donde un volumen total de la mezcla es al menos 90% del volumen V .

El método puede comprender además detectar complejos presentes en al menos 90% del volumen total de la mezcla.

- 50 Las partículas pueden ser células.

Los marcadores ópticos pueden ser marcadores fluorescentes.

En otro aspecto, un método comprende:

- 5 introducir un volumen total V de una muestra líquida en una red microfluídica dispuesta entre una superficie interna de un primer sustrato y una superficie interna de un segundo sustrato de un dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas,
- formar una mezcla dentro de la red microfluídica, comprendiendo la mezcla al menos aproximadamente 90% del volumen V de muestra líquida y un marcador óptico,
- formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos uno de los marcadores ópticos, y
- 10 detectar complejos presentes en un subconjunto de la mezcla.

La mezcla puede comprender al menos aproximadamente 95% del volumen V de la muestra líquida.

El método puede comprender además detectar complejos presentes en cada uno de los múltiples subconjuntos diferentes de la mezcla.

- 15 Un volumen total de los múltiples subconjuntos diferentes puede ser al menos 90% de un volumen de la muestra líquida introducida en el dispositivo microfluídico.

- 20 En un aspecto, la invención se refiere a un dispositivo para detectar un analito que comprende: un cartucho (100) que tiene un canal microfluídico (105) que incluye una entrada (109) y una región de detección (711) en comunicación de fluido con la entrada (109), una trayectoria del flujo microfluídico (104) que tienen una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación de fluido con la región de detección (711) del canal (105) y una tapa (102) que tiene un elemento de estanqueidad configurado para asegurar la estanqueidad con la entrada (109) y formar un circuito de fluido que incluya la entrada (109), el canal microfluídico (105) y la trayectoria del flujo microfluídico.

La tapa (102) y el cartucho (100) del dispositivo pueden estar configurados para ser cerrados irreversiblemente después de la formación del circuito de fluido.

- 25 Alternativamente, la tapa (102) puede estar unida flexiblemente al cartucho (100).

Además, la tapa (102) y el cartucho (100) pueden estar configurados para encajarse en una primera posición relativa de tal modo que se pueda ser retirada la tapa (102) y encajada en una segunda posición relativa, de tal modo que la tapa (102) se cierre irreversiblemente después de la formación del circuito de fluido.

- 30 La región de detección (711) puede estar delimitada por al menos una superficie del cartucho (100) y al menos una superficie de una tapadera. La tapadera puede incluir una película transparente sobre la región de detección. Además, la tapadera se puede fijar con adhesivo al cartucho (100).

- 35 En otro aspecto, un dispositivo para detectar un analito comprende un cartucho que tiene un canal microfluídico que incluye una entrada de capilar que tiene un anticoagulante sobre su superficie interna, una cámara que incluye un reactivo y una región de detección en comunicación de fluido con la entrada; una trayectoria del flujo microfluídico que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación de fluido con la región de detección del canal; y una tapa que tiene un elemento de estanqueidad configurado para asegurar la estanqueidad con la entrada y formar un circuito de fluido que incluya la entrada, el canal microfluídico y la trayectoria del flujo microfluídico.

- 40 En otro aspecto, un detector de la fluorescencia incluye una fuente luminosa; una lente convergente que produce un ángulo sólido de 10° o mayor; y una lente objetivo que produce un ángulo sólido de 10° o mayor y que está configurada para obtener imágenes de un objeto microscópico.

La lente convergente y/o la lente objetivo pueden producir un ángulo sólido de 10° a 15°, tal como 12° a 14°, por ejemplo 13,5°.

- 45 El detector de la fluorescencia puede incluir además una abertura. La abertura puede configurarse de modo que permita un ángulo de 10° o mayor (por ejemplo, de 10° a 15° o de 12° a 14° o 13,5°).

- 50 El detector de la fluorescencia puede incluir además al menos un filtro. Los filtros se pueden elegir con relación a un conjunto predeterminado de longitudes de ondas de emisión. Por ejemplo, un filtro se puede seleccionar de modo que deje pasar luz con una longitud de onda específica y otro filtro se puede seleccionar de modo que deje pasar luz con una longitud de onda específica diferente, por ejemplo dependiendo de las longitudes de onda de emisión de los colorantes usados para reactivos marcadores en el cartucho.

En otro aspecto, un sistema para detectar un analito comprende:

- 5 un cartucho que tiene: un canal microfluídico que incluye una entrada y una región de detección en comunicación de fluido con la entrada; una trayectoria del flujo microfluídico que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación de fluido con la región de detección del canal; y una tapa que tienen un elemento de estanqueidad configurado para asegurar la estanqueidad con la entrada y formar un circuito de fluido que incluya la entrada, el canal microfluídico y la trayectoria del flujo microfluídico; y un detector de fluorescencia que incluye una fuente luminosa; una lente convergente que produce un ángulo sólido de 10° o mayor; y una lente objetivo que produce un ángulo sólido de 10° o mayor.

El detector de la fluorescencia puede incluir una cámara.

- 10 Además, el detector de la fluorescencia puede incluir uno o más filtros de emisión seleccionables.

En otro aspecto, un método para detectar un analito en una muestra líquida comprende:

- introducir la muestra líquida en un canal microfluídico formando de este modo un tapón líquido contiguo encerrado por el canal y delimitado en un primer extremo por un fluido de transporte;
- 15 formar un circuito de fluido de modo que el fluido de transporte proporcione comunicación de fluido entre los extremos primero y segundo del tapón líquido; y
- aplicar una presión diferencial a los extremos primero y segundo del tapón líquido por medio del fluido de transporte.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para detectar un analito en una muestra líquida que comprende:

- 20 introducir la muestra líquida en un canal microfluídico (105) formando de este modo un tapón líquido contiguo encerrado por el canal (105) y delimitado en un primer extremo por un fluido de transporte, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas, asegurando la estanqueidad un elemento de estanqueidad de una tapa con la entrada formando de este modo un circuito de fluido de tal manera que el fluido de transporte proporcione comunicación de fluido entre el primer y segundo extremos del tapón líquido, en el que se forma una porción del circuito de fluido por medio de una pared deformable,
- 25 formar una mezcla que comprende al menos una porción de la muestra líquida y un marcador óptico presentes dentro del canal microfluídico (105) aplicando una presión diferencial en el primer y segundo extremos del tapón líquido por medio del fluido de transporte y moviendo de este modo el tapón líquido dentro del circuito de fluido,
- 30 formar múltiple complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos uno de los marcadores ópticos, y
- detectar complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.

A continuación, se explicarán otras realizaciones ilustrativas de los dispositivos y métodos (por ejemplo, de los dispositivos, sistemas y métodos para detectar un analito).

Se puede formar una porción del circuito de fluido por medio de una pared elásticamente deformable.

- 35 La aplicación de una presión diferencial en el primer y segundo extremos del tapón líquido puede incluir la compresión de la pared elásticamente deformable.

- La muestra líquida se puede seleccionar según se desee basándose en los analitos que han de determinarse. Muestras ilustrativas incluyen agua, soluciones acuosas, soluciones orgánicas, soluciones inorgánicas, líquidos corporales de seres humanos y otros animales, por ejemplo, orina, esputo, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre completa o materiales hemoderivados, tales como plasma y sueros.
- 40

- Los analitos que se han de determinar se pueden seleccionar según se desee. Por ejemplo, los analitos pueden estar relacionados con la medicina (por ejemplo, para diagnóstico), la investigación (por ejemplo, descubrimiento de fármacos), industria (por ejemplo, control de calidad del agua o de los alimentos) o la práctica forense. Los analitos ilustrativos que se pueden determinar incluyen marcadores (por ejemplo, marcadores de diagnóstico o marcadores predictivos) de estados fisiológicos, tal como enfermedades. Dichos marcadores incluyen marcadores cardiacos (por ejemplo, péptidos natriuréticos y miembros de la familia de las troponinas), marcadores cancerígenos (por ejemplo, proteínas de la matriz nuclear), marcadores genéticos (por ejemplo, polinucleótidos), marcadores de sepsis, marcadores neurológicos y marcadores indicativos de estados patogénicos. Los analitos pueden ser indicativos de la presencia de agentes patógenos (por ejemplo, bacterias, virus u hongos).
- 45

- 50 En una realización típica, uno o más de los analitos comprende partículas, tales como virus, bacterias, células, hongos o esporas. Por ejemplo, se puede detectar cualquiera de las partículas descritas en la Solicitud de Patente

5 Internacional PCT/EP2006/068153. Ejemplos de partículas que existen en la naturaleza incluyen entre otras células procariotas (por ejemplo, células bacterianas, tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*), células eucariotas (por ejemplo, células de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, células de insectos, tales como células Sf9 o High 5, líneas de células inmortalizadas, tales como células HeLa o Cos, y células primarias, tales como células sanguíneas de mamíferos) o virus (por ejemplo, partículas de bacteriófagos, tales como bacteriófago M13 o T7). En una realización, las partículas pueden ser células.

10 Los marcadores o compuestos sonda o moléculas de captura se pueden seleccionar según se desee basándose en los analitos que se han de determinar. Marcadores o compuestos sonda adecuados para determinar la presencia de un analito están descritos en la Solicitud de Patente provisional de EE.UU. 60/826.678 presentada el 22 de septiembre de 2006 (WO 2008034914). Se entiende que un marcador o molécula de captura o una sonda o una molécula sonda o una sonda molecular significa una molécula o un complejo, que se usa para la detección de otras moléculas debido a una característica particular que está asociada con el comportamiento o con una reactividad particular. Compuestos sonda ilustrativos incluyen biopolímeros, tales como péptidos, proteínas, antígenos, anticuerpos, carbohidratos, ácidos nucleicos y/o sus análogos y/o polímeros mixtos de los biopolímeros antes mencionados.

15 Marcadores detectables que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen cualquier compuesto, que genere directa o indirectamente un compuesto o señal detectable en una reacción química, física o enzimática. Preferiblemente, los marcadores se pueden seleccionar entre otros de marcadores enzimáticos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromógenos, marcadores luminiscentes, marcadores radiactivos, haptenos, biotina, complejos metálicos, metales y oro coloidal, siendo los marcadores fluorescentes particularmente preferidos. Todos estos tipos de marcadores están bien establecidos en la técnica. Un ejemplo de una reacción física que está mediada por dichos marcadores es la emisión de fluorescencia. Por consiguiente, los marcadores ópticos pueden ser marcadores fluorescentes.

20 Los métodos pueden comprender además marcar el analito con un primer marcador óptico y un segundo marcador óptico que es un anticuerpo, en el que el primer y segundo marcadores ópticos son diferentes. Los primer y segundo marcadores ópticos pueden ser primer y segundo marcadores fluorescentes que tienen distintas longitudes de onda de emisión. El marcador puede ser un anticuerpo. Por ejemplo, el método puede comprender además marcar el analito con un primer anticuerpo fluorescente como marcador óptico y un segundo anticuerpo fluorescente, en donde el primer y segundo anticuerpos fluorescentes tienen distintas longitudes de onda de emisión.

25 La detección del analito puede incluir registrar una primera imagen del analito a la longitud de onda de emisión del primer anticuerpo fluorescente; registrar una segunda imagen del analito a la longitud de onda de emisión del segundo anticuerpo fluorescente; y comparar la primera y segunda imágenes.

30 Los métodos pueden comprender además detectar complejos presentes dentro de cada uno de los múltiples subconjuntos diferentes de la mezcla. Por ejemplo, dentro de cada mezcla del dispositivo microfluídico, se pueden combinar partículas, si están presentes, con un marcador detectable para formar complejos. Después de un periodo de incubación adecuado para permitir la formación de complejos, se detecta la presencia de complejos. Ejemplos de detección de complejos están descritos en la Solicitud de Patente Internacional PCT/EP2006/068153.

35 Un volumen total de los múltiples subconjuntos diferentes puede ser al menos 90% de un volumen de la muestra líquida introducida en el dispositivo microfluídico.

40 Los métodos pueden comprender además introducir un volumen total V de muestra líquida en el dispositivo microfluídico, donde un volumen total de la mezcla puede ser al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% del volumen V.

Los métodos pueden comprender además detectar complejos presentes en al menos 10% del volumen total de la mezcla, por ejemplo en 10% al 90%, 15% al 50% o 20% al 30% del volumen total de la mezcla.

45 El canal microfluídico puede incluir una entrada y una región de detección en comunicación de fluido con la entrada. Además, el canal microfluídico puede ser un canal microfluídico de un dispositivo microfluídico.

Los métodos pueden comprender además, antes de la introducción de una muestra líquida en un canal microfluídico, introducir una muestra líquida en el ánima de un capilar.

50 El capilar es típicamente un capilar estándar (por ejemplo, un capilar de extremo a extremo, tal como un capilar de plástico). Un capilar de extremo a extremo incluye un ánima interna y una primera y segunda aberturas, una en cada extremo del ánima. El ánima del capilar puede comprender un inhibidor de la coagulación, tal como heparina. Por ejemplo, el capilar puede estar revestido con anticoagulante, tal como, heparina. En general, el ánima del capilar está configurada de modo que contenga un volumen total V de muestra líquida. El volumen V es típicamente alrededor de 25 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 20 microlitros o menos, aproximadamente 15 microlitros o menos, aproximadamente 10 microlitros o menos, aproximadamente 5 microlitros o menos). En general, el volumen V es aproximadamente 1 microlitro o más (por ejemplo, aproximadamente 3 o 5 o 7,5 microlitros o más).

Los métodos pueden comprender además, las etapas intermedias de introducción de la muestra líquida en el ánima del capilar y la introducción de la muestra líquida en el canal microfluídico, la conexión del capilar al dispositivo microfluídico, permaneciendo la muestra líquida dentro del capilar.

5 Los métodos pueden comprender además la detección óptica de una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto de la muestra líquida, estando presente el subconjunto dentro de una zona de detección o región de detección del dispositivo microfluídico.

10 En algunas realizaciones, la salida del capilar desemboca en una cámara de reacción con un volumen predeterminado de, por ejemplo, aproximadamente 5 μ L, 10 μ L o 20 μ L. En algunas realizaciones, la cámara de reacción incluye un pelet de reactivo. El pelet de reactivo puede incluir marcadores, por ejemplo, anticuerpos marcados con un colorante fluorescente y que tienen una afinidad para los antígenos que se han de detectar en la muestra. Por ejemplo, para detectar el número de linfocitos T cooperadores en una muestra líquida, el pelet de reactivo puede incluir un anticuerpo anti-CD4+ marcado con un primer colorante fluorescente (tal como, ficoeritrina) y un anticuerpo anti-CD3+ marcado con un segundo colorante fluorescente (tal como, ficoeritrina-Cy5), sales y reactivos estabilizantes, etc. En algunas realizaciones, la superficie interna de la primera zona está cubierta con los reactivos necesarios para tratar la muestra. Un análisis ilustrativo para la detección de partículas, tales como células, en una muestra líquida está descrito en, por ejemplo, el documento de patente WO 2007/051861, que se incorpora en su totalidad como referencia. Como se ha descrito en el documento WO 2007/051861, la detección puede tener lugar en el canal microfluídico. Por tanto, el canal microfluídico es al menos parcial y ópticamente transparente. Por ejemplo, el canal microfluídico puede estar cubierto por una capa al menos parcial y ópticamente transmisible.

20 La introducción de la muestra líquida se puede realizar por compresión de la pared elásticamente deformable. La compresión de la pared elásticamente deformable puede comprender comprimir una primera porción del circuito de fluido y, sin liberar primero completamente la compresión, mover un sitio de la compresión a lo largo del circuito de fluido una distancia suficiente para realizar las etapas de desplazamiento e introducción.

