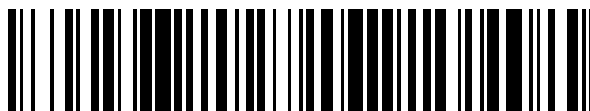


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 128**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/00** (2006.01)

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01L 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2008 PCT/US2008/008640**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2009 WO09054870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2008 E 08843060 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2179025**

54 Título: **Aparato integrado para efectuar la extracción de ácidos nucleicos y la comprobación diagnóstica sobre múltiples muestras biológicas**

30 Prioridad:

**13.07.2007 US 959437 P**

**14.11.2007 US 985577**

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

**26.04.2017**

73 Titular/es:

**HANDYLAB, INC. (100.0%)**

**1 Becton Drive**

**Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, JEFF;**

**WILSON, KERRY y**

**HANDIQUE, KALYAN**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 610 128 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

Aparato integrado para efectuar la extracción de ácidos nucleicos y la comprobación diagnóstica sobre múltiples muestras biológicas

5

Ámbito técnico

La tecnología descrita en la presente memoria se refiere generalmente a sistemas para extraer polinucleótidos de múltiples muestras, particularmente de muestras biológicas, y adicionalmente, a sistemas que posteriormente amplifican y detectan los polinucleótidos extraídos. La tecnología se refiere más en particular a sistemas microfluídicos que ejecutan PCR en múltiples muestras de nucleótidos de interés en canales microfluídicos, y detectan dichos nucleótidos.

10

Antecedentes

15

El sector del diagnóstico médico es un elemento fundamental de la infraestructura sanitaria actual. No obstante, los análisis de diagnósticos *in vitro* se han convertido en la actualidad en un cuello de botella en la atención al cliente, independientemente de lo habituales que sean. Los motivos para ello son muy diversos. En primer lugar, muchos análisis diagnósticos tan solo pueden realizarse con equipos muy especializados que tienen un coste elevado y que tan solo pueden utilizarlos clínicos formados. Tales equipos se encuentran normalmente en pocos lugares – frecuentemente solo uno en determinadas zonas urbanas, lo que significa que la mayoría de hospitales tiene que enviar las muestras para ser analizadas a dichos lugares, de manera que incurren en gastos de envío y en demoras producidas por el transporte e, incluso, en la pérdida de las muestras o en la inadecuada manipulación de las mismas. En segundo lugar, el equipo en cuestión normalmente no estará disponible "a demanda", sino que habrá que utilizarlo por lotes, produciéndose así demoras en el procesamiento de muchas muestras, ya que hay que esperar a llenar la máquina antes de poder efectuar el análisis.

20

25

Al comprender que el flujo de muestras se divide en diversos pasos clave, es deseable considerar formas para automatizar tantos pasos como sea posible. Por ejemplo, una muestra biológica, tras ser extraída de un paciente, debe ponerse en la forma adecuada para someterla a un régimen de procesamiento que normalmente implica utilizar la PCR para amplificar un vector (tal como un nucleótido) de interés. Una vez amplificado, debe determinarse sin ambigüedades la presencia de dicho nucleótido de interés en la muestra. Actualmente, la preparación de muestras para la PCR es una tarea intensiva que requiere mucho tiempo, pero que no requiere habilidades especializadas y podría automatizarse convenientemente. Por el contrario, pasos tales como la utilización de la PCR y la detección de nucleótidos (o "determinación de ácido nucleico") han estado tradicionalmente al alcance de personas especialmente formadas con acceso a equipos especializados.

30

35

Existe la necesidad de contar con un método y un aparato para ejecutar la preparación de las muestras en paralelo, con o sin PCR, y la detección en las muestras biológicas preparadas, preferiblemente, con un rendimiento elevado, pero de modo que pueda realizarse de forma rutinaria en el punto de atención, sin necesidad de enviar la muestra a unas instalaciones especializadas.

40

La solicitud de patente estadounidense con número de publicación US 2004/0029260 describe un sistema y un método para aislar, amplificar y detectar ácidos nucleicos diana para diagnosticar enfermedades. El sistema integra una pipeta, un extractor, un lector de ensayos y un brazo robótico articulado.

45

Se incluye una discusión de los antecedentes para explicar el contexto de las invenciones aquí descritas. No debe interpretarse como la admisión de que los materiales a los que se hace referencia hayan sido publicados, conocidos, o formen parte del conocimiento general en la fecha de prioridad de las reivindicaciones anexas.

50

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones de la especificación la palabra "comprende" y variaciones tales como "que comprende" y "comprendiendo", no pretende excluir otros aditivos, componentes, enteros o pasos.

Resumen

55

La invención se define en las reivindicaciones independientes a las que ahora se hace referencia. Las características preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

60

Según un aspecto de la presente invención, un aparato de diagnóstico comprende un primer módulo configurado para extraer ácido nucleico simultáneamente de una pluralidad de muestras que contienen ácido nucleico. El primer módulo comprende una gradilla extraíble, comprendiendo la gradilla una pluralidad de carriles paralelos. Cada carril comprende un soporte paralelo y está configurada para recibir un tubo de muestras extraíble junto al soporte extraíble en correspondencia biunívoca con el soporte extraíble. Cada tubo de muestras está configurado para recibir una de la pluralidad de muestras. Cada soporte comprende una cámara de proceso, una cámara para residuos, una o más puntas de pipeta, y uno o más receptáculos. Dichos uno o más receptáculos contienen,

65

respectivamente, cantidades suficientes de uno o más reactivos para realizar la extracción de ácido nucleico de una muestra. La gradilla extraíble puede introducirse y extraerse del aparato de diagnóstico para permitir la carga de muestras en los tubos de muestra y de los soportes correspondientes en la gradilla antes de introducirlo en el aparato de diagnóstico. El primer módulo comprende además un separador magnético configurado para mover uno o más imanes sujetos a un elemento de soporte. El separador magnético comprende un mecanismo motorizado para mover el elemento de soporte de modo que dichos uno o más imanes se mueven hacia atrás y hacia adelante a lo largo de un eje fijo con proximidad a la cámara de proceso de cada soporte colocado en la gradilla. El primer módulo comprende además un conjunto de calentamiento. El conjunto de calentamiento comprende una pluralidad de unidades de calentamiento independientemente controlables, cada una de las cuales está configurada para recibir y calentar la cámara de procesos de uno de la pluralidad de soportes situados en la gradilla. El primer módulo comprende, además, circuitos de control para controlar el mecanismo motorizado y para controlar el calentamiento de las unidades de calentamiento, y un dispensador de líquido configurado para ejecutar operaciones de transferencia de fluidos en dos o más soportes situados en la gradilla, simultáneamente. El aparato de diagnóstico comprende, además, un segundo módulo configurado para amplificar simultáneamente el ácido nucleico extraído de la pluralidad de muestras. El segundo módulo comprende uno o más compartimentos de cartucho, comprendiendo cada compartimento de cartucho al menos una fuente de calor y configurados para recibir un cartucho microfluídico. El cartucho está configurado para recibir por separado y para amplificar por separado el ácido nucleico extraído de la pluralidad de muestras. El segundo módulo comprende además uno o más sistemas de detección.

20 También se describe:

Un aparato de diagnóstico, que comprende: un primer módulo configurado para extraer ácido nucleico simultáneamente de una pluralidad de muestras que contienen ácido nucleico, en donde el primer módulo comprende: una o más gradillas, cada una de ellas configurada para recibir un número de muestras y el correspondiente número de soportes, en donde cada uno de los soportes comprende una cámara de proceso, una cámara de residuos, una o más puntas de pipeta, y uno o más receptáculos, en donde dichos uno o más receptáculos contienen, respectivamente, cantidades suficientes de uno o más reactivos para realizar la extracción de ácido nucleico de una muestra; un separador magnético configurado para moverse en relación con la cámara de procesos de cada soporte; un conjunto de calentamiento configurado para calentar independientemente cada cámara de procesos; y un dispensador de líquido configurado para efectuar operaciones de transferencia de fluidos en dos o más soportes simultáneamente; y un segundo módulo configurado para amplificar simultáneamente el ácido nucleico extraído de la pluralidad de muestras, en donde el segundo módulo comprende: uno o más compartimentos, cada uno de ellos configurado para recibir un cartucho microfluídico, en donde el cartucho está configurado para recibir por separado y para amplificar por separado el ácido nucleico extraído de múltiples muestras; y uno o más sistemas de detección.

Un aparato de diagnóstico que comprende: una o más gradillas, en cada uno de los cuales se monta un número de muestras que contienen ácido nucleico y el correspondiente número de soportes, en donde cada soporte comprende una cámara de proceso, una cámara de residuos, una o más puntas de pipeta, y uno o más receptáculos, en donde dichos uno o más receptáculos contienen, respectivamente, cantidades suficientes de uno o más reactivos para efectuar la extracción de ácido nucleico de una muestra; un separador magnético que puede moverse desde una primera posición a una segunda posición adyacente a la cámara de proceso de cada uno de dichos uno o más soportes; un conjunto de calentamiento que comprende un número de unidades de calentamiento, cada una de las cuales está en contacto térmico con una cámara de procesos; uno o más compartimentos, teniendo cada compartimento una forma complementaria a la forma de un cartucho microfluídico, en donde el cartucho comprende un número de entradas cada una de las cuales está en comunicación fluida con uno de una serie de canales en los que se amplifica el ácido nucleico extraído de una de la serie de muestras, y en donde el cartucho comprende además una o más ventanas que permiten la detección de ácido nucleico amplificado; un dispensador de líquido con uno o más cabezales dispensadores, en donde el dispensador de líquido puede moverse desde una primera posición sobre un primer soporte a una segunda posición sobre un segundo soporte, y puede moverse desde la primera posición sobre el primer soporte a una posición diferente encima del primer soporte y, además, puede moverse desde una posición sobre uno de los soportes a una posición sobre una de la serie de entradas; y uno o más sistemas de detección colocados cerca de dicha una o más ventanas.

Un instrumento de diagnóstico que comprende: una unidad de manipulación de líquido que extrae ácido nucleico de una muestra en una tira de reactivos individual; un cartucho microfluídico que, junto con el elemento de calentamiento, efectúa la PCR en tiempo real sobre el ácido nucleico extraído de la muestra; y un detector que proporciona al usuario un diagnóstico sobre si la muestra contiene nucleótidos de interés.

En la presente memoria también se describen métodos para utilizar el aparato de diagnóstico, que incluyen un método para diagnosticar una serie de muestras en paralelo, utilizando el aparato.

Un soporte para reactivos individual, que comprende: una tira, a la que se sujeta: un único tubo de procesos; uno o más receptáculos, cada uno de los cuales contiene un reactivo seleccionado del grupo formado por: un reactivo para preparación de muestras, reactivo para la PCR para un primer analito, y uno o más reactivos líquidos; un tubo de

recogida de residuos; uno o más casquillos configurados para sostener una o más puntas de pipeta; y una funda para puntas de pipeta configurada para rodear una o más puntas de pipeta.

5 Un dispensador de líquido, que comprende: uno o más sensores; un colector; una o más bombas en comunicación fluida con el colector; uno o más cabezales dispensadores en comunicación fluida con el colector; un brazo pórtico que proporciona libertad de movimiento de traslación en tres dimensiones; y conexiones eléctricas que reciben las señales eléctricas de un controlador externo, en donde el dispensador de líquido no tiene ninguna entrada ni salida de fluidos, salvo a través de dicha una o más bombas.

10 Un separador para las partículas magnéticas, que comprende: uno o más imanes alineados de forma lineal; un eje motorizado sobre el cual dicho uno o más imanes pueden subir o bajar de modo que dicho uno o más imanes consiguen aproximarse a dicho uno o más receptáculos que contienen partículas magnéticas; y circuitos de control para controlar el movimiento del eje motorizado.

15 Un separador y calentador integrados, que comprenden: un conjunto de calentamiento, en donde el conjunto de calentamiento comprende una pluralidad de unidades de calentamiento independientemente controlables, cada una de las cuales está configurada para recibir y para calentar una cámara de procesos; uno o más imanes alineados linealmente; un eje motorizado sobre el que pueden subirse o bajarse uno o más imanes de modo que dicho uno o más imanes se aproxima a una o más cámaras de procesos; y circuitos de control para controlar el movimiento del eje motorizado y el calentamiento de las unidades de calentamiento .

20 Un aparato preparatorio que comprende: un primer módulo configurado para extraer ácido nucleico simultáneamente de una serie de muestras que contienen ácido nucleico, en donde el primer módulo comprende: una o más gradillas, cada uno de los cuales está configurado para recibir la serie de muestras y la correspondiente serie de soportes, en donde cada soporte comprende una cámara de procesos, una cámara de residuos, una o más puntas de pipeta, y uno o más receptáculos, en donde dichos uno o más receptáculos contienen, respectivamente, cantidades suficientes de uno o más reactivos para efectuar la extracción de ácido nucleico de una muestra; un separador magnético configurado para moverse respecto a la cámara de procesos de cada soporte; un conjunto de calentamiento configurado para calentar independientemente cada cámara de procesos; y un dispensador de líquido configurado para realizar operaciones de transferencia de fluidos en dos o más soportes simultáneamente; y un segundo módulo configurado para recibir y para almacenar el ácido nucleico extraído de la serie de muestras.

25 Un aparato preparatorio que comprende: una o más gradillas, en cada uno de los cuales está montada una serie de muestras que contienen ácido nucleico y una serie correspondiente de soportes, en donde cada soporte comprende una cámara de procesos, una cámara de residuos, una o más puntas de pipeta, y uno o más receptáculos, en donde dichos uno o más receptáculos contienen, respectivamente, cantidades suficientes de uno o más reactivos para efectuar la extracción de ácido nucleico de una muestra; un separador magnético que puede moverse desde una primera posición a una segunda posición situada junto a la cámara de procesos de cada soporte; un conjunto de calentamiento que comprende una serie de unidades de calentamiento, cada una de las cuales está en contacto con una cámara de procesos; un dispensador de líquido móvil desde una primera posición sobre un primer soporte a una segunda posición sobre un segundo soporte; y un compartimento de almacenamiento con una serie de compartimentos, en donde cada compartimento almacena el ácido nucleico extraído de una de dicha serie de muestras.

35 Un soporte para reactivos individual, que comprende: una tira, a la que se sujeta: un único tubo de procesos; uno o más receptáculos, cada uno de los cuales contiene un reactivo seleccionado del grupo formado por: un reactivo para preparación de muestras, y uno o más reactivos líquidos; un tubo de recogida de residuos; uno o más casquillos configurados para sostener una o más puntas de pipeta; y una funda para puntas de pipeta configurada para rodear una o más puntas de pipeta.

40 Adicionalmente, la presente tecnología incluye un proceso para extraer ácido nucleico de múltiples muestras en paralelo, utilizando el aparato tal y como se describe en esta memoria.

45 Breve descripción de dibujos seleccionados

50 La FIG. 1A muestra una vista esquemática de un aparato preparatorio; la FIG. 1B muestra una vista esquemática de un aparato de diagnóstico.

55 La FIG. 2 muestra una vista esquemática de los circuitos de control.

60 Las FIG. 3A y 3B muestran una vista exterior de un aparato ejemplar.

La FIG. 4 muestra una vista interior ejemplar de un aparato.

65 La FIG. 5 muestra vistas en perspectiva de una gradilla ejemplar para soportes de muestras.



- La FIG. 6 muestra vistas en perspectiva de la gradilla la FIG. 5 junto con una unidad de calentamiento.
- 5 La FIG. 7 muestra una vista en perspectiva de una gradilla ejemplar para soportes de muestras.
- Las FIG. 8A - 8K muestran diversas vistas de la gradilla de la FIG. 7.
- La FIG. 9 muestra una zona de un aparato configurado para recibir una gradilla de la FIG. 7.
- 10 Las FIG. 10A y 10B muestran una vista en perspectiva (FIG. 10A) y una vista inferior (FIG. 10B) de una primera realización ejemplar de un soporte para reactivos con una funda de pipeta.
- La FIG. 11 muestra una vista en perspectiva de una realización ejemplar de un soporte para reactivos sin funda de pipeta.
- 15 Las FIG. 12A - 12C muestran una vista en perspectiva (FIG. 12A), una vista transversal (FIG. 12B), y una vista en despiece (FIG. 12C) de una segunda realización ejemplar de un soporte para reactivos con funda de pipeta.
- 20 Las FIG. 13A y 13B muestran una vista transversal (FIG. 13A) y en planta (FIG. 13B) del característico fondo estrellado del interior de un tubo de reactivo.
- La FIG. 14 muestra una secuencia de operaciones de pipeteado, en conjunción con un tubo de reactivo con un característico fondo estrellado.
- 25 La FIG. 15 muestra realizaciones de una capa laminada.
- La FIG. 16 muestra una secuencia de operaciones de pipeteado, en conjunción con una capa laminada.
- Las FIG. 17A - 17D muestran un kit ejemplar que contiene soportes y reactivos.
- 30 La FIG. 18 muestra un cabezal dispensador de líquido.
- Las FIG. 19A - 19C muestran un cabezal dispensador de líquido.
- 35 La FIG. 20 muestra un colector de distribución ejemplar.
- La FIG. 21 muestra un cabezal lector y escaneado sujeto a un cabezal dispensador de líquido.
- La FIG. 22 muestra una vista transversal de un escáner de códigos de barras.
- 40 La FIG. 23 muestra un lector de códigos de barras colocado sobre un cartucho microfluídico.
- La FIG. 24 muestra sensores de punta de pipeta.
- 45 Las FIG. 25A y 25B muestran un dispositivo ejemplar para extraer las puntas de pipeta.
- La FIG. 26 muestra una vista en perspectiva y una vista transversal de una unidad de calentamiento.
- La FIG. 27 muestra una vista transversal de una unidad de calentamiento y separador integrados.
- 50 La FIG. 28 muestra un cargador automático de cartuchos.
- La FIG. 29 muestra un apilador de cartuchos.
- 55 La FIG. 30 muestra un apilador de cartuchos en posición de entrega de un cartucho a un cargador automático.
- La FIG. 31 muestra un sistema de carga de cartuchos
- La FIG. 32 muestra una unidad de eliminación de cartuchos usados.
- 60 La FIG. 33 muestra un apilador de cartuchos lleno y vacío.
- La FIG. 34 muestra a cartucho microfluídico, un cabezal lector y una bandeja de cartuchos.

- La FIG. 35 muestra vista transversal de un cabezal de pipeteado y un cartucho en posición en un aparato microfluídico.
- 5 La FIG. 36 muestra un cartucho microfluídico ejemplar con construcción de 3 capas.
- La FIG. 37 muestra una vista en planta de las entradas y circuitos microfluídicos en un cartucho con múltiples carriles ejemplar.
- 10 La FIG. 38A muestra un cartucho ejemplar con carriles múltiples.
- La FIG. 38B muestra una parte de un cartucho ejemplar con carriles múltiples.
- Las FIG. 39A, 39B muestran una red microfluídica ejemplar en un carril de un cartucho con carriles múltiples;
- 15 Las FIG. 40A - 40C muestran diagramas de válvulas microfluídicas ejemplares. La FIG. 40A muestra la válvula en estado abierto, y la válvula en estado cerrado.
- La FIG. 41 muestra una salida de ventilación.
- 20 La FIG. 42 muestra cartucho microfluídico altamente multiplexado ejemplar;
- Las FIG. 43-46 muestran diversos aspectos de un cartucho microfluídico altamente multiplexado ejemplar; y
- 25 Las FIG. 47A-C muestran diversos aspectos de un cartucho microfluídico altamente multiplexado configurado radialmente.
- La FIG. 48 muestra una vista transversal de un cartucho microfluídico.
- 30 Las FIG. 49A, 49B muestran una cámara de PCR y calentadores asociados.
- La FIG. 50 muestra imágenes térmicas de los circuitos de calentamiento en funcionamiento.
- 35 Las FIG. 51A-51C muestran diversas secciones recortadas que pueden utilizarse para mejorar los niveles de enfriamiento durante el termociclado por PCR.
- La FIG. 52 muestra un plan de temperatura respecto al tiempo durante un proceso de PCR, tal y como se realiza en un cartucho microfluídico según se describe en la presente memoria.
- 40 La FIG. 53 muestra un proceso de montaje de un cartucho, tal y como se describe en esta memoria.
- Las FIG. 54A y 54B muestran un aparato ejemplar para la deposición de cera.
- Las FIG. 55A y 55B muestran la deposición ejemplar de gotas de cera en válvulas microfluídicas.
- 45 La FIG. 56 muestra una superposición de una matriz de elementos de calentamiento sobre un cartucho microfluídico de carriles múltiples ejemplar, en donde pueden observarse diversas redes microfluídicas.
- La FIG. 57 muestra una vista transversal de un detector ejemplar.
- 50 La FIG. 58 muestra una vista en perspectiva de un detector de un cabezal lector.
- La FIG. 59 muestra una vista en corte de un detector ejemplar de un cabezal lector.
- 55 La FIG. 60 muestra una vista exterior de un cabezal lector multiplexado ejemplar con una matriz de detectores incorporada.
- La FIG. 61 muestra una vista en corte de un cabezal lector multiplexado ejemplar con una matriz de detectores incorporada.
- 60 La FIG. 62 muestra un diagrama de bloques de un conjunto de circuitos electrónicos ejemplares en conjunción con un detector según se describe en esta memoria.
- La FIG. 63 muestra un sistema de dispensación de líquido ejemplar.
- 65 La FIG. 64 muestra un calentador/separador ejemplar.

- Las FIG. 65A y 65B muestran aspectos ejemplares de una interfaz de usuario informatizada.
- 5 La FIG. 66 muestra esquemáticamente la disposición de los componentes de un aparato preparatorio.
- La FIG. 67 muestra la disposición de los componentes de un aparato preparatorio ejemplar.
- La FIG. 68 muestra esquemáticamente la disposición de los componentes de un aparato de diagnóstico.
- 10 La FIG. 67 muestra la disposición de los componentes de un aparato de diagnóstico ejemplar.
- Las FIG. 70 y 71 muestran el exterior y el interior de un aparato de diagnóstico ejemplar.
- Las FIG. 72A y 72B muestran un termociclador configurado para recibir un cartucho microfluídico.
- 15 La FIG. 73 muestra esquemáticamente la disposición de los componentes de un aparato de diagnóstico de alta eficiencia.
- La FIG. 74 muestra muestra la disposición de los componentes de un aparato de diagnóstico de alta eficiencia ejemplar.
- 20 La FIG. 75 muestra una vista en planta de un cartucho microfluídico de 24 carriles
- La FIG. 76 muestra una vista en perspectiva del cartucho de la FIG. 75.
- 25 La FIG. 77 muestra una vista en despiece del cartucho de la FIG. 75.
- La FIG. 78 muestra una unidad de detección ejemplar.
- 30 Las FIG. 79A, 79B muestran cortes de la unidad de detección de la FIG. 78.
- Las FIG. 80, y 81 muestran la alineación de la unidad de detección con un cartucho microfluídico.
- Las FIG. 82 y 83 muestran el exterior y cortes, respectivamente, de un bloque óptico.
- 35 La FIG. 84 muestra una reacción de Scorpion, esquemáticamente.
- Las FIG. 85A-85C muestran, esquemáticamente, la utilización del cabezal de pipeteado durante diversos procesos preparatorios.
- 40 Las FIG. 86 - 91 muestran disposiciones ejemplares de los circuitos de control de la electrónica.
- Descripción detallada
- 45 La prueba de ácidos nucleicos (NAT, en sus siglas en inglés), según se utiliza en la presente memoria, es un término general que engloba la determinación tanto del ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). En esta memoria se describen protocolos específicos para el ARN y para el ADN. Se entiende que las descripciones generalizadas que no sean específicas al ARN o al ADN tampoco son aplicables igualmente ni pueden adaptarse sin variaciones menores de la descripción de esta memoria según las modificaciones que un experto en la técnica pudiera aplicar. También se entiende que los términos ácido nucleico y polinucleótido pueden utilizarse
- 50 indistintamente en esta memoria.
- Los aparatos según se describen en esta memoria encontrarán su aplicación en el análisis de cualquier muestra que contenga ácidos nucleicos con cualquier objeto, lo que incluye, aunque no por ello se limita, análisis genéticos y
- 55 análisis clínicos para la detección de diversas enfermedades infecciosas en humanos. Los objetivos para los que existen actualmente los ensayos clínicos, y que pueden utilizarse para comprobar el aparato y los métodos aquí descritos, pueden ser de origen bacteriano o vírico, e incluyen, aunque no se limitan a: Chlamydia Trachomatis (CT); Neisseria Gonorrhoea (GC); Streptococcus del grupo B; HSV; HSV Typing; CMV; Influenza A y B; MRSA; RSV; TB; Tricomonas; Adenovirus; Bordatella; BK; JC; HHV6; EBV; Enterovirus; y M. pneumoniae.
- 60 El aparato aquí descrito puede configurarse para operar sobre una mesa de laboratorio, o un entorno similar, y puede analizar aproximadamente 45 muestras por hora cuando funciona de forma continuada durante una jornada laboral normal. Dicho número puede aumentar, según el número de análisis que se alojen en un solo lote, tal y como se verá claramente a partir de la presente descripción. Los resultados procedentes de muestras brutas individuales
- 65 están disponibles normalmente en menos de 1 hora.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "módulo" debe interpretarse como un conjunto de componentes, cada uno de los cuales puede tener funciones separadas, distintas y/o independientes, pero que están configurados para funcionar conjuntamente para producir un resultado o resultados deseados. No es necesario que todos los componentes del módulo estén conectados directamente o en comunicación directa entre sí. Además, la conectividad entre los diversos componentes puede conseguirse con la ayuda de un componente, tal como un procesador, externo al módulo.

#### Descripción general del aparato

Un aparato con diversos componentes tal y como se describe en esta memoria puede configurarse en al menos dos formatos, preparatorio y diagnóstico, tal y como muestran, respectivamente, las FIG. 1A y 1B. En la FIG. 1A se muestra una vista esquemática de un aparato preparatorio 981 que se encarga de la preparación de la muestra tal y como se describe en la presente memoria. En la FIG. 1B se muestra una visión general de un aparato de diagnóstico 971. La disposición geométrica de los componentes de los sistemas 971, 981 mostrados en las FIG. 1A y 1B es ejemplar y no pretende limitar su alcance.

Un procesador 980, tal como un microprocesador, está configurado para controlar funciones de diversos componentes del sistema tal y como se muestra aquí, y, por lo tanto, están en comunicación con cada uno de dichos componentes que requieren control. Se entiende que muchas de dichas funciones de control pueden ejecutarse opcionalmente de forma manual y no bajo el control del procesador. Además, el orden en el que se describen las diversas funciones en la presente memoria, no limita el orden según el cual el procesador ejecuta las instrucciones cuando el aparato está en funcionamiento. Así, el procesador 980 puede configurarse para recibir datos de una muestra que debe analizarse, por ejemplo, de un lector de muestras 990, que puede ser un lector de códigos de barras, un lector de caracteres ópticos, o un escáner RFID (lector de etiquetas por radiofrecuencia). También se entiende que, aunque se muestra un solo procesador 980 controlando todas las operaciones de los aparatos 971 y 981, tales operaciones pueden distribuirse, según convenga, entre más de un procesador.

El procesador 980 puede configurarse para aceptar las instrucciones de un usuario desde una unidad de introducción 984, en donde dichas instrucciones pueden incluir instrucciones para comenzar a analizar la muestra y opciones de estados de funcionamiento. Aunque no se muestran en las FIG. 1A y 1B, en diversas realizaciones, la unidad de introducción 984 puede incluir uno o más dispositivos de introducción seleccionados del grupo formado por: un teclado, una superficie táctil, un micrófono, un trackpad, un escáner de retina, una proyección holográfica de un dispositivo de introducción y un ratón. Un dispositivo de introducción adecuado puede comprender además un lector de medios electrónicos formateados, tales como, aunque sin limitarse, una tarjeta de memoria flash, tarjeta de memoria, memoria USB, CD, o diskette. Un dispositivo de introducción puede comprender además una característica de seguridad tal como lector de huella dactilar, escáner de retina, lector de tira magnética o lector de códigos de barras, para garantizar que un usuario del sistema está autorizado para hacerlo, de acuerdo con las características identificativas precargadas de los usuarios autorizados. Un dispositivo de introducción puede funcionar, adicional y simultáneamente, como dispositivo de salida para escribir datos en relación con el análisis de las muestras. Por ejemplo, si un dispositivo de introducción es un lector de medios electrónicos formateados, también puede escribir en dichos medios. Los datos que pueden escribirse en dicho medio mediante dicho dispositivo incluyen, sin por ello limitarse a, información meteorológica, tal como temperatura o humedad, relativa a un análisis, así como al resultado de un diagnóstico y a datos identificativos de la muestra en cuestión.

El procesador 980 también puede configurarse para comunicarse con una pantalla 982, de modo que, por ejemplo, se transmite información sobre un análisis a la pantalla y así se comunica al usuario del sistema. Dicha información incluye, sin por ello limitarse: el estado actual del aparato; progreso del termociclado por PCR; y un mensaje de advertencia en caso de funcionamiento anómalo del sistema o del cartucho. Adicionalmente, el procesador 980 puede transmitir una o más preguntas que se mostrarán en la pantalla 982 que instan al usuario a responderlas. Así, en ciertas realizaciones, la unidad de introducción 984 y la pantalla 982 están integradas entre sí.

El procesador 980 puede configurarse opcionalmente además para transmitir resultados de un análisis a un dispositivo de salida tal como una impresora, una pantalla, una pantalla que utilice proyección holográfica o un altavoz, o una combinación de los mismos.

El procesador 980 puede estar conectado opcionalmente además a través de una interfaz de comunicaciones tal como una interfaz de red a una red de ordenadores 988. La interfaz de comunicaciones puede ser una o más interfaces seleccionadas del grupo formado por: una conexión en serie, una conexión en paralelo, una conexión a una red inalámbrica, una conexión USB y una conexión de red cableada. Así, cuando el sistema esté correctamente dirigido en la red, un usuario remoto puede acceder al procesador y transmitir instrucciones, datos de entrada, o recuperar datos, según estén almacenados en una memoria (no mostrada) asociada con el procesador o en otros medios que puedan leerse con un ordenador que esté en comunicación con el procesador. La interfaz puede también permitir la extracción de datos en una ubicación remota, tal como un ordenador personal, asistente digital personal, o un dispositivo de almacenamiento en red tal como un servidor informático o granjas de discos. El aparato

puede estar configurado además para permitir a un usuario enviar por correo electrónico los resultados de un análisis directamente a otra parte, tal como un proveedor de servicios sanitarios, instalaciones diagnósticas o pacientes.

5 Adicionalmente, en diversas realizaciones, el aparato puede comprender además medios de almacenamiento de datos configurados para recibir datos de uno o más procesadores, dispositivos de introducción y una interfaz de comunicaciones, siendo el medio de almacenamiento uno o más elementos seleccionados del grupo formado por: unidad de disco duro, tarjeta flash y CD-Rom.

10 El procesador 980 puede estar configurado además para controlar diversos aspectos de la preparación y diagnóstico de las muestras, según se describe a continuación, y tal y como se describe en detalle en esta memoria. En las FIG. 1A y 1B, el aparato 981 (o 971) está configurado para funcionar en conjunción con una gradilla complementaria 970. Estando la propia gradilla configurado, según se describe en esta memoria, para recibir una serie de muestras biológicas 996 en una forma adecuada para las tareas de análisis y diagnóstico y una serie de soportes 972 equipados con diversos reactivos, puntas de pipeta y receptáculos. La gradilla está configurada de modo que, durante la preparación de las muestras, las muestras se procesan en sus soportes respectivos, procesado que incluye someterlas, individualmente, a calentamiento y enfriamiento mediante el conjunto de calentamiento 977. Las funciones de calentamiento del conjunto de calentamiento pueden controlarse mediante el procesador 980. El conjunto de calentamiento 977 funciona en conjunción con un separador 978, tal como un separador magnético, que también puede controlarse con el procesador 980 para acercarlo y alejarlo a una o más cámaras de procesamiento asociadas con los soportes 972, en donde están presentes partículas tales como partículas magnéticas.

El dispensador de líquido 976, que de forma similar puede controlarse mediante el procesador 980, está configurado para ejecutar diversas operaciones de succión y dispensado en la muestra, fluidos y reactivos que corresponda de los soportes 972, para conseguir la extracción of ácido nucleico de las muestras. El dispensador de líquido 976 puede ejecutar dichas operaciones en múltiples soportes simultáneamente. El lector de muestras 990 está configurado para transmitir indicios identificativos sobre la muestra y, en algunos casos del soporte, al procesador 980. En algunas realizaciones un lector de muestras está sujeto al dispensador de líquido y así puede leer indicios sobre una muestra sobre la que está situado el dispensador de líquido. En otras realizaciones el lector de muestras no está sujeto al dispensador de líquido y se mueve independientemente, bajo control del procesador. El dispensador de líquido 976 también está configurado para tomar alícuotas de fluido que contiene ácido nucleico extraído de una o más muestras y dirigirlos a la zona de almacenamiento 974, que puede ser un refrigerador. La zona 974 contiene, por ejemplo, un tubo para PCR correspondiente a cada muestra. En otras realizaciones no hay ninguna zona 974 independiente, aunque puede configurarse un refrigerador para enfriar dicho uno o más soportes 972 de modo que el ácido nucleico extraído se enfría y almacena *in situ*, en lugar de transferirlo a otro lugar distinto.

La FIG. 1B muestra una realización esquemática de un aparato de diagnóstico 971, con elementos en común con el aparato 981 de la FIG. 1A, aunque, en lugar de una zona de almacenamiento 974, cuenta con un compartimento de recepción 992 en el que se introduce un cartucho 994. El compartimento de recepción se comunica con un calentador 998 el cual puede controlarse a través del procesador 980 de modo que regiones específicas del cartucho se calientan en momentos específicos durante el análisis. Así, el dispensador de líquido 976 está configurado para tomar alícuotas de fluido que contienen ácido nucleico extraído de una o más muestras y dirigirlos a las entradas respectivas del cartucho 994. El cartucho 994 está configurado para amplificar los ácidos nucleicos respectivos, por ejemplo, mediante la PCR. El procesador también está configurado para controlar un detector 999 que recibe una indicación de diagnóstico del cartucho 994. El diagnóstico puede transmitirse al dispositivo de salida 986 y/o a la pantalla 982, tal y como se ha descrito anteriormente.

Puede diseñarse un procesador adecuado 980 y fabricarse según, respectivamente, principios de diseño y métodos de procesamiento de semiconductores conocidos en la técnica.

50 Realizaciones de los aparatos descritos en las FIG. 1A y 1B, al igual que otras realizaciones ejemplares descritas en esta memoria, resultan ventajosas porque no requieren puntos del interior del aparato configurados adecuadamente para almacenar reactivos. Tampoco requieren las realizaciones del sistema, u otras realizaciones ejemplares incluidas en la presente memoria, puertos de entrada o de salida configurados para recibir reactivos de, por ejemplo, recipientes almacenados en el exterior tales como botellas, contenedores o depósitos. Por lo tanto, los aparatos de las FIG. 1A y 1B son independientes y operan en conjunción con los soportes 972, en donde los soportes ya incorporan reactivos, como si fueran puntos de su interior dedicados al almacenamiento de reactivos.

Los aparatos de las FIG. 1A y 1B pueden configurarse para realizar la operación en un solo lugar, tal como un laboratorio, o pueden ser portátiles de modo que puede acompañar, por ejemplo, a un médico u otro profesional de la salud que visita pacientes en diferentes lugares. Los aparatos incorporan normalmente un cable de alimentación, de modo que aceptan corriente AC de la red de suministro o de un generador. Un transformador opcional (no mostrado) incorporado en cada aparato, o situado externamente entre una toma eléctrica y el sistema, transforma la potencia AC de entrada en salida DC para su utilización por el aparato. El aparato también puede estar configurado para operar utilizando una o más baterías y, por lo tanto, también está normalmente equipado con un sistema de

recarga de la batería y diversos dispositivos de advertencia que avisan al usuario si la carga de la batería está muy baja como para iniciar o completar de forma fiable un análisis diagnóstico.

Los aparatos de las FIG. 1A y 1B pueden estar configurados, además, en otras realizaciones, para realizar un análisis de muestras multiplexado y/o análisis de múltiples lotes de muestras, cuando, por ej., un solo gradilla contiene un solo lote de muestras. En una de dichas configuraciones, se pone el ejemplo de un sistema, según se describe en la FIG. 1 B, que recibe y procesa múltiples cartuchos microfluidicos 994. Por lo tanto, todos los componentes mostrados en las FIG. 1A y 1B pueden estar presentes tantas veces como lotes de muestras haya, aunque los diversos componentes pueden estar configurados en una carcasa común.

En aún otra configuración, un sistema está configurado para aceptar y procesar múltiples cartuchos, aunque uno o más componentes de las FIG. 1A y 1B es común a múltiples cartuchos. Por ejemplo, un solo aparato puede estar configurado con múltiples compartimentos de recepción de cartuchos, aunque con un procesador, detector e interfaz de usuario común configurados adecuadamente para permitir el control concurrente, consecutivo o simultáneo de los diversos cartuchos. También es posible que dicha realización también utilice un único lector de muestras y un único dispositivo de salida.

En aún otra configuración, un sistema como el mostrado en la FIG. 1B está configurado para recibir un solo cartucho, en donde el cartucho único está configurado para procesar más de 1 muestra, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o 6 muestras en paralelo e independientemente las unas de las otras. La tecnología ejemplar para crear cartuchos que pueden manipular múltiples muestras se describe en otras memorias, por ej., en la solicitud estadounidense con número de serie 60/859,284, incorporada a la presente memoria a modo de referencia.

En línea además con la tecnología actual es posible etiquetar un cartucho, por ej., con un código de barras molecular indicativo de la muestra, para facilitar el seguimiento y reducir el riesgo de mezclado de las muestras. Métodos para efectuar dicho etiquetado pueden encontrarse en diversas memorias, por ej. en la solicitud de patente estadounidense con número de publicación 10/360.854, incorporada a la presente memoria a modo de referencia.

La electrónica de control 840 implantada en los aparatos 971 o 981, mostrados esquemáticamente en el diagrama de bloques de la FIG. 2, puede incluir una o más funciones en diversas realizaciones, por ejemplo, para el control principal 900, multiplexado 902, pantalla de control 904, control de detección 906, y otros similares. La función de control principal puede utilizarse como concentrador de la electrónica de control 840 de los aparatos de las FIG. 1A y 1B, y puede administrar las comunicaciones y controlar diversas funciones electrónicas. La función de control principal también puede soportar interfaces eléctricas y de telecomunicaciones 908 con un usuario o dispositivo de salida tal como una impresora 920, así como funciones diagnósticas y de seguridad opcionales. Junto con la función de control principal 900, la función de multiplexor 902 puede controlar los datos de los sensores 914 y la corriente de salida 916 para ayudar a controlar el conjunto de calentamiento 977. La función de control de pantalla 904 puede controlar la salida e interpretar, si corresponde, los comandos introducidos a través de la pantalla táctil LCD 846, por lo que en determinadas realizaciones constituye una interfaz gráfica con el usuario. La función de detector 906 puede implantarse en la electrónica de control 840 utilizando circuitos de control y procesamiento típicos para recoger, digitalizar, filtrar y/o transmitir los datos de un detector 999 tal como uno o más detectores de fluorescencia. Funciones adicionales, no mostradas en la FIG. 2, incluyen, sin por ello limitarse, funciones de control para controlar los elementos de las FIG. 1A y 1B tales como un cabezal dispensador de líquido, un separador, un refrigerador y para aceptar datos de un lector de muestras.

En las FIG. 3A y 3B se muestra un aparato ejemplar con las funciones según las FIG. 1A o 1B. El aparato ejemplar de las FIG. 3A y 3B cuenta con una carcasa 985, y una cubierta 987, mostrada en posición cerrada en la FIG. 3A, y en posición abierta en la FIG. 3B para mostrar características internas 995. Opcionalmente, la cubierta 987 cuenta con un asa 989, mostrada con forma ovalada y elevada respecto a la superficie de la cubierta, pero que puede tener otras formas tales como cuadrada, rectangular o circular y que puede estar embutida o a nivel con la superficie de la cubierta. La cubierta 987 se muestra con una bisagra, aunque otras configuraciones, como una cubierta deslizante, también son posibles. El tope 991 sirve para evitar que la cubierta se desplace excesivamente hacia atrás y proporciona un punto que sujeta la cubierta 987 en posición abierta. Adicionalmente, la carcasa 985, mostrada con uno o más puertos de comunicaciones 983, y uno o más puertos de alimentación 993, los cuales pueden colocarse en otros puntos, tales como la parte trasera del instrumento.

El aparato de las FIG. 1A y 1B puede comprender opcionalmente una o más patas estabilizadores que hacen que el cuerpo del dispositivo se eleve sobre una superficie sobre la que se coloca el sistema 100, permitiendo así la ventilación por debajo del sistema 100, y también facilitando al usuario la posibilidad de levantar el sistema 100. Puede incorporar 2, 3, 4, 5, o 6, o más patas en función del tamaño del sistema 100. Dichas patas estarán fabricadas preferiblemente de caucho, o plástico, o metal y, en algunas realizaciones, puede elevar el cuerpo del sistema 10 de alrededor de 2 a alrededor de 10 mm sobre la superficie sobre la que está colocado.

La FIG. 4 muestra una configuración ejemplar de una parte del interior de un aparato ejemplar, tal como el mostrado en las FIG. 3A y 3B. En la FIG. 4 se muestra una gradilla 970, que contiene una serie de soportes de reactivo 972 y

muestras de pacientes 996, así como, cerca de ellas, un compartimento de recepción 992 con un cartucho 994, para efectuar la PCR en los polinucleótidos extraídos de las muestras.

#### Gradilla

5 El aparato comprende además una o más gradillas configuradas para introducirlas y extraerlas del aparato, estando cada una de las gradillas configurada además para recibir una pluralidad de soportes para reactivos, y para recibir una pluralidad de tubos de muestras, en donde los soportes para reactivo están en correspondencia biunívoca con los tubos de muestras, y en donde los soportes para reactivo contienen cada uno reactivos suficientes para extraer polinucleótidos de una muestra y colocar los polinucleótidos en una forma lista para la PCR. Soportes para reactivos  
10 ejemplares se describen en mayor detalle en esta memoria.

15 Un aparato puede comprender 1, 2, 3, 4, o 6 gradillas, y cada gradilla puede aceptar 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, o 20 muestras tales como las de los tubos de muestras 802, y un número correspondiente de soportes 804, cada uno con al menos una o más puntas de pipeta, y uno o más recipientes para reactivos.

20 Un gradilla está normalmente configurada para aceptar una serie de soportes para reactivos, tales como los descritos en mayor detalle en esta memoria, estando la gradilla configurada para contener uno o más de dichos soportes, bien permitiendo el acceso a reactivos almacenados en los soportes estando colocado el sistema en una mesa de laboratorio, bien ubicando en una zona específica del aparato permitiendo el acceso a los soportes por una o más funciones del aparato, tales como pipeteado automático, calentamiento de los tubos de proceso y separación magnética de perlas de afinidad.

25 En la FIG. 5 se muestran dos vistas en perspectiva de una gradilla ejemplar 800, configurada para recibir 12 tubos de muestras y 12 soportes para reactivos correspondientes, en 12 carriles. Un carril, según se utiliza en esta memoria en el contexto de una gradilla, es una región específica de la gradilla diseñada para recibir un tubo de muestras y el correspondiente soporte para reactivos. En la FIG. 6 se muestran dos vistas en perspectiva de la misma gradilla ejemplar, junto con una unidad de calentamiento.

30 En las FIG. 7 y FIG. 8A - 8K se muestran diversas vistas de una segunda gradilla ejemplar 800, también configurada para recibir 12 tubos de muestras y 12 soportes para reactivos correspondientes. Así, se muestran las siguientes vistas: planta lateral (FIG. 8A); planta frontal, mostrando tubos de muestras (FIG. 8B); planta posterior, mostrando soportes para reactivos correspondientes (FIG. 8C); elevación posterior, mostrando soportes para reactivos correspondientes (FIG. 8D); elevación frontal, mostrando tubos de muestras (FIG. 8E); superior, mostrando la inserción de un soporte para reactivos (FIG. 8F y 8G); superior mostrando ranura para la inserción de un soporte para reactivos (FIG. 8H); vista superior mostrando el registro de un soporte para reactivos (FIG. 8I); primer plano de un gradilla en estado de inserción/extracción parcial del aparato (FIG. 8J); y gradilla sostenida por el asa, extraída del aparato (FIG. 8K). En la FIG. 9 se muestra una zona rebajada en un aparato preparatorio o de diagnóstico, tal y como se describe en esta memoria, para recibir la gradilla ejemplar extraíble de la FIG. 7. Otras zonas rebajadas  
40 adecuadamente configuradas para recibir otras gradillas con forma, apariencia y forma diferente, aunque no de función, también se corresponden con la esta descripción.

45 Las dos gradillas ejemplares mostradas en las figuras no son limitantes, las características generales de las gradillas contempladas en esta memoria se describen a continuación utilizando las dos gradillas ejemplares como ilustrativas de las mismas. Por ejemplo, las realizaciones aquí mostradas, al menos la primera carril y la segunda carril son paralelas entre sí, una configuración que aumenta la eficiencia del pipeteado. Normalmente, al estar en paralelo, pares de carriles de muestras adyacentes están separadas 24 mm desde sus puntos centrales respectivos. (Otras distancias son posibles, tales como separación de 18 mm, o de 27 mm. La distancia entre los puntos centrales depende del diámetro de los inyectores del cabezal dispensador de líquido, tal y como se describe en esta memoria.  
50 Mantener el espaciado en múltiplos de 9 mm permite la carga fácil de la gradilla a la placa de 96 pocillos (donde normalmente los pocillos están espaciados 9 mm). Normalmente, también la gradilla es tal que se mantiene una pluralidad de soportes para reactivos correspondientes en la pluralidad de carriles a la misma altura los unos respecto de los otros.

55 La gradilla está configurada para recibir un soporte para reactivos de modo que el soporte para reactivos se cierra o encaja de forma reversible en su lugar y permanece fija mientras se accede a los reactivos que contiene, y mientras se transporta la gradilla de un lugar a otro, o mientras se introduce o extrae del aparato. En cada realización, cada una de las segundas posiciones comprende una llave mecánica configurada para recibir el soporte para reactivos en una sola orientación. En la FIG. 5, se muestra que el/los soporte(s) para reactivos se desliza(n) horizontalmente en ranuras orientadas verticalmente, una por soporte, situadas en la gradilla. En dicha realización, el borde de un elemento conector del soporte se conecta a un surco complementario situado en la parte superior de una ranura. En las FIG. 8F, 8G, y 8I, se muestra que el soporte para reactivo(s) puede conectarse con la gradilla a través de una llave mecánica que mantiene los soportes sujetos y en su lugar. Por ejemplo, la llave mecánica puede comprender una parte elevada o rebajada que, al entrar en contacto con una parte complementaria del soporte para reactivos,  
60 permite que el soporte para reactivos encaje en el segundo punto. También puede observarse en las realizaciones

mostradas que el soporte para reactivos cuenta con un primer extremo y un segundo extremo y la llave mecánica comprende una primera característica configurada para encajar en el primer extremo y una segunda característica configurada para encajar en el segundo extremo de modo que no se puede introducir un soporte para reactivos al revés por error.

5 En determinadas realizaciones, los soportes para reactivos correspondientes encajan cada uno en su lugar en la gradilla, por ejemplo, con un mecanismo de cierre de leva que se cierra de forma audible y/o físicamente, o del tipo que funciona con una llave mecánica. La gradilla puede estar configurada de modo que los soportes, al estar colocados en ella, están alineados para la correcta extracción de puntas de pipeta utilizando un dispensador de líquido tal y como se describe en esta memoria. Además, la segunda ubicación de cada carril puede ser lo suficientemente profunda para alojar una o más puntas de pipeta, tal como las contenidas en una funda de puntas de pipeta.

10 En determinadas realizaciones, la gradilla está configurada para aceptar las muestras en tubos de muestras individuales 802, cada uno montado junto a un soporte correspondiente 804, por ejemplo, en un lado de la gradilla 800. Los tubos de muestra deben ser accesibles a un verificador de identificación de muestras, tal como un lector de códigos de barras, tal y como se describe en la presente memoria. En la FIG. 5, un elemento receptor cilíndrico sujeta un tubo de muestras por su extremo inferior. En la FIG. 7, se muestra que un tubo de muestras puede sujetarse tanto por su extremo superior como por su extremo inferior, tal como por una parte rebajada 803 configurada para recibir una parte inferior de un tubo de muestras, y una apertura 805 configurada para sujetar una parte superior de un tubo de muestras. La apertura puede ser un aro, un circuito abierto, o un orificio en una lámina de metal. La parte rebajada puede ser como la mostrada en la FIG. 7, en donde se trata de una carcasa fabricada a partir de una chapa enfaldillada de una carcasa metálica con un orificio lo suficientemente grande como para alojar un tubo de muestras.

15 La gradilla puede estar diseñada de modo que puede extraerse fácilmente del aparato y trasladada dentro y fuera de un entorno de laboratorio externo al aparato, tal como un banco, y el aparato, por ejemplo, para permitir una carga fácil de los tubos de muestra y de los soportes para reactivo en la gradilla. En determinadas realizaciones, la gradilla está diseñada para mantenerse estable sobre una superficie horizontal y para que no se desmonte durante el transporte, y para ello, la gradilla cuenta con una o más (tal como 2, 3, 4, 6, 8) patas 809. En determinadas realizaciones, la gradilla cuenta con un asa 806 que facilita su levantamiento y transporte, tal y como se muestra en la FIG. 5, el asa puede bloquearse en posición vertical, durante su transporte, también para reducir riesgos de que la gradilla se caiga. El asa puede contar opcionalmente con una empuñadura suave 808 en el centro. En la realización de la FIG. 7, el asa de transporte está colocada alrededor de un eje desplazado del eje que pasa por el centro de gravedad de la gradilla al estar cargada, y puede colocarse a nivel con la superficie superior de la gradilla.

20 La realización de la FIG. 5 cuenta con un elemento metálico de base 810 con 4 patas 811 que también sirven como localizadores de posición cuando se introduce la gradilla en la parte específica del aparato. El asa está sujeta al elemento de base. La parte de la gradilla 812 que acepta las muestras y soportes puede estar fabricada en plástico y comprende 12 ranuras, y puede ser desechable.

25 En la realización de la FIG. 7, la gradilla comprende una carcasa, una pluralidad de carriles en la carcasa, y en donde cada carril de la pluralidad de carriles comprende: un primer punto configurado para recibir un tubo de muestras; y un segundo punto configurado para recibir un soporte para reactivos; y un elemento de registro complementario a un compartimento de recepción de un aparato de diagnóstico. Normalmente, la carcasa está fabricada de un metal, tal como aluminio, que es ligero y que puede fabricarse con una elevada tolerancia y es lo suficientemente robusto como para garantizar que la gradilla permanece estable al colocarla en el aparato de diagnóstico. El elemento de registro de la FIG. 7 comprende cuatro (4) espigas de tolerancia elevada 815, situadas en cada esquina de la gradilla. Dichas espigas tienen la forma adecuada para encajar firmemente en los orificios complementarios del compartimento de recepción del aparato, estabilizando así gradilla. Otras realizaciones que cuentan, por ejemplo, con 2, o 3, o más de 4 de dichas espigas coinciden con las realizaciones de la presente memoria.

30 En particular, la carcasa de la realización de la FIG. 7 comprende un elemento horizontal 821, y dos o más elementos verticales 822 conectados al elemento horizontal, y de modo que el segundo punto de cada carril respectiva es una parte rebajada del elemento horizontal. Los dos o más elementos verticales 809 de la realización de la FIG. 7 están configurados para permitir que la gradilla se sostenga sobre ellos. La carcasa puede comprender además dos o más patas o patines, sujetos simétricamente al primer y al segundo elemento vertical y proporcionando a la gradilla una estabilidad adicional al colocarla sobre una mesa de laboratorio.

35 Además, en la realización de la FIG. 7, la carcasa comprende además una pluralidad de elementos espaciadores 825, dispuestos entre cada par de carriles adyacentes. Opcionalmente, dichos elementos espaciadores pueden estar dispuestos verticalmente entre los carriles.



Aunque no se muestra en la FIG., una gradilla puede comprender además un identificador de carriles asociado con cada carril. Un identificador de carril puede ser una marca permanente o temporal tal como un número o letra único, también puede ser un RFID, un código de barras, o una etiqueta de color exclusiva para un carril en particular.

5 Una gradilla está configurada de modo que puede colocarse fácilmente en el lugar que corresponda en el instrumento y da al usuario una retroinformación positiva, audible o física, de que se ha colocado correctamente. En determinadas realizaciones, la gradilla puede bloquearse en posición. Es deseable que la gradilla esté correctamente colocada, y no se permite que se mueva una vez colocada, de modo que el movimiento del dispensador de líquido no se verá afectado durante las operaciones de manipulación de líquido. Por lo tanto, la gradilla cuenta con un elemento de registro para garantizar su adecuada colocación. En la realización de la FIG. 7, el elemento de registro comprende dos o más pasadores de posicionamiento configurados para garantizar que la gradilla solo se coloca en el aparato de diagnóstico en una sola orientación; y proporcionar estabilidad a la gradilla cuando está colocada en el aparato de diagnóstico. La realización de la FIG. 7 incorpora, opcionalmente, un accionador de sensor 817 configurado para indicar la colocación correcta de la gradilla en el aparato de diagnóstico. Dicho sensor puede comunicarse con un procesador 980 para proporcionar al usuario una advertencia, tal como una advertencia audible, o una advertencia visual comunicada a través de una interfaz, si la gradilla no está correctamente colocada. También puede configurarse para evitar el inicio o continuación de un proceso de preparación de muestra si se detecta un error de colocación.

20 En determinadas realizaciones, el interior de la gradilla alrededor del lugar en el que se encuentran los tubos de proceso en los diversos soportes está configurado para dejar una separación para un conjunto de calentamiento y/o separador magnético tal y como se describe en esta memoria. Por ejemplo, la gradilla está configurada de modo que las cámaras de procesos de los soportes individuales pueden introducirse en unidades de calentamiento en un conjunto de calentamiento tal y como se describe en esta memoria.

25 Contar con una gradilla extraíble permite al usuario mantener la siguiente gradilla cargada de muestras y alineada, mientras el aparato prepara la gradilla de muestras anterior, de modo que se maximiza el tiempo de funcionamiento del aparato.

30 La gradilla también puede limpiarse fácilmente fuera del instrumento en caso de producirse derrames de muestras o como parte del mantenimiento rutinario del laboratorio.

En ciertas realizaciones, las gradillas tienen una o más partes desechables.

35 Soporte

Las FIG. 10A y 10B muestran vistas de un soporte ejemplar 501 tal y como se describe en esta memoria. La FIG. 11 muestra una vista en planta de otro soporte ejemplar 502, tal y como se describe en esta memoria. La FIG. 12A muestra una vista en perspectiva de un soporte ejemplar 503, y la FIG. 12B muestra una vista transversal del mismo soporte. La FIG. 12C muestra una vista en despiece del mismo soporte de las FIG. 12A y 12B. A continuación, se describen, todos estos soportes ejemplares, así como otros que concuerdan con esta descripción, aunque no se presenten como realizaciones específicas.

45 Puede hacerse referencia a los soportes ejemplares mostrados en las FIG. 10A, 10B, 11, 12A, 12B, y 12C como una "tira desechable individual", o "tira individual", porque pretenden ser utilizadas como una sola unidad configurada para contener todos los reactivos y receptáculos necesarios para efectuar la preparación de una muestra y porque están dispuestas en formato de tira. Coincide con esta descripción, a pesar de que se contemplan otras disposiciones geométricas de los diversos receptáculos, de modo que la descripción no se limita a una disposición lineal, o de tira, sino que incluye una disposición circular o de cuadrícula.

50 Algunos de los reactivos contenidos en el soporte se proporcionan como líquidos y otros pueden proporcionarse como sólidos. En algunas realizaciones, se utiliza un tipo de recipiente para almacenar líquidos diferente del utilizado para almacenar sólidos.

55 El soporte puede ser desechable, tal como el destinado a un solo uso, tras lo cual se desecha.

El soporte está normalmente fabricado en plástico tal como polipropileno. El plástico es tal que tiene cierta flexibilidad para facilitar su colocación en la gradilla, tal y como se describe en esta memoria. No obstante, el plástico es normalmente rígido, de modo que el soporte no se combará ni flexionará significativamente por su propio peso, y no se deformará fácilmente durante su manipulación y transporte rutinarios, y así no permitirá que los reactivos escapen de su interior.

60 El soporte comprende un elemento de conexión 510 con una o más características como las descritas a continuación. El elemento de conexión 510 sirve para conectar diversos componentes en el soporte entre sí. El elemento de conexión 510 tiene un lado superior 512 y, opuesto al lado superior, un lado inferior 514. En la FIG.

10B, se muestra una vista del lado inferior 514, con diversos puntales 597 que conectan un borde del elemento conector con los casquillos, tubos de procesos y tubos de reactivos. Los puntales 597 son opcionales, y pueden omitirse total o parcialmente, o bien pueden sustituirse, total o parcialmente, por otras piezas que mantengan el soporte unido.

5 El soporte está configurado para comprender: un tubo de procesos 520 sujeto al elemento de conexión y con una apertura 522 situada en el elemento de conexión; al menos una cavidad 530, situada en el elemento de conexión, estando la cavidad configurada para aceptar una punta de pipeta 580 desechable; dos o más tubos de reactivo 540 dispuestos en el lado inferior del elemento de conexión, contando cada tubo de reactivo con una apertura de entrada 542 situada en el elemento de conexión; y uno o más receptáculos 550, situados en el elemento de conexión, en donde dicho uno o más receptáculos están configurados para recibir un recipiente complementario tal como un tubo de reactivo (no mostrado) introducido desde el lado superior 512 del elemento de conexión.

15 Normalmente, el soporte es tal que el elemento de conexión, el tubo de procesos, y los dos o más tubos de reactivo están fabricados en una sola pieza, tal como una pieza de polipropileno.

El soporte también es normalmente tal que al menos el tubo de procesos, y los dos o más tubos de reactivo son translúcidos.

20 Dicho uno o más receptáculos 550 están configurados para recibir tubos de reactivo que contienen, respectivamente, cantidades suficientes de uno o más reactivos normalmente en forma sólida, tal como en forma liofilizada, para efectuar la extracción de ácido nucleico de una muestra asociada con el soporte. Los receptáculos también pueden ser del mismo tamaño y forma, o pueden tener tamaños y formas diferentes los unos de los otros. Se muestran receptáculos 550 con fondos abiertos, pero no se limita a dicha tipología, y pueden estar cerrados por otro lado en lugar de la entrada 552 del lado superior del elemento de conexión 510. Preferiblemente, los receptáculos 550 están configurados para recibir recipientes utilizados comúnmente en el ámbito de los análisis de laboratorio, o recipientes configurados adecuadamente para su utilización con el soporte descrito en la presente memoria. Los recipientes se almacenan normalmente por separado de los soportes para facilitar la manipulación de las muestras, puesto que los reactivos sólidos requieren normalmente diferentes condiciones de almacenamiento que los reactivos líquidos. En particular, muchos reactivos sólidos pueden ser extremadamente sensibles a la humedad.

35 Los tubos de reactivo encajados que contienen diferentes reactivos pueden ser de colores diferentes, o bien pueden estar codificados por colores para facilitar su identificación al usuario. Por ejemplo, pueden estar fabricados en materiales de diferentes colores, tal como plástico tintado, o bien pueden contar con una etiqueta identificativa tal como una barra o punto de color. También puede incorporarse una etiqueta impresa en el lateral y/o incorporar un identificador tal como un código de barras en la capa de sellado de la parte superior.

40 Los recipientes 554 recibidos en los receptáculos 550 pueden ser alternativamente una parte integrada en el soporte y pueden ser el mismo tipo de recipientes que la cámara para residuos y/o los tubos de reactivos, aunque también pueden ser diferentes de estos.

45 En una realización, los recipientes 554 que contienen reactivos liofilizados, dispuestos en los receptáculos 550 (mostrados, por ej., en las FIG. 12A y 12C), son tubos de 0,3 ml configurados para tener un diseño de estrella (véanse las FIG. 13A y 13B) en sus respectivas superficies inferiores interiores. De este modo, cuando se añade un fluido a los reactivos liofilizados (que están secos en el paquete inicial), puede introducirse una punta de pipeta hasta el fondo del tubo y aun así poder extraer casi la totalidad del fluido del tubo, tal y como se muestra en la FIG. 14, durante el proceso de extracción de ácido nucleico. El diseño en estrella se describe más adelante en esta memoria.

50 Los tubos de reactivo, tales como los que contienen los reactivos liofilizados, pueden sellarse por su parte superior con una lámina metálica, tal como una lámina de aluminio, sin capa de revestimiento plástico, tal y como se describe en esta memoria.

55 Las realizaciones 501, 502, y 503 se muestran configuradas con una cámara para residuos 560, con una apertura de entrada 562 en el lado superior del elemento de conexión. La cámara para residuos 560 es opcional, y en las realizaciones en las que está presente, está configurada para recibir reactivos líquidos gastados. En otras realizaciones en las que no está presente, los reactivos líquidos gastados pueden transferirse o desecharse en un lugar fuera del soporte, tal como, por ejemplo, un tubo de muestras que haya contenido la muestra original cuyo contenido está siendo analizado. La cámara para residuos 560 se muestra como parte de un conjunto que comprende adicionalmente, dos o más tubos de reactivo 540. Debe entenderse que dicha disposición se realiza por comodidad, por ej., de fabricación; son posibles otras posiciones para la cámara para residuos, así como lo son realizaciones en las que la cámara para residuos se encuentra adyacente a un tubo de reactivo, aunque no está conectada a él salvo por el elemento de conexión.

El soporte es normalmente tal que el elemento de conexión, el tubo de procesos, los dos o más tubos de reactivo y la cámara para residuos (de estar presente) están fabricados en una sola pieza, fabricada en un material tal como polipropileno.

5 Las realizaciones 501 y 503 se muestran con una funda para pipetas 570. Se trata de un componente opcional del soporte aquí descrito. Puede estar sujeta al elemento de conexión 510 de forma permanente o de forma desmontable, o bien puede estar conformada, por ej., moldeada, como parte del conjunto de una sola pieza que forma el soporte. Por ejemplo, la vista en despiece del soporte 503 de la FIG. 12C muestra pestañas 574 en la superficie superior de una funda extraíble para pipetas 570 que se engarzan en unos rebajes u orificios complementarios situados en el lado inferior 514 del elemento de conexión 510. Otras configuraciones de sujeción son posibles. La funda para pipetas 570 está configurada normalmente para rodear dicha al menos una cavidad, una punta y la parte inferior de una punta de pipeta cuando esta está instalada en dicha al menos una cavidad. En algunas realizaciones, dicha al menos una cavidad comprende cuatro cavidades. En algunas realizaciones la al menos una cavidad comprende dos, tres, cinco o seis cavidades.

15 La funda para pipetas 570 está configurada normalmente para tener una parte inferior 576 y una parte cerrada 578 dispuesta entre la parte inferior y el elemento de conexión. La funda para pipetas 570 puede adicional y opcionalmente tener uno o más recortes 572 en la pared 578, o en la parte inferior 576. Tales recortes proporcionan ventilación a las puntas de pipeta y también reducen la cantidad total de material utilizado en la fabricación del soporte. La realización 503 cuenta con una funda para pipetas sin tales recortes. En la realización 501, dicho recorte se muestra como un triángulo isósceles en la parte superior de la funda; puede encontrarse un recorte con una forma similar en una posición correspondiente en el lado opuesto de la funda, oculto a la vista en la FIG. 10A. Otros recortes podrían tener otras formas triangulares, circulares, ovales, cuadradas, rectangulares, u otras formas poligonales o irregulares y pueden ser diversas, tal como muchas, en número. La pared 578 de la funda para pipetas 570 también puede incorporar una malla o estructura similar con fenestraciones o intersticios. En realizaciones con funda para pipetas, el objeto de la funda es atrapar gotas de las puntas de pipeta usadas, evitando así la contaminación cruzada de las muestras, al pasarlas de un soporte a otro en un lugar similar, y/o a cualquier gradilla de apoyo en la que está situado el soporte. Normalmente, el fondo 576 es sólido y tiene forma de cuenco (cóncava) de modo que las gotas quedan retenidas. Una realización tal como la 502, sin funda para pipetas, puede utilizar, por ej., una bandeja de goteo o una salida de drenaje, colocada adecuadamente bajo las puntas de pipeta en dicha una o más cavidades, con el mismo objeto. Además de atrapar gotas, la funda para las puntas de pipeta evita o inhibe que las puntas de otros soportes para reactivos – tales como las situadas junto a la punta en cuestión en una gradilla, tal y como se describe en esta memoria – se toquen entre sí cuando se recogen o se vuelven a colocar antes o después de algún paso de procesamiento de líquidos. Por lo general, no se pretende que haya contacto entre las puntas situadas en soportes adyacentes por, por ejemplo, un cabezal dispensador automático que controla el procesado de las muestras en soportes en paralelo, pero las puntas de pipeta al ser largas pueden tocar fácilmente otra punta situada en una tira próxima si el ángulo al recolocar la punta se desvía ligeramente respecto a la vertical.

