

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 225**

51 Int. Cl.:

B01J 4/02 (2006.01)

B01L 3/02 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2005 E 05722725 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1776181**

54 Título: **Sistema y método para el suministro de fluidos**

30 Prioridad:

26.01.2004 US 539358 P

26.01.2004 US 539416 P

26.04.2004 US 565866 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2014

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (100.0%)**

**17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**SIA, SAMUEL K.;
LINDER, VINCENT A. y
WHITESIDES, GEORGE M.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 439 225 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

Sistema y método para el suministro de fluidos

- 5 Esta invención se refiere a un método y a un aparato para el suministro y/o almacenamiento de uno o más fluidos y, en particular, a un método y a un aparato para almacenar y suministrar reactivos químicos y biológicos.

El suministro de fluidos juega un importante papel en sectores tales como la química, microbiología y bioquímica. Estos fluidos pueden incluir líquidos o gases y pueden proporcionar reactivos, disolventes, reaccionantes o agentes de aclarado a procesos químicos o biológicos. A menudo, más de un fluido es suministrado a un recipiente o sitio de reacción para fomentar la interacción entre los fluidos o componentes de los fluidos. También se pueden utilizar fluidos de aclarado intermitentes para separar reaccionantes indeseados o para preparar un reactor, sitio de reacción o sitio de ensayo.

- 15 Mientras que diversos dispositivos y métodos microfluidicos tales como ensayos microfluidicos, pueden proporcionar plataformas analíticas económicas, sensibles y precisas, el suministro de fluidos a la plataforma puede añadir un nivel de coste y de sofisticación que pueden requerir llevar a cabo un ensayo en un laboratorio más que en el campo, en donde puede ser de la mayor utilidad.

- 20 Dado que plataformas químicas y bioquímicas se están convirtiendo cada vez más pequeñas debido a mejoras en sectores tales como los microfluidos, se requieren cantidades de reactivo menores para realizar un número similar de ensayos o reacciones. Típicamente, sin embargo, plataformas de menor tamaño no disminuyen la necesidad de suministrar múltiples reactivos y agentes de aclarado a un sitio de reacción. Por ejemplo, algunos ensayos de microfluidos pueden requerir menos de un microlitro de fluidos reactivos, pero puede ser necesario suministrar dos, tres o más fluidos diferentes en cantidades precisas y en una secuencia adecuada.

- Para ensayos y reactores de microfluidos, los fluidos son suministrados a menudo por un operario utilizando una micropipeta. Un fluido se puede pipetear en la entrada de un sistema microfluidico, y el fluido se puede retirar a través del sistema mediante la aplicación de una fuente de vacío al extremo de salida del sistema microfluidico. Los reactivos también se pueden bombear, por ejemplo utilizando diferentes bombas de jeringa llenas con los reactivos requeridos. Una vez que se ha bombeado un fluido en el dispositivo microfluidico, un segundo puede ser bombeado al desconectar una tubería procedente de la primera bomba y conectar una tubería procedente de una segunda bomba. Alternativamente, se puede utilizar un sistema de válvulas para cambiar de un fluido bombeado a otro. Se utilizan diferentes bombas para cada uno de los fluidos para evitar una contaminación cruzada. Esto puede ser de particular relevancia cuando dos fluidos que contienen componentes que pueden reaccionar uno con otro o cuando se mezclan, pueden afectar a los resultados de un ensayo o reacción.

- Los sistemas de flujo continuo pueden utilizar una serie de dos fluidos diferentes que atraviesan en serie un canal de reacción. Los fluidos se pueden bombear a un canal de una manera en serie al cambiar, a través de un sistema de válvulas, la fuente de fluido que está alimentando al tubo. Los fluidos se mueven constantemente a través del sistema en secuencia y se permite que reaccionen en el canal. Por ejemplo, utilizando un flujo continuo puede realizarse una reacción PCR. Véase Obeld et al., "Microfabrication Device for DNA and RNA Amplification by Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Cycle Number Selection", *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 288-295.

- La utilidad de sistemas de fluidos puede verse afectada por el tiempo de almacenamiento, o vida útil, de cualesquiera reactivos que se han de utilizar con un sistema. Un sistema microfluidico portátil puede ser transportado a casi cualquier lugar, pero cuando los reactivos han de ser preparados de manera reciente, la utilidad del sistema en el campo puede disminuir. Esto puede ser cierto, en particular, para sistemas de base biológica y bioquímica que pueden depender de reactivos que, por ejemplo, son inestables, tienen cortas vidas útiles o han de ser almacenados bajo condiciones especiales tales como refrigeración.

- Una determinación precisa, temprana y permanente de un estado patológico es importante para la prevención y el tratamiento de enfermedades de seres humanos y animales. Una clase de técnicas de diagnóstico utiliza reacciones de inmunoensayo para detectar la presencia de un antígeno o un anticuerpo en una muestra tomada de un sujeto. Estos métodos de inmunoensayo incluyen, por ejemplo, ELISA, ensayos inmunocromatográficos (tests con tiras, ensayos con papel tornasol y ensayos de flujo lateral) y ensayos de sándwich. La precisión, fiabilidad y facilidad de uso de estos tipos de ensayos han mejorado, pero a menudo el ensayo requiere condiciones de laboratorio, suministros de energía y entrenamiento que pueden no estar disponibles en algunas zonas en donde se desea realizar el ensayo.

Un tipo de ensayo de sándwich utiliza anticuerpos conjugados con oro para potenciar la detección. Por ejemplo, véase la publicación PCT WO/91/01003. La intensificación de una señal de coloide de oro se puede conseguir tiñendo los coloides de oro con plata. Primeramente, un antígeno se inmoviliza sobre un sustrato sólido de poliestireno. Luego, un anticuerpo anti-VIH humano es capturado por el antígeno y, por lo tanto, es inmovilizado por sí mismo sobre el sustrato. Después, el anticuerpo se expone a IgG anti-humana marcada con una partícula de oro coloidal y, de esta forma, IgG marcada queda unida al anticuerpo. El complejo antígeno-anticuerpo-IgG es luego expuesto a una disolución que contiene iones plata, y éstos se vuelven nucleados en torno a las partículas de oro en forma de partículas de plata sólidas que tienen un color oscuro a la vista.

El desarrollo de microfluidos y técnicas de microfluidos ha proporcionado herramientas mejoradas de investigación química y biológica, incluidas plataformas para llevar a cabo reacciones químicas, combinar y separar fluidos, diluir muestras y generar gradientes. Por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N° 6.645.432.

La solicitud de patente de EE.UU. N°: 2002/0142618 A1 describe un método para controlar las condiciones del entorno dentro de un sistema fluido. El método comprende hacer fluir un volumen de un primer fluido a través de un primer segmento del canal, en que la primera región de fluido comprende un reactivo para el control del entorno. Un primer volumen de un segundo fluido se hace fluir al primer segmento del canal inmediatamente antes o después de la etapa de hacer fluir el volumen del primer fluido a través del primer segmento del canal.

La solicitud de patente internacional N°: PCT/GB90/01046 describe un método para potenciar visualmente tests de ensayos inmuno-oro, que comprende exponer los tests de ensayo inmuno-oro completados a una disolución que comprende iones plata. El sustrato utilizado puede tener la forma de una varilla, perla o placa y el método es adaptable para trabajar a escala de microlitros.

La patente de EE.UU. 6.488.894 B1 describe un dispositivo en el que al menos dos reactivos líquidos o semi-líquidos se pueden almacenar por separado. Cuando se utiliza, el dispositivo permite una descarga de reactivos precisa, cronológicamente definida y secuencial en una cámara de reacción por medio de un movimiento lineal sin mezcladura previa de dichos reactivos. Los reactivos se pueden descargar aplicando presión a los fluidos por medio de un émbolo.

Se proporcionan un aparato y un método para el suministro de fluidos. El aparato se puede utilizar con un cierto número de ensayos analíticos.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método que comprende:
proporcionar un primer y un segundo fluidos mantenidos separados uno de otro mediante un tercer fluido en un recipiente común, sellado, en donde el tercer fluido es sustancialmente inmiscible con el primer y segundo fluidos, y en donde el primer, segundo y tercer fluidos se almacenan dentro del recipiente común, sellado durante al menos un día;

disponer el recipiente en comunicación de fluidos con un dispositivo que comprende un sitio de reacción;
transferir el primer, tercer y segundo fluidos en serie desde el recipiente al sitio de reacción para llevar a cabo una reacción química o bioquímica predeterminada mediante la aplicación de un vacío en un lado aguas abajo del sitio de reacción; y
evitar el contacto entre el primer y el segundo fluidos, al menos hasta que los fluidos hayan sido aplicados al sitio de reacción.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un aparato, que comprende:

un dispositivo que comprende un sitio de reacción;

un recipiente sellado;

un primer fluido estático dispuesto en el recipiente sellado;

un segundo fluido estático dispuesto en el recipiente sellado; y

un tercer fluido estático dispuesto en el recipiente sellado, en donde el tercer fluido está junto a y es sustancialmente inmiscible tanto con el primer como con el segundo fluidos y separa el primer y segundo fluidos, y al menos el primer y segundo fluidos se seleccionan para uso en una reacción química o biológica predeterminada en una secuencia predeterminada, y en donde el recipiente y el primer, segundo y tercer fluidos se seleccionan de modo que el recipiente y los fluidos dispuestos en su interior puedan ser almacenados durante un período de al menos un día y puedan ser manipulados bajo condiciones de empaquetamiento y transporte normales al tiempo que mantienen a los fluidos en posiciones predeterminadas en relación uno con otro dentro del recipiente, sin perjuicio de la capacidad de los fluidos de participar en la reacción química o biológica predeterminada, y en donde el primer, segundo y tercer fluidos se construyen y disponen de modo que puedan ser suministrados desde el

recipiente a un sitio de reacción de modo que se evite el contacto entre el primer y segundo fluidos, al menos hasta que los fluidos hayan sido aplicados al sitio de reacción; y

una fuente de vacío situada en un lado aguas abajo del sitio de reacción y adaptada y dispuesta para transportar los primero, tercero y segundo fluidos desde el recipiente al sitio de reacción.

5 Realizaciones preferidas de la invención en sus diversos aspectos se describen más adelante o son como se definen en las reivindicaciones subordinadas.

10 Otras ventajas, características y usos de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones no limitantes de la invención cuando se consideran en unión con los dibujos que se acompañan, los cuales son esquemáticos y no pretenden estar dibujados a escala. En las figuras, cada uno de los componentes idénticos o casi idénticos que se ilustran en diversas figuras, están típicamente representados por un solo número. Para fines de claridad, no cada uno de los componentes está marcado en cada una de las figuras, ni tampoco cada uno de los componentes de cada una de las realizaciones de la invención mostradas en donde la

15 ilustración no es necesaria para permitir a los expertos ordinarios en la técnica comprender la invención.

En los dibujos:

La FIG. 1 es una ilustración de una realización de un ensayo de la invención;
 la FIG. 2 es una ilustración de un ensayo que incluye un detector;
 20 la FIG. 3 es una ilustración esquemática de un detector óptico;
 la FIG. 4 es una gráfica que ilustra la absorbancia frente a la concentración de analito;
 la FIG. 5 ilustra gráficamente y en una fotocopia de una microfotografía la cantidad de material opaco presente a concentraciones del analito elevadas y/o bajas;
 la FIG. 6 proporciona fotocopias de microfotografías que muestran la formación de material opaco a
 25 diversas concentraciones del analito;
 la FIG. 7 proporciona datos gráficos en relación con cuatro técnicas de ensayo diferentes;
 la FIG. 8 proporciona datos gráficos que indican la absorbancia frente al tiempo de exposición, y proporciona fotocopias de microfotografías que muestran un material opaco;
 la FIG. 9 proporciona una vista lateral de un sistema de detección del ensayo;
 30 la FIG. 10 proporciona datos gráficos que comparan la absorbancia aparente mediante dos técnicas diferentes;
 la FIG. 11 proporciona datos gráficos adicionales que comparan la absorbancia mediante dos técnicas diferentes;
 la FIG. 12 es una ilustración esquemática de un recipiente que contiene tapones para fluidos;
 35 la FIG. 13 ilustra una técnica para llenar un recipiente;
 la FIG. 14 ilustra otra técnica para llenar un recipiente;
 la FIG. 15 ilustra una realización de suministrar una serie de fluidos a un dispositivo de ensayo;
 las FIGs. 16 a, b y c ilustran gráficamente la respuesta de fluorescencia a una serie de tapones para fluido aplicados secuencialmente;
 40 la FIG. 17 proporciona una ilustración esquemática de diversos tapones para reactivos de fluidos en un recipiente;
 la FIG. 18 ilustra un método para producir un dispositivo de ensayo microfluidico;
 la FIG. 19 proporciona una ilustración esquemática de componentes asociados a partir de los fluidos reactivos del recipiente de la FIG. 17;
 45 la FIG. 20 es una fotocopia de una microfotografía de fluorescencia de un ensayo completado en el dispositivo de la FIG. 18;
 la FIG. 21 proporciona otra ilustración de diversos tapones para reactivos de fluidos en un recipiente;
 la FIG. 22 ilustra una realización que muestra un cambio en la respuesta que varía con un cambio en la concentración de anticuerpos; y
 50 la FIG. 23 ilustra gráficamente un cambio en la fluorescencia frente al tiempo de almacenamiento del cartucho.

Esta invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción ni a la disposición de los componentes recogidos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención es capaz de otras
 55 realizaciones y de ser puesta en práctica o de ser llevada a cabo de diversas maneras. También, la fraseología y terminología utilizadas en esta memoria es con fines de descripción y no deberían considerarse como limitantes. El uso de “que incluyen”, “que comprenden” o “que tienen”, “que contienen”, “que implican” y variaciones de los mismos en esta memoria pretenden abarcar los elementos listados más adelante y equivalentes de los mismos, así como elementos adicionales.

60

La invención se refiere a un método y un aparato para el suministro de fluidos. El término “fluido” se utiliza en esta memoria tal como es utilizado comúnmente por los expertos en la técnica, para incluir tanto líquidos como gases, incluidas mezclas gaseosas. También quedan incluidos disolventes, disoluciones y suspensiones acuosos y no acuosos.

Un “sitio de reacción” es un lugar en el que se produce un proceso químico, físico o bioquímico. Estos procesos pueden incluir cualesquiera de, por ejemplo, reacciones químicas, reacciones electroquímicas fotoquímicas, ensayos químicos y biológicos tales como la evaluación de estados patológicos, inmunoensayos, unión y/o identificación de ácidos nucleicos y unión y/o identificación de proteínas. También se incluyen procesos de acabado, tratamientos en superficie y reacciones que alteran las fases.

Tal como se utiliza en esta memoria, “inmiscible” se utiliza de acuerdo con su significado habitual en la técnica. Específicamente, un primer fluido es inmiscible en un segundo fluido, si el primer fluido no es sustancialmente soluble en el segundo fluido. En algunos casos, un primer fluido puede ser miscible en un segundo fluido si es menos de 0,1%, menos de 1%, menos de 10% o menos de 50% soluble en un segundo fluido bajo condiciones del entorno a las que se almacenan o utilizan los fluidos.

“Artículo enterizo” significa un solo trozo de material, o conjunto de componentes conectados de manera enteriza entre sí. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “conectados de manera enteriza”, cuando se refiere a dos o más objetos, significa objetos que no se separan uno de otro durante el transcurso de su uso normal, p. ej. no se pueden separar manualmente; la separación requiere al menos del uso de herramientas y/o el provocar daño a al menos uno de los componentes, por ejemplo mediante rotura, pelado, etc. (separando componentes fijados juntos a través de adhesivos, herramientas, etc.).

“Instrucciones” pueden definir, y a menudo definen, un componente de promoción y, típicamente implican instrucciones escritas en o asociadas con el envase de composiciones de la invención, opcionalmente como parte de un kit. Las instrucciones pueden también incluir cualesquiera instrucciones orales o electrónicas proporcionadas de cualquier manera. El “kit” define típicamente, y de manera preferida, un envase que incluye tanto un cualquiera o una combinación de los componentes o dispositivos de la invención y las instrucciones, pero también puede incluir componentes o dispositivos de la invención e instrucciones de cualquier forma que se proporcionen en relación con los componentes o dispositivos de una manera tal que un profesional clínico reconocerá claramente que las instrucciones han de ser asociadas con los componentes o dispositivos.

Los sistemas y métodos descritos en esta memoria pueden ser microfluidicos. “Microfluidico”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un dispositivo, aparato o sistema que incluye al menos un canal para fluidos que tiene una dimensión en sección transversal menor que 1 mm, y una relación de longitud a dimensión en sección transversal mayor de al menos 3:1. Un “canal microfluidico”, tal como se utiliza en esta memoria, es un canal que cumple estos criterios.

La “dimensión en sección transversal” del canal se mide perpendicular a la dirección del flujo de fluido. La mayoría de los canales para fluidos en componentes de la invención tienen dimensiones en sección transversal máximas menores que 2 mm y, en algunos casos, menores que 1 mm. En un conjunto de realizaciones, todos los canales para fluidos que contienen realizaciones de la invención son microfluidicos o tienen una dimensión en sección transversal mayor de no más de 2 mm o 1 mm. En otra realización, los canales para fluidos pueden formarse, en parte, por un único componente (p. ej. un sustrato grabado al agua fuerte o unidad moldeada). Naturalmente, se pueden utilizar canales, tubos, cámaras, depósitos, etc. mayores para almacenar fluidos a granel y para suministrar fluidos a componentes de la invención. La dimensión en sección transversal máxima del o de los canales descritos en esta memoria puede ser menor que 500 micras, menor que 200 micras, menor que 100 micras, menor que 50 micras o menor que 25 micras.

Un “canal”, tal como se utiliza en esta memoria, significa una característica sobre o en un artículo (sustrato) que dirige, al menos en parte, el flujo de un fluido. El canal puede tener cualquier forma en sección transversal (circular, ovalada, triangular, irregular, cuadrada o rectangular, o similar) y puede estar cubierto o no cubierto. Al menos una parte del canal puede tener una sección transversal que está completamente encerrada, o todo el canal puede estar completamente encerrado a lo largo de toda su longitud, con la excepción de su o sus entradas y salidas. Un canal puede también tener una relación de proporcionalidad (longitud a dimensión en sección transversal media) de al menos 2:1, más típicamente de al menos 3:1, 5:1 ó 10:1 o más. Un canal abierto incluirá generalmente características que faciliten el control a lo largo del transporte del fluido, p. ej. características estructurales (una indentación alargada) y/o características físicas o químicas (hidrofobicidad frente a hidrofiliidad) u otras características que puedan ejercer una fuerza (p. ej. una fuerza de contención) sobre un

fluido. El fluido dentro del canal puede rellenar parcialmente o por completo el canal. En algunos casos, en los que se utiliza un canal abierto, el fluido puede mantenerse dentro del canal, por ejemplo utilizando la tensión superficial (es decir, un menisco cóncavo o convexo).

5 El canal puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo puede tener una dimensión mayor perpendicular al flujo de fluido menor que aproximadamente 5 mm o 2 mm, o menor que aproximadamente 1 mm, o menor que aproximadamente 500 micras, menor que aproximadamente 200 micras, menor que aproximadamente 100 micras, menor que aproximadamente 60 micras, menor que aproximadamente 50 micras, menor que aproximadamente 40 micras, menor que aproximadamente 30 micras, menor que aproximadamente 25 micras, menor que
10 aproximadamente 10 micras, menor que aproximadamente 3 micras, menor que aproximadamente 1 micra, menor que aproximadamente 300 nm, menor que aproximadamente 100 nm, menor que aproximadamente 30 nm o menor que aproximadamente 10 nm. En algunos casos, las dimensiones del canal pueden elegirse de manera que el fluido sea capaz de fluir libremente a través del artículo o sustrato. Las dimensiones del canal pueden también elegirse, por ejemplo, para permitir un determinado caudal volumétrico o lineal de fluido en el canal. Naturalmente,
15 el número de canales y la forma de los canales pueden variarse por cualquier método conocido por los expertos ordinarios en la técnica. En algunos casos, se puede utilizar más de un canal o capilar. Por ejemplo, se pueden utilizar dos o más canales en los casos en los que éstos estén situados uno dentro de otro, situados uno junto a otro, situados para intersectar uno con otro, etc.