25 Los métodos pueden comprender además la realización de la etapa de detección óptica de una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro del subconjunto diferente liberando primero completamente la compresión.

Los métodos pueden comprender además las etapas intermedias de introducción de la muestra líquida en el ánima del capilar y la introducción de al menos la porción de la muestra líquida en el canal microfluídico, impidiendo que la muestra líquida salga del capilar.

30 En algunas realizaciones, una región de detección del canal microfluídico no soporta el flujo en el capilar de la muestra líquida.

Además, al menos una parte de una superficie interior del canal microfluídico puede ser hidrófoba.

35 Los métodos pueden comprender además mover al menos uno del dispositivo microfluídico y un detector óptico, uno con respecto al otro, y detectar subsiguientemente una señal óptica indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto diferente de la muestra líquida.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 a 11 ilustran dispositivos, sistemas y métodos útiles para la comprensión de la descripción.

La Figura 1 ilustra un dispositivo microfluídico.

La Figura 2 es una vista lateral del dispositivo microfluídico de la Figura 1.

40 La Figura 3a muestra vistas superiores de dos zonas de ensayo del dispositivo microfluídico de la Figura 1.

Las Figuras 3b a 3g ilustran un método para formar la zona de ensayo de la Figura 3a.

Las Figuras 4 y 5 son vistas laterales de un sistema configurado para hacer funcionar el dispositivo microfluídico de la Figura 1;

La Figura 5 es sólo una vista lateral parcial.

45 La Figura 6 ilustra los datos de intensidad de la fluorescencia en función de una posición a lo largo de un canal del dispositivo microfluídico de la Figura 1.

La Figura 7 ilustra un dispositivo microfluídico.

Las Figuras 8a y 8b son cada una vistas superiores de dos zonas de ensayo del dispositivo microfluídico de la Figura 7.

50 La Figura 9 ilustra un dispositivo microfluídico.

La Figura 10a es una vista lateral de la sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 9 e ilustra también un tubo capilar que contiene un material de muestra líquida.

5 La Figura 10b ilustra el dispositivo microfluídico de la Figura 10a, habiendo sido conectado el tubo capilar con una entrada del dispositivo microfluídico, no habiendo entrado la muestra líquida en una red microfluídica del dispositivo microfluídico.

La Figura 10c ilustra el dispositivo microfluídico de la Figura 10b, habiendo sido retirada una porción de la muestra líquida del capilar con la muestra e introducida en la red microfluídica del dispositivo microfluídico.

La Figura 10d ilustra el dispositivo microfluídico de la Figura 10c, habiendo sido completada la etapa de retirada de la muestra líquida del capilar con la muestra y la introducción en la red microfluídica del dispositivo microfluídico.

10 La Figura 10e ilustra el dispositivo microfluídico de la Figura 10d, habiendo sido movida una porción de la muestra líquida una distancia Δl a lo largo de un tramo de la red microfluídica.

La Figura 10f ilustra el dispositivo microfluídico de la Figura 10e y la detección de un analito presente dentro de una porción de la muestra líquida.

15 La Figura 11 ilustra un sistema operativo para hacer funcionar el dispositivo microfluídico de cualquiera de las Figuras 1, 7 y 9. El sistema operativo puede incluir cualquiera o todas las características del sistema operativo de las Figuras 4 y 5.

Las Figuras 12a-12d muestran una representación esquemática de un circuito de fluido.

Las Figuras 13a-13b muestran vistas en corte de un cartucho que tiene un circuito de fluido.

Las Figuras 14a-14b muestran vistas en corte de un detector de la fluorescencia.

20 La Figura 15 muestra un esquema de la trayectoria óptica de un detector.

Las Figuras 16a-16b muestran representaciones de un análisis de recuento de células que usa un detector de la fluorescencia.

La Figura 17 muestra una superposición de dos imágenes derivadas de un análisis de recuento de células que usa un detector de la fluorescencia.

25 **Descripción detallada**

Un método para analizar una muestra para determinar la presencia (por ejemplo, cualitativamente y/o cuantitativamente) de múltiples analitos incluye introducir la muestra en un canal de un dispositivo microfluídico. El dispositivo microfluídico puede tener un solo canal o múltiples canales, dependiendo del diseño y complejidad del análisis. En algunas realizaciones, el canal puede estar definido entre superficies internas enfrentadas del primer y segundo sustratos del dispositivo.

30 En general, un dispositivo para realizar análisis puede incluir una trayectoria del flujo microfluídico que está delimitada por al menos una superficie deformable. Por ejemplo, cuando la trayectoria del flujo está definida entre superficies internas enfrentadas del primer y segundo sustratos del dispositivo, el segundo sustrato puede ser relativamente flexible comparado con el primer sustrato. En otro ejemplo, una porción de la trayectoria del flujo microfluídico puede incluir una zona comprimible. La zona comprimible puede ser un tramo del circuito de fluido a lo largo del cual al menos una pared del circuito es comprimible o deformable. Cuando se aplica una fuerza de compresión localizada a la superficie deformable, dicha superficie se deforma. Bajo una fuerza suficiente, la superficie deformable puede ser comprimida hasta un grado que interrumpe la trayectoria del flujo microfluídico. Moviendo la localización de la deformación de la superficie con respecto a la trayectoria del flujo microfluídico se puede mover el líquido dentro la trayectoria del flujo microfluídico, particularmente cuando la superficie deformable es comprimida hasta un grado que interrumpe la trayectoria del flujo microfluídico.

35 En algunas realizaciones, el segundo sustrato puede ser relativamente flexible comparado con el primer sustrato. Múltiple zonas de ensayo pueden estar separadas a lo largo del canal. Cada zona de ensayo incluye una compuesto sonda inmovilizado configurado para participar en un análisis para determinar un analito respectivo. Típicamente, cada análisis incluye la interacción de un compuesto sonda con el analito respectivo o con un complejo respectivo que incluye el analito y un reactivo (por ejemplo, un marcador óptico).

40 Para determinar los resultados del análisis para cada zona de ensayo, la superficie externa del segundo sustrato puede ser sometida a una fuerza de compresión localizada. La fuerza de compresión provoca una reducción localizada de la distancia que separa las superficies internas del primer y segundo sustratos. La localización de la reducción de la distancia localizada se solapa con una zona de detección óptica definida dentro del canal. A medida que se reduce la distancia, se desplaza un material móvil (por ejemplo, muestra, sondas ópticas no unidas, y/o reactivos) entre los sustratos en la zona de detección. El dispositivo microfluídico se traslada de modo que las zonas

50

de ensayo pasen secuencialmente a través de la zona de detección. Para cada zona de ensayo, el resultado del análisis se determina ópticamente (por ejemplo, por fluorescencia) a medida que la zona de ensayo pasa a través de la zona de detección. La presencia de cada analito se determina (por ejemplo, cuantitativamente y/o cualitativamente) basándose en el resultado del análisis.

- 5 Los resultados del análisis pueden determinarse típicamente sin poner primeramente en contacto las zonas de ensayo con una solución de lavado después de poner en contacto las zonas de ensayo con la muestra.

Los analitos que han de ser determinados pueden seleccionarse como se desee. Por ejemplo, los analitos pueden estar relacionados con la medicina (por ejemplo, para diagnóstico), la investigación (por ejemplo, descubrimiento de fármacos), industria (por ejemplo, control de la calidad del agua o alimentos) o la práctica forense. Los analitos ilustrativos que han de ser determinados incluyen marcadores (por ejemplo, marcadores de diagnóstico o marcadores predictivos) de estados fisiológicos, tales como enfermedades. Dichos marcadores incluyen marcadores cardiacos (por ejemplo, péptidos natriuréticos y miembros de la familia de las troponinas), marcadores cancerígenos (por ejemplo, proteínas de la matriz nuclear), marcadores genéticos (por ejemplo, polinucleótidos), marcadores de sepsis, marcadores neurológicos y marcadores indicativos de estados patogénicos. Los analitos pueden ser indicativos de la presencia de agentes patógenos (por ejemplo, bacterias, virus u hongos).

Los compuestos sonda de las zonas de ensayo se pueden seleccionar según se desee basándose en los analitos que se han de determinar. Los compuestos sonda ilustrativos incluyen polinucleótidos, anticuerpos y proteínas.

El líquido de muestra se puede seleccionar según se desee basándose en los analitos que se han de determinar. Las muestras ilustrativas incluyen, agua, soluciones acuosas, soluciones orgánicas, soluciones inorgánicas, líquidos corporales de seres humanos y otros animales, por ejemplo, orina, esputo, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre completa y materiales hemoderivados, tales como plasma y sueros.

Con referencia a las Figuras 1, 2 y 4, se pueden usar un dispositivo microfluídico 100 y un sistema operativo 500 para analizar una muestra para determinar la presencia (por ejemplo, cualitativamente y/o cuantitativamente) de múltiples analitos. El dispositivo microfluídico 100 incluye primer y segundo sustratos 102,104 que definen una red microfluídica 107 que incluye una entrada 106 y, en comunicación con ella, un canal 110 y un depósito 108. Dentro del canal 110 están dispuestas múltiples zonas de ensayo separadas 112i. Cada zona de ensayo 112i incluye uno o más reactivos (por ejemplo, compuesto sonda) configurados para participar en un análisis para determinar un analito. El canal 110 incluye también una zona de referencia 117. El dispositivo 100 incluye también un patrón de referencia 114 que incluye múltiples marcas distintivas 116j. El patrón de referencia 114 proporciona información relacionada con las propiedades espaciales de las zonas de ensayo 112i.

El sistema operativo 500 incluye un alojamiento 502, un detector 504, un lector del patrón de referencia 506 y un procesador en comunicación con el detector 504 y el lector del patrón 508. El detector 504 es un detector óptico de fluorescencia que detecta la interacción entre una muestra y las zonas de ensayo 112i. El detector 504 incluye una fuente luminosa 550 (por ejemplo, un diodo emisor de luz o un diodo láser) y un detector fotosensible de orden cero 552 (por ejemplo, un tubo fotomultiplicador o un fotodiodo, tal como un fotodiodo de avalancha). El lector del patrón de referencia 506 lee el patrón de referencia 114 del dispositivo 100 durante el funcionamiento del sistema 500.

A continuación se describe con mayor detalle el dispositivo microfluídico 100 y el sistema 500.

El primer sustrato 102 es típica y ópticamente transmisor (por ejemplo, transparente) con respecto a una longitud de onda de luz útil para excitar y detectar la fluorescencia de marcadores fluorescentes. Por ejemplo, el primer sustrato 102 puede transmitir al menos aproximadamente 75% (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%) de luz incidente en al menos un intervalo de longitudes de onda entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 800 nm. El primer sustrato 102 puede estar formado, por ejemplo, de un polímero, vidrio o sílice. El segundo sustrato 104 está formado típicamente de un material plegable o flexible (por ejemplo, un polímero elastómero). El primer sustrato 102 puede ser menos flexible que el segundo sustrato 104. Por ejemplo, el primer sustrato 102 puede ser sustancialmente rígido (por ejemplo, suficientemente rígido para facilitar el manejo del dispositivo 100).

El canal 110 es un canal capilar. Una muestra 113 aplicada a la entrada 106 migra a lo largo del canal 110 por fuerza capilar. El canal 110 está orientado a lo largo de un eje principal a1. El depósito 108 incluye un orificio de ventilación 111 para impedir la acumulación de gas en la parte delantera de la muestra.

Cada zona de ensayo 112i incluye típicamente un reactivo (por ejemplo, un compuesto sonda) configurado para proporcionar una interacción detectable en presencia de un analito. La interacción puede incluir, por ejemplo, la unión de un analito correspondiente a un compuesto sonda del sitio de ensayo y/o una reacción química entre el analito correspondiente y el compuesto sonda. La reacción da como resultado un producto detectable (por ejemplo, un precipitado). Los compuestos sonda ilustrativos incluyen proteínas, anticuerpos y polinucleótidos. Los compuestos sonda adecuados para determinar la presencia de un analito están descritos en la solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/826.678 presentada el 22 de septiembre de 2006.

También con referencia a la Figura 3a, cada zona de ensayo 112i es alargada teniendo un eje principal a2 orientado generalmente perpendicular al eje principal a1 del canal 110. Típicamente, una relación de una longitud a lo largo del eje principal a2 a una anchura w a lo largo de una dimensión perpendicular de las zonas de ensayo 112 es al menos 2,5 (por ejemplo, al menos 5). La longitud a lo largo del eje a2 es típicamente al menos aproximadamente 200 μm (por ejemplo, al menos aproximadamente 350 micrómetros) y típicamente aproximadamente 2000 μm o menos (por ejemplo, aproximadamente 1000 μm o menos, aproximadamente 750 μm o menos). La anchura w es típicamente al menos aproximadamente 25 μm (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 micrómetros) y típicamente aproximadamente 500 μm o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 μm o menos, aproximadamente 150 μm o menos). En una realización ilustrativa, las zonas de ensayo 112 tienen aproximadamente 500 μm de largo y aproximadamente 100 μm de ancho.

Como se ve en la Figura 2, las zonas de ensayo 112i están separadas de las zonas de ensayo adyacentes por una distancia d7 a lo largo del canal 110. La distancia d7 entre las zonas de ensayo 112i se describe adicionalmente en relación con una zona de detección del detector 504.

Las zonas de ensayo 112i pueden estar formadas según se desee. En general, los reactivos se ponen en contacto con el primer sustrato. Luego, los reactivos y el sustrato se trasladan relativa y lateralmente para formar una zona de ensayo alargada.

Con referencia a las Figuras 3b-3g, un método para formar las zonas de ensayo 112i incluye dispensar reactivos desde un dispositivo de goteo capilar 400 sobre el primer sustrato 102. En la Figura 3b, se introduce una cantidad (por ejemplo, entre aproximadamente 2 y 8 nL, entre aproximadamente 3 y 5 nL) de solución de reactivo 402 que contiene uno o más compuesto sonda hasta una punta distal 404 de un capilar de un dispositivo de goteo capilar. La punta distal 404 tiene típicamente un diámetro entre aproximadamente 80 y 120 μm (por ejemplo, aproximadamente 100 μm). La solución de reactivo 402 y el sustrato 102 están separados inicialmente (por ejemplo, no en contacto) por una distancia d1. Típicamente, d1 es al menos aproximadamente 250 μm (por ejemplo, aproximadamente 500 μm).

En la Figura 3c, la punta 404 y el sustrato 102 han sido llevados a una separación más pequeña d2 de modo que la solución de reactivo 402 entra en contacto con una localización del sustrato 102. En la separación más pequeña d2, la punta distal 404 es adyacente a la localización del sustrato 102 (por ejemplo, tocando de modo que d2 es cero). La punta distal 404 y el sustrato 102 se mantienen durante un tiempo (por ejemplo, aproximadamente 1 segundo o menos, aproximadamente 0,5 segundos o menos, aproximadamente 0,25 segundos o menos) en la separación d2 en la posición adyacente (por ejemplo, tocando). En algunas realizaciones, el tiempo para el cual la punta distal 402 se mantiene en la posición adyacente (por ejemplo, tocando) es indistinguible de cero.

En la Figura 3d, la punta distal 404 y el sustrato 102 se han movido hasta una separación intermedia d3 en la cual la punta distal 404 y el sustrato permanecen conectados por la solución de reactivo 402 de la punta distal 404. Típicamente, la separación intermedia d3 es al menos aproximadamente 5 μm (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 μm y aproximadamente 30 μm o menos, aproximadamente 25 μm o menos). En una realización ilustrativa, la separación intermedia d3 es aproximadamente 20 μm .