40 Los soportes de las realizaciones 501, 502, y 503, tienen un elemento de conexión configurado de modo que dicha al menos una cavidad, el uno o más receptáculos, y las respectivas aperturas del tubo de procesos, y los dos o más tubos de procesos, están dispuestos linealmente los unos respecto a los otros (es decir, sus puntos centrales se encuentran en el mismo eje). No obstante, los soportes aquí descritos no se limitan a configuraciones particulares de receptáculos, de cámaras de residuos, de tubo de procesos, de cavidades, y de tubos de reactivos. Por ejemplo, un soporte puede fabricarse más corto, si se escalonan algunas aperturas entre sí y ocupan posiciones "fuera del eje". Los diversos receptáculos, etc., tampoco tienen que ocupar las mismas posiciones entre sí, tal y como se muestra en las FIG. 12A y 12B, en donde el tubo de procesos está dispuesto aproximadamente cerca del centro del soporte, los reactivos líquidos se almacenan en receptáculos montados en un lado del tubo de procesos, y los receptáculos que contienen reactivos sólidos están montados en el otro lado del tubo de procesos. Así, en las FIG. 10A, 10B, y 50 11, el tubo de procesos se encuentra en un extremo del elemento de conexión, y la funda para pipetas se encuentra en el otro extremo, adyacente, en el interior, a una cámara para residuos y dos o más tubos de reactivos. Aún son posibles otras disposiciones, tales como montar el tubo de procesos en un extremo del soporte, montar el tubo de procesos junto a las puntas de pipeta y a la funda para puntas de pipeta (tal y como se describe en esta memoria), y montar el tubo de recolección de residuos junto al tubo de procesos. Se entiende que configuraciones alternativas de las diversas partes del soporte dan lugar solo a variaciones de la forma y pueden acomodarse en otras variaciones del aparato tal y como se ha descrito, lo cual incluye sin por ello limitarse a conjuntos de instrucciones alternativas para un cabezal de pipeteado para dispensación de líquidos, conjunto de calentamiento, y separador magnético, tal y como se describe en esta memoria.

60 El tubo de procesos 520 también puede ser un tubo insertable, en lugar de formar parte de una pieza integrada. El tubo de procesos 520 se utiliza normalmente para diversos procesos de mezclado y de reacción que se producen durante la preparación de muestras. Por ejemplo, puede producirse lisis celular en el tubo de procesos 520, así como la extracción de ácidos nucleicos. El tubo de procesos 520 se coloca así ventajosamente en un lugar que reduce, en general, las operaciones de desplazamiento del cabezal de pipeteado necesarias para la transferencia de líquidos al tubo de procesos 520.

65

Los tubos de reactivo 540 están configurados, normalmente, para contener reactivos líquidos, uno por tubo. Por ejemplo, en las realizaciones 501, 502, y 503, se muestran tres tubos de reactivos, que contienen respectivamente tampón de lavado, tampón de liberación y tampón de neutralización, cada uno de los cuales se utiliza en un protocolo de preparación de muestras.

Los tubos de reactivos 540 que contienen líquidos o reactivos líquidos pueden estar cerrados herméticamente con una estructura laminada 598. La estructura laminada tiene normalmente una capa de sellado térmico, una capa plástica tal como una capa de polipropileno, y una capa metálica tal como lámina de aluminio, en donde la capa de sellado térmico se encuentra junto a dicho uno o más tubos de reactivos. La película plástica adicional utilizada en un laminado para receptáculos que contienen reactivos líquidos sirve normalmente para evitar que el líquido entre en contacto con el aluminio.

En la FIG. 15 se muestran dos realizaciones de una estructura laminada, que difieren en sus estructuras de capas. En ambas realizaciones, la capa de sellado térmico 602, por ejemplo, fabricada de una laca u otro polímero similar con un punto de fusión bajo, se encuentra en el fondo, junto a la parte superior del soporte, cuando se aplica de este modo. La capa plástica 604 se encuentra normalmente sobre la capa de sellado térmico y está fabricada normalmente de polipropileno, con un espesor en el intervalo de 10 - 50 micras. La capa metálica 608 se encuentra normalmente sobre la capa plástica y puede ser una capa de lámina de aluminio unida a la capa plástica con una capa de adhesivo 606, como en la primera realización de la FIG. 15, o bien puede ser una capa de metal que ha sido evaporada o erosionada en su lugar directamente sobre la capa plástica. Espesores ejemplares de las capas respectivas se muestran en la FIG. 15, en donde se entiende que variaciones del espesor de hasta un factor de 2 pulgadas concuerdan con la tecnología aquí descrita. En particular, la lámina de aluminio tiene un espesor de 0,1 - 15 micras, la capa de polímero tiene un espesor de 15 - 25 micras en una realización. En otra realización, el aluminio tiene un espesor de 0,1 - 1 micras y la capa de polímero tiene un espesor de 25 - 30 micras.

Los laminados utilizados aquí facilitan el almacenamiento a largo plazo ya que el soporte incluye la presencia de reactivos liofilizados sellados, así como líquidos sellados en su proximidad, lo cual normalmente es difícil de conseguir.

En una realización, las partes superiores de los tubos de reactivos tienen bordes biselados de modo que cuando se une térmicamente una lámina de aluminio a la parte superior, el plástico fundido no se extiende más allá del reborde del tubo. Esto resulta ventajoso, ya que, si el plástico fundido reduce el diámetro interior del tubo, provocará interferencias con la punta de pipeta durante la operación. En otras realizaciones, una parte plana elevada 599 facilita la aplicación y retirada del laminado 598. La superficie elevada 599, situada en el lado superior del elemento de conexión, y rodeando las aperturas de entrada de los tubos de reactivos y, opcionalmente, la cámara de residuos, es una característica opcional del soporte.

La forma de pipeteado de líquido es tal que una punta de pipeta que perfora la lámina pasa a través sin crear un sello alrededor de la punta de pipeta, como se muestra en la FIG. 16. Tal sello alrededor de la punta durante el pipeteado resultaría inconveniente ya que es deseable contar con cierta cantidad de aire durante la operación de pipeteado. En tal caso, no se crea un sello porque la estructura del laminado hace que la lámina perforada permanezca en la posición adoptada inicialmente al ser perforada. Los cinco paneles superiores de la FIG. 16 ilustran el pipeteado de un reactivo desde un tubo de reactivo sellado con un laminado, tal y como se describe en esta memoria. En A, la punta de pipeta está colocada aproximadamente en el centro sobre el tubo de reactivo que contiene reactivo 707. En B, la punta de pipeta se baja, normalmente se baja de forma controlada, hacia el interior de tubo de reactivo y, al hacerlo, perfora la lámina 598. La vista en despiece de esta zona muestra el borde del laminado perforado en contacto con la punta de pipeta en la parte más ancha en la que penetra en el tubo de reactivo. En C, la punta de pipeta se retira ligeramente, manteniendo la punta en la masa del reactivo 707. La vista en despiece muestra que la lámina perforada ha conservado la configuración que ha adoptado al ser perforada y la punta de pipeta descendió hasta la posición más profunda posible en el interior del tubo de reactivo. En D, la punta de pipeta aspira el reactivo 707, posiblemente alterando su altura a medida que personas cada vez más mayores se realizan dichos análisis. En E, la punta de pipeta está completamente retirada del tubo de reactivo.

Los materiales de los diversos tubos y cámaras pueden estar configurados para contar con al menos una superficie interior uniforme y un recubrimiento para reducir la unión de ADN y otras macromoléculas a ellos. No se desea la unión de ADN debido a que puede producirse una reducción de la sensibilidad en las posteriores detecciones y análisis del ADN que no queda atrapado en la superficie del soporte.

El tubo de procesos también puede contar con una superficie de baja adherencia y permite que las perlas magnéticas se deslicen arriba y abajo de la pared interior sin quedarse pegadas a ella. Además, cuenta con un recubrimiento hidrofóbico que permite una baja adherencia estática del fluido y, por lo tanto, una baja adherencia de los ácidos nucleicos y otras moléculas.

En algunas realizaciones, el soporte comprende un elemento de registro tal como una llave mecánica. Normalmente, dicha llave forma parte del elemento de conexión 510. Una llave mecánica garantiza que el soporte es recibido en un elemento complementario, por ejemplo, una gradilla de soporte o compartimento de recepción de un aparato que controla operaciones de pipeteado en reactivos del soporte. Una llave mecánica es normalmente una pieza recortada con una forma en particular que se corresponde con un recorte o protuberancia en un aparato receptor. Así, la realización 501 cuenta con una llave mecánica 592 que comprende un par de recortes de forma rectangular en un extremo del elemento de conexión. Esta característica, tal y como se muestra adicionalmente, proporciona una pestaña que el usuario puede agarrar al introducir y extraer el soporte en una gradilla u otro aparato. Las realizaciones 501 y 502 también incorporan una llave mecánica 590 en el otro extremo del elemento de conexión 510. La llave 590 es un recorte angulado que facilita la introducción del soporte en una gradilla, y también garantiza un buen registro al apoyar un recorte angulado complementario en una zona rebajada configurada para recibir el soporte. Otras variaciones de la llave mecánica son, por ejemplo, coherentes con la presente descripción: por ejemplo, recortes curvados, o diversas combinaciones de muescas o protuberancias que facilitan el registro seguro del soporte.

En algunas realizaciones, no mostradas en las FIG. 10A, 10B, 11, o 12A-C, el soporte comprende además un identificador sujeto al elemento de conexión. El identificador puede ser una etiqueta, tal como una etiqueta escribible, un código de barras, un código de barras de 2 dimensiones, o una etiqueta RFID. El identificador puede tener, por ej., objeto de revelar rápidamente qué combinación de reactivos está presente en el soporte y, así, a qué tipo de protocolo de preparación de muestras se destina. El identificador puede indicar también el lote del soporte, para el control de calidad o con objeto de mantener un registro. El identificador puede también permitir a un usuario combinar un soporte determinado con una muestra determinada.

También debe considerarse coherente con la presente descripción que un soporte puede estar configurado adicionalmente para recibir una muestra, tal como en un tubo de muestras. Así, en realizaciones descritas en la presente memoria, una gradilla recibe una serie de tubos de muestras y una serie de soportes correspondientes de modo que los tubos de muestras y los soportes pueden cargarse por separado e independientemente los unos de los otros. No obstante, en otras realizaciones, un soporte puede estar configurado para recibir una muestra, por ejemplo, en un tubo de muestras. De este modo, una gradilla complementaria está configurada para recibir una serie de soportes, en donde cada soporte tiene una muestra, así como reactivos y otros elementos. En tal realización, el soporte está configurado de modo que un verificador de identificación de la muestra puede acceder a la muestra.

#### Kits

El soporte descrito en la presente puede proporcionarse en una bolsa cerrada herméticamente para reducir la posibilidad de que el aire y la humedad entren en contacto con los reactivos del soporte. Dicha bolsa cerrada herméticamente puede contener uno o más de los soportes aquí descritos, tales como 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, o 24 soportes.

El soporte también puede proporcionarse como parte de un kit para realizar la preparación de las muestras, en donde el kit comprende una primera bolsa que contiene uno o más de los soportes aquí descritos, cada uno de los soportes configurados con reactivos líquidos para, por ej., lisis, lavado y liberación, y una segunda bolsa, con atmósfera inerte en su interior y uno o más tubos de reactivos que contienen reactivos liofilizados para la PCR, tal y como se muestra en la FIG. 17. Dicho kit puede estar configurado también para realizar el análisis de múltiples muestras, y contiene suficientes reactivos para PCR (u otros reactivos de amplificación, tales como para RT-PCR, amplificación mediada por transcripción, NASBA, amplificación dependiente de helicasa, y otras conocidas por los expertos en la técnica, y otras descritas en esta memoria) para procesar dichas muestras y una serie de soportes individuales, tales como 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, o 24 soportes.

#### Tubos de reactivos

Tal y como se describe en la presente memoria, los recipientes 554 que contienen reactivos liofilizados son tubos de 0,3 ml que han sido configurados además para tener una forma de estrella o patrón estrellado (véanse las FIG. 13A y 13B) en sus respectivas superficies interiores inferiores. Sin embargo, pueden configurarse de forma similar otros tubos para su utilización según la presente memoria, así como para otros usos aquí no descritos. Así, por ejemplo, los beneficios del patrón en forma de estrella recaen en tubos de reactivos que contienen muestras líquidas que se pipeteen directamente fuera de los tubos (así como los tubos que inicialmente contienen sólidos que se constituyen en forma líquida antes del pipeteado). Otros tamaños de tubos que pueden beneficiarse de dicho patrón en forma de estrella tienen tamaños en el intervalo de, por ejemplo, 0,1 ml a 0,65 ml.

El patrón en forma de estrella garantiza que cuando se retira un fluido del tubo, una punta de pipeta puede introducirse hasta el fondo del tubo y puede extraer la totalidad, o la práctica totalidad, del fluido del tubo, tal y como se muestra en la FIG. 14. Esto es importante porque, al trabajar con volúmenes tan pequeños, y cuando el ADN diana puede estar presente en muy pocas copias, debe reducirse en la medida posible la pérdida de muestra por imperfecciones del pipeteado.

El diseño del patrón en forma de estrella es importante, especialmente al utilizarlo para la recuperación de ADN/ARN presente en cantidades muy pequeñas en la muestra clínica. El patrón estrellado debe permitir el pipeteado de la mayoría del líquido (volumen residual < 1 microlitro) cuando se utiliza con una pipeta introducida hasta el fondo del tubo. Adicionalmente, el patrón estrellado debe estar diseñado para reducir el área superficial, así como los surcos terminales que tienden a tener dos efectos no deseables – atrapar líquidos y aumentar la indeseable retención de polinucleótidos por adsorción.

A continuación, se describe la FIG. 14 del siguiente modo. La FIG. 14 muestra una serie de paneles, A - G, cada uno de los cuales representa, secuencialmente, una etapa de la operación de pipeteado. En A, una punta de pipeta 2210, que contiene un líquido 2211 (tal como una solución tampón), se coloca directa o aproximadamente sobre el centro del tubo de reactivo 2200. El tubo contiene una serie de pellets liofilizados 2212, y está sellado con una capa 2214, tal como lámina. La lámina puede sellarse térmicamente a la parte superior del tubo. Aunque puede colocarse una capa laminada, tal y como se describe en esta memoria, en el tubo de reactivo, normalmente es adecuado utilizar una capa de lámina de papel de aluminio cuando el contenido del tubo es sólido, por ejemplo, reactivos liofilizados. En algunas realizaciones, la parte superior del tubo de reactivo posee bordes biselados para reducir la expansión del reborde superior del tubo durante el termosellado de una lámina en la parte superior del tubo. El tubo puede comprender además un código identificable, tal como un código de barras 1D o 2D en la parte superior. Dicho código resulta útil para identificar la composición de los reactivos almacenados en su interior y el número de lote para la preparación y una fecha de caducidad. El código puede estar impreso, por ejemplo, con una impresora de inyección de tinta o de transferencia térmica.

Se muestra el patrón estrellado 2203 de la superficie interior inferior del tubo 2200. En B, la punta de pipeta se baja, perforando el sello 2214, y se lleva hacia una posición sobre las partículas 2212. En C el líquido 2211 se descarga desde la punta de pipeta sobre las partículas, disolviéndolas, tal y como se muestra en D. Una vez las partículas se han disuelto por completo, formando una solución 2218, la punta de pipeta se baja hasta una posición en la que está en contacto con el patrón estrellado 2203. En E, la punta de pipeta succiona la solución 2218, y en F, la punta puede descargar opcionalmente la solución de vuelta al tubo. Los pasos E y F pueden repetirse según se desee para facilitar la disolución y mezclada de los componentes liofilizados en la solución. En el paso G, tras succionar tanta solución 2218 como se puede con la punta de pipeta, la punta de pipeta se retira del tubo. Idealmente, se succiona un 100% en volumen de la solución 2218 con la punta de pipeta en G. En otras realizaciones, y en función de la naturaleza de la solución 2218, se extrae al menos un 99% por volumen de la solución. Aún en otras realizaciones, se extrae al menos un 98%, al menos un 97%, al menos un 96%, al menos un 95%, y al menos un 90% por volumen de la solución.

El diseño estrellado o el patrón en forma de estrella puede optimizarse para maximizar el flujo de líquido a través de los espacios entre la parte inferior de una micropipeta, tal como una pipeta p1000, y el patrón de estrella se describe además en la solicitud estadounidense de patente provisional con número de serie 60/959,437, presentada el 13 de julio, 2007, incorporada a la presente memoria a modo de referencia. Debe entenderse que, aunque la presente descripción se refiere a pipetas y puntas de pipeta utilizadas normalmente en la preparación de muestras biológicas, los principios y aspectos detallados del diseño son los aplicables a otros tipos de pipetas y de puntas de pipeta, y pueden, así, adaptarse.

La FIG. 13A muestra una vista transversal perspectiva de un tubo de reactivo 2200 con una pared lateral 2201 y un fondo 2202. La superficie interior 2204 del fondo es visible. Se muestra parcialmente un recorte en forma de estrella 2203, como tres ranuras apicales.

Normalmente el patrón en forma de estrella está presente como una parte elevada en la superficie interior inferior del tubo. Así, durante la fabricación de un tubo de reactivos, tal como mediante moldeo por inyección, una parte exterior del molde es una cavidad que define la forma exterior del tubo. Una forma interior del tubo se forma mediante un molde colocado concéntricamente con el molde exterior y con una estructura en forma de estrella fresada en la punta. Así, al inyectar plástico líquido en el espacio entre las dos partes del molde, se forma la forma de estrella como parte elevada en la superficie interior inferior del tubo.

El patrón de estrella ejemplar 2203 que se muestra en la vista en planta de la FIG. 13B parece el "timón de un barco" y comprende un centro 2209, un anillo circular 2207 centrado sobre el centro 2209, y 8 segmentos radiales configurados como surcos radiales 2205. Cada surco se encuentra con el resto de surcos en el centro 2209, y tiene un extremo radial, también referido como ápice o vértice. El patrón en estrella 2203 tiene 8 surcos, pero se entiende que un patrón de estrella con un mayor o menor número de surcos, tal como 3, 4, 6, 10, o 12, también concuerda con el diseño aquí descrito. El número de surcos de la estrella debe ser el mínimo adecuado para un pipeteado de líquido eficaz y también suficientemente espaciados como para no atrapar la punta de las puntas de pipetas utilizadas en las aplicaciones de manipulación de líquido.

El centro 2209 está colocado normalmente de manera coincidente con el centro geométrico del fondo del tubo de reactivo 2200. Normalmente, el tubo tiene una sección transversal circular, por lo que la identificación del centro (por

## ES 2 610 128 T3

ejemplo, en el punto de cruce de dos diámetros) es, normalmente, directo. El centro 2209 puede ser mayor que el mostrado en la FIG. 13B, puede ser un recorte circular o una parte elevada que sobrepasa en diámetro a la región formada por el punto de encuentro de los surcos 2205.

5 El anillo 2207 es una característica opcional del patrón en forma de estrella 2203. Normalmente, el anillo 2207 está centrado alrededor del centro 2209, y, normalmente, sus dimensiones se corresponden con la superficie inferior de una punta de pipeta. Así, cuando una punta de pipeta "llega al fondo" en el fondo del tubo de reactivo 2200, el extremo inferior de la punta de pipeta entra en contacto con el anillo 2207. Así, el anillo 2207 es preferiblemente una característica recortada o rebajada que puede alojar la punta de pipeta y ayudar a guiar su posicionamiento centralmente en el fondo del tubo. En otras realizaciones, se incorpora más de un anillo concéntrico 2207, tal como 2, 3, o 4 anillos concéntricos 2207.

15 El patrón de estrella está configurado para tener unas dimensiones que proporcionen un flujo óptimo de líquido del tubo de reactivo hacia una punta de pipeta correctamente colocada. El patrón de estrella mostrado en la FIG. 13B con un diámetro significativamente inferior al diámetro del tubo en su punto más ancho. El patrón de estrella puede tener, en diversas realizaciones, un diámetro (medido desde el centro 2209 al ápice de un surco 2205) del 5 - 20% del diámetro del tubo de reactivo, o del 10 - 25% del diámetro del tubo de reactivo, o del 15 - 30% del diámetro del tubo de reactivo, o del 20 - 40% del diámetro del tubo de reactivo, o del 25 - 50% del diámetro del tubo de reactivo, o del 30 - 50% del diámetro del tubo de reactivo, o del 40 - 60% del diámetro del tubo de reactivo, o del 50 - 75% del diámetro del tubo de reactivo, o del 65 - 90% del diámetro del tubo de reactivo.

20 Los surcos 2205 están separados por aristas (que ocupan el espacio entre los surcos adyacentes). En la realización mostrada, los surcos son más estrechos (ocupan un ángulo radial más pequeño) que los huecos entre ellos. En otras realizaciones, los surcos pueden ser proporcionalmente más anchos que los huecos entre ellos. En tales realizaciones, puede ser más apropiado describirlos como que tienen aristas en lugar de surcos. En otras realizaciones, los surcos y aristas que los separan tienen un ancho igual en la distancia radial de cada una de ellas desde el centro.

25 Los surcos que forman los ápices de la estrella pueden estar redondeados en sus superficies inferiores, tal como una sección transversal semicircular, aunque normalmente tienen forma en V. También pueden tener una sección transversal trapezoidal, tal como teniendo una parte superior más ancha que la parte inferior, que es plana, la parte superior y la inferior estando conectada por paredes inclinadas.

30 En algunas realizaciones, para facilitar su fabricación, los surcos acaban en el mismo nivel en el fondo del tubo. Así, los extremos radiales están dispuestos en la circunferencia de un círculo. En otras realizaciones, los surcos no finalizan todos en el mismo nivel. Por ejemplo, los surcos pueden acabar alternativamente en diferentes niveles, y así los extremos están dispuestos de forma alternada en las respectivas circunferencias de dos círculos que ocupan diferentes planos en el espacio el uno respecto al otro.

35 En la FIG. 13B se muestran surcos 2205 con longitudes iguales (medidas desde centro 2209 al ápice). Aunque no tiene por qué ser así. En realizaciones alternativas, los surcos pueden tener diferentes longitudes los unos de los otros, por ejemplo, como longitudes alternas sobre surcos alternos, en donde hay un número par de surcos. Además, los ápices pueden ser redondeados, y no puntiagudos.

40 Normalmente, los surcos tienen una conicidad uniforme en ancho y profundidad desde el centro 2209 a su ápice respectivo. Sin embargo, otras configuraciones son posibles, tales como un surco que sigue un ancho o profundidad constantes, hasta un alcance radial en particular, tal como 30 - 60% de su longitud, y luego se estrecha o se vuelve más profundo hacia su ápice. Alternativamente, un surco puede comenzar estrecho en el centro 2209, ensanchándose hasta una región más ancha cerca de su punto central de longitud y a continuación estrechándose hacia su ápice. No obstante, otras posibilidades, no descritas en esta memoria, concuerdan con el patrón estrellado.

45 En un tubo de 0,3 ml, el ancho de cada surco 2205 en su punto más ancho es normalmente de alrededor de 50 micras, y el ancho normalmente se estrecha de forma uniforme desde un punto más ancho, próximo a o en el centro 2209, del ápice.

50 En un tubo de 0,3 ml, la profundidad de un surco en el punto más profundo es normalmente de alrededor de 25 - 50 micras y la profundidad normalmente se reduce uniformemente desde un punto más profundo, próximo a o en el centro 2209, de un ápice.

55 En un tubo de 0,3 ml, el radio de la estrella formada a partir de los surcos, medido como la distancia más corta desde el centro 2209 al ápice, es normalmente de alrededor de 0,5 mm, aunque puede ser de 0,1 - 1 mm o de 0,3 - 2 mm.

60 En otra realización, en un tubo de 0,3 ml, los surcos deben ser redondeados y tener una profundidad inferior a 100 micras, o inferior a 50 micras, o inferior a 25 micras.

65

El patrón estrellado normalmente tiene un eje de simetría de rotación, el eje está dispuesto perpendicular respecto al fondo del tubo y a través del centro 2209, de modo que los surcos están dispuestos simétricamente alrededor del eje de rotación. Con esto se quiere decir que para los surcos  $n$ , una rotación de  $2\pi/n$  alrededor del eje central (rotacional) puede hacer que cada surco coincida con el surco adyacente.

La forma estrellada mostrada en la FIG. 13B no es limitante en tanto en cuando comprende una serie de surcos 2205 dispuestos radialmente 2205, y un anillo circular opcional 2207. Pueden utilizarse otras geometrías en forma de estrella y, en función de la facilidad de fabricación, pueden preferirse. Por ejemplo, puede crearse una estrella simplemente superponiendo dos o más polígonos con un centro común, pero desplazados rotacionalmente entre sí alrededor del eje central. (Véase, por ejemplo "polígonos estrellados" descritos en el sitio web [mathworld.wolfram.com/StarPolygon.html](http://mathworld.wolfram.com/StarPolygon.html).) Dichas formas alternativas para crear patrones en forma de estrella pueden utilizarse aquí.

#### 15 Dispensador de líquido

En diversas realizaciones, la preparación de una muestra lista para la PCR para su utilización el posterior diagnóstico utilizando el aparato tal y como se describe en esta memoria, puede incluir uno o más de los siguientes pasos: poner en contacto una muestra de un polinucleótido neutralizado con una mezcla de reactivos para PCR que comprende una enzima polimerasa y una pluralidad de nucleótidos (en algunas realizaciones, la mezcla de reactivos para la PCR puede incluir además un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorogénica selectiva para al menos una parte del plásmido); en algunas realizaciones, la mezcla de reactivos para la PCR puede tener la forma de uno o más pellets liofilizados, almacenados en un receptáculo de un soporte, y el método puede incluir además, reconstituir el pellet para PCR con líquido para crear una solución de mezcla de reactivos para PCR. Pueden realizarse varias, tales como una o más, de las operaciones de transferencia de líquido asociadas con los pasos indicados mediante un cabezal de pipeteado automatizado.

Un dispensador de líquido adecuado para su utilización con el aparato aquí descrito, comprende uno o más sensores; un colector; una o más bombas en comunicación fluida con el colector; uno o más cabezales dispensadores en comunicación fluida con el colector; y conexiones eléctricas que reciben señales eléctricas de un controlador externo, en donde el dispensador de líquido no incluye una entrada o salida para fluido, salvo a través de una o más bombas.

En la FIG. 18 se muestra una vista transversal de un dispensador de líquido ejemplar. El dispensador de líquido está configurado para efectuar operaciones de transferencia de fluidos en dos o más soportes simultáneamente. Tal y como se muestra en la FIG. 18, el dispensador de líquido 2105 puede estar montado en un brazo pórtico con una libertad translacional de tres grados. Otras realizaciones pueden comprender un brazo pórtico con una libertad translacional de menos de tres grados. El montaje se realizará mediante sujeción mecánica, tal como con uno o más tornillos, como se muestra en el lateral izquierdo de la FIG. 18. Un brazo pórtico adecuado comprende tres ejes de patines con transmisión por correa accionados por motores de pasos codificados. Los patines del brazo pórtico pueden montarse en un marco estructural de aluminio u otro material equivalente, particularmente un metal o una aleación de metal. Los patines alineados en las direcciones  $x$ - e  $y$ - (dirigidas hacia fuera y hacia en el plano de la FIG. 18, respectivamente) facilitan el movimiento del brazo pórtico a través de una matriz de soportes y en una dirección a lo largo de un soporte determinado, respectivamente.

El eje  $z$  del brazo pórtico puede estar asociado con un sensor de fuerza variable que puede configurarse para controlar el alcance de movimiento vertical del cabezal durante las operaciones de recogida de la punta y de dispensado de fluidos. Por ejemplo, en la FIG. 18 se muestra un cabezal de pipeteado 1803 que puede montarse de modo que puede detectarse una fuerza que actúa hacia arriba contra el cabezal a través de un movimiento relativo entre el cabezal y un sensor de fuerza. Por ejemplo, cuando el cabezal de pipeteado 1803 aplica una fuerza contra una pipeta desechable situada en la gradilla por debajo de él, se transmite una fuerza hacia arriba que hace que el cabezal 1803 gire alrededor del punto de giro 2102, haciendo que el tornillo fijo 2104 haga presión contra un sensor de fuerza. A su vez, el sensor de fuerza se comunica con un procesador o controlador que controla al menos el movimiento vertical del dispensador de líquido de modo que el procesador o controlador puede enviar instrucciones para detener el movimiento vertical del dispensador de líquido tras recibir la señal adecuada desde el sensor de fuerza. Un sensor de fuerza ejemplar adecuado para su utilización según la presente memoria, está disponible de Honeywell; su especificación se muestra en un anexo a la presente memoria. El mecanismo del sensor de fuerza mostrado en la FIG. 18 es ejemplar y uno de los muchos posibles mecanismos que pueden controlar el cabezal durante las operaciones de recogida y dispensado de fluidos. Por ejemplo, como alternativa al sensor de fuerza, puede utilizarse un sensor de parada que detecta la interrupción del movimiento vertical de uno o más cabezales de dispensado tras entrar en contacto con un tubo de muestras o con un soporte para reactivos. Por lo tanto, tal y como entenderán los expertos en la técnica, el dispensador de líquido según se describe en esta memoria no se limita al mecanismo específico mostrado en la FIG. 18.



El dispensador de líquido comprende además una serie de cabezales individuales a resorte 1803, en donde cada cabezal está configurado para recibir una punta de pipeta de entre una o más puntas de pipeta de un soporte. El dispensador de líquido puede estar configurado además de modo que dos cabezales no aceptan puntas de pipeta del mismo soporte. Las FIG. 1 9A-C, por ejemplo, ilustran cuatro cabezales individuales a resorte 1803, pero se entiende que el dispensador no se limita a ese número. Por ejemplo, otros números incluyen 2, 3, 5, 6, 8, 10, o 12. Además, los cabezales individuales a resorte 1803 se muestran dispuestos en paralelo entre sí, aunque pueden configurarse con otras disposiciones.

El dispensador de líquido puede comprender además una bomba controlada por ordenador 2100 conectada al colector de distribución 1802 con un sistema de válvulas asociado controlado por ordenador. El colector de distribución 1802 puede comprender una serie de válvulas, tales como válvulas solenoides 1801 configuradas para controlar el flujo de aire a través de las puntas de pipeta: en una realización ejemplar, hay dos válvulas para cada pipeta y una válvula adicional para ventilar la bomba. Así, en un dispensador de líquido con nueve cabezales de pipetas hay nueve válvulas. En otra realización se prevé una válvula para cada pipeta, y una válvula adicional para ventilar la bomba. Sin embargo, el colector de distribución no se limita al que comprende exactamente nueve válvulas solenoides.

El dispensador de líquido está configurado además para aspirar o dispensar fluidos en relación con el análisis o con la preparación de soluciones de dos o más muestras. El dispensador de líquido también está configurado para dispensar líquido en un cartucho microfluídico. Adicionalmente, el dispensador de líquido está configurado para recibir o dispensar, en una sola operación, una cantidad de 1,0 ml de fluido o menos, tal como una cantidad de fluido en el intervalo de 10 nl - 1 ml.

El dispensador de líquido está configurado de modo que la bomba 2100 bombea aire dentro y fuera del colector de distribución. El colector de distribución comprende una red microfluídica que distribuye aire de forma uniforme entre la una o más válvulas. Así, controlando el flujo de aire a través del colector y de las diversas válvulas, puede variarse la presión sobre los cabezales de pipetas de modo que se extrae o se expulsa líquido desde una punta de pipeta conectada al respectivo cabezal de pipeta. De este modo no es necesario suministrar aire comprimido a través de una manguera al dispensador de líquido. Tampoco es necesario proporcionar líneas de líquido al cabezal dispensador. Además, ningún reactivo líquido ni ninguna muestra líquida del soporte entra en parte alguna del dispensador de líquido, incluido el colector. Este aspecto reduce las complicaciones que se derivan de la introducción de burbujas de aire en las muestras o reactivos líquidos. En la FIG. 20 se muestra una configuración ejemplar de un colector de distribución.

Tal y como se muestra en las diversas figuras, el dispensador de líquido entero se mueve arriba y abajo del eje z en una unidad autocontenida que tiene solo conexiones eléctricas a un procesador o controlador, y conexiones mecánicas con el brazo pòrtico. Los movimientos traslacionales en tres dimensiones del dispensador de líquido pueden controlarse mediante un microprocesador, tal como un procesador 980. El dispensador no tiene asociada ninguna línea de manipulación de fluidos. Este diseño permite la simplificación del montaje del instrumento, reduce la contaminación del instrumento y la contaminación cruzada de las muestras entre las diferentes instancias de funcionamiento del aparato, aumenta la eficiencia del bombeo (volumen muerto mínimo) y permite un mantenimiento y reparación sencillos del dispositivo. Esta disposición también facilita la actualización de las características del dispositivo dispensador, tal como el control individual e independiente de la bomba de cada dispensador, conexión o desconexión individual de pipeta, capacidad para controlar la inclinación de las pipetas, etc.

Otro aspecto del aparato se refiere a un verificador de identificación de muestras configurado para comprobar la identidad de cada una de la serie de muestras que contienen ácido nucleico. Dichos verificadores de identificación de muestras pueden ser lectores de caracteres ópticos, lectores de códigos de barras, o lectores de tarjetas de radiofrecuencia, u otros lectores adecuados, según tengan acceso los expertos en la técnica. Un verificador de identificación de muestras puede estar montado en el brazo pòrtico, o sujeto al dispensador de líquido de modo que se mueve en concierto con el dispensador de líquido. Alternativamente, el verificador de identificación de muestras puede estar montado por separado y puede moverse independientemente del dispensador de líquido. En las FIG. 21 y 22, por ejemplo, el verificador de identificación de muestras 1701 es un lector de códigos de barras sujeto al dispensador de líquido. El campo de visión del escáner de códigos de barras 1701 es no lineal, lo que le permite detectar la luz reflejada por el espejo 2300 del tubo de muestras clínicas con código de barras 2301 de la gradilla desechable 2302. El escáner de códigos de barras lee el código de barras del tubo de muestras clínicas, identificando así la presencia y características del tubo de muestras. Como se utiliza un espejo, el escáner está configurado para leer un código de barras impreso en imagen especular (es decir, reflejado en la forma normal), o para leer una imagen especular de un código de barras normal y convertir la imagen especular en forma no reflejada a través de un algoritmo informático.

El verificador de identificación de muestras está configurado para comunicar información de etiquetas que ha detectado o leído a un procesador o controlador del aparato, permitiendo así asociar la información identificativa de las muestras con resultados diagnósticos y otra información asociado a la preparación, extracción y amplificación del ácido nucleico contenido en ellas.

En la FIG. 23, el verificador de identificación de muestras está colocado para leer datos de un cartucho microfluídico.

En determinadas realizaciones, el dispensador de líquido comprende además uno o más sensores 2001 (por ej. sensores infrarrojos) cada uno de los cuales detecta la presencia de una punta de pipeta en una gradilla. En la FIG. 24, por ejemplo, un sensor de infrarrojos 2001 puede incorporar un emisor de infrarrojos colocado enfrente, de manera que la presencia de una punta de pipeta desechable 2000 obstruye la línea de visión entre el emisor y el detector, permitiendo así la determinación de la presencia o ausencia de la punta de pipeta. Las pipetas desechables están configuradas en perpendicular a la placa de extracción-alineación de pipetas 2003 tal y como se describe en esta memoria.

El dispensador de líquido también puede operar en conjunción con una placa motorizada configurada para extraer las pipetas y alinearlas durante el dispensado de fluido en un cartucho microfluídico, tal y como se describe en esta memoria.

Las FIG. 25A y 25B muestran un dispositivo ejemplar para extraer puntas de pipeta de un dispensador de líquido tal y como se describe en esta memoria. Las puntas de pipeta están alineadas, todas con la misma inclinación, sobre sus respectivos receptáculos (por encima de una funda para punta de pipeta) en un soporte. Sobre los receptáculos se encuentra una placa metálica con orificios alargados. Las puntas de pipeta se introducen parcialmente hacia abajo hacia la funda a través de los orificios alargados, y la placa metálica se mueve a lo largo de modo que las puntas de pipeta quedan sujetas por la parte alargada de los orificios. Cuando se mueve el dispensador de líquido hacia arriba, las puntas de pipeta se separan de sus cabezales respectivos. Al volver a mover la placa metálica hacia atrás hacia su posición inicial, las puntas de pipeta permanecen sin moverse en sus respectivos receptáculos.

Conjunto de calentamiento y separador magnético

En la FIG. 18 (panel derecho) se muestra una vista transversal de una unidad de calentamiento de un conjunto de calentamiento ejemplar 1401. El conjunto de calentamiento comprende una o más unidades de calentamiento independientemente controlables, cada una de las cuales comprende un bloque calentador. En determinadas realizaciones hay 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 25, 30, 32, 36, 40, 48, o 50 unidades de calentamiento en un conjunto de calentamiento. Aun así, otros números de unidades de calentamiento, tales como cualquier número entre 6 y 100 concuerdan con esta descripción. El uno o más bloques calentadores pueden estar fabricados en una sola pieza de metal u otro material, o bien pueden fabricarse independientemente los unos de los otros o conectados entre sí de alguna forma. Así, el término conjunto de calentamiento connota una serie de unidades de calentamiento, pero no exige que las unidades de calentamiento o sus bloques calentadores respectivos estén sujetos directa o indirectamente entre sí. El conjunto de calentamiento puede estar configurado de modo que cada unidad de calentamiento calienta independientemente uno de dicho uno o más tubo de procesos 1402, por ejemplo, permitiendo que cada uno de los bloques calentadores se controlen independientemente, tal y como se describe en esta memoria. Según la configuración de la FIG. 26, el conjunto de calentamiento comprende uno o más bloques calentadores 1403 cada uno de los cuales está configurado para alinearse y aplicar calor a un tubo de procesos 1402. Cada bloque calentador 1403 puede sujetarse y conectarse opcionalmente al resto del aparato mediante una tira 1408 y uno o más tornillos 1407 u otros medios adhesivos. Este mecanismo de sujeción no se limita a esta configuración.

A pesar de que en la FIG. 26 se muestra una vista transversal de un bloque calentador 1403, se entenderá que dicha vista concuerda también con la inclusión de múltiples bloques calentadores alineados en paralelo entre sí, de modo que sus puntos centrales geométricos se encuentran en un solo eje lineal, aunque no se limita a esta configuración. Así, dicho uno o más bloques calentadores pueden colocarse a diferentes alturas los unos respecto a los otros, en grupos o, alternativamente, individualmente, o bien pueden estar escalonados entre sí de izquierda a derecha como en la FIG. 26 (panel de la derecha), en grupo o alternativamente, individualmente. Adicionalmente, y en otras realizaciones, los bloques calentadores no están alineados en paralelo entre sí, sino que están dispuestos en ángulos los unos respecto a los otros, no siendo los ángulos de 180°. Además, aunque el bloque calentador mostrado en la FIG. 26 puede ser uno de entre diversos idénticos en tamaño, concuerda con la tecnología aquí presentada que uno o más bloques calentadores estén configurados para recibir y calentar tubos de procesos de diferentes tamaños.

El bloque calentador ejemplar 1403 de la FIG. 26 (panel de la derecha) está configurado para contar con una cavidad interna que rodea parcialmente una porción inferior del tubo de procesos 1402. En el bloque calentador de la FIG. 26, la cavidad interna rodea la parte inferior del tubo de procesos 1402 por dos lados, aunque no por el lado frontal (lado puesto al imán 1404), ni tampoco por el lado posterior (lado del imán 1404). En otras realizaciones, el bloque calentador 1403 está configurado para rodear la parte inferior del tubo de procesos 1402 por tres lados, incluido el lado frontal. Sin embargo, son posibles otras configuraciones de bloque calentador 1403, en línea con el objetivo de conseguir un calentamiento rápido y uniforme del contenido de los tubos de proceso 1402. En determinadas realizaciones, el bloque calentador tiene la forma adecuada para adecuarse estrechamente a la forma del tubo de procesos 1402 para aumentar el área superficial del bloque calentador que está en contacto con el tubo

de procesos durante el calentamiento del tubo de procesos. Así, aunque el bloque calentador 1403 ejemplar se muestra con una cavidad cónica con fondo curvado en donde se aloja un tubo de procesos complementario, otras realizaciones de bloque calentador 1403 tienen, por ejemplo, una cavidad cilíndrica con un fondo plano. Aun así, otras realizaciones de bloque calentador 1403 pueden tener una cavidad interna rectilínea adecuada para alojar una cubeta.

Además, aunque el bloque calentador 1403 se muestra con una forma en L en la FIG. 26, que ayuda a la transmisión de calor desde el elemento de calentamiento 1501 y a sujetar uno o más bloques calentadores al resto del aparato, no es necesario que tenga esta forma, tal y como se describe en esta memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones el elemento de calentamiento 1501 puede colocarse directamente bajo el tubo de procesos 1402.

Cada bloque calentador 1403 está configurado para tener una masa térmica baja, con una elevada integridad estructural y permitiendo que un imán se deslice por los bloques calentadores y el tubo de procesos con facilidad. Una masa térmica baja resulta ventajosa ya que permite aplicar o disipar el calor rápidamente, aumentando la eficiencia de calentamiento y de enfriamiento del aparato en el que está situado el conjunto de calentamiento. Los factores que contribuyen a una masa térmica baja incluyen el material del cual está fabricado un bloque calentador, y la forma que adopta. Los bloques calentadores 1403 pueden, por lo tanto, estar fabricados de materiales tales como aluminio, plata, oro y cobre, y aleaciones de ellos, aunque no se limita a estos materiales.

En una realización, el bloque calentador 1403 tiene una masa de ~ 10 gramos y está configurado para calentar muestras líquidas con un volumen de entre 1,2 ml y 10  $\mu$ l. El calentamiento desde temperatura ambiente a 65 °C de 1 ml de muestra biológica puede conseguirse en menos de 3 minutos, y de 10  $\mu$ l de un líquido acuoso, tal como un tampón de liberación, hasta 85 °C (desde 50 °C) en menos de 2 minutos. El bloque calentador 1403 puede enfriar hasta 50 °C desde 85 °C en menos de 3 minutos. El bloque calentador 1403 puede configurarse para tener una uniformidad de temperatura de 65  $\pm$  4 °C para el calentamiento de hasta 1 ml de muestra y 85  $\pm$  3 °C para el calentamiento de 10  $\mu$ l de tampón de liberación. Aunque estos intervalos son los típicos, el bloque calentador puede escalarse adecuadamente para calentar otros volúmenes de líquidos a velocidades más lentas y más rápidas que las descritas. Este aspecto de la tecnología es un aspecto que contribuye a conseguir una rápida extracción de los ácidos nucleicos de múltiples muestras mediante la combinación de pasos de procesamiento de líquidos, calentamiento rápido para lisis, captura y liberación de ADN y separación magnética, tal y como se describe en esta memoria.

Aunque no se muestra en la FIG. 26, el conjunto de calentamiento 1401 puede también estar opcionalmente contenido en una caja que rodea los bloques calentadores 1403. La caja puede configurarse para permitir un flujo de aire suficiente alrededor del tubo de procesos, de modo que no se inhibe significativamente la velocidad de enfriamiento. La caja puede incorporar un hueco entre ella y los bloques calentadores para facilitar el enfriamiento. La caja puede estar fabricada en plástico, aunque no se limita a dicho material. La caja está configurada normalmente para tener un aspecto estético para el usuario.

Tal y como se muestra en la FIG. 26, el conjunto de calentamiento 1401 puede comprender también uno o más elementos de calentamiento (por ej., una resistencia de potencia) 1501 cada uno de los cuales está configurado para interconectarse térmicamente con un bloque calentador 1403 y disipar calor. Por ejemplo, en una realización, una resistencia de potencia puede disipar hasta 25 vatios de potencia. Una resistencia de potencia resulta ventajosa, porque, normalmente, es la alternativa de bajo coste a un elemento de calentamiento. Otros componentes electrónicos ya existentes en el mercado, tales como transistores de potencia, también pueden utilizarse para detectar la temperatura y el calor. Aunque el elemento de calentamiento 1501 se muestra colocado en el fondo del bloque calentador 1403, se entiende que otras configuraciones concuerdan con el conjunto aquí descrito: por ejemplo, el elemento de calentamiento 1501 puede colocarse en la parte superior o en el lateral de cada bloque calentador 1403, o directamente debajo del tubo de procesos 1402. En otras realizaciones, el elemento de calentamiento tiene otras formas y no tiene una sección transversal rectangular y puede ser curvado, tal como esférico o elipsoidal. Adicionalmente, el elemento de calentamiento puede estar moldeado o formado de modo que se conforma, estrecha o aproximadamente, a la forma del fondo del tubo de procesos. Aunque no se muestra en la FIG. 26, el conjunto de calentamiento también puede comprender un material de interfaz (por ej., Q-pad de Berquist, o grasa térmica) entre el elemento de calentamiento 1501 y el bloque calentador 1403 para permitir un buen contacto térmico entre el elemento y el bloque calentador.

En la realización mostrada en la FIG. 26, el conjunto de calentamiento comprende además uno o más sensores de temperatura 1502, tal como detectores resistivos de temperatura, para detectar las temperaturas respectivas de cada bloque calentador 1403. Aunque se muestra un sensor de temperatura 1502 colocado en el fondo del bloque calentador 1403, se entiende que otras configuraciones concuerdan con el conjunto aquí descrito: por ejemplo, el sensor de temperatura puede estar colocado en la parte superior o en el lateral de cada bloque calentador 1403, o más próximo al fondo del tubo de procesos 1402 pero no tan cerca como para impedir su calentamiento uniforme. Tal y como se muestra En la realización de la FIG. 26, el conjunto de calentamiento puede comprender además un material de interfaz (por ej., Q-pad de Berquist) 1503 configurado para permitir un buen contacto térmico entre el sensor 1502 y el bloque calentador 1403, para garantizar así la precisión de la lectura.

Determinadas realizaciones del aparato de diagnóstico o preparatorio aquí descrito contemplan más de un conjunto de calentamiento, tal y como se describe en esta memoria. Por ejemplo, un solo conjunto de calentamiento puede estar configurado para calentar de forma independiente 6 o 12 tubos de procesos, y puede configurarse un aparato con dos o cuatro de dichos conjuntos de calentamiento.

El aparato aquí descrito comprende además un separador magnético, configurado para separar las partículas magnéticas, comprendiendo el separador: uno o más imanes sujetos a un elemento de soporte; un mecanismo motorizado configurado para mover el elemento de soporte de modo que dicho uno o más imanes se mueven hacia delante y hacia atrás a lo largo de un eje fijo, y, durante al menos una parte del movimiento, dicho uno o más imanes mantienen una proximidad a uno o más receptáculos que contienen las partículas magnéticas en solución; y circuitos de control para controlar el mecanismo motorizado.

El aparato aquí descrito incluye además un separador magnético integrado y calentador, que comprende: un conjunto de calentamiento, en donde el conjunto de calentamiento comprende una pluralidad de unidades de calentamiento independientemente controlables, cada una de las cuales está configurada para recibir y calentar uno de entre una pluralidad de tubos de procesos; uno o más imanes sujetos a un elemento de soporte; un mecanismo motorizado configurado para mover el elemento de soporte de modo que dicho uno o más imanes se mueven hacia atrás y hacia adelante a lo largo de un eje fijo, y durante, al menos, una parte del movimiento dicho uno o más imanes mantienen proximidad respecto a dicho uno o más tubos de procesos del conjunto de calentamiento, en donde dicho uno o más tubos de procesos contienen partículas magnéticas; y circuitos de control para controlar el mecanismo motorizado y para controlar el calentamiento de las unidades de calentamiento .

Normalmente, cada uno de dicho uno o más receptáculos es un tubo de procesos, tal como para efectuar reacciones biológicas. En algunas realizaciones, la proximidad puede definirse como un imán cuya cara se encuentra a menos de 2 mm de la superficie exterior de un tubo de procesos sin estar en contacto con el tubo. Puede definirse incluso como que se encuentra alejado menos de 1 mm sin estar en contacto con el tubo, o alejado entre 1 y 2 mm.

Normalmente, las partículas magnéticas son micropartículas, perlas, o microesferas capaces de unir una o más biomoléculas, tales como polinucleótidos. La separación de las partículas, estando en solución, comprende normalmente recoger y concentrar, o reunir, las partículas en un lugar en el interior de dicho uno o más receptáculos.

En la FIG. 27 se muestra un separador magnético ejemplar 1400, configurado para funcionar en conjunción con un conjunto de calentamiento 1401. El separador magnético 1400 está configurado para mover uno o más imanes en relación con dicho uno o más tubos de procesos 1402. Aunque el imán 1404 mostrado en la FIG. 27 se muestra como un bloque rectangular, su forma no se limitado a esta. Además, la configuración de la FIG. 27 concuerda tanto con la inclusión de un solo imán que se extiende sobre todos los bloques calentadores 1403 o con la inclusión de múltiples imanes funcionando al unísono y alineados para abarcar un subconjunto de los bloques calentadores, por ejemplo, alineados colinealmente en el elemento de soporte. El imán 1404 puede ser de neodimio (por ej., de K & J Magnetics, Inc.) y puede tener una fuerza magnética de 5.000-15.000 gauss (Brmax). Los polos de los imanes 1404 pueden estar dispuestos de modo que un polo está orientado hacia los bloques calentadores 1403 y el otro está orientado en dirección opuesta a los bloques calentadores.

Además, en la realización mostrada en la FIG. 27, el imán 1404 está montado sobre un elemento de soporte 1505 que puede elevarse y bajarse a lo largo de un eje fijo mediante un eje motorizado 1405. El eje fijo puede ser vertical. En la realización mostrada en la FIG. 27, una disposición con engranajes 1406 permite colocar el motor 1601 en perpendicular respecto al eje 1405, ahorrando así espacio en el aparato en el que está situado el separador magnético 1400. En otras realizaciones, el motor está colocado debajo del eje 1405. Se entiende que otras configuraciones están en línea con el movimiento del imán en relación con el tubo de procesos, lo que incluye, sin por ello limitarse, mover el imán de lado a lado, o llevar el imán abajo desde arriba. El motor puede estar controlado por ordenador para funcionar a una velocidad en particular; por ejemplo, a una velocidad de rotación que produce un movimiento vertical del imán en el intervalo de

1-20 mm/s. El separador magnético puede así estar configurado para moverse repetitivamente, por ej., arriba y abajo, de lado a lado, o atrás y adelante, a lo largo del mismo eje diversas veces. En algunas realizaciones hay más de un eje que opera bajo control motorizado. La presencia de al menos un segundo eje tiene el efecto de hacer que el movimiento del separador sea más uniforme. En algunas realizaciones, el elemento de soporte se monta sobre un elemento de guía más para garantizar que el elemento de soporte, por ejemplo, no se vuelca, retuerce o da bandazos, ni experimenta otros movimientos internos mientras se mueve (salvo los producidos por el movimiento controlado a lo largo del eje), reduciendo así la eficacia de la separación.

El elemento de soporte también puede estar configurado para mover los imanes entre una primera posición, situada alejada de dicho uno o más receptáculos, y una segunda posición situada con proximidad a dicho uno o más receptáculos, y está configurado además para moverse en una amplitud alrededor de la segunda posición en la que

la amplitud es más pequeña que una distancia entre la primera posición y la segunda posición medida a lo largo del eje.

5 En las FIG. 26 y 27, el conjunto de calentamiento 1401 y el separador magnético 1400 pueden controlarse mediante circuitos electrónicos, tales como en tarjetas de circuitos impresos 1409. Los circuitos electrónicos 1409 pueden estar configurados para hacer que el conjunto de calentamiento 1401 aplique calor independientemente al tubo de procesos 1402 para reducir el coste de calentamiento y detección. También puede estar configurado para hacer que el separador magnético 1400 se mueva repetitivamente en relación con el tubo de procesos 1402. Los circuitos electrónicos 1409 pueden estar integrados en una sola tarjeta de circuitos impresos (PCB). Durante el montaje, una  
10 guía de plástico puede ayudar a mantener cierto espaciado entre los bloques calentadores individuales 1403. Este diseño puede beneficiarse de la utilización de sistemas electrónicos ya existentes en el mercado para controlar una disposición personalizada de bloques calentadores 1403.

15 Aunque no se muestra las FIG. 26 y 27, una caja puede cubrir el separador magnético 1400 y el conjunto de calentamiento 1401 para proteger los subconjuntos que se encuentran debajo y por estética. La caja también puede estar diseñada para mantener los bloques calentadores 1403 espaciados entre sí para garantizar la eficiencia del calentamiento y del enfriamiento. El separador magnético y el conjunto de calentamiento pueden, alternativamente, estar encerrados en cajas separadas. Dicha una o más cajas pueden estar fabricadas de plástico.

20 Ventajosamente, el conjunto de calentamiento y el separador magnético funcionan juntos para permitir que las sucesivas operaciones de calentamiento y separación se realicen sobre materiales líquidos en dicho uno o más tubos de procesos, sin transportar ni los materiales líquidos ni los tubos de procesos a diferentes lugares para realizar el calentamiento y la separación. Dicha operación también resulta ventajosa ya que significa que se utilizan las dos funciones de calentamiento y separación, aunque son independientes la una de la otra, en la preparación de  
25 muestras y pueden efectuarse con un aparato compacto y eficiente.

#### Cargador automático de cartuchos

30 En la FIG. 28 se muestra una realización ejemplar de un sistema de amplificación-detección por PCR 2900 para su utilización con un cartucho microfluídico. El sistema 2900 realiza y automatiza el proceso de la PCR sobre múltiples muestras en paralelo que contienen ácido nucleico. El sistema 2900 comprende un depósito 2907 para los cartuchos microfluídicos no utilizados, un cargador automático de cartuchos, un compartimiento de recepción para el cartucho microfluídico, un detector, y una bandeja de residuos 2903 configurada para recibir cartuchos microfluídicos usados. En una realización, el cargador automático de cartuchos comprende un paquete de cartuchos 2901, y un impulsor de  
35 cartuchos 2904.

A efectos ilustrativos, el sistema 2900, está configurado de modo que un cartucho microfluídico se mueve en un plano y de forma lineal desde el depósito hasta el compartimiento de recepción, a la papelera, pero no es necesario que esté dispuesto así. Por ejemplo, la papelera para cartuchos usados 2903 puede estar alineada ortogonalmente, o en cualquier otro ángulo, respecto al compartimiento de recepción, tal como dispuesto detrás de él. Alternativamente, cada elemento (cargador automático de cartuchos 2901, compartimiento de recepción 2902, y papelera para cartuchos usados 2903) puede configurarse de forma escalonada, de modo que el paquete de cartuchos 2901 se encuentra en el mismo nivel, o en un nivel superior o en un nivel inferior, que el sistema microfluídico de amplificación-detección por PCR 2902 y el sistema microfluídico de amplificación-detección por PCR 2902 se encuentra en el mismo nivel, o en un nivel superior o en un nivel inferior que la papelera para cartuchos usados 2903. Otra configuración puede ser que cada uno de los tres elementos no esté dispuesto linealmente, sino en ángulo unos respecto a los otros, aunque dentro del mismo plano.

50 La FIG. 28 ilustra el paquete de cartuchos 2901 y la papelera para cartuchos usados 2903 situada por debajo del plano del compartimiento de recepción, y un sistema de detección 2908 sobre el plano. Esta configuración es ejemplar y se entiende que dichos elementos pueden estar colocados por encima o por debajo del plano en otras realizaciones.

55 La FIG. 29 ilustra un depósito de cartuchos microfluídicos sin usar. El depósito puede estar configurado para recibir una serie de cartuchos cargados individualmente y apilados individualmente, o bien estar configurado para recibir un paquete de cartuchos. Un paquete de cartuchos ejemplar incluye 24 cartuchos. El depósito puede estar formado por una jaula 2910 de cualquier material que puede o no ser transparente. Por ejemplo, puede estar fabricado de metal o plástico. El paquete de cartuchos 2901 no se limita a veinticuatro cartuchos 106 por paquete, sino que puede contener cualquier número de 2 a 100. Por ejemplo, otros números tales como 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 36, 40, 48,  
60 50, o 64 son números posibles de cartuchos 106 por paquete. De forma similar, el depósito puede estar configurado para aceptar dichos números de cartuchos, si están apilados individualmente. En una realización, como en la FIG. 29, cada cartucho 2906, apilado individualmente, descansa sobre salientes 2911 que sobresalen de la jaula 2910. No obstante, otras configuraciones son posibles. Por ejemplo, un cartucho 2906 puede descansar sobre ranuras practicadas en las superficies interiores de la jaula 2910. Además, no es necesario colocar el paquete de cartuchos

2901 en una jaula 2910. El paquete de cartuchos 2901 puede incluir las conexiones necesarias para sujetarse firmemente al aparato para cargar los cartuchos 2906.

5 La FIG. 30 es una ilustración de una posición de carga inicial ejemplar de un paquete de cartuchos 2901 de un depósito cuando se cargan las muestras en el cartucho superior del paquete. La FIG. 30 muestra el paquete de cartuchos 2901 por debajo de un plano que contiene un impulsor de cartucho. En otras realizaciones, el paquete de cartuchos 2901 puede encontrarse por encima del plano del impulsor de un cartucho, si el impulsor impulsa el cartucho inferior del soporte; o parcialmente encima y parcialmente debajo de un soporte 2920, si el impulsor empuja un cartucho desde el centro del paquete de cartuchos 2901. En la realización mostrada, un cartucho superior 106 es empujado a lo largo de dos guías 2905. Alternativamente, pueden contemplarse más o menos guías (tales como una o tres) o ninguna, en tanto en cuanto se pueda hacer que un cartucho 2906 se mueva hacia otras posiciones necesarias.

15 En la FIG. 31 se muestra un impulsor de cartucho ejemplar 2904. El impulsor de cartucho 2904 empuja un cartucho 2906 a lo largo de guías 2905, que permiten que un cartucho 2906 se desplace a posiciones calibradas previamente por el mecanismo de un motor de pasos 2930. No obstante, se entiende que el mecanismo para transportar el cartucho 2906 no se limita a un motor de pasos 2930, por lo que otros mecanismos están también en línea con el impulsor de cartuchos descrito en esta memoria 2904.

20 La FIG. 32 muestra un cartucho usado 2906 que ha sido empujado por el impulsor del cartucho 2904 hacia la papelera para cartuchos usados 2903 tras completar un proceso de PCR. La realización muestra un asa canteada 2940 que facilita la manipulación, tal como el vaciado, de la papelera 2903. Sin embargo, se entiende que el asa 2904 no se limita al estilo y forma mostrados.

25 En la FIG. 33 se muestra un paquete de cartuchos ejemplar 2901, antes y después de completar múltiples procesos de PCR. Cuando el impulsor del cartucho 2904 empuja un cartucho 2906 fuera del paquete de cartuchos 2901, un resorte 2950 situado en la parte inferior del paquete de cartuchos vuelve a empujar la superficie inferior de la pila de cartuchos y hace que el cartucho superior esté disponible para la inyección de muestras. El resorte 2950 no se limita en número o tipo. Así, aunque se muestra un solo resorte en espiral o helicoidal, está en línea con la descripción de la presente memoria la utilización de más de un resorte en espiral o helicoidal, tal como 2, 3, o 4, y que alternativamente puede utilizarse muelle metálico, o varios muelles. Alternativamente, puede desplegarse otro mecanismo para forzar los cartuchos hacia arriba, tal como recipientes presurizados neumáticos, hidráulicos o inflables.

35 Debe tenerse en cuenta que los cartuchos microfluídicos, tal y como se describen en esta memoria, que cuentan con un labio elevado a lo largo de sus bordes que permite una mayor facilidad de apilado y/o almacenamiento en un paquete o en un cargador automático, resultan especialmente ventajosos ya que sus labios elevados también dan rigidez a los cartuchos y ayuda a mantener las entradas de fluido de un cartucho lejos de las de otro cartucho durante su almacenamiento y transporte. Las zonas elevadas, que no solo pueden ser labios, a lo largo de cada borde de un cartucho, también ayudan a reducir la fricción entre la superficie inferior de un cartucho y la superficie superior de otro.

#### Compartimento de recepción de cartuchos

45 La presente tecnología se refiere a un aparato y a métodos relacionados para amplificar y realizar análisis diagnósticos de nucleótidos a partir de muestras biológicas. El aparato está configurado para actuar sobre un cartucho microfluídico desechable que contiene múltiples carriles de muestras en paralelo, y comprende una plataforma de instrumentos reutilizable que puede accionar operaciones en el cartucho, puede detectar y analizar los productos de la amplificación por PCR en cada una de los carriles por separado, en todas ellas simultáneamente, o simultáneamente en grupos, y, opcionalmente, puede mostrar los resultados en una interfaz gráfica de usuario.

50 La FIG. 34 muestra una vista en perspectiva de un cartucho ejemplar 200 que contiene múltiples carriles de muestras, y un cabezal lector ejemplar 300 que contiene un aparato de detección para leer señales del cartucho 200. También en la FIG. 34 se muestra una bandeja 110 que, opcionalmente, puede alojar un cartucho 200 antes de la introducción del cartucho en un compartimento de recepción. El aparato descrito en esta memoria puede ejecutar la PCR en tiempo real simultáneamente en una serie de muestras del cartucho 200. Preferiblemente, el número de muestras es 12 muestras, tal como se ilustra con el cartucho ejemplar 200, aunque otros números de muestras tales como 4, 8, 10, 16, 20, 24, 25, 30, 32, 36, 40, y 48 quedan dentro del alcance de la presente invención. En una operación preferida del aparato, una solución lista para PCR que contiene la muestra, y, opcionalmente, uno o más reactivos específicos de analitos (ASR) utiliza otros componentes del aparato, tal y como se describe en esta memoria, antes de su introducción en el cartucho 200.

65 En algunas realizaciones, un aparato incluye compartimento configurado para recibir selectivamente un cartucho microfluídico; al menos una fuente de calor térmicamente acoplada al compartimento; y acoplado a un procesador tal y como se describe en esta memoria, en donde la fuente de calor está configurada para calentar carriles de

muestras individuales del cartucho, y el procesador está configurado para controlar la aplicación de calor en los carriles de muestras individuales, de forma separada, en todas simultáneamente, o simultáneamente en grupos

5 En algunas realizaciones, un aparato incluye además al menos un detector configurado para detectar un polinucleótido (ácido nucleico) en una muestra en una o más de los carriles de muestras individuales, por separado o simultáneamente; en donde el procesador está acoplado al detector para controlar al detector y para recibir señales del detector.

10 El compartimento puede ser una parte del aparato que está configurada para recibir selectivamente el cartucho microfluídico. Por ejemplo, el compartimento y el cartucho microfluídico pueden tener formas complementarias de modo que el cartucho microfluídico se recibe de forma selectiva, por ej., en una sola orientación. Por ejemplo, el cartucho microfluídico puede tener un elemento de registro que encaja en una característica complementaria del compartimento. El elemento de registro puede ser, por ejemplo, un recorte en un borde del cartucho, tal como una esquina cortada, o una o más muescas practicadas en uno o más de los laterales para recibir selectivamente el cartucho, el compartimento puede ayudar al usuario a colocar el cartucho de modo que el aparato pueda operar correctamente en él. De esta forma, se consigue una alineación de cartuchos libre de errores. Además, el cartucho puede estar diseñado para ser ligeramente más pequeño que el compartimento de recepción, aproximadamente 200-300 micras, facilitar la introducción y extracción del cartucho. El aparato puede incluir además un sensor configurado para detectar y el cartucho microfluídico se ha recibido selectivamente.

20 El compartimento también puede estar configurado de modo que diversos componentes del aparato pueden que operar sobre el cartucho microfluídico (fuentes de calor, detectores, elementos de fuerza, y otros similares) están colocados para operar adecuadamente sobre el cartucho microfluídico. Por ejemplo, una fuente de calor de contacto puede colocarse en el compartimento de modo que puede acoplarse térmicamente en puntos distintos de un cartucho microfluídico recibido selectivamente en el compartimento de recepción.

25 Alternativamente, en relación con la alineación de los microcalentadores del módulo de calentamiento con los correspondientes microcomponentes que requieren calor (tales como válvulas, bombas, compuertas, cámaras de reacción, etc.), los microcalentadores pueden estar diseñados para ser ligeramente más grandes que los componentes microfluídicos que requieren calor, de modo que incluso aunque el cartucho esté descentrado respecto al calentador, los componentes individuales siguen funcionando eficazmente.

30 El detector 300 puede ser, por ejemplo, un detector óptico, tal y como se describe en esta memoria. Por ejemplo, el detector puede incluir una fuente de luz que emite luz selectivamente en la banda de absorción de un tinte fluorescente y un detector de luz que detecta luz selectivamente en una banda de emisión del tinte fluorescente, en donde el tinte fluorescente corresponde a una sonda polinucleótida fluorescente o a un fragmento de la misma. Alternativamente, por ejemplo, el detector óptico puede incluir un diodo que ha pasado por un filtro de paso de banda que emite selectivamente luz en la banda de absorción del tinte fluorescente y un fotodiodo que ha pasado por un filtro de paso de banda que detecta selectivamente la luz en la banda de emisión del tinte fluorescente; o, por ejemplo, el detector óptico puede estar configurado para detectar independientemente una pluralidad de tintes fluorescentes con diferentes espectros de emisión fluorescente, en donde cada tinte fluorescente se corresponde a una sonda polinucleótida fluorescente, o a un fragmento de la misma; o, por ejemplo, el detector óptico puede estar configurado para detectar independientemente una pluralidad de tintes fluorescentes en una pluralidad de puntos distintos de un cartucho microfluídico, en donde cada tinte fluorescente corresponde a una sonda polinucleótida fluorescente o a un fragmento de la misma en una muestra diferente.