20 Un “tapón” se define en esta memoria como un volumen continuo de un primer fluido, cuyos límites se definen por una pared o paredes de un recipiente y una o más interfaces con un segundo fluido que es esencialmente inmiscible con el primer fluido. Un ejemplo de un tapón sería un volumen de un microlitro de una disolución acuosa en un tubo capilar limitada por aire en ambos extremos del volumen de un microlitro. Otro ejemplo de un tapón sería un volumen de un mililitro de un líquido no acuoso en un tramo sellado de una tubería, estando limitado el
25 fluido no acuoso en un extremo por el extremo sellado de la tubería y en el extremo opuesto por un líquido acuoso.

Si un fluido es “mantenido estáticamente” en un recipiente, el fluido no cambia su posición en relación con el recipiente, a pesar de que, por ejemplo, se puede expandir o contraer o vibrar en su posición estáticamente mantenida. El recipiente que contiene el fluido puede ser movido o re-orientado mientras que el fluido se mantiene
30 estáticamente.

Si un fluido es del mismo “tipo” que un segundo fluido, esto significa que los dos fluidos cumplen el mismo fin en un ensayo o reacción, a pesar de que pueden ser de volúmenes diferentes. Por ejemplo, dos disoluciones de aclarado diferentes se considerarían del mismo tipo de disolución, mientras que una disolución que incluyera un
35 reactivo no sería del mismo tipo que una disolución de aclarado.

Si dos fluidos son “distintos” uno de otro, éstos no se entremezclan ni llenan por separado volúmenes diferenciados. Por ejemplo, dos fluidos pueden ser distintos si son inmiscibles o si están físicamente separados tales como mediante un fluido de separación.

40 El término “unión” se refiere a la interacción entre un par correspondiente de moléculas que exhiben una afinidad mutua o capacidad de unión, típicamente una unión o interacción específica o no específica, que incluye interacciones bioquímicas, biológicas y/o farmacéuticas. La unión biológica define un tipo de interacción que se produce entre pares de moléculas que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas, hidratos de carbono,
45 hormonas y similares. Ejemplos específicos incluyen anticuerpo/antígeno, anticuerpo/hapteno, enzima/sustrato, enzima/inhibidor, enzima/cofactor, proteína de unión/sustrato, proteína de soporte/sustrato, lectina/hidrato de carbono, receptor/hormona, receptor/efector, hebras complementarias de ácidos nucleicos, proteína/ácido nucleico, represor/inductor, ligando/receptor de la superficie celular, virus/ligando, etc.

50 Un “material opaco” es una sustancia que interfiere con la transmitancia de la luz a una o más longitudes de onda. Un material opaco no refleja meramente la luz, sino que reduce la cantidad de transmisión a través del material, por ejemplo absorbiendo o reflejando la luz. Diferentes materiales opacos o diferentes cantidades de un material opaco pueden permitir la transmitancia de menos de 90, 80, 70, 60 50, 40, 30, 20, 10 ó 1 por ciento de la luz que ilumina el material opaco. Ejemplos de materiales opacos incluyen capas moleculares de metal elemental y capas
55 poliméricas.

La expresión “participante en la unión” se refiere a una molécula que puede sufrir una unión con una molécula particular. Ejemplos son participantes de la unión biológicos. Por ejemplo, la proteína A es un participante de la unión de la molécula biológica IgG, y viceversa. De igual manera, un anticuerpo es un participante de la unión con
60 respecto a su antígeno, y viceversa.

“Coloides”, tal como se utilizan en esta memoria, significan nanopartículas, es decir, partículas muy pequeñas, auto-suspendibles o suspendibles en fluidos que incluyen las hechas de un material que es, p. ej., inorgánico u orgánico, polimérico, cerámico, semiconductor, metálico (p. ej. oro), no metálico, cristalino, amorfo o una combinación. Típicamente, partículas coloides utilizadas de acuerdo con la invención tienen una sección transversal menor que 250 nm en cualquier dimensión, más típicamente una sección transversal menor que 100 nm en cualquier dimensión y, en la mayoría de los casos, son de una sección transversal de aproximadamente 2-30 nm. Una clase de coloides adecuada para uso en la invención tiene una sección transversal de 10-30 nm, y otra clase de aproximadamente 2-10 nm de sección transversal. Los coloides pueden estar asociados con un participante de la unión, por ejemplo un anticuerpo. Tal como se utiliza en esta memoria, este término incluye la definición comúnmente utilizada en el campo de la bioquímica.

Tal como se utiliza en esta memoria, un componente que está “inmovilizado con relación a” otro componente está fijado al otro componente o indirectamente fijado al otro componente, p. ej. al estar fijado a un tercer componente al que el otro componente también está fijado, o en su defecto está asociado transitoriamente con el otro componente. Por ejemplo, una entidad de señalización está inmovilizada con respecto a una especie de unión, si la entidad de señalización está fijada a la especie de unión, está fijada a una partícula coloide a la que está fijada la especie de unión, está fijada a un dendrímero o polímero al que está fijada la especie de unión, etc.

“Entidad de señalización” significa una entidad que es capaz de indicar su existencia en una muestra particular o en un lugar particular. Entidades de señalización pueden ser las que son identificables a simple vista, las que pueden ser invisibles en aislamiento, pero pueden ser detectadas a simple vista si se encuentran en una cantidad suficiente (p. ej. partículas coloides), entidades que absorben o emiten radiación electromagnética a un nivel o dentro de un intervalo de longitudes de onda tal que pueden ser fácilmente detectadas visualmente (a simple vista o con un microscopio, incluido un microscopio electrónico o similares), ópticamente o espectroscópicamente, entidades que pueden ser detectadas por vía electrónica o electroquímica tal como moléculas con actividad redox que exhiben un modelo de oxidación/reducción característico tras exposición a energía de activación apropiada (“entidades de señalización electrónicas”) o similares. Ejemplos incluyen colorantes, pigmentos, moléculas electro-activas tales como moléculas de acción redox, restos fluorescentes (que incluyen, por definición, restos fosforescentes), fósforos supra-reguladores, entidades quimioluminiscentes, entidades electroquimioluminiscentes o restos de señalización enlazados a enzimas que incluyen peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. “Precursores de entidades de señalización” son entidades que, por sí mismas, pueden no tener capacidad de señalización, pero que tras interacción química, electroquímica, eléctrica, magnética o física con otras especies, se convierten en entidades de señalización. Un ejemplo incluye un cromóforo que tiene la capacidad de emitir radiación dentro de una longitud de onda particular detectable, sólo tras la interacción química con otra molécula. Precursores de entidades de señalización son discernibles de, pero están incluidos dentro de la definición de “entidades de señalización” tal como se utiliza en esta memoria.

El dispositivo microfluidico puede ser uno de los descritos en esta memoria o puede ser cualquier otro dispositivo microfluidico. Un ejemplo de un dispositivo microfluidico de este tipo se describe en Samuel Sia, et al, solicitud PCT titulada “Assay Device and Method” (Dispositivo y Método de Ensayo), presentada el 29 de diciembre de 2004 bajo el número de expediente del Agente nº H0498.70211. Los fluidos pueden fluir en serie a un sitio de reacción en un ensayo microfluidico. Los fluidos pueden ser gases, líquidos acuosos o líquidos no acuosos. Fluidos y componentes de fluidos pueden incluir, por ejemplo, reactivos, agentes de aclarado, agentes de pre-aclarado, fijadores y colorantes. Los fluidos pueden fluir a uno o más sitios de reacción con una pequeña mezcladura o sin ninguna entre los diferentes reactivos. Una serie de disoluciones de aclarado se pueden separar por un tapón de separación, permitiendo que una primera disolución de aclarado circule por completo a lo largo de un sitio de reacción antes de que se aplique al sitio una segunda disolución de aclarado.

Se proporciona un recipiente para que contenga, almacene o proteja y/o transporte dos o más fluidos. Tal como se utiliza en esta memoria, recipientes incluyen cartuchos y tubos. Un recipiente puede contener dos o más fluidos distintos separados por un tercer fluido que es inmiscible con ambos. En un recipiente pueden estar contenidos cualquier número de distintos fluidos. Por ejemplo, la FIG. 12 ilustra en sección transversal longitudinal una realización en la que el recipiente es un tubo 10 que incluye un tapón 20 de disolución de reactivo, seguido de un tapón 30 de aire, seguido de un tapón 40 de disolución de aclarado: un tapón 50 de aire adicional puede separar el primer tapón 40 de disolución de aclarado del segundo tapón 60 de disolución de aclarado. Los extremos 70 y 72 del tubo pueden estar sellados, por ejemplo, para retener a los tapones y para evitar la contaminación por parte de fuentes externas. Los tapones de líquido pueden conservar sus posiciones relativas en el tubo y puede evitarse que contacten uno con otro por parte de los tapones de aire interespaciados. Las dimensiones y los materiales de construcción del tubo pueden elegirse para ayudar a retener a los tapones de fluido en su posición y a que

permanezcan sin mezclar.

Reactivos y otros fluidos pueden almacenarse en el recipiente durante períodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, los reactivos se pueden almacenar durante más de 1 día, 1 semana, 1 mes o 1 año. Al evitar el contacto entre fluidos, los fluidos que contienen componentes que típicamente reaccionarían o se unirían uno con otro se evita que lo hagan, al tiempo que se mantienen en una cámara continua.

Los fluidos pueden ser transferidos del recipiente a utilizar en un proceso, por ejemplo para participar en una reacción o ensayo. Los fluidos se pueden transferir desde el recipiente aplicando presión o vacío después de retirar o perforar el sello en los extremos 70 y 72. El recipiente no necesita ser sellado, y el flujo de fluido se puede iniciar aplicando una fuerza externa tal como un diferencial de presión. Un extremo del recipiente, por ejemplo el extremo 70, puede estar o puede disponerse en comunicación de fluidos con otro dispositivo que recibirá los fluidos procedentes del recipiente. Un dispositivo de este tipo puede incluir, por ejemplo, un sitio de reacción de un reactor o un ensayo.

Un recipiente que contiene tapones de fluido puede disponerse en comunicación de fluidos con un sitio de reacción, y los fluidos pueden fluir desde el recipiente al sitio de reacción. Por ejemplo, los fluidos pueden fluir a un inmunoensayo microfluidico, algunas realizaciones del cual se describen en esta memoria. El recipiente que contiene los tapones de fluido puede separarse de un dispositivo que incluye el sitio de reacción o que puede ser parte de la misma plataforma. El fluido puede fluir al sitio de reacción, por ejemplo impulsando o extrayendo el fluido a través del recipiente. Los fluidos pueden ser impulsados al sitio de reacción utilizando, por ejemplo, una bomba, jeringa, recipiente presurizado o cualquier otra fuente de presión. Alternativamente, los fluidos pueden ser arrastrados al sitio de reacción mediante la aplicación de vacío o presión reducida en un lado aguas abajo del sitio de reacción. El vacío puede ser proporcionado por cualquier fuente capaz de proporcionar un estado de presión menor que el que existe aguas arriba del sitio de reacción. Fuentes de este tipo pueden incluir bombas de vacío, tubos Venturi, jeringas y recipientes en los que se ha hecho el vacío.

Un recipiente puede contener tapones de fluido en un orden lineal, de modo que a medida que el fluido fluye desde el recipiente a un sitio de reacción, dichos tapones son suministrados en una secuencia predeterminada. Por ejemplo, un ensayo puede alojar, en serie, un fluido de anticuerpo, un fluido de aclarado, un fluido de anticuerpo marcado y un fluido de aclarado. Al mantener un fluido inmiscible (un fluido de separación) entre cada uno de estos fluidos de ensayo, los fluidos de ensayo pueden ser suministrados en secuencia desde un recipiente único, al tiempo que se evita el contacto entre cualquiera de los fluidos de ensayo. Cualquier fluido inmiscible que separe fluidos de ensayo se puede aplicar al sitio de reacción sin alterar las condiciones del sitio de reacción. Por ejemplo, si se ha producido una unión anticuerpo-antígeno en un sitio de reacción, se puede suministrar aire al sitio con un efecto mínimo o sin efecto alguno sobre cualquier unión que se haya producido.

En una realización, al menos dos fluidos pueden fluir en serie desde un recipiente común, y un componente de cada uno de los fluidos puede participar en una reacción común. Tal como se utiliza en esta memoria, "reacción común" significa que al menos un componente procedente de cada uno de los fluidos reacciona con el otro después de que los fluidos hayan sido suministrados desde el recipiente, o al menos un componente procedente de cada uno de los fluidos reacciona con un componente común y/o en un sitio de reacción común después de haber sido suministrado desde el recipiente. Por ejemplo, un componente del primer fluido puede reaccionar con una entidad química o biológica que se encuentra aguas abajo del recipiente. Una entidad química o biológica puede formar un sitio de reacción y puede ser, por ejemplo, una muestra, un compuesto biológico o químico, una célula, una parte de una célula, una superficie o un sustrato. La entidad química o biológica puede estar fijada en posición o puede ser móvil. Un componente del segundo fluido puede luego reaccionar y/o asociarse con el componente del primer fluido que ha reaccionado con la entidad química o biológica de aguas abajo, o puede reaccionar o asociarse con la propia entidad química o biológica. Fluidos adicionales pueden luego aplicarse, en serie, a la entidad biológica o química para efectuar reacciones adicionales o fenómenos de unión o como indicadores o reforzadores de señales.

El pre-llenado del recipiente con reactivos puede permitir que los reactivos sean dispensados en un orden predeterminado para un proceso de aguas abajo. En los casos en los que se desea un tiempo predeterminado de exposición a un reactivo, la cantidad de cada uno de los fluidos en el recipiente puede ser proporcional a la cantidad de tiempo que el reactivo está expuesto a un sitio de reacción de aguas abajo. Por ejemplo, si el tiempo de exposición deseado para un primer reactivo es el doble del tiempo de exposición deseado para un segundo reactivo, el volumen del primer reactivo en el recipiente puede ser el doble del volumen del segundo reactivo en el recipiente. Si se aplica un diferencial de presión constante en el flujo de los reactivos desde el recipiente al sitio de reacción, y si la viscosidad de los fluidos es la misma o similar, el tiempo de exposición de cada uno de los fluidos

en un punto específico, tal como un sitio de reacción, puede ser proporcional al volumen relativo del fluido. Factores tales como geometría del recipiente, presión o viscosidad, también pueden ser alterados para modificar los caudales de fluidos específicos desde el recipiente.

Se describe también el llenado de un recipiente con tapones de fluidos. El recipiente es un tubo y el tubo es llenado secuencialmente con una serie de tapones de fluidos separados por tapones de fluidos de separación inmiscibles. Los fluidos se pueden disponer en el tubo de cualquier manera que permita que dos o más tapones de fluido sean separados por uno o más tapones de fluidos de separación. Por ejemplo, los fluidos se pueden bombear al tubo bajo presión o arrastrar al tubo mediante vacío.

Un primer extremo del tubo puede estar conectado a una fuente de vacío. El tubo puede estar pre-cargado con un fluido tal como un tampón, que exhibe una mayor viscosidad que el aire y que puede permitir un control más preciso de las tasas de llenado que si el tubo estuviese simplemente lleno de aire. Algo o la totalidad de cualquier fluido que se utilice para pre-llenar el tubo puede ser expulsado del tubo durante el proceso de llenado. Entre la parte del tubo a llenar y la fuente de vacío puede estar dispuesta una válvula que puede abrirse o cerrarse para proporcionar un vacío al tubo. El extremo opuesto del tubo puede disponerse en un depósito que puede ser, por ejemplo, un vial o un pocillo en una placa de 96 pocillos. El depósito puede contener un fluido tal como un tampón, fluido reactivo, disolución de aclarado, precursor o fluido de separación. La válvula se puede abrir durante un período de tiempo lo suficientemente largo como para extraer la cantidad deseada de fluido desde el depósito. La válvula se puede controlar manualmente o mediante un controlador tal como un ordenador. Después de haber cerrado la válvula, el extremo opuesto del tubo se puede retirar del depósito de fluido, y un segundo tapón de fluido se puede introducir en el tubo. Si el aire es el segundo fluido, la válvula se puede poner en funcionamiento al tiempo que el extremo del tubo está suspendido en aire, no en un depósito. Cuando un tapón de aire de longitud adecuada ha sido aspirado al interior del tubo, la válvula puede cerrarse y el extremo opuesto del tubo se puede colocar en un depósito de fluido que puede ser el mismo o diferente del primero. Después, la válvula se puede abrir de nuevo durante un período de tiempo apropiado para aspirar el tamaño de tapón deseado. A esto le puede seguir otro tapón de fluido de separación que puede ser el mismo o diferente del primero. El proceso se puede repetir hasta que se haya aspirado al interior del tubo una secuencia y cantidad predeterminadas de fluidos. En algunos casos, el tubo se puede luego sellar en uno o en ambos extremos. Múltiples tubos se pueden aspirar en paralelo utilizando un controlador común tal como un ordenador. Los fluidos se pueden retirar de los recipientes comunes o separados cuando se llena más de un tubo.

Recipientes tales como tubos se pueden llenar sin una bomba de vacío o sin una fuente de energía eléctrica. Por ejemplo, una jeringa accionada manualmente puede proporcionar una fuente de vacío para aspirar fluidos. El émbolo de la jeringa puede ser extraído una distancia específica para proporcionar la aspiración de una cantidad específica de fluido a un extremo opuesto de un tubo. Puede no ser necesario un sistema de válvulas. Múltiples tubos se pueden llenar en paralelo.

Se puede utilizar un recipiente para retener dos o más fluidos que pueden ser suministrados en serie desde el recipiente. El recipiente puede tener cualquier forma y tamaño y puede estar hecho de cualquier material apropiado para retener a los fluidos para los que está diseñado contener. Dependiendo de los fluidos, este material puede ser, por ejemplo, vidrio, metal o un polímero. Los polímeros pueden incluir, por ejemplo, materiales termoplásticos tales como polietileno y polipropileno, policarbonatos, poliestireno, PTFE, PET, y otros conocidos por los expertos en la técnica.

El recipiente puede ser un tubo. Se pueden preferir tubos, ya que éstos están fácilmente disponibles en diferentes diámetros, longitudes y materiales. Los tubos pueden ser flexibles y pueden ser translúcidos o transparentes. Los tapones de fluido en un tubo pueden medirse linealmente como un indicio del volumen del tapón. El tubo puede tener un diámetro interno consistente o variable y puede tener una relación de longitud a diámetro interno mayor que 10 a 1, mayor que 50 a 1 o mayor que 100 a 1. Dependiendo de la aplicación, se pueden utilizar tubos de cualquier diámetro, y en muchas aplicaciones el tubo puede tener un diámetro interno menor que 1 cm, menor que 5 mm, menor que 1 mm, menor que 500 micras, menor que 200 micras, menor que 100 micras o menor que 50 micras. Un tubo con una relación de longitud a diámetro interno mayor puede ser útil para indicar visualmente la cantidad de cada uno de los fluidos contenidos en el tubo. Por ejemplo, una medición lineal de un tapón de fluido en un tubo de diámetro interno conocido puede dar un indicio fiable del volumen o del volumen relativo del fluido.

El recipiente, si es un tubo o de otra forma, puede incluir dos o más ramas o secciones que pueden estar en comunicación de fluidos una con otra, y con el interior restante del recipiente. Un tubo puede tener dos, tres, cuatro o más ramas que pueden estar interconectadas. Las ramas y las uniones de las ramas pueden o pueden no incluir válvulas. Se pueden utilizar válvulas para segregar temporalmente una o más ramas, y cualquier líquido contenido

en las mismas, del resto del tubo.

Un tubo puede incluir una rama en forma de "Y" en un extremo, por ejemplo, un extremo situado aguas arriba. Cada una de las ramas de la Y puede contener un fluido que reaccione con el fluido en la otra rama para formar un
 5 tercer fluido. La retirada de cada uno de los fluidos de cada una de las ramas en un tubo común puede proporcionar un entorno para permitir que reaccionen los dos fluidos. Las dos ramas pueden unirse en una sección, o pueden conducir a una sección que sea de las dimensiones suficientes para fomentar un flujo turbulento y, por lo tanto, mezclar los dos fluidos. Por ejemplo, de diferentes geometrías, véase la patente de EE.UU. N° 6.705.357.