En la Figura 3e, la punta distal 404 y el sustrato 102 se mantienen en la separación intermedia d3 durante un tiempo de incubación de modo que al menos algo (por ejemplo, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 40%) de la solución de reactivo 402 en la punta distal se evapore de modo que solamente permanezca una porción restante 402' de la solución de reactivo 402. Típicamente, solo se evapora aproximadamente 75% o menos (por ejemplo, aproximadamente 50% o menos) de solución de reactivo 402 dejando la solución 402' restante. El tiempo de incubación depende de la naturaleza de la solución 402 (por ejemplo, la concentración del compuesto sonda y la presión de vapor del disolvente) y el ambiente de la punta distal 404 (por ejemplo, la humedad relativa y la temperatura). Los tiempos de incubación típicos son mayores (por ejemplo, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 20 veces mayor, al menos aproximadamente 35 veces mayor) que el período de tiempo durante el cual la punta y el sustrato están en la posición adyacente d2. Los tiempos de incubación ilustrativos son al menos aproximadamente 5 segundos (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 segundos, al menos aproximadamente 20 segundos o al menos aproximadamente 25 segundos).

En la Figura 3f, después del tiempo de incubación en la separación intermedia d3, al menos uno de la punta distal 404 y el sustrato 102 se mueven lateralmente uno con respecto al otro para dispensar la solución de reactivo 402' a lo largo de un eje principal a2. En la Figura 3g, al completarse el movimiento lateral, la punta distal 402 y el sustrato 102 están separados de modo que ya no están conectados por la solución de reactivo. Por ejemplo, la punta distal 404 y el sustrato 102 pueden ser devueltos a la separación inicial d1. El método se puede repetir (por ejemplo, usando una solución de reactivo diferente) para dispensar zonas de ensayo alargadas en cada una de las múltiples localizaciones del sustrato.

En general, la separación vertical de la punta distal y el sustrato se cambia moviendo la punta distal con respecto al sustrato. En general, el traslado lateral de la punta distal y el sustrato se realiza trasladando el sustrato con respecto

a la punta distal. Las soluciones de reactivos, los compuestos sonda y los dispositivos de dispensación ilustrativos se describen en la solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/826.678 presentada el 22 de septiembre de 2006.

5 Como se ve en la Figura 3a y con referencia también a las Figuras 8a y 8b, el método para producir zonas de ensayo alargadas 112i proporciona una distribución más homogénea de los compuestos sonda que un método de dispensación que omita la etapa de movimiento lateral de la punta distal y el sustrato. Las zonas de ensayo 112i incluyen una primera porción 119 y una segunda porción 121. La distribución de los compuestos sonda en la primera porción 119 es más homogénea que en la segunda porción 121 o en las zonas de ensayo 312i, que fueron preparadas sin la etapa de movimiento lateral.

10 Volviendo a la Figura 1, la zona de referencia 117 produce una respuesta detectable por el detector 504 independiente de la presencia de cualquier analito en una muestra. La zona de referencia 117 incluye típicamente un medio fluorescente (por ejemplo, un polímero o una molécula fluorescente inmovilizada). La zona de referencia 117 se describe con más detalle más adelante con respecto al funcionamiento del sistema 500.

15 Las marcas distintivas 116j del patrón de referencia 114 están configuradas para ser leídas por el lector del patrón de referencia 506 del sistema 500. Las marcas distintivas 116j están compuestas de material magnético (por ejemplo, tinta magnética). El lector del patrón 506 puede detectar la presencia de las marcas distintivas 116j. El patrón de referencia 114 se describe con más detalle más adelante en relación con el funcionamiento del sistema 500.

20 Volviendo a la Figura 4, el alojamiento 502 del sistema operativo 500 incluye una abertura 510 para recibir el dispositivo 100, un sistema de compresión que incluye un rodillo de compresión 516 y rodillos de soporte 518, 520, y un accionador de la traslación 512 que incluye un muelle humedecido 514. Cuando el dispositivo 100 es recibido en el alojamiento 500, el detector 504 define una zona de detección óptica 524 dentro del canal 110. En uso, el dispositivo 100 es trasladado con respecto a la zona de detección 524. Las zonas de ensayo 112i entran y salen secuencialmente de la zona de detección. El detector 504 detecta secuencialmente la interacción entre una muestra y las zonas de ensayo sucesivas 112i. El detector 504 detecta también la zona de referencia 117.

25 Haciendo referencia a la Figura 6, el detector 504 produce una señal 600 que es función de la distancia (relativa o absoluta) a la que se traslada el dispositivo 100. La señal 600 incluye un pico 617 indicativo de la zona de referencia 117 y picos 612i indicativos de la interacción en cada zona 112i. Simultáneamente, el lector del patrón 506 produce una señal 602 indicativa de las marcas distintivas 116i en función de la distancia a la que se traslada el dispositivo 100. Debido a que las marcas distintivas 116i están relacionadas espacialmente con las zonas de ensayo 112i, el procesador 508 puede determinar cuando la zona de detección 524 coincide con una zona de ensayo particular incluso si esa zona de ensayo no presenta señal (por ejemplo, como para la zona de ensayo 112a que presenta una señal 612a que es indistinguible de cero). La zona de referencia 117 y la señal correspondiente 617 se pueden usar alternativamente o en combinación con la señal 602 para determinar que regiones de la señal 600 corresponden a zonas de ensayo particulares.

35 A continuación se define el sistema de compresión. En uso, el sistema de compresión comprime el dispositivo 100 para reducir la distancia entre los sustratos 102, 104 dentro del canal 110. Cuando el dispositivo 100 es recibido en el alojamiento 502, una superficie externa 132 del primer sustrato 102 es orientada hacia los rodillos de soporte 518, 520 y una superficie externa 134 del segundo sustrato 104 es orientada hacia el rodillo de compresión 516. Una distancia d_4 entre los rodillos de soporte 518, 520 y el rodillo de compresión 516 es menor que un espesor t_1 (Figura 5) del dispositivo 100. Debido a que el segundo sustrato 104 es relativamente flexible en comparación con el primer sustrato 102, el rodillo de compresión 516 comprime el segundo sustrato 104 provocando una reducción local en la distancia d_6 entre la superficie interna 103 del segundo sustrato 104 y la superficie interna 105 del primer sustrato 102.

45 En el estado relajado (por ejemplo, estado no comprimido) (Figura 2), la distancia d_6 es típicamente al menos aproximadamente 25 μm (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 μm , al menos aproximadamente 75 μm). En el estado no comprimido, la distancia d_6 es típicamente aproximadamente 500 μm o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 μm o menos). En el estado de la distancia localmente reducida (por ejemplo, estado localmente comprimido) (zona de ensayo 112e en la Figura 4), la distancia d_6 es típicamente aproximadamente 15 μm o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 μm o menos, aproximadamente 5 μm o menos, por ejemplo, aproximadamente 2,5 μm o menos). Ejemplos de detección de fluorescencia realizada entre superficies separadas por un estado de distancia reducida se describen en la solicitud de continuación de EE.UU. de la solicitud de patente internacional PCT/EP2005/004923.

55 Como se ve en las Figuras 4 y 5, el sistema de compresión redujo la distancia d_8 dentro del canal 110 solo en una porción de la longitud del canal 110. Típicamente, la distancia d_8 es aproximadamente 5 veces la longitud o menos (por ejemplo, aproximadamente 3 veces la longitud o menos, aproximadamente 2 veces la longitud o menos, aproximadamente la misma) a la distancia d_7 que separa las zonas de ensayo 112i.

Típicamente, la distancia d_7 es suficientemente grande para que la zona de detección óptica 524 definida por el detector 504 abarque menos que todas (por ejemplo, 5 o menos, 3 o menos, 2 o menos) las zonas de ensayo 112i

dentro del canal 110. En una realización ilustrativa, d7 es suficientemente grande para que una anchura de la zona de detección 524 a lo largo del eje principal a1 del canal 110 no entre en contacto simultáneamente con más de 3 (por ejemplo, no más de dos, no más de una) zonas de ensayo 112i. Una anchura de la zona de detección 524 perpendicular al eje principal a1 del canal 110 es típica y aproximadamente la misma o inferior (por ejemplo, no más de 75%, no más de 50%, no más de 30%) a la longitud de las zonas de ensayo 112i a lo largo de su eje a2.

En uso, el líquido de muestra se aplica a la entrada 106. La fuerza capilar aspira la muestra a lo largo del canal 110 hacia el depósito 108. El líquido de muestra entra en contacto con las zonas de ensayo 112i a lo largo del canal 110. Los analitos de la muestra interaccionan con los compuestos sonda de las zonas de ensayo. Después de un tiempo de incubación adecuado, se inserta el dispositivo 100 en el alojamiento 500 para comprimir el muelle 514 del accionador de translación 512. Durante la inserción del dispositivo 100, el rodillo de compresión 516 y los rodillos de soporte 520 están separados de modo que el dispositivo 100 no esté comprimido. Una vez que el dispositivo 100 está completamente insertado, la zona de detección 524 se posiciona aproximadamente solapando la zona de referencia 117. El rodillo de compresión 516 comprime localmente el canal 110 (Figura 5).

Cuando las interacciones entre los analitos de la muestra y las zonas de ensayo 112i están listas para ser determinadas (por ejemplo, después de un periodo de incubación), el actuador de translación 512 traslada el dispositivo 100 con respecto a la zona de detección 524 del detector 504 (Figura 4). Las zonas de ensayo 112i pasan secuencialmente a través de la zona de detección 524 y son iluminadas con luz procedente de la fuente luminosa. El rodillo de compresión 516 está dispuesto de modo que la reducción localizada de la distancia d6 corresponda espacialmente a la zona de detección 524. Por consiguiente, el fotodetector detecta secuencialmente luz procedente de las zonas de ensayo 112i, mientras que cada una está en el estado de distancia localmente reducida (por ejemplo, estado localmente comprimido) (zona de ensayo 112e en la Figura 4). La fluorescencia que surge de cada zona de ensayo es recogida por lentes y detectada por el fotodetector. La reducción secuencial localizada de la distancia d6 y la determinación óptica continúa hasta que cada zona de ensayo haya sido trasladada a través de la zona de detección 524.

Además de los compuestos sonda de cada zona de ensayo y los analitos, están presentes otros materiales en el canal 110 entre la superficie interna 103 del segundo sustrato 104 y la superficie interna 105 del primer sustrato 102. Ejemplos de dichos materiales incluyen simultáneamente muestras y reactivos (por ejemplo, sondas ópticas no unidas o que no han reaccionado). Estos materiales producen típicamente emisión de fondo (por ejemplo, fluorescencia o luz dispersa) que no está asociada con la interacción de la muestra con las zonas de ensayo 112i. La intensidad de la emisión de fondo es generalmente proporcional a la cantidad de dichos materiales que permanecen entre las superficies internas en la localización correspondiente a la zona de detección 524. La intensidad de la señal óptica que es indicativa de la interacción en cada zona de ensayo, sin embargo, está localizada espacialmente en la proximidad de esa zona de ensayo. El fotodetector recibe y detecta tanto la fluorescencia indicativa de la interacción como la emisión de fondo.

Con referencia a las Figuras 9, 10a y 11, se pueden usar un dispositivo microfluídico 700 y un sistema operativo 500' para analizar una muestra para determinar la presencia (por ejemplo, cualitativamente y/o cuantitativamente) de uno o más analitos. En una realización típica, uno o más de los analitos comprende partículas, tales como virus, bacterias, células, hongos o esporas. Por ejemplo, se pueden detectar cualquiera de las partículas descritas en la solicitud de patente internacional PCT/EP2006/068153.

El dispositivo microfluídico 700 incluye un primer y segundo sustratos 702, 704 que definen una red microfluídica 707 que incluye una entrada 706 y, en comunicación con ella, múltiples canales 710a, 710b, 710c, teniendo cada uno un depósito respectivo 708a, 708b, 708c. Cada depósito incluye un material reactivo 709a, 709b, 709c (por ejemplo, un compuesto sonda) configurado para participar en un análisis para determinar un analito. El dispositivo 700 puede incluir un patrón de referencia 114 que incluye múltiples marcas distintivas 116j (no mostrado en las Figuras 9, 10a, 11) que pueden ser las mismas que las indicadas antes.

El sistema operativo 500' incluye un alojamiento 502', un detector 504', un lector del patrón de referencia (no mostrado) y un procesador en comunicación con el detector 504' y un lector del patrón. El detector 504 es un detector óptico de fluorescencia que detecta complejos que comprenden un analito (por ejemplo, una partícula) y un marcador detectable (por ejemplo, un marcador óptico). Ejemplos de marcadores adecuados se describen en la solicitud de patente internacional PCT/EP2006/068153. El detector 504' incluye una fuente luminosa 550' (por ejemplo, un diodo emisor de luz o un diodo láser) y un detector óptico 552' (por ejemplo, un detector de primer orden, tal como una matriz de diodos o un detector multidimensional (por ejemplo, un detector de imágenes, tal como un detector acoplado con cargas)). El detector óptico típica y espacialmente detecta de modo selectivo luz procedente de una zona de detección respectiva definida dentro de cada canal del dispositivo microfluídico.

[e describe ahora con mayor detalle el dispositivo microfluídico 700 y el sistema 500'.

El primer sustrato 702 es típicamente y ópticamente transmisor (por ejemplo, transparente) con respecto a una longitud de onda de luz útil para excitar y detectar fluorescencia procedente de marcadores fluorescentes. Por ejemplo, el primer sustrato 702 puede transmitir al menos aproximadamente 75% (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%) de luz incidente en al menos un intervalo de longitudes de

onda entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 800 nm. El primer sustrato 702 puede estar formado de, por ejemplo, un polímero, vidrio o sílice. El segundo sustrato 704 está formado típicamente de un material plegable o flexible (por ejemplo, un polímero elastómero). El primer sustrato 702 puede ser menos flexible que el segundo sustrato 704. Por ejemplo, el primer sustrato 702 puede ser sustancialmente rígido (por ejemplo, suficientemente rígido para facilitar el manejo del dispositivo 700).

Los canales 710a-710c soportan típicamente el movimiento de la muestra líquida en ellos, pero típicamente no son canales capilares (es decir, el líquido típicamente no se mueve dentro de los canales del dispositivo 700 por acción capilar). Por ejemplo, una o más superficies internas de los canales pueden ser hidrófobas para inhibir el movimiento capilar de la muestra líquida. Alternativamente, o en combinación, las dimensiones internas de los canales pueden ser demasiado grandes para permitir que fuerzas capilares activen un movimiento sustancial de la muestra dentro de ellos. Naturalmente, en algunas realizaciones, los canales pueden ser canales capilares.

El dispositivo 700 se muestra con 3 canales y un depósito correspondiente, pero generalmente tiene un número N de canales y depósitos correspondientes, en donde N es al menos 1 y es típicamente menos que 20.

Cada depósito 708i incluye típicamente un reactivo 735i (por ejemplo, un marcador detectable, tal como un marcador óptico) configurado para proporcionar una interacción detectable en presencia de un analito. La interacción puede incluir, por ejemplo, la unión de un analito correspondiente a un marcador para formar un complejo que comprende el analito y uno o más de los marcadores. Ejemplos de dichos complejos se describen en la solicitud de patente internacional PCT/EP2006/068153. Cada reactivo está configurado típicamente para permitir la detección de un analito diferente.