35 La fuente de calor puede ser, por ejemplo, una fuente de calor tal como un calentador resistivo o red de calentadores resistivos, una fuente de calor reversible, tal como un circuito de transferencia de calor lleno de líquido o un elemento termoeléctrico, una fuente de calor radioactiva, tal como una lámpara de xenón, y otros similares.

40 En realizaciones preferidas, dicha al menos una fuente de calor puede ser una fuente de calor de contacto seleccionada entre un calentador resistivo (o red de los mismos), un radiador, un intercambiador de calor fluido y un dispositivo de Peltier. La fuente de calor de contacto puede configurarse en el compartimento de recepción para acoplarse térmicamente a uno o más puntos distintos de un cartucho microfluídico alojado en el compartimento, en donde los distintos puntos se calientan de forma selectiva. Puede incluirse Al menos una fuente de calor de contacto adicional, en donde cada una de las fuentes de calor de contacto está configurada en el compartimento para acoplarse térmicamente de forma independiente a un punto distinto de un cartucho microfluídico alojado en el compartimento, de modo que los distintos puntos se calientan independientemente. La fuente de calor de contacto puede estar configurada para estar en contacto físico directo con un punto distinto de un cartucho microfluídico alojado en el compartimento. En diversas realizaciones, cada fuente de calor de contacto puede estar configurada para calentar un punto distinto con un diámetro medio en 2 dimensiones de alrededor de 1 milímetros (mm) a alrededor de 15 mm (normalmente, de alrededor de 1 mm a alrededor de 10 mm), o un punto distinto con un área superficial de alrededor de 1 mm<sup>2</sup> a alrededor de 225 mm<sup>2</sup> (normalmente, entre alrededor de 1 mm<sup>2</sup> y alrededor de 100 mm<sup>2</sup>, o en algunas realizaciones entre alrededor de 5 mm<sup>2</sup> y alrededor de 50 mm<sup>2</sup>).

50

55

60

65

En diversas realizaciones, al menos una fuente de calor puede ser una fuente de calor radioactivo configurada para dirigir calor a un punto determinado de un cartucho microfluídico alojado en el compartimento de recepción.

En diversas realizaciones, el aparato incluye uno o más elementos de fuerza configurados para aplicar fuerza y acoplar térmicamente dicha al menos una fuente de calor a al menos una parte del cartucho microfluídico alojado en el compartimento. Dicho uno o más elementos de fuerza puede configurarse para accionar un elemento mecánico en el cartucho microfluídico. Al menos un elemento de fuerza puede accionarse manualmente. Al menos un elemento de fuerza puede acoplarse mecánicamente a una tapa en el compartimento de recepción, de modo que al accionar la tapa se acciona el elemento de fuerza.

En diversas realizaciones, la fuerza aplicada por dicho uno o más elementos de fuerza puede tener como resultado una presión media en una interfaz entre una parte del compartimento de recepción y una parte del cartucho microfluídico de alrededor de 1 psi. La aplicación de fuerza es importante para garantizar el contacto térmico constante entre la oblea del calentador, el reactor de PCR y las microválvulas del cartucho microfluídico.

En diversas realizaciones, el aparato puede incluir además una tapa en el compartimento de recepción, siendo accionable la tapa para excluir al menos parcialmente luz ambiental del compartimento. Por ejemplo, puede tratarse de una tapa deslizante. La tapa puede incluir el detector óptico. La cara principal de la tapa del compartimento puede tener una planaridad variable desde menos de alrededor de 100 micrómetros, por ejemplo, a menos de alrededor de 25 micrómetros. La tapa puede estar configurada para extraerse del aparato. La tapa puede incluir un elemento de cierre que garantice que la tapa está debidamente cerrada antes de efectuar reacciones de amplificación en las muestras del cartucho.

La FIG. 35 muestra una vista transversal esquemática de una parte de un aparato, según se describe en esta memoria, en la que se muestra la introducción de una muestra en un cartucho 200 mediante una punta de pipeta 10 (tal como una pipeta desechable) conectada a un cabezal dispensador automático, y una entrada 202. Aunque no se muestra, hay tantas entradas 202 como muestras a introducir en un cartucho 200. La entrada 202 está configurada preferiblemente para recibir una pipeta o el extremo inferior de un tubo de PCR y así aceptar muestras para su análisis generando un residuo mínimo, y con la introducción mínima de aire. El cartucho 200 está colocado sobre, y en contacto con, un sustrato calentador 400. El cabezal lector 300 está colocado sobre el cartucho 200 y una cubierta para la óptica 310 limita la cantidad de luz ambiental detectada por el cabezal lector.

En diversas realizaciones, un sistema según el descrito en esta memoria puede incluir un cartucho microfluídico y un aparato de diagnóstico.

#### Cartucho microfluídico

Un aspecto de la presente tecnología se refiere a un cartucho microfluídico que incluye una primera, una segunda, y una tercera capa que juntas definen una pluralidad de redes microfluídicas, contemplando cada red diversos componentes configurados para ejecutar la PCR sobre una muestra que contiene uno o más polinucleótidos cuya presencia debe determinarse. El cartucho incluye una o más carriles de muestras en paralelo, en donde cada carril está asociado independientemente con una muestra determinada para su procesamiento simultáneo, y cada carril contiene una red microfluídica configurada independientemente. Un cartucho ejemplar tiene la construcción mostrada en la FIG. 36. La fabricación de dicho cartucho es sencilla, y permite realizar la PCR con un volumen de reacción concentrado (~ 4 µl) y permite un termociclado rápido, a ~20 segundos por ciclo.

Aunque pueden encontrarse otras capas en cartuchos con unos resultados y facilidad de fabricación comparables, el cartucho aquí descrito incluye realizaciones con sólo tres capas en su construcción: un sustrato con un lado superior y un lado inferior opuesto, en donde el sustrato comprende una red microfluídica con una pluralidad de carriles de muestras; un laminado sujeto al lado inferior para sellar los componentes de la red microfluídica y proporcionar una capa de transferencia térmica efectiva entre un elemento de calentamiento específicos y componentes de la red microfluídica; y una etiqueta, colocada en el lado superior que también cubre y sella orificios que se utilizan en el proceso de fabricación para cargar componentes microfluídicos tales como válvulas. Así, realizaciones aquí descritas incluyen cartuchos microfluídicos formados por tres capas, un sustrato, un laminado y una etiqueta, aunque otras características adicionales además de las capas pueden estar en línea con tales caracterizaciones. Las realizaciones aquí descritas incluyen además cartuchos microfluídicos formados esencialmente por tres capas, un sustrato, un laminado y una etiqueta, aunque otras caracterizaciones además de las capas pueden estar en línea con tales caracterizaciones. Además, las realizaciones aquí descritas incluyen, además, cartuchos microfluídicos que comprenden tres capas, un sustrato, un laminado, y una etiqueta.

Una red microfluídica puede incluir, en comunicación fluidica, uno o más componentes seleccionados del grupo formado por: compuertas, válvulas, tales como válvulas accionadas térmicamente, canales orificios de ventilación y cámaras de reacción. Componentes particulares de redes microfluídicas ejemplares se describen en otros puntos de la presente memoria. El cartucho normalmente procesa la muestra aumentando la concentración de un polinucleótido a determinar.



- 5 Un carril de muestras es un conjunto de elementos, independientemente controlables de los elementos que se encuentran en otro carril de muestras, según los cuales una muestra puede ser aceptada y analizada, según los métodos aquí descritos. Un carril comprende al menos una entrada de muestra, y un componente microfluídico, tal y como se describe en esta memoria en relación con un cartucho microfluídico. En algunas realizaciones, cada red microfluídica, comprende un depósito de desbordamiento para contener el líquido en exceso dispensado en el cartucho.
- 10 En diversas realizaciones, un carril puede incluir un puerto de entrada de muestra, una primera válvula accionada térmicamente, una segunda válvula accionada térmicamente, una cámara de reacción PCR, y canales que conectan el puerto de entrada con la cámara de reacción PCR a través de la primera válvula, y canales que conectan la cámara de reacción PCR con un orificio de ventilación de salida a través de la segunda válvula. La válvula de entrada de muestras puede configurarse para aceptar una cantidad de muestra con una presión diferencial, respecto a la presión ambiental, de entre alrededor de 100 a 5000 Pa. Debe tenerse en cuenta que cuanto menor sea la presión de carga, mayor será el tiempo de llenado de un alícuota de la mezcla de reacción para llenar la red microfluídica. Si se aplica más presión se reducirá el tiempo de llenado, pero si no se determina correctamente el tiempo durante el cual se aplica la presión, la muestra podría estallar en el cartucho microfluídico (de no contar con un orificio de ventilación hidrofóbico final). Por lo tanto, el tiempo durante el cual se aplica la presión debe determinarse adecuadamente, por ejemplo, a través de los métodos disponibles para los expertos en la técnica, para evitar el llenado insuficiente o el llenado en exceso: Por lo general, el tiempo de llenado es inversamente proporcional a la viscosidad de la solución. Por ejemplo, la FIG. 37 muestra un cartucho microfluídico que contiene 12 carriles de muestras independientes que puede ejecutar un procesamiento independiente (simultáneo o sucesivo) de las muestras.
- 25 La red microfluídica de cada carril está configurada normalmente para ejecutar la PCR en muestras preparadas para ello, tales como una que contiene ácido nucleico (ADN o ARN) extraído de una muestra biológica en bruto utilizando otros aspectos del aparato, tal y como se describe en esta memoria. Una muestra lista para PCR es, normalmente, una mezcla que comprende reactivos para PCR y la muestra polinucleótida neutralizada, adecuada para ser sometida a condiciones de termociclado que crea amplicones PCR a partir de la muestra polinucleótida neutralizada.
- 30 Por ejemplo, una muestra lista para PCR puede incluir una mezcla de reactivos para PCR que comprende una enzima polimerasa, un plásmido de control positivo, una sonda fluorogénica de hibridación selectiva para al menos una parte del plásmido y una pluralidad de nucleótidos, y al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos.
- 35 Normalmente, la red microfluídica está configurada de modo que el tiempo necesario para que una microgota de muestra pase a través de la entrada a la segunda válvula es inferior al 50% del tiempo necesario para que la muestra se desplace hasta el orificio de salida de ventilación. Normalmente, la red microfluídica está diseñada para tener una mayor resistencia de flujo aguas abajo de las dos válvulas sin aumentar el volumen total de la red microfluídica en comparación con la cantidad necesaria para llenar desde la primera válvula hasta el orificio de ventilación final de la red.
- 40 La FIG. 38A muestra una vista en perspectiva de una parte de un cartucho microfluídico ejemplar 200 según la presente tecnología. Puede hacerse referencia al cartucho como un cartucho para PCR de carriles múltiples con entradas de pipeta específicas 202. En la FIG. 38A se muestran diversos componentes representativos del cartucho 200. Por ejemplo, la entrada de muestra 202 está configurada para recibir una jeringa, una pipeta, o un tubo PCR que contiene una muestra lista para la PCR. Se muestra más de una entrada 202, en donde una entrada opera en conjunción con un solo carril. También son visibles diversos componentes de un circuito microfluídico de cada carril. Por ejemplo, microválvulas 204, y 206, y orificios de ventilación 208, forman parte de un circuito microfluídico de un carril determinado. También se muestra un reactor PCR ultrarrápido 210, el cual, tal y como se describe en esta memoria, es un canal microfluídico lo suficientemente largo como para permitir que se produzca la PCR en una muestra. Sobre el reactor de PCR 210 hay una ventana 212 que permite la detección óptica, tal como detección de fluorescencia de una sustancia fluorescente, tal como una sonda fluorogénica de hibridación, en un reactor PCR 210 cuando se coloca un detector sobre la ventana 212.
- 55 Un cartucho de carriles múltiples está configurado para recibir un número de muestras, en particular realizaciones de 12 muestras, en donde las muestras incluyen al menos una primera muestra y una segunda muestra, en donde la primera muestra y la segunda muestra contienen cada una uno o más polinucleótidos, en una forma adecuada para su amplificación. Los polinucleótidos en cuestión pueden ser los mismos, o diferentes, de otros contenidos en diferentes carriles de un cartucho. El cartucho multicarril comprende al menos una primera red microfluídica y una segunda red microfluídica, adyacentes entre sí, en donde tanto la primera red microfluídica como la segunda red microfluídica son tal y como se describe en esta memoria, y en donde la primera red microfluídica recibe la primera muestra, y en donde la segunda red microfluídica recibe la segunda muestra.
- 60 Las entradas de muestra de los carriles adyacentes se encuentran lo suficientemente separadas las unas de las otras como para evitar la contaminación de una entrada de muestra procedente de otra muestra al introducir una

muestra en un cartucho. En algunas realizaciones, las entradas de muestra están configuradas para evitar la introducción inadvertida de muestras en un carril determinado tras haber introducido ya una muestra en dicho carril.

5 En algunas realizaciones, el cartucho multimuestra tiene un tamaño sustancialmente igual al de una placa de 96 pocillos según se utiliza habitualmente en la técnica. Ventajosamente, puede utilizarse un cartucho con los manipuladores de micro placas utilizados en la técnica. Sin embargo, aún más preferiblemente, se ha diseñado un cartucho multimuestra de modo que el espaciado entre los puntos centrales de las entradas de muestra es de 9 mm, distancia que es un estándar reconocido en el sector. Esto significa que, en determinadas realizaciones, la distancia entre los centros de los orificios de entrada del cartucho que recibe las muestras de tubos para PCR, tal y como se describe en esta memoria, es 9 mm. Los orificios de entrada se fabrican en forma troncocónica, de modo que las puntas de pipeta con un tamaño estándar (volúmenes de 2  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, etc.) encajan cómodamente, accediendo desde el punto más ancho de la entrada. Así, en determinadas realizaciones, una entrada comprende una estructura troncocónica invertida con una altura de al menos 1 mm, y con un diámetro en su punto más ancho que permite la introducción de una punta de pipeta, o entre 1 - 5 mm. El aparato aquí descrito puede adaptarse para adecuarse a otros estándares del sector para puntas de pipeta que no se describen en esta memoria. Normalmente, el volumen de muestra recibida a través de una entrada a una red microfluídica de un carril de muestras oscila entre 1 - 20  $\mu$ l, y puede ser de 3 - 5  $\mu$ l. El orificio de entrada puede estar diseñado para que una punta de pipeta encaje cómodamente y cree un buen sello alrededor de la punta de pipeta, dentro del cono del orificio de entrada. Sin embargo, el cono ha sido diseñado de modo que el sellado es reversible ya que no es deseable que el sello sea tan hermético que el cartucho se salga de su bandeja, O del compartimento de recepción, cuando se levantan las puntas de pipeta tras las operaciones de dispensado.

La FIG. 37 muestra una vista en planta de un cartucho microfluídico ejemplar de 12 carriles. Los puertos de entrada están espaciados 6 mm, de modo que, al ser utilizados junto a un cargador de muestras automatizado con 4 cabezales, espaciados 9 mm de forma equidistante, las entradas pueden cargarse en tres lotes de 4 entradas: por ej., entradas 1, 4, 7, y 10 juntas, seguidas por 2, 5, 8, y 11, y finalmente 3, 6, 9, y 12, en donde las 12 entradas están numeradas de forma consecutiva de un lado al otro del cartucho.

La FIG. 39A muestra una vista en planta de un circuito microfluídico representativo que puede encontrarse en un carril de un cartucho multicarril tal y como se muestra en las FIG. 38A y 38B. La FIG. 39B muestra otra vista en planta (panel izquierdo) de otro circuito microfluídico representativo que puede encontrarse en un carril de un cartucho multicarril, tal como el mostrado en la FIG. 36, y muestra cómo el circuito es visible a través de la construcción del mismo (panel derecho). Otras configuraciones de la red microfluídica estarían en línea con el funcionamiento de los cartuchos y del aparato aquí descritos. En secuencia, se introduce la muestra a través de la entrada de líquido 202, y, opcionalmente, fluye hacia un canal de purga de burbujas 208 (que permite que escapen las burbujas de aire accidentales introducidas en la muestra durante la introducción), y continúa a lo largo de un canal 216. Normalmente, cuando se utiliza un dispensador robotizado de muestra líquida, el volumen se dispensa con la suficiente precisión como para que la formación de burbujas no sea un problema significativo, y la presencia de un canal de purga 208 no sea necesaria.

40 Durante el funcionamiento del cartucho 200 el fluido se manipula como microgota (no mostrada en las FIG. 39A, B). En la FIG. 39A las válvulas 204 y 206 se muestran como válvulas dobles, con una fuente de material térmicamente sensible (también referido como sustancia sensible a la temperatura) en ambos lados del canal en el que están situadas: No obstante, las válvulas 204 y 206 pueden ser, ambas o una de ellas, válvulas sencillas con una fuente de material térmicamente sensible en sólo un lado de los respectivos canales. Las válvulas 204 y 206 están inicialmente abiertas, de modo que puede bombearse una microgota de fluido que contiene la muestra en el reactor de PCR 210 desde el orificio de entrada 202. Tras iniciar un procesamiento, el detector presente sobre el reactor PCR comprueba la presencia de líquido en el reactor de PCR, y a continuación cierra las válvulas 204 y 206 para aislar la mezcla de reacción PCR de los canales de ambos lados.

50 El reactor PCR 210 es un canal microfluídico que se calienta a través de una serie de ciclos para ejecutar la amplificación de los nucleótidos de la muestra, tal y como se describe en esta memoria. Normalmente, el reactor PCR tiene un volumen de 3 - 5  $\mu$ l, en particular, 4  $\mu$ l. Las paredes interiores del canal del reactor PCR son muy uniformes y están pulidas en un acabado brillante (por ejemplo, utilizando un pulido seleccionado entre SPI A1, SPI A2, SPI A3, SPI B1, o SPI B2) durante su fabricación. De este modo se reduce el atrapamiento microscópico de aire en la superficie del reactor PCR, lo que provocaría burbujeo durante los pasos de termociclado. La presencia de burbujas especialmente en la región de detección del reactor PCR puede provocar una falsa lectura de la reacción PCR. Además, el reactor PCR 210 se ha fabricado hueco de modo que se reduce el gradiente de temperatura en la profundidad del canal. La región del cartucho 212 sobre el reactor PCR 210 permite que un detector supervise el progreso de la reacción y también detecte la fluorescencia de una sonda que se une a una cantidad de nucleótido amplificado. La región 212 se ha fabricado en un material más fino que el del resto del cartucho para permitir que el reactor PCR sea más sensible a un ciclo de calentamiento (por ejemplo, para calentarse y enfriarse rápidamente entre temperaturas adecuadas para los pasos de desnaturalización e hibridación), y para reducir resplandores, autofluorescencias, y absorción indebida de fluorescencia. Las válvulas 204 y 206 están cerradas antes de efectuar

el termociclado para evitar la evaporación de líquido, la generación de burbujas, o el movimiento de los fluidos del reactor PCR.

5 La válvula de purga 214 evita que un usuario introduzca una cantidad excesiva de líquido en el cartucho microfluídico, y también evita que las muestras se derramen involuntariamente sobre partes del cartucho. Un usuario puede introducir volúmenes de muestra tan pequeños como para rellenar desde la válvula de eliminación de burbujas hasta la mitad del reactor PCR, o hasta la válvula 204 o más allá de la válvula 204. La utilización de microválvulas evita la pérdida de líquido y de vapor permitiendo así que incluso un reactor parcialmente lleno complete con éxito una reacción de termociclado por PCR. La aplicación de presión (tal como ~1 psi) para poner en contacto el cartucho con el calentador del instrumento ayuda a conseguir un mejor contacto térmico entre el calentador y las partes que reciben calor del cartucho, y también evita que la estructura laminada del fondo se expanda, tal y como sucedería si el canal PCR estuviera parcialmente lleno de líquido y el aire atrapado se expandiera térmicamente durante el termociclado.

15 En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir opcionalmente al menos una válvula hidrofóbica adicional a la válvula de purga.

20 Tras ejecutar la PCR en una muestra y determinar la presencia o ausencia de un polinucleótido de interés, es preferible que la muestra amplificada permanezca en el cartucho y volver a utilizar el cartucho (si quedan abiertas una o más carriles), o desecharlo. Si un usuario quisiera ejecutar un análisis de post amplificación, tal como electroforesis en gel, el usuario puede perforar un orificio a través del laminado del cartucho y recuperar una cantidad - normalmente alrededor de 1,5 microlitro – de producto PCR. El usuario también puede colocar el carril para la PCR individual en una placa estrecha calentada especial, mantenida a una temperatura adecuada para fundir la acera de la válvula, y a continuación aspirar la muestra reaccionada a través del orificio de entrada de dicho carril para la PCR.

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir opcionalmente al menos un depósito configurado para contener residuos.

30 En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir además una etiqueta, tal como una etiqueta legible o escaneable por ordenador. Por ejemplo, la etiqueta puede ser un código de barras, una etiqueta de radiofrecuencia, o uno o más caracteres legibles por ordenador o escaneables ópticamente. La etiqueta puede estar colocada de modo que puede ser leída por un verificador de identificación de muestras, tal y como se describe en esta memoria.

35 En diversas realizaciones, durante el transporte y el almacenamiento, el cartucho microfluídico puede estar rodeado además por una bolsa sellada herméticamente. El cartucho microfluídico puede estar cerrado herméticamente dentro de la bolsa con un gas inerte. El cartucho microfluídico puede ser desechable.

40 El cartucho microfluídico 200 puede estar fabricado según se desee. Normalmente, la capa del cartucho microfluídico incluye una capa de polipropileno u otra etiqueta plástica con adhesivo sensible a la presión (normalmente, entre alrededor de 50 y 150 micras de espesor) configurado para sellar los orificios de carga de cera de las válvulas, atrapar el aire utilizado para el accionamiento de las válvulas, y servir como ubicación para las marcas del operario. Esta capa puede estar formada por dos piezas separadas, aunque un experto en la técnica comprenderá que pueden ser adecuadas muchas realizaciones en las que se utiliza una capa de una sola pieza.

50 Normalmente, la capa de sustrato microfluídico se ha moldeado por inyección de un plástico, preferiblemente un plástico zeonor (polímero de olefina cíclica), con un canal para PCR y canales de válvulas en un primer lado, y canales de ventilación y diversos orificios de entrada, incluidos orificios de carga de cera y entradas de líquido, en un segundo lado (dispuesto hacia la etiqueta). Normalmente, la totalidad de la red microfluídica, incluidos los reactores PCR, los orificios de entrada y las válvulas para aislar las cámaras de reacción PCR, están definidos en un solo sustrato. El sustrato está fabricado de un material que confiere rigidez al sustrato y al cartucho, y es impermeable al aire y al líquido, de modo que la entrada o salida de aire o líquido durante el funcionamiento del cartucho tan sólo es posible a través de la entrada o del orificio de ventilación.

55 Los canales de una red microfluídica de un carril del cartucho 200 tienen normalmente una dimensión transversal de un submilímetro. Por ejemplo, los canales de dicha red pueden tener un ancho y/o profundidad de alrededor de 1 mm o menos (por ej., alrededor de 750 micras o menos, alrededor de 500 micras, o menos, alrededor de 250 micras o menos).

60 El cartucho puede incluir además una capa de laminado termosellable 222 (normalmente entre alrededor de 100 y alrededor de 125 micras de espesor) unido a la superficie inferior de inferior del sustrato microfluídico utilizando, por ejemplo, unión por calor, unión por presión, a una combinación de ellas. La capa del laminado 222 también puede estar fabricada de un material que cuenta con un recubrimiento adhesivo solo en un lado, siendo dicho lado el lado que está en contacto con la cara inferior del sustrato microfluídico. Dicha capa puede estar fabricada a partir de una

65

cinta de una cara con una capa de adhesivo 420, fabricado por 3M. Cintas ejemplares incluyen variantes de una cara de cintas de doble cara con números de producto 9783, 9795, y 9795B, y disponibles de 3M. Otras capas aceptables incluyen cintas basadas en adhesivos a base de micro cápsulas.

5 Durante su utilización, el cartucho 200 está normalmente térmicamente asociado a una matriz de fuentes de calor configurada para operar los componentes (por ej., válvulas, compuertas, y zona de procesamiento 210) del dispositivo. En algunas realizaciones, las fuentes de calor están controladas por un sistema operativo, que controla el dispositivo durante su uso. El sistema operativo incluye un procesador (por ej., un ordenador) configurado para accionar las fuentes de calor según un protocolo deseado. En la solicitud estadounidense núm. 09/819,105, presentada el 28 de marzo, 2001, se describen procesadores configurados para operar dispositivos microfluídicos, solicitud que se incorpora a la presente memoria a modo de referencia.

10 La tabla uno muestra volúmenes, presiones del bombeo y tiempos de operación asociados con los diversos componentes de un cartucho microfluídico.

15 Tabla 1

Operación	Presión de bombeo	Volumen de desplazamiento	Tiempo de operación
Desplazamientos de mezclado	~2 psi	10-25 µl	1-2 minutos
Movimiento de tapones de cera de la válvula	~1-2 psi	<1 µl	5-15 segundos
Operación	Bomba utilizada	Diseño de la bomba	Accionamiento de la bomba
Desplazamientos de mezclado	Bomba Expancel	Igual que la anterior	Igual que la anterior
Movimiento de tapones de cera de la válvula	Bomba termoneumática	1 µl de aire atrapado	Aire atrapado por calor ~70-90 C

20 En algunas realizaciones, un cartucho microfluídico comprende además un elemento de registro que garantiza que el cartucho se introduce en aparato de diagnóstico complementario en una sola orientación, por ejemplo, en un compartimento de recepción del aparato. El elemento de registro puede ser el simple recorte de un borde o de una esquina del cartucho (tal y como se muestra en la FIG. 38A), o puede ser una serie de muescas, u otra configuración de formas que requieren una orientación única de colocación en el aparato.

25 En algunas realizaciones, el cartucho microfluídico comprende dos o más elementos de posicionamiento, o fiduciales, que se utilizan al llenar las válvulas con material térmicamente sensible. Los elementos de posicionamiento pueden estar situados en el sustrato, normalmente en la cara superior del mismo.

30 El cartucho microfluídico también puede ser apilable, para facilitar su almacenamiento o transporte, o puede estar configurado para ser introducido en un dispositivo de carga, tal y como se describe en esta memoria, que contiene una pluralidad de cartuchos próximos los unos de los otros, pero sin estar en contacto. Para conseguir una o ambas de dichas características, el sustrato puede comprender dos aristas, cada una de ellas situada a lo largo de los dos bordes opuestos del cartucho, estando las aristas dispuestas en el lado superior del sustrato. Así, cuando un cartucho tiene un aspecto rectangular (ignorando los elementos de registro o llaves mecánicas), las dos aristas pueden estar situadas a lo largo del lado largo, o a lo largo del lado corto del cartucho.

35 Válvulas

40 Una válvula es un componente microfluídico que tiene normalmente un estado abierto que permite que el material pase a través de un canal desde una posición a un lado de la válvula (por ej., aguas arriba de la válvula) a una posición en el otro lado de la válvula (por ej., aguas abajo de la válvula). En la FIG. 40A se muestra una válvula doble ejemplar. Una válvula doble tiene dos canales, uno a cada lado del canal cuyo flujo regula, mientras que una válvula simple tiene sólo un canal, dispuesto en un lado del canal cuyo flujo regula.

45 Tras accionarla, por ej., aplicando calor, la válvula transiciona a un estado cerrado que evita que el material, tal como una micro gota de una muestra lista para la PCR, pase a lo largo del canal de un lado de la válvula al otro. Por ejemplo, una válvula incluye una o más masas de una sustancia térmicamente sensible (TRS) que es relativamente inmóvil a una primera temperatura y más móvil a una segunda temperatura. Una masa de TRS puede ser una masa esencialmente sólida o una aglomeración de partículas más pequeñas que cooperan para obstruir el paso tras ser accionadas. Ejemplos de TRS incluyen una aleación eutéctica (por ej., una soldadura), cera (por ej., una olefina), polímeros, plásticos, y combinaciones de los mismos. La primera y la segunda temperatura no son lo suficientemente altas para dañar materiales, tales como capas de polímero de un cartucho microfluídico en el que

está situada la válvula. Generalmente, la segunda temperatura es inferior a alrededor de 90 °C y la primera temperatura es inferior a la segunda temperatura (por ej., alrededor de 70 °C o menos).

5 Para cada masa asociada con una válvula, una cámara está en comunicación gaseosa con la masa. Tras calentar el gas (por ej., aire) en la(s) cámara(s) y calentar dicha una o más masas de TRS hasta la segunda temperatura, la presión de gas del interior de una cámara mueve la masa correspondiente hacia el canal obstruyendo el paso de material. Otras válvulas de la red tienen la misma estructura y funcionan del mismo modo que las válvulas aquí descritas.

10 Para que el sellado de la válvula sea sólido y fiable, el canal de flujo en la intersección con la válvula se hace estrecho (150 µm ancho y 150 µm profundidad o más estrecho) y el canal así limitado tiene al menos 0,5 o 1 mm de largo de modo que la cera sella un largo canal estrecho reduciendo así los escapes a través de las paredes del canal. En caso de un mal sellado, se producen escapes de fluido alrededor de las paredes del canal, pasada la cera. Por ello el canal de flujo se estrecha en la medida posible, y se hace más largo, por ej., tan largo como ~1 mm. La  
15 válvula funciona calentando aire en el puerto de carga de la cera, que fuerza a la cera a avanzar de modo que no regresa a su posición original. De esta forma, se calientan el aire y la cera durante el funcionamiento de la válvula.

En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir una válvula curvada, tal y como se muestra en la FIG. 32B (como válvula simple) para reducir la huella de la válvula del cartucho y así reducir el coste por parte de la  
20 fabricación de sustrato microfluídico altamente denso. En la válvula FIG. 40B, el orificio de carga de TRS se encuentra en el centro de la válvula; las estructuras situadas en ambos extremos son una entrada y una salida y se muestran exclusivamente con objeto ilustrativo. Se muestra una válvula simple.

En diversas realizaciones, la red puede incluir una válvula curvada, tal y como se muestra en la FIG. 40C, también  
25 como válvula simple, para reducir la efectiva sección transversal de la microválvula, permitiendo la fabricación de dispositivos microfluídicos densos más baratos.

#### Válvulas de ventilación

30 Una válvula de ventilación hidrofóbica (por ej., una válvula de ventilación en la FIG. 41) es una estructura que permite que salga gas por un canal al tiempo que se limita (por ej., evitando) que salga líquido del canal. Normalmente, las válvulas de ventilación hidrofóbica incluyen una capa de material hidrofóbico poroso (por ej., un filtro poroso, tal como una membrana hidrofóbica porosa de Osmonics) que define una pared del canal. Tal y como se describe en esta memoria, pueden colocarse válvulas hidrofóbicas de ventilación para colocar una microgota de  
35 muestra en un lugar deseado de una red microfluídica.

Las válvulas hidrofóbicas de ventilación del cartucho se construyen preferiblemente de modo que la cantidad de aire que escapa a través de ellas se maximiza mientras se reduce el volumen del canal por debajo de la superficie de las  
40 válvulas de ventilación. Por lo tanto, es preferible que la válvula de ventilación esté construida de modo que cuente con una membrana hidrofóbica de gran área superficial y una sección transversal superficial del microcanal por debajo de la superficie de la válvula.

Las válvulas de purga para la eliminación de burbujas tienen normalmente una longitud de al menos alrededor de 2,5 mm (por ej., al menos alrededor de 5 mm, al menos alrededor de 7,5 mm) a lo largo de un canal. La longitud de  
45 la válvula hidrofóbica de ventilación es normalmente al menos alrededor de 5 veces (por ej., al menos alrededor de 10 veces, al menos alrededor de 20 veces) mayor que la profundidad del canal del interior de la válvula hidrofóbica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la profundidad del canal del interior de la válvula hidrofóbica es de alrededor de 300 micras o menos (por ej., alrededor de 250 micras o menos, alrededor de 200 micras o menos, alrededor de 150 micras o menos). La inclusión de purgas de burbujas es un elemento opcional de la red microfluídica del  
50 cartucho microfluídico aquí descrito

La profundidad del canal del interior de la válvula hidrofóbica es normalmente alrededor del 75% o menos (por ej., alrededor de 65% o menos, alrededor de 60% o menos) respecto a la profundidad del canal aguas arriba y aguas abajo de la válvula hidrofóbica. Por ejemplo, en algunas realizaciones la profundidad del canal del interior de la  
55 válvula hidrofóbica es de alrededor de 150 micras y la profundidad del canal aguas arriba y aguas abajo de la válvula hidrofóbica es de alrededor de 250 micras.

El ancho del canal del interior de la válvula hidrofóbica es normalmente al menos alrededor del 25% más ancho (por ej., al menos alrededor de un 50% más ancho) que el ancho del canal aguas arriba de la válvula y aguas abajo de la  
60 válvula. Por ejemplo, en una realización ejemplar, el ancho del canal del interior de la válvula hidrofóbica es alrededor de 400 micras y el ancho del canal aguas arriba y aguas abajo de la válvula es alrededor de 250 micras.

#### Realización altamente multiplexada

Pueden construirse realizaciones del aparato y del cartucho aquí descritos con circuitos microfluídicos de alta densidad en un solo cartucho que permiten el procesamiento de múltiples muestras en paralelo, o secuencialmente, en un solo cartucho. Los números preferidos de tales múltiples muestras incluyen 36, 40, 48, 50, 64, 72, 80, 96, y 100, pero se entiende que otros números están en línea con el aparato y cartucho aquí descritos, cuando se considere conveniente y práctico.

En consecuencia, se contemplan diferentes configuraciones de carriles, entradas de muestras y redes de calentadores asociados que pueden facilitar el procesamiento de dichos números de muestras en un solo cartucho se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. De forma similar, también entran dentro del alcance de esta descripción configuraciones alternativas de detectores para su utilización en conjunción con dicho cartucho altamente multiplexado.

En una realización ejemplar, un cartucho altamente multiplexado tiene 48 canales PCR, y tiene un control independiente de cada válvula del canal, con 2 bancos de protocolo de termociclado por canal, tal y como se muestra en la FIG. 43. En la realización de la FIG. 43, los calentadores están dispuestos en tres matrices. Los calentadores de las dos zonas de cristal separadas solo aplican calor a las válvulas de la red microfluídica de cada carril. Debido a la baja conductividad térmica del cristal, pueden calentarse las válvulas individualmente por separado las unas de las otras. Esto permite cargar las muestras en el cartucho en momentos diferentes, y pasar a las cámaras de reacción PCR independientemente las unas de las otras. Los calentadores para la PCR están montados sobre un sustrato de silicio – y no se calientan individualmente, sino que permiten el procesamiento en lotes de las muestras de PCR, en donde múltiples muestras de diferentes carriles se amplifican mediante el mismo conjunto de ciclos de calentamiento/enfriamiento. Es preferible que los calentadores de PCR estén dispuestos en 2 bancos (la matriz de calentadores a izquierda y derecha no están en comunicación eléctrica entre sí), permitiendo así un grado separado de control de las muestras.

La FIG. 42 muestra un cartucho representativo, que revela una configuración de entrada para un cartucho de 48 muestras. La configuración de entrada es compatible con una máquina de pipeteado automático que posee cabezales dispensadores situados a una distancia de 9 mm. Por ejemplo, dicha máquina con 4 cabezales puede cargar 4 entradas a la vez, en 12 pasos discretos, del cartucho de la FIG. 42.

La FIG. 44 muestra un primer plano de un espacio ejemplar de las válvulas y carriles en carriles adyacentes de un cartucho microfluídico de muestras múltiples.

Las FIG. 45 y 46 muestran un primer plano de, respectivamente, matrices de calentadores y entradas del cartucho ejemplar mostrado en la FIG. 44.

Las FIG. 47A - 47C muestran diversas vistas de una realización de un cartucho altamente multiplexado configurado radialmente, con una serie de entradas, carriles microfluídicas y zonas de reacción PCR.

Las diversas realizaciones mostradas en las FIG. 42 - 47C son compatibles con dispensadores de líquidos, compartimentos de recepción, y detectores configurados de forma diferente respecto a los ejemplos específicos aquí descritos.

En otra realización preferida (no mostrada en las FIG.), un cartucho y un aparato están configurados de modo que el cabezal lector no cubre las entradas de muestras, permitiendo así la carga de muestras separadas mientras otras muestras están siendo sometidas a termociclado por PCR.

Configuraciones de calentador para garantizar el calentamiento uniforme de una zona

Otro aspecto del aparato aquí descrito se refiere a un método y aparato para controlar de forma uniforme el calentamiento de una zona de una red microfluídica que incluye, sin por ello limitarse, uno o más componentes microfluídicos. En una realización ejemplar, múltiples calentadores pueden configurarse para calentar simultánea y uniformemente una zona, tal como la zona de reacción PCR, del cartucho microfluídico.

En realizaciones preferidas, un cartucho microfluídico con una red microfluídica que comprende uno o más componentes microfluídicos se pone en contacto con una fuente de calor, en el interior de un aparato debidamente configurado. La fuente de calor está configurada de modo que determinados elementos de calentamiento están colocados para calentar componentes específicos de la red microfluídica del cartucho.

La FIG. 48 muestra una vista transversal de un cartucho microfluídico ejemplar para mostrar la posición relativa del canal PCR en relación con los calentadores cuando el cartucho está colocado en el instrumento. La vista de la FIG. 48 también se refiere a una vista isométrica transversal del cartucho que se encuentra sobre la oblea del calentador. Se muestra una vista en perspectiva de una ventana 903 sobre el canal PCR del cartucho. Se muestra un canal PCR 901 (por ejemplo, 150  $\mu$  de profundidad x 700  $\mu$  de ancho), en una capa superior del cartucho. Una capa de laminado 905 del cartucho (por ejemplo, con un espesor de 125  $\mu$ ) está directamente debajo del canal PCR 901.

Otra capa de laminado térmico intermedio 907 del cartucho (por ejemplo, 125  $\mu$  de espesor) se encuentra directamente debajo de la capa de laminado 905. Los calentadores están situados en otra capa 913 directamente debajo del laminado térmico intermedio. Los calentadores están fotolitográficamente definidos e incorporan capas de oro grabado (normalmente, con un espesor de alrededor de 3.000 Å). Se depositan capas de 400 Å de TiW encima y debajo de la capa de oro que actúan como capas de adhesión. El sustrato utilizado es cristal, sílice fundido u oblea de cuarzo con un espesor de 0,4 mm, 0,5 mm o 0,7 mm o 1 mm. Una fina capa eléctricamente aislante de 2  $\mu$ m de óxido de silicio sirve como capa aislante sobre la capa de metal. Pueden depositarse capas finas eléctricamente aislantes adicionales, tales como 2-4  $\mu$ m de Parylene, sobre la superficie de óxido de silicio. También se muestran dos calentadores largos 909 y 911, tal y como se describe en esta memoria.

En referencia a las FIG. 49A y 49B, la zona de reacción PCR 1001, normalmente con un volumen de  $\sim 1,6 \mu$ l, está configurada con un lado largo y un lado corto, cada uno con un elemento de calentamiento asociado. Por lo tanto, el aparato incluye preferiblemente cuatro calentadores dispuestos a lo largo de los lados y configurados para calentar, la zona de reacción PCR, tal y como se muestra en la realización ejemplar de la FIG. 38A: calentador largo superior 1005, calentador largo inferior 1003, calentador corto izquierdo 1007, y calentador corto derecho 1009. El pequeño hueco existente entre el calentador largo superior 1005 y el calentador largo inferior 1003 tiene como resultado un gradiente de temperatura negligible (menos de 1 °C a lo ancho del canal PCR en cualquier punto a lo largo de la zona de reacción PCR) y por lo tanto una temperatura efectivamente uniforme en la zona de reacción PCR. Los calentadores situados en los bordes cortos del reactor PCR proporcionan calor para contrarrestar el gradiente creado por los dos calentadores largos desde el centro del reactor al borde del reactor. Un experto en la técnica entenderá que otras configuraciones de uno o más calentadores situados alrededor de la zona de reacción PCR están en línea con los métodos y aparato aquí descritos. Por ejemplo, un lado "largo" de la zona de reacción puede estar configurado para ser calentado por dos o más calentadores. Se utilizan orientaciones y configuraciones específicas de los calentadores para crear zonas de calentamiento uniformes incluso en sustratos con una conductividad térmica pobre debido a que se utiliza la pobre conductividad térmica de los sustratos de cristal, cuarzo y sílice fundido para ayudar en el funcionamiento independiente de diversos componentes microfluidicos tales como válvulas y en el funcionamiento independiente de diversos carriles para la PCR.

En realizaciones preferidas, cada calentador tiene un sensor de temperatura asociado. En la realización de la FIG. 49A, se utiliza un solo sensor de temperatura 1011 para ambos calentadores largos. También se muestra un sensor de temperatura 1013 para el calentador corto izquierdo, y un sensor de temperatura 1015 para el calentador corto derecho. El sensor de temperatura situado en el centro del reactor se utiliza para proporcionar información y controlar la potencia suministrada a los dos calentadores largos, en donde cada uno de los calentadores cortos cuenta con un sensor de temperatura propio situado junto a él para controlarlo. Tal y como se describe en esta memoria, los sensores de temperatura están preferiblemente configurados para transmitir información acerca de la temperatura en el área próxima al procesador en los momentos en que los calentadores no están recibiendo corriente que los hace calentar. Esto puede conseguirse mediante el adecuado control de los ciclos de corriente.

Con el objeto de reducir el número de sensores o de elementos calentadores necesarios para controlar un calentador para la PCR, podemos utilizar los calentadores para detectar, así como para calentar y así obviar la necesidad de tener un sensor separado específico para cada calentador. En otra realización, cada uno de los cuatro calentadores puede estar diseñado para tener el voltaje adecuado y conectar los cuatro calentadores en serie o en paralelo para reducir el número de elementos electrónicamente controlables de 4 a 1, reduciendo así la carga impuesta en la electrónica.

La FIG. 49B muestra vistas expandidas de calentadores y de sensores de temperatura utilizados en conjunción con una zona de reacción PCR de la FIG. 49A. Los sensores de temperatura 1001 y 1013 están diseñados para tener una resistencia a la temperatura ambiental de aproximadamente 200-300 ohmios. Este valor de resistencia se determina controlando el espesor de la capa de metal depositada (por ej., una alternancia de 400 Å TiW/3000 Å Au/400 Å TiW), y grabando la línea de metal sinuosa para que tenga un ancho de aproximadamente 10 - 25  $\mu$ m y 20 - 40 mm de longitud. La utilización de metal en esta capa le da un coeficiente de temperatura y resistividad del orden de 0,5 - 20 °C/ohmios, preferiblemente en el intervalo de 1,5 - 3 °C/ohmios. La medición de la resistencia a temperaturas más elevadas permitirá la determinación de la temperatura exacta de la posición de dichos sensores.

La configuración para el calentamiento uniforme, mostrado en la FIG. 49A para una sola zona de reacción PCR, puede aplicarse a un cartucho para PCR multicarril en donde se producen múltiples reacciones PCR independientes.

Cada calentador puede controlarse independientemente mediante un procesador y/o circuitos de control utilizados en conjunción con el aparato aquí descrito. La FIG. 50 muestra imágenes térmicas, de la superficie superior de un cartucho microfluidico con calentadores configurados según las FIG. 49A y 49B, a medida que se va activando cada calentador, del modo descrito a continuación: (A): Superior largo exclusivamente; (B) Inferior largo exclusivamente; (C) Corto izquierda exclusivamente; (D) Corto derecha exclusivamente; y (E) los cuatro calentadores. El panel (F) muestra una vista de la zona de reacción y de los calentadores en la misma escala que los paneles de la otra imagen de la FIG. 50. También se muestra en la figura una barra de temperatura.

Utilización de recortes del sustrato del cartucho para mejorar la velocidad de enfriamiento durante el ciclado PCR

Durante una amplificación por PCR de una muestra de nucleótidos, se realizan una serie de ciclos térmicos. Para mejorar la eficiencia, el enfriamiento entre cada aplicación de calor se hará, preferiblemente, lo más rápido posible. Puede conseguirse una velocidad mejorada de enfriamiento con diversas modificaciones del sustrato de calentamiento, tal y como se muestra en las FIG. 51A - 51C.

Una forma de conseguir un enfriamiento rápido es recortar partes del sustrato del cartucho microfluídico, tal y como se muestra en la FIG. 51A. El panel superior de la FIG. 51A es una sección transversal de un cartucho microfluídico ejemplar tomada a lo largo de la línea de puntos A - A' según se marca en el panel inferior de la FIG. 51A. Se muestran la zona de reacción PCR 901 y los calentadores representativos 1003. También se muestran dos porciones recortadas, una etiquetada 1201, situadas a lo largo de los calentadores que están a su vez situados a lo largo del lado largo de la zona de reacción PCR. Las porciones recortadas tales como 1201 reducen la masa térmica del cartucho, y también permiten que circule el aire dentro de las porciones recortadas. Ambos aspectos permiten alejar rápidamente el calor de las inmediaciones de la zona de reacción PCR. Otras configuraciones de recortes, tales como de forma, posición y número están en línea con la presente tecnología.

Otra manera de conseguir un enfriamiento rápido es recortar partes del sustrato del calentador, tal y como se muestra en la FIG. 51B. El panel inferior de la FIG. 51B es una sección transversal del sustrato de calentador ejemplar de un cartucho microfluídico tomada a lo largo de la línea de puntos A - A' según se indica en el panel superior de la FIG. 51B. Se muestran la zona de reacción PCR 901 y los calentadores representativos 1003. También se muestran cuatro partes recortadas, una de las cuales etiquetada 1205, que están situadas a lo largo de los calentadores que están a su vez situados a lo largo del lado largo de la zona de reacción PCR. Las partes recortadas tales como 1205 reducen la masa térmica del sustrato del calentador y también permiten que circule el aire en el interior de las partes recortadas. Ambos aspectos permiten alejar rápidamente el calor de las inmediaciones de la zona de reacción PCR. En la FIG. 51 B se muestran cuatro partes recortadas separadas, de modo que no se interrumpen los circuitos de control de los diversos calentadores. Otras configuraciones de recortes, tales como de forma, posición y número están en línea con la presente tecnología. Dichos recortes pueden crearse mediante un método seleccionado de: grabado selectivo utilizando procesos de grabado húmedo, grabado profundo por iones reactivos, grabado selectivo utilizando láser CO<sub>2</sub> laser o láser de femtosegundo (para evitar grietas superficiales o tensión cerca de la superficie), perforación mecánica selectiva, perforación ultrasónica selectiva o chorro abrasivo selectivo de partículas. Debe ponerse atención en mantener la integridad mecánica del calentador reduciendo tanto material como sea posible.

La FIG. 51C muestra una combinación de recortes y de utilización de enfriamiento con aire ambiental para aumentar la velocidad de enfriamiento durante la etapa de enfriamiento del termociclado. Una parte sustancial del enfriamiento se produce por la pérdida convectiva desde la superficie inferior de la superficie del calentador al aire ambiental. La fuerza impulsora de esta pérdida convectiva es el diferencial de temperatura entre la superficie del cristal y la temperatura del aire. Al bajar la temperatura del aire ambiental utilizando, por ejemplo, un enfriador de Peltier, puede aumentarse la velocidad de enfriamiento. También puede aumentarse la pérdida de calor convectivo manteniendo el aire a una velocidad superior a cero.

En la FIG. 52 se muestra un ejemplo de los resultados del ciclado térmico obtenidos con la configuración descrita en esta memoria, para un protocolo configurado para calentar hasta 92 °C, y permanecer ahí durante 1 segundo, a continuación, enfriar hasta 62 °C, y permanecer ahí durante 10 segundos. La duración del ciclo es de alrededor de 29 segundos, siendo necesarios 8 segundos para calentar desde 62 °C y estabilizar a 92 °C, y son necesarios 10 segundos para enfriar desde 92 °C, y estabilizar a 62 °C.

Proceso de fabricación del cartucho

La FIG. 53 muestra un diagrama de flujo 2800 de un proceso de montaje de un cartucho ejemplar, tal y como se describe en esta memoria. Los expertos en la técnica entenderán que los diversos pasos pueden realizarse en un orden diferente del indicado en la FIG. 53, y, adicionalmente, cualquier paso determinado puede ejecutarse utilizando métodos alternativos a los indicados en la figura. También se entiende que cuando se ilustran pasos independientes para realizar dos o más funciones, dichas funciones pueden efectuarse de forma síncrona y combinadas en pasos únicos y aun así ser acordes con el proceso general aquí descrito.

En 2802, se aplica una capa de laminado a un sustrato microfluídico que ha sido diseñado previamente para incorporar una red microfluídica en su interior; se recortan los bordes del laminado allí donde sobresale de los límites del sustrato.

En 2804, se dispensa cera y se carga en las microválvulas de la red microfluídica del sustrato microfluídico. Aquí se describe adicionalmente un proceso ejemplar para realizar este paso.



## ES 2 610 128 T3

En 2806, se inspecciona el cartucho para comprobar que la cera del paso 2804 se ha cargado correctamente y que el laminado del paso 2802 se adhiere correctamente al sustrato microfluídico. Si un sustrato no satisface una o ambas pruebas, se desecha. Si el sustrato no pasa reiteradamente ninguna de estas pruebas, se revisan los pasos de dispensado de cera o de aplicación del laminado, según corresponda.

5 En 2808, se aplica una membrana hidrofóbica de ventilación y se une por calor a la parte superior del sustrato microfluídico sobre las válvulas de cera, y en la cara opuesta al laminado del sustrato. Se recortan los bordes de la membrana que sobresalen de los límites del sustrato.

10 En 2810, se inspecciona el conjunto para comprobar que la membrana hidrofóbica de ventilación está bien unida al sustrato microfluídico sin que se produzca obstrucción térmica de los canales microfluídicos. Si alguno de los canales estuviera bloqueado, o si la unión entre la membrana y el sustrato fuera imperfecta, el conjunto se descartaría, y, en el caso de reiterados episodios de descarte, se revisaría el paso del proceso anterior.

15 En 2812, se aplica una lámina térmicamente conductiva en el laminado del fondo del cartucho.

En 2814, se aplican dos tiras de etiquetas en la parte superior del sustrato microfluídico, una para cubrir las válvulas, y la segunda para proteger las membranas de ventilación. Se entiende que una sola tira de etiqueta puede idearse para cumplir ambas funciones.

20 En 2816, se imprimen o aplican etiquetas adicionales para mostrar características identificativas, tales como un código de barras #, lote # y fecha de caducidad, sobre el cartucho. Preferiblemente, una o más de dichas etiquetas cuentan con un espacio y una superficie que permite la escritura para que el usuario efectúe una anotación identificativa sobre la etiqueta, a mano.

25 En 2818, para facilitar su transporte y entrega a un cliente, los cartuchos montados y etiquetados, se apilan y empaquetan en grupos de cartuchos, tales como grupos de 25, o grupos de 10, o grupos de 20, o grupos de 50. Preferiblemente, el empaquetado se realiza a través de un medio inerte y/o libre de humedad.

30 Proceso ejemplar de deposición de cera

La deposición de cera en las válvulas de la red microfluídica, como en el paso 2804 puede ejecutarse con el equipo ejemplar mostrado en las FIG. 54A y 54B. La serie DispenseJet DJ-9000 (FIG. 54A y 54B) es un dispensador sin contacto que proporciona un dispensado de alta velocidad con un excepcional control volumétrico para diversos fluidos, incluidos adhesivo de montaje superficial, de relleno, encapsulantes, recubrimientos conformables, adhesivos UV, y epoxi plata. El DJ-9000 inyecta en espacios tan pequeños como 200 micrómetros y crea anchos de cordones tan pequeños como 300 micrómetros en el lado dispensado de un sustrato tal como un troquel. Dispensa fluido en gotas discretas o en una rápida sucesión de puntos que forman un flujo de fluido con un diámetro de 100 micras (4 mil) desde el inyector. Es completamente compatible con otros sistemas comercialmente disponibles tales como las series de sistemas de dispensado Asymtek Century C-718/C-720, Millennium M-2000, y Axiom X-1000.

Asymtek fabrica la unidad DJ-9000 según las normas de control de calidad de la fabricación con el objeto de proporcionar unos resultados precisos y fiables. Las especificaciones representativas del aparato son las siguientes.

Característica	Especificación
	Ancho: 35 mm
Tamaño	Alto: 110 mm
	Profundidad: 100 mm
Peso	400 gramos - seco
Conjunto de tubo de alimentación	Nylon – accesorio
	Poliuretano - Tubo
Cámara de fluido	Acero inoxidable tipo 303
Asiento e inyector	Serie 300/400 S/S, Carburo
Conjunto de aguja	52100 Cojinete de acero
	Chapado con alto contenido en carbono
	Carburo – Punta
Sello de fluido	PEEK/Acero inoxidable

## ES 2 610 128 T3

Característica	Especificación
Junta tórica de la cámara de fluido	Etileno-Propileno
Cuerpo inyector	Aluminio 6061-T6
	Chapado en níquel
Rodamientos del conjunto de aguja	PEEK
Cuerpo de control térmico	Aluminio 6061-T6
	Chapado en níquel
Soporte del depósito	Acetilo
Tamaño del depósito	5, 10, o 30 cc (0,17, 0,34, o 1,0 oz)
Conector del conjunto del tubo de alimentación	Conector hembra según ANSI/HIMA MD70.1-1983
Frecuencia de ciclo máxima	200 Hz.
Presión mínima de aire de válvulas	5,5 bar (80 psi)
Nivel de ruido operativo	70 db*
Solenoides	24 VDC, 12,7 vatios
Calentador de control térmico	24 VDC, 14,7 vatios, 40 ohmios
RTD de control térmico	100 ohmios, platino
Punto fijo máximo del calentador	80C
*A la velocidad de ciclo máxima	

En la FIG. 54B se muestra una vista en despiece de este aparato.

Teoría del funcionamiento de la unidad DJ-9000

5 La unidad DJ-9000 incorpora un mecanismo de retorno de resorte neumático, que utiliza los principios de transferencia del momento para expulsar volúmenes precisos de material. Un solenoide de alta velocidad regula el aire presurizado para retraer un conjunto de aguja de su asiento. El fluido, alimentado a la cámara de fluido, fluye sobre el asiento. Cuando se expulsa el aire, la aguja se desplaza rápidamente a la posición cerrada, desplazando fluido a través del asiento y el inyector en forma de gota. Pueden utilizarse múltiples gotas disparadas en sucesión para formar volúmenes de dispensado y líneas de mayor tamaño al combinarse con el movimiento de un robot dispensador.

10 El equipo incorpora diversas características regulables: Las siguientes características afectan al rendimiento de la unidad DJ-9000 y normalmente se ajustan para adecuarlas a las condiciones específicas de los procesos.

15 "Fluid Pressur" [Presión del fluido] debe ajustarse de modo que se llene de fluido hasta el asiento, pero no debe ser determinante para impulsar el fluido a través del asiento y el inyector. Por lo general, una presión de fluido elevada tiene como resultado la expulsión de un mayor volumen de material.

20 "Stroke Adjustment" [Ajuste del recorrido] controla la distancia recorrida por el conjunto de aguja. Este control se gira de derecha a izquierda para aumentar el recorrido del conjunto de aguja, o de izquierda a derecha para reducirlo. Un aumento del recorrido resulta frecuentemente en la expulsión de un mayor volumen de material.

25 La válvula solenoide controla el funcionamiento de las válvulas. Al estar conectada, permite la entrada de aire en la cámara de aire del chorro para comprimir un resorte y así elevar el conjunto de aguja. Al desactivarse, se libera el aire y el resorte fuerza al pistón hacia abajo, de modo que la punta de la aguja entra en contacto con el asiento.

30 Las geometrías del asiento y del inyector son, normalmente, los principales factores que controlan el volumen de material dispensado. El tamaño del asiento y del inyector se determinan en función de la aplicación y de las propiedades del fluido. Otros parámetros se ajustan de acuerdo con la selección de asiento e inyector. En la tabla incluida a continuación se indican los tamaños de asiento e inyector disponibles.

Conjunto de control térmico: La temperatura del fluido influye, frecuentemente, en las características de viscosidad y flujo de los fluidos. La DJ-9000 está equipada con un conjunto de control térmico que asegura una temperatura de fluido constante.

- 5 Parámetros de punto y línea: Además de la configuración del hardware y de los parámetros de la DJ-9000, los parámetros de punto y línea se ajustan en un programa de software (referido como FmNT) para controlar el tamaño y calidad de los puntos y líneas dispensados.

Carga de cera en las válvulas

10 Las FIG. 55A y 55B muestran cómo se utiliza una combinación de dispensado controlado de gotas calientes en un dispositivo microcanal calentado con las dimensiones y geometría correctas para cargar cera con precisión en un microcanal de un cartucho microfluídico para formar una válvula. El cabezal dispensador calentado puede colocarse con precisión sobre el orificio de entrada del microcanal del dispositivo microfluídico, y puede dispensar gotas de  
 15 cera fundida en volúmenes tan pequeños como 75 nanolitros con una precisión del 20 %. El orificio de entrada del dispositivo microcanal tiene las dimensiones adecuadas como para que la gota de 75 nl se aplique con precisión en el fondo del orificio de entrada utilizando, por ejemplo, aire comprimido, o de forma similar al método de impresión por chorro de tinta. El dispositivo microcanal se mantiene en una temperatura por encima del punto de fusión de la  
 20 cera, permitiendo así que la cera permanezca en estado fundido inmediatamente tras ser dispensada. Una vez la gota cae en el fondo del orificio de entrada, la cera fundida se dirige hacia el canal estrecho por acción capilar. El volumen de la parte estrecha ha sido diseñado para ser aproximadamente igual a la cantidad típica máxima dispensada en el orificio de entrada.

Multiplexado de calentadores (controlado por software)

25 Otro aspecto del aparato aquí descrito, se refiere a un método para controlar el calor del interior del sistema y sus componentes tal y como se ilustra en la FIG. 56. El método conduce a una mayor eficiencia energética del aparato aquí descrito, ya que no todos los calentadores están calentando al mismo tiempo y, un calentador determinado recibe corriente solo parte del tiempo.

30 Por lo general, el calentamiento de componentes microfluídicos, tales como una zona de reacción PCR, se controla pasando corrientes a través de calentadores microfabricados configurados adecuadamente. El calentamiento puede controlarse adicionalmente activando y desactivando periódicamente la corriente con modulación variada del ancho de pulso (PWM), en donde la modulación por ancho de pulsos se refiere a la relación tiempo activado/tiempo  
 35 desactivado de la corriente. La corriente puede suministrarse conectando un calentador microfabricado a una fuente de alto voltaje (por ejemplo, 30 V), que puede estar controlada por la señal PWM. En algunas realizaciones, el dispositivo incluye 48 generadores de señales PWM. El funcionamiento de un generador de PWM incluye generar una señal con un periodo escogido programable (la cuenta final) y granularidad. Por ejemplo, la señal puede ser de 4000  $\mu$ s (microsegundos) con una granularidad de 1  $\mu$ s, en cual caso el generador de PWM puede mantener un  
 40 contador que comienza en cero y que avanza en incrementos de 1  $\mu$ s hasta alcanzar 4000  $\mu$ s, tras lo cual regresa a cero. Así, la cantidad de calor producido puede ajustarse regulando la cuenta final. Una cuenta final elevada corresponde a una mayor duración del tiempo durante el cual el calentador microfabricado recibe corriente y, por lo tanto, una mayor cantidad de calor producido.

45 En diversas realizaciones, el funcionamiento de un generador de PWM puede incluir también una cuenta inicial programable además de la cuenta final y la granularidad antes mencionadas. En tales realizaciones, los múltiples generadores de PWM pueden producir señales que pueden ser selectivamente no solapables (por ej., multiplexando el tiempo de encendido de los diversos calentadores) de modo que no se sobrepasa la capacidad de corriente de la potencia de alta tensión. Pueden controlarse múltiples calentadores mediante diferentes generadores de señal de  
 50 PWM con diferentes cuentas de inicio y final. Los calentadores pueden dividirse en bancos, en donde un banco define un grupo de calentadores con la misma cuenta de inicio. Por ejemplo, pueden agruparse 36 generadores de PWM en seis diferentes bancos, correspondiendo cada uno de ellos a cierta parte del ciclo de PWM (500 ms en este ejemplo). La cuenta final de cada generador de PWM puede programarse selectivamente de modo que no habrá más de seis calentadores activados en un momento determinado. Puede seleccionarse una parte de un ciclo PWM como tiempo muerto (de 3000 a 4000 en este ejemplo) durante el cual no se produce calentamiento y los circuitos detectores de temperatura sensible pueden utilizar este tiempo para detectar la temperatura. En la siguiente tabla se muestra un ciclo PWM del ejemplo anterior:

60 Cuenta inicial Cuenta final Cuenta final máxima

Banco 1			
Generador de PWM #1	0	150	500
Generador de PWM #2	0	220	500

## ES 2 610 128 T3

Banco 1			
...	...	...	
Generador de PWM #6	0	376	500
Banco 2			
Generador de PWM #7	500	704	1000
Generador de PWM #8	500	676	1000
...	...	..	...
Generador de PWM #12	500	780	1000
Banco 3			
Generador de PWM #13	1000	1240	1500
Generador de PWM #14	1000	1101	1500
...	...	...	..
Generador de PWM #18	1000	1409	1500
Banco 4			
Generador de PWM #19	1500	1679	2000
Generador de PWM #20	1500	1989	2000
...	...	...	...
Generador de PWM #24	1500	1502	2000
Banco 5			
Generador de PWM #25	2000	2090	2500
Generador de PWM #26	2000	2499	2500
...	...	...	...
Generador de PWM #30	2000	2301	2500
Banco 6			
Generador de PWM #31	2500	2569	3000
Generador de PWM #32	2500	2790	3000
...	...	...	...
Generador de PWM #36	2500	2678	3000

Utilización del sistema de detección para medir/detectar fluido en la cámara para PCR

5 Opcionalmente, el aparato incorpora un detector de fluorescencia muy sensible que puede recoger luz fluorescente de la cámara para PCR 210 de un cartucho microfluídico. Este detector se utiliza para detectar la presencia de líquido en la cámara, medición que determina si se puede o no ejecutar un ciclo de PCR. Antes de llenar la cámara con líquido se efectúa una lectura de fondo. Tras realizar las operaciones microfluídicas se toma otra lectura que muestra el resultado de llenar la cámara para PCR con líquido. La presencia de líquido altera la lectura de fluorescencia de la cámara. Se utiliza un valor umbral programable para ajustar un algoritmo programado en el procesador (por ejemplo, la segunda lectura ha sobrepasado la primera lectura un 20%). Si las dos lecturas no difieren más allá del margen programado, se considerará que no ha entrado líquido en la cámara y no se inicia un ciclo PCR en dicha cámara. En su lugar, se emite una advertencia para el usuario.

15 Programa informático

En diversas realizaciones, un programa informático para su utilización con el aparato aquí descrito incluye instrucciones en soporte magnético para operar el aparato.