El material utilizado para el recipiente puede ser altamente humectable. Sin embargo, el material utilizado para el
 10 recipiente y, en particular, el material utilizado para la superficie interior del recipiente, puede exhibir una baja humectabilidad. Por ejemplo, cuando en el recipiente han de estar contenidas disoluciones acuosas, la superficie interior del recipiente puede exhibir una baja humectabilidad para las disoluciones acuosas. Si la superficie interior
 15 del recipiente es menos humectable, puede ser menos probable que un fluido fluya a lo largo de la superficie. Sobre una superficie altamente humectable, una disolución acuosa puede fluir a lo largo de las paredes del recipiente y puede ser más probable que entre en contacto con los otros fluidos contenidos en el recipiente. Una superficie menos humectable puede permitir el uso de mayores relaciones de diámetro interno a longitud para tubos, cartuchos u otros recipientes, al tiempo que mantiene distintos tapones de fluido durante el
 20 almacenamiento, transporte y/o uso. La energía superficial es indicativa de la humectabilidad de una superficie, y se puede preferir que el recipiente, o la superficie interior del recipiente, tenga una energía superficial menor que 40 dinas/cm, menor que 35 dinas/cm, menor que 32 dinas/cm o menor que 30 dinas/cm. Algunos polímeros pueden exhibir energías superficiales en estos intervalos, incluidos polipropileno, polietileno y PTFE.

Se puede preferir una superficie interior más hidrofílica. Por ejemplo, en algunos sistemas, el flujo consistente de
 25 un tapón de fluido puede ser interferido mediante un fluido de separación, si el tapón de fluido tiene o no tiene determinadas propiedades. Por ejemplo, el flujo de fluido puede verse afectado en los casos en los que el fluido no tenga una afinidad suficientemente elevada por la superficie interior del recipiente cuando se compara con la del fluido de separación. Un ejemplo de ello puede ser el caso de un sistema de líquido/gas. Si el fluido es un líquido
 30 acuoso, y el fluido de separación es un gas tal como aire, el fluido de separación puede adherirse a la superficie y provocar una interrupción u otra inconsistencia en el flujo de fluido a medida que el fluido avance a través del recipiente.

El aumento de la afinidad relativa del fluido por la superficie puede ser un método de mejorar el comportamiento,
 35 por ejemplo, reduciendo una tendencia hacia un flujo inconsistente. Esto se puede realizar alterando las propiedades del fluido, el fluido de separación, la superficie o cualquier combinación de los mismos. Un método de alterar una propiedad de la superficie interior del recipiente consiste en aumentar la hidrofiliidad de la superficie o una parte de la superficie. Esto se puede realizar, por ejemplo, tratando la superficie con un detergente tal como TWEEN 20, u oxidando la superficie a través de oxidación con plasma o con un oxidante gaseoso o líquido, tal
 40 como ozono o permanganato, que puede fluir a través del recipiente para alterar las propiedades de al menos una parte de la superficie interior del recipiente. Otras técnicas incluyen la silanización o la unión de polímeros hidrofílicos o anfifílicos a la superficie, por ejemplo mediante enlace covalente o fisiosorción.

Un aumento en la hidrofobicidad puede dar como resultado una superficie más humectable, lo cual se refleja en
 45 una mayor energía superficial. Por ejemplo, una superficie interior puede exhibir o puede ser tratada para que exhiba una energía superficial mayor que 32 dinas/cm, mayor que 35 dinas/cm, mayor que 40 dinas/cm o mayor que 45 dinas/cm.

El recipiente puede estar hecho de un material que tenga características de baja absorbancia para componentes
 50 fluidos que puedan ser retenidos en el recipiente. Por ejemplo, si un recipiente ha de retener un fluido que contiene proteínas, se puede preferir utilizar un recipiente hecho de un material que no absorba proteínas. Si la superficie interior del recipiente exhibe una tendencia a absorber un componente de un fluido, la superficie puede ser tratada previamente para reducir esa tendencia. Por ejemplo, una superficie polimérica puede ser tratada con tensioactivos
 55 tales como Tween 20 o proteínas de bloqueo tales como albúmina y/o caseína para reducir su tendencia a absorber proteínas. Para otros ejemplos de superficies de tratamiento, véase la solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 09/907.551, publicación n° 20020102405.

El recipiente puede ser desechable o reutilizable y, cuando se encuentra en forma de un tubo, puede estar
 60 contorneado, por ejemplo en un diseño de serpentín, para prolongar la longitud que puede caber en un espacio dado.

Uno o más extremos del recipiente pueden ser sellados con el fin de proteger y retener cualesquiera líquidos que puedan estar almacenados dentro del mismo. Algunos materiales, en particular materiales termoplásticos y vidrio, pueden ser sellados fundiendo los extremos. Los extremos también se pueden sellar doblando hacia adentro, cerrando, taponando o fijando cualquier material al extremo evitar el flujo o evaporación de fluido desde el recipiente. Un fluido con baja volatilidad, tal como un aceite o glicol, se puede colocar en el extremo de un tubo para ayudar a prevenir la evaporación y/o el movimiento de otros fluidos contenidos en el mismo.

Se puede utilizar cualquier tipo de fluido o fluidos. Los fluidos incluyen líquidos tales como disolventes, disoluciones y suspensiones. Los fluidos también incluyen gases y mezclas de gases. Cuando están contenidos múltiples fluidos en un recipiente (tal como un tubo), los fluidos pueden ser separados por otro fluido que es preferiblemente inmiscible en cada uno de los primeros dos fluidos. Por ejemplo, si un tubo contiene dos disoluciones acuosas diferentes, un tapón de separación de un tercer fluido puede ser inmiscible en ambas de las disoluciones acuosas. Cuando las disoluciones acuosas han de ser mantenidas separadas, fluidos inmiscibles que se pueden utilizar como separadores pueden incluir gases tales como aire o nitrógeno, o fluidos hidrofóbicos que son esencialmente inmiscibles con los fluidos acuosos. Los fluidos se pueden elegir también en base a la reactividad del fluido con los fluidos adyacentes. Por ejemplo, se puede utilizar un gas inerte tal como nitrógeno en algunas realizaciones y puede ayudar a preservar y/o estabilizar cualesquiera fluidos adyacentes. Un ejemplo de un líquido inmiscible para separar disoluciones acuosas es perfluorodecalina. La elección de un fluido separador puede hacerse asimismo en base a otros factores, incluido cualquier efecto que el fluido separador pueda tener sobre la tensión superficial de los tapones de fluido adyacentes. Se puede preferir maximizar la tensión superficial dentro de cualquier tapón de fluido para fomentar la retención del tapón de fluido como una unidad continua sencilla bajo condiciones del entorno variables tales como vibración, choque y variaciones de temperatura. Fluidos separadores también pueden ser inertes a cualquier sitio reactivo al que serán suministrados los fluidos. Por ejemplo, si un sitio reactivo incluye un participante de la unión biológico, un fluido separador tal como aire o nitrógeno puede tener un pequeño efecto o ningún efecto sobre el participante de la unión. El uso de un gas, como un fluido separador puede proporcionar también espacio para la expansión dentro del recipiente si los líquidos contenidos en el recipiente se expandieran o contrajeran debido a cambios tales como variaciones de temperatura (incluida congelación) o presión.

Los fluidos se pueden transferir desde un recipiente para uso en un proceso químico o bioquímico. Al aplicar una fuerza externa al recipiente tal como presión, succión o fuerzas g, los fluidos pueden fluir desde un recipiente a caudales constantes o variables. Los fluidos pueden retirarse de un recipiente mediante la acción capilar. La presión puede aplicarse aguas arriba de los fluidos a fluir desde el recipiente, y fuentes de presión pueden incluir bombas tales como bombas eléctricas o manuales, jeringas o recipientes presurizados. La succión puede aplicarse al lado de aguas abajo del recipiente utilizando una fuente de vacío o de vacío parcial tal como una bomba, jeringa, recipiente en el que se ha hecho vacío, tubo Venturi u otra fuente de presión reducida.

Una fuente de vacío se utiliza para que los líquidos fluyan desde el recipiente. Para controlar el flujo de líquidos desde el recipiente, por ejemplo cuando los líquidos han de fluir a lo largo de un sitio de reacción a una velocidad específica, se puede preferir aplicar una presión de vacío parcial constante al lado de aguas abajo del recipiente. Presiones de vacío precisas pueden ser proporcionadas por una bomba de vacío, mediante una bomba de funcionamiento a baterías portátil o mediante una jeringa. Se puede utilizar una presión de vacío menor que 1,0, 0,99, 0,95, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,3, 0,2 ó 0,1 atmósferas.

Un vacío o vacío parcial se puede aplicar al recipiente sin el uso de energía eléctrica. Por ejemplo, para proporcionar una fuente de vacío se puede utilizar una jeringa que incluya un cilindro y émbolo. Si el recipiente se encuentra en comunicación con un sitio de reacción, tal como en un ensayo microfluidico, la fuente de vacío, en este caso una jeringa, puede ser fijada aguas abajo del sitio de reacción. El vacío se puede aplicar disponiendo la punta del cilindro de la jeringa en comunicación de fluidos con el lado de aguas abajo del recipiente que retiene a los fluidos. Si se desea un vacío total o próximo a un vacío total, entonces todo el aire puede ser expelido de la jeringa oprimiendo por completo el émbolo de la jeringa hasta el fondo del cilindro y subsiguientemente fijando el cilindro al recipiente. Para proporcionar menos de un vacío total, el cilindro de la jeringa puede ser parcialmente llenado con aire antes de extraer el émbolo para producir el vacío. Por ejemplo, si se utiliza una jeringa de 10 cm³, el cilindro de la jeringa puede llenarse hasta 5 cm³ con aire y el émbolo puede extraerse hasta un volumen total de 10 cm³ para proporcionar un vacío igual a media atmósfera. De igual manera, se pueden aplicar 0,75 atmósferas llenando una jeringa de 10 cm³ con 7,5 cm³ de aire y luego extrayendo el émbolo hasta la marca completa de 10 cm³. Se puede utilizar un dispositivo de sujeción tal como un clip o una muesca en el cilindro de la jeringa para retener al émbolo en la posición constante después de su extracción. Si el volumen interno de la jeringa utilizada es significativamente mayor que el volumen de fluidos a extraer del recipiente, la presión de vacío aplicada al

recipiente puede ser sustancialmente constante desde el comienzo hasta el final del proceso de extracción. El volumen de la jeringa utilizada puede ser mayor que 10 veces, 100 veces o 1.000 veces el volumen del fluido o fluidos a extraer.

- 5 Cuando la jeringa se llena con aire hasta un volumen específico, el aire en el cilindro de la jeringa puede encontrarse a la presión atmosférica, independientemente de dónde se realice el proceso. En comparación con proporcionar un vacío parcial a una presión absoluta fija, tal como con un recipiente en el que se ha hecho un vacío, esta técnica de jeringa manual puede ser útil bajo condiciones de presión ambiente variables tal como a diferentes altitudes, dado que el método puede producir un diferencial de presión más consistente a lo largo del
10 recipiente y/o del sitio de reacción, independientemente de la presión del aire ambiente. Esto puede ayudar a extraer fluidos a una velocidad predeterminada y, así, someter a un sitio de reacción a un tiempo de permanencia predeterminado más preciso para cada uno de los fluidos.

- El recipiente puede utilizarse para almacenar fluidos. En diversas realizaciones, los fluidos se pueden almacenar en el recipiente durante más de 10 segundos, un minuto, una hora, un día, una semana, un mes o un año. El tiempo durante el cual están almacenados, los fluidos pueden mantenerse separados por fluidos de separación inmiscibles, de modo que los fluidos que reaccionarían uno con otro cuando están en contacto, se pueden almacenar durante períodos de tiempo prolongados en un recipiente común. Los fluidos se pueden almacenar de modo que se mantengan estáticamente y no se muevan en relación con su posición en el recipiente. Los fluidos se
15 pueden desplazar ligeramente o pueden vibrar y expandirse y contraerse al tiempo que son mantenidos estáticamente. El recipiente común puede tener una carencia de paredes internas u otros divisores para mantener los fluidos separados, y los fluidos se pueden separar mediante nada más que un fluido de separación. Cuando se almacenan en un estado estático, los fluidos se pueden almacenar a temperaturas reducidas tales como menos de 4°C, menos de 0°C o menos de -10°C. Los fluidos también se pueden exponer a temperaturas elevadas tales como
20 mayores que 25°C, mayores que 35°C o mayores que 50°C. Los fluidos se pueden transportar de un lugar a otro por superficie o aire, sin permitir la mezclado de los fluidos reactivos contenidos en el recipiente. La cantidad de fluido de separación inmiscible puede elegirse en base al proceso final para el que se vayan a utilizar los fluidos, así como en base a las condiciones a las que se espera que sea expuesto el recipiente. Por ejemplo, si se espera que el recipiente reciba un choque físico o vibración, se pueden utilizar tapones mayores de fluido de separación inmiscible. De esta manera, se puede evitar una mezclado de los distintos fluidos dentro de un recipiente.
30

- El recipiente que contiene los fluidos se puede almacenar junto con un dispositivo que incluye un sitio de reacción tal como un dispositivo de ensayo o un reactor químico o bioquímico. El recipiente y el dispositivo se pueden conectar o construir de manera enteriza y se pueden disponer de modo que estén conectados de manera enteriza.
35 Así, un conjunto completo de reactivos se puede alinear en serie en el recipiente y mantener listo para su aplicación al sitio de reacción tras aplicar, por ejemplo, presión o vacío a un extremo apropiado del recipiente o dispositivo.

- Un recipiente que contiene una serie de tapones de fluido se puede conectar a un dispositivo aguas abajo para la participación en una reacción química o bioquímica. Un extremo del recipiente, por ejemplo un extremo de un tubo o cartucho, se puede conectar a un dispositivo, de modo que los dos estén en comunicación de fluidos. Esto se puede hacer directamente, insertando un extremo del tubo en una entrada en el dispositivo, o se puede hacer indirectamente mediante la fijación a través de un conector intermedio tal como un tramo de tubería. En algunos casos, el espacio muerto del punto de conexión se puede minimizar para reducir, por ejemplo, la demora,
40 mezclado o la formación de un flujo turbulento. La conexión puede ser hermética. En algunas realizaciones, el diámetro interno del conector puede ser menor que 1 vez, 3 veces o 5 veces el diámetro interno del recipiente o del dispositivo. Algunos polímeros más blandos pueden proporcionar una conexión mejor que los polímeros más duros. Por ejemplo, un dispositivo hecho de PDMS puede proporcionar una conexión segura con un volumen muerto mínimo.
45

- Un recipiente que incluye tapones de fluido puede estar conectado de manera enteriza a un dispositivo que incluye un sitio de reacción. Por ejemplo, el recipiente y el dispositivo se pueden formar sobre una plataforma común tal como un chip microfluidico. El dispositivo y el recipiente pueden estar en comunicación de fluidos, de modo que cuando se aplica un vacío o un vacío parcial aguas debajo de un sitio de reacción, los tapones de fluido son retirados del recipiente. De igual manera, la presión aplicada aguas arriba de los tapones de fluido puede empujar
50 los fluidos al interior del dispositivo y aplicarles al sitio de reacción.
55

- Más de un recipiente puede estar conectado de manera enteriza o puede ser conectado de manera no enteriza a un dispositivo que incluye un sitio de reacción. Por ejemplo, si dos recipientes están conectados al lado de aguas arriba de un dispositivo, los fluidos en uno de los recipientes se pueden hacer pasar por encima del sitio de
60

reacción dejando sin sellar un extremo de aguas arriba del primer dispositivo, al tiempo que manteniendo un sellado en el lado de aguas arriba del segundo dispositivo. El vacío aplicado al lado de aguas abajo del dispositivo extraerá reactivos del primer recipiente, pero no del segundo. De una manera similar, dos o más dispositivos que incluyen sitios de reacción se pueden conectar a un único recipiente que contiene fluidos, y los fluidos se pueden retirar a través de un dispositivo de elección, por ejemplo aplicando vacío a ese dispositivo al tiempo que dejando sellado al otro o a los otros dispositivos.

Se pueden utilizar muestras de todos los tipos. Muestras pueden incluir muestras químicas tales como agua, disolventes, extractos y muestras del entorno. Las muestras pueden incluir también muestras biológicas tales como sangre entera, suero, plasma, lágrimas, orina y saliva. Una muestra que está siendo examinada con un ensayo o que se está haciendo reaccionar en un reactor se puede transferir a un dispositivo de reacción o a un recipiente que contiene fluidos reactivos. Por ejemplo, una muestra de sangre entera se puede colocar en la entrada de un dispositivo de ensayo y se puede dejar que fluya por encima del sitio de reacción utilizando vacío o presión. Esto puede suceder antes de la conexión del recipiente o antes de que los reactivos fluyan desde el recipiente al sitio de reacción. Alternativamente, la muestra se puede disponer en un recipiente que contenga fluidos reactivos. Por ejemplo, una muestra de sangre entera de un volumen medido se puede inyectar en el extremo de aguas abajo de un tubo que contiene reactivos fluidos. El tubo puede entonces conectarse al dispositivo de ensayo y, tras la aplicación de vacío o presión, la muestra se puede aplicar al sitio de reacción antes que los reactivos que fluyen en serie desde el tubo. Algunos reactivos pueden fluir al sitio de reacción, seguidos de una muestra, que luego, a su vez, es seguida por reactivos adicionales. Todavía en otras realizaciones, la muestra puede fluir la última.

Un dispositivo que incluye un sitio reactivo puede conectarse de manera enteriza o no enteriza a un dispositivo de muestreo tal como un tubo de muestreo. El tubo de muestreo puede tener un extremo asociado con un canal o cámara que aloja el sitio de reacción. Un extremo opuesto del tubo puede sumergirse en una fuente de la muestra (que puede ser un recipiente o puede ser un sujeto) a analizar o a reaccionar con ella. Al aplicar vacío aguas abajo del sitio de reacción, la muestra se puede introducir en el tubo de muestreo y puede mantenerse en el tubo de muestreo o introducirse en el sitio de reacción. Cuando se obtiene una cantidad determinada de muestra, el extremo del tubo de muestreo puede retirarse de la fuente de muestra o se puede detener el vacío. El mismo tubo de muestreo puede entonces servir como un conector entre el dispositivo y un recipiente que contiene fluidos reactivos. Al colocar el extremo del tubo de muestreo en comunicación de fluidos con el lado de aguas abajo del recipiente que contiene fluidos, éstos pueden extraerse a través del canal del dispositivo en un método similar a como fue extraída la muestra. En algunos casos, puede elegirse un primer fluido reactivo en el recipiente para ayudar a aportar la muestra, tratar la muestra, diluir la muestra o enjuagar la muestra del tubo.

Se pueden proporcionar un método y un aparato para determinar la presencia, cualitativa o cuantitativamente, de un componente en una muestra. El componente puede ser un participante de la unión, tal como un anticuerpo o antígeno, que puede ser indicativo de un estado patológico.

Una muestra procedente de un sujeto se puede analizar con una pequeña preparación o sin preparación de la muestra. La muestra también se puede obtener de manera no invasiva, proporcionando así un proceso analítico más seguro y más agradable para el paciente.

Se proporciona un ensayo que proporciona una elevada sensibilidad y un bajo límite de detección, equiparable al del ensayo ELISA más sensible. El ensayo puede realizarse de manera rápida y los resultados pueden ser permanentes, permitiendo la lectura del ensayo en cualquier instante después de realizar el mismo.

Una muestra se hace fluir sobre una superficie asociada con un participante de la unión prospectivo de un componente de la muestra. El ensayo puede realizarse en un canal de un dispositivo microfluidico, permitiendo que la muestra fluya por encima de un participante de la unión, por ejemplo un antígeno. Cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se forme se puede asociar con un coloide metálico que proporcione una superficie catalítica para la deposición de un material opaco tal como una capa de metal. Por lo tanto, si la unión anticuerpo-antígeno se produce en el canal microfluidico, el flujo de un precursor de metal a través del canal puede dar como resultado la formación de una capa opaca, tal como una capa de plata, debido a la presencia del coloide de metal catalítico asociado con el complejo anticuerpo-antígeno. Cualquier capa opaca que se forme en el canal microfluidico se puede detectar ópticamente, por ejemplo midiendo una reducción en la transmitancia de luz a través del canal microfluidico en comparación con una parte del canal que no incluye el anticuerpo o antígeno. La capa opaca puede proporcionar un aumento en la sensibilidad del ensayo cuando se compara con técnicas que no forman una capa opaca.