Con referencia a las Figuras 10b-10f, el dispositivo 700 puede funcionar como sigue. Una cantidad de muestra líquida 738 (por ejemplo, un líquido biológico, tal como sangre, saliva o u orina) se introduce en un capilar 736. El capilar 737 es típicamente un capilar estándar (por ejemplo, un capilar de extremo a extremo, tal como un capilar de plástico). Un capilar de extremo a extremo incluye un ánima interna y primera y segunda aberturas, una en cada extremo del ánima. El capilar puede estar revestido con anti-coagulante tal como con heparina. Ejemplos de capilares adecuados incluyen capilares revestidos con 20 μ l de heparina disponibles en Kabe Labortechnik (Nürnberg-Elsenroth, Alemania; http://www.kabe-labortechnik.de/index.php?sprache=de&akt_seite=startseite_produkte.php). En general, el ánima del capilar está configurada para contener un volumen total V de muestra líquida. El volumen V es típicamente aproximadamente 25 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 20 microlitros o menos, aproximadamente 15 microlitros o menos, aproximadamente 10 microlitros o menos). En general, el volumen V es aproximadamente 5 microlitros o más (por ejemplo, aproximadamente 7,5 microlitros o más).

Como se ve en la Figura 10b, la entrada 706 del dispositivo 700 está configurada para acomodar el capilar 736. La muestra 737 permanece típicamente dentro del capilar 736 y no entra en el dispositivo microfluídico hasta ser sometida a una fuerza de introducción.

Como se ve en la Figura 10c, se puede aplicar una fuerza de introducción a la muestra 737 reduciendo la distancia entre las superficies internas de los sustratos 702, 704 para reducir a su vez un volumen dentro de la red microfluídica. Por ejemplo, la Figura 10c ilustra un rodillo que se mueve a lo largo de una porción de la red microfluídica. Típicamente, la compresión provoca que las superficies internas enfrentadas entren en contacto una con la otra. A medida que aumenta el volumen dentro del canal después de la descompresión de una región dada del canal, una reducción de la presión del gas que actúa sobre una superficie interna 739 de la muestra líquida 737 hace que la muestra sea forzada a entrar en la red microfluídica. La compresión y la descompresión pueden ser realizadas con un solo movimiento continuo del rodillo 716 a lo largo de la red microfluídica o pueden realizarse secuencialmente en múltiples etapas como en un modo peristáltico.

Como se ve en la Figura 10d, sustancialmente todo (por ejemplo, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, esencialmente todo) el volumen V de muestra líquida 737 es aspirado en la red microfluídica. En una realización ilustrativa, al menos 90% del volumen V es aspirado en la red.

La muestra líquida dentro de la red microfluídica entra en cada uno de los canales 710i y depósitos 708i y moviliza los reactivos dentro cada depósito para formar una mezcla. Típicamente, la formación de la mezcla es ayudada provocando el movimiento en masa de la muestra líquida dentro de la red microfluídica. Dicho movimiento en masa es causado típicamente por compresión y descompresión del dispositivo microfluídico para reducir una distancia interna entre los sustratos 702, 704. La compresión y la descompresión pueden realizarse de un modo peristáltico por movimientos repetidos de al menos uno de los rodillos 716 y el dispositivo microfluídico 700 con respecto al otro.

En general, el volumen total de las mezclas formadas por la combinación de reactivos 735i en los N canales del dispositivo 700 incluye al menos aproximadamente 70% (por ejemplo, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, esencialmente todo) de la cantidad de muestra líquida introducida en el dispositivo 700. En una realización ilustrativa el volumen total de las mezclas formadas por la combinación de reactivos 735i en los N canales del dispositivo 700 incluye al menos aproximadamente 90% de la cantidad de muestra líquida introducida en el dispositivo 700.

Dentro de cada mezcla del dispositivo microfluídico, las partículas, si están presentes, se combinan con un marcador detectable formando complejos. Después de un periodo de incubación adecuado para permitir la formación de complejos, se detecta la presencia de complejos. Cada reactivo 735i está configurado típicamente para permitir la detección de un analito diferente. Ejemplos de detección de complejos se describen en la solicitud de patente internacional PCT/EP2006/068153.

Con referencia a la Figura 10f, una detección tiene lugar típicamente dentro de un subconjunto de cada mezcla dentro del dispositivo. En general, la detección puede realizarse dentro de múltiples subconjuntos diferentes de cada mezcla. Por ejemplo, subconjuntos diferentes de cada mezcla pueden ser movidos a través de la zona de detección moviendo el rodillo 716 en un estado comprimido para mover una porción de nueva aportación de la mezcla para que entre en cada zona de detección. Esto puede realizarse muchas veces de modo que sustancialmente la totalidad (por ejemplo, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, esencialmente la totalidad) de cada mezcla pueda ser sometida a detección. En esta realización, la detección se realiza con el rodillo 716 en un estado comprimido. La mezcla que ya ha sido sometida a detección entra en el capilar 736, que actúa como recipiente de desecho.

En algunas realizaciones, la detección se realiza escaneando el dispositivo 700 con respecto al detector óptico de modo que cada detección comprenda secuencialmente un subconjunto diferente de la solución. Esto puede realizarse muchas veces de modo que sustancialmente la totalidad (por ejemplo, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, esencialmente la totalidad) de cada mezcla pueda ser sometida a detección. En esta realización, la detección se realiza con el rodillo 716 en un estado descomprimido.

Se han descrito los métodos y dispositivos para realizar los análisis. A continuación se describen ejemplos de otras realizaciones.

Aunque la entrada 106 ha sido descrita como una abertura no obstruida son posibles otras configuraciones. Por ejemplo, una entrada puede estar configurada con un ajuste para jeringa (por ejemplo, un ajuste estanco a los gases) para recibir una jeringa. Alternativamente, una entrada puede estar configurada como una junta a través de la cual se puede introducir una muestra por medio de una aguja. Como otra alternativa, la entrada puede estar provista de una válvula anti-retorno que permite que la muestra sea introducida pero no que salga. Como otra alternativa, la entrada puede estar configurada para recibir un capilar estándar (por ejemplo, un capilar de extremo a extremo, tal como un capilar de plástico). El capilar puede estar revestido con un anti-coagulante, tal como con heparina. Ejemplos de capilares adecuados incluyen capilares revestidos con 20 µl de heparina disponibles en Kabe Labortechnik (Nürnbrecht-Elsenroth, Alemania; http://www.kabe-labortechnik.de/index.php?sprache=de&akt_seite=startseite_produkte.php).

Aunque se descrito un dispositivo microfluídico que se llena por acción capilar se pueden usar otras realizaciones. Por ejemplo, el sistema 500 puede ser diseñado para reducir un volumen interno de la red microfluídica antes de la aplicación de la muestra a la entrada. Cuando se aplica la muestra se aumenta el volumen interno captando por tanto la muestra. Dicha disminución de volumen puede conseguirse con, por ejemplo, el rodillo de compresión 516. Por ejemplo, el dispositivo microfluídico puede ser recibido dentro del alojamiento 500 de modo que el muelle humedecido 514 del accionador de traslado 512 esté en un estado comprimido. El rodillo de compresión 516 está colocado para comprimir el dispositivo 100 en una localización correspondiente al depósito 108. Esta compresión reduce un volumen interno del depósito 108. La reducción de volumen es aproximadamente tan grande como (por ejemplo, al menos aproximadamente 25% mayor, al menos 50% mayor) el volumen de muestra que ha de ser recibido dentro del dispositivo 100. Con el depósito 108 en el estado comprimido, se aplica un volumen de muestra a la entrada 106 del dispositivo 100. El rodillo de compresión 516 se repliega alejándose de la entrada 106 hacia un extremo opuesto 137 de dispositivo 100. A medida que el rodillo 516 se mueve alejándose del depósito 108, el depósito se descomprime aumentando con ello el volumen interno de la red microfluídica. El aumento de volumen crea un vacío que aspira la muestra introduciéndola en el dispositivo.

Aunque se ha descrito dispositivos microfluídicos que tienen un canal capilar abierto se pueden usar otras realizaciones. Por ejemplo, el canal puede incluir un medio que ocupa al menos algo (por ejemplo, la mayor parte o la totalidad) de la sección transversal del canal a lo largo de al menos una porción de su longitud. Típicamente, el medio es uno en el que puede ser inmovilizados múltiples compuestos sonda para definir zonas de ensayo separadas respectivas (por ejemplo, volúmenes de captura), estando cada uno de los sitios de captura dispuestos en tres dimensiones. Los poros o huecos del medio permiten al líquido permear a lo largo del canal (por ejemplo, por acción capilar). El movimiento de líquido a lo largo del canal puede ser ayudado o inducido por, por ejemplo, generación de un vacío dentro del canal como se ha descrito antes. Típicamente, los compuestos sonda son inmovilizados con respecto al medio poroso para definir zonas de ensayo separadas a lo largo del canal. La interacción de los analitos los compuestos sonda de las zonas de ensayo puede ser determinada secuencialmente como se ha descrito para las zonas de ensayo 112i de dispositivo 100. Debido a que cada zona de ensayo está dispuesta en tres dimensiones, la reducción de la distancia entre las superficies internas enfrentadas del canal disminuye el volumen de captura ocupado por los compuestos sonda inmovilizados de la zona de ensayo. La detección óptica se realiza con la zona de ensayo en el estado de volumen reducido (es decir, distancia reducida).

Aunque las zonas de ensayo 112i se han mostrado en forma alargada son posibles otras configuraciones. Por ejemplo, con referencia a la Figura 7, un dispositivo microfluídico 300 incluye múltiples zonas de ensayo 312i, teniendo cada una una configuración generalmente circular. Aparte de una diferencia en la forma, las zonas de ensayo 312i pueden ser idénticas a las zonas de ensayo 112i del dispositivo 100. Aparte de una diferencia en las zonas de ensayo los dispositivos 100 y 300 pueden ser idénticos.

Aunque se ha descrito un método para formar las zonas de ensayo 112i moviendo la punta distal 404 y el sustrato 102 desde una separación inicial d1 (Figura 3b) hasta una separación adyacente d2 (Figura 3c) y hasta una separación intermedia d3 (Figura 3d) antes de iniciar el movimiento lateral de la punta distal 404 y el sustrato 102 (Figura 3f), pueden efectuarse otras realizaciones. Por ejemplo, la punta distal 404 y el sustrato 102 pueden ser movidos lateralmente con la punta 404 y el sustrato 102 en la separación adyacente d2. En esta realización, la separación d2 es típicamente mayor que cero.

Aunque se ha descrito un método para formar las zonas de ensayo 112i que incluye una etapa de mantenimiento de la punta distal 404 y el sustrato 102 en una separación intermedia d3 durante un tiempo de incubación hasta que solamente permanece una porción restante 402' de solución de reactivo 402, se pueden efectuar otras realizaciones. Por ejemplo, el movimiento lateral de la punta distal 404 y el sustrato 102 puede empezar inmediatamente a medida que la punta distal 404 y el sustrato 102 se mueven desde la separación adyacente d2 (Figura 3c) hasta la separación d3 (Figura 3d). En otras palabras, el tiempo de incubación puede ser indistinguible de cero. Como otro ejemplo, durante la incubación, la solución del reactivo que se evapora puede ser reemplazada por solución del reactivo adicional introducida en la punta del capilar. Por consiguiente, la cantidad total de reactivo en la punta capilar aumenta durante la incubación.

Aunque se ha descrito un método para formar las zonas de ensayo 112i que incluye un tiempo de incubación con la punta distal 404 y el sustrato 102 mantenidos a una separación d3, pueden efectuarse otras realizaciones. Por ejemplo, la separación d3 puede variar durante el tiempo de incubación. Por ejemplo, la punta 404 puede ser hecha oscilar lateralmente y/o verticalmente respecto al sustrato 102 durante el tiempo de incubación. Alternativamente o en combinación, la punta 404 puede ser hecha oscilar lateralmente y/o verticalmente respecto al sustrato 102 durante el movimiento lateral. Dicha oscilación puede aumentar el transporte de las moléculas sonda hasta el primer sustrato durante la incubación o el movimiento lateral.

Aunque se ha descrito un método para formar las zonas de ensayo 112i que usa un dispensador capilar se pueden usar otros dispensadores. Por ejemplo, el material puede ser dispensado desde un dispensador sólido (por ejemplo, una varilla sólida).

Aunque se ha descrito un método para formar las zonas de ensayo 112i introduciendo una cantidad de solución de reactivo en una punta distal de un capilar de un dispositivo de goteo capilar (Figura 3b) y llevando la punta y un sustrato a una separación más pequeña d2 de modo que la solución de reactivo 402 entre en contacto con una localización del sustrato 102, se pueden efectuar otras realizaciones. Por ejemplo, se puede introducir la solución de reactivo en la punta distal solamente después de que la punta distal y el sustrato sean llevados a una separación más pequeña (por ejemplo, después de que la punta distal se ponga en contacto con el sustrato).

Aunque se han descrito un método y un lector del dispositivo microfluídico para reducir secuencialmente una distancia entre las superficies internas de un canal, son posibles otras configuraciones. Por ejemplo, un lector del dispositivo microfluídico puede estar configurado para reducir simultáneamente una distancia entre las superficies internas a lo largo de la mayor parte (por ejemplo, sustancialmente la totalidad o la totalidad) de un canal. Subsiguientemente, el lector traslada la zona de detección de un detector a lo largo del canal de modo que se lean secuencialmente diferentes zonas de ensayo.

Aunque se ha descrito un dispositivo microfluídico que tiene un primer sustrato relativamente rígido y un segundo sustrato relativamente flexible, se pueden usar otras realizaciones. Por ejemplo, pueden ser flexibles los sustratos que definen ambas superficies internas enfrentadas de un canal. En tales realizaciones una porción del detector óptico puede formar parte del sistema de compresión. Por ejemplo, el dispositivo microfluídico puede trasladarse entre un rodillo de compresión y un elemento óptico del detector.

Aunque se ha descrito un patrón de referencia que proporciona información relacionada con las propiedades espaciales de las zonas de ensayo de un dispositivo microfluídico, el patrón de referencia puede proporcionar información adicional o alternativa. Por ejemplo, un patrón de referencia puede proporcionar información relacionada con las propiedades físico-químicas de las zonas de ensayo de un dispositivo microfluídico. Dichas propiedades incluyen analitos para los están configuradas para el análisis las zonas de ensayo. Otras propiedades incluyen la identidad y propiedades de los reactivos mantenidos en el dispositivo y la información de fechas (por ejemplo, la fecha de caducidad) del dispositivo.

Aunque se ha descrito un patrón de referencia que incluye marcas distintivas magnéticas, se pueden usar otras marcas distintivas. Por ejemplo, los marcas distintivas pueden estar formadas de regiones que tienen densidad óptica o reflectancia diferentes en comparación con el material circundante. El lector del patrón de referencia es un lector óptico configurado típicamente para leer las marcas distintivas por transmitancia o reflectancia.