20 En diversas realizaciones, el programa informático puede incluir una o más instrucciones que hacen que el sistema produzca una indicación de la posición del cartucho microfluídico en el receptáculo; lea la etiqueta de una muestra o

- la etiqueta de un cartucho microfluídico; produzca instrucciones para que un usuario introduzca el identificador de una muestra; produzca instrucciones para que un usuario cargue un elemento de transferencia de muestra con la muestra lista para la PCR; produzca direcciones para que un usuario introduzca la muestra lista para PCR en el cartucho microfluídico; produzca instrucciones para que un usuario coloque el cartucho microfluídico en el compartimento de recepción; produzca instrucciones para que un usuario cierre la tapa para accionar el elemento de fuerza; produzca instrucciones para que un usuario presurice la muestra lista para la PCR en el cartucho microfluídico inyectando en la muestra lista para la PCR un volumen de aire de alrededor de 0,5 mL y alrededor de 5 mL; y produzca información de estado sobre el progreso de las muestras de una o más carriles del cartucho.
- En diversas realizaciones, el programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema: caliente la muestra lista para la PCR bajo condiciones de termociclado adecuadas para crear amplicones PCR a partir del polinucleótido neutralizado; ponga en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o amplicón PCR del mismo con al menos una sonda selectiva para una secuencia de polinucleótidos; ponga en contacto, independientemente, cada muestra de polinucleótido neutralizado y un polinucleótido de control negativo, con la mezcla de reactivo para la PCR bajo las condiciones de termociclado adecuadas para crear independientemente amplicones PCR de la muestra de polinucleótido neutralizado y un polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivo para PCR bajo condiciones de termociclado adecuadas para crear independientemente amplicones PCR de la muestra de polinucleótidos neutralizados y amplicones PCR del polinucleótido de control negativo; poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o un amplicón PCR del mismo y el polinucleótido de control negativo o un amplicón PCR del mismo con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos; producir una determinación de la presencia de una secuencia de polinucleótidos en la muestra biológica, correspondiendo la secuencia polinucleótida a la sonda, si se detecta la sonda en la muestra polinucleótida neutralizada o en un amplicón PCR de la misma; y/o producir una determinación de resultado contaminado se detecta si la sonda en el polinucleótido de control negativo o en un amplicón PCR del mismo
- En diversas realizaciones, el programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema realice automáticamente uno o más pasos del método.
- En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico comprende dos o más carriles de muestras, incluyendo cada una de ellas una válvula de entrada de muestra, un orificio de purga de burbujas, una bomba accionada térmicamente, una válvula accionada térmicamente, y una zona de reacción PCR, en donde las instrucciones en soporte magnético están configuradas para operar independientemente uno o más componentes de cada una de dichas carriles del sistema, independientemente las unas de las otras, y para hacer que un detector mida la fluorescencia de las zonas de reacción PCR.
- Muestra**
- En diversas realizaciones, la muestra puede incluir una mezcla de reactivos para PCR que comprende una enzima polimerasa y una pluralidad de nucleótidos. La mezcla de reactivos para PCR puede estar en la forma de uno o más pellets liofilizados y los pasos mediante los cuales se prepara la muestra lista para PCR pueden implicar poner en contacto el pellet PCR con líquido para crear una solución de mezcla de reactivos para PCR. En aún otra realización, cada una de los carriles para la PCR contendrán reactivos ASR secos o liofilizados precargados de modo que el usuario solo tiene que introducir la muestra de polinucleótido preparada en la PCR. En otra realización, los carriles para la PCR pueden tener solo las sondas y cebadores específicos para la aplicación premedidos y precargados y el usuario introduce una muestra mezclada con los reactivos para PCR.
- En diversas realizaciones, la red microfluídica puede estar configurada para acoplar calor de una fuente de calor externa a una mezcla de muestra que comprende reactivo PCR y muestra de polinucleótido neutralizado bajo condiciones de termociclado adecuadas para crear amplicones PCR a partir de la muestra de polinucleótido neutralizado.
- En diversas realizaciones, la muestra lista para PCR puede incluir además un plásmido de control positivo y una sonda hibridación fluorogénica selectiva para, al menos, una parte del plásmido. En diversas realizaciones, la muestra lista para PCR incluye además un tampón de muestra, y al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos, por ej., la secuencia de polinucleótidos característica de un patógeno seleccionado del grupo formado por bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, levaduras, hongos, protozoos y virus.
- En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede alojar un polinucleótido de control negativo, en donde la red microfluídica puede estar configurada para realizar PCR independientemente en cada una de las muestras de polinucleótidos neutralizados y un polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos para PCR bajo condiciones de termociclado adecuadas para crear independientemente amplicones PCR del polinucleótido de control negativo. Cada carril de un cartucho multicarril según se describe en esta memoria puede realizar dos reacciones debido a la presencia de dos sistemas de detección de fluorescencia por carril. Pueden ejecutarse una variedad de combinaciones de reacciones en el cartucho, tal como dos reacciones de muestra en un carril, un

control positivo y un control negativo en otros dos carriles; o la reacción de una muestra y un control interno en un carril y un control negativo en un carril separada.

5 En diversas realizaciones, la muestra puede incluir al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos, en donde los pasos según los cuales se prepara la muestra lista para PCR implican poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o un amplicón PCR del mismo con la sonda. La sonda puede ser una sonda de hibridación fluorogénica. La sonda de hibridación fluorogénica puede incluir una secuencia de polinucleótidos acoplada a un tinte indicador fluorescente y a un tinte extintor de la fluorescencia. La mezcla de reactivos para PCR puede incluir además un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorogénica del plásmido selectiva para al menos una parte del plásmido y el cartucho microfluídico puede estar configurado para permitir la detección óptica independiente de la sonda de hibridación fluorogénica y la sonda de hibridación fluorogénica del plásmido

15 En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos característica de un organismo, por ejemplo, cualquier organismo que emplea polinucleótidos de ácido desoxirribonucleico o de ácido ribonucleico. Así, la sonda puede ser selectiva para cualquier organismo. Organismos adecuados incluyen mamíferos (incluidos los humanos), aves, reptiles, anfibios, peces, animales domesticados, animales salvajes, organismos extinguidos, bacterias, hongos, virus, plantas, entre otros. La sonda también puede ser selectiva para componentes de organismos que emplean sus propios polinucleótidos, por ejemplo, mitocondrias. En algunas realizaciones, la sonda es selectiva para microorganismos, por ejemplo, organismos utilizados en la producción de alimentos (por ejemplo, levaduras empleadas en productos fermentados, mohos o bacterias empleados en quesos y productos similares), o patógenos (por ej., de humanos, animales domesticados o salvajes, aves domesticadas o salvajes, y otros similares). En algunas realizaciones, la sonda es selectiva para organismos seleccionados del grupo formado por bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, levaduras, hongos, protozoos y virus.

25 En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos característicos de un organismo seleccionado del grupo formado por *Staphylococcus* spp., por ej., *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus* resistente a la vancomicina; *Streptococcus* (por ej.,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  -hemolítico, Grupo A, B, C, D o G) tal como *S. pyogenes*, *S. agalactiae*; *E. faecalis*, *E. durans*, y *E. faecium* (anteriormente *S. faecalis*, *S. durans*, *S. faecium*); *Streptococcus* del grupo D no enterococo, por ej., *S. bovis* y *S. equines*; *Streptococci viridans*, por ej., *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mitior*, *A. milleri*, *S. constellatus*, *S. intermedius*, y *S. anginosus*; *S. iniae*; *S. pneumoniae*; *Neisseria*, por ej., *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, saprophytic *Neisseria* sp; *Erysipelothrix*, por ej., *E. rhusiopathiae*; *Listeria* spp., por ej., *L. monocytogenes*, raramente *L. ivanovii* y *L. seeligeri*; *Bacillus*, por ej., *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. subtilis niger*, *B. thuringiensis*; *Nocardia asteroides*; *Legionella*, por ej., *L. pneumonophila*, *Pneumocystis*, por ej., *P. carinii*; Enterobacterias tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* (por ej., *E. coli*, *E. coli*O157:H7); *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia*, y otras similares, por ej., *Salmonella*, por ej., *S. typhi*, *S. paratyphi* A, B (*S. schottmuelleri*), y C (*S. hirschfeldii*), *S. dublin*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. newport*, *S. infantis*, *S. agona*, *S. montevideo*, y *S. saint-paul*; *Shigella* por ej., subgrupos: A, B, C, y D, tal como *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*; *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, y *P. myxofaciens*), *Morganella* (*M. morganii*); *Providencia* (*P. rettgeri*, *P. alcalifaciens*, y *P. stuartii*); *Yersinia*, por ej., *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*; *Haemophilus*, por ej., *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. ducreyi*; *Brucella*, por ej., *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*; *Francisella*, por ej., *F. tularensis*; *Pseudomonas*, por ej., *P. aeruginosa*, *P. paucimobilis*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. acidovorans*, *Burksoporteia* (*Pseudomonas pseudomallei*, *Burksoporteia mallei*, *Burksoporteia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia*); *Campylobacter*, por ej., *C. fetus fetus*, *C. jejuni*, *C. pylori* (*Helicobacter pylori*); *Vibrio*, por ej., *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. hollisae*, *V. vulnificus*, y los vibrios no aglutinables; *Clostridia*, por ej., *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C. botulinum*; *Actinomyces*, por ej., *A. israelii*; *Bacteroides*, por ej., *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. caccae*, y *B. merdae*; *Prevotella*, por ej., *P. melaninogenica*; género *Fusobacterium*; *Treponema*, por ejemplo, subespecies endémico *T. pallidum* subespecie *endemicum*, *T. pallidum* os subespecie *pertenue*, *T. carateum*, y *T. pallidum* subespecie *pallidum*; género *Borrelia*, por ej., *B. burgdorferi*; género *Leptospira*; *Streptobacillus*, por ej., *S. moniliformis*; *Spirillum*, por ej., *S. minus*; *Mycobacterium*, por ej., *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, el complejo *M. fortuitum* (*M. fortuitum* y *M. chelonae*), *M. leprae*, *M. asiaticum*, *M. chelonae* subesp. *abscessus*, *M. fallax*, *M. fortuitum*, *M. malmoense*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*; *Mycoplasma*, por ej., *M. hominis*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*; *Mycoplasma*, por ej., *M. genitalium*; *Ureaplasma*, por ej., *U. urealyticum*; *Trichomonas*, por ej., *T. vaginalis*; *Cryptococcus*, por ej., *C. neoformans*; *Histoplasma*, por ej., *H. capsulatum*; *Candida*, por ej., *C. albicans*; *Aspergillus* sp; *Coccidioides*, por ej., *C. immitis*; *Blastomyces*, e.g. *B. dermatitidis*; *Paracoccidioides*, por ej., *P. brasiliensis*; *Penicillium*, por ej., *P. mameffeii*; *Sporothrix*, por ej., *S. schenckii*; *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*, y *Basidiobolus*; diseases caused by *Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Xylohypha*, *Ochroconis*, *Rhinocladia*, *Scolecobasidium*, y *Wangiella*; *Trichosporon*, por ej., *T. beigeli*; *Blastoschizomyces*, por ej., *B. capitatus*; *Plasmodium*, por ej., *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, y *P. malariae*; *Babesia* sp; protozoos del género *Trypanosoma*, por ej., *T. cruzi*; *Leishmania*, por ej., *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. viannia braziliensis*; *Toxoplasma*, por ej., *T. gondii*; Amebas del genero *Naegleria* o *Acanthamoeba*; *Entamoeba*

5 histolytica; Giardia lamblia; género Cryptosporidium, por ej., C. parvum; Isospora belli; Cyclospora cayetanensis; Ascaris lumbricoides; Trichuris trichiura; Ancylostoma duodenale o Necator americanus; Strongyloides stercoralis Toxocara, por ej., T. canis, T. cati; Baylisascaris, por ej., B. procyonis; Trichinella, por ej., T. spiralis; Dracunculus, por ej., D. medinensis; género carrilriodea; Wuchereria bancrofti; Brugia, por ej., B. malayi, or B. timori; Onchocerca volvulus; Loa loa; Dirofilaria immitis; género Schistosoma, por ej., S. japonicum, S. mansoni, S. mekongi, S. intercalatum, S. haematobium; Paragonimus, por ej., P. Westermani, P. Skriabini; Clonorchis sinensis; Fasciola hepatica; Opisthorchis sp; Fasciolopsis buski; Diphyllbothrium latum; Taenia, por ej., T. saginata, T. solium; Echinococcus, por ej., E. granulosus, E. multilocularis; Picomavirus, rinovirus, ecovirus, coxsackievirus, virus de la gripe; paramixovirus, por ej., types 1, 2, 3, y 4; adnovirus; virus del herpes, por ej., HSV-1 y HSV-2; virus de la varicela-zoster; virus T-linfotrófico humano (tipo I y tipo II); Arbovirus y Arenavirus; Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae; Flavivirus; Hantavirus; Encefalitis vírica (alfavirus [por ej., encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental]); Fiebres hemorrágicas víricas (filovirus [por ej., Ebola, Marburg] y arenavirus [por ej., Lassa, Machupo]); Viruela (variola); retrovirus por ej., virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2; virus del papiloma humano [HPV] tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, y 35.

15 En diversas realizaciones, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos característica de los organismos seleccionados del grupo formado por *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter Baumannii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecium*, enterococos resistentes a la vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus viridans*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus* Group B, *Streptococcus* Group C, *Streptococcus* Group G, *Streptococcus* Group F, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Gardenerella vaginalis*, *Micrococcus spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrahlis*, *Salmonella spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Peptostreptococcus productus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Lactobacillus fermentum*, *Eubacterium lentum*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Chlamydia spp.*, *Camplobacter spp.*, *Salmonella spp.*, viruela (variola mayor), Yersina Pestis, virus del herpes simple I (HSV I), y virus del Herpes Simplex II (HSV II).

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

30 Ejecutar la PCR sobre una muestra lista para PCR puede incluir calentar la mezcla de reactivos para PCR y la muestra de polinucleótido neutralizado bajo condiciones de termociclado adecuadas para crear amplicones PCR de la muestra de polinucleótido neutralizado; poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o un amplicón PCR de la misma con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos; poner en contacto independientemente cada muestra de polinucleótido neutralizado y un polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos para PCR bajo condiciones de termociclado adecuadas para crear independientemente amplicones PCR de la muestra de polinucleótido neutralizado y amplicones PCR del polinucleótido de control negativo; y/o poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o un amplicón PCR de la misma y el polinucleótido de control negativo o un amplicón PCR del mismo con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos.

35 En diversas realizaciones, un método para efectuar la PCR sobre una muestra puede incluir además uno o más de los siguientes pasos: calentar la muestra biológica en el cartucho microfluídico; presurizar la muestra biológica en el cartucho microfluídico a un diferencial de presión en comparación con la presión atmosférica de entre alrededor de 20 kilopascales y 200 kilopascales, o en algunas realizaciones entre alrededor de 70 kilopascales y 110 kilopascales.

45 En diversas realizaciones, un método para utilizar el aparato aquí descrito puede incluir además uno o más de los siguientes pasos: determinar la presencia de una secuencia de polinucleótidos en la muestra biológica, correspondiendo la secuencia de polinucleótidos a la sonda, si se detecta la sonda en la muestra de polinucleótido de control negativo o un amplicón PCR del mismo; determinar un resultado contaminado si se detecta la sonda en el polinucleótido de control negativo o en un amplicón PCR del mismo; y/o en algunas realizaciones, en donde la mezcla de reactivos para PCR comprende además un plásmido de control positivo y una sonda plasmidial selectiva para al menos una parte del plásmido, el método incluye además determinar si se ha producido una reacción PCR si se detecta la sonda plasmidial.

50 Sistema de detección de fluorescencia, incluidas lentes y filtros y detección paralela múltiple de un cartucho de múltiples carriles

60 Puede incorporarse un sistema de detección de fluorescencia altamente sensible, en miniatura, para supervisar la fluorescencia de las reacciones bioquímicas que son la base de métodos de amplificación del ácido nucleico tales como la PCR.

65 Por lo tanto, otro aspecto del aparato incluye un sistema para supervisar la fluorescencia de las reacciones bioquímicas. El sistema puede ser, por ejemplo, un detector óptico con una fuente de luz (por ejemplo, un LED) que

emite selectivamente luz en una banda de absorción de un tinte fluorescente, lentes para enfocar la luz y un detector de luz (por ejemplo, un fotodiodo) que detecta selectivamente la luz en una banda de emisión del tinte fluorescente, en donde el tinte fluorescente corresponde a una sonda polinucleótida fluorescente, o un fragmento de la misma. Alternativamente, el detector óptico puede incluir un diodo que ha pasado por un filtro de paso banda que emite selectivamente luz en la banda de absorción del tinte fluorescente (una sonda fluorogénica) y un fotodiodo ha pasado por un filtro de paso banda que detecta selectivamente la luz en la banda de emisión del tinte fluorescente. Por ejemplo, el detector óptico puede estar configurado para detectar independientemente una pluralidad de tintes fluorescentes con diferentes espectros de emisión fluorescente, en donde cada tinte fluorescente corresponde a una sonda polinucleótida fluorescente o a un fragmento de la misma. Por ejemplo, el detector óptico puede estar configurado para detectar independientemente una pluralidad de tintes fluorescentes en una pluralidad de posiciones diferentes en, por ejemplo, un cartucho microfluídico, en donde cada tinte fluorescente corresponde a una sonda polinucleótida fluorescente o a un fragmento de la misma.

En algunas realizaciones, un detector determinado para su utilización con el aparato aquí descrito puede detectar una señal de fluorescencia en reacciones PCR a escala de nanolitro. Ventajosamente, el detector está formado a partir de componentes económicos, sin partes móviles. El detector también está configurado para acoplarse a un cartucho microfluídico tal y como se describe en esta memoria y, preferiblemente, también forma parte de un sistema de aplicación de presión, tal como una tapa deslizante, que mantiene el cartucho en su lugar. El detector tiene además potencial de detección de 2 o 3 colores y se controla mediante un programa, preferiblemente, personalizado, configurado para extraer información del detector.

Las FIG. 57 - 59 ilustran una realización de un sistema de detección de fluorescencia altamente sensible que incluye diodos emisores de luz (LED), fotodiodos y filtros/lentes para supervisar, en tiempo real, una o más señales fluorescentes que emanan del cartucho microfluídico. La realización de las FIG. 57 - 59 incorpora un sistema de detección de dos colores con un diseño modular que coincide con el de un cartucho microfluídico de un carril. El detector comprende dos LED (azul y rojo, respectivamente) y dos fotodiodos. Los dos LED están configurados para transmitir un haz de luz enfocada hacia una zona en particular del cartucho. Los dos fotodiodos están configurados para recibir luz emitida desde la zona del cartucho. Un fotodiodo está configurado para detectar luz roja emitida, y el otro fotodiodo está configurado para detectar luz azul emitida.

Las FIG. 60 y 61 muestran un cabezal lector ejemplar que comprende un sistema de detección multiplexado de 2 colores, tal como los múltiples ejemplos de un sistema de detección mostrado en las FIG. 57 - 59, configurado para coincidir con un cartucho microfluídico multicarril. La FIG. 60 muestra una vista del exterior de un cabezal lector multiplexado. La FIG. 61 es una vista en despiece que muestra cómo están configurados diversos detectores dentro de un cabezal lector multiplexado ejemplar, y en comunicación con una tarjeta de circuitos electrónicos.

El módulo de las FIG. 60 y 61 está configurado para detectar fluorescencia de cada carril de un cartucho de 12 carriles, y, por lo tanto, comprende 24 detectores controlables independientemente, dispuestos en 12 pares de elementos de detección idéntica. Cada par de elementos puede efectuar una detección de color doble de un conjunto predeterminado de sondas fluorescentes. Los expertos en la técnica entenderán que cualquier otro número de pares de detectores concuerda con el aparato aquí descrito. Por ejemplo, 4, 6, 8, 10, 16, 20, 24, 25, 30, 32, 36, 40, y 48 pares también concuerdan y pueden configurarse según métodos y criterios conocidos por los expertos en la técnica.

#### 45 Conjunto de óptica ejemplar

En una realización ejemplar, el conjunto de presión/chasis óptico está alojado en una caja (fabricada en plástico en ciertas realizaciones) que puede colocarse para cubrir un cartucho microfluídico multicarril. La caja puede incorporar opcionalmente un asa de fácil agarre por el usuario, e incorpora guías que facilitan su empuje y tracción. El asa puede servir también como dispositivo de bloqueo a presión. La posición horizontal de la caja se detecta en la posición completamente abierta y en la posición completamente desplegada, y se comunica al programa de control. La caja y el conjunto de presión del chasis óptico encajan en un módulo de cassette de calentador colocado bajo un cartucho microfluídico a 0,010". Un encaje perfecto es importante para que las interconexiones calentador/cartucho sean correctas. No se degrada el rendimiento del conjunto de la caja a lo largo de una vida de 10.000 ciclos, en donde un ciclo se define como: se comienza con el carro en la posición posterior, y se desliza hacia adelante y se bloquea el asa sobre un cartucho, desbloquear el asa y devolverla a su posición original. Todas las partes del camino óptico deberían ser no reflectantes (anodizadas, pintadas, moldeadas, etc.) y no deben perder esa característica durante 10.000 ciclos. La unidad óptica no resulta afectada por una intensidad de luz de  $\leq 9.000$  candelas procedente de una fuente colocada a 12" del instrumento en ángulos en los que es más probable que se produzca la penetración de luz. Se mide una degradación nula del rendimiento del fotodetector pasados 10.000 ciclos.

Al fabricar un conjunto detector, se crea un solo canal que aloja dos fuentes LED (azul y ámbar) y dos canales adicionales que alojan un fotodiodo detector cada uno (cuatro orificios perforados en total). Los dos canales emparejados (fuente y detector) están orientados a 43° respecto de cada uno, medido desde el eje óptico y están



alineados con los otros canales emparejados que tienen la misma orientación de 43°. Los orificios perforados en el chasis óptico contienen filtros y lentes con los espaciadores adecuados, cuyas especificaciones se describen adicionalmente en esta memoria. Los LED se mantienen en su lugar para evitar movimientos ya que la alineación mecánica es importante para conseguir una buena iluminación de la fuente. Los LED están, preferiblemente, 5  
trenzados hasta que los dos "puntos calientes" están alineados con los canales de lectura del cartucho. Debe mantenerse esta posición hasta que los LED no puedan moverse. El chasis óptico puede estar fabricado de aluminio y estar anodizado en negro. La superficie de presión del fondo del chasis óptico es plana  $\pm 0.001$ " en toda la superficie. El chasis óptico está equilibrado sobre su centro de modo que el centro de fuerza del chasis óptico está 10  
cerca del centro del cartucho de reactivos. El conjunto de presión (fondo del chasis óptico) proporciona una presión uniforme de un mínimo de 1 psi en todas las secciones del calentador del cartucho de reactivos. El conjunto óptico puede alejarse de la zona del cartucho de reactivos para la extracción e introducción del cartucho. Se prefiere que el chasis óptico esté conectado a tierra para evitar que emanen señales espurias a la PCB de la óptica.

Las fuentes de luz LED (ámbar y azul) inciden en un cartucho microfluídico a través de un filtro de paso de banda y una lente de enfoque. Estas fuentes de luz LED tienen una potencia mínima de 2800 milicandelas (azul) y 5600 milicandelas (verde), y las longitudes de onda centradas son 470 (azul) y 575 (ámbar) nanómetros, con un ancho de media banda no superior a 75 nanómetros. 15

La luz LED excita al menos una molécula fluorescente (inicialmente unida a una sonda oligonucleótida) en una sola cámara de un cartucho, haciendo que emane fluorescencia. Esta fluorescencia estará normalmente eficazmente bloqueada por una molécula extintora próxima. La amplificación de ADN a través de la enzima TAQ separa las moléculas fluorescentes y extintoras de la sonda oligonucleótida, deshabilitando la extinción. La amplificación de ADN solo se produce si la molécula diana de la sonda (una secuencia de ADN) está presente en la cámara de muestra. Se produce fluorescencia cuando cierta longitud de onda golpea la molécula diana. La luz emitida no es 20  
igual que la luz incidental. La luz incidental azul se bloquea del detector mediante el filtro verde de solo emisión. La luz emitida no es igual que la luz incidental. La luz incidental azul queda bloqueada del detector por el filtro de emisión exclusivamente verde. De forma similar, la luz incidental verde queda bloqueada del detector por el filtro de emisión amarillo. Se captura la luz y se dirige por un camino hasta una lente de enfoque, a través de un filtro o sobre un fotodiodo muy sensible. La cantidad de luz detectada aumenta a medida que aumenta la cantidad de amplificación de ADN. La señal variará según el tinte fluorescente utilizado, sin embargo, el ruido de fondo debe ser inferior a 1 mV pico-a-pico. El fotodetector, que puede estar montado permanentemente en el chasis óptico en una posición fija, debe ser estable durante 5 años o 10.000 ciclos, y debe ser sensible a niveles de luz extremadamente 25  
bajos y tener un valor de oscuridad no superior a 60 mV. Adicionalmente, el fotodetector debe estar comercialmente disponible durante al menos 10 años. Las lentes son plano-convexas (6 mm detector, y 12 mm longitud focal de la fuente) estando el lado plano orientado hacia el cartucho de análisis en ambas lentes. Los filtros deben permanecer estables durante los intervalos operativos de humedad y temperatura habituales. 30  
35

Los filtros, por ej., suministrados por Omega Optical (Brattleboro, VT 05301), son un sustrato de vidrio óptico con una calidad superficial de F/F según Mil-C-48497A. Los filtros individuales tienen un diámetro de  $6,0 \pm 0,1$  mm, un espesor de  $6,0 \pm 0,1$  mm, y AOI (ángulo de incidencia) y 1/2 cono AOI son 0 grados y  $\pm 8$  grados, respectivamente. La apertura tiene un diámetro de  $\geq 4$  mm diámetro y el borde se oscurece antes del montaje en un anillo de metal negro anodizado. Los filtros excitadores FITC los suministra, por ej., Omega Optical (PN 481AF30-RED-EXC). Tienen una frecuencia de corte inferior de  $466 \pm 4$  nm y una frecuencia de corte superior de  $496 \pm 4$  nm. La transmisión es  $\geq 65\%$  pico y el bloqueo es:  $\geq OD8$  en teoría de 503 a 580 nm,  $\geq OD5$  entre 501-650 nm,  $\geq OD4$  de media entre 651-1000 nm, y  $\geq OD4$  UV-439 nm. Los filtros del emisor FITC los suministra, por ej., Omega Optical (PN 534AF40-RED-EM). Tendrá una frecuencia de corte superior de  $514 \pm 2$  nm y una frecuencia de corte inferior de  $554 \pm 4$  nm. La transmisión es  $\geq 70\%$  pico y el bloqueo es:  $\geq OD8$  en teoría de 400 a 504 nm,  $\geq OD5$  UV-507 nm, y  $\geq OD4$  de media entre 593-765 nm. Los filtros excitadores ámbar los suministra, por ej., Omega Optical (PN 582AF25-RED-EXC). Tienen una frecuencia de corte superior de  $594 \pm 5$  nm y una frecuencia de corte inferior de  $569 \pm 5$  nm. La transmisión es  $\geq 70\%$  pico y el bloqueo es:  $\geq OD8$  en teoría de 600 a 700 nm,  $\geq OD5$  600-900 nm, y  $\geq OD4$  UV-548 nm. Los filtros emisores ámbar los suministra, por ej., Omega Optical (PN 627AF30-RED-EM). Tienen una frecuencia de corte superior de  $642 \pm 5$  nm y una frecuencia de corte inferior de  $612 \pm 5$  nm. La transmisión es  $\geq 70\%$  pico y el bloqueo es:  $\geq OD8$  en teoría de 550 a 600 nm,  $\geq OD5$  UV-605 nm, y  $\geq OD5$  de media entre 667-900 nm. Los espaciadores deben ser inertes y la temperatura estable a lo largo de todo el intervalo operativo y debe mantener los filtros en estricta posición y alineación. El epoxy utilizado debe contar con un material ópticamente negro y opaco y un sólido seco sin residuo pegajoso. Adicionalmente, debe tener una temperatura y humedad estables, no debe ejercer ninguna presión sobre los componentes que contiene y la PCB debe montarse de modo que quede sujeta y estable sin que puedan producirse cambios en la rotación o en la altura vertical. El 50% de la iluminación caerá en el plano de la muestra en un área de 0,1" (2,5 mm) de ancho por 0,3" (7,5 mm) a lo largo del eje del canal de detección. La fluorescencia del chip de control no debe cambiar más de un 0,5% de la señal medida por 0,001" de altura en una región  $\pm 0,010$  respecto a la altura nominal del chip de control. 40  
45  
50  
55  
60

En la FIG. 62 se muestra una tarjeta óptica ejemplar y se utiliza para detectar y amplificar la firma fluorescente de una reacción química correcta en un cartucho microfluídico, y controla la intensidad de los LED utilizando modulación por ancho de pulsos (PWM) para iluminar la muestra del cartucho hasta en cuatro canales, cada uno 65

con opciones de color. Adicionalmente, recibe instrucciones y envía datos de resultados a través de una SPI (interfaz periférica en serie) de LVDS (señalización diferencial de bajo voltaje). Los sistemas de la tarjeta de alimentación incluyen: una entrada +12V; y salidas +3,3V, +3,6V, +5V, y -5V, configuradas del siguiente modo: la salida de +3,3V contiene un regulador lineal, utilizado para alimentar la interfaz LVDS, debe mantener una precisión de +/-5%, y suministrar una corriente de salida de 0,5 A; la salida de +3,6V contiene un regulador lineal, utilizado para alimentar el MSP430, debe mantener una precisión de +/-5%, y suministrar una corriente de salida de 0,35 A; la salida de +5V contiene un regulador lineal, utilizado para alimentar el riel positivo de amplificadores operacionales, debe mantener una precisión de +/-5% y suministrar una corriente de salida de 0,35 A; la salida de -5V recibe electricidad de la fuente de alimentación de +5V, se utiliza para alimentar el raíl negativo de amplificadores operaciones y para la corriente de polarización, debe mantener una precisión del voltaje de +/-1% y suministrar una corriente de salida de 6,25 mA +/-10%. Adicionalmente, la tarjeta de alimentación tiene una resistencia fuente de 80 ohmios, y el software de la tarjeta principal puede habilitar/deshabilitar las salidas del regulador.

La interfaz de la tarjeta principal utiliza un solo canal del estándar LVDS para realizar las comunicaciones entre tarjetas. Esto se produce utilizando señalización SPI sobre la interfaz LVDS que está conectada al principal puerto SPI del procesador de control. La interfaz también contiene un puerto en serie para la programación en el sistema.

El sistema de detección óptico ejemplar de la FIG. 62 está formado por un procesador de control, controladores LED, y un sistema de fotodetección. En la realización ejemplar, el procesador de control es un TI MSP430F1611 formado por una SPI doble (una para la interfaz de la tarjeta principal y otra para la interfaz ADC) y SRAM ampliada para almacenamiento de datos. Incorpora las funciones de supervisión de la alimentación, control LED PWM, e interconexión SPI al ADC y a la tarjeta principal. Los controladores para LED contienen transistores NPN como interruptores, están conectados a las salidas PWM del procesador de control, pueden disipar 10 mA @ 12V por LED (80 mA total), y tienen un solo canal con 2 LED (uno de cada color) conectado a cada uno. El sistema de fotodetección tiene dos canales y está formado por un fotodetector, un fotodiodo de alta sensibilidad, un convertidor de corriente de alta ganancia a tensión, un amplificador de inversión de tensión de ganancia unitaria, y un ADC. Adicionalmente, contiene un Sigma-delta de 16 canales (aunque solo utiliza los primeros 8 canales) conectado al segundo puerto SPI del procesador de control. Los expertos en la técnica entenderán que otras opciones y combinaciones de elementos pueden utilizarse para que un sistema de detección coincida con el de la presente descripción.

Ventajas y características adicionales de la tecnología aquí descrita

La utilización de una cámara de procesos desechable, con un recubrimiento superficial y propiedades materiales que permiten un bajo volumen y la liberación del calor en tubo abierto para maximizar la concentración de la muestra en el volumen más bajo posible.

El separador de calor magnético integrado permite calentar múltiples muestras independientemente, por separado, utilizando una sola plataforma magnética móvil.

El diseño del lector/bandeja permite la fácil colocación del cartucho microfluídico y el pipeteado de líquido en múltiples muestras utilizando un dispensador robótico en una posición; desplazamiento relativo respecto a otra posición y aplicación de presión para los posteriores pasos de incubación con calor rápido y detección óptica. La superficie del fondo del cartucho se corresponde con la superficie de calentamiento. Además, normalmente es más sencillo mover un cartucho y un calentador dentro y fuera de su posición que un detector.

Un diseño de cabezal lector móvil para la detección de fluorescencia de canales PCR microfluídicos.

Aspectos del soporte, tales como una tira desechable individual, que incluye la presencia de reactivos liofilizados sellados, así como líquidos sellados próximos entre sí, lo cual es, normalmente, difícil de conseguir. Los laminados aquí utilizados facilitan el almacenamiento.

El soporte permite la introducción de múltiples tubos ASR, y procesos de dispensado de líquidos asociados que reducen la contaminación cruzada de las muestras, permitiendo al mismo tiempo realizar múltiples preparaciones para PCR a partir de una sola muestra clínica.

Las características del software permiten a un usuario conseguir resultados de las 24 muestras lo más rápido posible, o bien las primeras 12 muestras lo más rápido posible y posteriormente las 12 siguientes.

Los instrumentos preparatorios y de diagnóstico aquí descritos permiten procesar diferentes tipos de muestras (tales como sangre, orina, hisopo, etc.) al mismo tiempo incluso aunque requieran diferentes temperaturas, tiempos o reactivos químicos. Esto se consigue en parte utilizando soportes individuales compatibles

La alimentación automática de cartuchos microfluídicos en un lector PCR a través de un cargador automático de cartuchos ahorra tiempo al usuario y conduce a una mayor eficiencia del procedimiento general.

Perforación de la lámina de aluminio sobre un tubo de líquido y forma fiable de recogida del líquido.

5 Un cabezal lector móvil que incorpora las bombas, sensores (detector de pipeta, detección de fuerza), verificador de identificación de muestras, etc., que se mueven con él, reduciendo así el número de líneas de control que se mueven en el instrumento durante su utilización.

10 Alineación precisa y rápida de las puntas de pipeta con orificios de entrada de cartucho utilizando una placa de alineación motorizada.

Ejemplos

Ejemplo 1: Soporte para reactivos

15 Un soporte ejemplar para reactivos en línea con esta descripción tiene las siguientes dimensiones y capacidades:

- 180 mm largo X 22 mm ancho X 100 mm alto;
  - Fabricado de polipropileno.
  - Un tubo de 1,7 mm de baja adherencia encajado que funciona como tubo de procesos.
  - 3 tubos incorporados que funcionan como receptáculos para reactivos, del siguiente modo:
    - 25 ◦ Un tubo con 200 - 1000 µl de tampón de lavado (0,1 mM Tris, pH 8).
    - Un tubo con 200 - 1000 µl de solución de liberación (40 mM NaOH).
    - Un tubo con 200 - 1000 µl con solución de neutralización (330 mM Tris, pH 8.0).
  - Un tubo incorporado que funciona como cámara para residuos (contendrá ~ 4 ml de residuos líquidos).
  - 3 receptáculos para alojar recipientes de reactivos sólidos. Tubos PCR encajables de 0,3 ml o 0,65 ml (normalmente, almacenados por separado del soporte para reactivos) se colocan en cada una de estas posiciones, y contienen, respectivamente:
    - 35 ◦ reactivos liofilizados para la preparación de muestras (mezcla de enzimas de lisis y perlas de afinidad magnética).
    - primera mezcla maestra PCR liofilizada, sondas y cebadores para una primera detección de los analitos diana.
    - 40 ◦ segunda mezcla maestra PCR liofilizada, sondas y cebadores para una segunda detección de los analitos diana (solo ofrecida en determinados casos, tales como la detección de clamidia y gonorrea en la orina).
  - 4 puntas de pipeta colocadas en sus respectivos 4 compartimentos.
  - funda para puntas de pipeta: las puntas de pipeta cuentan con una funda/bandeja de goteo debajo para capturar las gotas que puedan caer de las puntas de pipeta tras ser utilizadas, y para evitar la contaminación no deseada del instrumento.
  - Asa y cierre flexible permiten una fácil introducción, extracción y colocación positiva de la tira en la gradilla.
  - Una o más etiquetas: colocadas hacia arriba para facilitar la lectura y/o, por ej., con un lector de códigos de barras, conteniendo dicha una o más etiquetas información legible por humanos y por ordenador relativa al análisis a realizar.
- 55 Se entiende que las dimensiones indicadas son ejemplares. Sin embargo, son especialmente deseables para garantizar que un soporte no sobrepasa dichas dimensiones, de modo que una gradilla y un aparato que aloja el soporte para reactivos(s) no resulta ser inconvenientemente grande y puede situarse cómodamente en un laboratorio, por ej., sobre una mesa.

60 Ejemplo 2: Fabricación del soporte para reactivos desechable

Pueden diseñarse y fabricarse accesorios sencillos que permitan la manipulación y procesamiento de múltiples tiras. Pueden efectuarse cinco pasos para producir este componente. El soporte para reactivos desechable se colocará en un accesorio y se llenará con líquidos mediante pipeteado múltiple manual/eléctrico. Inmediatamente tras dispensar todos los líquidos en la tira, se aplicará una lámina mediante termosellado utilizando equipos de termosellado  
 5 ejemplares (prensa de cabeza plana Hix FH-3000-D) y se recortará el sobrante de la lámina según corresponda. Cuando el calor sella los líquidos en la placa, todos los pellets de los tubos pueden pasar a la tira, pueden introducirse las puntas de pipeta en sus respectivos compartimentos, y puede colocarse una etiqueta con código de barras. Pueden colocarse paquetes con desecante en la gradilla moldeada por soplado o termoformada diseñada para alojar 12 soportes. Se cargan doce tiras desechables en la gradilla y a continuación se sellan con la lámina. La  
 10 bolsa sellada se coloca en una caja y se etiqueta para ser enviada.

Ejemplo 3: Sellado con lámina de tubos de reactivos que contienen tampón

Los tubos que contienen tampones tienen que sellarse con materiales de barrera con un vapor húmedo elevado, para conservar el líquido a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Puede ser necesario que los soportes desechables tengan una vida útil de 1-2 años, y así, no perderán más de, digamos un 10-15% del líquido a lo largo del periodo de tiempo, para mantener el volumen de líquido necesario y para mantener la concentración de las diversas moléculas presentes en la solución. Además, los materiales utilizados para la fabricación de los tubos, así como del laminado de sellado, no deben reaccionar con el tampón líquido. Ciertos laminados plásticos especiales  
 15 pueden proporcionar la barrera de humedad, pero tienen que ser muy gruesos (un espesor superior a 300 µm), lo que aumenta considerablemente la fuerza de perforación, o de un caro polímero especial (tal como Aclar). Las láminas de aluminio, incluso una delgada lámina de unos pocos cientos de angstroms constituye una eficaz barrera para la humedad, aunque el aluminio sin recubrir reacciona con algunos tampones líquidos, tales como hidróxido de sodio, incluso una lámina de aluminio con un recubrimiento pulverizado de un polímero no reactivo puede no  
 20 soportar los vapores corrosivos a largo plazo. Pueden reaccionar a través de pequeños orificios presentes en el recubrimiento y pueden no funcionar como barrera con el paso del tiempo.

Por estos motivos, se ha identificado que las láminas de aluminio con una estructura laminada son una barrera adecuada, cuyas propiedades ejemplares se describen a continuación:

1. El calor del sellado sella la tira de polipropileno individual (temperatura de sellado ~ 170-180 °C) No se producen arrugas, grietas, ni cuarteado de la lámina tras efectuar el sellado
2. Pérdida de velocidad de transmisión de la humedad del vapor (MVTR) inferior al 10% del líquido (20 microlitros de un volumen de 200 microlitros) durante un periodo de 1 año almacenado a temperatura y presión ambiental. (área de transporte efectiva ~ 63 mm<sup>2</sup>); MVTR aproximada ~0,8 cc/m<sup>2</sup>/día
3. Capacidad química para no reaccionar con 40 mM de hidróxido de sodio (pH < 12,6): la lámina debe incorporar un laminado plástico con un espesor de al menos 15 micras en el lado del fluido sellado. Capacidad para no reaccionar  
 40 con otros tampones que contienen detergentes suaves
4. Capacidad de punción mediante una pipeta p1000 con una fuerza inferior a 3 lb Antes ser perforada, una membrana totalmente soportada de 8 mm de diámetro no se estirará más de 5 mm en dirección ortogonal. Tras ser perforada, la lámina no sellará la punta de pipeta alrededor de la circunferencia de la pipeta.  
 45
5. Otras características: libre de orificios Sin burbujas en caso de estructura multilaminadas.

Ejemplo 4: Mecanismo de perforación a través de un laminado plastificado y retirada de tampón líquido

El laminado de aluminio que contiene una película plástica descrito en esta memoria actúa correctamente no reaccionando con reactivos corrosivos tales como tampones que contienen NaOH, y con propiedades favorables de perforación y actúan como una barrera de la humedad. No obstante, presenta algunas dificultades adicionales durante el perforado. La lámina de aluminio tiende a romperse en un patrón poligonal irregular mayor que el diámetro de la pipeta, mientras que la película plástica tiende a envolver la punta de pipeta con un espacio mínimo  
 50 entre la pipeta y la película plástica. El diámetro del orificio de la película plástica es similar al diámetro máximo de la pipeta que ha atravesado el laminado. Esta envoltura de la pipeta dificulta las operaciones de dispensado y pipeteado, salvo que se incorpore un orificio de ventilación que permita que se equilibren las presiones de fuera y del aire del interior del tubo.

A continuación, se describe una estrategia para el correcto pipeteado de fluido:

1. Perforar a través de la estructura del laminado y acercar la pipeta al fondo del tubo de reactivo de modo que el orificio creado en el laminado es casi tan grande como el diámetro máximo de la pipeta (por ej., ~6 mm para una pipeta p1000)

65

2. Retirar la pipeta una corta distancia de modo que se deja un pequeño orificio anular de ventilación entre la pipeta y el laminado. La pipeta p1000 tiene un diámetro exterior mínimo de 1 mm y un diámetro exterior máximo de 6 mm y la sección cónica de la pipeta tiene alrededor de 28 mm de largo. Un orificio de ventilación con un espesor de unos cientos de micras es suficiente para crear un orificio de ventilación fiable. Esto hace que la pipeta introducida se corresponda con un diámetro de 5,8 mm, dejando un espacio anular de 0,1 mm alrededor de ella.

3. Retirar fluido del tubo. Tener en cuenta que el tubo está diseñado para contener más fluido del que es necesario retirar para realizar un procedimiento de preparación de muestras.

10 Ejemplo 5: Perforación de lámina y disolución de reactivos liofilizados:

Los recipientes de reactivos liofilizados proporcionados junto con un soporte según se describe en esta memoria están normalmente sellados con la lámina de aluminio no plastificado (es decir, no un laminado como se utiliza para sellar los tubos de reactivos). La lámina de aluminio se rompe en un patrón poligonal irregular al ser perforada por una pipeta y deja un orificio de ventilación, aunque la pipeta se mueva hacia el fondo del tubo. Para ahorrar reactivos, es deseable disolver los reactivos y maximizar la cantidad retirada del tubo. Para ello, se coloca en el fondo del recipiente un patrón con aristas en estrella (estrellado) para maximizar el volumen de líquido retirado y la velocidad de flujo entre las aristas.

20 A continuación, se describen pasos ejemplares para extraer fluidos:

1. Perforar con la pipeta y dispensar el fluido lejos del material liofilizado. Si la pipeta se introduce por debajo del nivel de material liofilizado, éste se introducirá en la pipeta y puede provocar atascos del flujo de líquido hacia afuera de la pipeta.

2. Dejar que el material liofilizado se disuelva durante unos segundos.

3. Mover la pipeta hacia abajo tocando el fondo estriado del tubo

4. Realizar el número adecuado de operaciones de succión y expulsión (4-10) para mezclar correctamente los reactivos con el tampón líquido.

5. Retirar todos los reactivos y mover la pipeta para dispensarlos en el siguiente tubo de procesamiento.

35 Ejemplo 6: Propiedades del material y de la superficie del tubo de lisis

El material, las propiedades de la superficie y el acabado de la superficie tienen un gran impacto en la sensibilidad del ensayo realizado. En aplicaciones clínicas, un ADN/ARN con un nivel tan bajo como 50 copias/muestra (~ 1 ml volumen) debe ser detectado positivamente en un fondo de miles de millones de otras moléculas, algunas de las cuales inhiben fuertemente la PCR. Para conseguir esos elevados niveles de sensibilidad, debe escogerse la superficie de los tubos de reacción, así como del material de la superficie, para que tenga una mínima unión con polinucleótidos. Durante la creación de la herramienta de moldeo por inyección para crear estos tubos de plástico, las superficies inherentes creadas por el mecanizado pueden tener una gran área superficial debido a marcas de corte tan grandes como décimas de micras de picos y valles. Dichas superficies deben pulirse hasta un acabado SPI A1/A2 (acabado de espejo) para eliminar las irregularidades superficiales microscópicas. Además, estos valles microscópicos atraparán las perlas magnéticas (0,5 - 2  $\mu$ ) en sitios no intencionados y pueden provocar un resultado irregular. Además de la rugosidad superficial, la hidrofobicidad superficial/moléculas superficiales presentes pueden hacer que los polinucleótidos se unan en lugares no intencionados y reduzcan la sensibilidad de la prueba. Además del material base utilizado, tal como polipropileno homogéneo y otros polímeros, otros materiales específicos utilizados durante el moldeo de dichos tubos, tales como compuestos para la liberación del molde u otros aditivos de fabricación, pueden tener un profundo impacto en el resultado de las reacciones.

Ejemplo 7: Cabezal dispensador de líquido

En referencia a las FIG. 18, 19A-C, y 63, el dispensador de líquido ejemplar está sujeto a un brazo pórtico, y recibe instrucciones a través de un cable eléctrico 1702. En una cara del dispensador de líquido se ha montado un escáner de códigos de barras 1701. El brazo pórtico está montado sobre un rail horizontal 1700 que proporciona movimiento en la dirección x. No se muestra un rail dispuesto ortogonalmente que proporciona movimiento en la dirección y. El dispensador de líquido comprende una bomba motorizada controlada por ordenador 1800 conectada al colector de distribución de fluido 1802 con válvulas asociadas controladas por ordenador 1801 y un pipetero de 4 canales con cabezales con resortes individuales 1803. El colector de distribución de fluido cuenta con nueve válvulas solenoides Lee Co. 1801 que controlan el flujo de aire a través de las puntas de pipeta: dos válvulas por pipeta, y una válvula adicional para ventilar la bomba. El lector de códigos de barras 1701 permite una detección positiva de tubos de muestras, reactivos desechables y cartuchos microfluídicos. El escáner está montado sobre el eje z, de modo que puede colocarse para leer los códigos de barras del tubo de muestras, de la tira, y del cartucho.

Ejemplo 8: Calentador/Separador integrado

5 En la FIG. 64 se muestra un separador magnético integrado y un conjunto de calentamiento ejemplares. El separador magnético 1400 y el conjunto de calentamiento 1401 fabricados comprenden doce bloques calentadores alineados en paralelo entre sí. Cada bloque calentador 1403 está fabricado en aluminio y tiene una configuración en L con una entrada en U para recibir una cámara de procesos 1402. Cada bloque calentador 1403 está sujeto y conectado con una banda metálica 1408 y tornillos 1407. El imán 1404 es un bloque rectangular de neodimio (u otro material terrestre raro permanente, K & J Magnetics, Forcefield Magnetics) dispuesto tras cada bloque calentador 10 1403 y está montado sobre un elemento de soporte. Engranajes 1406 comunican la energía rotatoria desde un motor (no mostrado) para hacer que el eje motorizado 1405 eleve y baje el imán 1404 en relación con cada bloque calentador. El motor se controla por ordenador para mover el imán a velocidades de 1-20 mm/s. El dispositivo comprende además una tarjeta de circuitos impresos (PCB) 1409 configurada para hacer que el el conjunto de calentamiento aplique calor independientemente a cada cámara de proceso 1402 tras recibir las instrucciones adecuadas. En la realización ejemplar, el dispositivo también comprende un sensor de temperatura y una resistencia de potencia junto con cada bloque calentador. 15

Ejemplo 9: Software ejemplar

20 El software ejemplar que acompaña la utilización del aparato aquí descrito puede incluir dos amplias partes – interfaz de usuario y firmware del dispositivo. El software de interfaz de usuario permite ciertos aspectos de interacción con el usuario tales como – introducción de información de pacientes/muestras, supervisión del progreso de la prueba, advertencias de error, impresión de los resultados de la prueba, subir los resultados a bases de datos y actualizar el software. El firmware del dispositivo puede ser el software de bajo nivel que ejecuta el análisis. El firmware puede tener una parte genérica que puede ser independiente del análisis y una parte específica al análisis que se está realizando. La parte específica del análisis ("protocolo") puede especificar las operaciones microfluídicas y su orden para efectuar el análisis. 25

30 Las FIG. 65A y 65B muestran capturas de pantalla de la interfaz de programación, del sensor de calor en tiempo real y de la supervisión del detector óptico. Esta supervisión del rendimiento del dispositivo en tiempo real se realiza a modo de comprobación; no es visible para el usuario en la configuración final.

Interfaz de usuario:

35 Un conjunto de LCD de grado médico y una pantalla táctil puede servir como interfaz del usuario a través de una interfaz gráfica del usuario que facilita la operación y proporciona instrucciones para la resolución de problemas menores. El LCD y pantalla táctil han sido especificados para garantizar la compatibilidad de todas las superficies con agentes limpiadores comunes. Puede configurarse un escáner de códigos de barras integrado en el analizador para escanear el código de barras del cartucho (especificando el tipo de cartucho, número de lote, fecha de caducidad) y, de estar disponible, el ID de paciente y usuario de uno o más tubos de muestras. 40

Ejemplo 10: Aparato preparatorio ejemplar

45 Este producto es un instrumento que permite el procesado automático de 24 muestras clínicas para producir ácido nucleico purificado (ADN o ARN) en alrededor de media hora (FIG. 66). El ácido nucleico purificado puede procesarse en una máquina de amplificación-detección independiente para detectar la presencia de ciertos ácidos nucleicos diana. Las muestras se procesan en una tira desechable individual, precargada con sustancias químicas para preparar la muestra y los ácidos nucleicos purificados finales se dispensan en tubos PCR. La manipulación del fluido se permite mediante el movimiento del cabezal de pipeteado de un brazo pórtico xyz. (FIG. 67) 50

El sistema cuenta con los siguientes subsistemas:

- 55 ▪ Dos gradillas de procesamiento de muestras, cada gradilla procesa hasta 12 muestras clínicas en tiras desechables individuales
- Conjunto de separador magnético – calentador de tubos (24 estaciones de calentamiento)
- Un cabezal dispensador de líquido con cuatro sondas
- 60 ▪ Brazo pórtico de 3 ejes para para mover el cabezal de pipetas
- Estación de soporte para tubos PCR con enfriamiento Peltier para recibir el ADN/ARN
- 65 ▪ Electrónica de control

- Lector de códigos de barras

5 Funcionamiento: El usuario tiene que obtener una lista de trabajo de cada muestra, en caso que se desee extraer ADN o ARN de cada muestra clínica. Los tubos de muestras se colocan en la gradilla y para cada tipo de muestra (ADN o ARN), el usuario desliza un reactivo desechable individual (procesamiento de ADN o ARN) en el carril correspondiente de la gradilla. El (soporte) desechable individual tendrá todos los reactivos de preparación de la muestra, el tubo de procesos, así como pipetas desechables ya preempaquetadas. Una vez todos los desechables están cargados en la gradilla, esta se coloca en posición en el instrumento. Se colocan tubos PCR abiertos en el soporte para tubos con enfriamiento Peltier, en donde se dispensará el ácido nucleico purificado final. A 10 continuación, el usuario cierra la puerta del instrumento e inicia el procesamiento de la muestra mediante la GUI (Interfaz Gráfica del Usuario).

15 El instrumento comprueba que todos los subsistemas funcionan y a continuación lee el código de barras de los tubos de muestras y del reactivo individual desechable. Se determina cualquier disparidad respecto a una lista de trabajo preexistente y, de ser necesario, se muestran errores. A continuación, el instrumento pasa por unas series de procesamiento de líquido, calentamiento, separaciones magnéticas para completar los pasos de preparación de la muestra de cada una de las muestras clínicas y genera el ácido nucleico purificado en el tubo PCR. Los pasos básicos implicados en el procesamiento de cada muestra son lisis de la muestra, captura de ácido nucleico en perlas de afinidad magnética, lavado de las perlas magnéticas para eliminar las impurezas, liberación del ácido nucleico de 20 las perlas magnéticas, neutralizando el ADN liberado y dispensándolo en el tubo PCR final. Estos tubos se mantienen a 4 °C hasta que se procesan todas las muestras y el usuario se lleva el tubo para el procesamiento de los ácidos nucleicos.

25 Ejemplo 11: Aparato ejemplar de diagnóstico

El aparato, en combinación con los consumibles asociados, realiza automáticamente todos los aspectos del análisis de ácido nucleico, incluida la preparación de la muestra, amplificación, y detección de hasta 48 muestras por hora teniendo los primeros 24 resultados disponibles en menos de una hora. El sistema es fácil de utilizar. Un operario simplemente prepara un alícuota de una parte de la muestra del paciente en un tubo específico que contiene tampón preempaquetado. El operario coloca los tubos específicos en posiciones en una gradilla de muestras. El operario carga una tira de reactivos de plástico desechable para el análisis adecuado en la gradilla. El otro único consumible utilizado en el aparato son cartuchos PCR microfluídicos para efectuar la amplificación y detección; cada cartucho puede efectuar hasta doce análisis PCR y pueden cargarse dos cartuchos a la vez en el analizador. En el caso de que el aparato requiriera un nuevo cartucho para PCR, el analizador indicaría al operario que debe cargar el 35 cartucho. A continuación, el analizador indicará al operario que cierre la tapa para iniciar el análisis. Todos los consumibles y tubos de muestras incorporan un código de barras para la identificación positiva de las muestras.

40 La lisis de las muestras y la preparación de ADN, que requerirá aproximadamente media hora para una serie completa de 24 muestras, se realiza automáticamente mediante la robótica del analizador y los componentes de manipulación de líquidos mediante protocolos y reactivos situados en tiras plásticas desechables individuales. A continuación, el aparato mezcla la muestra y los reactivos para la PCR e inyecta la mezcla en un cartucho que se procesará automáticamente mediante una máquina PCR integrada. La PCR y la detección rápida, en tiempo real requiere menos de 20 minutos. Los resultados, disponibles inmediatamente tras completar la PCR, se muestran en la pantalla táctil del instrumento, se imprimen o se envían al sistema de información hospitalaria, según especifique el usuario (o el supervisor del usuario). 45

50 Cada instrumento puede procesar hasta 24 muestras a la vez con un total de 48 muestras a la hora tras la primera serie. El analizador tiene un ancho ligeramente inferior a 1 m y encaja perfectamente en una mesa de laboratorio estándar. Todas las operaciones de la unidad pueden dirigirse mediante el lápiz lector de códigos de barras incluido y la pantalla táctil. El analizador puede interconectarse con sistemas de información de laboratorio, redes hospitalarias, PC, impresoras o teclados a través de interfaces USB y un puerto Ethernet.

El aparato posee las siguientes características.

55 Sensibilidad: el aparato tiene un límite de detección de ~50 copias de ADN o ARN. (y puede tener un límite de detección tan bajo como 25-30 copias de ADN/ARN).

60 Coste por análisis: debido a la naturaleza miniaturizada y simplificada de los reactivos, cartuchos y otros consumibles de HandyLab, el coste de los elementos por análisis será relativamente bajo y muy competitivo.

65 Automatismo: A diferencia de los sistemas NAT "automatizados" actuales, que requieren un grado de interacción tecnológica relativamente intensa con el sistema, mediante la utilización de los análisis unificados y la integración completa de la extracción de muestras, preparación, amplificación y detección, el aparato aquí descrito ofrece un nivel de automatismo más elevado, y la correspondiente reducción de los tiempos dedicados a la tecnología y del nivel de capacidad necesario, teniendo, por lo tanto, un impacto favorable en los costes de mano de obra en general.

Rendimiento: El rendimiento se define en cuántos análisis puede efectuar un sistema en un tiempo determinado. El aparato puede ejecutar 45 análisis por hora, de media.

- 5 Tiempo hasta el primer resultado: En un entorno hospitalario, el tiempo hasta el primer resultado es una consideración especialmente importante. El aparato producirá los primeros 24 resultados en menos de una hora y 24 resultados adicionales cada media hora a partir de entonces.

10 Acceso aleatorio y STAT: El acceso aleatorio es la capacidad de ejecutar una serie de análisis juntos en una sola serie y colocar las muestras en posiciones no asignadas del analizador. También, con sistemas de química e inmunoensayo, es deseable poder añadir pruebas una vez iniciada una serie. A esto se hace referencia normalmente como "acceso aleatorio auténtico" ya que el usuario tiene una completa flexibilidad en relación con qué pruebas pueden ejecutarse en un analizador y cuándo puede añadirse una nueva muestra a una serie. Un STAT es una muestra que requiere un resultado lo más rápido posible y, por lo tanto, se le da prioridad en la cola de análisis del analizador. Actualmente, esencialmente todos los analizadores de química e inmunoensayo tienen un acceso aleatorio auténtico y frecen capacidades STAT. No obstante, en el caso de NAT, pocos sistemas ofrecen acceso aleatorio o capacidades STAT. El instrumento aquí descrito proporciona acceso aleatorio y capacidades STAT.

20 Menú: El número y tipo de análisis disponibles en el analizador es un factor muy importante a la hora de escoger un sistema. El aparato aquí descrito despliega una estrategia de menú que implica una mezcla de análisis "estándar" de ácidos nucleicos de gran volumen, combinado con análisis nuevos de gran valor

25 El aparato permite el procesamiento automático de 24 muestras clínicas para purificar el ácido nucleico, mezclar el ADN/ARN con reactivo para la PCR y ejecutar la PCR en tiempo real en el cartucho microfluídico para proporcionar resultados de la muestra en una hora. El aparato ejemplar tiene dos lectores PCR, cada uno de ellos capaz de ejecutar un cartucho microfluídico de 12 carriles utilizando un sistema óptico con un sistema específico de detección óptico de dos colores. FIG. 68, FIG. 69.

30 El aparato cuenta con los siguientes subsistemas:

- Dos gradillas para el procesamiento de muestras, cada gradilla procesa hasta 12 muestras clínicas en tiras desechables individuales
- Un conjunto de separador magnético-calentador de tubos (24 estaciones de calentamiento)
- Un cabezal dispensador de líquido con cuatro sondas
- Brazo pòrtico de 3 ejes para mover el cabezal de la pipeta
- Dos estaciones de amplificación-detección PCR, cada una de ellas capaz de ejecutar un cartucho microfluídico de 12 carriles y un sistema de detección óptico específico de dos colores para cada carril de PCR.
- Electrónica de control
- Lector de códigos de barras

En las FIG. 70, 71 se muestran imágenes del exterior (de cara) y del interior, respectivamente.

50 Funcionamiento: El usuario obtiene una lista de trabajo para cada muestra, en función de si se desea detectar cierto analito diana (tal como EGB, clamidia, gonorrea, VHS) en cada muestra clínica. Los tubos de muestras se colocan en la gradilla y para cada muestra, el usuario desliza un reactivo desechable individual (específico para el analito) en el carril correspondiente de la gradilla. El desechable individual contendrá todos los reactivos de preparación de la muestra, reactivo para la PCR, tubo de procesos, así como pipetas desechables ya preempaquetadas. Una vez cargados los desechables en la gradilla, esta se coloca en su posición en el interior del instrumento. A continuación, el usuario coloca dos cartuchos PCR microfluídicos de 12 carriles en las dos bandejas del lector de PCR. A continuación, el usuario cierra la puerta del instrumento y comienza el procesamiento de la muestra mediante la GUI (Interfaz Gráfica de Usuario).

60 El instrumento comprueba que todos los subsistemas funcionen y, a continuación, lee el código de barras de los tubos de muestras y de los reactivos individuales desechables. Se determina cualquier disparidad respecto a una lista de trabajo preexistente y, de ser necesario, se muestran errores. A continuación, el instrumento realiza series de procesamiento de líquido, calentamiento, separación magnética para completar los pasos de preparación de la muestra de cada una de las muestras clínicas, mezcla el ácido nucleico purificado con reactivo para la PCR y dispensa la mezcla final en un carril del cartucho microfluídico. Tras cargar un cartucho microfluídico con la mezcla



final para PCR, la bandeja del cartucho se mueve y alinea el cartucho en el lector y el sistema de detección óptico presiona el cartucho contra una superficie de calentamiento microfluídica para PCR. Se accionan válvulas incorporadas en chip para cerrar la mezcla de reacción y, a continuación, se inicia el termociclado para iniciar la reacción PCR. En cada ciclo de PCR (hasta 45 ciclos), se detecta la fluorescencia de cada carril para la PCR mediante el sistema de detección óptico (2 colores por carril para la PCR) y se determina el resultado final en base al ciclo umbral (Ct).

Los pasos de preparación de la muestra para 24 muestras se realizan en alrededor de 40 minutos y la reacción PCR en alrededor de 20 minutos.

Lector de muestras:

El lector realiza la comprobación de las funciones de hasta doce muestras de pacientes debidamente preparadas mediante el proceso de la PCR (PCR en tiempo real) cuando se utiliza en conjunción con cartuchos microfluídicos de HandyLab. Cada unidad empleará dos módulos lectores para un total de hasta veinticuatro análisis (FIG. 72A y 72B) El funcionamiento del lector ha sido diseñado para que requiera una mínima interacción con el cliente, necesitando que éste se encargue solo de la carga y descarga de los cartuchos de análisis. Durante la secuencia de "carga de consumibles", el lector presentará una bandeja accionada a motor para instalar el cartucho desechable. Al deslizar un pequeño botón situado en el frontal de la bandeja, se levantará una cubierta protectora cargada a resorte permitiendo colocar debidamente en su lugar al cartucho de análisis. A continuación, se baja la cubierta hasta que el botón se bloquea en el marco de la bandeja, manteniendo sujeto el cartucho y evitando que se mueva durante la secuencia de carga de muestras.

Una vez se han dispensado con pipetas las muestras preparadas en el cartucho de análisis, la bandeja se retrae hacia el lector, colocando con precisión el cartucho de análisis bajo el chasis del conjunto óptico. A continuación, se baja el conjunto óptico mediante un motor de pasos hasta que hace contacto con el cartucho de análisis. Llegados a este punto el cartucho de análisis está situado 1/8" por encima de la posición del objetivo del conjunto de calentamiento. A medida que continúa el movimiento hacia abajo el cartucho de análisis y su soporte en el interior de la bandeja comprimen resortes situados en el marco de la bandeja (que se utilizan posteriormene para devolver el cartucho a su posición normal y pueden retirar las uniones de alambre encapsulado situadas en el conjunto de calentamiento durante el movimiento de la bandeja). Se completa el movimiento del cartucho de análisis y el conjunto óptico cuando se ha hecho contacto con el conjunto de calentamiento y se obtiene un mínimo de 2 psi a lo largo de dos tercios de la zona del cartucho alrededor de los canales PCR y sus compuertas de control. En este punto, se ejecuta el análisis del cartucho utilizando el conjunto de calentamiento, medido con la óptica incorporada y controlado a través del software y la electrónica del mismo modo que se opera con instrumentos HandyLab similares.

Una vez completado el análisis funcional, el motor principal eleva el conjunto óptico, liberando la presión sobre el cartucho de análisis y permitiendo que regrese a su posición normal. Cuando se le indica, el motor de la bandeja que funciona con cremallera y piñón, presenta la bandeja al cliente para la extracción y eliminación del cartucho. Cuando la bandeja está en posición extendida, queda suspendida sobre un bloque de soporte situado en el chasis del aparato. Este bloque evita que el cartucho se deslice del soporte hacia la bandeja durante la carga y actúa como soporte mientras se pipetea las muestras en el cartucho desechable. También se prevé en este bloque de soporte una palanca de ayuda que permite elevar y agarrar el cartucho desechable durante su extracción. El cliente puede extraer todos los componentes de la bandeja, así como el bloque de soporte y el elevador de cartuchos, sin herramientas, para su limpieza y luego puede reinstalarlos fácilmente.

Módulo calentador microfluídico para PCR:

El módulo calentador microfluídico para PCR comprende una oblea de vidrio con microcalentadores y sensores definidos fotolitográficamente para proporcionar calor con precisión para accionar las válvulas y ejecutar el termociclado necesario para efectuar una reacción de PCR en tiempo real. La superficie de la oblea cuenta con zonas específicas controladas individualmente para cada una de los carriles para la PCR del cartucho microfluídico. En el caso de un cartucho de 12 canales, hay 12 zonas PCR, y el cartucho de 24 canales, tiene 24 zonas de calentamiento de la PCR. Los calentadores y sensores individuales están conectados eléctricamente a una tarjeta de circuitos impresos mediante uniones de hilo de oro o aluminio. Un encapsulante que cumple los requisitos térmicos proporciona protección física a las uniones de hilos. Mientras el presente dispositivo está fabricado en oblea de vidrio, los calentadores pueden estar fabricados en obleas de Si sobre vidrio y otros sustratos poliméricos. Cada sustrato puede proporcionar ventajas específicas relacionadas con sus propiedades térmicas y mecánicas. Además, al utilizar un proceso de fotolitografía, tales sustratos de calentamiento pueden montarse utilizando componentes electrónicos comercialmente disponibles tales como resistencias de potencia, peltiers, transistores, manteniendo la superficie de calentamiento superior de cada uno de los componentes al mismo nivel para proporcionar calentamiento a un cartucho microfluídico. Los valores de calibración de la temperatura de cada sensor de temperatura pueden almacenarse en una EEPROM u otros dispositivos de memoria instalados en la tarjeta PC del calentador.

Cartucho de 12 carriles:

5 Este cartucho de 12 canales es el mismo diseño básico que el descrito en la solicitud de patente estadounidense provisional, con número de serie 60/859,284, presentada el 1 de noviembre, 2006, con las siguientes modificaciones: aumento del volumen PCR de 2 µl a 4,5 µl, que conduce a un aumento del volumen de entrada de 4 µl a 6 µl. Los orificios de entrada se alejan unos pocos milímetros del borde del cartucho para permitir espacio para un saliente de alineación de 2 mm en el cartucho. Se incluye un saliente de alineación similar en el otro borde del cartucho. (FIG. 31A, 31B)

10 Caja:  
 El diseño de la caja del aparato debe satisfacer los siguientes requisitos: asegurar la seguridad del cliente durante el funcionamiento; permitir acceso a las interfaces de alimentación y comunicación; proporcionar entrada, salida y filtrado de aire; posibilitar su utilización con una mano y poder abrir la unidad para introducir y extraer materiales; incorporar una estética comercializable.

Enfriamiento:  
 20 El enfriamiento del aparato se diseñará en conjunción con la caja y el sistema en general para garantizar que todos los conjuntos que requieren aire estén en el camino del flujo o reciban aire desviado.