Tal como se utiliza en esta memoria, "fijado a o adaptado para ser fijado" en el contexto de una especie con relación a otra especie o a una superficie de un artículo significa que la especie está química o bioquímicamente enlazada a través de fijación covalente, fijación a través de unión biológica específica (p. ej., biotina/estreptavidina), unión coordinativa tal como unión de quelato/metall o similares. Por ejemplo "fijado" en este contexto incluye múltiples enlaces químicos, múltiples enlaces químicos/biológicos, etc., que incluyen pero no se limitan a una especie de unión tal como un péptido sintetizado sobre una perla de poliestireno, una especie de unión específicamente acoplada de modo biológico a un anticuerpo que está unido a una proteína tal como proteína A, que está fijada a una perla, una especie de unión que forma una parte (a través de ingeniería genética) de una molécula tal como GST o fago, que a su vez, está específicamente unida de modo biológico a un participante de la unión covalentemente fijado a una superficie (p. ej., glutatión en el caso de GST), etc. Como otro ejemplo, un resto covalentemente enlazado a un tiol está adaptado para ser fijado a una superficie de oro, dado que el tiol se une al oro de manera covalente. De manera similar, una especie que porta una etiqueta de unión a metal está adaptada para ser fijada a una superficie que porta una molécula fijada de manera covalente a la superficie (tal como unión tiol/oro), molécula que también presenta un quelato que coordina un metal. Una especie también está adaptada para ser fijada a una superficie, si una superficie porta una secuencia particular de nucleótidos y la especie incluye una secuencia complementaria de nucleótidos.

Un dispositivo microfluidico puede fabricarse de un polímero, por ejemplo un material elastómero tal como poli(dimetilsiloxano) (PDMS) utilizando un prototipado rápido y una litografía blanda. Por ejemplo, se puede utilizar una impresora láser de elevada resolución para generar una máscara a partir de un archivo CAD que representa los canales que constituyen la red fluidica. La máscara puede ser una transparencia que puede ponerse en contacto con una fotorresina, por ejemplo la fotorresina SU-8 (MicroChem), para producir un patrón negativo de la fotorresina sobre una oblea de silicio. Se puede realizar una réplica positiva de PDMS moldeando el PDMS frente al patrón, una técnica conocida por los expertos en la técnica. Para completar la red fluidica, un sustrato plano, por ejemplo un portaobjetos, una oblea de silicio o una superficie de poliestireno, se puede colocar contra la superficie de PDMS y se puede mantener en su lugar mediante fuerzas de van der Waals, o se puede fijar al PDMS utilizando un adhesivo. Para permitir la introducción y la recepción de fluidos hacia y desde la red, se pueden formar agujeros (por ejemplo de 1 milímetro de diámetro) en el PDMS utilizando una aguja de un tamaño apropiado. Para permitir que la red fluidica comunique con una fuente de fluido, la tubería, por ejemplo de polietileno, se puede sellar en comunicación con los agujeros para formar una conexión fluidica. Para prevenir las fugas, la conexión se puede sellar con un sellante o adhesivo tal como cola epoxi.

Tal como se muestra en la FIG. 1, se puede utilizar un dispositivo microfluidico 110 para proporcionar un sustrato sobre el que se realice el ensayo. Métodos para fabricar un dispositivo microfluidico de este tipo se proporcionan en la solicitud de patente de EE.UU. N° 6.645.432.

Se puede utilizar una serie de canales microfluidicos 120, 122 y 124 para hacer fluir la muestra y el precursor de metal a través de la superficie 130 del dispositivo microfluidico. Un participante en la unión, por ejemplo un antígeno o anticuerpo, se puede disponer sobre la superficie 130 en la parte 140. La parte 140 puede incluir una tira de un participante de la unión, tal como se muestra, que atraviesa dos o más canales. Alternativamente, un participante de la unión se puede disponer sobre una parte limitada a un solo canal. Múltiples participantes de la unión se pueden disponer en un solo canal y pueden solaparse o pueden segregarse uno de otro.

Participantes de la unión inmovilizados en una región o parte de una región se pueden inmovilizar esencialmente de cualquier manera, y en la técnica se conocen muchas técnicas de inmovilización adecuadas para uso con la invención. Véanse la solicitud de patente de Estados Unidos N° 10/654.587 (publicación N° 20040121066) y la patente de Estados Unidos N° 6.686.184. La inmovilización se puede realizar de modo que las especies estén orientadas al azar con relación a la superficie (es decir, cada una de las especies inmovilizadas puede estar orientada al azar con respecto a la superficie) o se puede proporcionar un mayor control de la orientación de la especie con relación a la superficie. Por ejemplo, cuando las proteínas se inmovilizan en la superficie, las mismas se pueden orientar de modo que sus sitios de unión para el ensayo estén orientados generalmente alejados de la superficie, maximizando su capacidad o disponibilidad de unión. Una técnica para hacer esto, descrita en la patente de EE.UU. N° 5.620.850, implica sintetizar la proteína con una etiqueta de poliaminoácido tal como, por ejemplo, una secuencia de 6 histidinas, en un lugar generalmente opuesto al sitio de unión relevante de la proteína, proporcionando un quelato de metal tal como ácido nitrilotriacético, quelando un ion metálico tal como níquel de tal manera que al menos dos sitios de coordinación sobre el níquel estén libres para la unión a la etiqueta de poliaminoácido, y permitiendo que la etiqueta se coordine con los iones de metales, inmovilizando así la proteína en la región o parte de una región en una orientación ventajosa. Un quelato de metal tal como éste se puede inmovilizar en la región en cualquiera de un cierto número de maneras. Una manera implica formar una monocapa auto-ensamblada (SAM –siglas en inglés) en la región, que termina en el quelato de metal, según se describe en la

patente de EE.UU. N° 5.620.850 arriba referenciada. Por ejemplo, una fina capa de oro, esencialmente transparente, se puede depositar en la región, y alquil-tioles formadores de SAM que terminan en un quelato de metal se pueden depositar sobre la capa de oro en forma de una SAM. Otra química, descrita en la patente de EE.UU. N° 5.620.850 y otras referencias, conocida por los expertos ordinarios en la técnica, se puede utilizar para formar una SAM de este tipo en una región definida por una diversidad de materiales base.

Para realizar el ensayo, una muestra tal como una muestra biológica tomada de un sujeto se hace fluir a través de uno o más microcanales 120, 122 ó 124 en la dirección mostrada por las flechas. La muestra puede ser una muestra de líquido, pero en algunas realizaciones no necesita ser diluida, purificada ni tratada antes del análisis. La muestra puede fluir a través del microcanal a una velocidad suficiente para permitir que un componente de la muestra se una a un participante de la unión inmovilizado en la parte 140. Al hacer fluir activamente la muestra a través del canal, la parte 140 reactiva se expone repetidamente a los componentes de la muestra, mejorando la cinética de la reacción y dando como resultado una formación incrementada de cualesquiera pares de unión. Después de que haya fluido una cantidad adecuada de muestra a través del microcanal 120, p. ej. cuando se hayan formado pares de unión detectables, un fluido, que contiene un coloide metálico asociado con un segundo participante de la unión del componente de la muestra, se hace fluir al microcanal, permitiendo que el coloide metálico se una con cualquier componente de la muestra que haya sido asociado con la parte 140 del microcanal.

Después de que al coloide metálico se le haya dado la oportunidad de unirse con cualquier participante de la unión en la parte 140, un precursor de metal puede fluir a través del canal 120 de una manera similar a como lo hizo el coloide metálico. El precursor de metal se hace fluir a través del microcanal a una concentración y a una velocidad que permitan que se forme una capa opaca en cualquier sitio en el que un número de coloides metálicos umbral haya sido asociado con la superficie. Así, si un anticuerpo conjugado con oro se utiliza como un coloide metálico, se puede utilizar una disolución de nitrato de plata para depositar de forma no electrolítica una capa de plata sobre la parte del canal asociado con el anticuerpo conjugado con oro. Al completarse esta parte del ensayo, la superficie 130 de la red microfluidica puede incluir, en capas sucesivas, un antígeno tal como un antígeno de VIH, un componente de la muestra de un anticuerpo de VIH obtenido a partir de un sujeto, un coloide metálico tal como IgG anti-humana marcada con oro y una capa opaca de metal tal como plata, que ha sido depositada de forma no electrolítica sobre el coloide metálico. Disoluciones de aclarado pueden fluir a través del canal antes o después de cada una de las etapas.

Además de depositar metal sobre cualesquiera coloides metálicos que puedan asociarse con la parte 140 del microcanal 120, el precursor de metal también se puede depositar metal que haya sido previamente depositado de forma no electrolítica sobre el anticuerpo conjugado con oro. De esta manera, se puede formar un material opaco sobre algo o toda la parte 140, permitiendo la detección, por ejemplo, a simple vista o mediante un dispositivo de detección óptico. El material opaco puede ser un material continuo más que, por ejemplo, partículas independientes, y puede incluir una dimensión horizontal, que en una dimensión medida en esencialmente el mismo plano que la superficie 130, mide más de 1 micra, más de 10 micras o más de 100 micras.

En algunos casos, una capa opaca puede formar una banda o panel de material que incluye pasajes que permiten que la luz sea transmitida a través de los mismos. A medida que se deposita material adicional, estos pasajes se pueden volver más pequeños, permitiendo que se transmita cada vez menos luz a través del material. A medida que los pasajes desaparecen, la cantidad de transmitancia de luz se puede reducir a cero, proporcionando un material completamente opaco.

Después de haberse formado una capa opaca, la detección de la capa opaca y, con ello, la determinación de la presencia de un participante de la unión, se puede determinar visualmente examinando el dispositivo microfluidico o utilizando un detector tal como un detector óptico. Un detector óptico se representa en las FIGs. 2, 3 y 9. La FIG. 2 ilustra un dispositivo microfluidico 110 tal como se muestra en la FIG. 1. También se incluye una fuente de luz 210, en este caso un diodo láser modulado por oscilador, y un detector 220 tal como un CI óptico. Tal como se ilustra en el diagrama esquemático de la FIG. 3, la señal del detector se puede amplificar y hacer pasar a través de un filtro pasa-banda centrado a la misma frecuencia que el oscilador que controla la fuente de luz. La salida 320 puede luego hacerse pasar a un convertidor A/D 330, que luego puede proporcionar una salida en una lectura de salida tal como una pantalla LCD 340. Tanto la fuente de luz como el detector se pueden alimentar con una batería de 9 voltios 230.

Se describe un aparato y un método para analizar una muestra utilizando un flujo continuo. Típicamente, los métodos existentes tales como ELISA y otros ensayos de sándwich utilizan una placa de 96 pocillos o similar para contener una muestra del inmunoensayo. Estos métodos pueden exponer un anticuerpo o un antígeno a un componente de la muestra en un fluido, pero el fluido no fluye más allá del anticuerpo o antígeno y la difusión se

basa en disponer en proximidad a los participantes de la unión uno con otro. Se describen métodos y aparatos que permiten oportunidades incrementadas para unir un componente de una muestra a un potencial participante de la unión a concentraciones del componente de la muestra similares o menores que las de los métodos previos. Al hacer fluir una muestra que contiene un participante de la unión más allá de una superficie que presenta al otro participante de la unión, se coloca en proximidad un mayor número de participantes de la unión potenciales entre sí que lo que se produciría a través de una simple difusión. La muestra se hace fluir a través de un microcanal que proporciona el beneficio de dejar fluir un participante de la unión más allá de un segundo participante de la unión, al tiempo que requiere una muestra pequeña, por ejemplo de menos de 10 microlitros, menos de 1 microlitro o menos de 100 nanolitros de muestra. El microcanal puede ser de un material transparente a la luz que se utiliza para detectar la formación de un material opaco en el canal, de modo que toda absorbancia o transmitancia de luz a través de una parte del canal puede ser atribuida a la formación de una capa opaca.

Dado que los inmunoensayos detectan entidades de señalización tales como anticuerpos secundarios conjugados con enzimas que están disueltos o suspendidos en un fluido, se requiere un tramo de recorrido relativamente largo con el fin de obtener una sensibilidad óptima. Así, un motivo por el que los inmunoensayos no han sido aplicados en microfluidos es el tramo de recorrido corto que típicamente se presenta por parte de los dispositivos microfluidicos. Por ejemplo, un dispositivo microfluidico puede tener un canal con un grosor menor que 250 micras, menor que 100 micras o menor que 40 micras. Por lo tanto, cualquier fluido que llene un canal en este dispositivo microfluidico presentaría una trayectoria perpendicular de la luz menor que 250, 100 ó 40 micras. Los métodos pueden no estar sometidos a estas restricciones, ya que pueden utilizar una capa opaca en el estado sólido más que un cromóforo en un fluido. La capa opaca puede tener un grosor menor que 1 micra, menor que 100 nanómetros o menor que 10 nanómetros. Incluso a estos pequeños grosores, se puede obtener un cambio detectable en la transmitancia.

La geometría del canal microfluidico puede proporcionar el flujo laminar de fluidos a través del canal, incluso a caudales relativamente elevados. Alternativamente, se puede emplear un flujo turbulento utilizando caudales incluso más rápidos o dispositivos tales como mezcladores microfluidicos. Una mezcladura de este tipo puede proporcionar una mayor cantidad de contacto entre participantes de la unión potenciales.

La presencia, ausencia, o cantidad de un analito en una muestra puede ser indicada por la formación de un material opaco. A pesar de que el material opaco puede utilizarse para refractar la luz o puede ser excitado para emitir luz a una longitud de onda similar o diferente a la de la luz a la que se expone la capa, puede preferirse la medición de la transmisión de luz debido, por ejemplo, a un menor equipo y a costes de funcionamiento más bajos y a una facilidad de uso. En algunos microcanales, una capa no opaca puede ser visible a simple vista y, en particular si es reflectante, puede detectarse sin el uso de instrumentación.

Todo material opaco que se forma puede ser una serie de partículas discontinuas independientes, pero en una realización es un material continuo que adopta una forma generalmente plana. El material opaco puede tener una dimensión mayor que 1 micra o mayor que 10 micras. El material opaco puede ser un metal y es preferiblemente un metal que se puede depositar de forma no electrolítica. Estos metales incluyen, por ejemplo, cobre, níquel, cobalto, paladio y platino. Un precursor de metal es un material que puede proporcionar la fuente del metal elemental para depositarse, por ejemplo, sobre un coloide metálico. Por ejemplo, un precursor de metal puede ser una disolución de sal metálica tal como nitrato de plata. Un precursor de metal puede incluir 0,1% de nitrato de plata, 1,7% de hidroquinona y tampón citrato 0,1 M a un pH de 3,5. Algunos otros ejemplos de materiales depositados de forma no electrolítica pueden encontrarse en *Modern Electroplating*, 4ª edición, Schlesinger y Paunovic, Wiley, 2000. Los precursores de metales pueden almacenarse durante largos períodos de tiempo y pueden ser estables durante varios años, mientras que compuestos ópticamente activos pueden tener vidas útiles mucho más cortas.

Cualquier coloide metálico asociado con una superficie puede estar ampliamente dispersado a lo largo de una parte de la superficie. Por ejemplo, anticuerpos conjugados con oro pueden unirse a componentes de la muestra que están asociados con la parte de la superficie, pero pueden existir espacios entre los anticuerpos conjugados con oro, haciéndolos discontinuos. Cuando un precursor de metal se expone primeramente a estos anticuerpos conjugados con oro, el precursor puede formar componentes en partículas centrados alrededor de coloides metálicos individuales. Dado que el metal, p. ej. plata, se deposita sobre estos coloides metálicos, las partículas se vuelven mayores y pronto el precursor de metal puede depositar metal no sólo sobre coloides de oro, sino sobre metal que ha sido previamente depositado de forma no electrolítica. Por ejemplo, una disolución de nitrato de plata puede depositar metal plata sobre partículas de metal plata que han sido previamente depositadas sobre anticuerpos conjugados con oro. Así, a medida que la capa de plata continúa creciendo sobre la plata, así como sobre el oro, se pueden unir zonas que previamente eran partículas independientes o islas de metal para formar un

material opaco mayor y continuo que puede ser fácilmente detectado. Se ha encontrado que un sistema microfluidico puede proporcionar una capa de metal relativamente uniforme y continua. El material opaco puede tener un grosor mayor que 1, 10, 100 ó 1000 nanómetros. Para algunos materiales opacos, el material puede convertirse en completamente opaco a grosores mayores que aproximadamente 100 nm. Sin embargo, en algunas realizaciones, tal como cuando se forma una estructura de panal o similar, el grosor en algunas partes puede ser mucho mayor, al tiempo que sigue permitiendo que se transmita algo de luz.

Una diversidad de materiales químicos y biológicos se puede analizar por los métodos y aparatos descritos en esta memoria. Analitos pueden incluir productos químicos tales como compuestos orgánicos y materiales biológicos tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos.

Analitos incluyen cualquier analito para el que se puede encontrar un participante de la unión. Analitos que se pueden determinar incluyen proteínas específicas, virus, hormonas, fármacos, ácidos nucleicos y polisacáridos; específicamente anticuerpos, p. ej.: inmunoglobulinas IgD, IgG, IgM o IgA contra HTLV-1, VIH, hepatitis A, B y no A/no B, rubeola, sarampión, parvovirus humano B19, paperas, malaria, varicela o leucemia; hormonas humanas y animales, p. ej.: hormona del crecimiento humana (hGM, gonadotropina coriónica humana WM; fármacos, p. ej.: paracetamol o teofilina; ácidos nucleicos marcadores, p. ej.: tales como para marcadores del análisis de la huella genética; polisacáridos tales como antígenos de la superficie celular para el tipado de tejido HLA y material de la pared celular bacteriana. Productos químicos que se pueden detectar incluyen explosivos tales como TNT, agentes nerviosos y compuestos peligrosos para el medio ambiente tales como difenilos policlorados (PCBs), dioxinas, hidrocarburos y MTBE. Fluidos de muestras típicos incluyen fluidos fisiológicos tales como sangre entera humana o animal, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, semen, lágrimas, orina, sudor, saliva, fluido cerebro-espinal, secreciones vaginales; fluidos in vitro utilizados en fluidos de investigación o del medio ambiente tales como líquidos acuosos de los que se sospecha que están contaminados por el analito.

En los casos en los que se está analizando un antígeno, un correspondiente anticuerpo puede ser el participante de la unión asociado con una superficie de un canal microfluidico. Si un anticuerpo es el analito, entonces un antígeno apropiado puede ser el participante de la unión asociado con la superficie. Cuando se está determinando un estado patológico, se puede preferir disponer el antígeno sobre la superficie y analizar un anticuerpo que se haya producido en el sujeto. Anticuerpos de este tipo pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos contra VIH.

Una muestra biológica puede obtenerse de forma no invasiva. El bajo nivel de detección capaz de ser conseguido con la invención permite el uso de muestras que típicamente contienen concentraciones menores de antígenos o anticuerpos que la sangre. Por ejemplo, muestras útiles pueden obtenerse a partir de la saliva, orina, sudor o mucosidad. Al permitir que las muestras sean obtenidas de manera no invasiva, los métodos de la invención pueden proporcionar un rendimiento incrementado, un muestreo más seguro y una menor aprehensión del sujeto.

Los métodos y aparatos descritos en esta memoria pueden ser capaces de obtener límites de detección (LOD – siglas en inglés) equiparables a los que se pueden conseguir mediante ensayos inmunocromatográficos así como ELISA. Por ejemplo, se pueden detectar concentraciones inferiores a 1 nM e incluso en el intervalo de 100 pM. El ensayo puede ser cualitativo, cuantitativo o ambos. Tal como se ilustra en la FIG. 4, a medida que aumenta la concentración de analito, la absorbancia aparente del material opaco aumenta de manera correspondiente. En la FIG. 4, el componente de la muestra (analito) es antígeno del VIH, y la muestra es suero humano. Se muestran diferentes diluciones de estos sueros y en la FIG. 6 la formación de una capa opaca indica un resultado positivo cuando se compara con un control a diluciones de 1 a 10 y de 1 a 100. Por lo tanto, además de ensayos de tipo presencia/ausencia, se puede proporcionar un ensayo cuantitativo. Un ensayo cuantitativo de este tipo puede ser de interés, por ejemplo, para aquellos que estén controlando los niveles de anticuerpos en un paciente durante el tratamiento.