- En otras realizaciones, el primer sustrato puede incluir un canal formado, por ejemplo, mediante moldeo por inyección. El canal tiene una primera dimensión (longitud) sustancialmente mayor que su segunda y tercera dimensiones (es decir, anchura y profundidad). El canal puede tener una sección transversal que sea rectangular, en forma de V (triangular), en forma de U o de otra forma. En algunas realizaciones, la forma y/o dimensiones de la sección transversal del canal puede variar a lo largo de la longitud del canal. El segundo sustrato puede estar fijado al primer sustrato por un adhesivo. El segundo sustrato puede estar formado de, por ejemplo, una cinta transparente. El segundo sustrato (por ejemplo, la cinta) puede tener una rigidez mecánica, tal que el contacto mecánico con una superficie externa del segundo sustrato (por ejemplo, la cinta) no deforme sustancialmente la superficie interna del segundo sustrato.
- En ciertas realizaciones, el canal puede estar definido por la superficie interna de un tubo, una tubería, un capilar o similares. El canal puede tener una sección transversal que sea rectangular, en forma de V (triangular) u otra forma. En algunas realizaciones, la forma y/o las dimensiones de la sección transversal del canal puede variar a lo largo de la longitud del canal. Una porción del canal puede ser ópticamente transparente.
- En algunas realizaciones el canal incluye una o más marcas de referencia y/o alineamiento, tales como estructuras definidas o moléculas inmovilizadas configuradas para ser detectables con el sistema de detección usado para el análisis. Las marcas de alineamiento pueden incluir, por ejemplo, perlas fluorescentes inmovilizadas, polímeros fluorescentes inmovilizados, proteínas, ácidos nucleicos y similares. Las marcas de alineamiento también pueden incluir estructuras físicas como microestructuras y similares.
- El dispositivo puede estar configurado para formar un circuito de fluido después de haber introducido la muestra en el canal. El circuito de fluido encierra la muestra líquida en bucle sin fin. Cuando la muestra líquida está encerrada en el circuito de fluido y el volumen de la muestra líquida es menor que el volumen total del circuito de fluido, el volumen restante del circuito de fluido puede ser ocupado por un fluido de transporte. El fluido de transporte puede ser un líquido que sea sustancialmente inmiscible con el líquido de muestra (por ejemplo, en virtud de la hidrofilia/hidrofobia o diferencias de densidad). El fluido de transporte puede ser un gas, tal como, por ejemplo, aire. Típicamente, la muestra líquida estará presente en el circuito de fluido en un tapón continuo.
- Una porción del circuito de fluido incluye una zona comprimible. La zona comprimible puede tener la longitud del circuito de fluido a lo largo de la cual al menos una pared del circuito es comprimible o deformable. Cuando se aplica una fuerza de compresión localizada a la zona comprimible la pared se deforma. Bajo una fuerza suficiente la pared puede ser comprimida hasta un grado que interrumpa el circuito de fluido. Más usualmente, el circuito de fluido será interrumpido en una localización predeterminada, cuando el canal esté lleno con el fluido de transporte.
- Una vez que se ha interrumpido el circuito de fluido la localización de la muestra de fluido dentro del circuito de fluido puede ser manipulada moviendo la localización de la interrupción con respecto al resto del circuito fluido. El movimiento de la interrupción disminuye el volumen del fluido de transporte a un lado de la interrupción, con un aumento correspondiente en volumen del fluido de transporte en el otro lado de la interrupción. Los cambios en volumen dan como resultado una presión diferencial en los extremos de la muestra líquida (es decir, donde se encuentran la muestra líquida y el fluido de transporte). La muestra líquida responde moviéndose dentro del circuito de fluido para igualar las presiones.
- Una o más zonas de ensayo pueden estar separadas a lo largo del canal. Típicamente, cada análisis incluye la interacción del compuesto sonda con el analito respectivo o con un complejo respectivo que incluye el analito y un reactivo (por ejemplo, un marcador óptico).
- La localización de la muestra dentro del canal puede ser controlada por un accionador o rodillo configurado para someter una porción de la zona comprimible a una fuerza de compresión localizada. El dispositivo microfluídico se traslada con respecto al accionador o rodillo de modo que la muestra se desplaza a una localización deseada dentro del canal. Alternativamente, el rodillo puede ser movido mientras que el dispositivo permanece estacionario.
- La Figura 12a ilustra el circuito de fluido 10 en un estado cerrado. El circuito de fluido 10 incluye una primera zona 1, una canal microfluídico 2, una segunda zona 3 y una entrada 4. En el estado cerrado, la segunda zona 3 está conectada ajustadamente a la entrada 4. La Figura 12b muestra el circuito de fluido 10 en un estado abierto y listo para aceptar la muestra líquida 5 en la entrada 4. Después de que la muestra líquida 5 se pone en contacto con la entrada 4, la acción capilar aspira la muestra líquida 5 en la primera zona 1. La Figuras 12c-12d muestran el circuito de fluido en un estado cerrado después de que ha sido aplicada la muestra. El rodillo 6 está posicionado con respecto a la segunda zona 3 de tal modo que la segunda zona está en un estado no comprimido (como en la Figura 12c) o en un estado comprimido (como en la Figura 12d). La localización de la muestra líquida 5 dentro del circuito de fluido 10 puede ser ajustada posicionando el rodillo 6 de tal modo que la segunda zona 3 esté en un estado comprimido, y mientras se mantiene el estado comprimido, moviendo el rodillo 6 respecto a la segunda zona 3 (ilustrado por flechas en la Figura 12d). Debido a que el circuito de fluido está cerrado, el movimiento del rodillo 6 crea una presión diferencial en ambos lado del rodillo; la presión diferencial induce el movimiento de la muestra líquida, restableciendo con ello presiones iguales. El circuito de fluido puede estar configurado para trabajar en un cartucho. En ciertos ejemplos, el circuito de fluido puede tener una trayectoria del flujo microfluídico capaz de

compresión por deformación, un canal microfluídico que incluye una región de detección, y elemento de estanqueidad que puede formar reversible o irreversiblemente un circuito de fluido cerrado.

Las Figuras 13a-13b muestran una vista en corte de un cartucho ilustrativo 100. El cartucho 100 incluye el sustrato 101, la tapa 102, y un circuito de fluido que incluye la primera zona 103, los conductos 108, el canal 105, la segunda zona 104, y la conexión 109 ajustada con la entrada. El canal 105 puede estar cubierto por una capa al menos parcial y ópticamente transmisible. La primera zona 103 puede ser por ejemplo, un capilar, seleccionado para alojar un volumen de muestra deseado (por ejemplo, 1 μL a 20 μL , 2 a 10 μL , o aproximadamente 5 μL). El capilar puede estar revestido con un anticoagulante en su superficie interna. La entrada 109 del capilar está configurada para recibir la muestra 106. En algunas realizaciones, la salida del capilar desemboca en una cámara de reacción 110 con un volumen predeterminado de, por ejemplo, aproximadamente 5 μL , 10 μL o 20 μL . En algunas realizaciones, la cámara de reacción 110 incluye un pelet de reactivo 107. El pelet de reactivo puede incluir anticuerpos marcados con un colorante fluorescente y tener una afinidad para los antígenos que han de ser detectados en la muestra. Por ejemplo, para detectar el número de linfocitos T cooperadores en una muestra líquida, el pelet de reactivo puede incluir un anticuerpo anti-CD4+ marcado con un primer colorante fluorescente (tal como ficoeritrina) y un anticuerpo anti-CD3+ marcado con un segundo colorante fluorescente, (tal como ficoeritrina-Cy5), sales y reactivos estabilizantes etc. En algunas realizaciones, la superficie interna de la primera zona está cubierta con los reactivos necesarios para tratar la muestra. Un análisis ilustrativo para detectar partículas, tales como células, en una muestra líquida se describe en, por ejemplo, el documento de patentes WO 2007/051861. El conducto 108 en comunicación de fluido con la cámara de reacción 110 conecta la cámara de reacción con el primer extremo del canal 105. Como se ha descrito en el documento WO 2007/051861, la detección puede tener lugar en el canal. Por tanto, el canal es al menos parcial y ópticamente transparente. Por ejemplo, el canal 105 puede estar cubierto por una capa al menos parcial y ópticamente transmisible. El segundo extremo del canal 105 está conectado a un primer extremo de la segunda zona 104 por medio del conducto 108. La segunda zona es al menos parcialmente flexible de modo que el diámetro interno de la segunda zona pueda ser reducido a cero. Por ejemplo, la segunda zona puede ser un tubo elástico de silicona o similar. Un segundo extremo de la segunda zona está montado en una tapa 102 que está adaptada para ser aplicada al sustrato y soportar la segunda zona. Abriendo la tapa, se abre la conexión ajustada 109 entre la primera y la segunda zona, cerrando la tapa, se cierra la conexión de ajuste 109 entre la primera y la segunda zona.

En condiciones de transporte el dispositivo puede estar cerrado, es decir, la segunda zona forma una conexión ajustada con la primera zona en la conexión 109. Alternativamente, el dispositivo puede ser transportado en esta abierto. En algunas realizaciones, el dispositivo incluye (por ejemplo, con fines de seguridad) un mecanismo configurado para impedir que el cartucho se abra después de haber sido cerrado. La conexión 109 está cerrada cuando un elemento de estanqueidad en la tapa 102 forma una conexión estanca a los fluidos con un extremo del capilar 103. En funcionamiento, el usuario abre la tapa, abriendo con ello la primera zona por su primer extremo. El usuario pone en contacto el extremo abierto de la primera zona con el líquido de muestra, por ejemplo, una gota de sangre tal como la producida por una lanceta. Por tanto, el capilar 103 se llena con la muestra. El usuario cierra la tapa cerrando con ello la conexión 109 entre la primera y la segunda zona. En este momento, el circuito de fluido incluye un volumen contiguo y predeterminado de líquido de muestra, el pelet reactivo y un volumen contiguo de fluido de transporte (por ejemplo, aire) dentro de la cámara de reacción, los conductos, el canal y la segunda zona. El usuario coloca el dispositivo en la máquina diseñada para hacer funcionar el dispositivo. La máquina incluye un accionador configurado para comprimir la segunda zona, un detector, y un controlador. El accionador comprime la segunda zona, reduciendo su diámetro en el punto de compresión hasta cero. Cuando el dispositivo y el accionador se mueven uno respecto al otro mientras se encuentran en estado comprimido, aumentará la presión en el fluido de transporte en un extremo del volumen de muestra mientras que disminuirá en el otro extremo del volumen de muestra. El volumen de muestra se moverá dentro del circuito de fluido hasta que se iguale la presión en cada extremo del volumen de muestra.

El canal 105 puede ser hidrófobo, de tal modo que la muestra no se mueva en el canal 105 sin aplicación de una fuerza externa. En algunas realizaciones, también pueden ser hidrófobas las paredes en la proximidad del pelet reactivo 107. Cuando se usan materiales hidrófilos la estabilidad a largo plazo del pelet reactivo puede ser peor comparada con un material hidrófobo.

En una realización, el accionador está fijado dentro de la máquina y el dispositivo se mueve con relación a los medios de compresión. Como se describe en el documento de patente WO 2007/051861, el accionador es, por ejemplo, un rodillo.

El dispositivo puede ser movido dentro de la máquina de tal modo que la muestra se mueva entrando en la cámara de reacción disolviendo con ello el pelet reactivo en esta cámara. Los anticuerpos se unirán a los antígenos respectivos presentes en la muestra. Dependiendo del tipo de muestra, los antígenos pueden estar localizados en partículas suspendidas en el líquido de muestra (por ejemplo, en las superficies celulares de una muestra de sangre). Debido a que los anticuerpos están marcados (por ejemplo, con un colorante fluorescente), una vez unidos a sus respectivos antígenos, dichos antígenos también quedarán marcados. Véase, por ejemplo, el documento de patente WO 2007/051861. Moviendo más el dispositivo respecto a la máquina en la misma dirección se mueve la muestra entrando en el canal. Una vez que el canal está lleno tiene lugar la detección.

Deseablemente, el detector es pequeño, barato y versátil; es decir, es adaptable a aplicaciones distintas de las solamente descritas en la presente memoria. El detector puede ser un microscopio de fluorescencia, preferiblemente uno que tenga dimensiones externas muy pequeñas y una altura pequeña con respecto al cartucho. El detector puede ser capaz de captar imágenes de objetos con un tamaño $\geq 5 \mu\text{m}$ y está configurado para detectar señales de la longitud de onda que son emitidas por los colorantes fluorescentes usados en el análisis. La fuente luminosa puede ser un diodo emisor de luz (LED) de alta potencia que emite luz en un espectro que es adecuado para excitar los colorantes fluorescentes usados en el análisis. Si se usan colorantes diferentes, por ejemplo, al menos dos colorantes diferentes que emiten luz a dos diferentes longitudes de onda, la detección debe ser posible en cada una de al menos dos longitudes de onda diferentes. El detector puede incluir un mecanismo de enfoque y una cámara.

Usualmente, se usan fuentes luminosas muy potentes para la microscopía de fluorescencia, debido a que al tener haces luminosos casi paralelos, solamente se usa una pequeña porción de la luz emitida (ángulo sólido $\sim 2^\circ$). Usando una lente convergente y una lente detectora que recoge una porción mayor de luz emitida por la fuente, puede usarse una fuente menos potente (por ejemplo, un LED). La microscopía de fluorescencia tiene tradicionalmente un valor muy alto en la fidelidad óptica; de tal modo, que los expertos desaconsejan altos ángulos sólidos para lentes convergentes. Realmente, ha habido la tendencia a usar sistemas ópticos complejos relativamente pesados y voluminosos para conseguir alta fidelidad óptica.

Con referencia a la Figura 14, un detector ilustrativo 500 incluye un cuerpo principal 501 que incluye una primera trayectoria óptica 502 y una segunda trayectoria óptica 503. En ciertos ejemplos, cada una de las trayectorias ópticas independientemente, puede tener una forma generalmente cilíndrica u otra configuración adecuada. La primera trayectoria óptica 502 representa la trayectoria óptica de excitación; la segunda trayectoria óptica 503 representa la trayectoria óptica de detección.

La primera trayectoria óptica 502 conecta la fuente luminosa 505 con el cartucho 516. La fuente luminosa 505 puede ser un LED de alta potencia (tal como un Platinum Dragon® LED (Osram)) con longitudes de onda de emisión de 455 nm, 470 nm y 528 nm y un ángulo de visión de 120° (emisor de Lambertian). Cuando se usan colorantes fluorescentes la fuente luminosa se selecciona de acuerdo con la longitud de onda de excitación de los colorantes fluorescentes que se usan en el análisis. Por ejemplo, cuando se usa ficoeritrina y ficoeritrina-Cy5, la fuente luminosa se selecciona para emitir luz con una longitud de onda de alrededor de 520 nm, mientras que para el uso de ficoeritrina y PerCP, la fuente luminosa se selecciona para emitir luz de una longitud de onda de alrededor de 480 nm. La lente convergente 506 (por ejemplo, hecha de topacio, índice de refracción 1,533) condensa la luz emitida por el LED en la primera trayectoria óptica 502. La abertura 502a está configurada para permitir un ángulo sólido máximo de $13,5^\circ$ o menos para iluminar el espejo dicroico 504. La trayectoria óptica 502 incluye también un filtro de paso de banda 507 (filtro de excitación), que permite que pase la luz con una longitud de onda entre 505 nm y 530 nm. Por tanto, la longitud de onda de excitación restante sería alrededor de 528 nm.

La trayectoria óptica 503 conecta la camera CMOS con el objeto 516 por medio del espejo dicroico 504 y está configurada a un ángulo (mostrado como 90° en la Figura 14) respecto a la trayectoria óptica 502. La trayectoria óptica 503 incluye también un primer filtro de emisión 510. En algunas realizaciones, el filtro 510 está montado en un cambiador de filtros 512. El cambiador de filtros 512 puede incluir filtro(s) de emisión adicional(es), por ejemplo, un filtro 513. Los filtros de emisión 510 y 513 se pueden elegir con relación a un conjunto predeterminado de longitudes de onda de emisión, por ejemplo, las longitudes de onda de emisión de el(los) colorante(s) fluorescente(s) usado(s) para marcar los reactivos en el cartucho. Por ejemplo, los filtros 510 y 513 se pueden seleccionar para dejar pasar la luz con longitudes de onda de 590 nm y 685 nm, respectivamente, correspondientes a longitudes de onda de emisión de la ficoeritrina y la ficoeritrina-Cy5. La trayectoria óptica 503 incluye una abertura 503a configurada para permitir un ángulo sólido máximo de $13,5^\circ$ en el espejo dicroico 504.

El espejo dicroico 504 está configurado para separar la trayectoria óptica de detección 503 de la trayectoria óptica de excitación 502. En algunas realizaciones es un espejo dicroico de paso corto que permite el paso de luz con una longitud de onda ≤ 568 nm, mientras que es reflejada la luz con una longitud de onda > 568 nm. Por tanto, el espejo dicroico 504 permite que pase la luz desde la trayectoria óptica de excitación mientras es reflejada la luz del objeto 516 en la trayectoria óptica de detección. De nuevo, las propiedades físicas del espejo dicroico 504 se seleccionan de acuerdo con los marcadores (por ejemplo, los colorantes fluorescentes) que se usan en el análisis.