25 El concepto actual es que la entrada de aire esté situada en la parte inferior del panel frontal inferior. El aire, así, pasa a través de un filtro lavable antes de entrar en el aparato. Componentes de lámina de metal dirigen el aire a las dos gradillas desechables y a la fuente de alimentación principal. A continuación, el aire se dirige a través de los soportes de tarjetas, alrededor de los lectores y sale a través de ranuras previstas en la parte superior de la caja.

Placa base  
 30 El bastidor y la pletina XYZ están montados sobre la placa base de modo que no se produzca una desalineación entre la pletina, el cartucho y el desechable. La caja está montada en la placa base. El diseño final de la caja determina la disposición de los orificios de los pernos para su montaje. La placa posterior (*backplane*) se monta en la placa base con separadores. El resto de tarjetas se montan en la placa posterior. Los desechables se montan en una gradilla que podrá extraerse de los estantes montados en la placa base. El diseño final de los estantes del lector determina la disposición de los orificios de los pernos. La fuente de alimentación se monta en la placa base. La placa base se extiende a lo largo y a lo ancho bajo el instrumento.

Ejemplo 12: Aparato de diagnóstico de alta eficiencia ejemplar  
 40 Una realización altamente multiplexada también permite el procesamiento automático de 24 muestras clínicas para purificar ácidos nucleicos, mezclar el ADN/ARN purificado con reactivo para la PCR y realizar la PCR en tiempo real en un cartucho microfluídico. Este producto incorpora un solo lector PCR, con cabezal lector de escaneo, capaz de leer hasta 4 colores diferentes en cada una de los carriles para la PCR. El cartucho tiene 24 canales PCR que permiten que un solo cartucho procese las 24 muestras clínicas. Además, este producto cuenta con un cargador automático de cartuchos, en donde el instrumento alimenta automáticamente al lector PCR desde un paquete de cartuchos y desecha los cartuchos usados en una bandeja de eliminación. En las FIG 73, y 74 se muestran diagramas.

50 El aparato incorpora los siguientes subsistemas:

- Dos gradillas para el procesamiento de muestras, cada gradilla procesa hasta 12 muestras clínicas en tiras desechables individuales
- Conjunto de separador magnético-tubo de calentamiento (24 estaciones de calentamiento)
- Un cabezal dispensador de líquido con 4 sondas
- Brazo pórtico de 3 ejes para mover el cabezal para pipetas
- 60 ▪ Una sola estación detección – amplificación por PCR que puede procesar un cartucho microfluídico de 24 carriles y una unidad de escáner para detectar hasta 4 colores en cada carril para la PCR.
- Una unidad de carga automática para alimentar un cartucho microfluídico de 24 carriles desde una caja a la unidad de detección por PCR.

- Electrónica de control
- Lector de códigos de barras

5 Funcionamiento: El usuario obtiene una lista de trabajo para cada muestra, en función de si se desea detectar cierto analito diana (tal como EGB, clamidia, gonorrea, VHS) para cada muestra clínica. Los tubos de muestras se colocan en la gradilla y para cada muestra, el usuario desliza un reactivo desechable individual (específico para el analito) en el carril correspondiente de la gradilla. El desechable individual contendrá todos los reactivos para la preparación de la muestra, reactivos para la PCR, tubo de procesos, así como pipetas desechables ya preempaquetadas. Una vez cargados los desechables en la gradilla, esta se coloca en posición en el instrumento. A continuación, el usuario cierra la puerta del instrumento y comienza el procesamiento de la muestra mediante la GUI (Interfaz Gráfica de Usuario).

15 El instrumento comprueba que todos los subsistemas funcionen y, a continuación, lee el código de barras de los tubos de muestras, de los reactivos individuales desechables y detecta la presencia de un cartucho microfluídico de 24 carriles. Se determina cualquier disparidad respecto a una lista de trabajo preexistente y, de ser necesario, se muestran errores. A continuación, el instrumento realiza series de procesamiento de líquido, calentamiento, separación magnética para completar los pasos de preparación de la muestra de cada una de las muestras clínicas, mezcla el ácido nucleico purificado con reactivo para la PCR y dispensa la mezcla final en un carril del cartucho microfluídico de 24 carriles. Tras cargar un cartucho microfluídico con la mezcla final para la PCR, un impulsor motorizado automatizado mueve y alinea el cartucho en el lector PCR. A continuación, el sistema de detección óptico presiona el cartucho contra una superficie de calentamiento microfluídica para PCR. Se accionan válvulas incorporadas en chip para cerrar la mezcla de reacción y a continuación se inicia el termociclado para iniciar la PCR. En cada ciclo de la PCR (hasta 45 ciclos), el sistema de detección óptico detecta la fluorescencia de cada carril para la PCR (2 colores por carril para la PCR) y se determina el resultado final en base al ciclo umbral (Ct). A continuación, se expulsa automáticamente el cartucho en una papelera de cartuchos usados.

30 El instrumento comprueba la funcionalidad de todos los subsistemas y a continuación lee el código de barras de los tubos de muestras, de los reactivos unificados desechables y la presencia de un cartucho microfluídico de 24 carriles. Se determina cualquier disparidad respecto a una lista de trabajo preexistente y se muestran errores, de ser necesario. A continuación, el instrumento realiza por una serie de procesamiento de líquido, calentamiento, separación magnética para completar los pasos de preparación de la muestra de cada una de las muestras clínicas, mezcla el ácido nucleico purificado con reactivo para la PCR y dispensa la mezcla final en una de los 24 carriles del cartucho microfluídico. Tras cargar el cartucho microfluídico con la mezcla PCR final, un impulsor automatizado mueve y alinea el cartucho en el lector PCR. El sistema de detección óptico presiona el cartucho contra una superficie de calentamiento PCR microfluídico. Se accionan válvulas incorporadas en chip para cerrar la mezcla de reacción y a continuación se inicia termociclado para iniciar la reacción PCR. En cada ciclo de PCR (hasta 45 ciclos), el sistema de detección óptico detecta fluorescencia de cada carril para la PCR (2 colores por carril para la PCR) y el resultado final se determina en base al ciclo umbral (Ct). A continuación, el cartucho usado se expulsa automáticamente hacia una papelera para cartuchos usados.

45 Los cartuchos microfluídicos se almacenan en un paquete de cartuchos (24 cartuchos como máximo) y el instrumento alerta al usuario a la hora de reemplazar el paquete de cartuchos y vaciar la papelera de cartuchos usados cuando se han utilizado todos los cartuchos del paquete.

#### Cartucho de 24 carriles

50 El cartucho de 24 carriles tiene dos hileras de 12 carriles para la PCR. En las FIG. 75 – 77 se muestran diversas vistas. El cartucho tiene 3 capas, un laminado, un sustrato, y una etiqueta. La etiqueta se muestra en dos piezas. Cada carril tiene un puerto de entrada de líquido, que se interconecta con una pipeta desechable; una cámara de reacción PCR de 4 microlitros (1,5 mm de ancho, 300 micras de profundidad y aproximadamente 10 mm de largo), dos microválvulas a ambos lados del reactor PCR y orificio de salida. Normalmente, las microválvulas están abiertas y cierran el canal al accionarlas. Los orificios de salida permiten que el canal fluido contenga líquido en exceso (~1 µl) en caso que se dispensen más de 6 µl de fluido en el cartucho.

55 Los orificios de entrada del cartucho tienen forma cónica y un diámetro de 3-6 mm en la parte superior para garantizar que las pipetas pueden operarse fácilmente mediante el cabezal dispensador de fluido a través del orificio cónico. Una vez la pipeta se introduce en el cono, la forma cónica guía la pipeta y sella mecánicamente para proporcionar un dispensado o retirada de fluido en el cartucho libre de errores. Cuanto mayor sean los orificios, mejor será la alineación con la pipeta, no obstante, deben maximizarse el número de puertos de entrada a lo ancho del cartucho, así como mantener la distancia entre orificios, compatible con la distancia entre pipetas. En este diseño en particular, la distancia entre pipetas es 18 mm y la distancia entre orificios de carga del cartucho es 8 mm. De modo que los carriles 1, 4, 7, 11 se pipeteen durante una operación de dispensado; los carriles 2, 5, 8 y 12 en la siguiente, y así sucesivamente.

65

La altura de los orificios cónico se mantiene más baja que la altura de los salientes del cartucho para garantizar que los cartuchos pueden apilarse sobre los salientes. Los salientes de los dos bordes largos del cartucho permiten el apilado de los cartuchos con una superficie de contacto mínima entre dos cartuchos apilados, y ayudan a guiar el cartucho hacia el interior del lector desde el paquete de cartuchos (véanse FIG. 28 - 33).

5 Cargador automático de cartuchos

10 El cargador automático de cartuchos consiste en un lugar que cierra de forma positiva un paquete de 24 cartuchos microfluídicos, preapilados en una caja a resorte (por ej., FIG. 33). La caja incorpora elementos estructurales en los laterales que permiten el posicionamiento unidireccional y el bloqueo de la caja en el cargador automático (FIG. 33). Para cargar una caja nueva, el usuario mueve un elemento deslizante situado a la izquierda del cargador automático, coloca y empuja la caja en la ranura y libera el bloqueo deslizante para mantener la caja en la posición correcta. Los resortes cargados en el fondo de la caja ayudan a empujar la caja cuando debe reemplazarse. El resorte en espiral presente en el fondo del paquete de cartuchos empuja los cartuchos y puede empujarlos de forma  
15 continuada con una fuerza de 4 a 20 libras.

La presencia o ausencia de cartuchos se detecta al leer el código de barras situado en la parte superior del cartucho, si está presente.

20 Para iniciar una serie de PCR, el cabezal de pipeteado dispensa la mezcla de reacción PCR en el número de carriles que corresponda del cartucho superior del cargador automático (por ej., FIG. 28). El impulsor empuja el cartucho superior de la caja del cargador automático hacia los dos raíles que guían el cartucho hacia el lector de la PCR. El cartucho se empuja hacia la posición calibrada bajo el lector y, a continuación, el bloque óptico se mueve hacia abajo utilizando un motor de pasos para llevar el cartucho contra la superficie del microcalentador. La parte inferior  
25 del bloque óptico (placa de apertura) tiene proyecciones en los laterales para permitir que el cartucho se alinee de forma precisa contra las aperturas. El motor de pasos empuja el cartucho hacia una posición precalibrada (por ej., FIG. 30) que proporciona una presión de contacto mínima de 1 psi sobre la superficie de calentamiento del cartucho microfluídico.

30 Una vez completada la reacción PCR, el motor a pasos se aleja 5-10 mm del cartucho, libera la presión de contacto y permite que el cartucho se desplace en los raíles de guía. Se activa el impulsor que empuja el cartucho hacia la papelera cartuchos usados (por ej., FIG. 32). Una vez efectuado este paso, el impulsor regresa a su posición inicial. Durante este desplazamiento de regreso, el impulsor puede elevarse sobre la parte superior del cartucho del paquete de cartuchos porque tiene un grado angular de libertad (véase figura). Un resorte de torsión asegura que el impulsor regresa a la posición horizontal para permitir volver a empujar el siguiente cartucho de la cola. El impulsor  
35 está sujeto mecánicamente a una correa dentada. La correa dentada puede moverse en cualquier dirección girando un motorreductor. El impulsor está montado en una disposición de carro para limitarlo para que se mueva en un solo eje (véase, por ej., FIG. 31).

40 El mecanismo de empuje del cartucho también puede diseñarse no solo para empujar el el cartucho de la caja del cargador automático hacia la posición de detección, sino que también puede utilizarse para devolverlo a la posición de carga automática. De este modo se pueden utilizar los carriles no utilizadas del cartucho microfluídico en la siguiente serie de PCR.

45 La caja de carga automática de cartuchos también está diseñada de modo que una vez se han utilizado todos los cartuchos, la caja puede reciclarse fácilmente o bien pueden añadirsele nuevos cartuchos. De este modo, se reduce el coste para el cliente y el fabricante.

50 Lector

El lector está formado por una unidad de detección óptica que puede presionarse contra un cartucho microfluídico de 24 carriles para interconectarse ópticamente con los carriles para la PCR, y también presionar el cartucho contra un sustrato calentador microfluídico (FIG. 78). La parte inferior del bloque óptico cuenta con 24 aperturas (dos hileras de 12 aperturas) con dimensiones similares a los reactores PCR más próximos al cartucho. La placa de apertura  
55 está fabricada con material con baja fluorescencia, tal como aluminio negro anodizado, y durante el funcionamiento, reduce la fluorescencia de fondo mientras maximiza la recogida de fluorescente exclusivamente del reactor PCR (FIG. 79A y 79B). El fondo de la placa de apertura cuenta con dos bordes biselados que ayudan a alinear dos bordes del cartucho correctamente, de modo que las aperturas se alinean con los reactores PCR. (FIG. 80, 81)

60 Las unidades de detección óptica (8 unidades de detección en total) se montan y colocan sobre un raíl deslizando situado en el interior de la caja óptica de modo que las unidades ópticas pueden escanearse por las aperturas (FIG. 82). Cada unidad puede excitar y enfocar cierta longitud de onda de luz hacia el reactor PCR y recoger la fluorescencia emitida de determinadas longitudes de onda hacia un fotodetector. Al utilizar 4 colores diferentes en los 4 canales superiores y repetir los 4 colores en los canales inferiores, el escaner puede escanear hasta 4 colores  
65 de cada uno de los canales PCR.

El bloque óptico puede estar fabricado en aluminio y anodizado o bien moldeado por inyección utilizando plástico negro con baja fluorescencia (FIG. 83). El moldeo por inyección puede reducir drásticamente el coste por unidad y también facilitar el montaje de la óptica. Las unidades diseñadas pueden almacenarse una detrás de otra.

5 Ejemplo 13: Electrónica ejemplar para su utilización con el aparato preparatorio y de diagnóstico según se describe en esta memoria

10 Existen múltiples módulos de software independientes que se ejecutan en hardware específico: Los aquí descritos son especificaciones ejemplares de la electrónica utilizada en el sistema de diagnóstico (PCR). En otros apartados de esta memoria se describe información adicional relacionada con el sistema PCR. En algunas realizaciones, el sistema PCR incluye dieciocho tarjetas de circuitos impresos (PCB) de nueve tipos distintos. En referencia a la FIG. 86, el sistema puede contener tres tarjetas multiplex (MUX) 100a-c, dos de las cuales (tarjetas MUX de microcalentador 100a-b), pueden utilizarse para ejecutar una tarjeta de microcalentador 110a-b y la tercera (tarjeta MUX para calentador de lisis 100c) puede ejecutar una o más tarjetas de calentador de lisis 116 y 117. Cada una de dichas tres tarjetas MUX 100a-c puede controlarse mediante la tarjeta del procesador de un PC a través de un puerto Ethernet. Las dos tarjetas de microcalentador 110a-b, cada una controlada por una de las tarjetas MUX 100a-b, calentar microzonas del cartucho microfluídico. En algunas realizaciones, el sistema incluye las dos tarjetas de calentador de lisis 116 y 117, controladas por la tarjeta MUX del calentador de lisis 100c, que calienta los tubos de lisis en cada una de las dos gradillas de 12 muestras.

20 Aún en referencia a las PCB incluidas en el sistema PCR, el sistema puede incluir dos tarjetas de detección óptica de 12 canales 130a-b que pueden detectar la fluorescencia óptica emitida por la química del cartucho microfluídico. Las tarjetas de detección óptica pueden estar controladas por una o más de las tarjetas MUX 100a-c, utilizando SPI, a través de una interfaz RS-422. El sistema puede incluir tres tarjetas de control de motor 140a-c, en donde una tarjeta (por ej., tarjeta de control del motor 140c) puede controlar dos motores de separación magnética (no mostrados) y las dos tarjetas de control del motor restantes (por ej., tarjetas de control del motor 140a-b) pueden accionar cada una de ellas un motor de bandeja del lector (no mostrado) y un motor de presión del lector (no mostrado). La tarjeta de control del motor que controla los motores de separación magnética (por ej., tarjeta de control del motor 140c) puede controlarse a través de una interfaz RS-485 desde la tarjeta MUX del calentador de lisis 100c y las dos tarjetas de control del motor 140a-b, cada una de ellas controlando un motor de bandeja de lector y un motor de presión del lector, pueden controlarse a través de la interfaz RS-485 por las tarjetas MUX de microcalentador 100a-b. El sistema también puede incluir una tarjeta de procesador de PC 150, que dirige la secuencia general del sistema y puede controlarse a través de interfaces exteARNI Ethernet y USB, y una tarjeta base de procesador de PC 160, que proporciona interfaces internal para la tarjeta de procesador de PC 150 al resto del sistema e interfaces externas. El sistema puede incluir una placa posterior principal 180 que interconecta todas las tarjetas del sistema, una placa posterior de control del motor 190 que interconecta las tarjetas de control del motor 140a-c al plano posterior principal 180 y brazo pórtico (no mostrado), y dos tarjetas de sensor de puerta (no mostradas). Una tarjeta de sensor de puerta proporciona una interconexión entre los cierres solenoides de la puerta frontal y la tarjeta base del procesador de PC 160 y la otra tarjeta de sensor de puerta proporciona una interconexión entre los sensores de posición y la tarjeta base del procesador de PC 160.

45 En algunas realizaciones, el sistema PCR puede incluir la tarjeta de procesador de PC 150. La tarjeta de procesador de PC 150 puede ser una tarjeta de factor de forma ETX que incluye un puerto Ethernet 10/100 BASE-T, cuatro puertos USB, un puerto de pantalla VGA analógica, dos puertos UART, un reloj en tiempo real, un puerto paralelo, un puerto para teclado PS2, un puerto para ratón PS2, salida de audio estéreo, una interfaz IDE, y una interfaz 12C.

50 En referencia a la FIG. 87, el sistema también puede incluir la tarjeta base de procesador de PC 160 que incluye un puente Ethernet 10/100 BASE-T de cinco puertos 161 para las comunicaciones internas, uno de los cuales puede estar conectado al puerto Ethernet 10/100 BASE-T de la tarjeta de procesador PC 150, otro de los cuales puede destinarse a uso diagnóstico (con un conector en el interior de la cubierta del sistema), y tres de los cuales pueden comunicarse con las tres tarjetas MUX 100a-c (un puerto para cada tarjeta MUX 100a-c) a través de la placa posterior 180. La tarjeta base del procesador de PC 160 también puede incluir un puerto USB a Ethernet 10/100 BASE-T 162 para conexiones Ethernet externas, un concentrador de cuatro puertos USB 163 para conexiones internas, un conector VGA externo 164, un conector PS2 interno para ratón 165 (con un conector en el interior de la cubierta del sistema), y un conector PS2 interno para teclado 166 (con un conector en el interior de la cubierta del sistema). La tarjeta base de procesador de PC 160 también puede incluir una salida de audio estéreo interna 167 a los altavoces incorporados 168, un conector CompactFlash interno 169 desde un puerto IDE (con un conector en el interior de la cubierta del sistema), y una interfaz RS-232 interna 170 desde un puerto UART (con un conector en el interior de la cubierta del sistema). Componentes adicionales incluidos en la tarjeta base de procesador de PC pueden incluir una interfaz RS-485 interna 171 desde un puerto UART (con un conector en el interior de la cubierta del sistema), un sensor de temperatura interna 172 conectado a la interfaz 12C, una batería para el reloj en tiempo real y un puerto paralelo 173. El puerto paralelo 173, con conectores en el interior de la cubierta, puede estar conectado internamente del siguiente modo: un bit puede utilizarse para accionar interruptor de alta corriente de las dos solenoides de la puerta situado en el lateral inferior, un bit puede utilizarse para generar una interrupción del

procesador cuando cualquiera de los sensores de puerta indica que se ha abierto una puerta, pueden utilizarse tres bits para programar la EEPROM para configurar el puente de Ethernet 161, y dos bits pueden conectarse a la interfaz de administración del puente de Ethernet (no mostrada). Los bits restantes pueden dejarse sin asignar, con resistencias *pull-up* y *pull-down* opcionales y puede llevarse hasta un cabezal de contacto Phoenix de 10 pines.

5 En referencia ahora a la FIG. 88, En algunas realizaciones, el sistema puede incluir las tres tarjetas MUX 100a-c. Mientras que la FIG. 88 ilustra una tarjeta MUX ejemplar 100a, cada una de las tres tarjetas MUX 100a-c puede incluir una o más de las características descritas a continuación. La tarjeta MUX 100a puede incluir 96 canales de calentamiento con modulación por ancho de pulsos (PWM) con calentadores (alrededor de 33 ohmios a alrededor de 10 150 ohmios), que pueden soportar de 20 o 24 voltios (la tensión tiene procedencia externa) con una corriente máxima de alrededor de 800 mA. Cada PWM puede tener 12 bits con puntos de inicio y parada programables, puede tener una resolución de 1 microsegundo y puede tener un ciclo máximo de trabajo de alrededor del 75%. Cada periodo PWM es programable y, preferiblemente, se ajusta en 4 ms. Las tarjetas MUX pueden incluir una conexión RTD/calentador de 4 hilos con una precisión de 1 mA de corriente de detección que puede alojar 15 dispositivos con temperaturas resistivas de alrededor de 50 ohmios a alrededor de 2500 ohm y tiene una precisión de medición de +/- 0,5 ohmios. El periodo de muestreo de medición térmica de las tarjetas MUX es 32 ms incluidos periodos 8X PWM con 12 ADC de 16 bits 101a tomando muestras de 8 canales sucesivos cada una. La dirección MUX puede etiquetarse en los datos ADC.

20 Aún en referencia a la tarjeta MUX 100a ilustrada en la FIG. 88, una interfaz RS-422 de la tarjeta óptica 102a que se interconecta sobre la placa posterior 180 y transfiere datos a través de una interfaz SPI de 4 hilos utilizando señales e interrupciones de control locales puede incluirse en la tarjeta MUX 100a. La tarjeta MUX 100a también pueden incluir una interfaz Ethernet 10/100 BASE-T 103a que se interconecta con el sistema sobre la placa posterior 180 y una interfaz RS-485 104a que se interconecta al controlador del motor 140a sobre la placa posterior 180.

25 En referencia ahora a la FIG. 89, en algunas realizaciones, el sistema puede incluir las tarjetas de detección óptica 130a-b. Mientras que la FIG. 89 ilustra la tarjeta de detección óptica ejemplar 130a, cada una de las tarjetas de detección óptica 130a-b puede incluir una o más de las características descritas a continuación. La tarjeta de detección óptica 130a puede incluir un diseño de tarjeta óptica de 12 canales modificada para utilizar una interfaz RS-422 131 a. La tarjeta de detección óptica 130a puede incluir 12 LEDs azules de 3 vatios 132a alimentados con 30 alrededor de 6 V en alrededor de un máximo de 625 mA. Un LED ejemplar utilizado en la tarjeta de detección 130a es el emisor Luxeon K2 que produce luz azul con una longitud de onda de alrededor de 470 nm que utiliza alrededor de 27 mW @ 700 mA. La tarjeta de detección óptica 130a también puede incluir 12 LED ámbar de 3 vatios 133a alimentados con alrededor de 6 V a alrededor de un máximo de 625 mA. Un LED ejemplar utilizado en la tarjeta de 35 detección 130a es el emisor Luxeon K2 que produce luz ámbar con una longitud de onda de alrededor de 590 nm que utiliza alrededor de 60 mW @ 700 mA. La tarjeta de detección 130a puede incluir 24 diodos fotodetectores lenticulares de silicio 134a, un ejemplo de los cuales es el S2386-18L de Hamamatsu. Dichos detectores fotodiodo 134a están diseñados en un paquete TO-18 común. La tarjeta de detección 130a también puede incluir un procesador MSP430 135a con dos canales PWM, uno para el canal azul y otro para el canal ámbar. La tarjeta 130a puede incluir LED individuales 136a y 137a para cada uno de los 12 pares de colores sobre el bus SPI local.

40 El sistema PCR puede incluir una tarjeta de calentador de lisis que proporciona y supervisa el calentamiento de los tubos de lisis. La tarjeta de calentador puede incluir 12 resistencias de potencia de 70 vatios TO-247 (proporcionan calor a los tubos de lisis) diseñados para ser alimentados con 24V de una o más tarjetas MUX 100a-c (por ej., tarjeta 45 MUX 100c) y 12 dispositivos de temperatura resistiva (RTD) de 2000 ohmios para supervisar la temperatura de los tubos de lisis. Pueden incluirse resistencias opcionales para modificar el rango de escala completa de los RTD. Se incluye en la tarjeta de calentador de lisis se incorpora una EEPROM en serie que puede contener un número de serie de tarjeta y puede utilizarse para identificar el tipo de tarjeta y nivel de revisión to software.

50 En referencia ahora a la FIG. 90, en algunas realizaciones, el sistema puede incluir las tarjetas de microcalentador 110a-b. Mientras que la FIG. 90 ilustra una tarjeta de microcalentador ejemplar 110a, cada una de las tarjetas de microcalentador 110a-b puede incluir una o más de las características descritas a continuación. En algunas realizaciones, el sistema puede incluir la tarjeta de microcalentador 110a que incluye una EEPROM en serie y dos 55 interruptores ópticos. La EEPROM en serie puede contener un número de serie de tarjeta, puede contener datos de calibración RTD, y puede utilizarse para identificar el tipo de tarjeta y nivel de revisión del software. Los interruptores ópticos pueden utilizarse para detectar la posición de la bandeja del lector para la tarjeta de control del motor 140a y envía la información a los Blue Cobra (controladores de motor), que procesan la información sobre las posiciones de las bandejas lectars y, en consecuencia, controla la alimentación suministrada a los emisores por la tarjeta de control de motor 140a. La tarjeta de microcalentador 110a puede proporcionar conexiones a la placa de 60 microcalentador de 96 canales y controlar los 96 dispositivos multiplexados de calentador/RTD para controlar la temperatura del cartucho. Los dispositivos de calentador/RTD pueden ser de alrededor de 50 ohmios a alrededor de 500 ohmios. La tarjeta de microcalentador 110a puede unir la interfaz RS-422 desde, por ejemplo, la tarjeta MUX 100a a la tarjeta de detección óptica 130a. La conexión de la tarjeta de microcalentador 110a a la tarjeta MUX 100a se encuentra sobre la placa posterior 180, mientras que la conexión a la tarjeta óptica 130a se encuentra en un 65 cable FFC de 40 pines.

En referencia ahora a la FIG. 91, en algunas realizaciones, el sistema puede incluir las tarjetas de control de motor 140a-c. La FIG. 91 ilustra una tarjeta de control de motor ejemplar 140a, cada una de las tarjetas de control de motor 140a-c puede incluir una o más de las características descritas a continuación. En algunas realizaciones, el sistema puede incluir la tarjeta de control de motor 140a que puede controlar dos motores de micropasos 141 a y puede conectarse al plano posterior 180 a través de una interfaz RS-485. La salida a los motores puede ser de hasta 24 V suministrados externamente a través de la placa posterior 180. La corriente de salida puede seleccionarse mediante *jumper*s. Las corrientes de salida ejemplares que pueden seleccionarse mediante configuraciones de *jumper* incluyen de alrededor de 700 mA, a alrededor de 1,0 A, o 2,3 A. La tarjeta de control de motor 140a incluye una salida de interrupción TTL de colector abierto a la tarjeta MUX 100a y entradas de indicadores. Las entradas de indicadores pueden proporcionar una salida de potencia de 1,5 V a los sensores y pueden activarse y desactivarse mediante el software.

En posiciones extremas de cada eje se colocan limitadores, por ej., x-mínimo y x-máximo, que apaga la alimentación al motor que acciona dicho eje en caso de producirse un mal funcionamiento y el cabezal de pipeteado se mueva fuera de la distancia de trabajo diseñada. Se utiliza *pull-up* y *pull-down* opcional con la salida de los interruptores ópticos.)

En algunas realizaciones, el sistema puede incluir una o más tarjetas de interconexión, tal como la placa posterior principal 180. La placa posterior principal 180 puede interconectar otras PCB, tales como tarjetas MUX 100a-c, tarjeta base del procesador de PC 160, y tarjetas de interconexión de calentador. La placa posterior principal 180 puede conectarse a la placa posterior del motor 190 y a dos tarjetas de calentador de lisis. La placa posterior principal 180 puede distribuir alimentación y señalización, implantar Ethernet 10/100 BASE-T y RS-485 a través de la placa posterior 180, y suministra tensión desde un conector externo. Tensiones ejemplares suministradas incluyen +3,3 V, +5,0 V, +12,0 V, -12,0 V, +20,0 V, y +24,0 V.

El sistema puede incluir la placa posterior de control del motor 190 que puede distribuir potencia y señalización entre todas las tarjetas de control del motor 140a-c. La placa posterior de control del motor 190 puede suministrar +5,0 V y 24,0 V desde un conector externo. La placa posterior de control del motor 190 puede incluir 1 ranura para la señalización RS-485 desde cada una de las dos tarjetas MUX 100a-b (total de 2 ranuras), 6 ranuras para la señalización RS-485 desde el calentador de lisis que controla la tarjeta MUX 100c, y un conector que proporciona señalización RS-485 y alimentación al brazo pòrtico. La placa posterior de control de motor 190 puede proporcionar resistencias *pull-up* y *pull-down* para manipular los buses flotantes.

En algunas realizaciones, el sistema puede incluir una tarjeta de interconexión de calentador y una tarjeta sensora de puerta. La tarjeta de interconexión de calentador puede conectar las tarjetas de microcalentador 110a-b a la placa posterior principal 180 utilizando exclusivamente una interconexión física (por ej., sin circuitos activos). La tarjeta del sensor de puerta puede proporcionar una interfaz por cable y lógica de mezclado de los interruptores ópticos, que detectan si la puerta está abierta y proporcionan una interfaz de montaje y cableado al solenoide de cierre de la puerta.

Ejemplo 14: Software ejemplar para su utilización con aparatos preparatorios y de diagnóstico según se describe en esta memoria

En el hardware específico se ejecutan múltiples módulos de software independientes:

Lector (2);

Preparación de la muestra (1);

Interfaz de usuario (1);

Detector (2);

Control de motor (8)

La comunicación entre módulos se realiza a través de un bus Ethernet interno, la comunicación con la interfaz de usuario se realiza a través de un bus SPI de alta velocidad y la comunicación con el motor se realiza a través del bus en serie RS485.

El software del lector y de la preparación de muestras se ejecuta en un hardware idéntico y son idénticos en cuanto a la incorporación de las siguientes funciones:

Motor de script (forma parametrizada de un protocolo)

Motor de protocolo

Control de temperatura (microfluídica, lisis, liberación)

5 Control del motor (a través de módulos externos de control del motor). Características destacadas del software de control del motor son:

Comandos/respuesta en ASCII y capacidad de dirección para permitir el encadenamiento (*daisy-chaining*) del enlace de comunicaciones.

10 Detección (mediante módulos detectores externos) Módulo detector que controla la iluminación LED y la digitalización del fotodetector.

15 La interfaz de usuario se implanta como un programa que se ejecuta bajo sistema operativo Linux en un PC compatible x86. Se dirigen las siguientes funciones:

Interfaz gráfica de usuario

20 Control y monitor de pruebas

Almacenamiento de resultados de las pruebas y recuperación de la conectividad de red a través de Ethernet (a sistemas de información de laboratorio)

Interfaz USB

25 Impresora

Escáner (interno y externo)

30 Teclado

Ratón

35 Cierre y detector de puerta

Ejemplo 15: Química y procesos de uso ejemplares

Descripción general de la química:

40 El proceso químico se centra en la detección e identificación de organismos en una muestra clínica, detectando ácidos nucleicos en el organismo en cuestión. Esto implica aislar ácidos nucleicos de los organismos diana contenidos en una muestra clínica, seguido por un proceso que detectará la presencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Además de la detección de dianas, se añadirá un ácido nucleico de control positivo interno al tampón de recogida y se llevará a través de todo el proceso de extracción y detección junto con los ácidos nucleicos diana. Este control supervisa la efectividad del proceso y reduce los riesgos de falsos negativos.

45 Extracción y purificación de ácido nucleico:

50 Los procedimientos de extracción de ácido nucleico comienzan con la adición de una muestra clínica a una solución de recogida de muestras preparada. Esto puede realizarse bien en el sitio de recogida de la muestra, bien en el lugar de ensayo. Estarán disponibles dos formatos de solución de recogida: uno para fluidos corporales y otros para muestras en hisopos. Las soluciones de recogida utilizadas en los lugares de recogida servirán como soluciones de transporte de muestras y, por lo tanto, dicha solución debe mantener la integridad de la muestra y del analito.

55 El procedimiento de extracción y purificación, completamente automatizado, se produce del siguiente modo: Se someten a lisis los organismos diana calentando la solución de recogida que contiene detergente. Perlas magnéticas, añadidas a la mezcla de solución de muestra/recogida, se adhieren no específicamente a todo el ADN liberado en la solución.

60 Se aíslan las perlas magnéticas y se lavan para eliminar contaminantes

Se libera el ADN de las perlas utilizando calor y pH elevado.

65 Se extrae la solución que contiene ADN y se neutraliza con un tampón



Amplificación de los ácidos nucleicos:

5 Los ácidos nucleicos capturados por las perlas magnéticas, lavados, liberados en pH elevado y neutralizados con tampón, se añaden a una mezcla de tampones, sales y enzimas que han sido liofilizados en un tubo. Se rehidrata rápidamente la muestra y, a continuación, se carga una porción de la solución en un cartucho microfluídico. A continuación, se carga el cartucho en el módulo del instrumento de amplificación, formado por una unidad de calentamiento capaz de efectuar termociclado y un sistema de detección óptico. La detección de los ácidos nucleicos diana se produce del siguiente modo:

10 El líquido se introduce en una cámara de reacción.

Se utiliza termociclado rápido para potenciar la reacción de la cadena de polimerasa (PCR), utilizada para amplificar ADN diana específico.

15 Se amplifican las fluorescencias del ADN, que pueden ser detectadas por sensores ópticos.

Se incorpora una "cola" de una sonda fluorescente a cada pedazo amplificado de ADN

20 A una temperatura específica, la sonda adopta una conformación que produce fluorescencia (denominado reacción de "escorpión", véase FIG. 84).

Se detecta la fluorescencia y se supervisa a lo largo de la reacción.

25 Proceso de extracción y amplificación/detección:

Se han realizado exhaustivos ensayos de laboratorio para optimizar la química de la extracción de los ácidos nucleicos, incluido el tampón de recogida, la formulación del tampón de lavado, la formulación del tampón de liberación y las mezclas de reactivo para la PCR. El método de extracción completamente automático, seguido por PCR de 12 canales, consiguió proporcionar una sensibilidad muy elevada de 150 copias/muestra de forma constante.

Ejemplos: Clamidia en orina (50/50); Gonorrea en orina; EGB en plasma.

35 Diversas químicas de detección tales como Taqman, Scorpion, SYBRg Green funcionan de forma fiable en el cartucho microfluídico.

Fabricación de reactivos

40 Se han realizado estudios de viabilidad para determinar si los reactivos para la PCR pueden liofilizarse en tubos PCR además de la utilización de pellets liofilizados de 2 µl. Los estudios han indicado que la sensibilidad de las reacciones realizadas utilizando reactivos liofilizados en el tubo equivale a la de los reactivos húmedos o a la de los reactivos en pellets de 2 µl, por lo que se ha demostrado su viabilidad. Estudios de estabilidad de este formato indican datos de estabilidad similares. Hemos observado que pellets para PCR liofilizados de 2 microlitros son estables hasta 2 años a temperatura ambiente, una vez sellados en atmósfera de nitrógeno.

45 Descripción general de la fabricación: La fabricación de los componentes del sistema puede conseguirse de HandyLab, Inc., Ann Arbor, Minnesota. Las tareas de fabricación se han dividido en cinco áreas formadas por: fabricación de la química, tira desechable, kit de recogida, cartucho y analizador.

50 Fabricación de la química: Actualmente se han identificado siete componentes químicos individuales, mezclados para su utilización potencial con el sistema aquí descrito. El mezclado y procesado de los reactivos/sustancias químicas puede realizarse en HandyLab, Inc., con los equipos existentes. Serán necesarias herramientas y accesorios adicionales a medida que el producto madure y prevemos un volumen de producción elevado, sin embargo, los costes iniciales serán mínimos.

55 El tampón de recogida, los líquidos de lavado, liberación y neutralización son recetas sencillas con bajo riesgo y pueden elaborarse en grandes lotes para mantener los costes de mezclado por debajo de las proyecciones estimadas. Se mezclarán y colocarán en recipientes intermedios para su almacenamiento y a continuación se remitirán a la fabricación de tiras desechables para su dispensado. SOP maduras están en su lugar debido a actividades previas.

60 Las perlas de afinidad (AB) tienen un gran potencial de almacenamiento y de utilización como líquido en la tira, aunque se han considerado como refuerzo contingencias en el diseño para utilizar un pellet liofilizado. Es elemental mantener las perlas suspendidas en solución durante su dispensado. Se ha considerado la compra de un equipo de dispensado (por ej., fabricado por Innovadyne) que proporciona agitación para suspensión continua durante el

dispensado, una vez comprobada la estabilidad de almacenamiento de las AB en la tira. El proceso de fabricación y magnetización de las perlas de afinidad abarca un ciclo temporal de 9 horas para producir un lote de 2.000 alicuotas, pero dicho mismo periodo temporal puede utilizarse para escalar lotes de recetas una vez iniciemos la producción en gran volumen. Este punto es el que mayor contenido de trabajo tiene de toda la fabricación de la química actualmente necesario para el aparato.

Los reactivos/enzimas PCR se liofilizarán en nuestra cámara de liofilizado (Virtis Genesis) y no requerirá formación de pellets esféricos. En lugar de eso, la mezcla se dispensa y a continuación se liofiliza en el interior del tubo final. En primer lugar, se mezclan las químicas según los SOP establecidos y, a continuación, se efectúan los siguientes pasos para alcanzar la liofilización: Se colocan los tubos individuales en una gradilla/elemento fijo, y se dispensa la solución a cada uno, utilizando los equipos ya existentes (estación de dispensado EFD Ultra). La gradilla llena se coloca dentro de una caja hermética de acero inoxidable (modificada para aceptar topes en la tapa), y a continuación se coloca en la cámara de liofilización y comienza el ciclo de secado de forma autónoma. Durante la liofilización, los topes están levantados permitiendo que el aire/nitrógeno circule en su interior y salga la humedad de la caja de acero inoxidable que contiene las gradillas de viales. Al final del ciclo, las repisas de nuestra cámara de liofilización se bajan para colocar los topes en la tapa, formando un cierre hermético mientras está en el interior de la cámara cerrada, en una atmósfera de nitrógeno libre de humedad. A continuación, se extraen las cajas de acero de la cámara y se procesa cada gradilla del interior en una sola operación para sellar todos los viales de dicha gradilla. Inmediatamente tras realizar el sellado, se corta la lámina de los viales en una sola operación, permitiendo que cada vial se dirija a la zona de Fabricación de desechables para su colocación en una tira. Se añadirá, o no, control interno a una solución existente, o bien se dispensará en su propia cavidad en la forma de tampón de recogida, y soluciones de lavado, neutralización y liberación. Si fuera necesario realizar la liofilización, se realizará de la misma forma que el procedimiento químico para la PCR, y posteriormente se colocará en la tira. Los estudios acerca de la estabilidad de la vida útil están en curso.

#### Fabricación del kit de recogida

El kit de recogida se procesa manualmente en cada laboratorio para las cantidades iniciales. Las cantidades iniciales no requieren un gran gasto de capital, ya que contamos con todo el equipo necesario para permitirnos cumplir las proyecciones a lo largo de 2008. Utilizaremos nuestro propio equipo (Controlador digital EFD 754-SS Aseptic Valve & Valvemate 7000) para llenar el vial de recogida. Los viales cuentan un giro en la parte superior que estará apretado, y el vial tendrá un código de barras identificativo propio. Los 24 viales se colocarán en una bolsa de plástico resellable y se colocará en una caja para su envío.

Colocar los viales en la gradilla.

Dispensar solución en los viales.

Instalar y apretar las tapas.

Etiquetar viales.

Embolsar viales y etiquetar bolsa.

Colocar bolsa con viales e instrucciones/prospecto en una caja, cerrar la caja y etiquetarla.

#### Fabricación de los cartuchos:

Se utilizarán los equipos semiautomáticos actuales para laminado y aplicación de cera (Think & Tinker DF-4200, & Asymtek Axiom Heated Jet Platform, respectivamente,) para cumplir todos los requisitos de fabricación de los cartuchos. El tamaño de la unidad desechable 12-up es el mismo que el del cartucho RTa10, por lo que no es necesario ningún accesorio adicional.

Laminar microsustrato y recortar exceso.

Llenar válvulas con cera caliente e inspeccionar.

Aplicar etiqueta y código de barras.

Unir las 24 piezas.

Embolsar y sellar cartuchos unidos, etiquetar bolsa.

Colocar bolsa e instrucciones en una caja, cerrar y etiquetar.

Esta parte del producto es relativamente sencilla, aunque existe una diferencia entre el cartucho automático (según se utiliza aquí) y el cartucho de 12 canales independiente. No será necesario proporcionar ventilación al cartucho, lo que elimina uno de los procesos que más tiempo requiere en la fabricación de cartuchos, junto con el riesgo elevado y mayor coste de la automatización totalmente integrada. Se han producido con éxito más de 1.000 piezas del 12-up con ventilación.

5

Ejemplo 16: Procesos químicos ejemplares

Procesamiento previo de las muestras

10

En el caso de muestras de orina: Tomar 0,5 ml de orina y mezclar con 0,5 ml de tampón de recogida de HandyLab. Filtrar la muestra a través del prefiltro de HandyLab Inc. (contiene dos membranas con un tamaño de poro de 10 micras y 3 micras). Colocar el tubo de muestras en la posición especificada para el tubo de muestras externo en la gradilla de 12-up.

15

En el caso de muestras de plasma: Tomar 0,5 ml de plasma y mezclar con 0,5 ml de tampón de recogida de HandyLab. Colocar el tubo de muestras en la posición específica para el tubo de muestras externo de la gradilla de 12-up.

20

En el caso de muestras de EGB hisopadas: Tomar la muestra de hisopo y sumergir en 1 ml de tampón de recogida de HandyLab. Colocar el tubo de muestras en la posición especificada para el tubo de muestras externo en la gradilla 12-up.

25

El tampón de recogida de HandyLab contiene 50 mM Tris pH 7, 1% Triton X-100, 20 mM Citrato, 20 mM Borato, 100 mM EDTA, más 1000 copias de control positivo de ADN.

Carga del instrumento e inicio del procesamiento de las muestras

30

1. Cargar el tubo PCR con mezcla maestra para PCR en una de las posiciones especificadas en el desechable unificado.

2. Cargar el tubo PCR que contiene cebadores y sondas PCR para el analito diana considerando la posición especificada en el desechable unificado.

35

3. En caso de análisis de dos analitos, cargar el tubo PCR con sondas y cebadores para un segundo analito en la posición especificada en el desechable unificado.

40

4. Cargar el desechable individual en la gradilla de 12 canales en el mismo carril que el tubo de muestras considerado.

5. Preparar y cargar tiras de reactivo individual para otras muestras en consideración.

6. Cargar la gradilla de 12 canales en una de las posiciones del instrumento.

45

7. Cargar el cartucho de 12 canales en la posición de carga de la bandeja de cartucho.

8. Iniciar el funcionamiento.

Pasos de procesamiento de líquido

50

1. Utilizando la punta de pipeta#1, el robot transfiere la muestra clínica del tubo de muestras externo al tubo de lisis de la tira desechable individual.

55

2. Utilizando la misma punta de pipeta, el robot extrae alrededor de 100 µl de muestra, mezcla las perlas de afinidad y la enzima liofilizada, transfiere los reactivos al tubo de lisis. Se realiza el mezclado en el tubo de lisis mediante 5 operaciones de succión y dispensado.

3. El robot coloca la punta de pipeta#1 en la posición designada de la tira desechable individual.

60

4. cCalentar el tubo de lisis hasta 60 C y mantener durante 10 minutos.

5. Transcurridos 5 minutos de lisis, el robot recoge la punta de pipeta#1 y mezcla el contenido mediante 3 operaciones de succión y dispensado.

65

6. El robot coloca la punta de pipeta#1 en la posición designada de la tira desechable individual.

## ES 2 610 128 T3

7. Pasados 10 minutos de lisis, se mueve un imán hacia arriba por el lado del tubo de lisis hasta una altura media de la muestra y se mantiene en dicha posición durante un minuto para capturar todas las perlas magnéticas contra la pared del tubo.
- 5 8. Se lleva hacia abajo lentamente el imán para deslizar las perlas capturadas cerca del fondo (pero no en el fondo) del tubo.
- 10 9. Utilizando la punta de pipeta#2, aspirar todo el líquido y vaciarlo en el tubo de recogida de residuos.
- 10 10. Aspirar una segunda vez para extraer tanto líquido como sea posible del tubo de lisis.
- 15 11. Utilizando la punta de pipeta#2, retirar 100 µl de tampón de lavado y dispensarlo en el tubo de lisis. Durante este dispensado, el imán se mueve hacia abajo, lejos del tubo de lisis.
- 15 12. Efectuar 15 pasos de mezclado para mezclar por completo las perlas magnéticas con el tampón de lavado.
- 15 13. Esperar 30 segundos.
- 20 14. Mover el imán hacia arriba para capturar las perlas en el lateral y mantener durante 15 segundos.
- 20 15. Utilizando la punta de pipeta#2, aspirar tampón de lavado dos veces para eliminar tanto líquido como sea posible y devolverlo al tubo de lavado.
- 25 16. Mover el imán hacia abajo lejos del tubo de lisis.
- 25 17. Colocar la punta de pipeta# 2 en su posición específica en la tira desechable individual.
- 30 18. Recoger una nueva (punta #3) y retirar 8-10 µl de tampón de liberación y dispensarlo sobre las perlas del tubo de lisis.
- 30 19. Esperar 1 minuto y realizar 45 mezclas.
- 35 20. Calentar la solución de liberación a 85 °C y mantener la temperatura durante 5 minutos.
- 35 21. Colocar la punta de pipeta# 3 en su posición específica en la tira desechable individual.
- 40 22. Llevar el imán hacia arriba del tubo, capturar todas las perlas contra la pared del tubo y mover hacia arriba y lejos del fondo del tubo.
- 40 23. Recoger una nueva punta de pipeta (punta#4) y retirar todo el tampón de liberación del tubo de lisis y a continuación retirar 3-10 µl de tampón de neutralización, mezclar en la punta de pipeta y dispensar en el tubo PCR. (En caso de detección de dos analitos, dispensar la mitad de la solución de ADN neutralizada en un primer tubo PCR y el resto de la solución en el segundo tubo PCR).
- 45 24. Utilizando la punta de pipeta#4, mezclar el ADN neutralizado con los reactivos liofilizados en 4-5 operaciones de succión y dispensado y retirar toda la solución de la punta de pipeta.
- 50 25. Utilizando la punta de pipeta#4, cargar 6 µl de la solución PCR final en un carril del cartucho 12-up.
- 50 En la FIG. 85A-C se muestra esquemáticamente la utilización de cabezales de pipeta durante los diversos procesos.
- 50 PCR en tiempo real
- 55 Una vez se han cargado todos los carriles para la PCR que corresponda del cartucho para PCR con la solución final para PCR, la bandeja que contiene el cartucho lo mueve en el analizador PCR. El cabezal lector de detección óptica presiona el cartucho contra el calentador para la PCR. Los calentadores activan las válvulas para que cierren los extremos del reactor PCR y se inicia el proceso de termociclado en tiempo real. Tras completar los ciclos PCR adecuados (~45 ciclos), el analizador hace una llamada si la muestra contiene el ADN diana basado en los datos de fluorescencia emitida.
- 60 Detección de pipeta
- 65 El cabezal de pipeteado cuenta con 4 sensores infrarrojos para detectar la presencia de pipetas. Esto es esencial para garantizar que el ordenador sabe positivamente que ya hay o que falta una pipeta. Como las pipetas se

recogen mediante fuerzas mecánicas contra la pipeta y también se dispensa mediante un movimiento mecánico de una placa extractora, la detección de pipetas ayuda a evitar errores que, de otro modo, se producirían.

5 El cabezal múltiple de pipeteado está montado de modo que un sensor de fuerza interconectado con él de modo que siempre que el cabezal de pipeteado se asienta contra la(s) pipeta(s) desechable(s) o se fuerza a la pipeta escogida a través del laminado del elemento desechable con reactivo, o se fuerza la pipeta contra el fondo de los tubos del reactivo desechable, una fuerza hacia arriba actúa sobre el cabezal de cabezal de pipeteado a través del inyector de sujeción de la pipeta o de las propias pipetas. Todo el cabezal pivota, tal y como se muestra en la Figura y las fuerzas que actúan sobre el cabezal hacen que un tornillo de ajuste situado en la parte superior del cabezal presione  
10 contra un sensor de fuerza. El sensor de fuerza se calibra para el desplazamiento vertical del cabezal contra una superficie fija. Al utilizar esta calibración, puede determinarse cuándo debe detenerse el movimiento del cabezal en la dirección z para detectar si las pipetas están correctamente colocadas o si las pipetas golpean el fondo de los tubos.

15 Alineación de las puntas de pipeta mientras se carga el reactivo para la PCR en el cartucho microfluídico

Las pipetas usadas en el aparato pueden contener desde volúmenes tan pequeños como 10 µl hasta 1 ml. Pipetas para volúmenes más grandes pueden ser tan largas como 95 mm (pipeta p1000). Al extraer 4 puntas de pipeta largas del cabezal, incluso una 1ª desalineación durante la colocación puede hacer que la punta esté descentrada unos 1,7 mm. Como es imposible conseguir una alineación perfecta de la punta tanto en la parte superior, donde entra en contacto con el soporte de la punta, como en la parte inferior, es necesario limitar mecánicamente todas las  
20 puntas en otra posición más próxima a la parte inferior. Hemos utilizado la placa extractora, con una estructura de orificio definido para utilizarla para alinear todas las puntas. El orificio de la placa extractora aparta las 4 puntas de pipeta cuando se recogen. Una vez correctamente colocadas las puntas, la placa extractora se mueve en el eje x utilizando un motor para mover todas las pipetas con la muesca prevista en la placa extractora (véase Figura 46b).  
25 Ahora todas las pipetas penetran en los orificios de entrada con facilidad.

Ampliaciones de la preparación de muestras

30 La tecnología actual describe detalles del procesado de muestras clínicas para extraer polinucleótidos (DNA/ARN). Puede ampliarse la misma plataforma de producto para procesar muestras y extraer proteínas y otras macromoléculas modificando las moléculas de afinidad presentes en las perlas magnéticas. La plataforma de amplificación-detección también puede utilizarse para efectuar otras reacciones enzimáticas, tales como inmunoPCR, PCR con transcriptasa inversa, TMA, SDA, NASBA, LAMP, LCR, reacciones de secuenciación, etc. La preparación de la muestra también puede utilizarse para preparar muestras para la detección de micromatrices altamente multiplexadas.  
35

Ejemplo 16: Material ejemplar para la matriz de afinidad con ARN

40 Un material de captura de polinucleótidos ejemplar retiene polinucleótidos, tales como ARN, en su superficie cuando se pone en contacto con un medio líquido que contiene polinucleótidos mezclados con otras especies tales como proteínas y péptidos que pueden inhibir la posterior detección o amplificación de los polinucleótidos.

45 El material de captura de polinucleótidos ejemplar es: Poliámidoamina (PAMAM) Generación 0, disponible de Sigma-Aldrich Chemical Company ("Sigma-Aldrich"), número de producto 412368. PAMAM es un dendrímero cuyas moléculas contienen una mezcla de grupos amino primarios y terciarios. PAMAM (Generación 0) tiene la estructura aquí mostrada.

50 El PAMAM, durante su utilización, se inmoviliza sobre un soporte sólido tal como perlas carboxiladas, o perlas magnéticas. El material de captura de polinucleótidos comprende moléculas policatiónicas durante una operación de captura de polinucleótidos. La afinidad entre el material y los polinucleótidos es elevada porque los polinucleótidos tales como ADN y ARN normalmente comprenden polianiones disueltos.

55 Tras capturar las moléculas de polinucleótidos en la superficie del material y lavar los inhibidores restantes y otros compuestos disueltos con una solución tampón alcalina, tal como 0,1 mM Tris (pH 8,0) acuoso, los polinucleótidos pueden liberarse de la superficie del material, por ejemplo, lavando el material con un segundo tampón más alcalino, tal como Tris con un pH de 9,0.

60 En la solicitud de patente estadounidense con número de serie 12/172.214 presentada el 11 de julio, 2008, se describen protocolos ejemplares para la utilización de PAMAM en la determinación de ácidos nucleicos.

Ejemplo 17: Material ejemplar para la matriz de afinidad con ADN

65 El material de captura de polinucleótidos ejemplar es: polietilenimina (PEI), disponible de Sigma-Aldrich Chemical Company ("Sigma-Aldrich"), producto número 408719.

En la solicitud de patente estadounidense con número de serie 12/172.208 presentada el 11 de julio, 2008, se describen protocolos ejemplares para la utilización de PEI en la determinación de ácidos nucleicos.

#### 5 Ejemplo 18: Aparato ejemplar

10 En esta memoria se describen especificaciones para el diseño mecánico del sistema PCR. En algunas realizaciones, el sistema puede tener alrededor de 28,5 pulgadas de profundidad, o menos, y alrededor de 43 pulgadas de ancho, o menos, y un peso de alrededor de 250 libras o menos. El sistema puede estar diseñado con una vida útil de  
alrededor de 5 años (por ej., suponiendo 16.000 análisis al año) y puede estar diseñado de modo que el nivel de  
sonido del instrumento (durante su funcionamiento) no sobrepase los 50 dB medidos a 12 pulgadas del instrumento  
en todas las direcciones. En algunas realizaciones, el exterior del sistema puede ser blanco texturizado.

15 En referencia al sistema en general, en algunas realizaciones, componentes críticos del sistema pueden ser ortogonales o paralelos (según corresponda) en 0,04 grados. Componentes críticos ejemplares pueden incluir raíles de desplazamiento, pipetas, inyectores (por ej., axialmente como inyectores individuales, linealmente como matriz de cuatro puntos de intersección del inyector, u otros similares), calentadores de lisis, bordes principales del soporte de cartucho instalado en el cajón del lector, cara frontal de los imanes de separación y otros similares. En las siguientes descripciones, el eje X (o dirección X) se refiere al eje que se extiende de izquierda a derecha visto desde delante del sistema, el eje Y (o dirección Y) se refiere al eje que se extiende de atrás hacia delante mirando el sistema desde delante, y el eje Z (o dirección Z) se refiere al eje que se extiende hacia arriba desde el fondo mirando el sistema desde el frente. Visto desde arriba del instrumento, el centro de gravedad del inyector de pipeta de la izquierda del equipo Z (visto desde el frente del instrumento) puede desplazarse sin obstrucciones en la dirección X desde un punto a 80 mm desde el borde izquierdo de la placa base hasta un punto 608 mm desde el borde izquierdo de la placa base y puede desplazarse sin obstrucciones en la dirección Y desde un punto a 60 mm desde el borde exterior de la placa base frontal a un punto a 410 mm desde el borde exterior de la placa base frontal.

20 Aun en referencia al sistema, visto desde delante del instrumento, la cara más inferior de los inyectores del equipo Z puede desplazarse sin obstrucciones en la dirección Y desde un punto 156 mm por encima de la superficie superior de la placa base a un punto 256 mm por encima de la superficie superior de la placa base. Las puntas de pipeta de 1 ml pueden penetrar en la lámina incluida en las tiras de reactivo desechable. Esta penetración puede no contaminar, no afectar a las químicas asociadas, ni dañar las puntas de pipeta. Los movimientos pueden ejecutarse eliminando la histéresis mecánica, según sea necesario. Los movimientos del brazo pòrtico motions pueden optimizarse para evitar la contaminación y arrastre entre carriles. La gradilla puede alinear las tiras de reactivo con una tolerancia de +/- 0,010 pulgadas en las direcciones X e Y.

30 En referencia ahora al brazo pòrtico, en algunas realizaciones, el brazo pòrtico puede estar formado por un motor de pasos, un sistema robòtico cartesiano accionado con correa/tornillo sin fin. El brazo pòrtico puede ser libre para moverse, con o sin accesorios, sobre los módulos que se encuentran delante de la fachada trasera y por debajo de la cara horizontal más baja del cabezal Z, siempre que la inclinación Z esté totalmente retraída. El brazo pòrtico puede desplazarse a una velocidad de alrededor de 500 mm/seg en las direcciones X e Y y hasta alrededor de 100 mm/seg en la dirección Z. La precisión de los movimientos de los ejes (por ej., en relación con los sensores X, Y, y Z) puede ser 25 mm o mejor para cada eje, y puede conservarse durante el periodo de mantenimiento. Las correas impulsoras del eje pueden no dejar residuos en las zonas en las que se procesan PCR y las muestras. El brazo pòrtico puede contener provisiones para enrutar los arneses de cableado propios y del equipo Z de regreso al instrumento. La tensión de la correa de los ejes X y Y puede ajustarse de 41,5 +/- 3,5 libras.

35 En referencia ahora al equipo Z, el cabezal de fluido puede tener cuatro inyectores de pipeta situados en centros de 24 mm. Puntas de pipeta ejemplares son las que los inyectores de pipeta pueden capturar sin que se produzcan fugas, por ejemplo, puntas Biorobotix PN23500048 (50 µL), PN23500049 (1,75 µL), y PN23500046 (1 ml). El equipo Z puede incorporar una placa extractora accionada a pasos que puede extraer puntas de pipeta (por ej., las puntas de pipeta descritas anteriormente). El sistema puede incluir un sistema de bomba y colector que incluya aspiración, dispensado y ventilación de los volúmenes de fluido individuales dentro de cada una de las cuatro puntas individuales y dispensando y ventilando simultáneamente todas las puntas controlados mediante software. El sistema de bomba y colector puede tener una precisión de alrededor de +/- 2 µL por punta para volúmenes inferiores a 20 µL y alrededor de +/- 10% para volúmenes superiores o iguales a 20 µL (por ej., al aspirar o dispensar en puntas individuales). El volumen total de bombeo puede ser superior a alrededor de 8 µL e inferior a alrededor de 1250 µL. La velocidad mínima de aspirado y dispensado puede ser de alrededor de 10 µL/seg a alrededor de 300 µL/seg. El centroide de la cara inferior de cada punta de pipeta puede estar axialmente alineado con el centroide de los inyectores de pipeta en 0,2 mm. La cara inferior de cada punta de pipeta puede ser coplanar en 0,2 mm. El equipo Z puede incorporar un sensor de fuerza del eje Z capaz de informar al software sobre las fuerzas aplicadas de entre alrededor de 0 y 4 lbs. El equipo Z puede incorporar un lector de códigos de barras orientado hacia abajo capaz de leer los sistemas de códigos de barras descritos en esta memoria.

- En referencia ahora a las gradillas incluidas en el sistema, estas pueden contener tiras de reactivo desechables (por ej., orientadas ortogonalmente hacia la parte frontal del instrumento) en 2 gradillas de 12 carriles. Las 12 tiras de reactivo de una gradilla pueden registrarse y bloquearse en la gradilla tras ser introducidas por un usuario. La gradilla puede contener un área para 12 tubos de muestras para lisis (por ej., PN 2350043) y contener las partes inferiores de los tubos de forma coplanar, permitiendo al usuario orientar el código de barras hacia la parte posterior del instrumento. Ciertas características, incluidas las indicadas anteriormente, permiten que un usuario mínimamente formado pueda introducir y orientar la gradilla en el instrumento. La correcta colocación de la gradilla puede confirmarse a través del software. En algunas realizaciones, la gradilla puede ser negra y de color permanente (por ej., puede no percibirse la degradación del color con el uso o al lavarla con una solución al 10% de lejía) y el material de la gradilla puede ser dimensionalmente estable en 0,1 mm en el intervalo de temperatura de funcionamiento del sistema. La gradilla puede estar diseñada con provisiones para permitir su transporte hacia y desde el instrumento y para reducir o eliminar la probabilidad de que los tubos contenidos en la gradilla se derramen al ser colocados sobre una superficie plana.
- En referencia ahora al lector y al calentador de PCR incluidos en el sistema, el lector permite la introducción y extracción de un cartucho, por ejemplo, por un usuario mínimamente formado. El cartucho puede permanecer alojado en el lector mientras el sistema está en funcionamiento. En algunas realizaciones, puede suceder que el escáner de códigos de barras no lea correctamente el código de barras del cartucho si se introduce el cartucho incorrectamente (por ej., al revés o por detrás), así el sistema puede indicar al usuario que debe reinsertar correctamente el el cartucho en la bandeja del lector, cuando se introduce un cartucho incorrectamente. El cajón del lector puede localizar repetidamente el cartucho, para cargarlo con las puntas de pipeta, en 0,5 mm. El lector puede poner el cartucho desde la posición de carga a una posición de reacción y detección mediante un mecanismo automatizado del cajón controlado mediante el software. El mecanismo de la bandeja del lector y del cajón pueden alinear los carriles para la PCR del cartucho con el sistema óptico y el calentador. El cartucho puede entrar en contacto con los calentadores de forma uniforme con una presión media de alrededor de 1 psi, o superior, en las zonas de los canales PCR y las válvulas con cera. Pueden protegerse las uniones de hilos de los calentadores contra daños para que no interfieran con el movimiento del sistema. El registro del calentador al cartucho y del cartucho a los centros del camino óptico puede estar dentro de +/- 0,010 pulgadas. El lector puede realizar ciclos mecánicamente alrededor de 80.000 movimientos sin fallo como mínimo
- En referencia ahora a dicho uno o más calentadores de lisis incluidos en el sistema, los calentadores para cada una de las 24 estaciones de lisis pueden controlarse individualmente mediante software. Los tiempos de rampa de lisis (por ej., el tiempo que tarda el agua de un tubo de lisis en elevar su temperatura desde aproximadamente 2,5 °C a una temperatura determinada) puede ser inferior a 120 segundos para un aumento hasta 50 °C e inferior a 300 segundos para un aumento hasta 75 °C. La temperatura de lisis (por ej., según se mide en el agua contenida en un tubo de lisis) puede mantenerse, mediante los calentadores de lisis, dentro de +/- 3 °C de la temperatura deseada. El intervalo de temperatura de lisis accesible puede ser de alrededor de 40 °C a alrededor de 82 °C. Cada uno de los calentadores de lisis puede utilizar alrededor de 16 vatios o mayor potencia al estar en funcionamiento. El calentador de lisis puede estar diseñado para maximizar la transferencia térmica al tubo de lisis y también para acomodar las tolerancias de las partes. Los calentadores de lisis permiten que los tubos de lisis estén en contacto directo con los imanes (descritos en esta memoria con mayor detalle). Los calentadores de lisis pueden regularse en el plano horizontal durante su montaje y no interfieren con las cubiertas del sistema instaladas.
- En referencia ahora a los imanes incluidos en el sistema, los mecanismos relacionados con la lisis y los imanes encajan debajo de la gradilla y no interfieren en la introducción o registro de la gradilla. Los imanes pueden ser imanes de alto flujo (por ej., tener alrededor de 1.000 gauss, o superior, según el flujo medido en un un tubo de lisis determinado) y pueden moverse una distancia suficiente para conseguir la separación magnética de las perlas en uno o más de los tubos de lisis llenos hasta un volumen de 900 µL. Los imanes pueden controlarse mediante software con velocidades de movimiento de alrededor de 1 mm/sec a alrededor de 25 mm/seg. El cableado, incluido como parte del conjunto del calentador y controlador, puede contenerse y protegerse contra derrames potenciales (por ej., derrames procedentes de los tubos de lisis). Cuando no se utilizan, los imanes pueden estar situados alrededor de 1,25 pulgadas o a una distancia superior desde el fondo del tubo de lisis y pueden retenerse en dicha posición para maximizar el contacto con el tubo de lisis mientras, al mismo tiempo, se evitan atascos.
- En algunas realizaciones, la caja del sistema incluye una tapa semitransparente (por ej., con elementos y/o partes del sistema opacos) en la parte frontal del instrumento para permitir a los usuarios visualizar las funciones del instrumento. La tapa puede incluir el logotipo de una empresa y/o producto y un asa de transporte (por ej., permite al usuario levantar la tapa). Al estar cerrada, la tapa puede incorporar una fuerza de apertura no superior a 15 libras (por ej., al medirse tangencial respecto a la rotación de la puerta en el centro del borde inferior del asa) y puede bloquearse en posición abierta (por ej., "arriba") de modo que no es necesario más de alrededor de 5 lbs. de fuerza (por ej., aplicada al asa y tangencial respecto a la rotación de la puerta) para desbloquear el asa y devolver la tapa a la posición cerrada. La tapa puede incluir dos cierres de seguridad que, normalmente, están cerrados cuando el instrumento no recibe corriente y que permiten que el sistema supervise el estado de la tapa (por ej., abierta o cerrada). La tapa puede estar diseñada de modo que no se caiga cuando pase de posición abierta a cerrada. La caja puede incluir un interruptor de encendido situado en el lateral derecho del instrumento. Puede sobresalir un

5 cable de alimentación de modo que al posicionar el instrumento no se dañen los cables ni se produzcan desconexiones accidentales. La caja puede evitar que el usuario entre en contacto, por ejemplo, con las partes móviles, con altos campos magnéticos, conexiones eléctricas expuestas, entre otros. La caja puede incluir cuatro patas de soporte, situadas en la parte inferior de la caja, que proporciona una separación de alrededor de 0,75 pulgadas o más entre la parte inferior del sistema y la mesa. La caja puede incluir una zona rebajada que permite el acceso a las conexiones de accesorios externos, tales como el puerto de pantalla, el puerto Ethernet, los 4 puertos USB, entre otros.