La sensibilidad y los Límites de Detección (LOD) del método se equiparan favorablemente con los que se pueden obtener con diversas técnicas ELISA del estado conocido de la técnica. Cuando se comparan con técnicas ELISA utilizando quimioluminiscencia, fluorescencia y absorbancia en el ensayo de IgG de conejo, una realización de la invención utilizando la deposición de plata proporcionó una sensibilidad e índices del LOD equiparables. La sensibilidad y el LOD se calcularon utilizando las definiciones IUPAC y se proporcionan en la Tabla 1 que figura a continuación. Números de sensibilidad más altos indican una mayor sensibilidad, y números de LOD más bajos indican un LOD más bajo.

Tabla 1

Método	Sensibilidad (normalizada)	LOD (pM)
--------	----------------------------	----------

Deposición de plata	0,08	89
Quimioluminiscencia	0,19	22
Fluorescencia	0,12	163
Absorbancia	0,04	55

- Se describe un ensayo que requiere menos tiempo de funcionamiento que los ensayos basados en inmunología típicos tales como ELISA. Por ejemplo, utilizando un dispositivo microfluidico, los tiempos de incubación para cada uno de los reactivos pueden ser menores que 10 minutos. Para técnicas ELISA utilizando micropocillos, para cada uno de los reactivos se requiere típicamente un tiempo de incubación de 1 a 3 horas. Así, se proporciona una disminución de 6 a 18 veces en el tiempo de incubación. Una parte de estos ahorros de tiempo puede ser atribuida al análisis de una muestra directamente sin la necesidad de purificar, diluir o preparar de otro modo una muestra. Por ejemplo, una muestra de saliva puede fluir a través de un canal sin haber sido diluida, filtrada, separada o preparada de otro modo. Desde el instante en el que se obtiene una muestra a cuando se comprueban los resultados puede haber transcurrido un tiempo total menor que una hora, menor que 30 minutos, menor que 20 minutos o menor que 10 minutos. Una razón de este aumento de la velocidad es una tasa mejorada de unión entre participantes de la unión. Esta se puede atribuir, al menos en parte, al sistema de flujo de la invención. Sistemas basados en difusión o la acción capilar están limitados en el número de participantes de la unión que pueden ser expuestos entre sí a lo largo de un período de tiempo dado. Además de ello, dado que la difusión puede depender de la temperatura, la presente invención, utilizando un flujo de muestra, puede ser más independiente de la temperatura que otros métodos, proporcionando un ensayo más sólido en el campo en que las temperaturas pueden variar desde por encima de 40°C hasta por debajo de 0°C.
- Se pueden realizar dos o más ensayos en paralelo. Una sola muestra puede ser dividida físicamente en dos o más muestras utilizando un dispositivo microfluidico. Un dispositivo microfluidico puede tener un solo canal de entrada que se ramifica en dos, tres o más canales paralelos. El análisis paralelo se puede realizar a diferentes niveles de umbral de un analito similar o idéntico, o para analitos diferentes a los umbrales iguales o diferentes. Un control también se puede realizar en paralelo. Así, con una sola operación de la muestra, una muestra puede ser analizada para dos o más analitos a cualquier número de concentraciones umbral. También se puede realizar un control al mismo tiempo y puede ser útil para calibrar y/o verificar el método de detección que se utilice. Una vez que se ha formado una capa opaca, el ensayo puede ser estable durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo mayor que un mes o un año, de modo que los ensayos se pueden recoger y analizar o volver a analizar en una fecha posterior.
- Reactivos y muestras pueden ser suministrados al ensayo utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica o utilizando métodos descritos en esta memoria.
- Se puede utilizar una diversidad de técnicas de determinación. Técnicas de determinación pueden incluir técnicas basadas en la óptica tales como la transmisión de la luz, absorbancia de la luz, dispersión de la luz, reflexión de la luz y técnicas visuales. Técnicas de determinación también pueden medir la conductividad. Por ejemplo, pueden utilizarse microelectrodos colocados en extremos opuestos de una parte de un canal microfluidico para medir la deposición de un material conductor, por ejemplo un material depositado de forma no electrolítica. A medida que se desarrolla un número mayor de partículas de metal individuales y éstas contactan unas con otras, la conductividad puede aumentar y proporcionar una indicación sobre la cantidad de material conductor, p. ej., metal, que haya sido depositada sobre la parte. Por lo tanto, la conductividad o resistencia pueden utilizarse como una medida cuantitativa de la concentración del analito.
- Otra técnica analítica puede incluir medir una concentración variable de un precursor desde el instante en el que el precursor penetra en el canal microfluidico hasta el instante en el que el precursor sale del canal. Por ejemplo, si se utiliza una disolución de nitrato de plata, un electrodo sensible a la plata puede ser capaz de medir una pérdida en la concentración de plata debida a la deposición de la plata en un canal a medida que el precursor atraviesa el canal.
- Técnicas de detección óptica diferentes proporcionan un cierto número de opciones para determinar los resultados del ensayo. La medición de la transmisión o absorbancia significa que la luz puede ser detectada a la misma longitud de onda a la que se emite a partir de una fuente de luz. A pesar de que la fuente de luz puede ser una fuente de banda estrecha que emite a una longitud de onda única, también puede ser una fuente de amplio espectro que emite a lo largo de un intervalo de longitudes de onda, dado que muchos materiales opacos, pueden bloquear de manera eficaz un amplio intervalo de longitudes de onda. El sistema puede hacerse funcionar con un mínimo de dispositivos ópticos. Por ejemplo, el dispositivo de determinación puede estar exento de un

fotomultiplicador, puede estar exento de un selector de longitud de onda tal como una rejilla de difracción, prisma o filtro, puede estar exento de un dispositivo para dirigir o columnar la luz tal como un columnador. La eliminación o reducción de estas características puede dar como resultado un dispositivo menos costoso y más sólido.

- 5 La fuente de luz puede ser modulada por impulsos, por ejemplo a una frecuencia de 1.000 Hz. Para comparar la fuente de luz modulada por impulsos, un detector puede incluir un filtro que opere a la misma frecuencia. Al utilizar una fuente de luz modulada por impulsos se ha encontrado que el sistema puede ser menos sensible a las fuentes de luz extrínsecas. Por lo tanto, el ensayo puede realizarse bajo diversas condiciones de luz, incluida amplia luz diurna, que pueden hacer no práctico el uso de técnicas existentes. Resultados experimentales indican que al utilizar una fuente de luz modulada por impulsos y un filtro, los resultados son consistentes independientemente de las condiciones de luz bajo las que se realiza el ensayo.

- 15 La fuente de luz puede ser un diodo láser. Por ejemplo, se puede utilizar un diodo láser semiconductor rojo de InGaAlP que emite a 654 nm. El fotodetector puede ser cualquier dispositivo capaz de detectar la transmisión de luz que es emitida por la fuente de luz. Un tipo de fotodetector es un circuito integrado (CI) óptico que incluye un fotodiodo que tiene una sensibilidad pico a 700 nm, un amplificador y un regulador de la tensión. Si la fuente de luz es modulada por impulsos, el fotodetector puede incluir un filtro para separar el efecto de la luz que no se encuentra a la frecuencia seleccionada.

20 Ejemplo 1

Producción de un cartucho de reactivos –

- 25 Tubos, o cartuchos, se prepararon cortando una tubería de polietileno (PE) comercialmente disponible en unidades de 30 cm de longitud. Los dos métodos investigados para llenar el cartucho se ilustran en las Figs. 13 y 14. En el método representado en la Fig. 14, hasta seis cartuchos de PE se conectaron a una disposición de válvulas activadas por tensión, las cuales, a su vez, estaban conectadas a una fuente de vacío de - 6 kPa. Los impulsos de la tensión, generados a través de un programa Labview doméstico, hicieron funcionar las válvulas activadas por tensión. Antes de iniciar la carga del reactivo, los cartuchos se llenaron con tampón de lavado (Twee® 20 al 0,05% en PBS) y las válvulas se activaron para bombear un tapón de aire de 2 cm en los cartuchos. Después, los cartuchos se sumergieron en el líquido apropiado y en el cartucho se aspiró un tapón de líquido haciendo funcionar las válvulas. Un tiempo de apertura de 5 s dio como resultado un tapón de 3 cm de longitud o un volumen de aproximadamente 13,5 µL. Entre cada uno de los tapones de líquido, el aire se aspiró en el cartucho para separar físicamente cada reactivo y para evitar una mezclado de los reactivos en el cartucho. Las válvulas y los cartuchos se fijaron a un soporte que se acopla sobre una placa de 96 pocillos y las disoluciones de reactivos patrón se colocaron en la secuencia apropiada en los pocillos. Utilizando este sistema, tapones de reactivo se llenaron con exactitud en seis cartuchos paralelos con una precisión inferior a $\pm 14\%$ en términos de longitud del tapón.

- 40 El segundo método, representado en la Fig. 14, utilizaba una jeringa Hamilton accionada manualmente, conectada en un extremo a un solo tramo de la tubería de PE. Esta estrategia puede ser técnicamente más simple que el método anterior y puede ser más apropiada para la preparación de un número limitado de cartuchos. Cuando se completó la preparación de los cartuchos, el extremo de la tubería se selló por calor, el cartucho se desconectó de la válvula/jeringa y el otro extremo se selló por calor. Se prepararon cartuchos que contenían tanto como 10 tapones para un inmunoensayo heterogéneo.

- Los tapones de aire situados entre cada uno de los tapones de fluido aseguraron que no se produjera mezclado alguna entre los diferentes reactivos en el cartucho. Utilizando tapones muertos, se observó que los tapones dejaron pequeños residuos a medida que se movían en la tubería. Se encontró que los tapones de cola recogían el residuo. Este proceso resultó en una contaminación cruzada de tapón a tapón. Múltiples tapones distintos pueden ser más eficaces para separar este residuo. Para cuantificar la contaminación cruzada y para determinar cuántos tapones de aclarado pueden reducir el residuo a niveles aceptables, un cartucho se llenó con tapones de fluoresceína disuelta en tampón carbonato 50 mM (pH 9,5) utilizando el método representado en la Fig. 14. Tapones de fluoresceína fueron cargados a diversas concentraciones, seguidos de uno o más tapones de tampón. 55 El cartucho se conectó a la entrada de un canal microfluidico de 25 mm de longitud, 50 x 50 µm, y la intensidad de fluorescencia en el canal se registró a medida que los tapones fueron bombeados a través del canal microfluidico. Los resultados se muestran en las Figs. 16b y 16c. El detector mostró una respuesta lineal para la serie de dilución de fluoresceína, indicando que los datos podrían ser utilizados para un tratamiento cuantitativo. La cuantificación del grado de contaminación de tapón a tapón que deriva de una disolución de fluoresceína 31 µM en tres tapones tampón siguientes mostró (después de la sustracción del fondo) una concentración por fluorescencia de 7%, 0,9%

y 0,1% con relación al tapón de fluoresceína de 31 μM . Se midió la contaminación cruzada a partir de un tapón de fluoresceína 250 μM . Se determinó la presencia de fluoresceína en los seis tapones después de la disolución de fluoresceína 250 μM . Mientras que la señal del tapón de fluoresceína 250 μM saturó el detector, la fluorescencia se detectó sólo en los tres primeros tapones (siguientes al tapón de fluoresceína). Estas observaciones demostraron

que eran suficientes tres tapones de tampón entre cada uno de los tapones de reactivo para evitar una contaminación cruzada. Por lo tanto, la introducción de tres o más tapones de tampón en el cartucho puede cumplir una función doble: (i) prevenir la contaminación de tapón a tapón en el cartucho, y (ii) aclarar el sustrato antes de la etapa de lavado, como puede ser deseable en aplicaciones tales como en ensayos de microtitulación.

Además del aire, se evaluó como un fluido de separación perfluorodecalina (PFD). Las disoluciones acuosas humedecían los microcanales hidrofílicos más que lo hacía PFD. Cuando un tapón de PFD penetró en el canal microfluidico, sólo arrastró parcialmente a la disolución acuosa fuera del microcanal. Los tiempos de incubación resultantes y la eficacia de lavado eran, así, irreproducibles. Tapones gaseosos discurren a través del microcanal con mayor rapidez que lo hacen los tapones de PFD a un diferencial de presión dado. A la temperatura ambiente, el aire tiene una viscosidad de $\sim 20 \mu\text{Pa}\cdot\text{s}$, mientras que la viscosidad de PFD es $\sim 5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, o 250 veces mayor que la del aire. Tras la aplicación de un gradiente de presión, el caudal volumétrico a través del canal es inversamente proporcional a la viscosidad del fluido. Por lo tanto, un tapón de aire discurrirá aproximadamente 250 veces más rápido que un tapón de PFD. Tal como se ilustra en la Fig. 15, los tapones de aire en el cartucho tienen una longitud similar a los tapones de reactivo. Sin embargo, debido al primer transporte de aire, la lectura de salida del detector indica que el tiempo transcurrido entre dos tapones de fluoresceína es menor que 10 segundos. Para fines comparativos, un tapón de separación de una longitud similar, hecho de un líquido inmiscible con el agua, tal como PFD consumió varios minutos para discurrir a través del microcanal. El tiempo de ensayo total puede, por lo tanto, ser significativamente reducido cuando entre los tapones de reactivo se utilizan separadores basados en gas en lugar de separadores basados en líquidos.

Ejemplo 2

Se diseñó y se realizó un experimento para evaluar el uso de un inmunoensayo heterogéneo en combinación con un cartucho que contenía una serie de tapones de fluido. Todos los reactivos requeridos, excepto la muestra, estaban contenidos en el cartucho. El cartucho se realizó tal como se describe antes en el Ejemplo 1.

Fotomáscaras para fotolitografías se obtuvieron de Page Works (Cambridge, MA). Fotorresina SU8 negativa se obtuvo de Microchem (Newton, MA). Poli(dimetilsiloxano) Sylgard 184 (PDMS) se obtuvo de Dow Corning (Midland, MI). Los sustratos de poliestireno se adquirieron de NUNC (Rochester, NY). Inmunoglobulina G (IgG) de conejo, anti-conejo y de ratón se adquirieron de Sigma (St-Louis, MO), y la IgG anti-oveja de burro Alexa-488 se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR). Una bomba de vacío accionada manualmente y una tubería de polietileno (Intramedic PE-60, diámetro interno de 0,76 mm y diámetro externo de 1,22 mm) se adquirieron de VWR Scientific Products (Pittsburgh, PA). Todos los otros productos químicos eran de una calidad analítica y estaban disponibles de casas de suministro de productos químicos.

Preparación de una plataforma microfluidica-

Se preparó una réplica de PDMS con microcanales mediante prototipado rápido según se describe en la patente de EE.UU. N° 6.645.432 y en Samuel Sia et al, solicitud PCT titulada "Assay Device and Method" (Dispositivo y Método de Ensayo), presentada el 29 de diciembre de 2004 bajo el número de expediente del Agente HO498.70211. Se utilizó un diseño microfluidico para diseñar tiras de antígeno (dos canales paralelos, 30 mm de longitud, 200 μm de anchura y 60 μm de profundidad), y se utilizó un segundo diseño para llevar a cabo el inmunoensayo (seis canales paralelos de 50 mm de longitud, 63 μm de profundidad). Estos canales estaban compuestos por 5 secciones cada una de 10 mm, con una anchura de 500 μm , próxima a la entrada y a la salida, de 50 μm en el centro (en donde tiene lugar el inmunoensayo heterogéneo) y de 250 μm en los segmentos intermedios. Esta geometría resulta en canales largos (es decir, en que las seis entradas y las seis salidas pueden ser separadas geoméricamente una de otra) con una resistencia al flujo limitada (es decir, los fluidos se pueden bombear en un flujo hidrodinámico con una caída de presión mínima). La réplica de PDMS para el diseño se selló de manera no permanente (es decir, sin oxidación con plasma) al sustrato de poliestireno, y los dos canales paralelos se llenaron con una disolución de 50 μg de IgG de conejo y una disolución de 50 μg de IgG de ratón en PBS. Después de un tiempo de incubación de 90 minutos a la temperatura ambiente, los canales se vaciaron y se enjuagaron dos veces con una disolución de reciente aportación de Tween al 0,05% en PBS. La plancha de PDMS se desprendió y el sustrato de poliestireno se enjuagó con agua desionizada (conductividad mayor que 18 M Ω) y se secó con una pistola de nitrógeno. Las entradas y salidas se perforaron en la segunda plancha de PDMS (para el inmunoensayo) utilizando una aguja médica afilada con un diámetro exterior de 1,6 mm (calibre 16G1½). Los

agujeros practicados en el PDMS por parte de esta aguja modificada eran lo suficientemente grandes como para insertar una tubería de PE-60 y permitieron un sellado estanco entre el cartucho y el microcanal. La segunda plancha de PDMS no se selló de manera permanente sobre el sustrato de poliestireno, con sus microcanales orientados ortogonalmente a las tiras de antígeno. Los seis microcanales se llenaron con una disolución reciente de Tween al 0,05% en PBS para bloquear la superficie expuesta durante al menos dos horas.

Inmunoensayo heterogéneo –

Los cartuchos se insertaron en las entradas de los canales microfluidicos y las salidas se conectaron a una fuente de vacío. Para asegurar una fuente estacionaria de vacío a lo largo del ensayo, la bomba manualmente accionada se conectó a un matraz de fondo redondo de 1 L que actuaba como lastre. Seis tubos de PE-60 se conectaron a su vez entre el lastre y las salidas de los chips microfluidicos. El ensayo se inició haciendo funcionar la bomba hasta conseguir en el interior del lastre una diferencia de presión de -15 kPa, dando como resultado la dispensación de los contenidos del cartucho a los canales microfluidicos. La intensidad de fluorescencia en la tira de antígeno (es decir, en donde se constituye el inmunocomplejo) y fuera de la tira (es decir, en donde se miden la unión no específica y el nivel de ruido) se cuantificaron y sustrajeron para obtener la intensidad de la señal.

Los datos se presentan en la Fig. 22 y se compensaron para las variaciones diarias utilizando la curva de titulación obtenida para los tapones de 8 cm como patrón interno. Cada una de las curvas de titulación representa la media de tres curvas experimentales obtenidas con un intervalo de un día. Se calculó un ajuste sigmoideal para el patrón interno y los datos se transformaron para el ajuste sigmoideal con la relación $y = a \cdot x + b$. Se requería el valor de las constantes de a y b para obtener un ajuste que es $y = 0$ a la concentración más baja e $y = 1.000$ a la concentración más alta de IgG anti-conejo. Todos los datos experimentales se transformaron utilizando la relación $y = a \cdot x + b$ y se calculó la media de los tres puntos de datos. Los datos presentados en la Fig. 22 se compensaron para variaciones diarias, utilizando un tercer chip microfluidico como patrón interno. El calibrador consistía en cuatro canales paralelos (50 mm de longitud, 50 μ m de anchura y 50 μ m de profundidad) llenos de disolución de 0,5, 1, 2 y 4 μ M de fluoresceína en tampón carbonato de sodio 50 mM, pH 9,55. Para cada conjunto diario de mediciones se preparó un nuevo calibrador a partir de un nuevo chip microfluidico y las disoluciones apropiadas de fluoresceína. La representación de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de fluoresceína dio como resultado una línea que se ajustó mediante regresión lineal. Cada uno de los puntos de datos de fluorescencia obtenidos para el inmunoensayo se trató individualmente con el resultado del ajuste lineal sustrayendo el valor de la interceptación y luego dividiéndolo por la pendiente.