En algunas realizaciones el detector incluye además un mecanismo de enfoque 514 que permite variar continuamente la distancia de la lente de detección 508 y el objeto en 5 mm o menos, por ejemplo en 1 o 2 mm.

En algunas realizaciones, la lente de detección 508 está configurada para tener una abertura óptica de detección de 0,4 o menos, por ejemplo, 0,2 y una abertura óptica de excitación de 0,5 o menos, por ejemplo 0,4.

El detector puede incluir también un dispositivo digital de captura de imágenes, tal como una cámara CMOS de valor gris de 8 bits con una resolución de por ejemplo, 640×480 píxeles. En otras realizaciones, el dispositivo digital de captura de imágenes puede tener una mayor resolución y/o puede ser una cámara CMOS de color.

En algunas realizaciones, la escala de reproducción del sistema de detección está entre 1:1 y 1:10, por ejemplo 1:3, 1:4 o 1:5.

En algunas realizaciones, la distancia entre el objeto 516 y la lente de detección 508 está entre 2 mm y 20 mm, por ejemplo, 8 mm, 9 mm o 10 mm.

Con referencia a la Figura 15, en funcionamiento la luz emitida por la fuente luminosa 505 es condensada por la lente 506 y filtrada por el filtro de excitación 507. Pasa por la abertura 502a, el espejo dicróico 504, la lente de detección 508, la abertura 509 y excita el objeto 601. En algunas realizaciones, el objeto 516 es el canal lleno con el líquido de muestra, por ejemplo, sangre, incluyendo dicho líquido cierto número de partículas que han de ser detectadas, por ejemplo linfocitos T cooperadores. Las partículas pueden estar marcadas con uno o más anticuerpos acoplados a colorantes fluorescentes. En otras realizaciones el objeto es un canal que incluye moléculas diana marcadas con uno o más colorantes fluorescentes y unidas a moléculas sonda o una matriz con moléculas sonda inmovilizadas en una de las superficies del canal. Los colorantes fluorescen bajo la influencia de la luz de excitación procedente del LED. La luz emitida por los colorantes fluorescentes pasa por la abertura 509, la lente de detección 508 y se refleja por medio el espejo dicróico 504 en la trayectoria óptica de detección 503. Allí pasa el filtro de detección 510 (o 513, dependiendo de la posición del cambiador de filtros 512) adaptado para permitir el paso de luz de una longitud de onda de la luz emitida por el colorante fluorescente. Después de que la luz ha pasado el filtro es recogida por el chip CMOS de la cámara CMOS 511 conectada.

Las Figuras 16a-16b ilustran como se puede usar el detector para detectar, por ejemplo el número de linfocitos T cooperadores presente en una muestra de sangre. Los detalles para el dispositivo y la reacción se pueden encontrar antes y en el documento WO 2007/051861. En el ejemplo estudiado, el cartucho se prepara con dos anticuerpos marcados: anticuerpos anti-CD4+ marcados con ficoeritrina y anticuerpos anti-CD3+ marcados con ficoeritrina-Cy5. Puesto que los linfocitos T cooperadores muestran ambos antígenos en sus superficies, los linfocitos T cooperadores estarán marcados con ambos colorantes fluorescentes. También pueden estar presentes en la muestra otras células que muestran solamente, uno de ambos antígenos en sus superficies. Estas células estarán marcadas solamente con el colorante fluorescente adecuado.

Después de la reacción con los anticuerpos marcados con el colorante fluorescente respectivo, la muestra líquida que comprende células fluorescentes 712 es movida en el canal de detección 711. En una primera posición (Figura 16a) el detector 710 detecta una primera imagen 714 que representa una vista en una porción 713 del canal 711. La porción 713 representa un volumen predeterminado de la muestra, por ejemplo, 100 nL. La imagen 714 está tomada con un primer filtro que está configurado para permitir el paso de la luz emitida por los anticuerpos anti-CD4+ marcados con ficoeritrina presentes en la muestra y bloquear la luz emitida por los anticuerpos anti-CD3+ marcados con ficoeritrina-Cy5. Se toma una segunda imagen 715 de la misma posición usando un segundo filtro que está configurado para permitir el paso de la luz emitida por los anticuerpos anti-CD3+ marcados con ficoeritrina-Cy5 y bloquear la luz emitida por los anticuerpos anti-CD4+ marcados con ficoeritrina. Las imágenes 714 y 715 pueden mostrar un número diferente de señales dentro de la porción 713. Adicionalmente, debido a las aberraciones del sistema óptico tanto las imágenes 714 como 715 podrían estar fuera del alineamiento de una con respecto a la otra.

Se puede usar un programa informático (por ejemplo, Iconoclust de Clondiag) para alinear tanto las imágenes 714 como 715, por ejemplo, usando marcas de alineamiento en el canal (no mostradas) o analizando las relaciones entre las señales que están presentes en ambas fotografías. Adicionalmente, el programa informático identifica y marca las señales que han sido detectadas en ambas fotografías (716). En la Figura 16a, se identificaron tres señales que estaban presentes en ambas figuras. Esto significa que se encontraron 3 células con ambos antígenos en la porción 713. Los resultados pueden ser presentados, ser usados para posteriores cálculos o estadísticas o pueden ser conservados para posterior procesamiento.

El detector 710 y el canal 711 se mueven uno respecto al otro para visionar otra porción 717 del canal 711 (Figura 16b) y se repite el método de detección. Las imágenes 718 y 719 se registran, usando el primer y el segundo filtros, respectivamente. El programa informático identifica y marca las señales que han sido detectadas en ambas fotografías (720).

La detección se puede repetir en otras porciones del canal de detección, dando como resultado un conjunto de valores que representan el número de células en cada una de las porciones. El número de células presentes en la muestra, así como los parámetros estadísticos correspondientes pueden ser calculados a partir de este conjunto de valores. Por ejemplo, una media de tres células por cada 100 nL corresponde a una cantidad total de 150 células en un volumen de muestra de 5 μ L.

La Figure 17 muestra una superposición de dos imágenes detectadas durante un experimento de recuento de linfocitos T usando sangre como muestra líquida. Ambas imágenes se detectan en la misma localización del canal (por ejemplo, como las imágenes 714 y 715 en la Figura 5) usando dos filtros de detección diferentes. 801 y 802 representan una marca de alineamiento tomada como imagen usando dos filtros de detección diferentes. La deslocalización entre ambas imágenes puede ser detectada claramente y corregida usando las marcas. 803 y 804 representan una sola célula que está deslocalizada con la misma distancia que las marcas de alineamiento 801 y 802. Puesto que esta célula está presente en ambas imágenes, se puede determinar que esta célula está marcada con ambos anticuerpos y por tanto es un linfocito T cooperador. 805 representa una célula que es detectable solamente en una de ambas imágenes de la superposición. Por tanto, puede llegarse a la conclusión de que esta

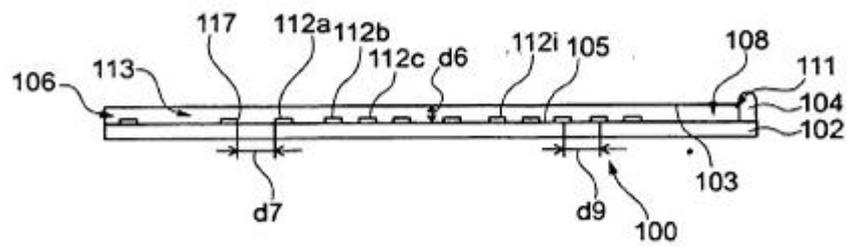
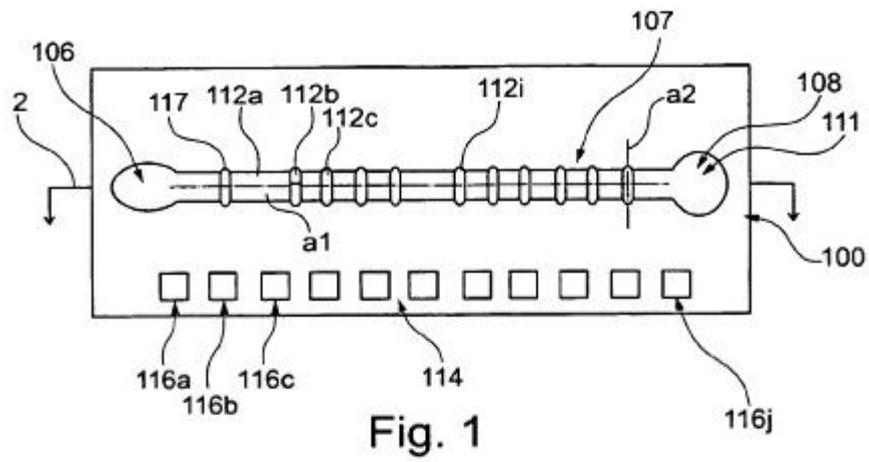
célula no muestra ambos antígenos en su superficie y por tanto no es un linfocito T cooperador. También pueden verse en las imágenes otras células de la sangre. Puesto que no están marcadas con ningún anticuerpo fluorescente solamente pueden verse como una sombra (806).

Otras realizaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para detectar un analito, que comprende:
 - un cartucho (100) que tiene:
 - un canal microfluídico (105) que incluye una entrada (109) y una región de detección (711) en comunicación de fluido con la entrada (109);
- 5 una trayectoria del flujo microfluídico (104) que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación de fluido con la región de detección (711) del canal (105); y
 - un tapa (102) que tiene un elemento de estanqueidad configurado para asegurar la estanqueidad de la entrada (109) y formar un circuito de fluido que incluye la entrada (109), el canal microfluídico (105) y la trayectoria del flujo microfluídico.
- 10 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde la tapa (102) y el cartucho (100) están configurados para cerrarse irreversiblemente después de la formación del circuito de fluido o en donde la tapa (102) está unida flexiblemente al cartucho (100) o en donde la tapa (102) y el cartucho (100) están configurados para encajarse en una primera posición relativa de tal modo que la tapa (102) pueda ser retirada y ser encajada en una segunda posición relativa, de tal modo que la tapa (102) esté irreversiblemente cerrada después de la formación del circuito de fluido.
- 15 3. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde la región de detección (711) está delimitada por al menos una superficie del cartucho (100) y al menos una superficie de una tapadera, en donde la tapadera incluye opcionalmente una película transparente sobre la región de detección y está fijada opcionalmente con adhesivo al cartucho (100).
- 20 4. Un método, que comprende:
 - introducir una muestra líquida en una entrada (109) de un canal microfluídico (105) formando con ello un tapón líquido contiguo encerrado por el canal (105) y delimitado en un primer extremo por un fluido de transporte, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas,
 - asegurar la estanqueidad de un elemento de estanqueidad de un tapa (102) con la entrada (109) y formar con ello un circuito de fluido, tal que el fluido de transporte proporcione comunicación de fluido entre el primer y segundo extremos del tapón líquido, en donde una porción del circuito de fluido está formada por una pared deformable,
 - formar una mezcla que comprende al menos una porción de la muestra líquida y un marcador óptico presente dentro del canal microfluídico (105) aplicando una presión diferencial al primer y segundo extremos del tapón líquido por medio el fluido de transporte y moviendo con ello el tapón líquido dentro del circuito de fluido,
 - 30 formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos uno de los marcadores ópticos, y
 - detectar los complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.
- 35 5. El método de la reivindicación 4, en donde la aplicación de una presión diferencial al primer y segundo extremos del tapón líquido incluye comprimir una pared elásticamente deformable.
6. El método de las reivindicaciones 4 o 5, que comprende además detectar los complejos presentes dentro de cada uno de los múltiples subconjuntos diferentes de la mezcla, en donde un volumen total de los múltiples subconjuntos diferentes de la mezcla es opcionalmente al menos 90% de un volumen de la muestra líquida introducida en el canal microfluídico, que comprende opcionalmente detectar los complejos presentes dentro de al menos 10% del volumen total de la mezcla.
- 40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende introducir un volumen total V de muestra líquida en el canal microfluídico y en donde un volumen total de la mezcla es al menos 90% del volumen V, opcionalmente al menos aproximadamente 95% del volumen V de muestra líquida.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde las partículas son células y los marcadores ópticos son marcadores fluorescentes.
- 45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde el canal microfluídico (105) incluye la entrada (109) y una región de detección (711) en comunicación de fluido con la entrada (109) y es un canal microfluídico (105) de un dispositivo microfluídico (100).

- 5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, que comprende además, antes de introducir una muestra líquida en un canal microfluídico (105), introducir una muestra líquida en un ánima de un capilar (103), comprendiendo además opcionalmente, las etapas intermedias de introducir la muestra líquida en el ánima del capilar (103) e introducir la muestra líquida en el canal microfluídico (105), conectar el capilar (103) al dispositivo microfluídico (100), permaneciendo la muestra líquida dentro del capilar (103), en donde el ánima del capilar comprende opcionalmente un inhibidor de la coagulación.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que comprende además detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto de la muestra líquida, estando presente dicho subconjunto dentro de una región de detección (711) del dispositivo microfluídico (100).
- 10 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde la introducción de la muestra líquida en el canal microfluídico (105) se realiza comprimiendo la pared elásticamente deformable, en donde la compresión de la pared elásticamente deformable comprende opcionalmente comprimir una primera porción del circuito de fluido y, sin liberar primero completamente la compresión, mover un sitio de la compresión a lo largo del circuito de fluido en una distancia suficiente para realizar la etapa de introducción.
- 15 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, que comprende realizar la etapa de detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro del subconjunto, liberando primero completamente la compresión.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, donde la muestra líquida es sangre.
- 20 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende las etapas intermedias de introducir la muestra líquida en el ánima del capilar (103) e introducir al menos la porción de la muestra líquida en el canal microfluídico (105), impidiendo que la muestra líquida salga del capilar (103).
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15, en donde una región de detección del canal microfluídico (105) no soporta flujo capilar de la muestra líquida.
- 25 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16, en donde al menos una parte de una superficie interna del canal microfluídico es hidrófoba.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, que comprende además mover al menos uno del dispositivo microfluídico (100) y un detector óptico (500) con respecto al otro y subsiguientemente detectar una señal óptica indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto diferente de la muestra líquida.
- 30 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en donde el capilar (103) es un capilar de extremo a extremo que comprende un primer y segundo extremos abiertos, el ánima del capilar (103) comprende un volumen total V , y la etapa de introducir al menos una porción de la muestra líquida comprende introducir al menos 90% de la muestra líquida en el canal microfluídico (105).