10 En referencia ahora al subsistema de enfriamiento incluido en el sistema PCR, puede incorporarse una toma de aire en la parte frontal de la unidad y puede incorporarse una salida de aire en el lado posterior de la parte superior de la unidad. El aire de entrada pasa a través de la toma de aire y del filtro (por ej., un filtro extraíble y lavable). El subsistema de enfriamiento puede mantener una temperatura del aire interior (por ej., la temperatura según se mide en la superficie de las tiras de reactivo, tales como las tiras de reactivo con los números 1, 12, y 24, situadas en la superficie de los cartuchos PCR, entre otras) alrededor de 10 °C más elevada, o inferior a la temperatura ambiental.

15 El subsistema de enfriamiento puede mantener la temperatura del aire interior en o por debajo de alrededor de 32 °C. Dicho uno o más ventiladores de enfriamiento incluidos como parte del subsistema de enfriamiento puede requerir una potencia de alrededor de 5,7 vatios, o menos, por ventilador.

20 En algunas realizaciones, el sistema puede incluir cubiertas en los subconjuntos internos (con la excepción del brazo robótico). Las cubiertas pueden limpiarse con una solución al 10% de lejía aplicada con un paño suave sin que se produzca una degradación significativa. Las cubiertas pueden proporcionar una barrera de seguridad entre un usuario y los conjuntos electrónicos y mecánicos móviles incluidos en el sistema. Las cubiertas de los subconjuntos internos pueden estar diseñadas para maximizar el enfriamiento de los subconjuntos internos, maximizar el flujo de aire bajo las cubiertas y reducir el flujo de aire por encima de las cubiertas. Un técnico especializado puede extraer las cubiertas, las cuales pueden coincidir en color y textura con las cajas.

25

30 En algunas realizaciones, el sistema puede estar diseñado para funcionar en un intervalo de temperatura de alrededor de 15 °C a alrededor de 30 °C y en un intervalo de humedad relativa sin condensación (por ej., alrededor de 15% a alrededor de 80% de humedad relativa). El analizador puede estar diseñado para funcionar tras haber estado almacenado a una temperatura superior a -20 °C durante 24 horas o menos, con un almacenamiento a no más de 60 °C durante 24 horas o menos, y/o almacenamiento a alrededor de 50.000 pies o menos (por ej., 3,4 pulgadas de Hg) durante 24 horas o menos. El sistema puede estar diseñado con elementos que eviten movimientos que pudieran dañar el instrumento durante su envío. Puede adecuarse a las normas de envío establecidas en ASTM D 4169-05, DC 12 y puede estar diseñado de modo que permita que la placa base esté correctamente sujeta a un pallet de envío. Las gradillas y la caja del instrumento han sido diseñados para no degradarse ni resultar dañados por las tareas de limpieza diarias con una solución al 10% de lejía. La electricidad puede suministrarse a los subconjuntos del sistema mediante fuentes de alimentación internas. Fuentes de alimentación ejemplares pueden recibir, alrededor de 1590 vatios en alrededor de 90 a alrededor de 264 Vac entre alrededor de 47 y alrededor de 63 Hz y suministrar alrededor de 1250 vatios de salida a los subconjuntos.

35

40 En algunas realizaciones, el sistema puede incluir un interruptor (por ej., un interruptor basculante), situado en el lado derecho del instrumento, uno o más componentes de interfaz, y/o uno o más puertos de interfaz. Por ejemplo, el sistema puede incluir un monitor con pantalla LCD de 15 pulgadas, una resolución de 1280 x 1024 píxeles y color de 16 bits. El sistema también puede incluir otros monitores de pantalla, tales como los que tienen un tamaño, resolución y/o profundidad del color aumentados. La pantalla LCD puede conectarse al sistema a través de una conexión VGA. El sistema puede incluir un ratón USB blanco de 2 botones, un teclado USB blanco, un cable de alimentación SJT negro y una fuente de alimentación ininterrumpible, con retroalimentación mediante USB. El sistema también puede incluir una impresora a color USB, 2 cables USB (por ej., uno para la impresora y otro para la UPS). El sistema puede incluir puertos de interfaz ejemplares, tales como, 4 puertos USB (por ej., para conectar a un dispositivo señalador, impresora, teclado, UPS, LIS), 1 puerto VGA (por ej., para la conexión con la pantalla LCD), y 1 puerto Ethernet (por ej., para conectividad con PC) situado en el lado izquierdo de la caja. En el lado derecho de la caja puede incluirse un cable de alimentación CEI/EN 60320-11C14.

45

50

55 En algunas realizaciones, el sistema puede incluir características dirigidas a aumentar la seguridad del usuario. Por ejemplo, pueden incluirse interruptores de enclavamiento de puerta para evitar el acceso del usuario mientras el brazo pòrtico está en movimiento y/o mientras otros procesos no interrumpibles están en progreso. El sistema puede estar diseñado para reducir o eliminar la presencia de rincones peligrosos accesibles para el usuario y/o bordes en el instrumento y ha sido diseñado de modo que las partes metálicas están debidamente conectadas a tierra. Puede incluirse una cubierta metálica o plástica sobre los componentes mecánicos y eléctricos según sea necesario para proteger al usuario de las partes móviles y/o partes eléctricas expuestas y para proteger la electrónica y los motores incluidos en el sistema en caso de, por ejemplo, vertidos.

60

Ejemplo 19: Óptica ejemplar



En esta memoria se describen especificaciones ejemplares relacionadas con el diseño de la óptica utilizada en un analizador y/o sistema PCR. En otros apartados de esta memoria se describe información adicional relacionada con el sistema PCR. El sistema de detección óptico incluido en el sistema PCR puede ser un sistema de detección de dos colores y 12 canales para supervisar la fluorescencia PCR en tiempo real de un cartucho microfluídico para PCR de 12 carriles. El sistema puede incluir luces de excitación (por ej., fuentes de luz LED azul y ámbar), uno o más filtros de paso de banda y una o más lentes de enfoque. La luz fluorescente emitida por el reactor de PCR (por ej., incluido en el cartucho microfluídico) se captura en el camino hacia una lente de enfoque, a través de un filtro, y hacia un fotodiodo. El sistema incluye elementos ópticos individuales fijos específicos para cada uno de los dos colores cuestionados para cada carril para la PCR.

En algunas realizaciones, el límite de detección es 20 copias de ADN por reacción de la introducción de la mezcla de reacción PCR con un valor mínimo de señal a base de 1,15. El sistema de fluorescencia de dos colores puede utilizarse, por ejemplo, con FAM (o equivalente) y Cal Red (o equivalente). El sistema puede tener la capacidad de recoger datos de fluorescencia en alrededor de 600 ms a la velocidad máxima de un punto de datos alrededor de cada dos segundos. Al recoger datos de un carril para la PCR, los LED de los carriles adyacentes aumentan la señal del carril que está siendo muestreada menos de alrededor de un 1% (por ej., 0,5%). El ruido de la detección puede ser inferior a alrededor de 1% de la señal máxima. La variabilidad de la fluorescencia carril-a-carril con una fluorescencia estándar (por ej., parte # 14000009) puede encontrarse dentro de un Cv del 30% para FAM y para Cal Red, al realizar la medición con la curva de fluorescencia corregida con corriente residual. La curva de fluorescencia corregida con corriente residual media del bloque óptico de 12 carriles puede ser de alrededor de 30 mV a alrededor de 90 mV (% potencia LED) para FAM que utiliza el estándar de fluorescencia (Parte # 14000009). La curva de fluorescencia corregida con corriente residual media del bloque óptico con 12 carriles puede ser de alrededor de 75 mV a alrededor de 300 mV (% potencia LED ámbar) para Cal Red que utiliza un cartucho de fluorescencia estándar (Parte # 14000009). La potencia de excitación media de cada canal puede variarse independientemente por medio del software de alrededor del 5% a alrededor del 100%. Puede no haber ninguna fuente de luz activada en el interior del lector que afecte a la lectura de la fluorescencia. En algunas realizaciones, encender o apagar las luces no afecta a las lecturas ópticas.

En algunas realizaciones, el sistema puede incluir un bloque óptico con 12 repeticiones de unidades de detección de fluorescencia de 2 colores a distancia de alrededor de 8 mm. El bloque de óptica de detección puede colocarse sobre el cartucho microfluídico, desplazándose la excitación y la emisión a través de las ventanas PCR del cartucho microfluídico. Las aperturas del bloque óptico pueden alinearse con el reactor PCR en alrededor de +/- 200 micras. Una tarjeta electrónica óptica que contiene los LED y fotodetectores puede combinarse nivelada con la parte superior del bloque óptico con cada uno de los fotodetectores empotrados en los orificios de su correspondiente carril óptica. Cuando se instala el cartucho microfluídico en el sistema, el bloque óptico puede utilizarse para aplicar una fuerza de alrededor de 20 a alrededor de 30 lb. sobre la zona activa del cartucho microfluídico con una presión media de, al menos, alrededor de 1 psi.

El bloque óptico puede estar fabricado de aluminio y las superficies presentes en las longitudes del camino óptico pueden ser negro anodizado, por ejemplo, para reducir la autofluorescencia, así como la dispersión de la luz. Una placa de apertura con 12 hendiduras, las cuales tienen una longitud de alrededor de 10 mm y un ancho de alrededor de 1 mm, y que pueden utilizarse, por ejemplo, para limitar el tamaño de los puntos de luz de excitación, así como para reducir la fluorescencia de fondo. El espesor del bloque óptico puede ser de alrededor de 1,135 +/- 0,005 pulgadas. La superficie inferior del bloque óptico puede ser planar en +/- 1 mil para proporcionar una presión uniforme sobre el cartucho microfluídico. Las aperturas deben mantenerse limpias y libres de residuos durante la fabricación del bloque óptico y del montaje del bloque óptico en el sistema.

En algunas realizaciones, el sistema puede incluir óptica de excitación con un ángulo del camino de excitación igual a 55 +/- 0,5 pulgadas en relación con la superficie normal del cartucho para PCR. Una disposición ejemplar de los elementos ópticos del camino de excitación, en orden, es LED, lente; filtro, apertura, y muestra para PCR. El sistema puede utilizar una lente de excitación plano-convexa (por ej., PCX, 6 X 9, MgF2TS) orientada con el lado plano hacia la muestra para PCR. Se incluye en la óptica uno o más caminos de excitación con uniones diseñadas de modo que la lente y el filtro pueden colocarse en el interior del orificio para proporcionar un punto de luz mayor que la placa de apertura. La posición del LED y de la muestra pueden ser fijos, ya que el diseño puede incluir un espesor del bloque óptico fijo disponible. Puede determinarse la posición de la lente y del filtro para que proporcione un tamaño de punto de excitación de alrededor de 6 mm a lo largo de la longitud de un carril para la PCR. La óptica de excitación puede incluir un LED, tal como Luxeon Parte # L XK2-PB 14-NO0 (por ej., para excitación FAM) que incluye una longitud de onda central de alrededor de 470 nm (azul) con un ancho de media banda de 75 nanómetros, o menos (por ej., para excitación FAM). La óptica de excitación también puede incluir un LED, tal como Luxeon Parte # L XK2-PL12-Q00, (por ej., para excitación Cal Red) que incluye una longitud de onda central de 575 nm (ámbar) con un ancho de media banda de alrededor de 75 nanómetros, o menos (por ej., para excitación Cal Red). Los LED utilizados en la óptica de excitación son estables durante alrededor de 5 años o más o alrededor de 10.000 ciclos.

El sistema puede incluir óptica de emisión con un ángulo del camino de emisión igual a alrededor de 15 +/- 0,5 pulgadas en relación con la superficie normal del cartucho para PCR. Una disposición ejemplar de los elementos

- 5 ópticos en el camino de emisión, por orden, es: muestra para PCR, apertura, filtro, lente, y fotodetector. La lente de emisión puede ser plano-convexa (por ej., PCX, 6 x 6 MgF2TS) con el lado plano hacia los fotodetectores. La óptica de emisión puede incluir uno o más orificios, para el camino de emisión, con conexiones que pueden diseñarse para maximizar la luz detectada mientras se permite una colocación ajustada de los filtros y las lentes. La posición de los fotodetectores en relación con la muestra puede ser fija, ya que el diseño puede incluir un espesor de bloque óptico fijo disponible. Puede determinarse la posición de la lente y del filtro de modo que proporcione un tamaño de punto de emisión de 6 mm a lo largo de un carril para la PCR. Un fotodetector ejemplar que puede utilizarse en la óptica de emisión es el fotodetector de silicio con lente de Hamamatsu, S2386-18L.
- 10 En algunas realizaciones, el sistema puede incluir uno o más filtros con diámetros de alrededor de 6,0 +/- 0,1 mm, espesores de alrededor de 6,0 +/- 0,1 mm, aperturas con diámetros de salida inferiores o iguales a alrededor de 4 mm. Los filtros pueden incluir un tratamiento de borde oscurecido realizado antes de su colocación en un anillo de montaje. Der estar presente, el anillo de montaje puede ser metálico y anodizado en negro. Los filtros pueden fabricarse a partir de vidrio óptico con una calidad superficial F/F según Mil-C-48497A, un AOI de alrededor de 0
- 15 grados, una AOI de 1/2 cono de alrededor de +8 grados, y puede mantener una humedad y temperatura estables dentro del intervalo operativo recomendado del sistema. Un filtro ejemplar puede obtenerse de Omega Optical Brattleboro, VT 05301.
- 20 El sistema puede incluir uno o más filtros excitadores FITC (por ej., PN 14000001) con número de parte de Omega 481AF30-RED-EXC (por ej., dibujo # 2006662) utilizados, por ejemplo, en la excitación FAM. Estos filtros pueden tener un punto de corte de baja longitud de onda de alrededor de 466 +/- 4 nm y un punto de corte de alta longitud de onda de alrededor de 496 +/- 4 nm. La transmisión de los filtros de este tipo puede ser mayor o igual a alrededor de 65% pico. Dichos filtros pueden tener una eficiencia de bloqueo superior o igual a OD4 para longitudes de onda ultravioleta a alrededor de 439 nm, mayor o igual a OD4 para longitudes de onda de alrededor de 651 nm a
- 25 alrededor de 1000 nm, mayor o igual a OD5 para longitudes de onda de alrededor de 501 nm a alrededor de 650 nm, y mayor o igual a OD8, en teoría, para longitudes de onda de alrededor de 503 nm a alrededor de 580 nm.
- 30 El sistema puede incluir uno o más filtros excitadores ámbar (por ej., PN 14000002) con número de parte 582AF25-RED-EXC (por ej., dibujo # 2006664) utilizados, por ejemplo, en la excitación Cal Red. Estos filtros pueden tener un punto de corte de baja longitud de onda de alrededor de 569 +/- 5 nm y un punto de corte de alta longitud de onda de alrededor de 594 +/- 5 nm. La transmisión de filtros de este tipo puede ser mayor o igual a 70% del pico. Estos filtros tienen una eficiencia de bloqueo mayor o igual a OD8, en teoría, para longitudes de onda de alrededor de 600 nm a alrededor de 700 nm.
- 35 El sistema puede incluir uno o más filtros emisores FITC (por ej., PN 14000005) con número de parte 534AF40-RED-EM (por ej., dibujo # 2006663) utilizados, por ejemplo, en la emisión FAM. Estos filtros pueden tener un punto de corte de baja longitud de onda de 514 +/- 2 nm y un punto de corte de alta longitud de onda de 554 +/- 5 nm. La transmisión de filtros de este tipo puede ser mayor o igual a 70% del pico. Estos filtros tienen una eficiencia de bloqueo mayor o igual a OD5 para longitudes de onda desde ultravioleta a alrededor de 507 nm, mayor o igual a
- 40 OD8, en teoría, de alrededor de 400 nm a alrededor de 504 nm, y mayor o igual a OD4 media de alrededor de 593 nm a alrededor de 765 nm.
- 45 El sistema puede incluir uno o más filtros emisores ámbar (por ej., PN 14000006) con número de parte 627AF30-RED-EM (por ej., dibujo # 2006665) utilizados, por ejemplo, en la emisión Cal Red. Estos filtros pueden tener un punto de corte de baja longitud de onda de 612 +/- 0 nm y un punto de corte de alta longitud de onda de 642 +/- 5 nm. La transmisión de filtros de este tipo puede ser mayor o igual a 70% del pico. Estos filtros tienen una eficiencia de bloqueo mayor o igual a OD5 para longitudes de onda de ultravioleta a alrededor de 605 nm, mayor o igual a OD8, en teoría, de alrededor de 550 nm a alrededor de 600 nm, y mayor o igual a OD5 de media de alrededor de 667 nm a alrededor de 900nm.
- 50 Ejemplo 20: Cartucho de 3 capas ejemplar
- 55 En esta memoria se describen especificaciones ejemplares utilizadas para diseñar y montar el cartucho microfluídico, así como instrucciones ejemplares sobre la utilización del cartucho en, por ejemplo, el sistema aquí descrito. En algunas realizaciones, el cartucho puede tener un límite de detección máximo igual a 20 copias por volumen de reacción (por ej., 20 copias / 4µ), con una detección diana de 10 copias por volumen de reacción. El cartucho puede efectuar 45 ciclos de reacción en 40 minutos o menos (por ej., 45 ciclos en 40 minutos, 45 ciclos en 20 minutos, 45 ciclos en 15 minutos, u otros similares). El cartucho puede utilizar detección de dos colores utilizando, por ejemplo, los tintes fluorescentes FAM (o equivalente) y CAL RED (o equivalente). Se han comparado
- 60 los resultados obtenidos utilizando el cartucho con los resultados obtenidos utilizando instrumentos para PCR estándar en tiempo real.
- 65 En algunas realizaciones, el cartucho puede ser un cartucho monouso desechable que puede ser eliminado según los procedimientos de laboratorio habituales. El cartucho puede tener una longitud de 4,375 pulgadas y 2,800 pulgadas de ancho, con un espesor de 0,094 +/- 0,005 pulgadas. El cartucho puede incluir características que

5 permiten al cartucho interconectarse con, por ejemplo, el sistema aquí descrito. Características de interfaces ejemplares incluyen paredes de canales PCR y la parte superior del microsustrato sobre el canal PCR bien pulidos (SPI A1/A2/A3), facilitando la transferencia de la luz de excitación y emisión entre el reactor PCR (por ej., contenida en el cartucho) y el sistema de detección (por ej., el analizador). El cartucho puede incluir una interfaz térmica, situada en la parte inferior del cartucho, para su conexión con el analizador. La interfaz térmica puede tener un laminado fino (por ej., inferior a un espesor de 150, un espesor de 100 micras, u otros similares) para fomentar la transferencia de calor desde la oblea del calentador a, por ejemplo, los canales PCR del cartucho.

10 El cartucho puede incluir uno o más interfaces mecánicas con, por ejemplo, el analizador. Por ejemplo, el cartucho puede incorporar una muesca es una o más de las esquinas que coinciden con una forma correspondiente del módulo calentador del analizador. La muesca y la forma correspondiente permittien colocar el cartucho de en una sola dirección en la bandeja de, por ejemplo, el sistema aquí descrito. En algunas realizaciones, el cartucho tiene una sola muesca en una de las esquinas, teniendo las tres esquinas restantes un radio mínimo de 1 mm para facilitar la colocación del cartucho en el analizador. Durante su utilización (por ej., al colocarlo en el sistema aquí descrito y al realizar una función tal como la PCR), el bloque óptico presiona el cartucho por un lado contra la oblea del calentador (colocada en el lado opuesto) con una presión de alrededor de 1 psi o mayor (por ej., 0,99 psi, 1,2 psi, u otras similares). Al estar colocada en la bandeja del analizador, el cartucho puede tener una inclinación de alineación de +/- 200 micras para permitir al usuario introducir y extraer el cartucho con facilidad de la bandeja del analizador. El cartucho puede incorporar dos salientes, cada uno con un ancho de 1 mm y situados a lo largo de los dos bordes largos del cartucho, para permitir que la superficie de calentamiento se extienda por debajo del plano de referencia de la bandeja.

25 En algunas realizaciones, el cartucho puede tener las siguientes especificaciones funcionales. El cartucho puede incluir un orificio de entrada que tiene, por ejemplo, forma de cono con una altura de 1 mm desde la superficie superior del cartucho. El cono puede tener un diámetro interior de 3 mm en la parte superior del cono y en la parte inferior tiene diámetro que coincide con el ancho de un microcanal (por ej., un canal de entrada) al que está fluidamente conectado el cono de entrada. El canal de entrada conecta de forma fluida el orificio de entrada a un reactor de PCR con un volumen interior de, por ejemplo, alrededor de 4,25 µl a 4,75 µl (por ej., 4,22 µl, 4,5 µl, 4,75 µl, u otros similares). Un canal microfluídico de salida puede conectar de forma fluida el reactor de PCR a una cámara de desborde. El cartucho también puede incluir un orificio de ventilación de salida.

35 La muestra para PCR introducida (por ej., una mezcla de reacción) puede ser de alrededor de 6,0 y 7,0 µl por carril para la PCR (por ej., 5,9 µl por carril, 6,4 µl por carril, 7,1 µl por carril, u otras cantidades similares) y puede introducirse en el cartucho a través del orificio de entrada, por ejemplo, con una pipeta. La muestra de reacción puede transportarse a través del canal de entrada al reactor de PCR en donde puede aislarse la muestra de reacción (por ej., sellado mediante válvulas) para evitar la evaporación o el movimiento de la mezcla de reacción durante el termociclado. Una vez sellada la mezcla en el interior de la cámara, el analizador puede iniciar la PCR multiplexada en tiempo real sobre parte o toda la mezcla de reacción (por ej., 4,5 µl, una cantidad de fluido igual al volumen interno de la cámara de reacción, u otra similar).

40 El sustrato microfluídico del cartucho puede incluir uno o más de las siguientes especificaciones. El material del microsustrato puede ser ópticamente transparente (por ej., tener una transmisión óptica de alrededor del 90% o superior, tener un espesor de 3 mm, cumplir con la norma ASTM D1003, y otras similares), tendrá una autofluorescencia inferior a la emitida por una ZEONOR 1420R con 2 mm de espesor, y tendrá un índice refractivo de alrededor de 1,53 (ASTM D542). El material del microsustrato puede utilizarse en el moldeo por inyección de características necesarias para la red microfluídica del cartucho. Preferiblemente, el material será compatible con todos los agentes para PCR y soportará temperaturas de hasta alrededor de 130°C durante alrededor de 5 minutos o más sin deformarse ni fundirse. El cartucho puede incluir fiduciales, reconocibles por los equipos fabricados por HandyLab, situados en una o más (preferiblemente en dos) de las esquinas del sustrato. El cartucho puede incluir componentes fluídicos (por ej., microcanales, válvulas, orificios de ventilación, orificios de introducción de reactivo, cámaras de reacción, y otros similares) necesarios para realizar las funciones del cartucho (por ej., PCR).

55 Características adicionales del material del sustrato pueden incluir una o más de las siguientes. Pueden diseñarse separaciones mínimas de alrededor de 1 mm entre las características funcionales para garantizar el éxito del sellado (por ej., para el analizador), y para permitir la simplificación del montaje. El cartucho puede incluir huesos de perro en extremos pequeños del camino del fluido para, por ejemplo, aumentar la vida del molde. La parte inferior de la superficie de las microherramientas puede desbastarse (por ej., arenado por vapor, EDM, u otras similares). El material del sustrato debe poder permitir la adhesión de una etiqueta.

60 En algunas realizaciones, la cinta de sellado utilizada en el cartucho puede incluir una o más de las siguientes especificaciones. El laminado puede aplicarse fácilmente en la parte inferior del sustrato microfluídico. Preferiblemente, el material del laminado estará libre de perforaciones. Preferiblemente, el material y el adhesivo serán compatibles con las químicas de reacción de la PCR. El material laminado y la cola no serán autofluorescentes. El material puede soportar hasta 130°C durante 5 minutos sin perder adhesión, sin deformarse, ni fundirse y sin provocar tensiones en el cartucho. No deben formarse burbujas en la capa de adhesivo tras el

## ES 2 610 128 T3

calentamiento (por ej., hasta 130°C durante 5 minutos) tras aplicar el microsustrato. El laminado debe tener un espesor inferior a 5 mils para, por ejemplo, permitir una rápida transferencia del calor.

5 La cera de alta temperatura incluida en el cartucho puede tener las siguientes características. La cera tendrá un punto de fusión de alrededor de 90 +/- 3°C (por ej., 87°C, 90°C, 93,1°C, u otras temperaturas similares), será biocompatible con las reacciones PCR, tendrá humectabilidad con el material de microsustrato, y tendrá un intervalo de viscosidad de fusión, por ejemplo, de alrededor de viscosidad a 100°C = 20 mm<sup>2</sup>/s y dureza a 25°C = 8 dmm. La etiqueta principal del cartucho tendrá las siguientes características. Puede tener un espesor de 2-4 mils, una adherencia adecuada a las microcaracterísticas y se sellará alrededor de las válvulas, incluirá recortes para una o 10 más ventanas PCR, y una pestaña (sin adhesivo) para ayudar a retirar el cartucho del analizador. La superficie superior de la etiqueta principal puede presentar resistencia a la abrasión, y puede ser imprimible. La etiqueta principal puede incluir un patrón de alineación superior e inferior para que la etiqueta cubra completamente los orificios de las válvulas para su correcto funcionamiento.

15 El cartucho puede incluir una etiqueta de código de barras aplicada en la parte superior del cartucho que puede ser leída por un lector de códigos de barras (por ej., el lector de códigos de barras incluido en el analizador) mientras el cartucho está instalado en el analizador. La etiqueta con el código de barras puede incluir el nombre del producto, número de lote, fecha de caducidad, código de barras (2D) y puede imprimirse. Además, alternativamente, puede aplicarse directamente un código de barras a la etiqueta del cartucho principal utilizando una impresora láser o de 20 chorro de tinta.

El envase en el que se incluye el cartucho puede incluir uno o más de los siguientes elementos: etiqueta del paquete, caja de cartón, etiqueta de la caja de cartón y/o instrucciones de funcionamiento. Puede imprimirse encima del envase o bien puede etiquetarse por separado, colocado dentro de una bolsa de plástico, una bolsa 25 termoencogible/expandible, u otros similares, y puede apilarse en grupos de 24. Los cartuchos envasados sin incluir un sellado crítico deben mantenerse libres de polvo.

El cartucho puede incluir una o más válvulas (por ej., válvulas que contienen cera de temperatura controlada) para 30 iniciar, detener y/o controlar el flujo de material en el interior del cartucho. La cera contenida en las válvulas debe estar libre de burbujas de aire con un diámetro superior a la mitad del ancho del canal de la válvula. El canal de la válvula puede incorporar una bolsa de aire. La cera no accederá al camino del fluido antes de producirse la activación. Puede llenarse la cera en el camino del fluido hasta que se inicie el resplandor.

El cartucho puede incluir microcanales y orificios de modo que los orificios tengan un tamaño y forma adecuados 35 para permitir una interconexión sencilla y libre de fugas con una punta de pipeta de 175 µl. En algunos ejemplos, los orificios tienen un tamaño de diámetro de alrededor de 200 µm a alrededor de 4000 µm. Los microcanales pueden tener un ancho de alrededor de 50 µm a alrededor de 1500 µm wide y una altura de entre alrededor de 50 µm y 1000 µm.

El cartucho puede incluir válvulas para controlar el flujo de líquido en el interior del cartucho (por ej., a través de los 40 microcanales, cámaras del reactor, y otros). Los bordes, pasos y geometría general de la válvula pueden diseñarse para fomentar el flujo/paro exacto necesario durante la carga de la cera. La geometría de la válvula puede diseñarse para que admita las limitaciones de los equipos de dispensado de cera (por ej., volumen +/- 25% de 75 nL). En algunas realizaciones, las cámaras de reducción de aire de las válvulas tienen forma de embudo adaptadas para 45 ayudar a la carga de la cera y la geometría restante se reduce desde la parte inferior del embudo hasta el extremo final, donde se detiene la cera. El camino por el que fluyen y bloquean las válvulas durante su uso, puede ser lo suficientemente estrecho (por ej., profundidad y ancho de 150 - 200) y tener la suficiente longitud para sellarse de forma eficaz cuando se activan las válvulas durante su utilización. La temperatura de la cera de la válvula puede ser 50 alrededor de 90°C. Cuando se utiliza para bloquear una parte de un microcanal, las válvulas pueden sellar para evitar la evaporación de fluidos y/o migración física de fluido del reactor PCR durante el termociclado.

El cartucho puede incluir una o más zonas PCR para efectuar la PCR en una muestra. El canal de la región PCR 55 (por ej., reactor de PCR) puede estar diseñado de modo que la temperatura del contenido del canal permance uniforme alrededor de 1°C de la temperatura de hibridación. Las canales del canal tendrán un pulido según SPI A1/A2/A3.

En algunas realizaciones, el cartucho está diseñado para efectuar pruebas diagnósticas dentro de un intervalo de 60 temperatura de alrededor de 59°F a alrededor de 86°F (alrededor de 15°C a alrededor de 30°C) y un intervalo de humedad de alrededor de un 15% de humedad relativa a alrededor del 80% de humedad relativa. El cartucho ha sido diseñado para ser seguro y funcional cuando se utiliza en interior, a una altitud de 2000 m o menos, y bajo condiciones de humedad sin condensación (por ej., humedad relativa máxima de 80% para temperaturas hasta 31 °C reduciéndose linealmente hasta una humedad relativa del 50% a 40°C).

65 Durante su utilización, el producto, PCR producido en el cartucho puede permanecer en el cartucho usado para, por ejemplo, reducir la posibilidad de contaminación cruzada. El cartucho puede diseñarse de modo que una caída de 4

## ES 2 610 128 T3

pies, mientras está siendo envasado, no lo dañaría. El cartucho ha sido diseñado para funcionar sin daños tras ser expuesto a las siguientes condiciones. El cartucho debe almacenarse en 4°C a 40°C durante la vida útil indicada. La exposición a temperaturas de entre -20°C y 40°C o 40°C y 60°C no se producirá durante más de 24 horas. El cartucho puede soportar cambios en la presión del aire normales del transporte aéreo.

5 El cartucho puede etiquetarse con la siguiente información (por ej., para identificar el cartucho, cumplimiento de normativas, entre otros). La etiqueta puede contener una etiqueta de "Exclusivamente para investigación", si correspondiera, y una marca CE, de ser aplicable. La etiqueta puede incluir el nombre y logotipo de la empresa (por ej., Handylab®), un número de parte (por ej., 55000009), un nombre de parte (Cartucho 12x no ventilado), un número de lote (por ej., LOT 123456), una fecha de caducidad (por ej., 06/2015), espacio para escribir un código de barras según las especificaciones de los códigos de barras (descritos en otras memorias), y/o "Handylab, Inc., Ann Arbor, MI 48108 USA".

15 El cartucho puede incluirse en una caja que contiene información tal como, un número de parte (por ej., 55000009 un nombre de parte (Cartucho 12x no ventilado), una cantidad (por ej., 24), un número de lote (por ej., LOT 123456), una fecha de caducidad (por ej., 06/2015), un código UPC opcional, "Fabricado por Handylab, Inc., Ann Arbor, MI 48108 USA", una etiqueta que indique los límites de almacenamiento, una marca CE (si es aplicable), y/o un nombre y dirección AR.

20 The paquete de cartuchos puede incluir un envoltorio en papel para sujetar múltiples cartuchos y relleno limpio para evitar daños, por ejemplo, producidos por vibraciones. La caja de envío del cartucho puede incluir características tales como, cumplimiento de la norma ASTM 6159, la caja puede almacenarse en cualquier dirección, no es necesario almacenar las cajas con refrigeración, así como tampoco etiquetar la caja como frágil, pueden no ser necesarios packs fríos adicionales. La vida útil del cartucho es de 12 meses o más.

25 El cartucho cumple la norma CEI 61010 (comprobación NRTL) y puede ser necesaria su inclusión en las listas de la FDA para su distribución clínica. Los cartuchos utilizados en un dispositivo de laboratorio clínico deben cumplir los requisitos de seguridad del sistema. Los cartuchos utilizados exclusivamente para investigación mediante dispositivos comerciales deben cumplir todos los requisitos de calidad de HandyLab. Los cartuchos utilizados exclusivamente para investigación (pruebas alfa o beta) pueden ser diseñados/fabricados para que pueden rastrearse por un DHR (registro de historia de dispositivo) (registro de fabricación).

35 Las siguientes características se identifican mediante los números de referencia de las figuras, pero que no se han identificado en la descripción:

218: Cámara de desbordamiento

350: Bloque óptico

40 500: Cabezal dispensador automático

545: Reactivos líquidos

45 546: Tampón de neutralización

547: Tampón de liberación

548: Tampón de lavado

50 549: Reactivos para preparación de la muestra (liofilizados)

555: Reactivo para la PCR liofilizados (primer analito)

55 556: Reactivo para la PCR liofilizados (segundo analito)

600: Laminado

610: Sustrato microfluídico

60 620: Etiqueta

630: Etiqueta identificativa de lote/caducidad

65 814: Carriles

## ES 2 610 128 T3

- 830: Primeras ubicaciones
- 835: Segundas ubicaciones
- 5 997: Bandeja
- 1010: Calentador del tubo de procesos
- 10 1200: Gota de cera dispensada
- 1600: Canal de flujo
- 1610: Canal de carga de cera
- 15 1620: Bolsillo de aire atrapado
- 1650: Membrana PTFE de 0,22 $\mu$
- 1703: Apertura
- 20 1704: Cabezal multipipeta soportado y capaz de moverse arriba y abajo en el eje z
- 1705: Campo de visión del escáner de códigos de barras
- 25 1900: Botón de ajuste de la carrera
- 1901: Resorte
- 1902: Botón de carga
- 30 1903: Conjunto de aguja
- 1904: Válvula solenoide
- 35 1910: Orificio de drenaje de fluidos
- 1920: Collarín (conjunto del retén)
- 1921: Retén
- 40 1922: Sello
- 1930: Conjunto de control térmico
- 45 1940: Depósito de fluidos
- 1945: Soporte del depósito
- 1950: Conjunto del tubo de alimentación
- 50 1960: Cámara de fluidos
- 1961: Junta tórica
- 55 1962: Asiento
- 1963: Inyector
- 2004: Motor para mover placa de extracción/alineación
- 60 2110: tarjeta PC
- 2310: Espejo
- 65 2700: Motor a pasos para presionar el conjunto óptico contra el cartucho

- 2710: Motor para el carro del escáner
- 5 2720: Placa de apertura, presiona el cartucho microfluídico contra la superficie del calentador
- 2730: Cabezal lector de escaneo de 4 colores
- 3000: Termociclador PCR en tiempo real (escáner de 4 colores)
- 10 4000: ADN diana
- 4100: Cebador/sonda escorpión
- 4200: Fluoroforo
- 15 4300: Extintor
- 9700: Gradillas para el procesamiento de muestras (12 muestras cada uno)
- 20 9720: Soporte para tubo PCR con enfriamiento Peltier (12 muestras cada uno)
- 9941: Cartucho para PCR de 24 carriles
- 9991: Fotodiodos/Fotodetector
- 25 9992: LED azul
- 9993: LED rojo
- 30 9994: Tarjeta de circuitos de detección
- 9995: Filtro
- 9996: Lente
- 35 9997: Espaciador
- 9998: Apertura
- 40 9999: Estructura de alineación en el fondo de la placa de apertura

La descripción que antecede pretende ilustrar los diversos aspectos de la presente invención. No se pretende que los ejemplos aquí presentados limiten el alcance de las presentes invenciones. Para los expertos en la técnica resultará evidente que pueden aplicarse diversos cambios y modificaciones a la tecnología descrita sin alejarse del alcance de las reivindicaciones anexas.

45

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato de diagnóstico (971), que comprende:

- 5 un primer módulo configurado para extraer ácido nucleico simultáneamente de una pluralidad de muestras que contienen ácido nucleico (996), en donde el primer módulo comprende:
- 10 un gradilla extraíble (970, 800), comprendiendo la gradilla una pluralidad de carriles paralelos, comprendiendo cada carril un soporte paralelo (972, 804, 501, 502, 503) y configurado para recibir un tubo de muestras extraíble (802) situado junto al soporte paralelo en una correspondencia uno a uno con el soporte extraíble, estando configurado cada tubo de muestras para aceptar una de la pluralidad de muestras, en donde cada soporte comprende una cámara de proceso (520, 1402), una cámara para residuos (560), una o más puntas de pipeta (580), y uno o más receptáculos (550), en donde uno o más receptáculos contienen respectivamente cantidades suficientes de uno o más reactivos para realizar la extracción de ácido nucleico de una muestra, pudiéndose insertar y extraer la gradilla extraíble del aparato de diagnóstico para permitir la carga de muestras en los tubos de muestras y en los soportes correspondientes en la gradilla antes de la introducción de la gradilla en el aparato de diagnóstico;
- 15 un separador magnético (978, 1400) configurado para mover uno o más imanes (1404) sujetos a un elemento de soporte, comprendiendo el separador magnético un mecanismo motorizado (1405, 1406, 1601) para mover el elemento de soporte de modo que el/los uno o más imanes se mueven hacia atrás y hacia adelante a lo largo de un eje fijo en estrecha proximidad a la cámara de proceso de cada soporte situado en la gradilla;
- 20 un conjunto de calentamiento (977, 1401) que comprende una pluralidad de unidades de calentamiento independientemente controlables, cada una de las cuales está configurada para aceptar y calentar la cámara de proceso de uno de la pluralidad de soportes situados en la gradilla;
- 25 circuitos de control (980, 840, 1409) para controlar el mecanismo motorizado y para controlar el calentamiento de las unidades de calefacción; y
- 30 un dispensador de líquido (976, 2105) configurado para realizar las operaciones de transferencia de fluidos en dos o más soportes situados en la gradilla simultáneamente; y
- 35 un segundo módulo configurado para amplificar simultáneamente el ácido nucleico extraído de la pluralidad de muestras, en donde el segundo módulo comprende:
- 40 uno o más compartimentos de cartucho (992), comprendiendo cada compartimento de cartucho al menos una fuente de calor (998) y estando configurado para recibir un cartucho microfluídico (994), en donde la fuente de calor está configurada para operar en el cartucho y en donde el cartucho está configurado para recibir por separado y para amplificar por separado el ácido nucleico extraído de la pluralidad de muestras; y
- 45 uno o más sistemas de detección (999).
2. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el dispensador de líquido (976, 2105) posee 4 cabezales (1803), en donde cada cabezal está configurado para recibir una punta de pipeta (580) de entre una o más puntas de pipeta de un soporte (972, 804, 501, 502, 503).
3. El aparato (971) de la reivindicación 2, en donde dos cabezales (1803) no reciben puntas de pipeta (580) del mismo soporte (972, 804, 501, 502, 503).
- 50 4. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el dispensador de líquido (976,2105) está sujeto a un brazo pórico con una libertad translacional de 3 grados.
5. El aparato (971) de la reivindicación 1, que comprende, además:
- 55 circuitos electrónicos (840) configurados para controlar el funcionamiento de: el dispensador de líquido (976, 1205); el conjunto de calentamiento (977, 1401); y el separador magnético (978, 1400).
6. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde los soportes (972, 804, 501, 502, 503) son adecuados para un solo uso y son desechables.
- 60 7. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el separador magnético (978, 1400) está configurado para desplazarse de forma reiterada en relación con la cámara de procesos (520, 1402).
8. El aparato (971) de la reivindicación 1, que comprende además una segunda gradilla extraíble (970, 800).
- 65



9. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el sistema de detección (999) comprende un sistema de detección óptico específico que detecta entre uno a cuatro colores.
- 5 10. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el sistema de detección (999) comprende sistema de detección óptico de dos colores al efecto configurado para detectar independientemente la luz de un ácido nucleico objetivo y de un control.
- 10 11. El aparato (971) de la reivindicación 1, que cuenta con dos compartimentos para cartuchos (992) y dos sistemas de detección (999).
- 15 12. El aparato (971) de la reivindicación 1, que cuenta con un sistema de detección único (999), que comprende un detector que hace un barrido a través de un cartucho microfluídico (994).
- 20 13. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el uno o más sistemas de detección (992) comprende una fuente de luz que emite luz en una banda de absorción de un tinte fluorescente y un detector de luz que detecta luz en una banda de emisión del tinte fluorescente, en donde el tinte fluorescente se une a una sonda polinucleótida fluorescente o a un fragmento de la misma.
- 25 14. El aparato (971) de la reivindicación 13, en donde el uno o más sistemas de detección (992) emiten selectivamente luz en la banda de absorción del tinte fluorescente y detecta selectivamente luz en la banda de emisión del tinte fluorescente.
- 30 15. El aparato (971) de la reivindicación 1, configurado para ejecutar extracción extracción, amplificación y detección de la pluralidad de muestras (996) en menos de una hora.
- 35 16. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el primer módulo comprende más de una gradilla (970, 800), y en donde el segundo módulo comprende a single compartimento de cartucho (992).
- 40 17. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde cada uno de la pluralidad de carriles paralelos comprende una parte rebajada (803) configurada para recibir el fondo de uno de los tubos de muestras extraíble (802) y una apertura (805) configurada para mantener una parte superior del tubo de muestras.
- 45 18. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde la al menos una fuente de calor (998) está configurada para acoplarse térmicamente al cartucho microfluídico (994) y está configurado para aplicar calor a uno o más regiones seleccionadas del cartucho microfluídico en uno o más momentos seleccionados, a fin de:
- 50 cerrar una o más válvulas confinando así una microgota de un ácido nucleico extraído en una posición dentro del cartucho; y aplicando las operaciones de ciclo término suficientes para amplificar el ácido nucleico extraído.
- 55 19. El aparato de la reivindicación 18, que comprende además un procesador configurado para controlar aplicando calor a una o más regiones seleccionadas del cartucho microfluídico en uno o más momentos seleccionados.
- 60 20. El aparato de la reivindicación 18, en donde la al menos una fuente de calor comprende al menos dos fuentes de calor de contacto, en donde las al menos dos fuentes de calor de contacto están configuradas para estar independientemente acopladas térmicamente a una región seleccionada diferente del cartucho microfluídico, en donde las diferentes regiones seleccionadas se calientan independientemente.
21. El aparato de la reivindicación 20, en donde al menos una fuente de calor se selecciona entre un elemento de calor resistivo, un radiador, un intercambiador de calor fluídico, y un dispositivo Peltier.
22. El aparato de la reivindicación 20, en donde al menos una fuente de calor es un a elemento de calor resistivo.
23. El aparato de la reivindicación 22, en donde las al menos dos fuentes de calor de contacto están configuradas para estar en contacto físico directo con diferentes regiones seleccionadas del cartucho microfluídico cuando el cartucho microfluídico se recibe en el compartimento de cartucho.
24. El aparato de la reivindicación 22, en donde al menos una de las regiones seleccionadas del cartucho tiene un área de contacto con una de las al menos dos fuentes de calor de contacto de entre alrededor de  $1 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $225 \text{ mm}^2$ .
25. El aparato de la reivindicación 24, en donde el área comprende entre alrededor de  $1 \text{ mm}^2$  y alrededor de  $100 \text{ mm}^2$ .

26. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el segundo módulo está configurado para amplificar los ácidos nucleicos mediante un método seleccionado entre el grupo formado por: PCR; TMA; SDA; NASBA; LCR; y amplificaciones en ciclo rodante.
- 5 27. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el uno o más compartimentos de cartucho (992) comprende además un elemento de registro complementario del cartucho microfluídico (994), en donde el uno o más compartimentos de cartucho reciben respectivamente un cartucho microfluídico en una sola orientación.
- 10 28. El aparato (971) de la reivindicación 1, que comprende además un sensor configurado para detectar si el cartucho microfluídico (994) se ha colocado correctamente en el compartimento de cartucho (992).
29. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el aparato es portátil o puede colocarse en una mesa de trabajo de laboratorio.
- 15 30. El aparato (971) de la reivindicación 1, en donde el aparato está integrado en una sola carcasa (985).