Para ilustrar el uso de un cartucho para el suministro secuencial de reactivos, se realizó un inmunoensayo heterogéneo microfluidico para la detección de inmunoglobulina G (IgG) desarrollada contra IgG de conejo (anti-conejo). Se preparó un cartucho tal como se describe antes con una secuencia de tapones que contenían IgG anti-conejo de oveja, Tween al 0,05% en PBS, IgG anti-oveja de burro marcada con Alexa 488 y Tween al 0,05% en PBS, siguiendo a cada uno de los tapones con contenido en anticuerpos tres tapones de Tween al 0,05% en PBS (véase la Fig. 17). Una réplica de PDMS se selló sobre un sustrato de poliestireno no estructurado. Se llenaron dos microcanales paralelos, uno con una disolución de IgG de conejo y el otro con una disolución de IgG de ratón. Después de la incubación, la plancha de PDMS se retiró para revelar las bandas de IgG de conejo e IgG de ratón fisiosorbidas sobre sustrato de poliestireno. Para realizar el inmunoensayo, una segunda plancha de PDMS con seis canales microfluidicos se colocó ortogonalmente a las tiras de antígeno (véase la Fig. 18) y la superficie del poliestireno en el microcanal se bloqueó con Tween 20 al 0,05% en PBS. El cartucho se conectó a la entrada del microcanal y se aplicó un vacío de -15 kPa en la salida, utilizando una bomba de vacío manualmente accionada. Los reactivos se suministraron secuencialmente a la plataforma microfluidica. La observación en el microcanal mediante microscopía de fluorescencia reveló una señal de fluorescencia clara que procede del inmunocomplejo fluorescente formado sobre la tira de IgG de conejo (véanse las Figs. 19 y 20); y no se detectó fluorescencia alguna fuera de la tira de IgG de ratón. Se observó algo de unión no específica sobre la superficie de la IgG de ratón cuando se utilizaron muestras con una elevada concentración de proteínas. El tiempo de ensayo total para realizar el inmunoensayo podía ser ajustado a entre 2 y 8 minutos, dependiendo de la longitud de los tapones en el cartucho (véase más adelante).

El intervalo dinámico del inmunoensayo heterogéneo de IgG anti-conejo se determinó realizando el ensayo con una serie de diluciones décuplas de IgG anti-conejo en los cartuchos. El tiempo de incubación de la muestra tiene una influencia directa sobre el comportamiento del ensayo. El intervalo dinámico conseguido utilizando la técnica descrita anteriormente se determinó registrando la señal como una función del tiempo de incubación. Dado que la longitud del tapón puede ser directamente proporcional al tiempo de incubación, se prepararon cartuchos en los que la longitud de los tapones con contenido en anticuerpos se varió de 2 a 4 y 8 cm. En los cartuchos, los dos tapones con contenido en anticuerpo fueron seguidos por tres tapones de aclarado (0,5 cm, 2,3 μ L) y un tampón

de lavado (1 cm, 4,5 μ L) que contenía Tween al 0,05% en PBS (véase la Fig. 21). Los tiempos de incubación específicos para el tapón con contenido en anticuerpos y el tiempo de ensayo total se proporcionan en la Tabla 2 que figura más adelante. La señal máxima aumentó cuando se utilizaron tiempos de incubación más largos, y el intervalo dinámico cuando se utilizan tapones de 8 cm de longitud, fue desplazado en aproximadamente un orden de magnitud hacia las concentraciones de muestra bajas en comparación con el ensayo con tapones de 2 cm de longitud.

Tabla 2: Longitud de los tapones en cartuchos y tiempo de ensayo correspondiente

Longitud del tapón	Volumen del tapón	Tiempo de suministro del tapón	Tiempo total de ensayo
2 cm	9 μ L	30 s	2' 00"
4 cm	18 μ L	67 s	3' 50"
8 cm	36 μ L	130 s	7' 45"

Ejemplo 3

Almacenamiento del cartucho –

Un cartucho puede servir como almacenamiento a largo plazo para reactivos antes de realizar un ensayo. La estabilidad a largo plazo de los reactivos en el cartucho se evaluó preparando aproximadamente 70 cartuchos cargados con una muestra de IgG anti-conejo 167 nM y utilizándolos a lo largo del transcurso de 12 días. Los tapones con contenido en anticuerpos eran de 8 cm de longitud. Inmediatamente después de la preparación del cartucho, se realizó el ensayo en dos chips paralelos con 6 cartuchos y se registró la señal de fluorescencia que surgía del inmunocomplejo. Los cartuchos restantes se dividieron en tres tandas, cada una almacenada a una temperatura diferente: 4°C, temperatura ambiente y 37°C. Posteriormente, se repitió el inmunoensayo en dos chips recientemente preparados con cuatro cartuchos procedentes de cada una de las tandas. El sistema ilustrado en la Fig. 18 puede alojar hasta seis cartuchos en paralelo. Se utilizaron dos cartuchos de cada una de las tandas en cada uno de los chips y se representó la señal de fluorescencia media en función del tiempo de almacenamiento (véase la Fig. 23). Se observó un ligero descenso en la señal (véase la línea de trazos continuos en la Fig. 23, que representa la intensidad de fluorescencia media registrada para todos los 12 puntos de datos). En un chip dado se observaron pequeñas variaciones (es decir, típicamente menores que 5%) entre las señales obtenidas de los cartuchos almacenados a temperaturas diferentes. Sin embargo, las variaciones de chip a chip eran mayores (a veces tan elevadas como 25%) que las variaciones de cartucho a cartucho en el mismo chip. Esto sugiere que el proceso para la preparación de la plataforma microfluidica puede ser la fuente de la reproducibilidad reducida de los resultados del inmunoensayo. Una comparación de la señal obtenida con cartuchos almacenados a temperaturas diferentes, pero utilizados en el mismo chip, puede evaluar, sin embargo, de manera fiable la pérdida de señal asociada con las condiciones de almacenamiento. A partir del gráfico ilustrado en la Fig. 23, se encontró que el cartucho puede almacenarse a temperaturas tan elevadas como 37°C durante dos semanas sin una pérdida significativa de la actividad en comparación con los almacenados a 4°C o 20°C. Después de cuatro semanas, los cartuchos almacenados a 37°C mostraban una disminución en la actividad en comparación con los almacenados a 4°C o 20°C. La actividad global de los inmunorreactivos en cartuchos almacenados a 20°C permanecía esencialmente inalterada durante períodos de tiempo prolongados. Esto se determinó comparando las curvas de titulación obtenidas para IgG anti-conejo utilizando cartuchos recientemente preparados y cartuchos almacenados durante 4 semanas a 20°C, 37°C y 4°C.

Ejemplo 4

Evaluación del ensayo –

Se diseñó un experimento para someter a ensayo anticuerpos de VIH utilizando el presente método así como técnicas ELISA, empleando quimioluminiscencia, fluorescencia y absorbancia. Los procesos y los resultados se describen a continuación.

Los reactivos y el equipo se obtuvieron como sigue. IgG de conejo, IgG anti-conejo (conjugada con peroxidasa de rábano picante), IgG anti-conejo (conjugada con fosfatasa alcalina), IgG anti-conejo (conjugada con oro), fosfato de p-nitrofenilo (pNPP), y el kit reforzador de plata se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). AttoPhos se adquirió de Promega Corp. (Milwaukee, WI). ELISA SuperSignal Femto Max se adquirió de Pierce (Rockford, IL). El sustrato de fosfatasa BluePhos se adquirió de KPL (Gaithersburg, MD). El antígeno Env del VIH (gp41) se

adquirió de Research Diagnostics (Flanders, NJ). Suero VIH positivo y suero control se adquirieron de Golden West Biologicals Inc. (Temecula, CA).

Los inmunoensayos en placas de microtitulación de 96 pocillos se realizaron utilizando un robot de manipulación de líquidos de Tecan Genesis (Center for Genomics Research, Universidad de Harvard). Las siguientes placas de poliestireno Nunc MaxiSorp se utilizaron para la reducción de la plata y ensayos ELISA: placas claras para la reducción de plata y la absorbancia, placas negras para fluorescencia y placas blancas para la quimioluminiscencia. A los micropocillos se añadió IgG de conejo (70 µL para cada uno de los pocillos) en diluciones décuplas (10 µg/mL a 100 pg/mL, que corresponden a 67 nM a 670 fM), excepto una fila a la que se añadió PBS como control negativo; el tiempo de incubación era de 2 horas. Luego se añadieron, tampón de bloqueo (100 µL de Tween-20 al 0,05% y BSA al 1% en PBS), y se dejó incubar durante 30 minutos. Para los anticuerpos secundarios, se utilizaron diluciones (30 µL de Tween-20 al 0,05% en PBS) de 1:300 de IgG de anti-conejo (conjugada con oro), 1:1000 de IgG de anti-conejo (fosfatasa alcalina) y 1:1000 de IgG anti-conejo (peroxidasa de rábano picante); el tiempo de incubación era de 1 hora. Para los sustratos ELISA, pNPP (100 µL; 3 minutos de incubación), AttoPhos (100 µL, utilizado con 1 semana de apertura; 10 minutos de incubación) y ELISA SuperSignal Femto (100 µL; después de 5 minutos). Para el refuerzo de plata, las disoluciones de plata e iniciador (a 4°C) se mezclaron en una relación 1:1 inmediatamente antes del desarrollo; se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y a cada uno de los pocillos se añadieron 100 µL. Después de incubación durante 20 minutos, la disolución de reforzador de plata se separó y cada uno de los pocillos se lavó con agua. En general, el calentamiento de la disolución de reforzador de plata desde 4°C hasta temperatura ambiente aumentó la tasa de deposición de plata. Entre la adición de cada uno de los nuevos reactivos, cada uno de los pocillos se lavó tres veces con PBS, con la siguiente excepción: se utilizó agua desionizada para lavar los pocillos después de la incubación con IgG anti-conejo (oro) y antes del refuerzo de plata, con el fin de evitar la precipitación de AgCl. Los lectores de placas utilizados eran Spectramax Plus 384 para las mediciones de la absorbancia y Spectramax Gemini XS para las mediciones de fluorescencia y quimioluminiscencia.

La salida del CI óptico era la transmitancia de luz; valores de la absorbancia aparente se calcularon utilizando la relación $A = -\log(T/T_0)$, en que A es la absorbancia y T y T_0 son la transmisión de la luz a través de la muestra y referencia, respectivamente, hacia el fotodetector. Como referencia se utilizó aire en el lector de placas y se utilizó una placa de poliestireno en blanco como referencia para el detector portátil.

Las lecturas de la absorbancia, fluorescencia y quimioluminiscencia (y) se ajustaron a curvas sigmoidales utilizando el software Kaleidagraph y la siguiente ecuación: $y = Ax^n / (B + z^n) + C$, en donde x es la concentración del analito, y A , B , C y n son parámetros flotantes. Los resultados se ilustran en la FIG. 7. Esta ecuación describe una curva sigmoidal general con el número más bajo posible de parámetros flotantes (cuatro). El ajuste de la curva a todas las cuatro titulaciones proporcionó coeficientes de correlación superiores a 0,99. Las lecturas y para todas las cuatro titulaciones se normalizaron a la misma escala (0 a 1) mediante transformación lineal de cada uno de los conjuntos de datos para conseguir los valores de $A = 1$ (asíntota a medida que x se aproxima al infinito) y $C = 0$ (y = interceptación).

Los límites de detección se calcularon de acuerdo con la definición IUPAC: tres veces la desviación estándar de la muestra en blanco ("ruido") dividido por la pendiente ("sensibilidad"). En muestras sin IgG de conejo (es decir, controles negativos), los métodos que exhibían el ruido de menor a mayor eran (después de la normalización de la señal de 0 a 1): 0,006 para la absorbancia de pNPP, 0,014 para la quimioluminiscencia de ELISA SuperSignal Femto Max, 0,023 para plata (utilizando el detector portátil) y 0,066 para fluorescencia de AttoPhos. Los métodos que mostraron las sensibilidades más elevadas a más bajas, que se midieron como pendientes de las curvas de ajuste óptimo en el centro del intervalo de detección de trabajo lineal (señal de 0,50) eran (en unidades normalizadas por 100 pM de analito): 0,193 para quimioluminiscencia, 0,121 para fluorescencia, 0,078 para plata y 0,035 para absorbancia.

Para preparar muestras de inmunoensayo para el análisis mediante AFM, se practicaron agujeros (de 4 mm de diámetro) en una plancha de PDMS, y la plancha de PDMS se colocó sobre una superficie de poliestireno. Los inmunoensayos se llevaron a cabo en pocillos de PDMS individuales. Después del desarrollo de la plata, se retiró la plancha de PDMS y las muestras sobre el sustrato de poliestireno plano se analizaron mediante AFM de modo de contacto intermitente. El AFM se realizó con un microscopio de sondas de barrido Dimension 3100 (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) en el modo de contacto intermitente, utilizando sondas de silicio (Si N° MPP-111000; NanoDevices, Santa Barbara, CA), a una tasa de barrido de 0,35 Hz. En la Fig. 8 se proporcionan microfotografías del AFM. Se observaron unas mechas para las muestras con los granos de plata mayores, lo que sugirió que los granos de plata estaban unidos de manera suelta a la superficie.

El dispositivo microfluidico fue fabricado en PDMS utilizando los procesos publicados en la litografía blanda. Las dimensiones de los microcanales eran 2 mm de anchura y 130 μm de altura. La superficie de poliestireno se diseñó inicialmente con una tira de antígeno Env del VIH (10 $\mu\text{g/mL}$) llenando un canal de PDMS (sellado de manera conformacional sobre la placa de poliestireno) con la disolución de antígeno. Después de incubación durante una noche, el canal se vació, la plancha de PDMS se retiró de la superficie de poliestireno y la superficie se enjuagó con agua desionizada. La tira de antígeno se cubrió con una plancha no estructurada de PDMS y se oxidó la superficie restante de poliestireno con plasma oxigenado. Después de la separación de la plancha de PDMS protectora del plasma, otro canal microfluidico (también oxidado con plasma recientemente) se selló ortogonalmente a la tira de antígeno. Las dimensiones de estos microcanales eran 2 mm de anchura y 40 μm de altura; la anchura del canal debe ser lo suficientemente grande como para registrar una señal con el detector portátil. Para evitar el pandeo del PDMS, se incluyeron en el diseño del canal pilares (que recogían el 12% de la superficie específica). El ensayo del anticuerpo anti-VIH se llevó a cabo en los canales microfluidicos con los siguientes tiempos de incubación: 1 a 4 horas para el bloqueo, 10 minutos para muestras, 10 minutos para IgG anti-humana marcada con oro y 13,5 minutos para la disolución de refuerzo de plata. Después de 6,5 minutos de refuerzo de plata, la disolución de plata se cambió por una recientemente preparada. El microcanal de PDMS se separó por encima de la tira inicial de antígeno, antes de medir la densidad óptica de la película de plata. El ensayo de VIH en micropocillos se realizó con los siguientes tiempos de incubación: durante una noche para el antígeno Env del VIH, 2 horas para bloqueo, 3 horas para muestras, 1 hora para IgG anti-humana marcada con oro y 10 minutos para la disolución de refuerzo de plata.

Para cada una de las concentraciones de IgG de conejo y cada una de las diluciones de suero humano, se realizaron triplicados de inmunoensayo y se calcularon los valores medios y las desviaciones estándar.

El circuito electrónico consistía en una sección de transmisor y en una sección de receptor. En la sección de transmisor, un oscilador de 1 kHz modulaba la salida de la luz de un diodo láser. Se utilizó un diodo láser semiconductor rojo (Sharp GH06510B2A; normalmente utilizado para aplicaciones de almacenamiento de datos ópticos tal como DVD); emitía a una longitud de onda de 654 nm con una potencia máxima de 10 mW. La salida del láser pasó a través de la muestra hasta la sección del receptor. Un CI óptico (Sharp IS455; normalmente utilizado en máquinas de fotocopiado) para detectar y amplificar la señal. IS455 proporcionaba una corriente de salida lineal con respecto a la iluminancia de entrada (1 μA por lux). (Las dimensiones y los costes del diodo láser rojo y el CI óptico eran 5,6 mm y 10 \$ y 5,0 mm y 2 \$, respectivamente). Después, la señal se filtró mediante un filtro pasabanda de segundo orden centrado a 1 kHz y su amplitud se registró mediante un detector de picos. La salida del detector de picos se conectó a un convertidor analógico/digital que también codificaba la salida en decimales codificados binarios (Intersil ICL7106). La señal fue representada por una pantalla de cristal líquido digital 3.5 que proporcionaba un intervalo de lectura de salida de 0 a 1999. Toda la circuitería se hizo funcionar con una batería de 9 V o una fuente de 5 V de polaridad sencilla, que fue invertida con un convertidor de tensión CMOS (Intersil ICL7660) para crear un suministro de ± 5 V. Para reducir el ruido en el sistema, se utilizó la modulación por impulsos de la señal óptica a 1 kHz para filtrar la potencia del ruido en el espectro de frecuencias; como resultado, sólo la parte del ruido óptico que se ajusta en el pasabanda del filtro receptor contribuía al ruido global detectado. El sistema podía también ser utilizado sin la modulación de la señal (es decir, en corriente continua).

El diodo láser y el CI óptico se colocaron en dos placas de circuito impreso separadas que se mantuvieron en una orientación fijada para asegurar la alineación consistente de la trayectoria de la luz desde la fuente de luz hasta el fotodetector. Entre la fuente de luz y el fotodetector se colocó una placa de vidrio. Una transparencia negra, con un poro alineado con la trayectoria de la luz, se colocó sobre la placa de vidrio para bloquear la transmisión de luz parásita que no penetraba en la muestra. Para registrar una medición, sobre la placa de vidrio se colocó una placa de poliestireno (ya sea una placa de 96 pocillos o una placa con un dispositivo microfluidico). La muestra se alineó con la trayectoria de la luz colocando aproximadamente la muestra sobre el poro y ajustando con precisión las posiciones x e y de la placa de poliestireno hasta conseguir una transmitancia máxima. La lectura se registró a partir de la pantalla de cristal líquido.

Para comparar métodos de detección independientemente del analito, micropocillos de una placa de 96 pocillos se sometieron a lecturas mediante un CI y un lector de placas comercial.

La absorbancia de micropocillos que contenían diferentes concentraciones de BluePhos, que absorbe como máximo a 600 nm, tal como se mide mediante un lector de placas de absorbancia visible a UV y el CI óptico descrito en este estudio. Se realizó un ELISA directo sobre 0,67 pM a 0,67 nM de IgG de conejo como analito, utilizando una IgG anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina y BluePhos como el sustrato de fosfatasa. Los resultados se proporcionan en la FIG. 10 y la FIG. 11. Las mediciones con los dos dispositivos se realizaron a 654 nm. Se muestra la línea de ajuste óptimo mediante regresión lineal (coeficiente de correlación de 0,998, pendiente

de 1,01, interceptación-y de 0,08). Las barras de errores son desviaciones estándar de mediciones de tres micropocillos diferentes.

5 En este ensayo, en el que el producto colorimétrico es una disolución homogénea en el micropocillo, los dos métodos de detección resultaron en una concordancia casi perfecta (coeficiente de correlación de 0,998). Así, la no homogeneidad de la deposición de plata sobre la superficie puede haber contribuido a la concordancia imperfecta entre los dos métodos de medición, de manera que diferentes partes del mismo pocillo fueron muestreadas por el diodo láser y por el lector de placas (coeficiente de correlación de 0,996).

10 Ejemplo 5

En la FIG. 9 se proporciona una representación esquemática de una realización y un dispositivo de detección óptico. (A) Luz roja procedente del diodo láser atraviesa el micropocillo revestido con plata que contiene la muestra hacia el CI óptico. Se utilizó un poro para bloquear la luz parásita que no atravesaba la muestra. El diodo láser y el
15 CI óptico fueron accionados por el mismo circuito, que también tenía una pantalla de cristal líquido integrada que mostraba el valor de transmitancia medido.