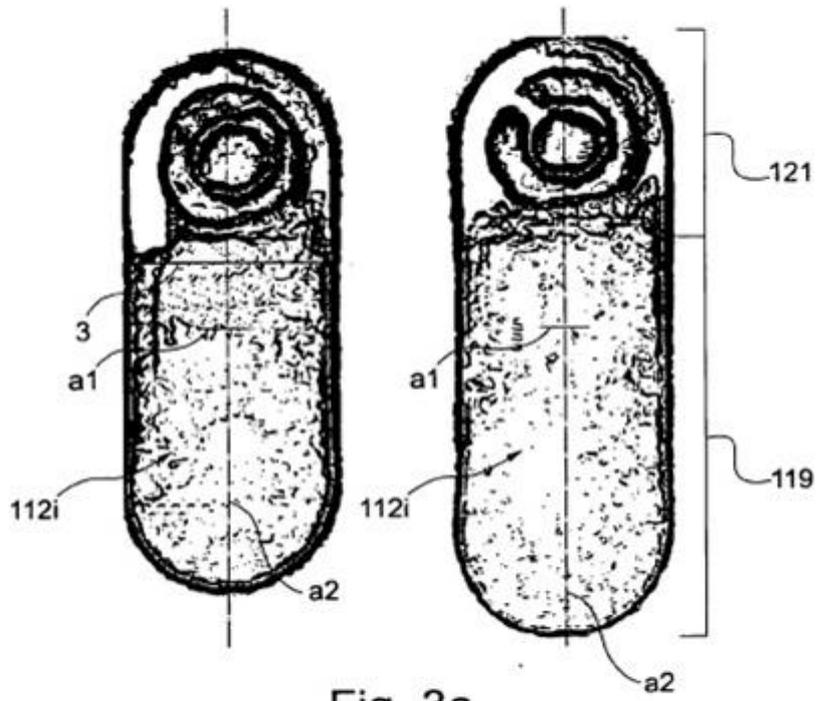
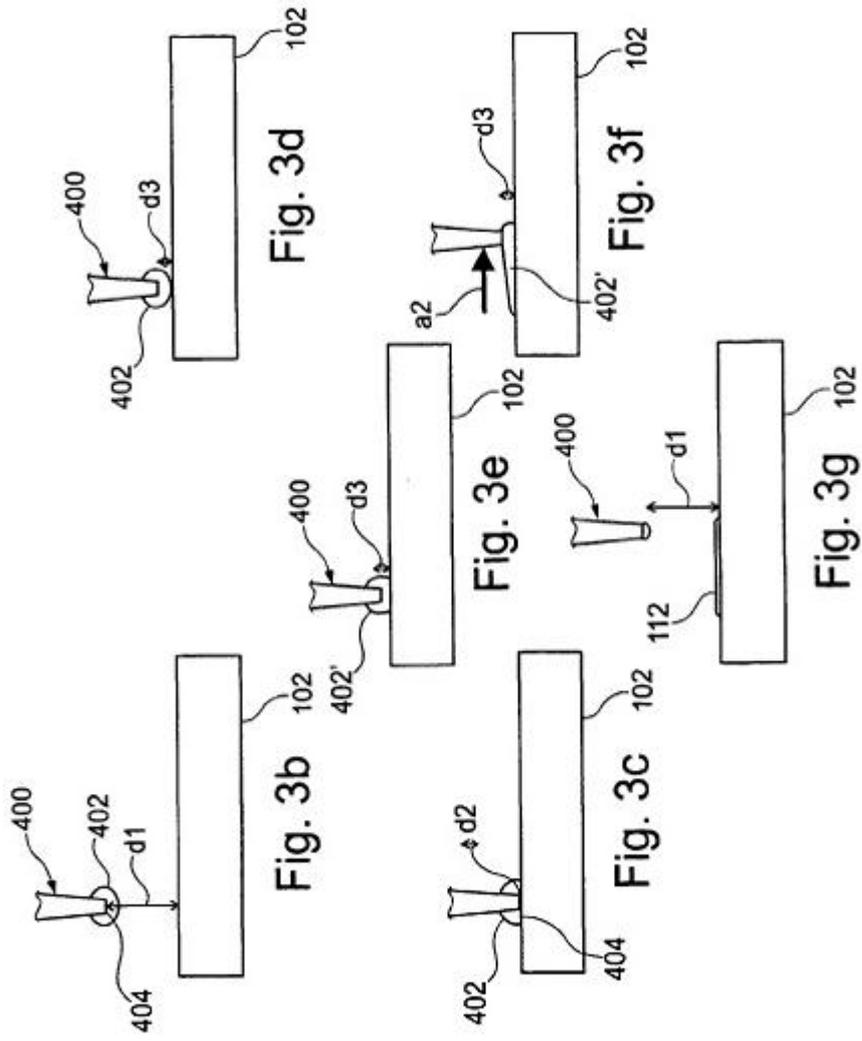