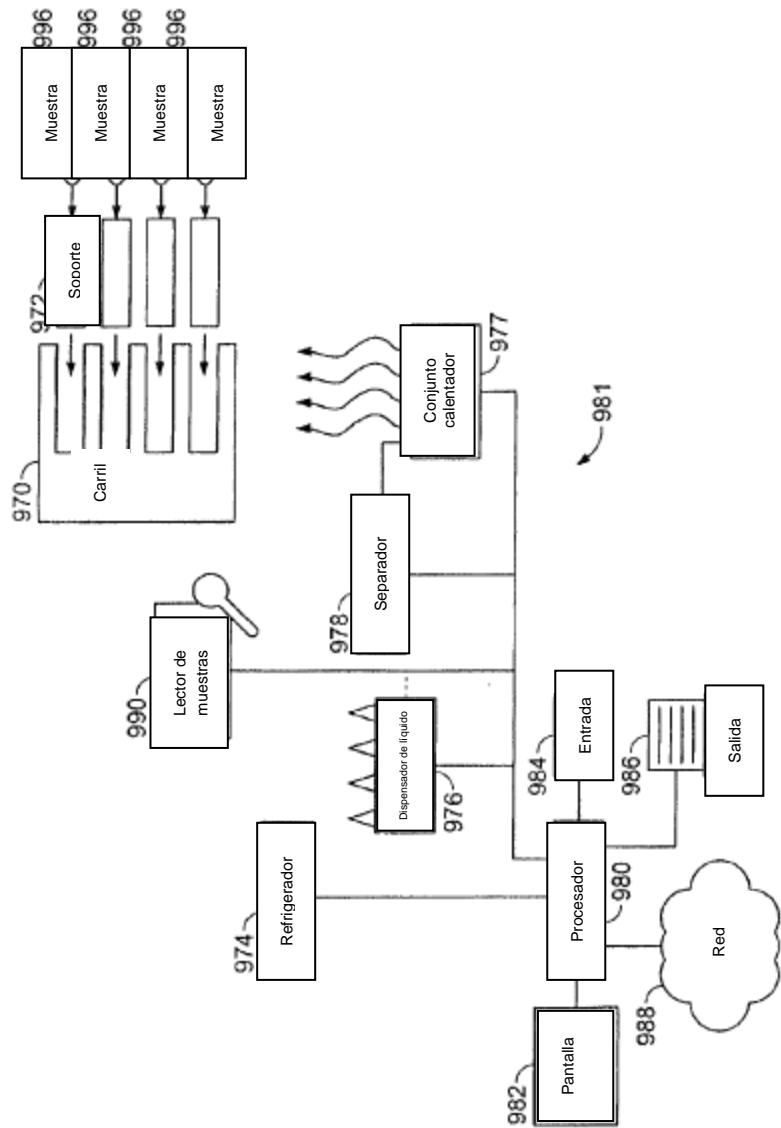


FIG. 1A

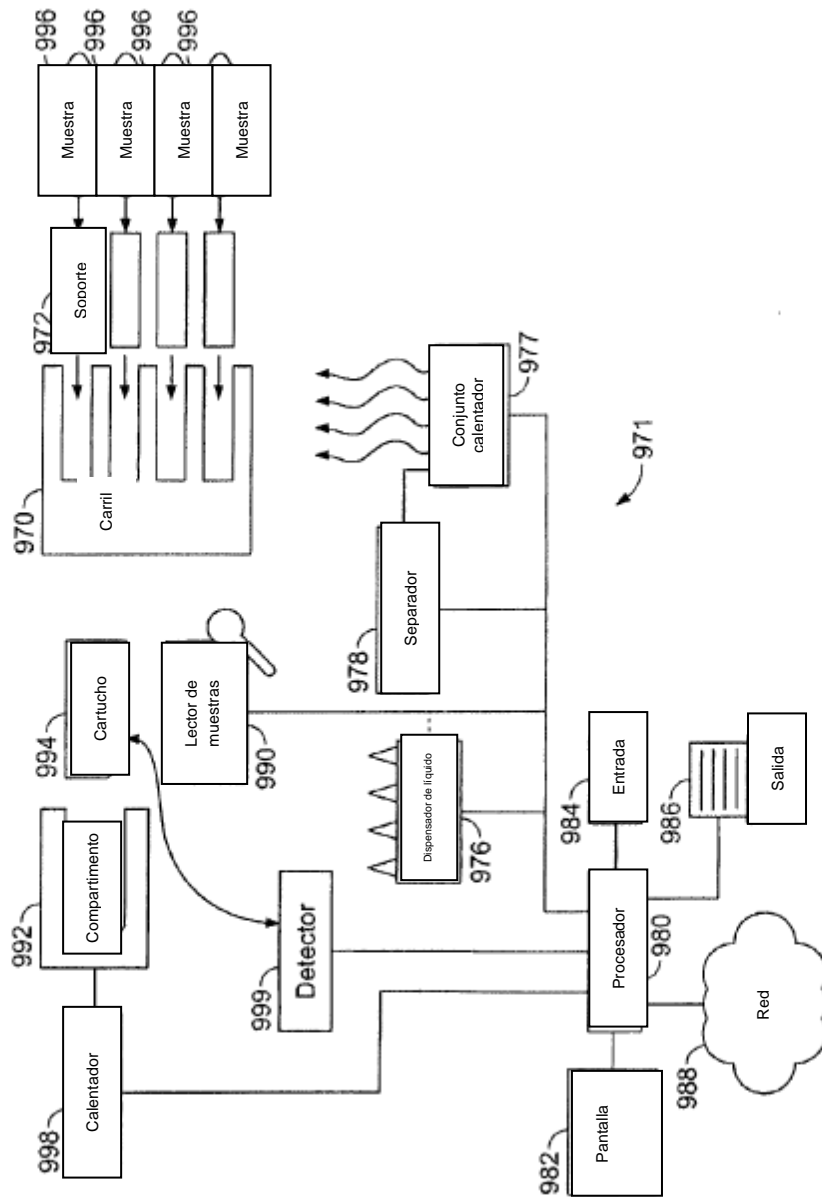


FIG. 1B

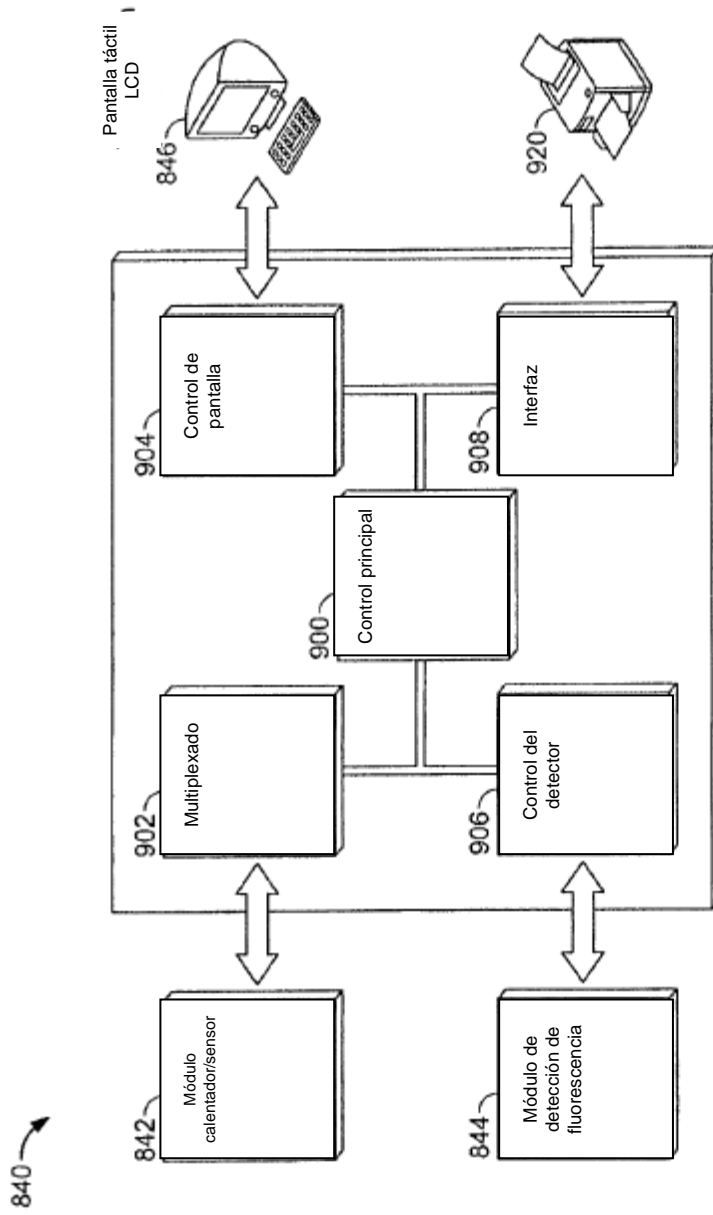


FIG. 2

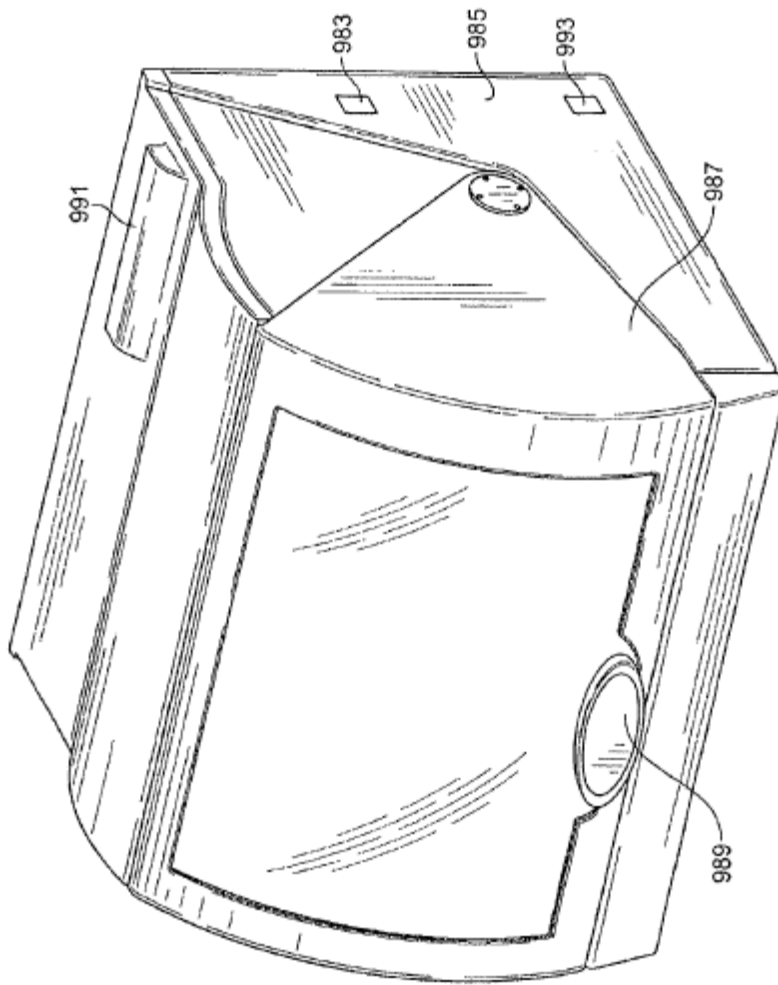


FIG. 3A

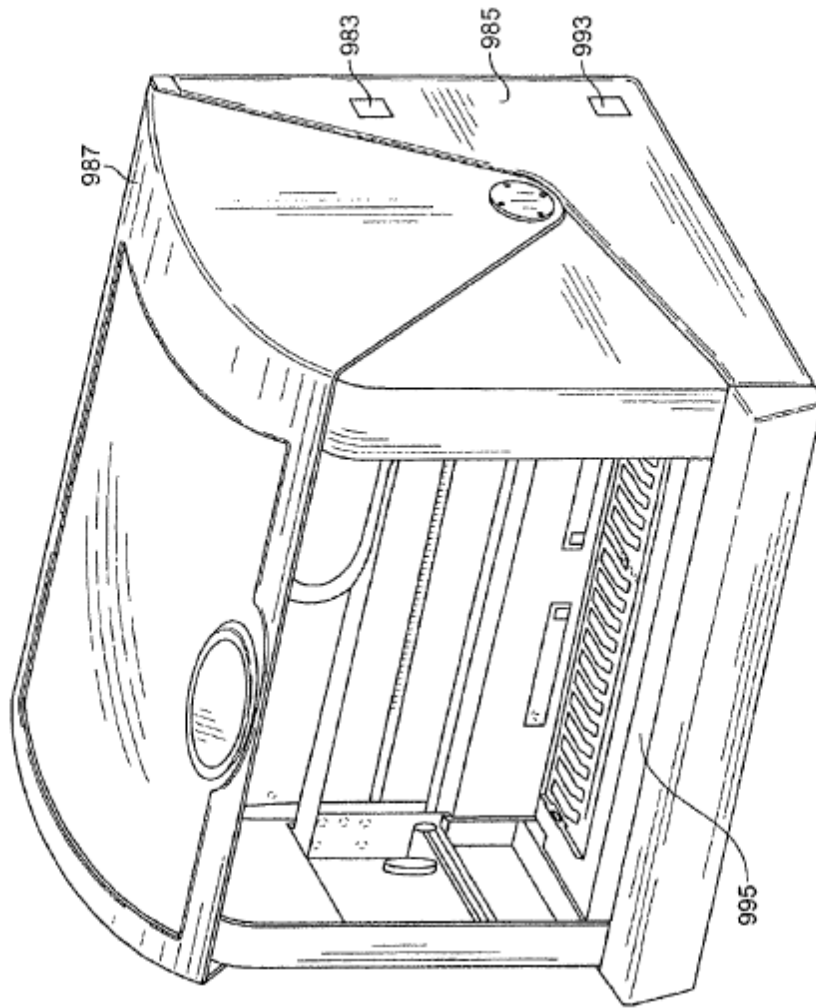


FIG. 3B

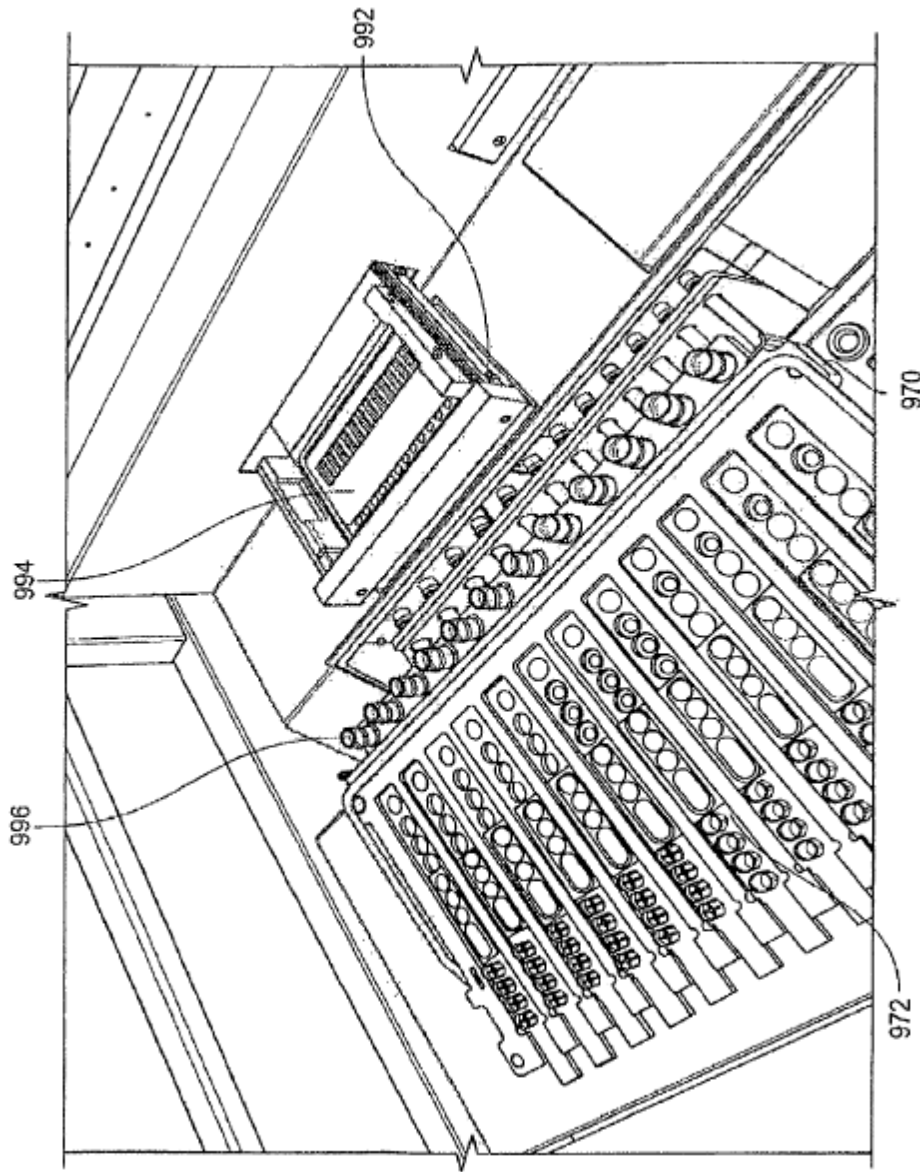


FIG. 4



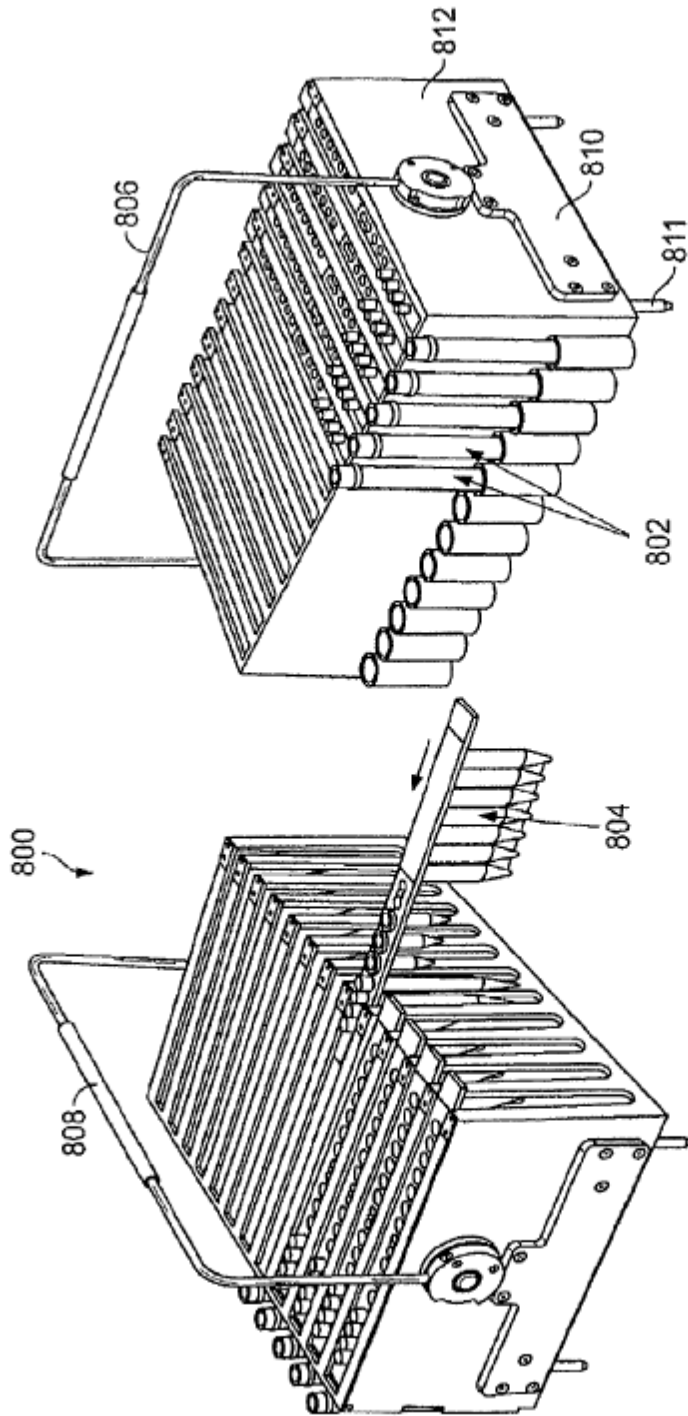


FIG. 5

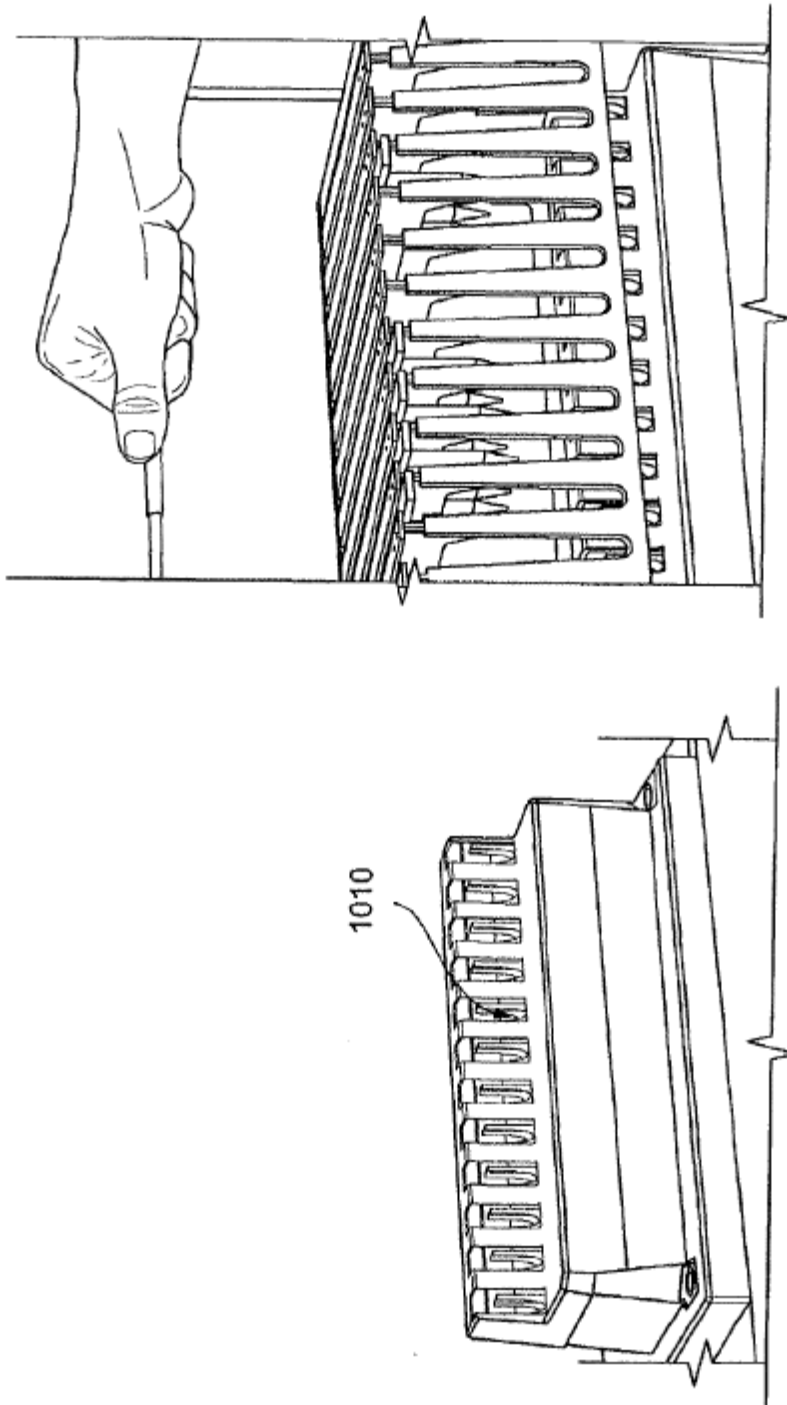


FIG. 6

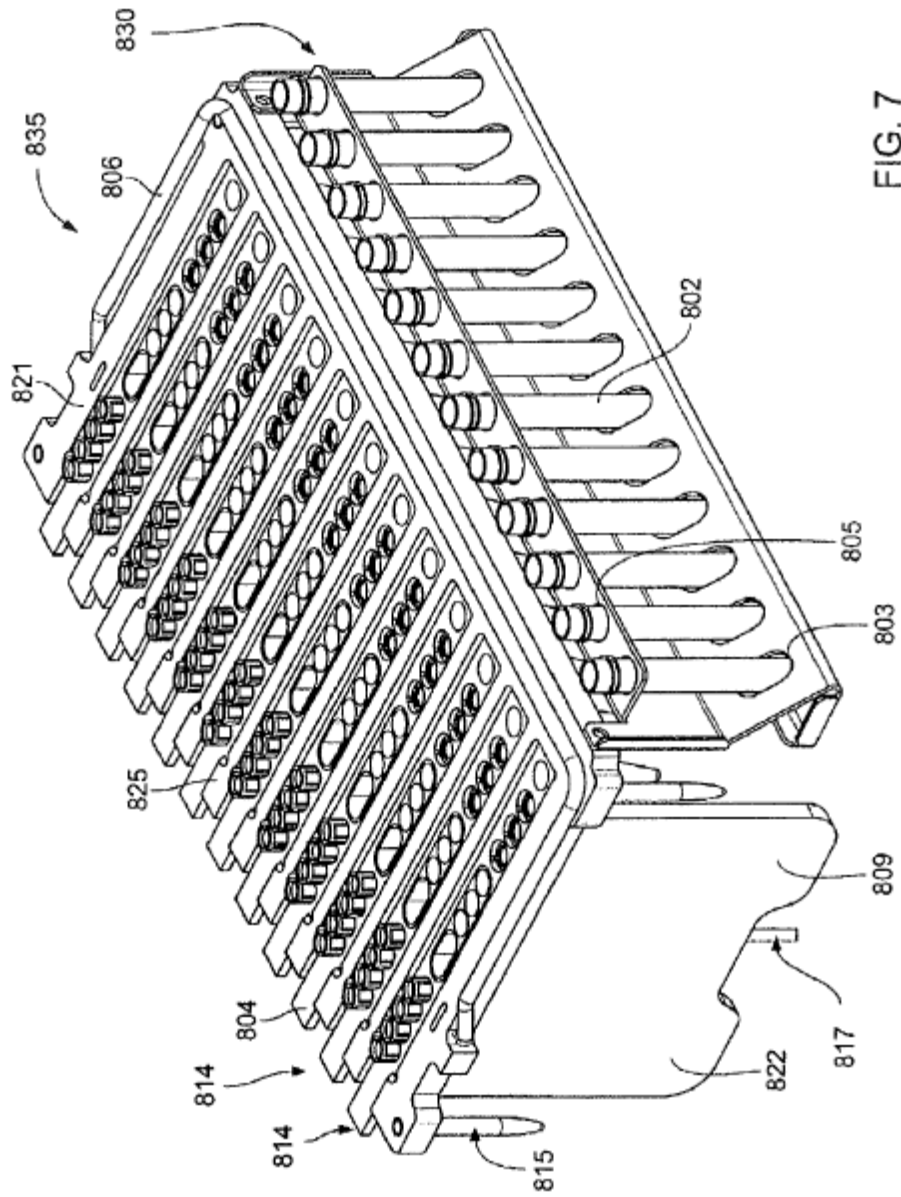


FIG. 7

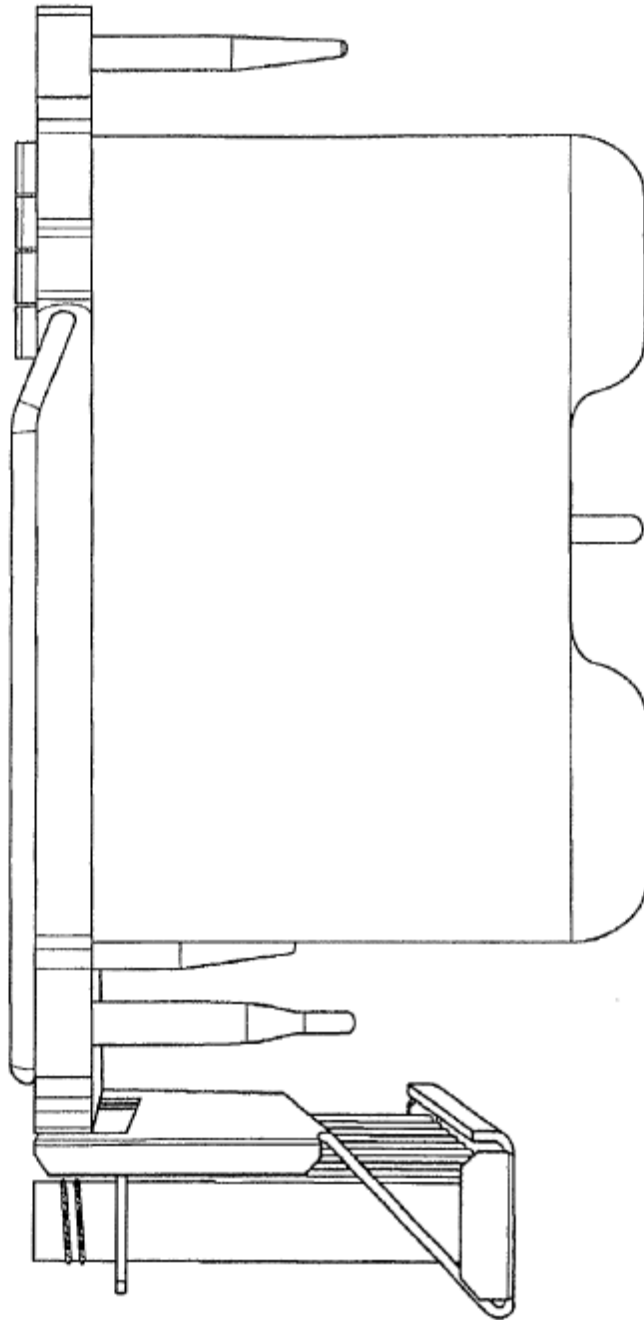


FIG. 8A

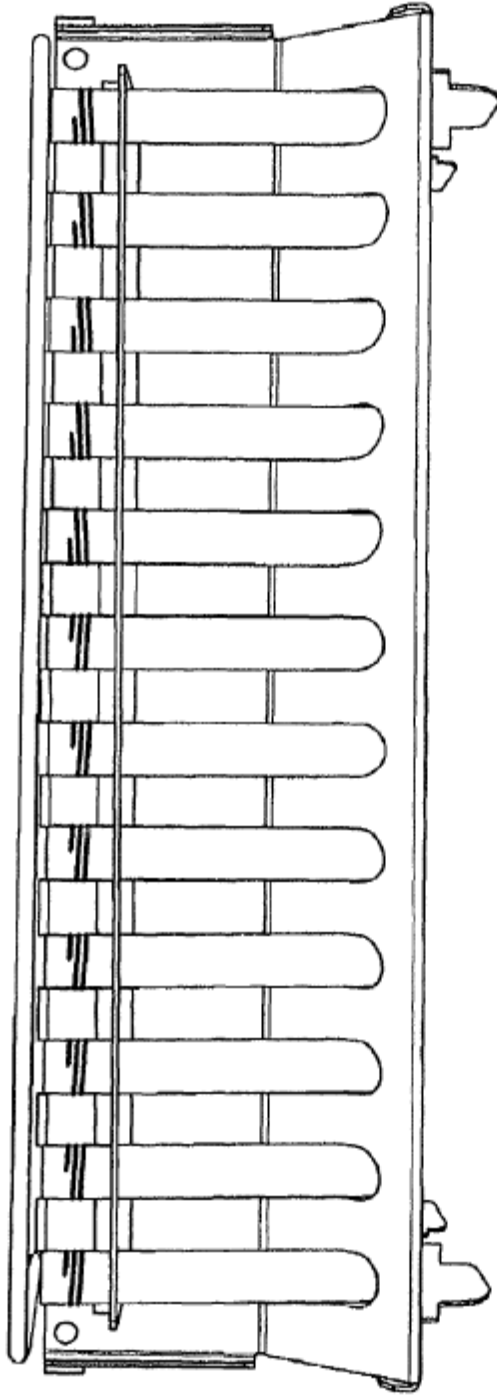


FIG. 8B

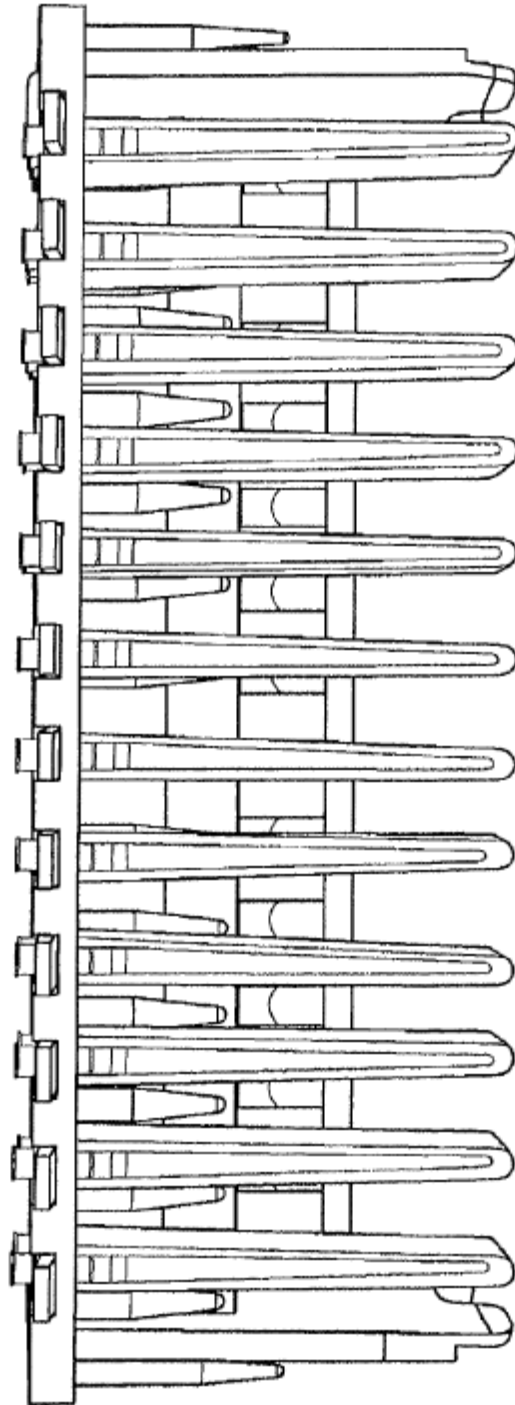


FIG. 8C

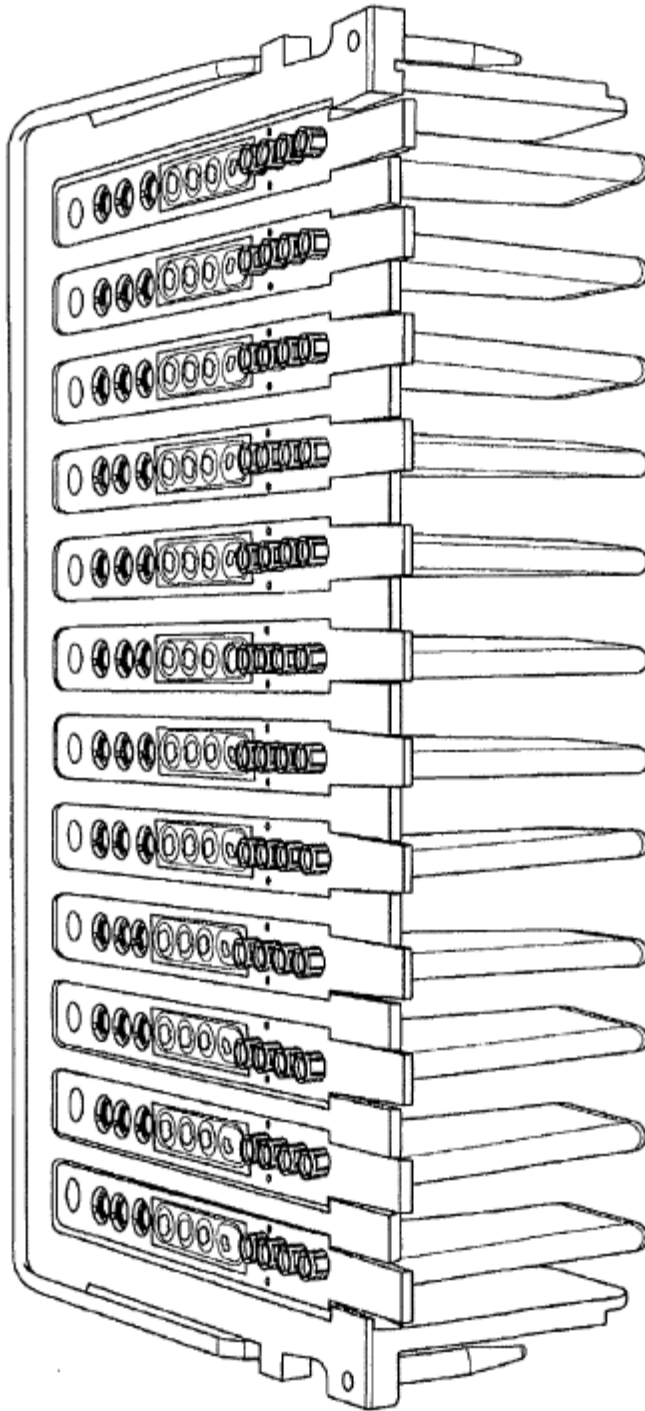


FIG. 8D

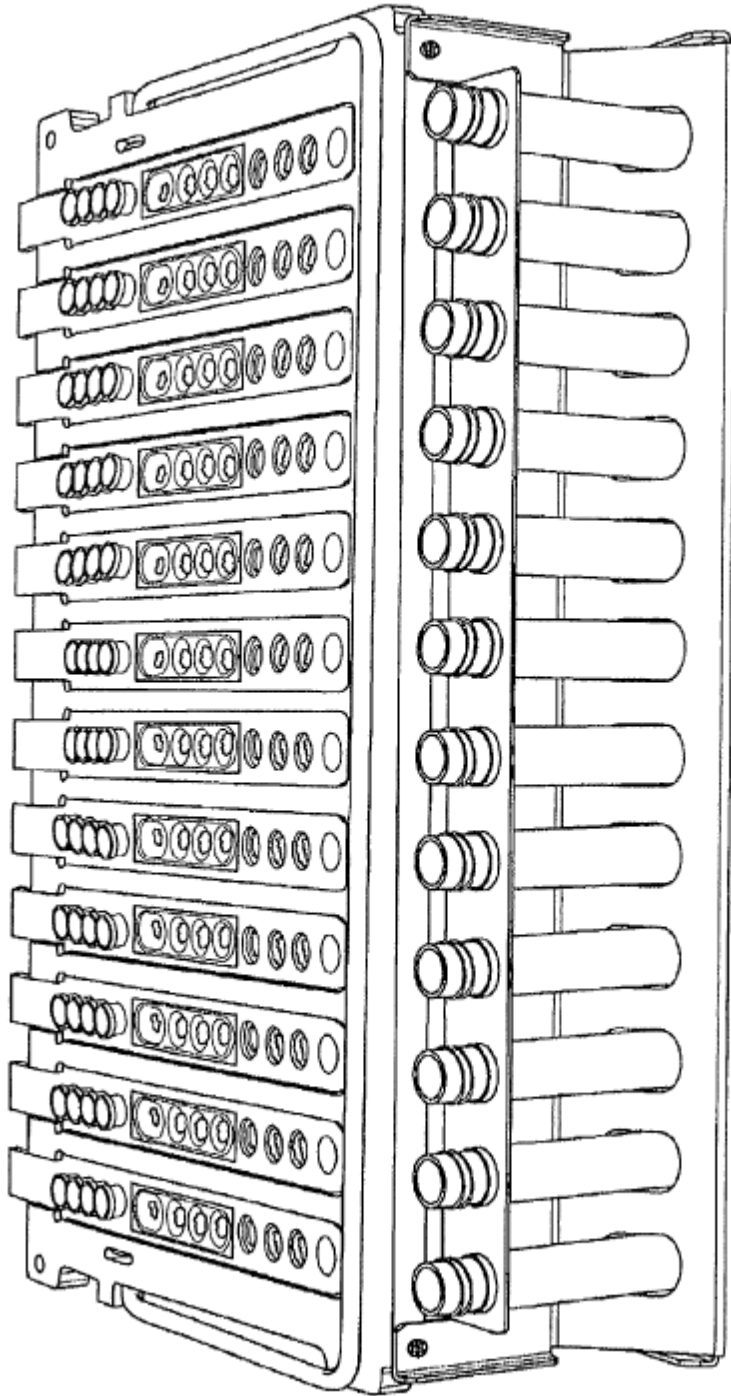


FIG. 8E



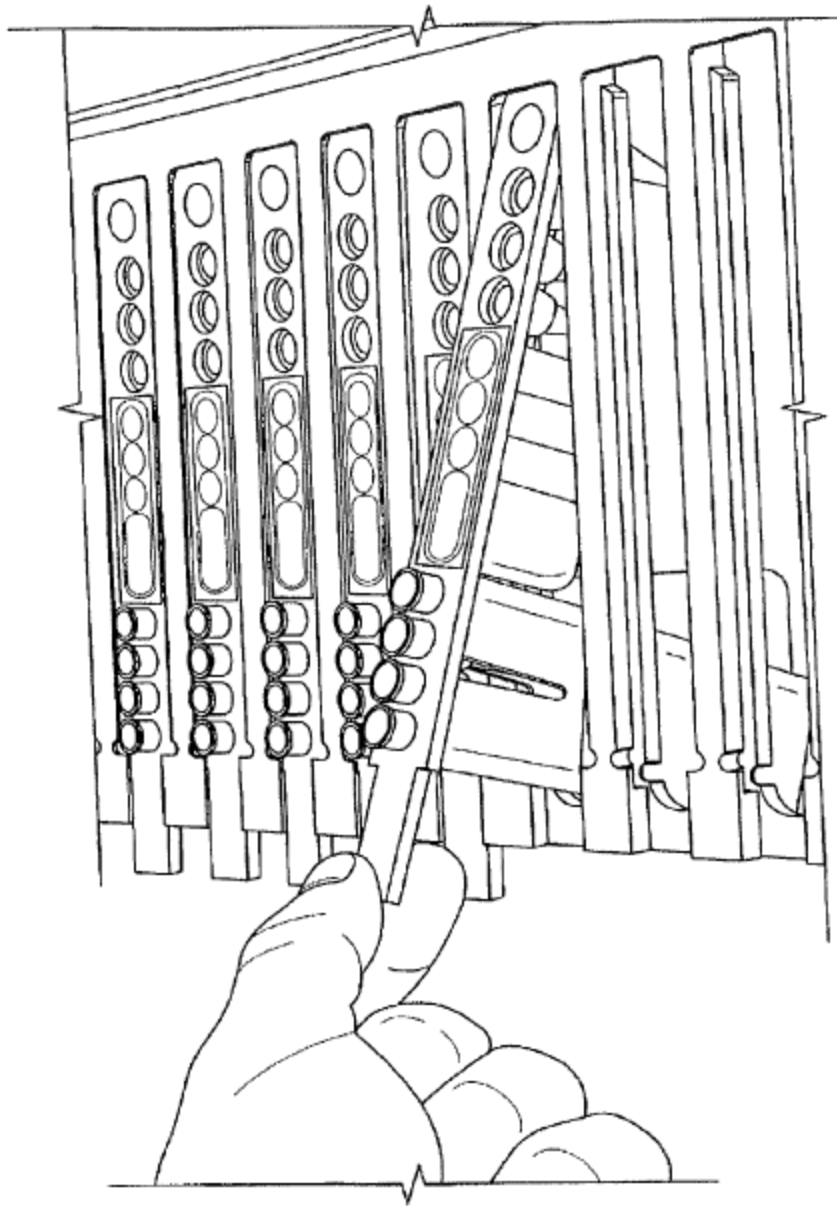


FIG. 8F

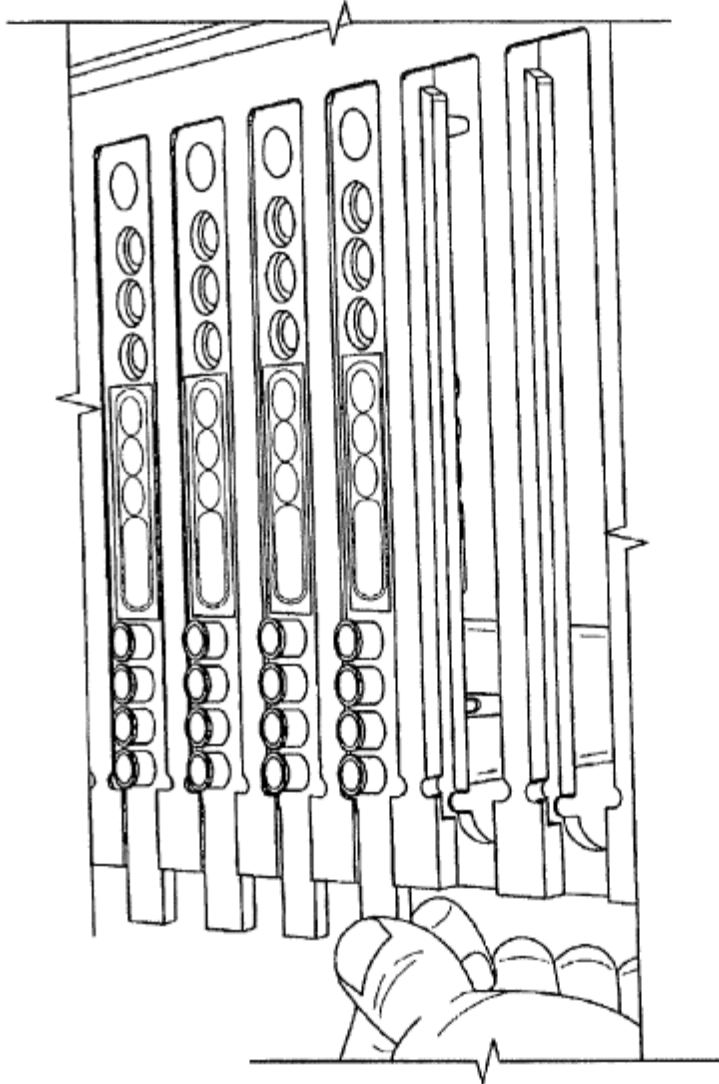


FIG. 8G

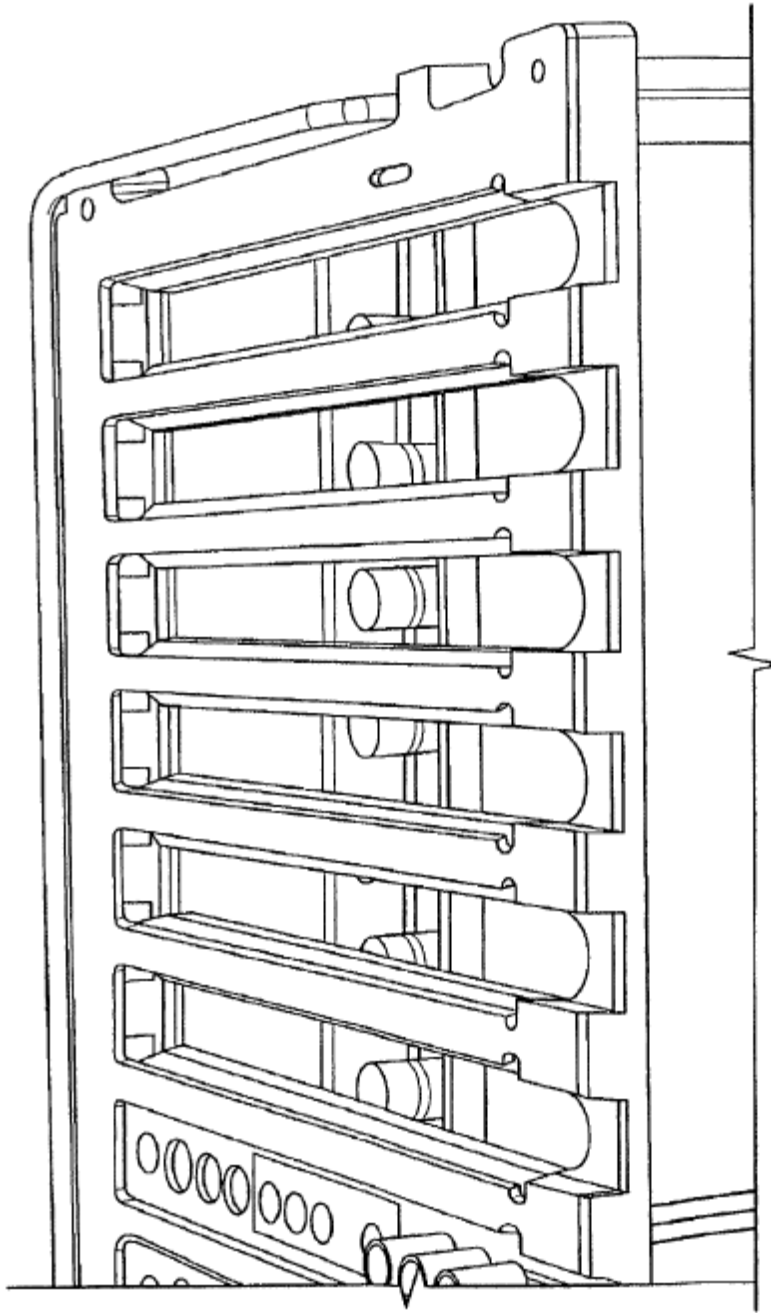


FIG. 8H

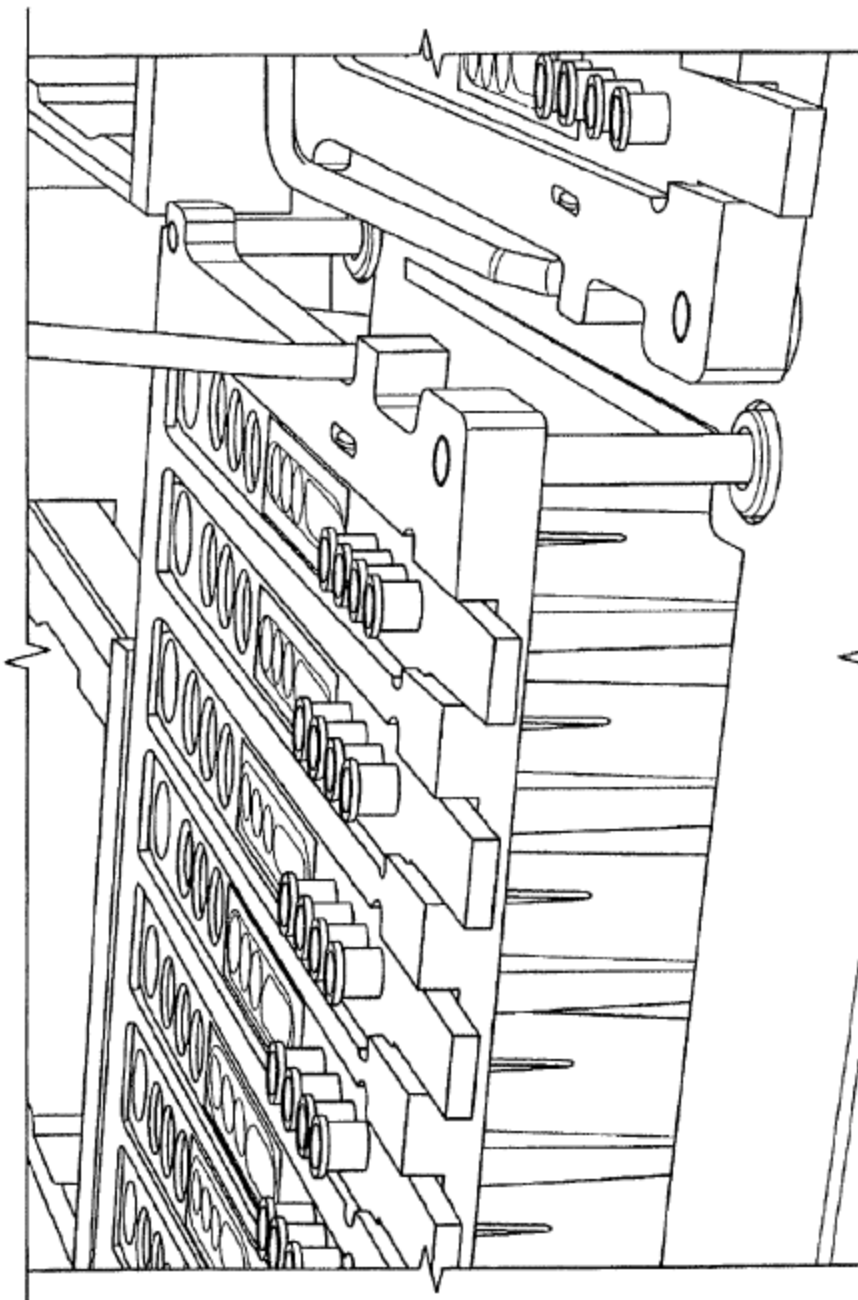


FIG. 8I



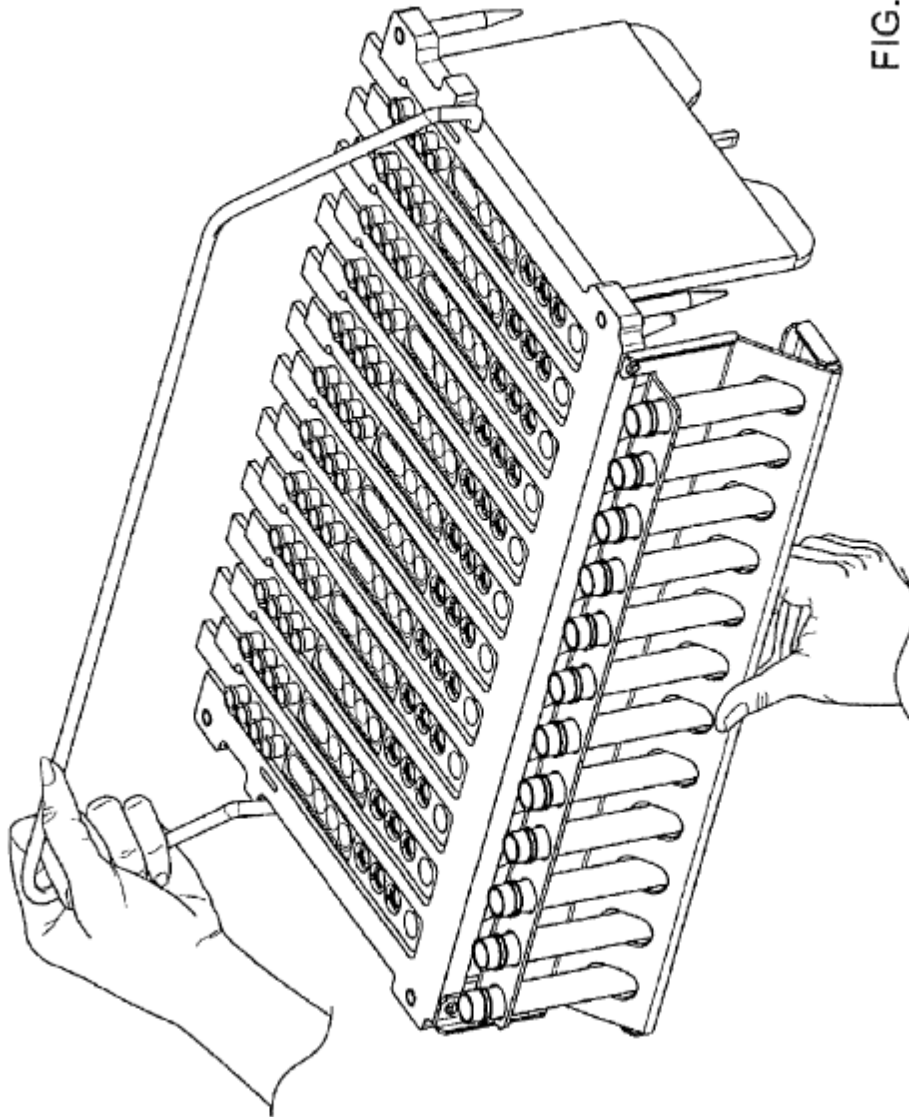


FIG. 8K

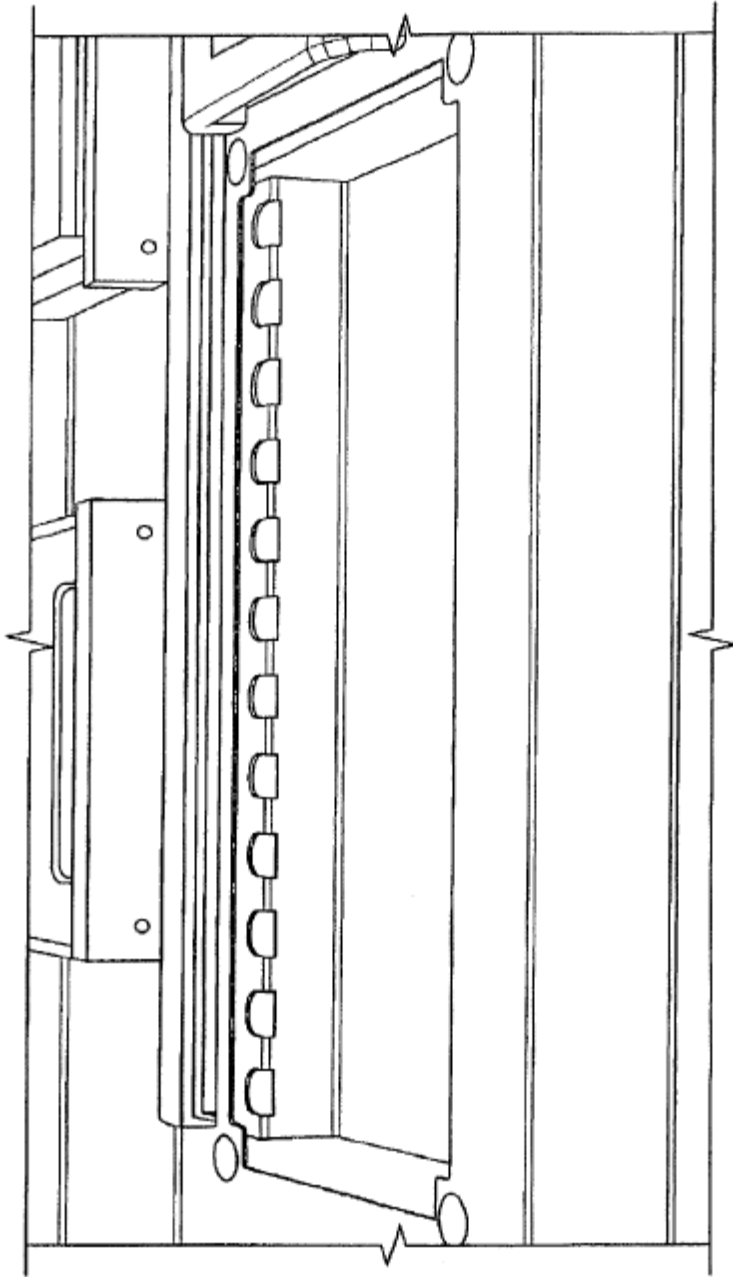


FIG. 9

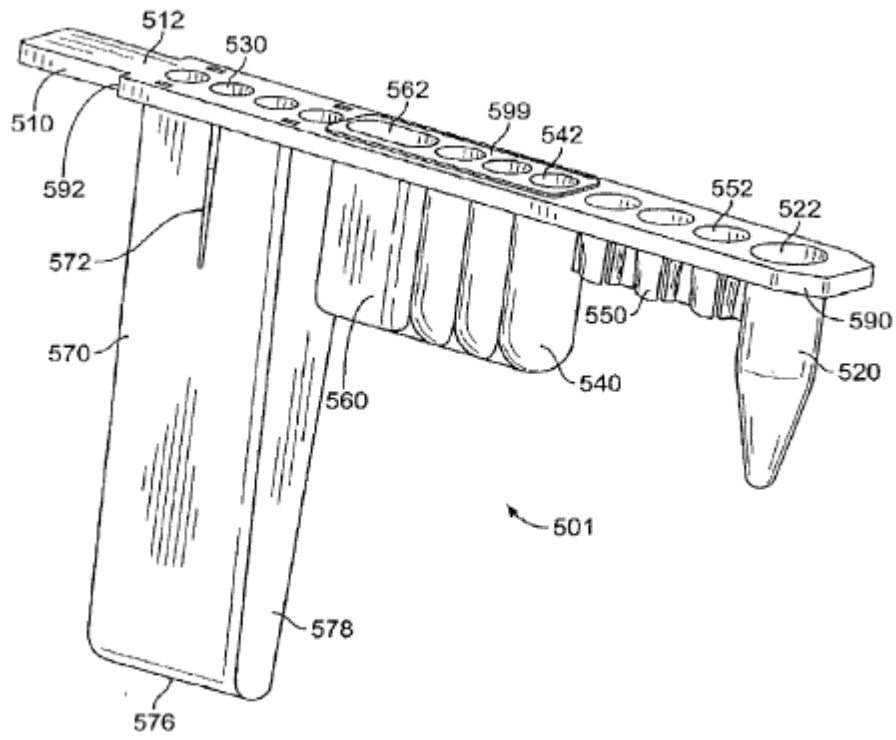


FIG. 10A



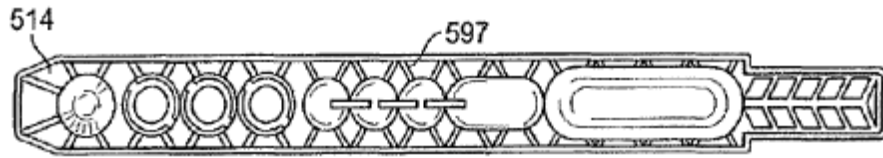


FIG. 10B

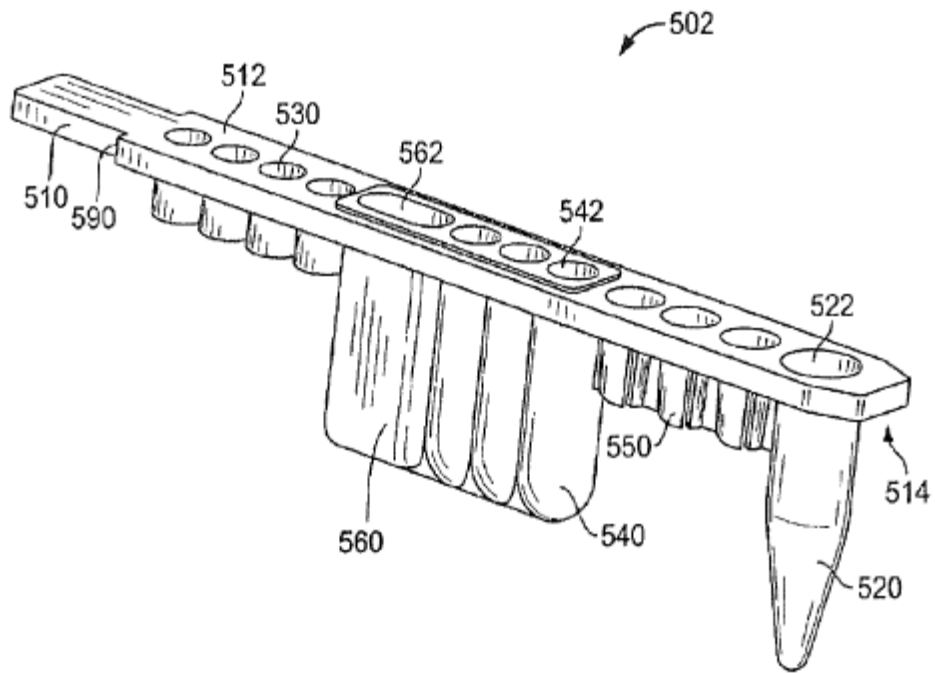


FIG. 11

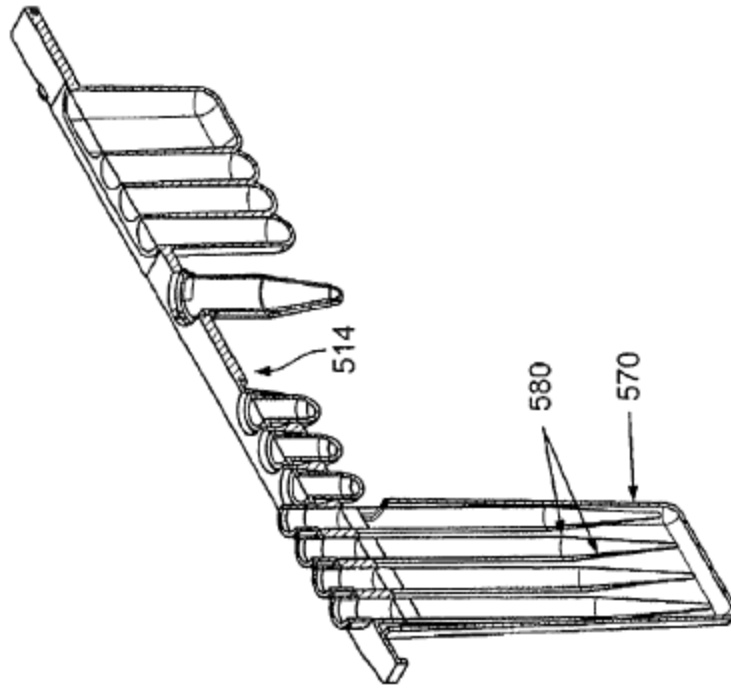


FIG. 12B

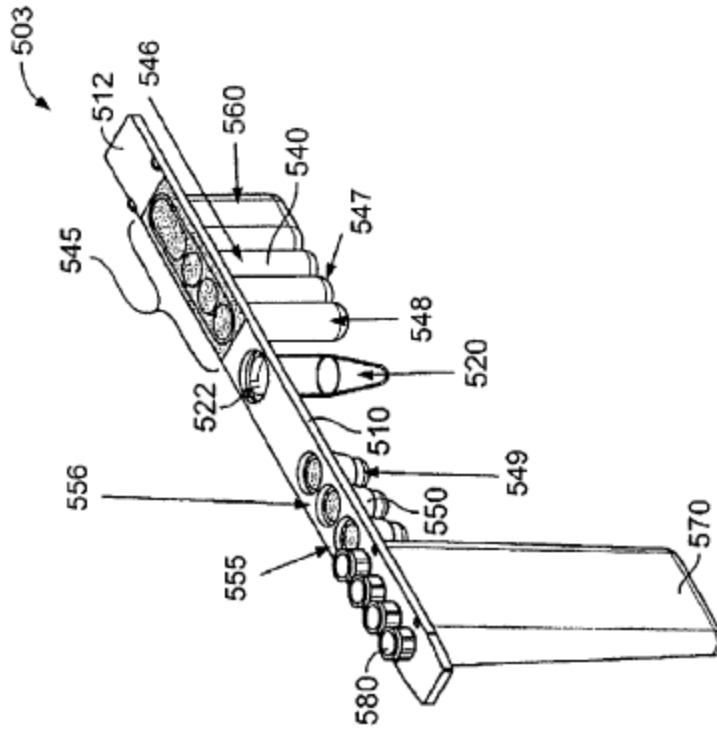


FIG. 12A

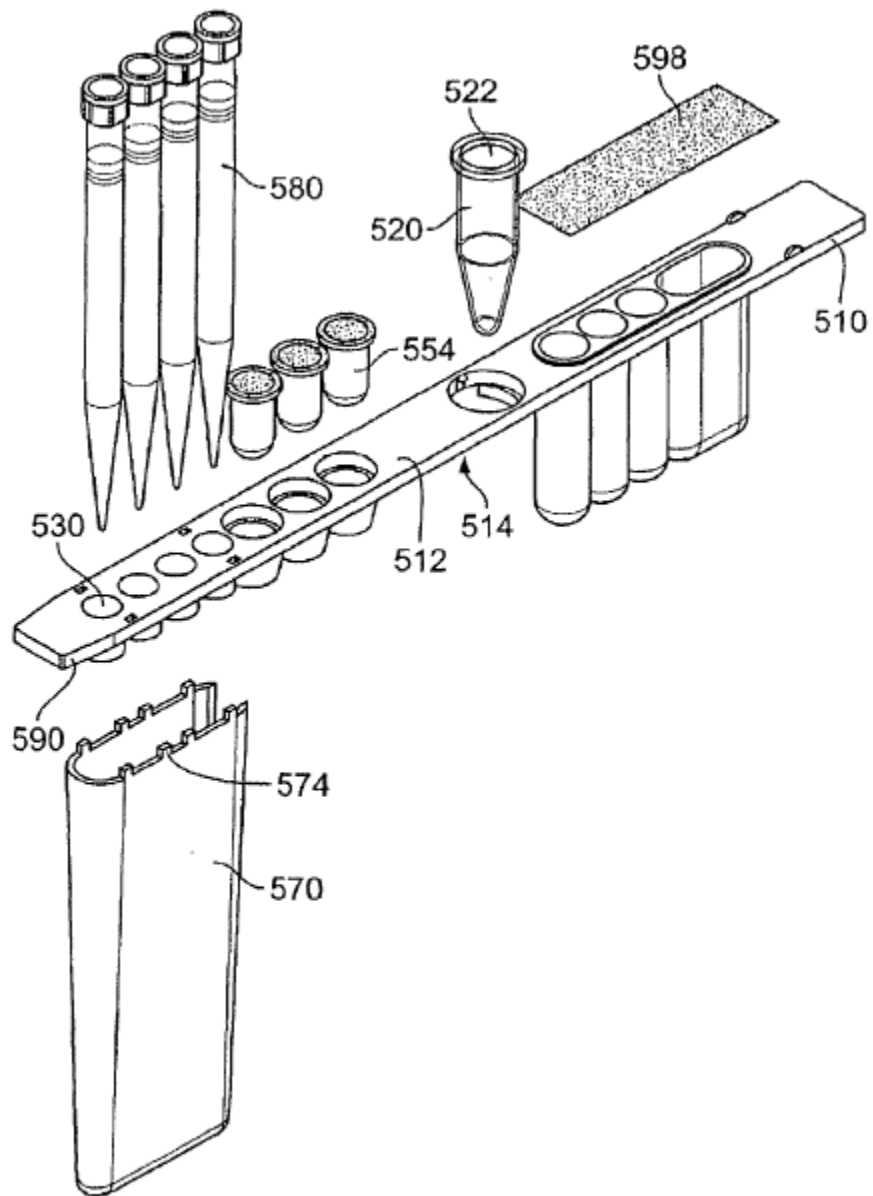


FIG. 12C

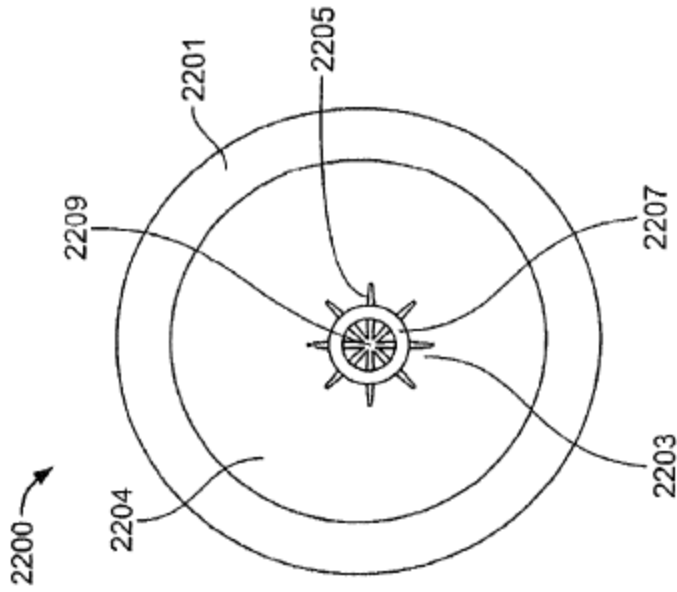


FIG. 13B

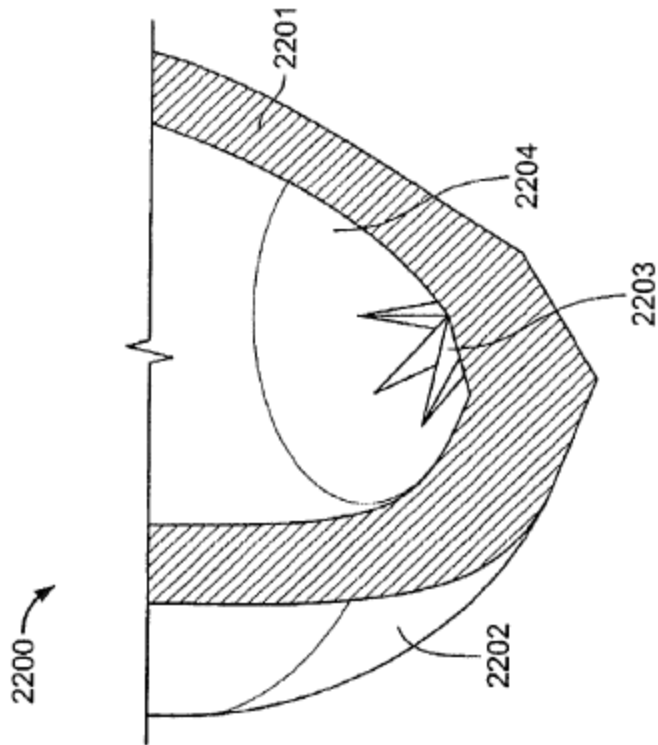