Ejemplo 6

20 La FIG. 10 proporciona una comparación de lecturas de un inmunoensayo utilizando un CI óptico y un lector de placas visible a UV. Se realizó un inmunoensayo utilizando la reducción de plata en una placa de 96 pocillos que detectaba IgG de conejo. Para cada una de las muestras se muestran microfotografías ópticas de las películas de plata sobre los micropocillos. La absorbancia aparente de cada uno de los pocillos se midió mediante un CI óptico y se comparó con su lectura por parte de un lector de placas visible a UV; ambas mediciones se realizaron a 654
25 nm. La línea de ajuste óptimo mediante regresión lineal tiene un coeficiente de correlación de 0,989, una pendiente de 1,12 y una interceptación y de 0,16.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método que comprende:
 - proporcionar un primer y un segundo fluidos mantenidos separados uno de otro mediante un tercer fluido en un recipiente común, sellado, en donde el tercer fluido es sustancialmente inmiscible con el primer y segundo fluidos, y en donde el primer, segundo y tercer fluidos se almacenan dentro del recipiente común, sellado durante al menos un día;
 - disponer el recipiente en comunicación de fluidos con un dispositivo que comprende un sitio de reacción;
 - transferir el primer, tercer y segundo fluidos en serie desde el recipiente al sitio de reacción para llevar a cabo una reacción química o bioquímica predeterminada mediante la aplicación de un vacío en un lado aguas abajo del sitio de reacción; y
 - evitar el contacto entre el primer y el segundo fluidos, al menos hasta que los fluidos hayan sido aplicados al sitio de reacción.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que el recipiente comprende un tubo, preferiblemente en el que el tubo tiene:
 - (a) una relación de longitud a diámetro interno de al menos 10:1; o
 - (b) un diámetro interno menor que 5 milímetros, menor que 1 milímetro, menor que 500 micras, menor que 200 micras o menor que 100 micras.
- 3.- El método de la reivindicación 1, en el que el primer y segundo fluidos se transfieren en serie al sitio de reacción sin accionar una válvula.
- 4.- El método de la reivindicación 1, en el que el tercer fluido es un gas o una mezcla gaseosa.
- 5.- El método de la reivindicación 4, en el que el segundo fluido es una disolución de aclarado.
- 6.- El método de la reivindicación 1, que comprende, además, disponer una muestra en el dispositivo antes de aplicar el primer y segundo fluidos al sitio de reacción.
- 7.- El método de la reivindicación 1, en el que uno de los fluidos comprende:
 - (a) un anticuerpo conjugado con oro o
 - (b) un precursor de metal.
- 8.- El método de la parte b) de la reivindicación 7, que comprende, además, depositar de forma no electrolítica:
 - (a) metal al sitio de reacción para producir un material opaco, preferiblemente que comprende determinar la absorbancia o transmisión de la luz a través del material opaco; o
 - (b) un metal y determinar una propiedad eléctrica del metal.
- 9.- El método de la reivindicación 1, en el que:
 - (a) el método no utiliza energía eléctrica,
 - (b) el recipiente está constituido por polietileno, polipropileno o PTFE, o
 - (c) al menos uno de un anticuerpo o un antígeno está asociado con el sitio de reacción.
- 10.- El método de la reivindicación 1, que comprende, además:
 - (a) permitir que un componente del primer fluido se asocie con el sitio de reacción; y
 - (b) permitir que un componente del segundo fluido se asocie con el componente del primer fluido.
- 11.- El método de la reivindicación 1, en el que el primer fluido comprende:
 - (i) uno de un anticuerpo o antígeno y el segundo fluido comprende el otro de un anticuerpo o antígeno;
 - (ii) un anticuerpo conjugado con oro y el segundo fluido comprende un precursor de metal; o
 - (iii) un anticuerpo y el segundo fluido comprende una entidad de señalización.
- 12.- Un aparato, que comprende:
 - un dispositivo que comprende un sitio de reacción;
 - un recipiente sellado;
 - un primer fluido estático dispuesto en el recipiente sellado;
 - un segundo fluido estático dispuesto en el recipiente sellado; y
 - un tercer fluido estático dispuesto en el recipiente sellado, en donde el tercer fluido está junto a y es sustancialmente inmiscible tanto con el primer como con el segundo fluidos y separa el primer y segundo fluidos, y

al menos el primer y segundo fluidos se seleccionan para uso en una reacción química o biológica predeterminada en una secuencia predeterminada,

y en donde el recipiente y el primer, segundo y tercer fluidos se seleccionan de modo que el recipiente y los fluidos dispuestos en su interior puedan ser almacenados durante un período de al menos un día y puedan ser manipulados bajo condiciones de empaquetamiento y transporte normales al tiempo que mantienen a los fluidos en posiciones predeterminadas en relación uno con otro dentro del recipiente, sin perjuicio de la capacidad de los fluidos de participar en la reacción química o biológica predeterminada, y en donde el primer, segundo y tercer fluidos se construyen y disponen de modo que puedan ser suministrados desde el recipiente a un sitio de reacción de modo que se evite el contacto entre el primer y segundo fluidos, al menos hasta que los fluidos hayan sido aplicados al sitio de reacción; y

una fuente de vacío situada en un lado aguas abajo del sitio de reacción y adaptada y dispuesta para transportar los primero, tercero y segundo fluidos desde el recipiente al sitio de reacción.

13.- El aparato de la reivindicación 12, en donde el primer y segundo fluidos son líquidos.

14.- El aparato de la reivindicación 13, en donde el tercer fluido es un gas o una mezcla gaseosa, preferiblemente en donde el tercer fluido es aire o nitrógeno.

15.- El aparato de la reivindicación 12, que comprende, además, fluidos distintos adicionales, preferiblemente en donde los fluidos distintos adicionales son del mismo tipo que el primer fluido o el segundo fluido.

16.- El aparato de la reivindicación 12, en donde al menos uno del primer fluido o el segundo fluido comprende:

(a) un agente químico o bioquímico, o

(b) una disolución de aclarado.

17.- El aparato de la reivindicación 12, en donde el recipiente:

(a) está constituido por un material polimérico, preferiblemente en donde el material polimérico se selecciona de polietileno, polipropileno y PTFE; o

(b) es sellable por calor.

18.- El aparato de la reivindicación 12, en donde al menos uno del primer y segundo fluidos contiene una especie capaz de participar en:

(a) un ensayo biológico o químico; o

(b) un ensayo biológico, y el tercer fluido es inerte con respecto al ensayo y se selecciona para separar el primer y segundo fluidos y para evitar que se mezclen.

19.- El aparato de la reivindicación 12, en donde el recipiente es un tubo que tiene una relación de longitud a diámetro interno de al menos 10:1, preferiblemente en donde el tubo es contorneado.

20.- El aparato de la reivindicación 12, en donde el recipiente sellado se construye y dispone para almacenar el primer y segundo fluidos durante al menos una semana, o un año antes del uso del primer y segundo fluidos en la reacción química o biológica predeterminada.

21.- El método de la reivindicación 1, en el que el primer, segundo y tercer fluidos se almacenan con el recipiente común a una temperatura igual a o menor que 4 grados C; o al menos uno de los fluidos se congela.

22.- Un método según la reivindicación 1, que comprende aplicar el primer y segundo fluidos al sitio de reacción procedente del recipiente sin la acción de un componente del recipiente.

23.- El método de la reivindicación 1, en el que el recipiente comprende al menos primera y segunda ramas que están en comunicación de fluidos una con otra y con el interior restante del recipiente.

24.- El método de la reivindicación 1, en el que el recipiente es un tubo que comprende una rama en forma de Y, en donde cada una de las ramas de la rama en forma de Y contiene un fluido que reacciona con el fluido en la otra rama para formar un fluido adicional.

25.- El método de la reivindicación 1, que comprende, además, hacer pasar una muestra a través del sitio de reacción antes del inicio de la etapa de transferencia.

26.- El método de la reivindicación 1, que comprende disponer una muestra que comprende un componente de la

muestra en el dispositivo antes de aplicar el primer y segundo fluidos al sitio de reacción, permitiendo que el componente de la muestra se una con un participante de la unión dispuesto en el sitio de reacción, y haciendo fluir un precursor de metal a través del sitio de reacción; opcionalmente, en el que el precursor de metal comprende una disolución de sal metálica.

5 27.- El método de la reivindicación 26, que comprende formar una capa opaca y medir la absorbancia o transmitancia de la luz a través de la capa opaca.

10 28.- El método de la reivindicación 26, que comprende permitir a un coloide metálico asociarse con el componente de la muestra.

29.- El aparato de la reivindicación 13, en el que el primer fluido comprende un coloide metálico y el segundo fluido comprende un precursor de metal.