Fig. 3a



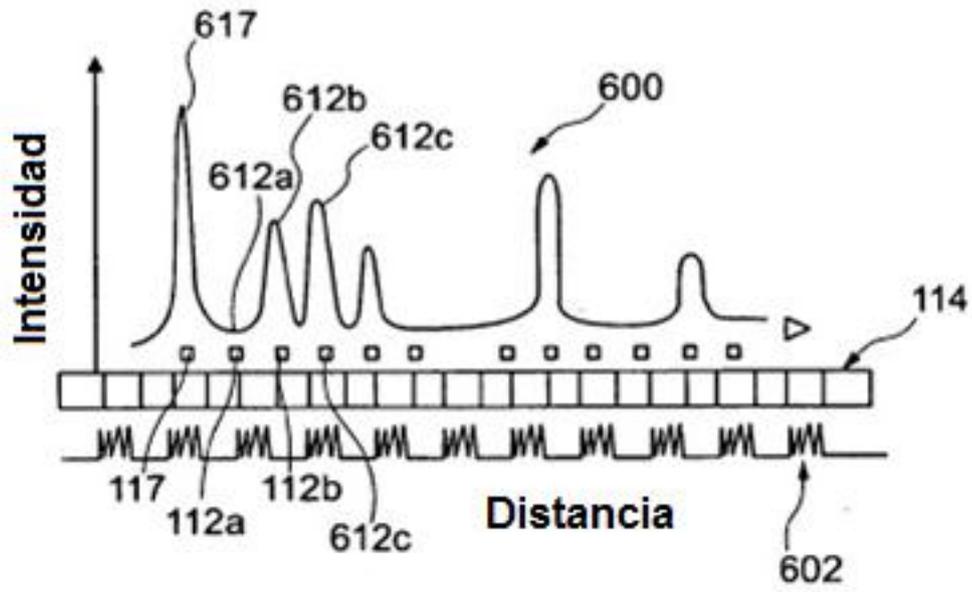


Fig. 6

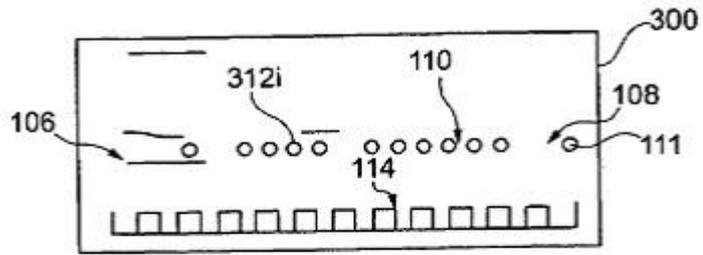


Fig. 7

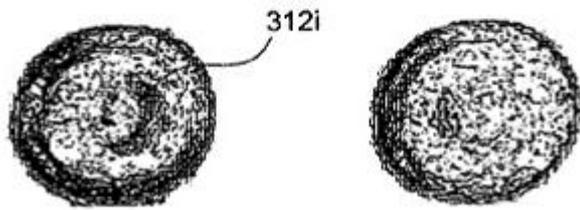


Fig. 8a

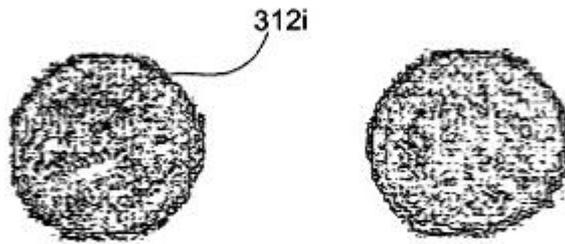


Fig. 8b

700

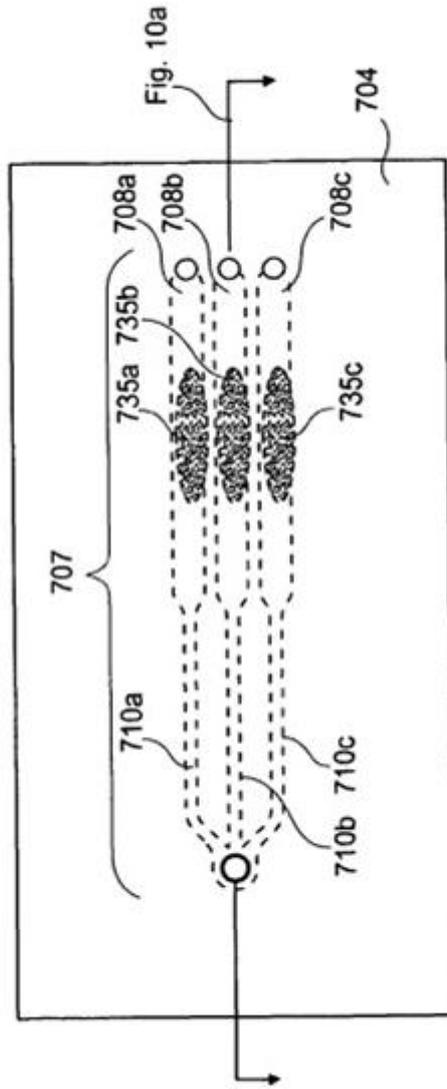


Fig. 9

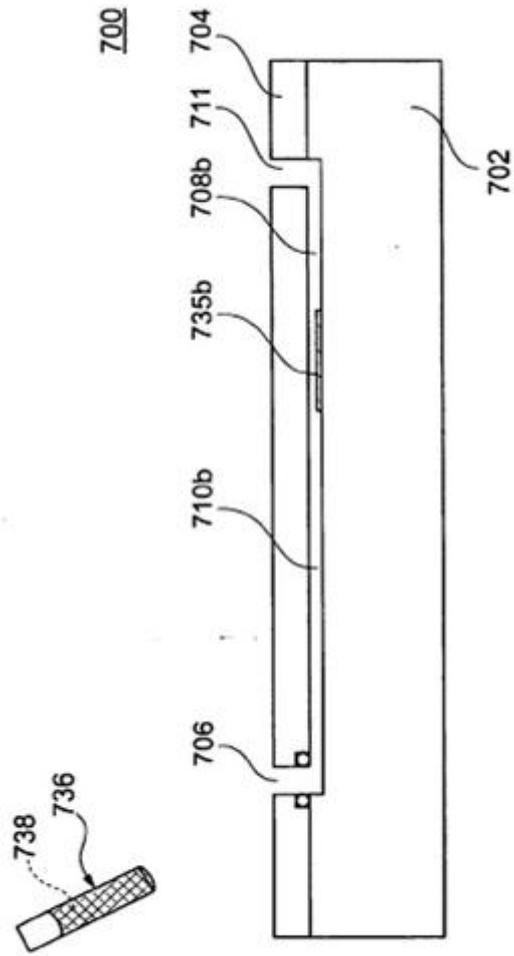


Fig. 10a

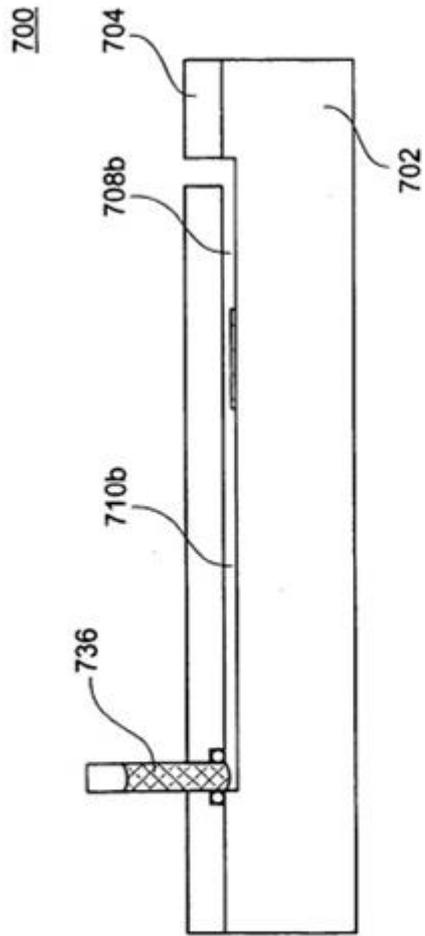


Fig. 10b

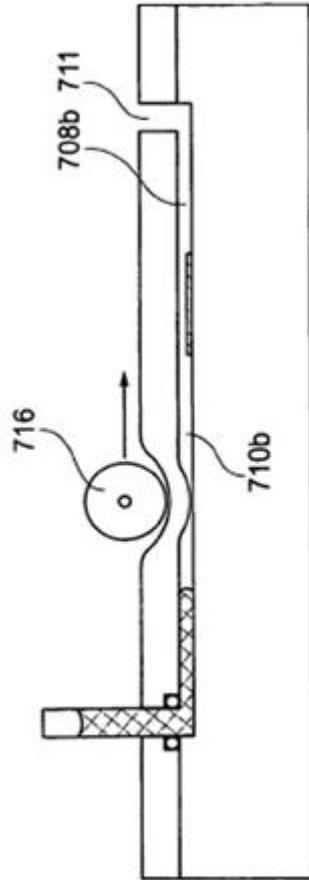


Fig. 10c

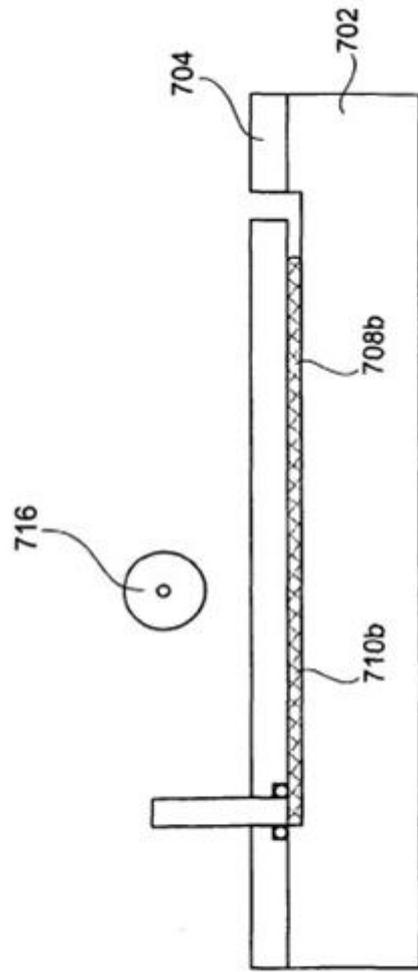


Fig. 10d

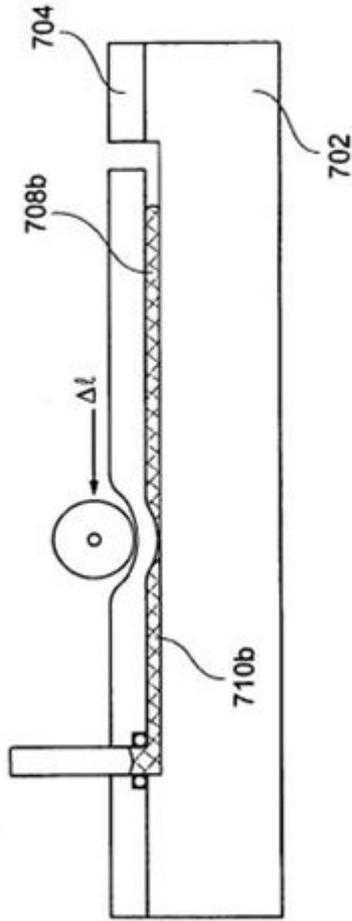


Fig. 10e

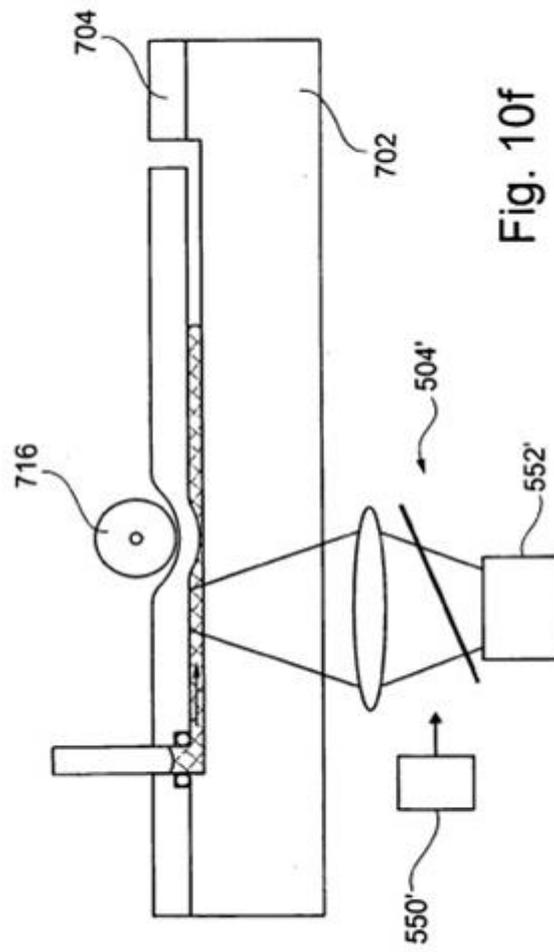
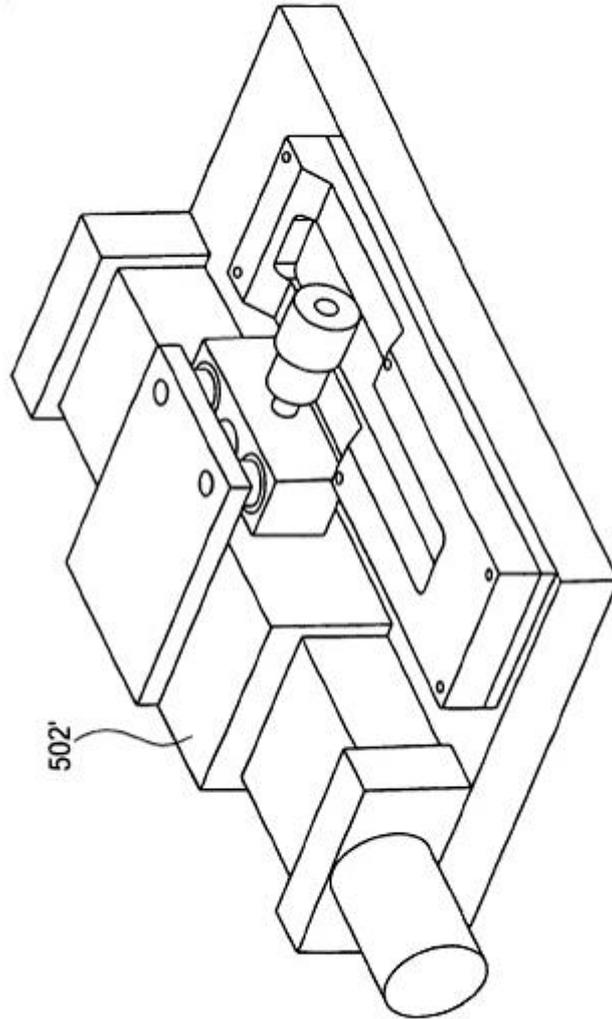


Fig. 10f

500'



502'

Fig. 11

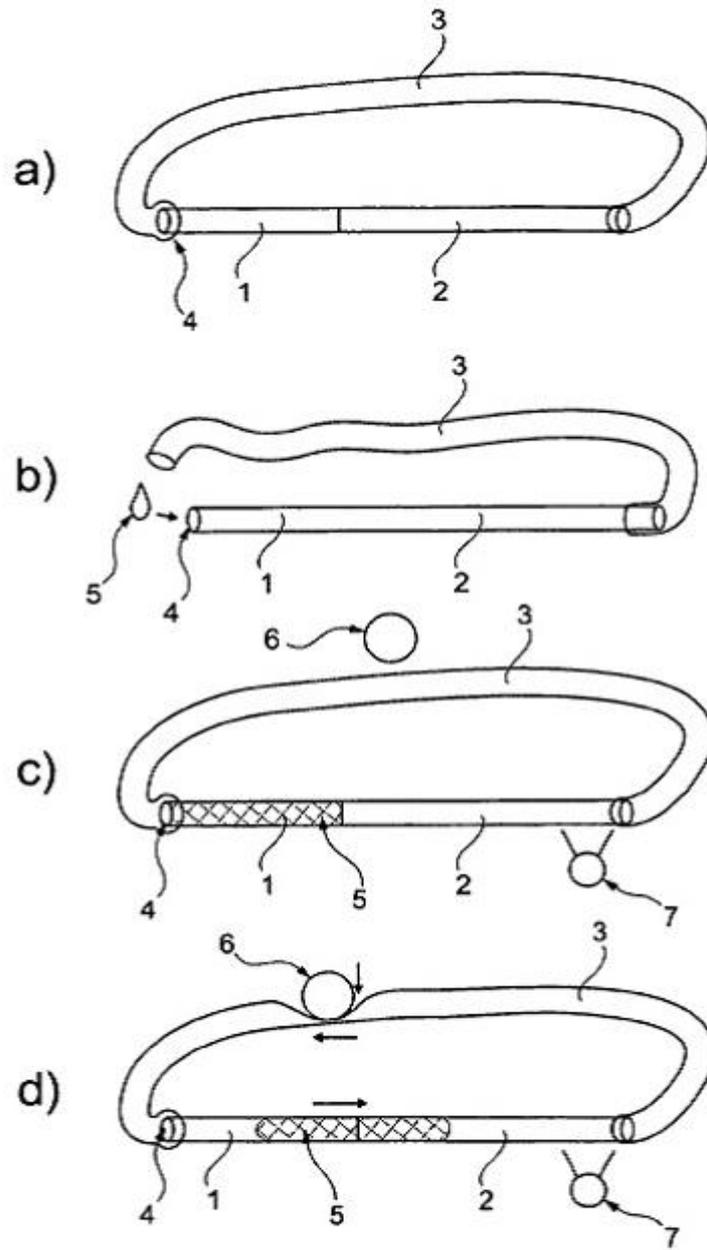


Fig. 12

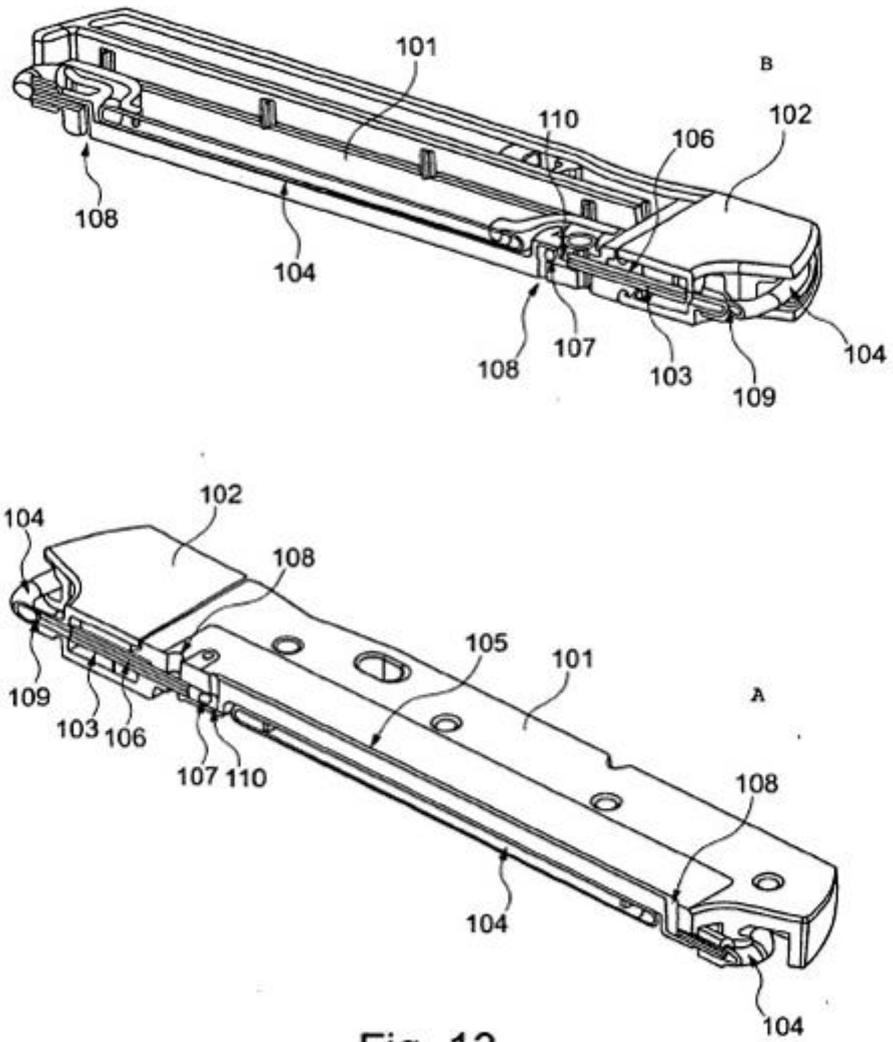


Fig. 13

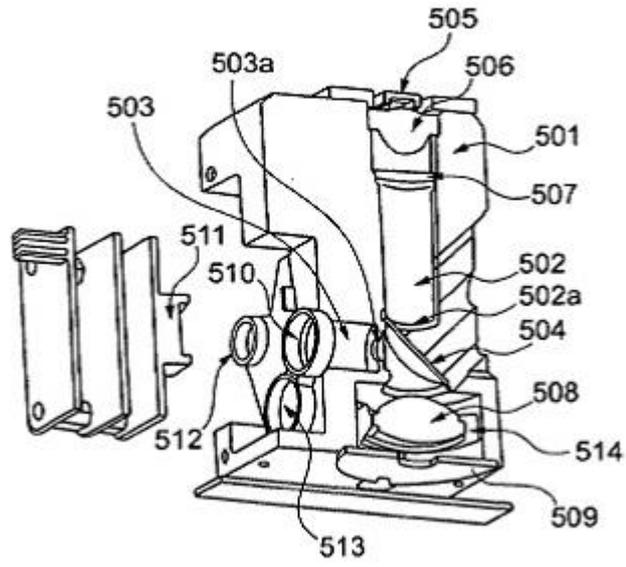


Fig. 14a

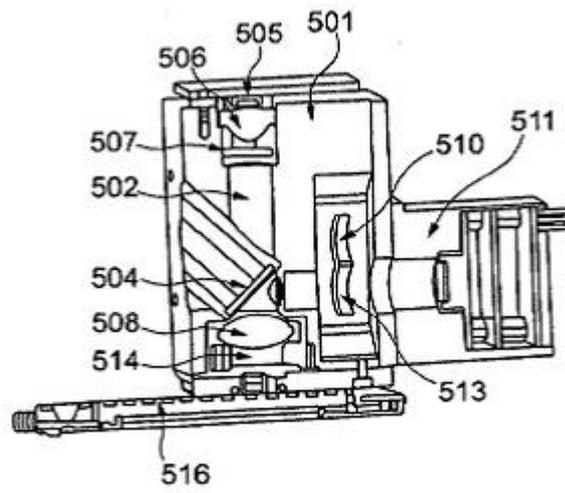


Fig. 14b

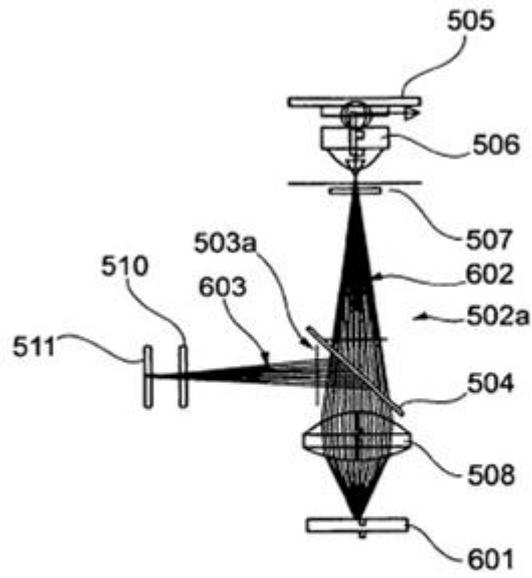


Fig. 15

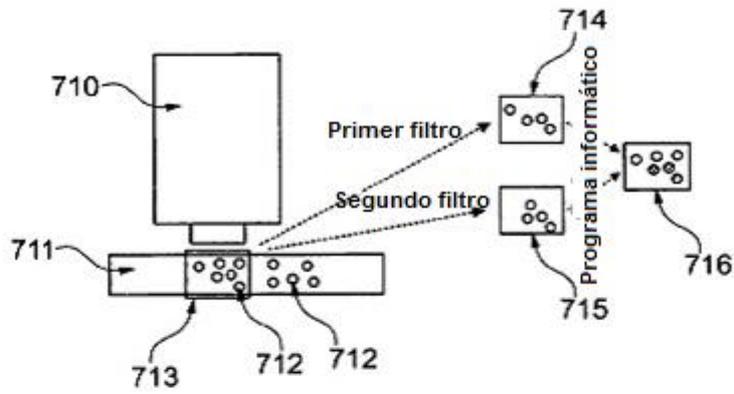


Fig. 16a

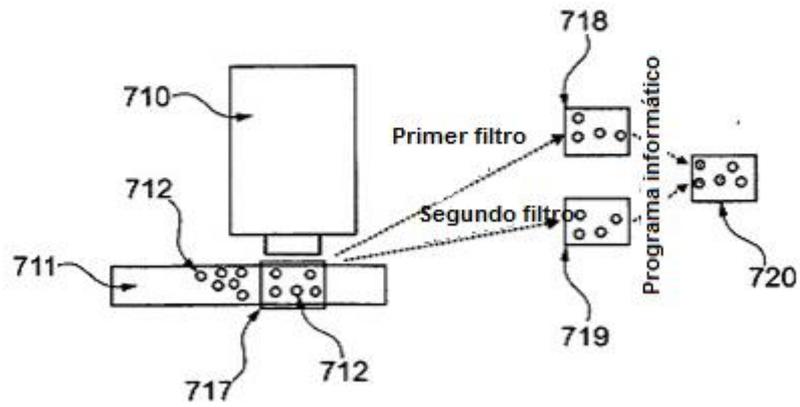


Fig. 16b

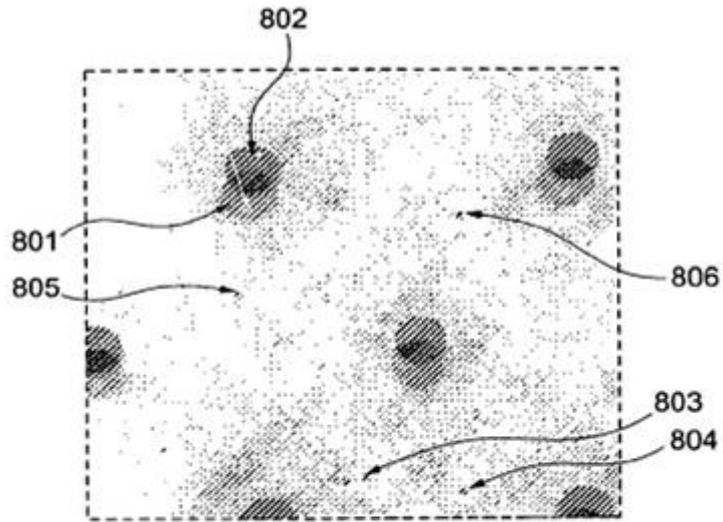


Fig. 17