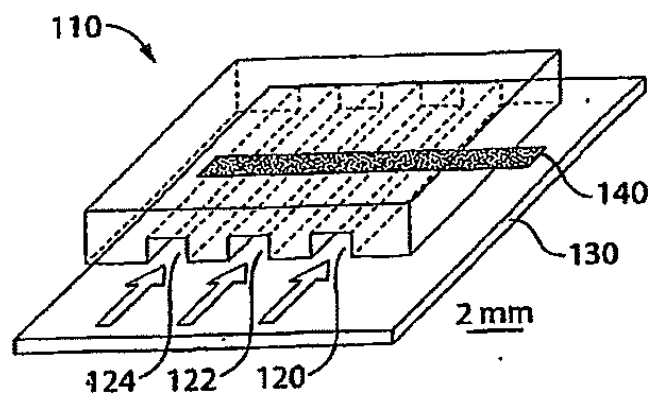


Fig. 1

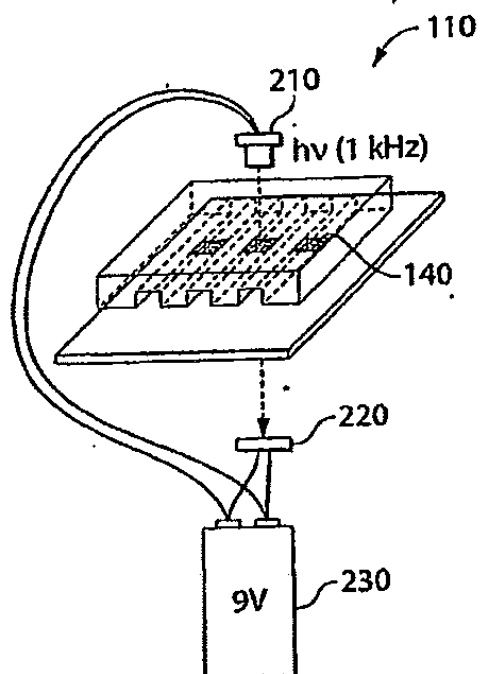


Fig. 2

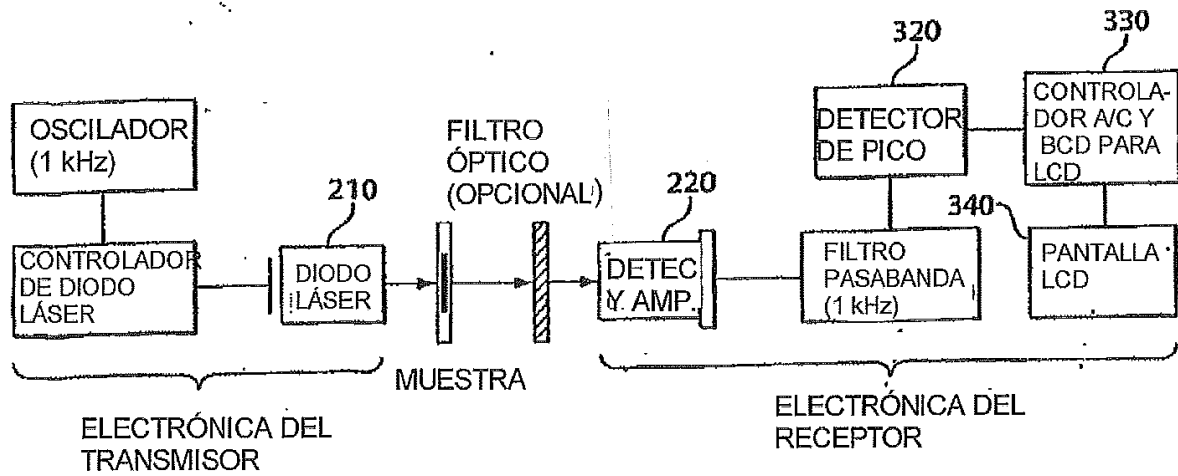


Fig. 3

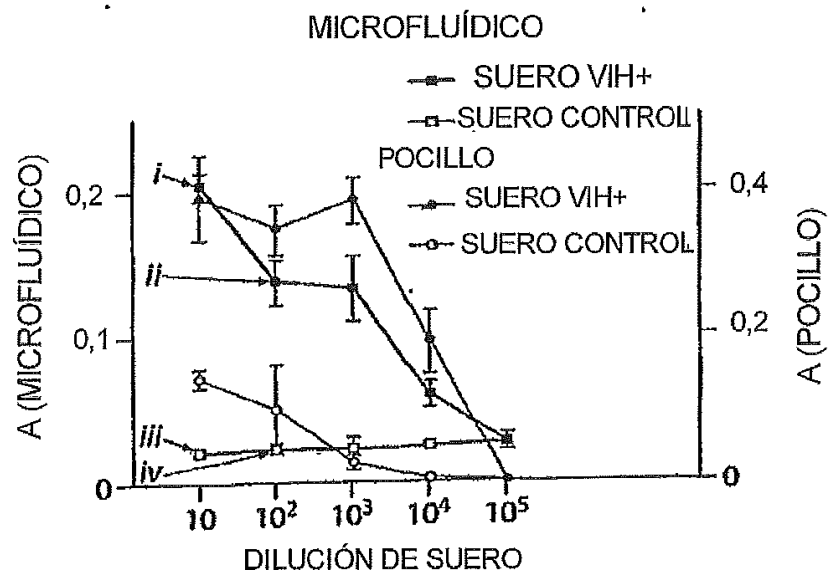


Fig. 4

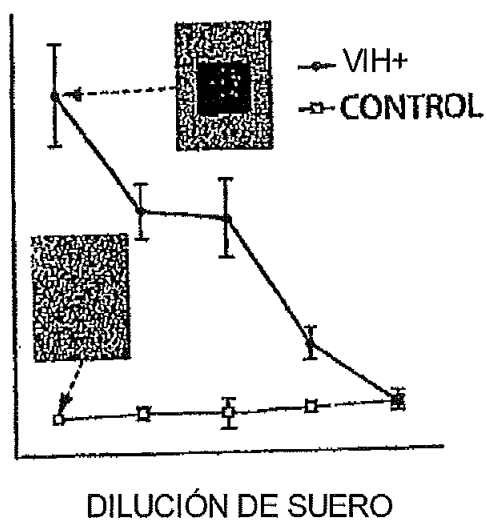


Fig. 5

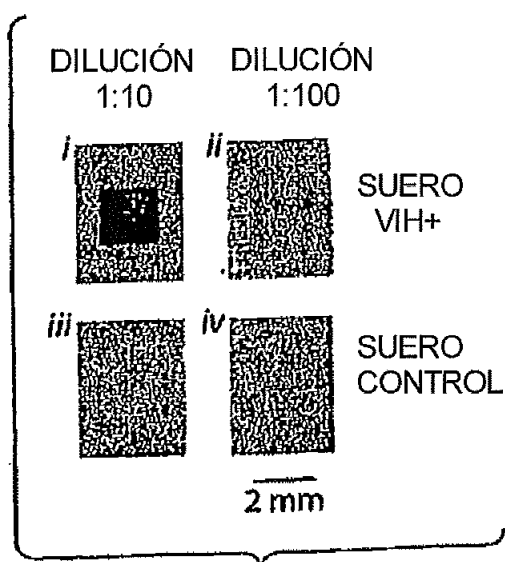


Fig. 6

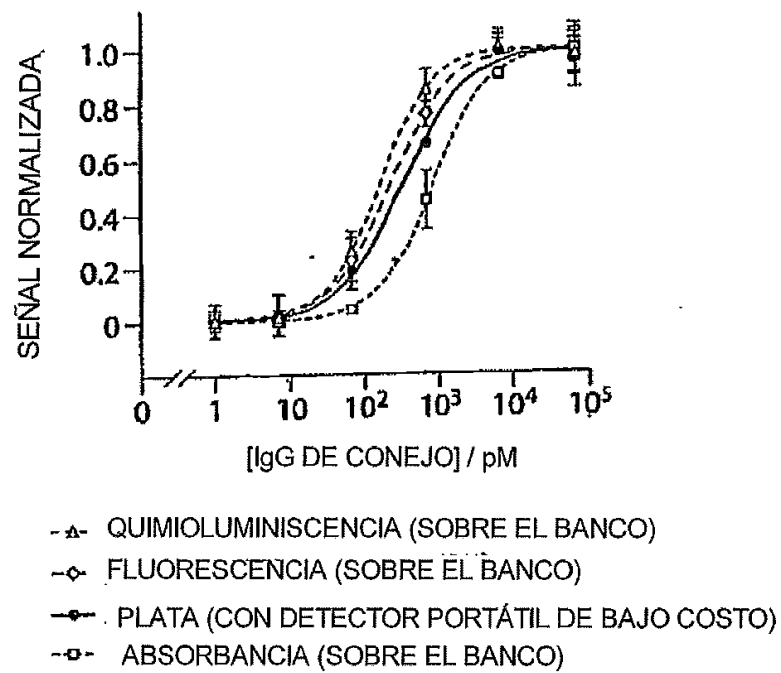


Fig. 7

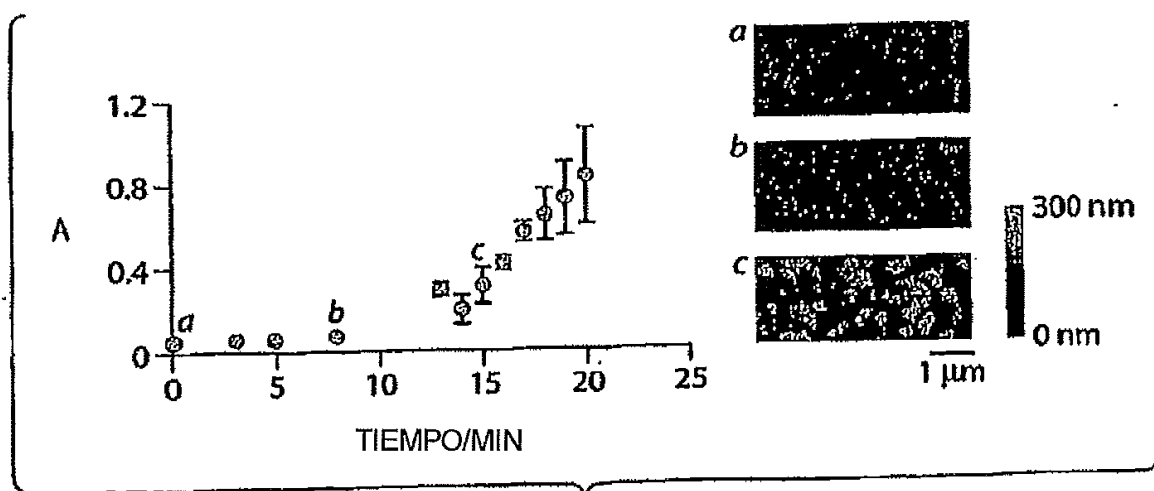


Fig. 8

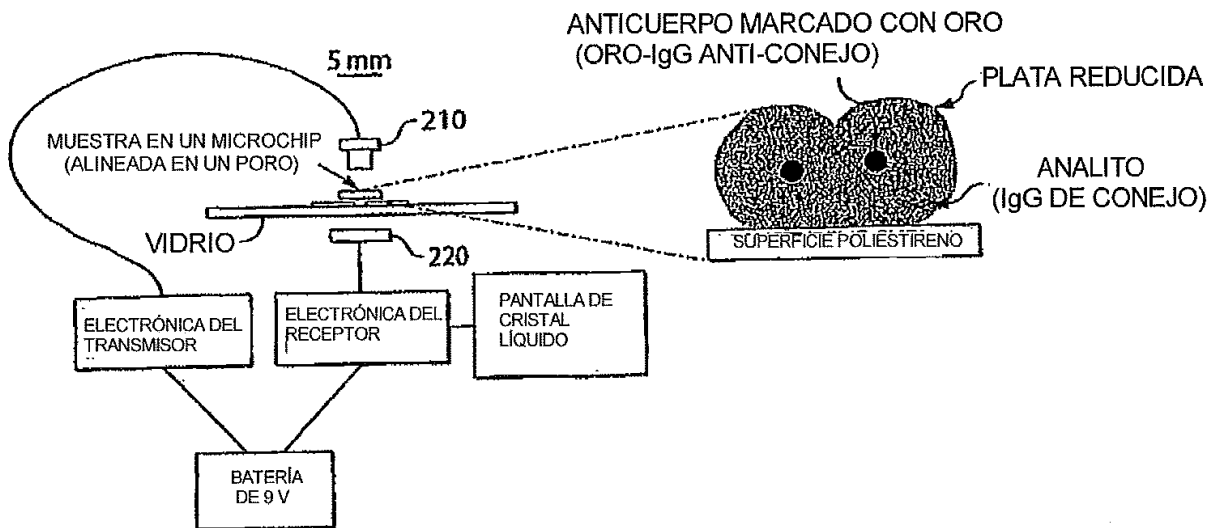


Fig. 9

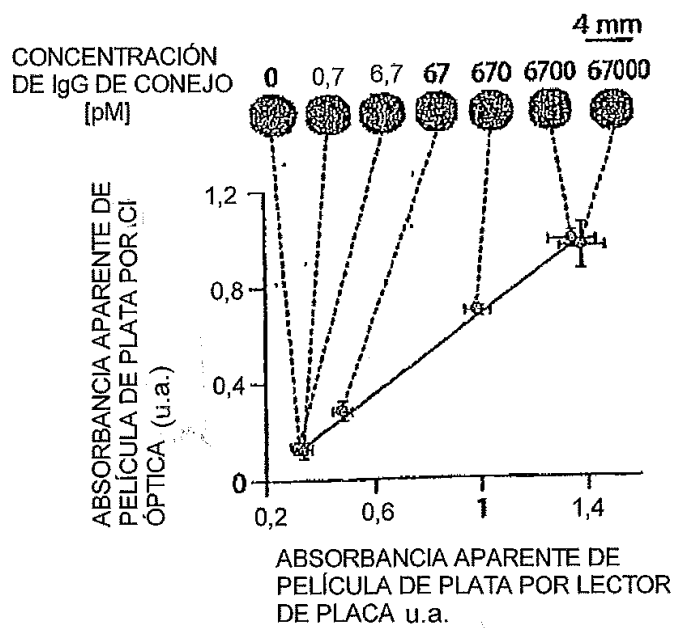


Fig. 10

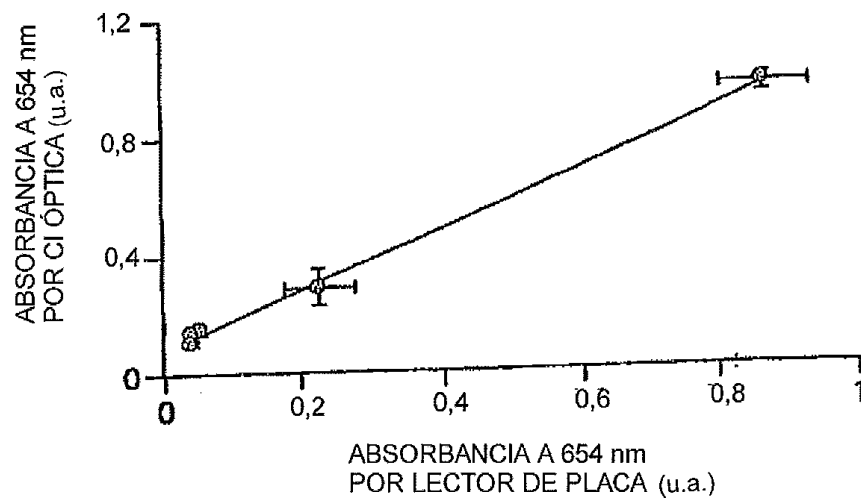


Fig. 11

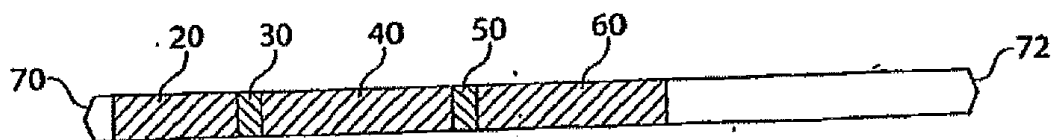


Fig. 12

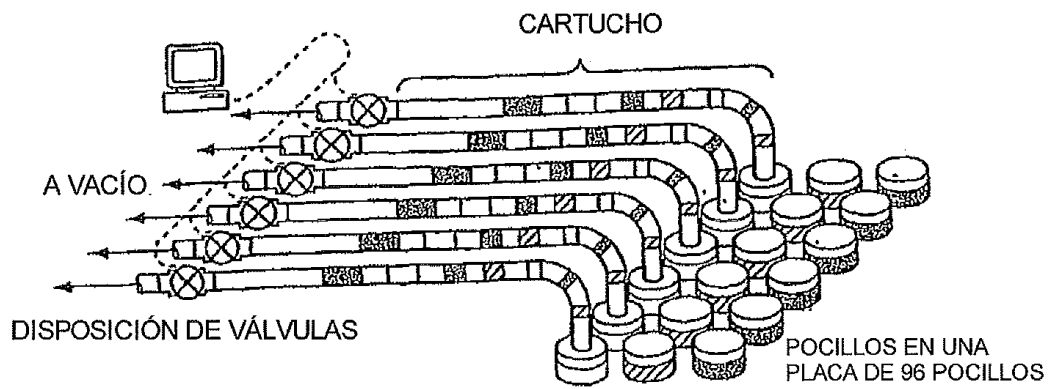


Fig. 13

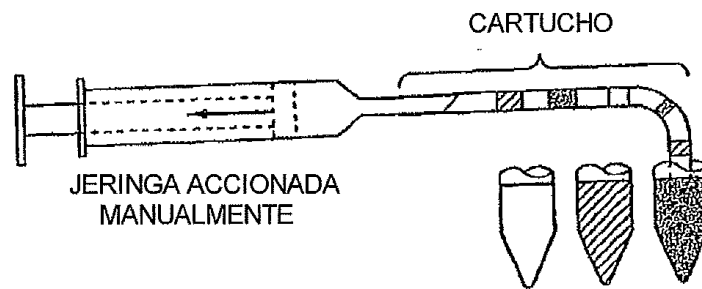


Fig. 14

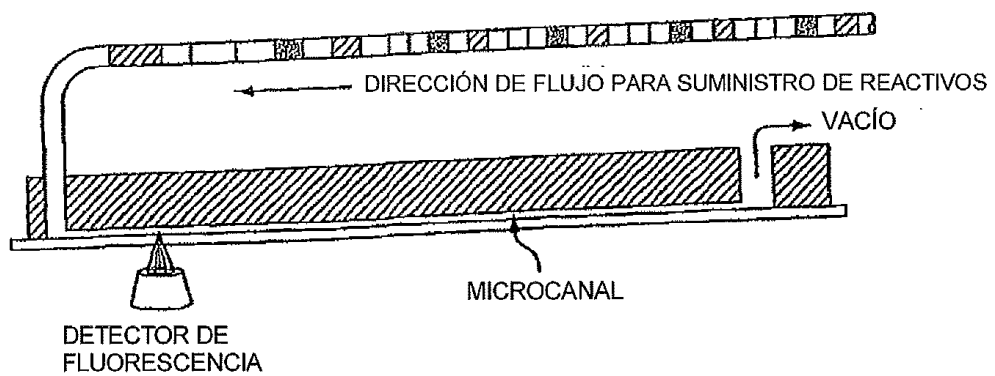


Fig. 15

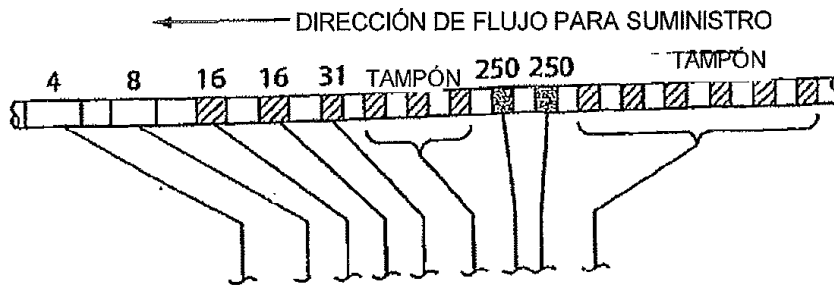


Fig. 16A

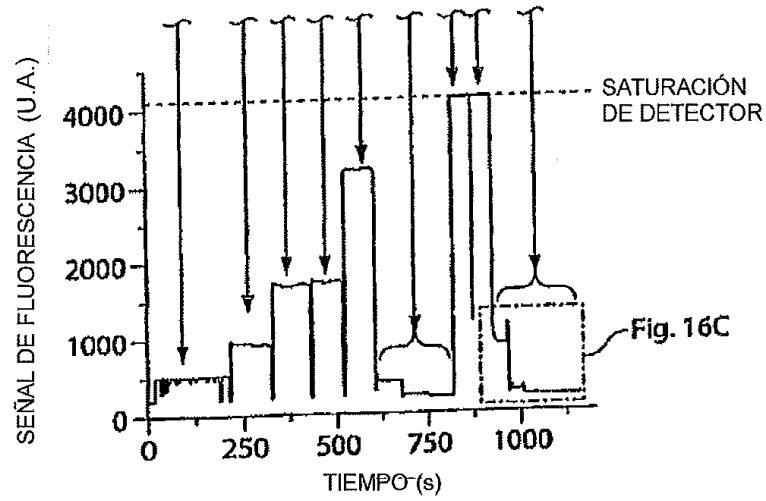


Fig. 16B

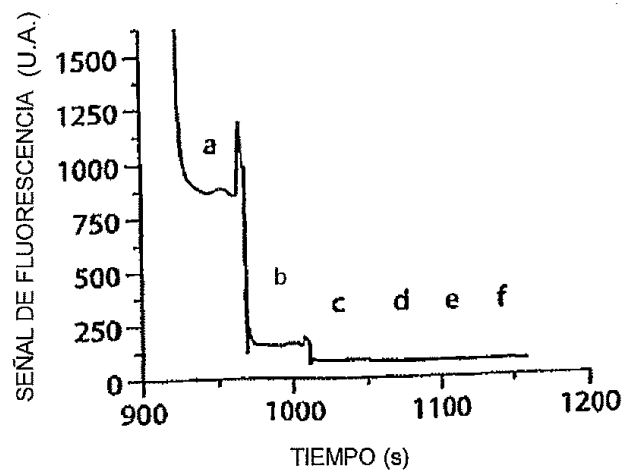


Fig. 16C

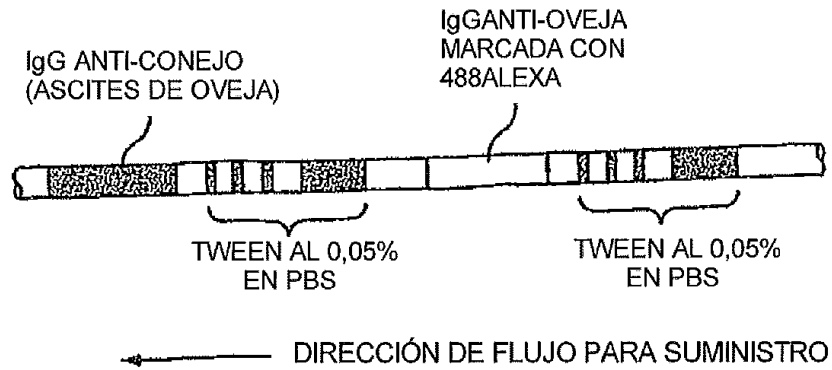


Fig. 17

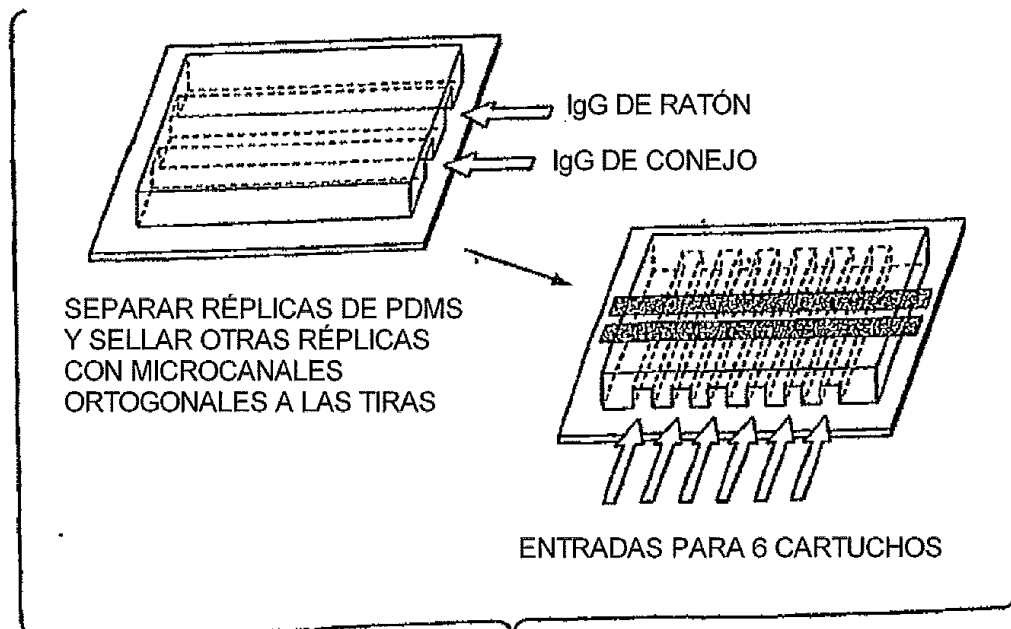


Fig. 18

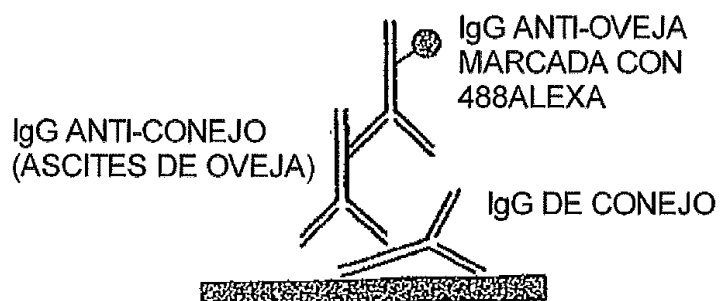


Fig. 19

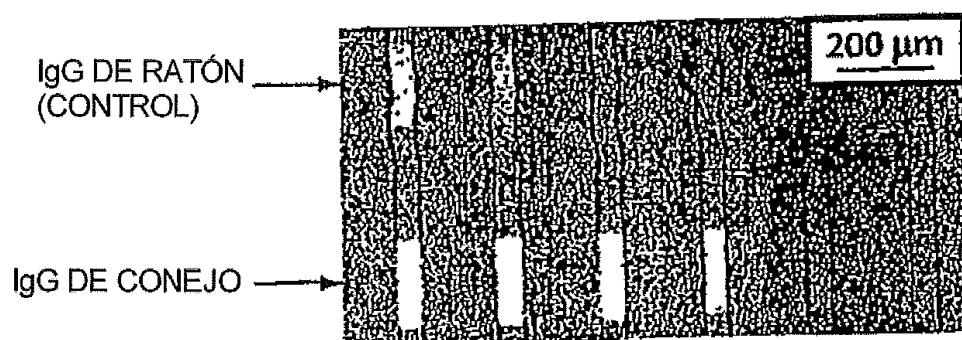


Fig. 20

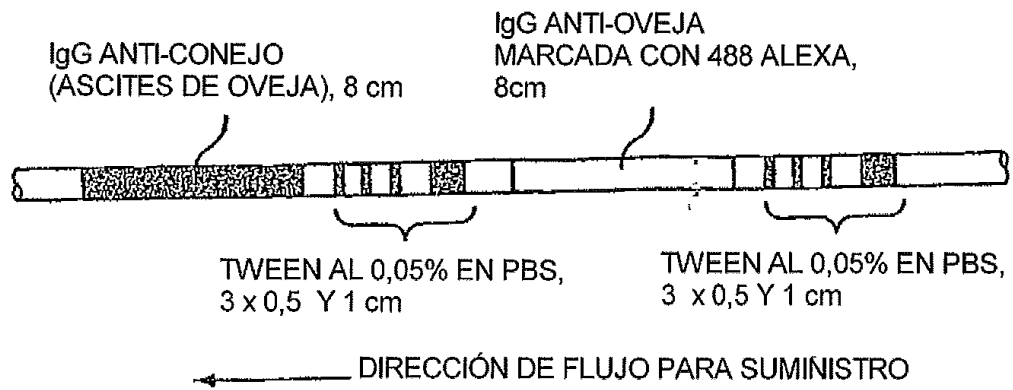


Fig. 21

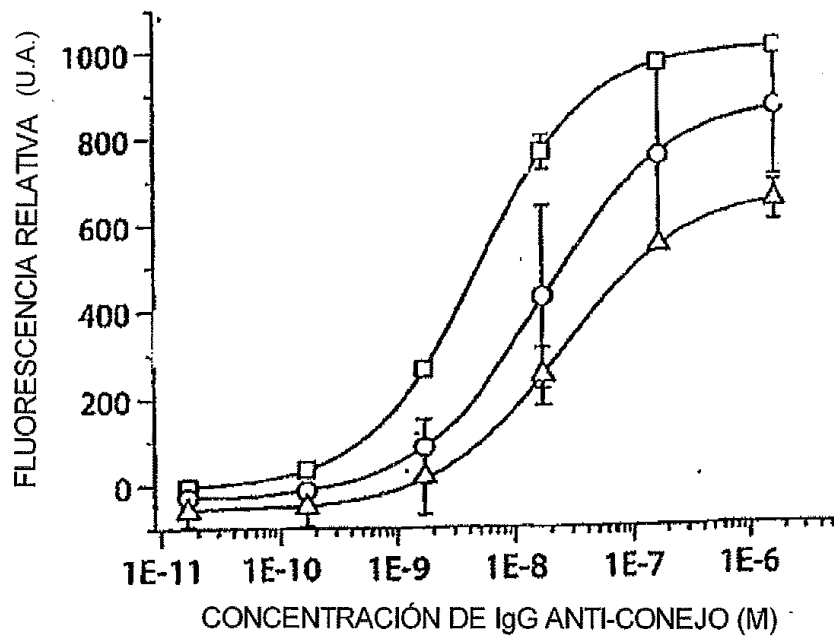
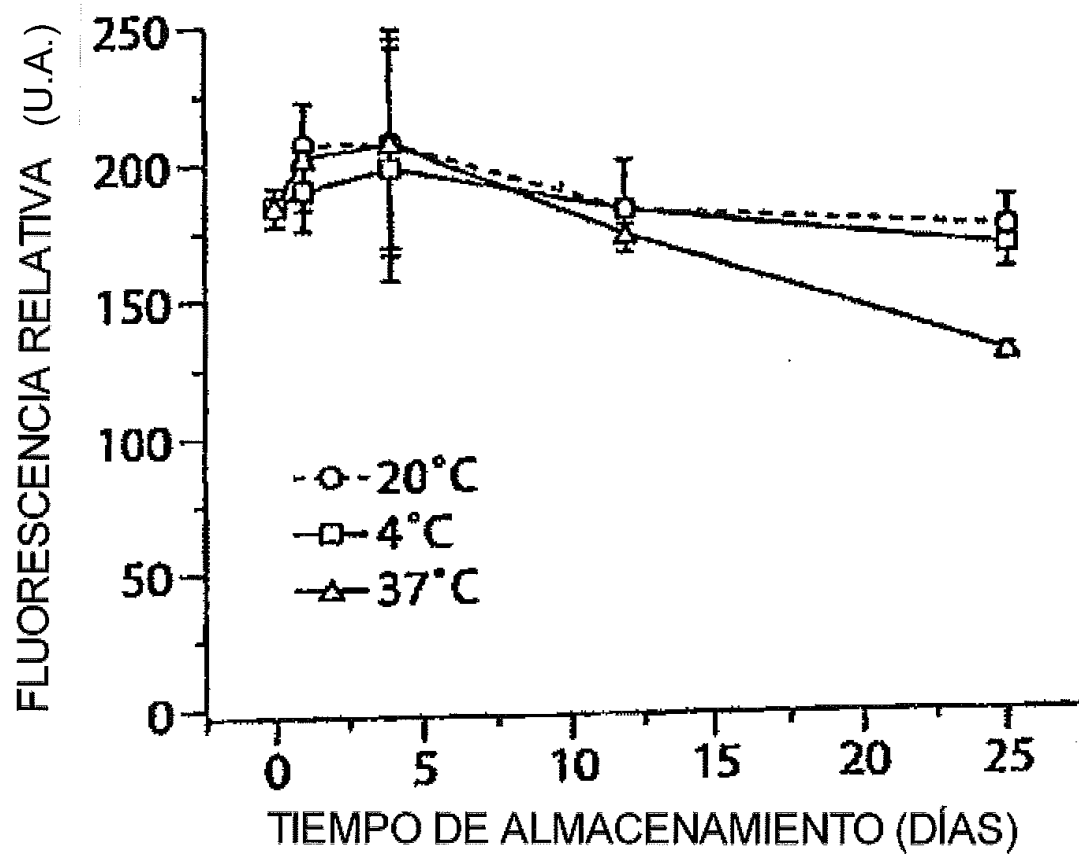


Fig. 22

**Fig. 23**