FIG. 13A

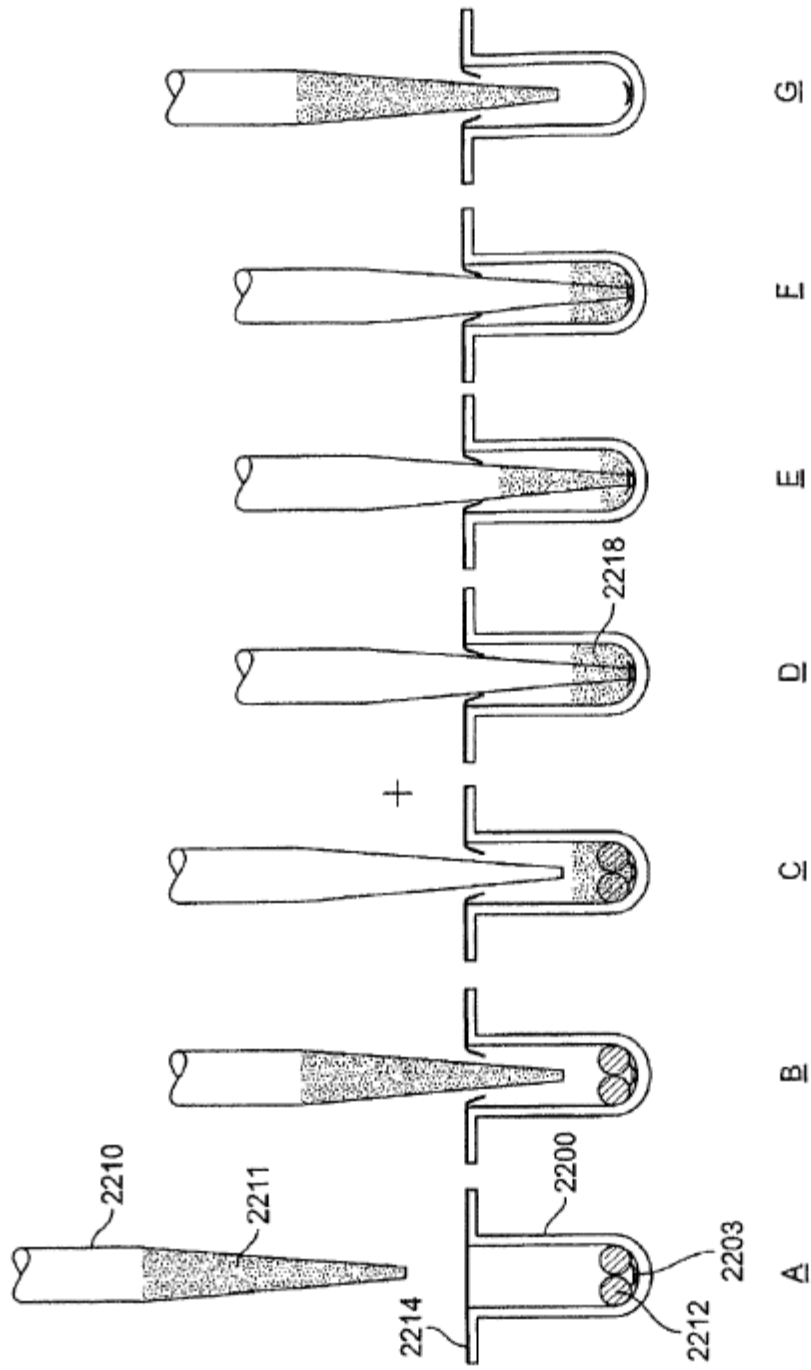


FIG. 14

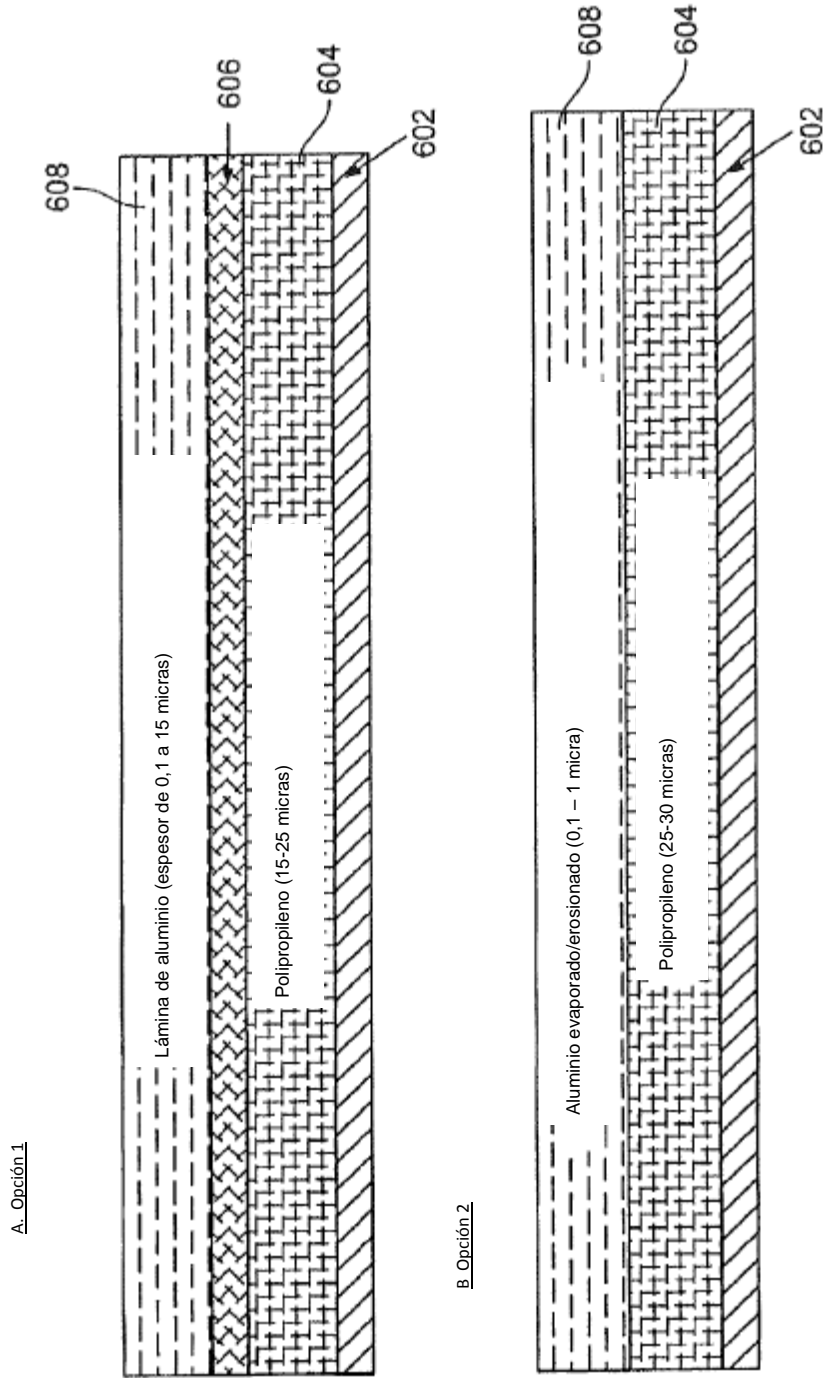


FIG. 15

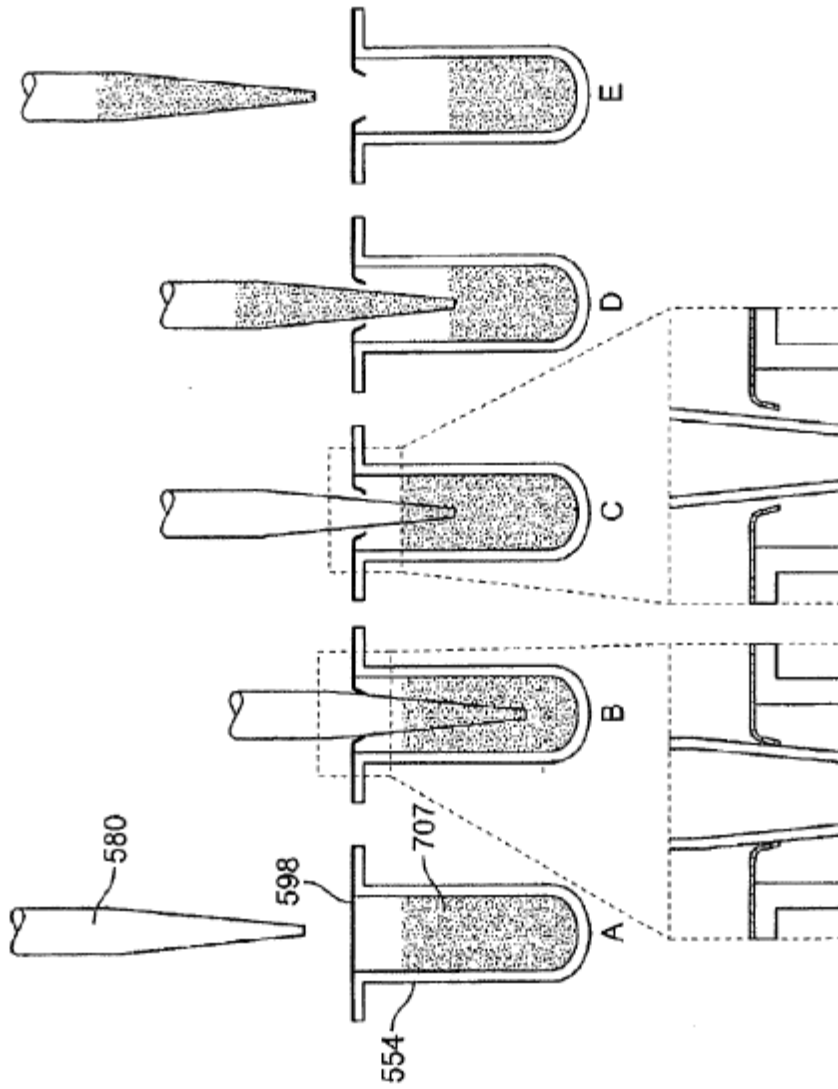


FIG. 16



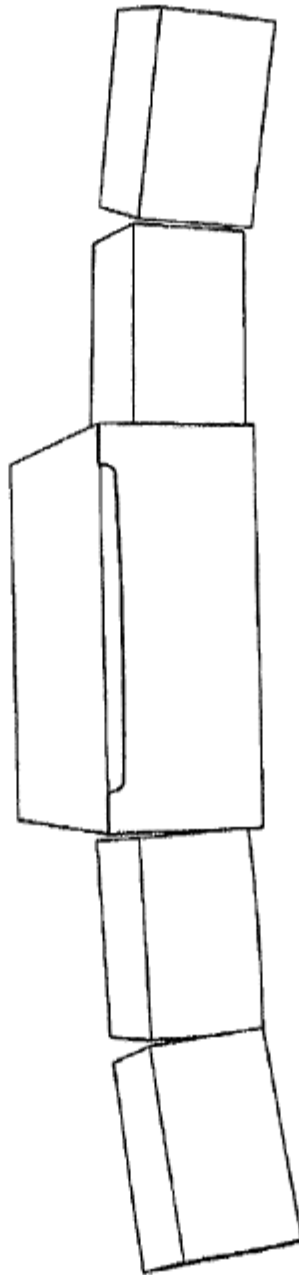


FIG. 17A

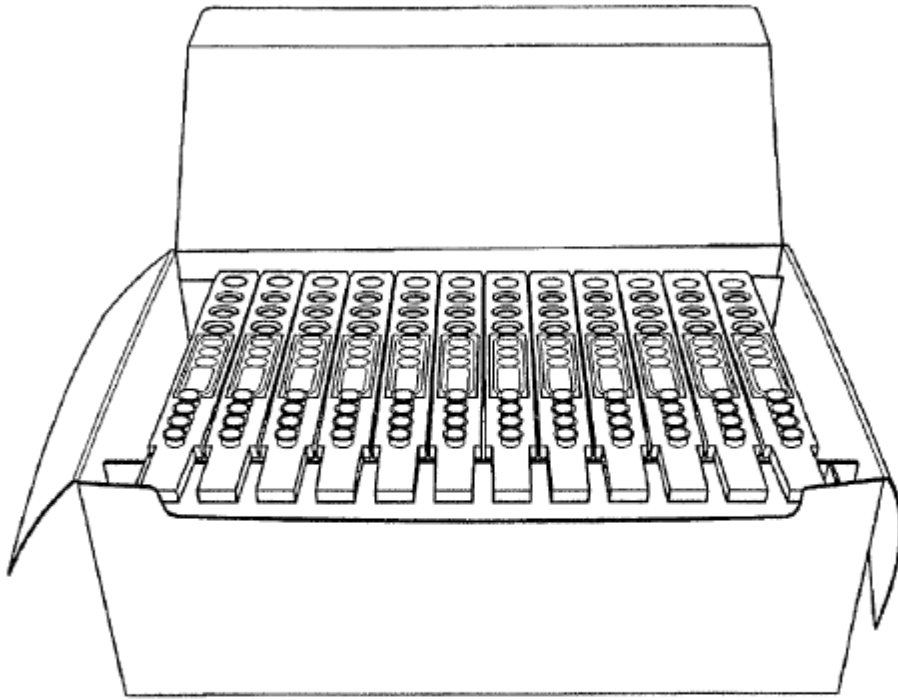


FIG. 17B

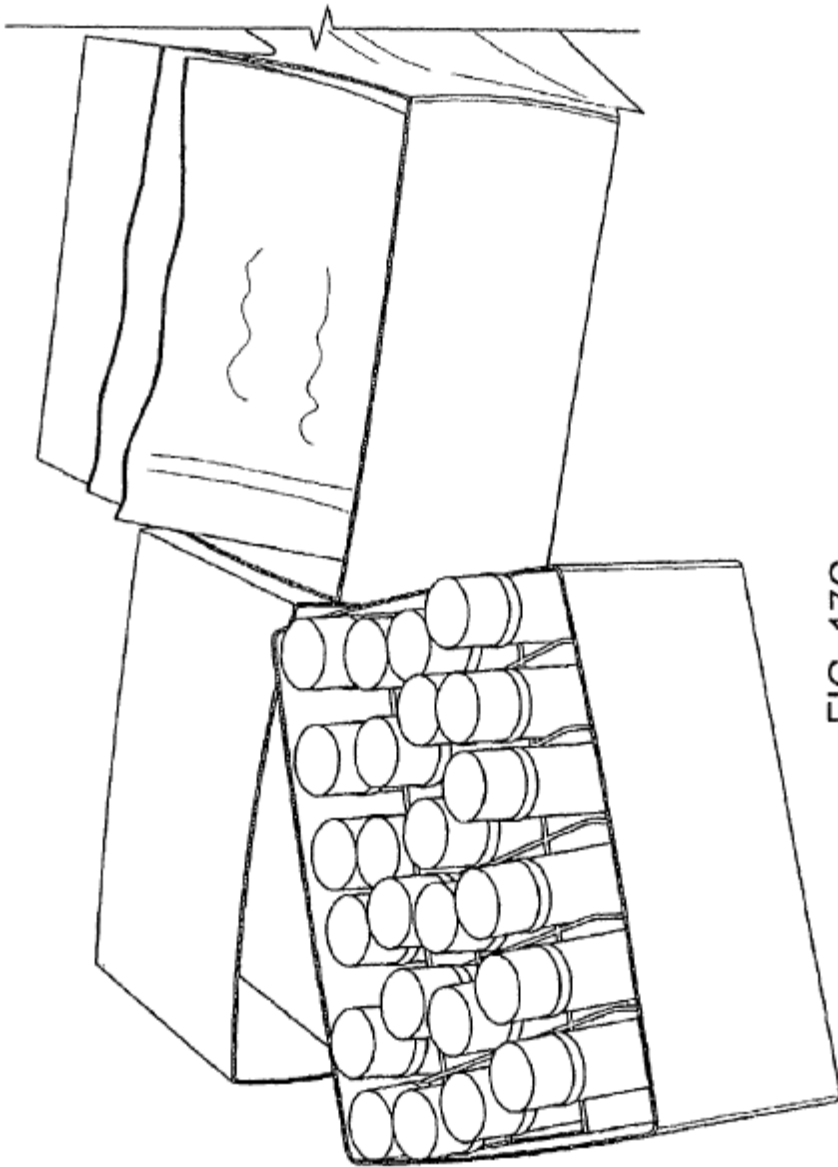


FIG. 17C

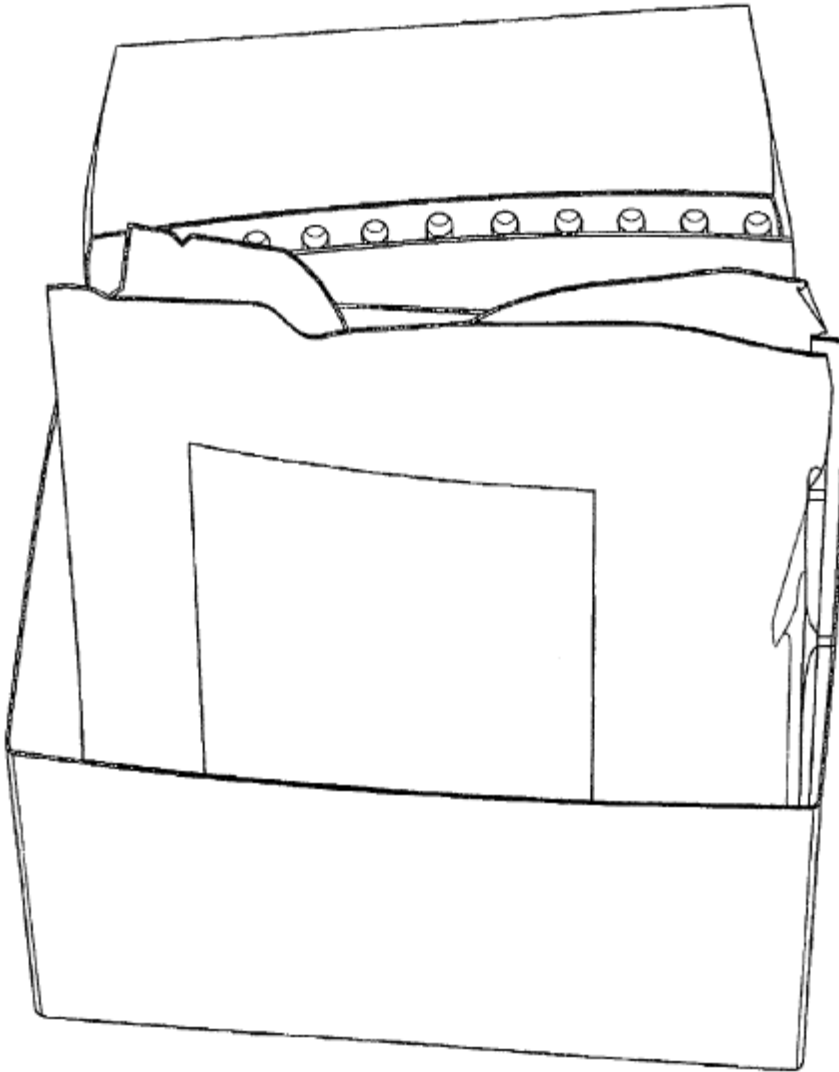
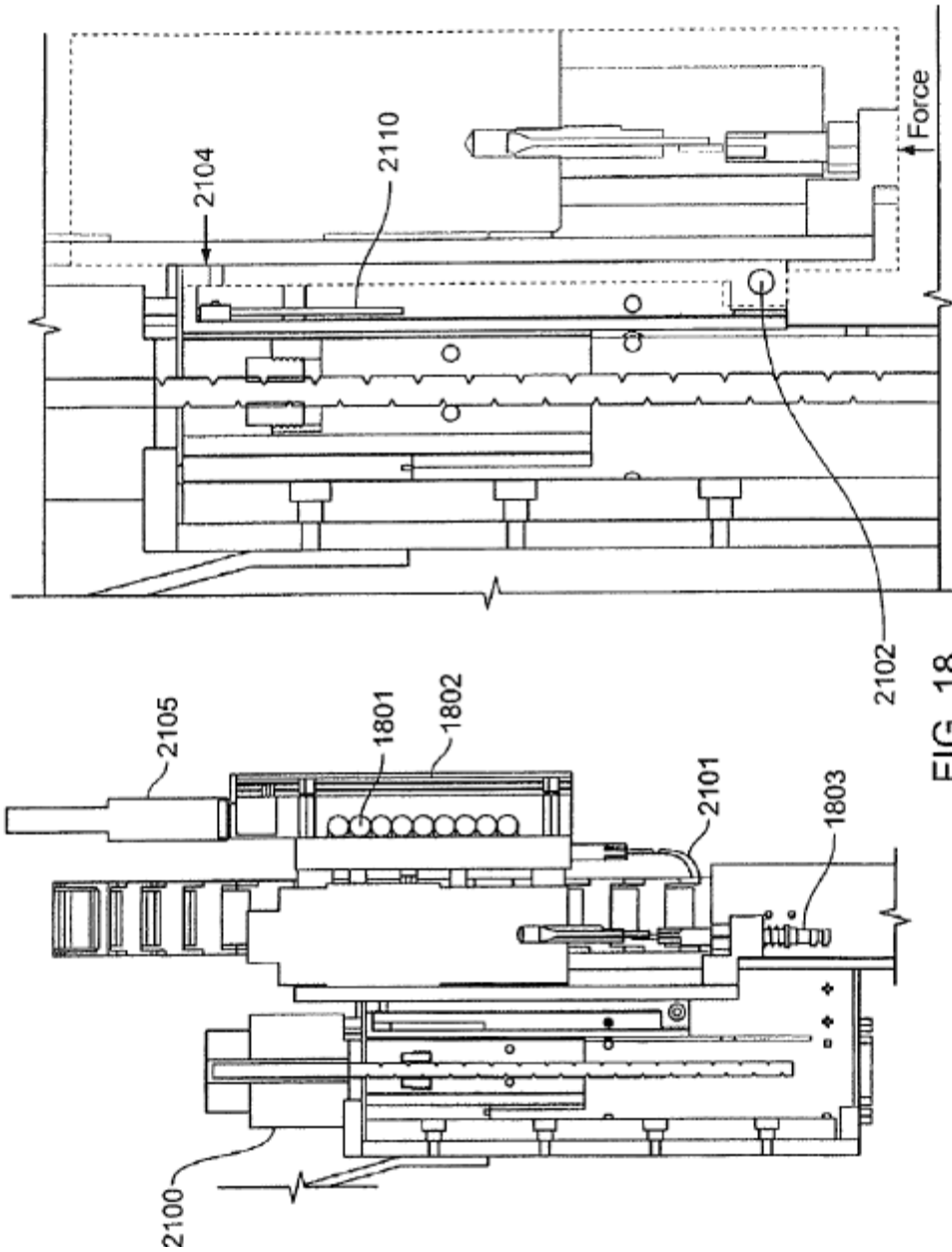


FIG. 17D



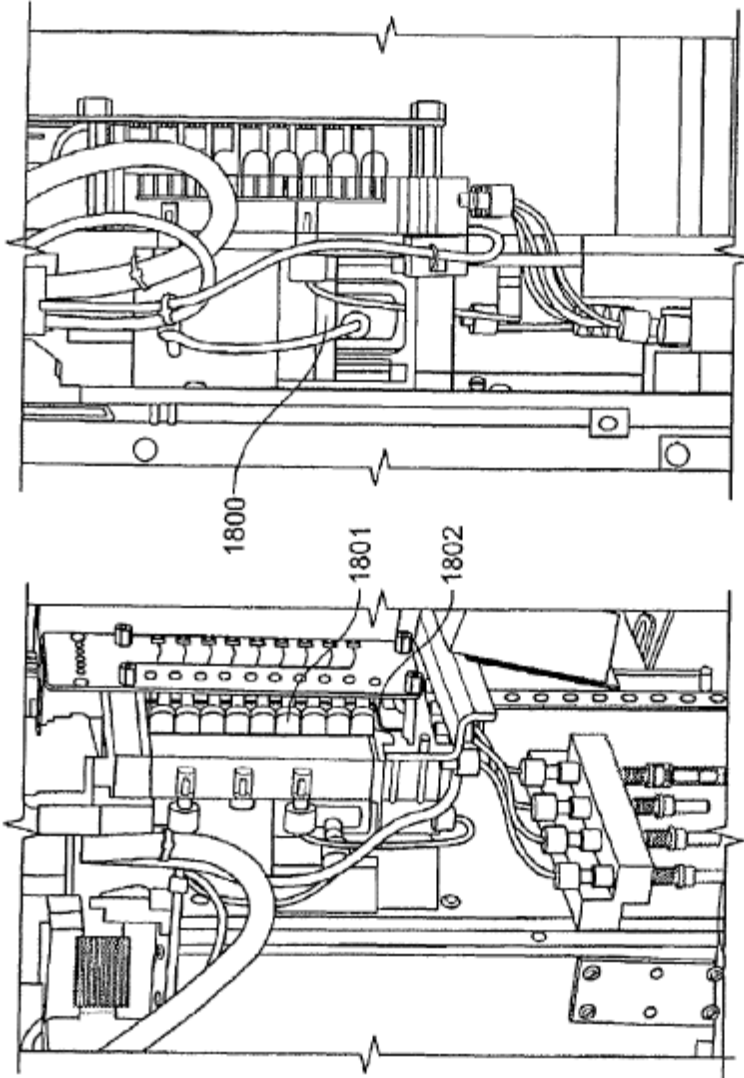


FIG. 19B

FIG. 19A

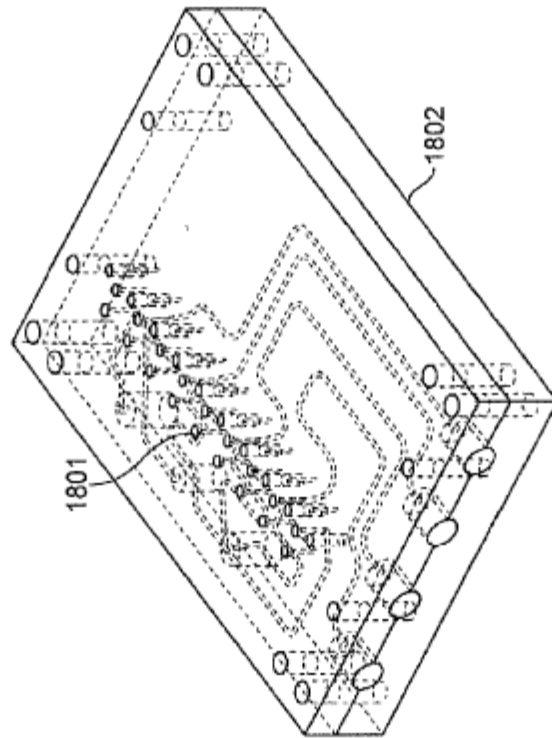


FIG. 20

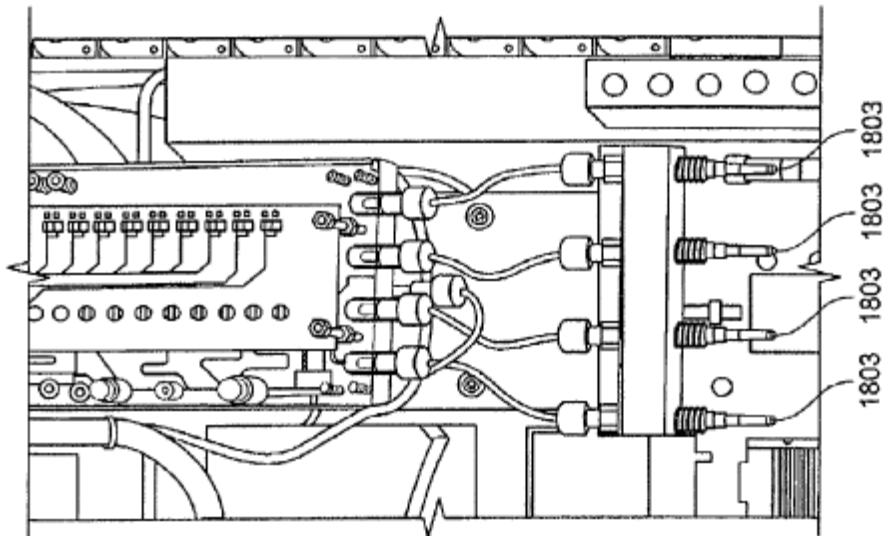


FIG. 19C

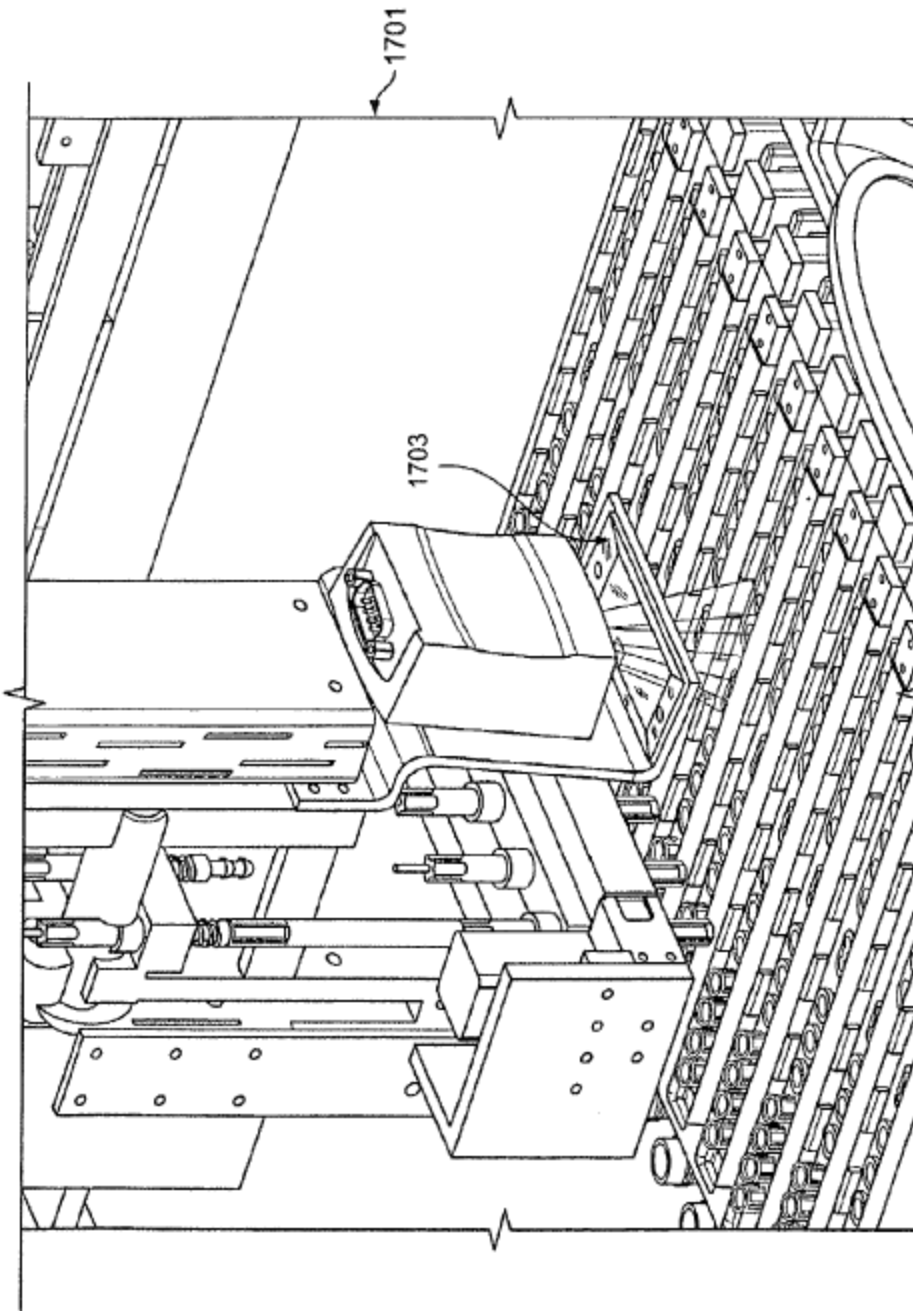


FIG. 21



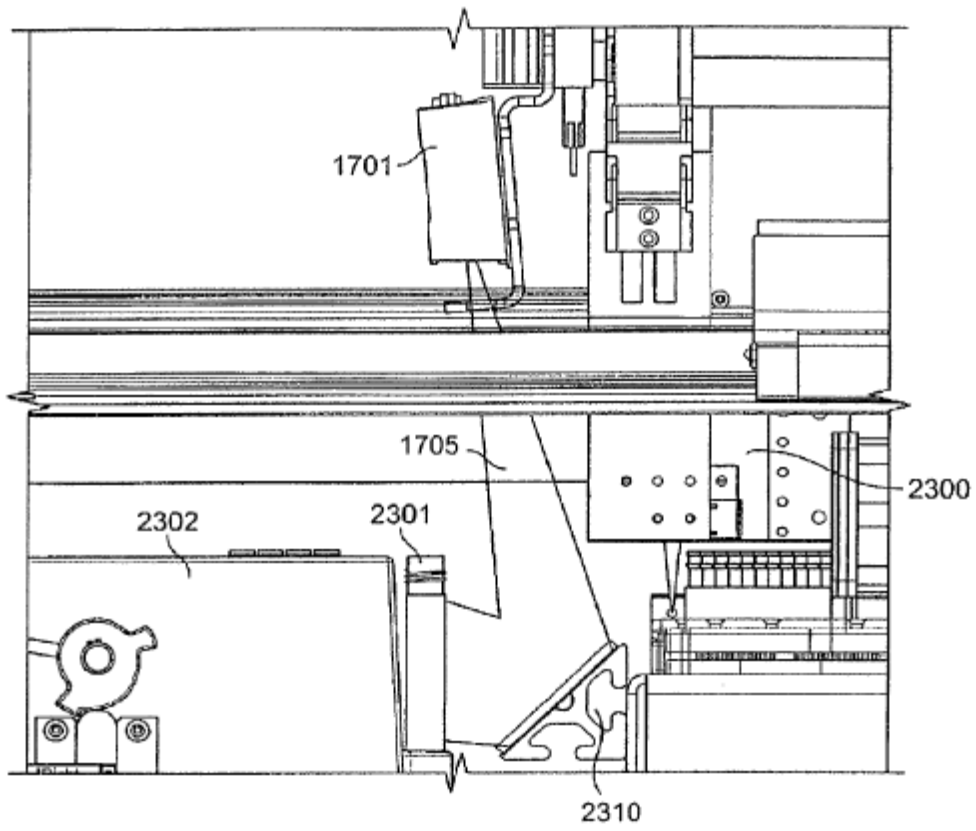


FIG. 22

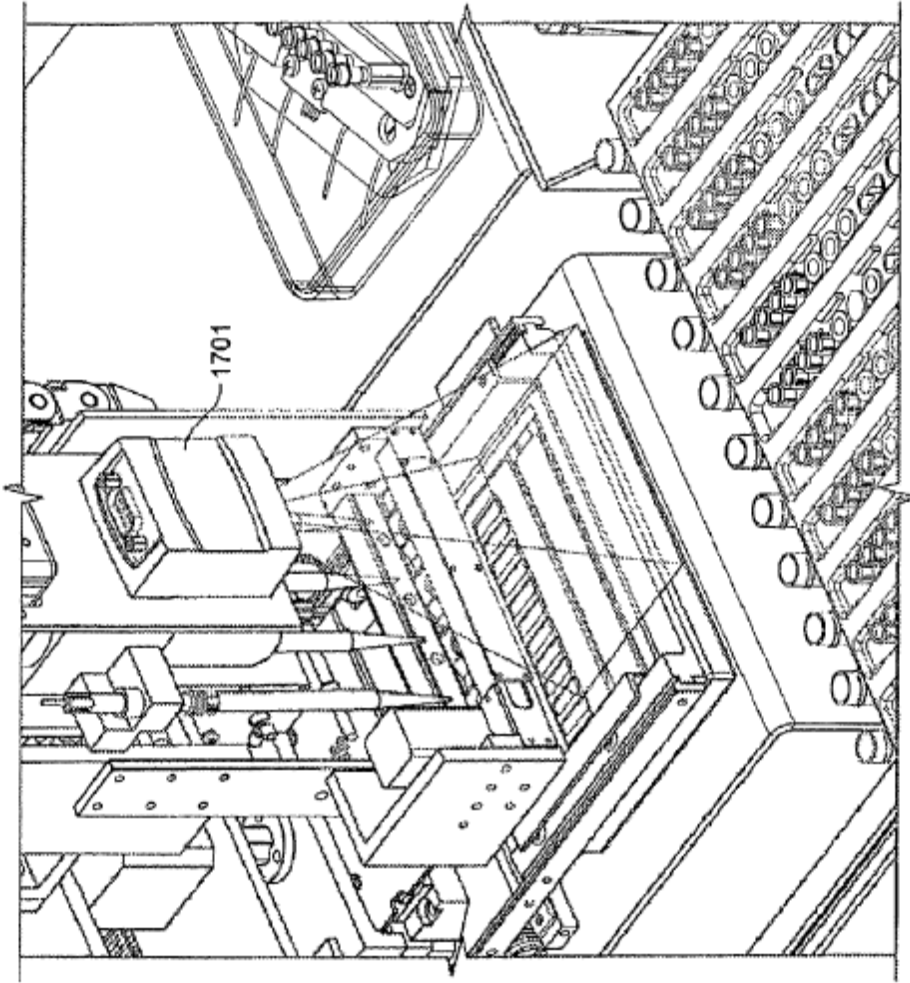


FIG. 23

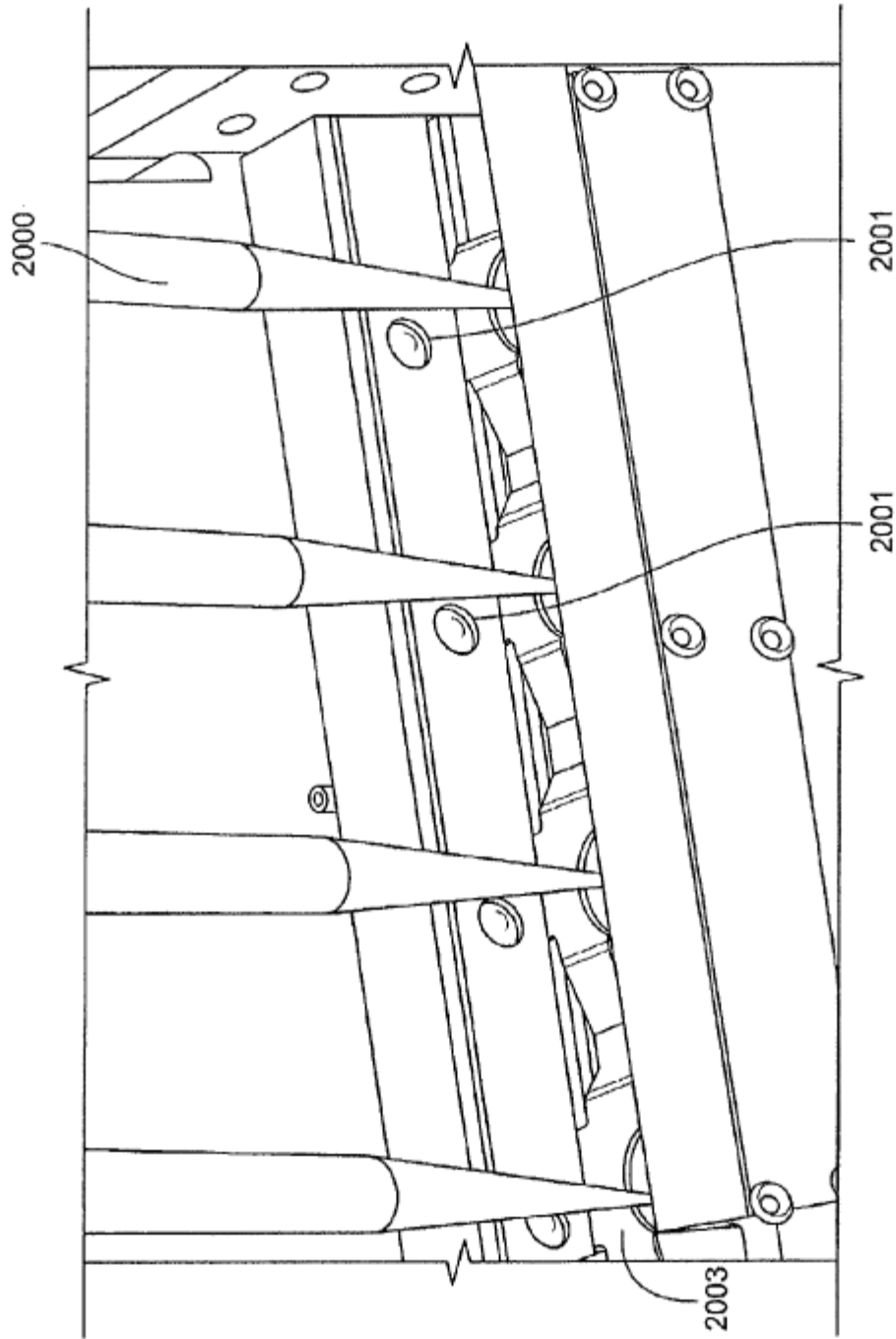


FIG. 24

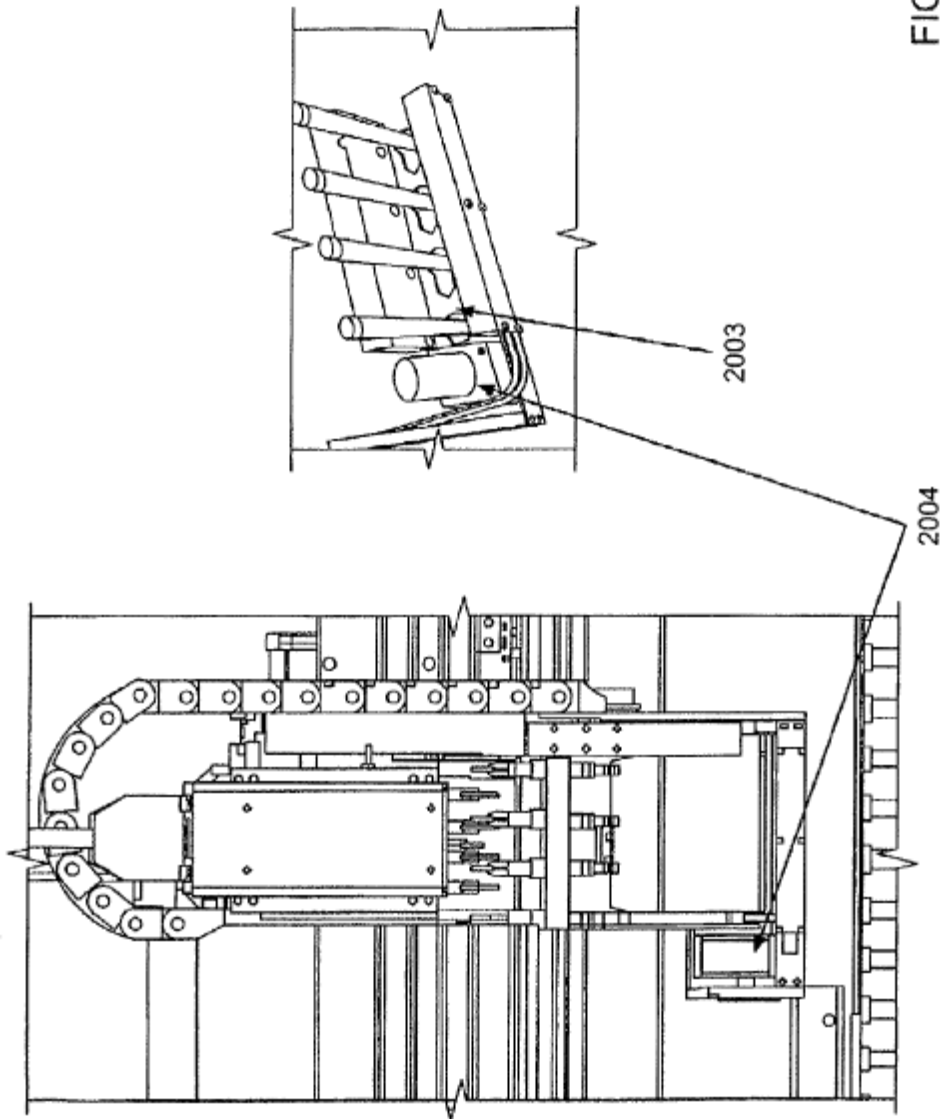


FIG. 25A

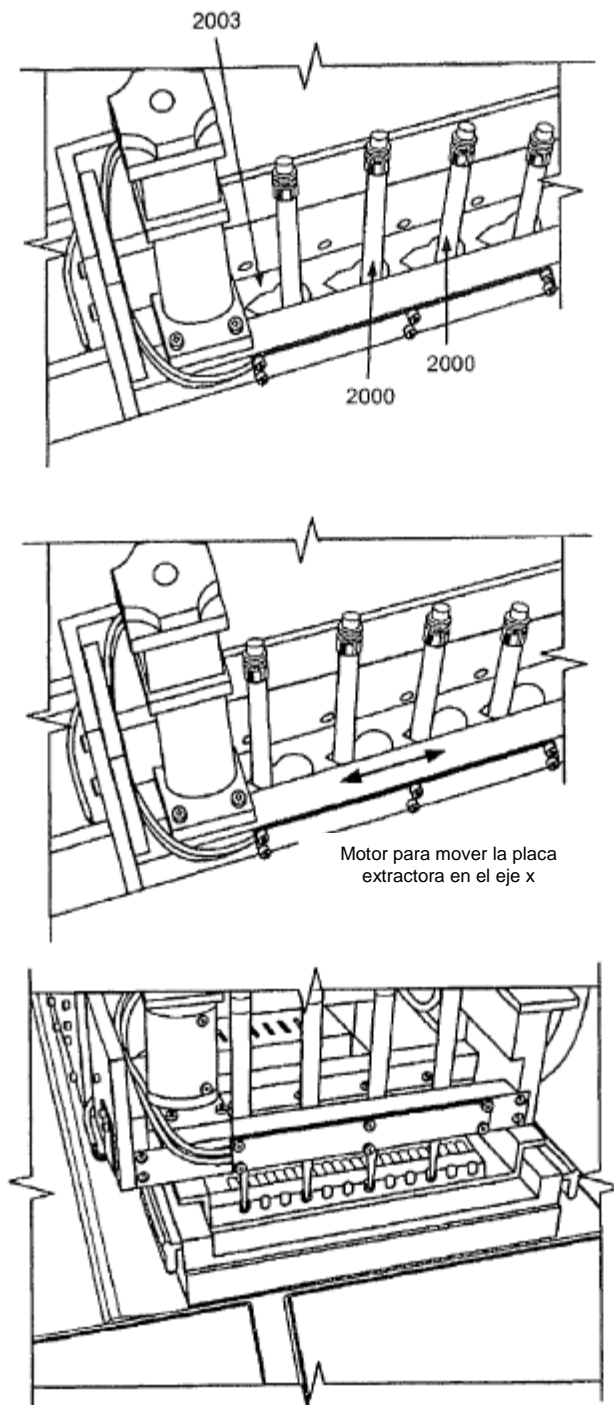


FIG. 25B

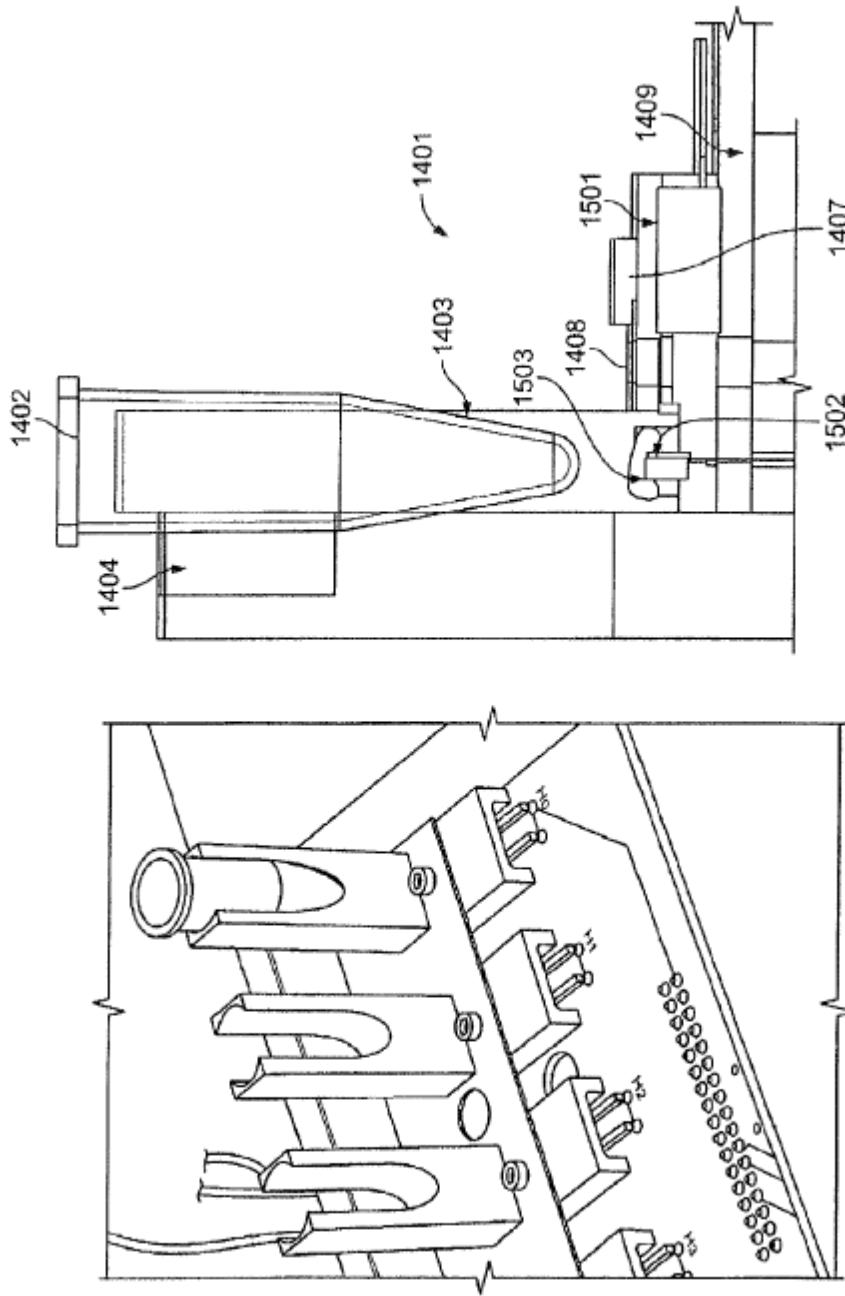


FIG. 26

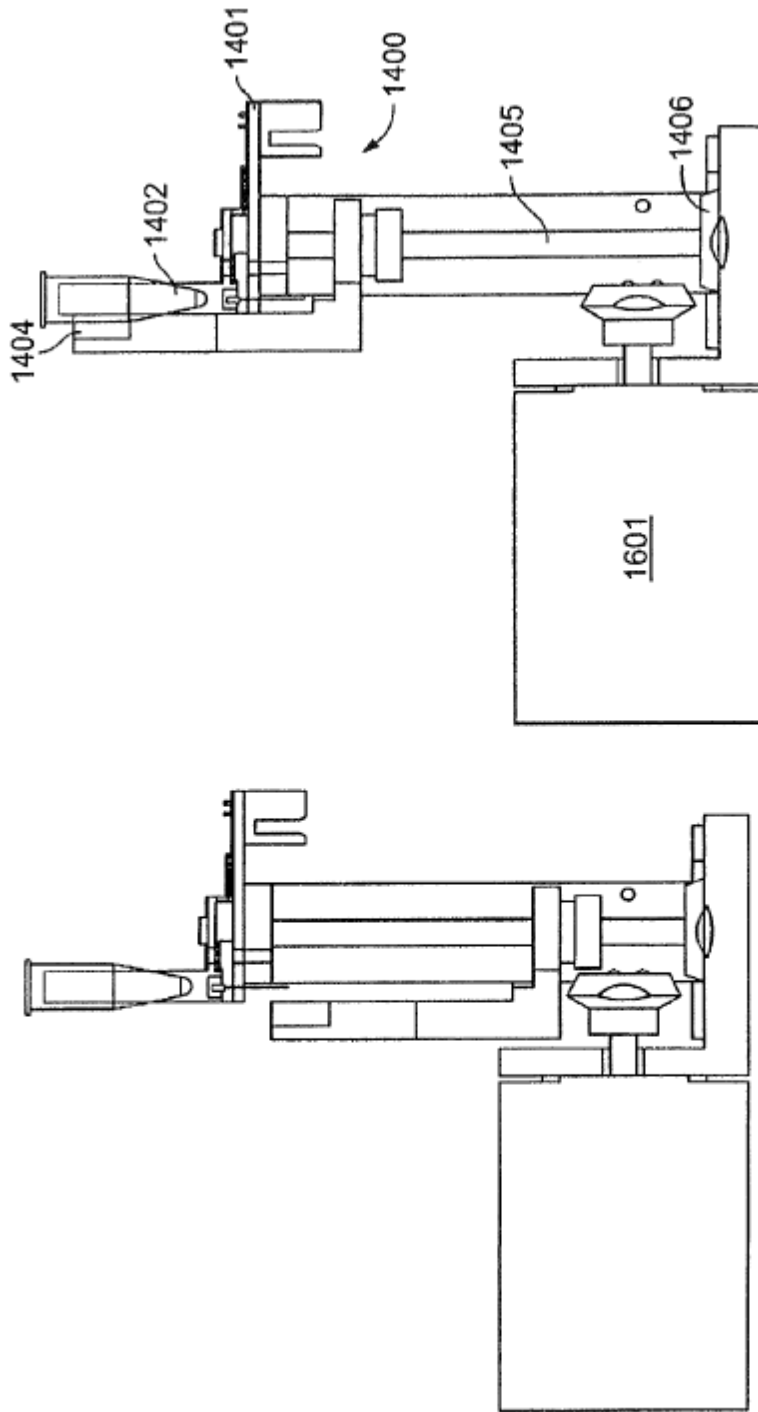


FIG. 27

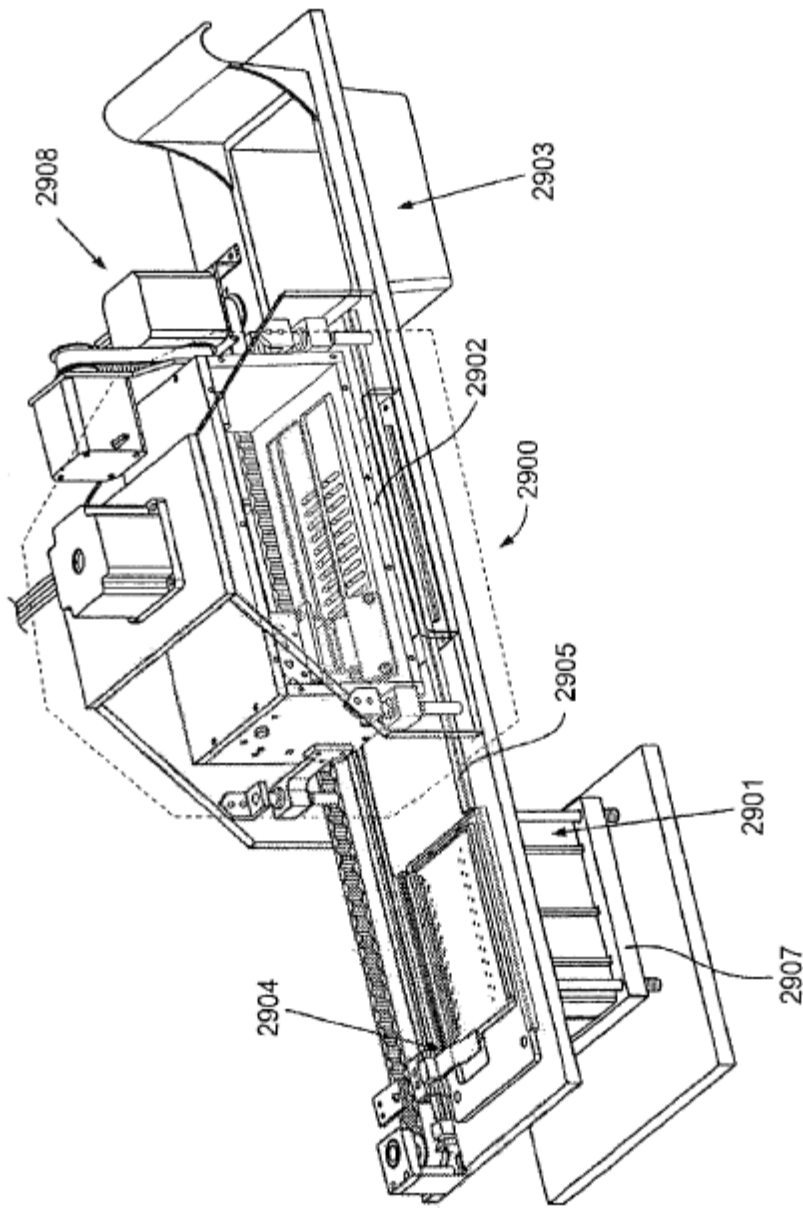


FIG. 28



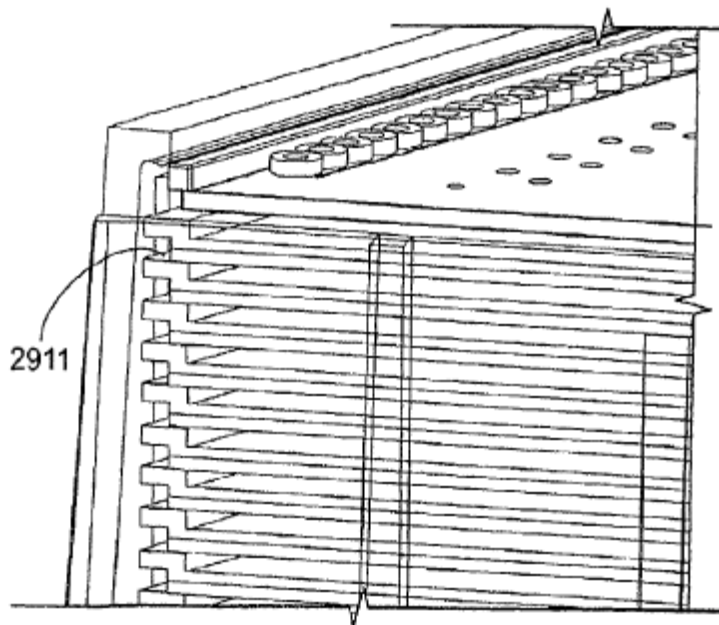
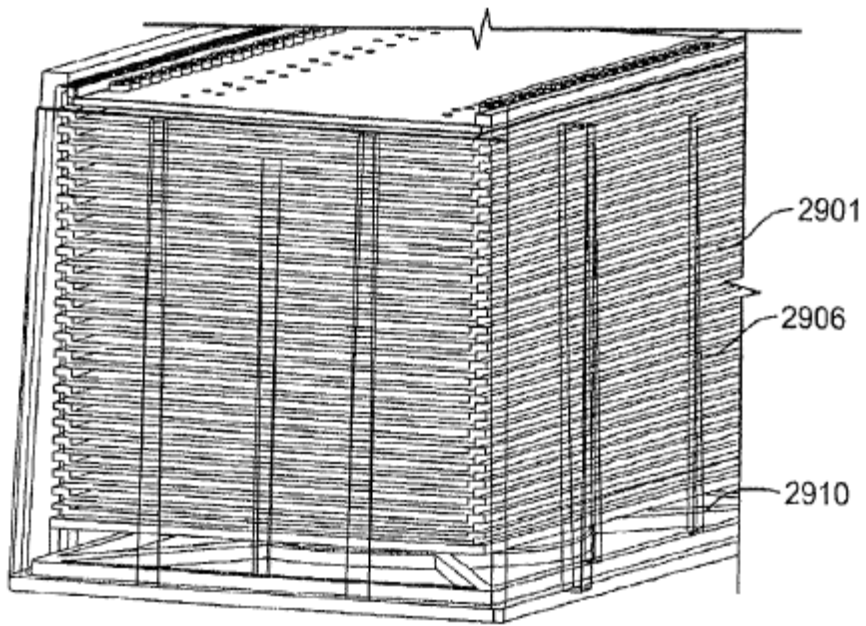


FIG. 29

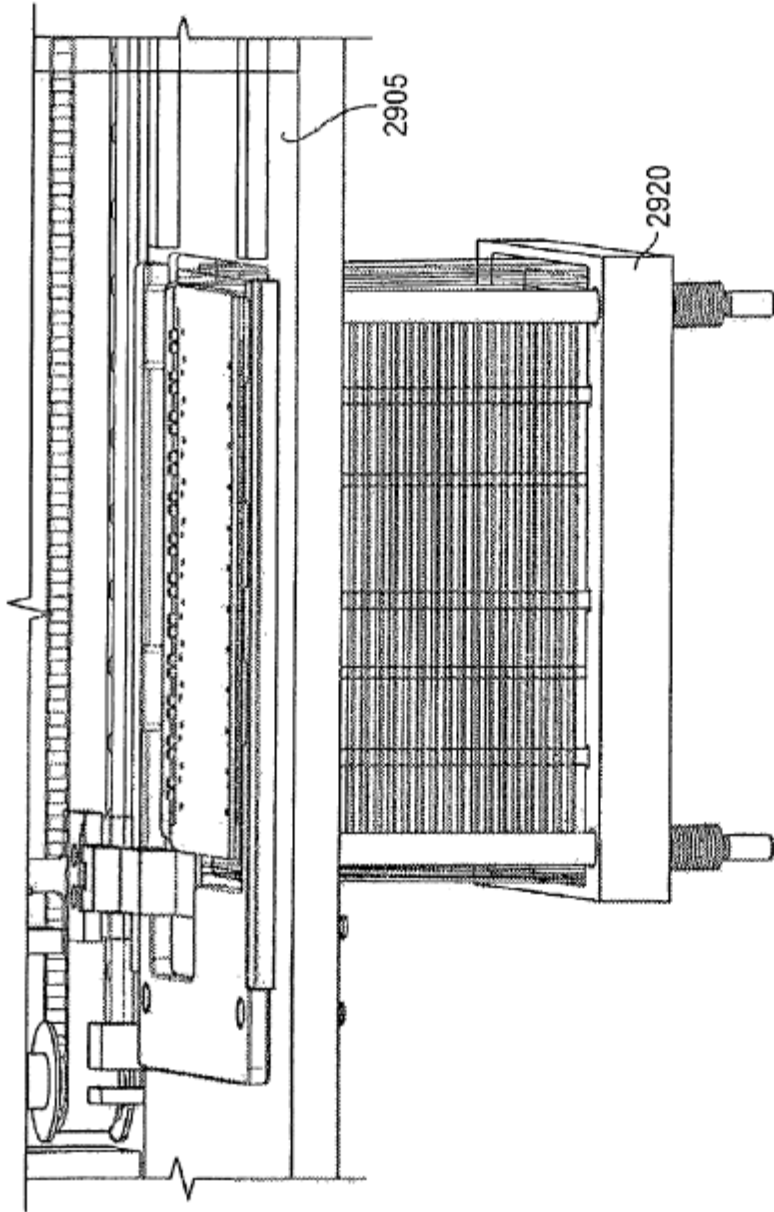


FIG. 30

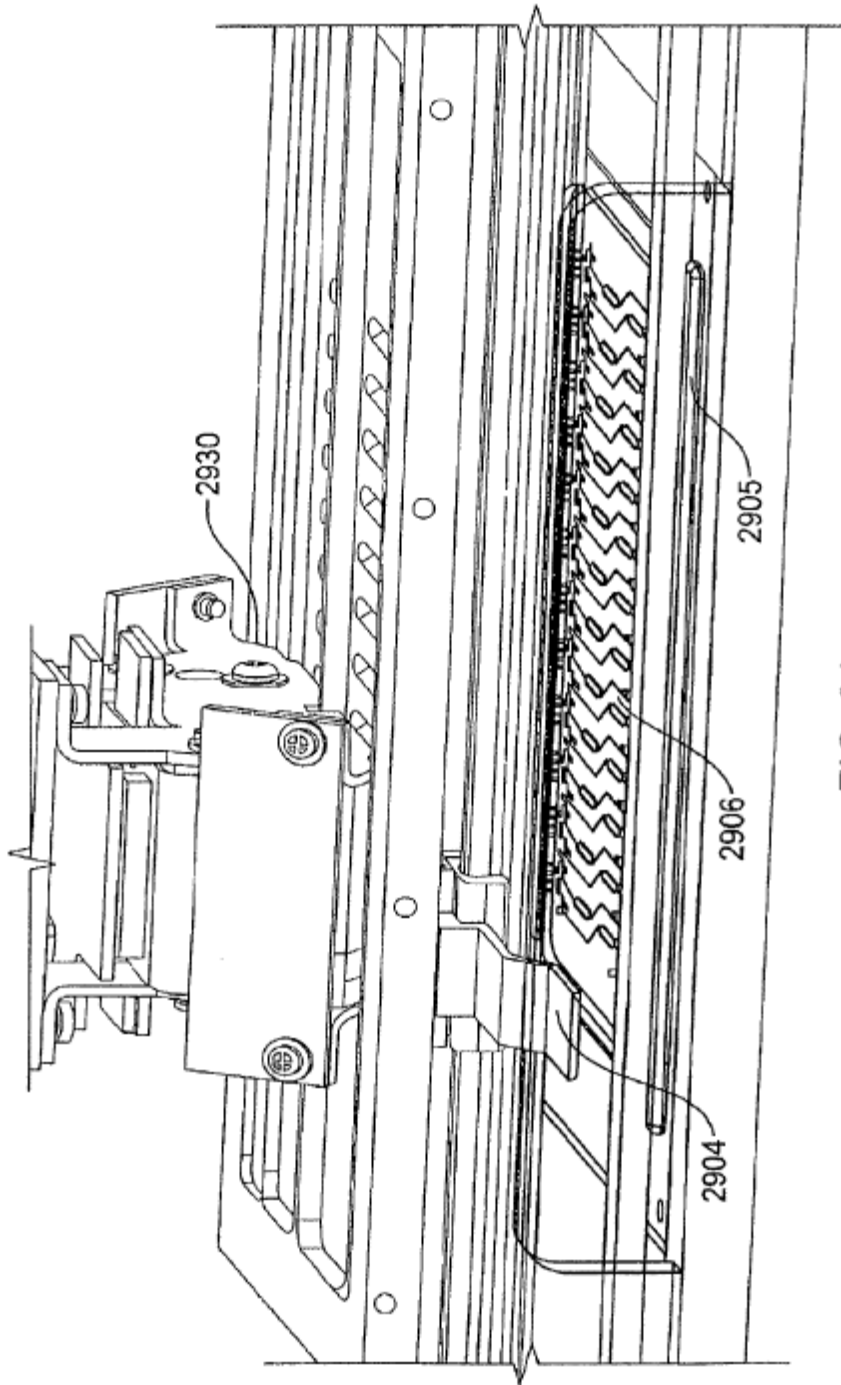


FIG. 31

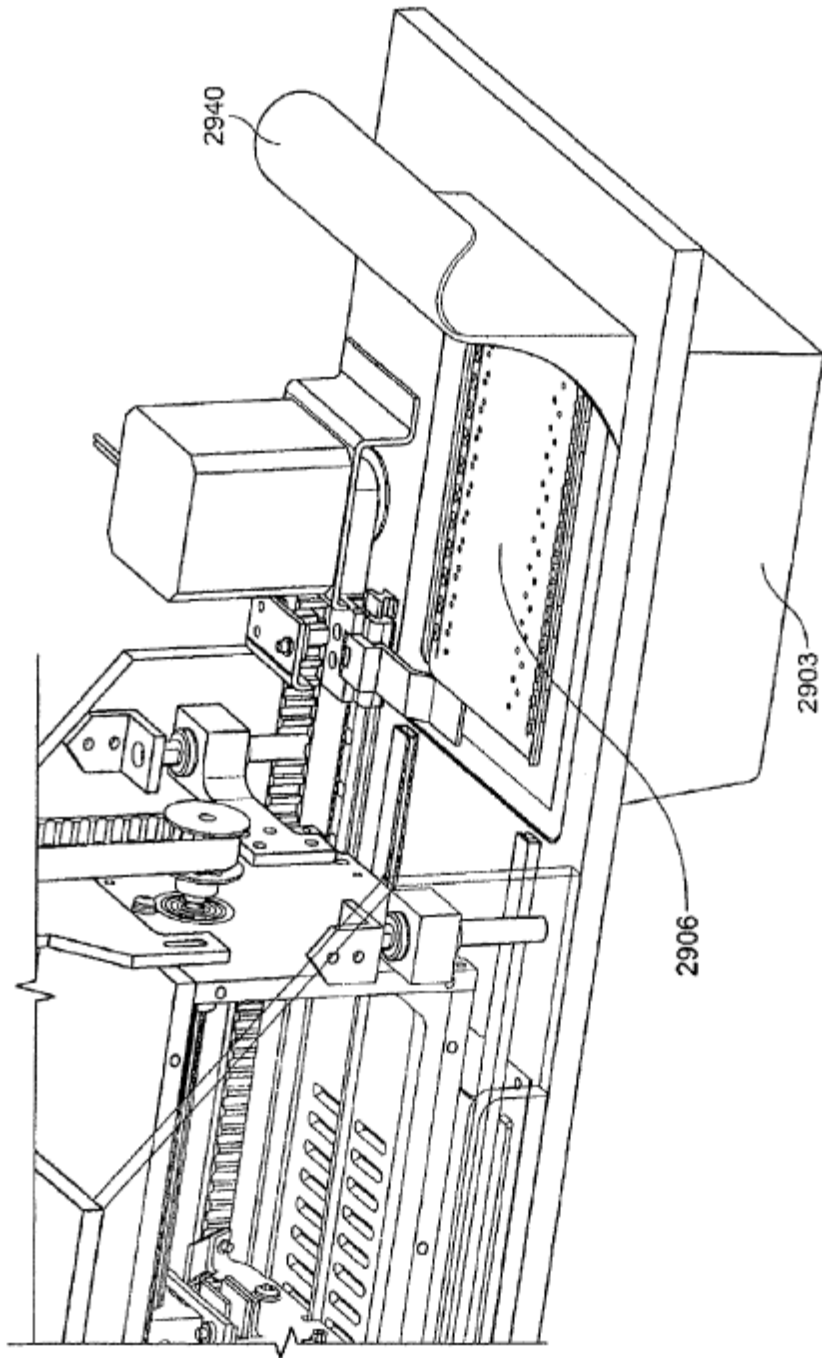


FIG. 32

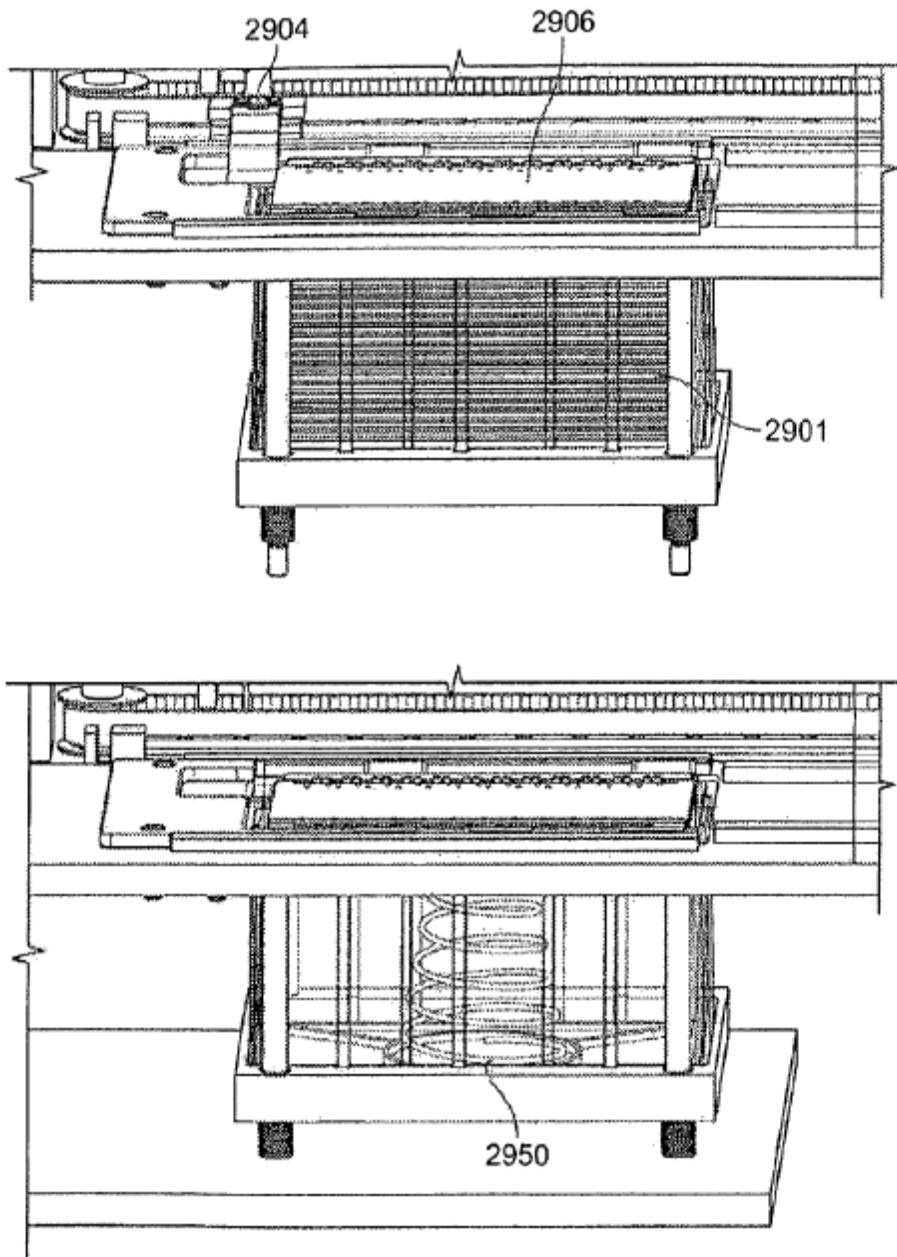


FIG. 33

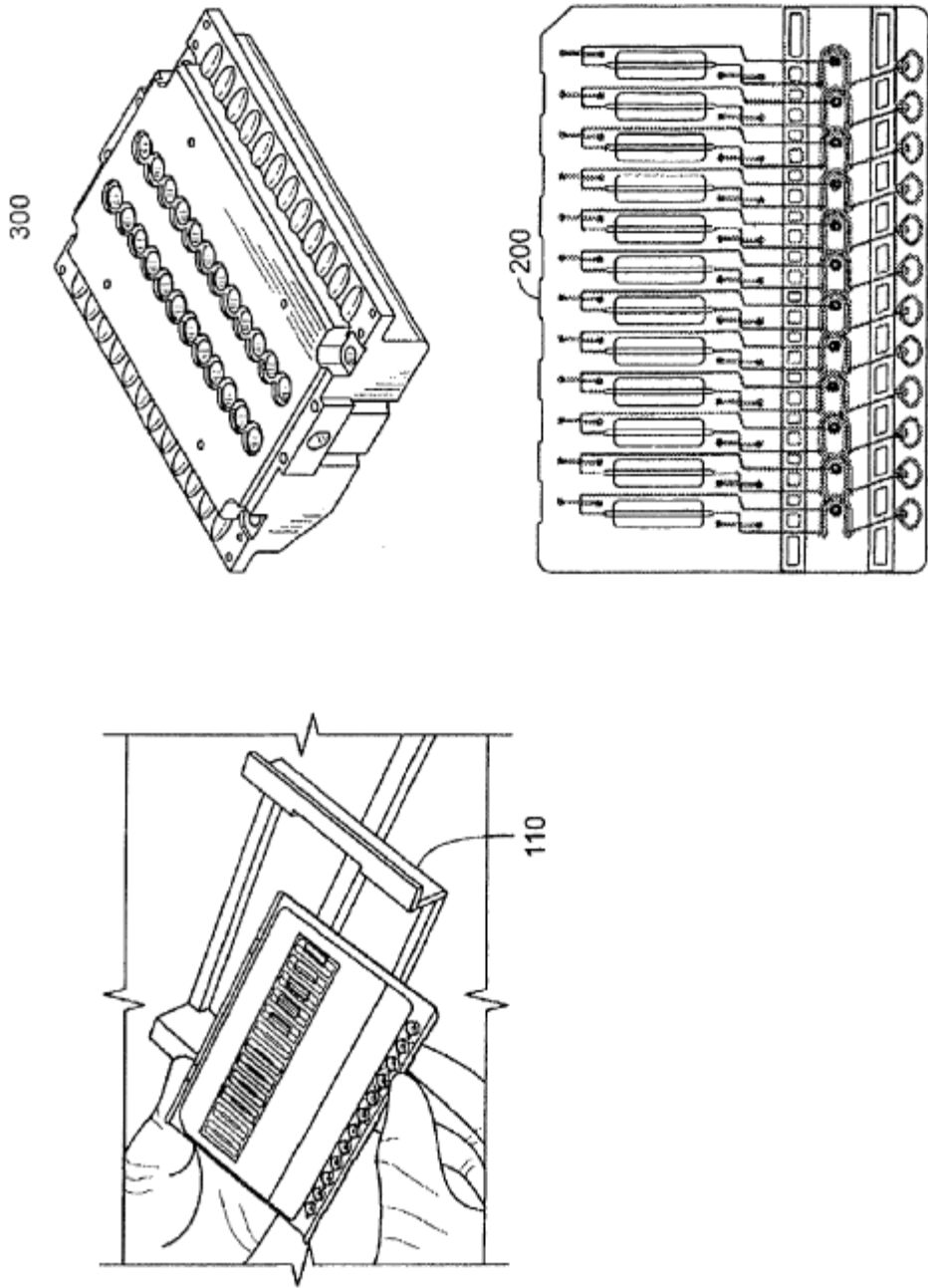


FIG. 34

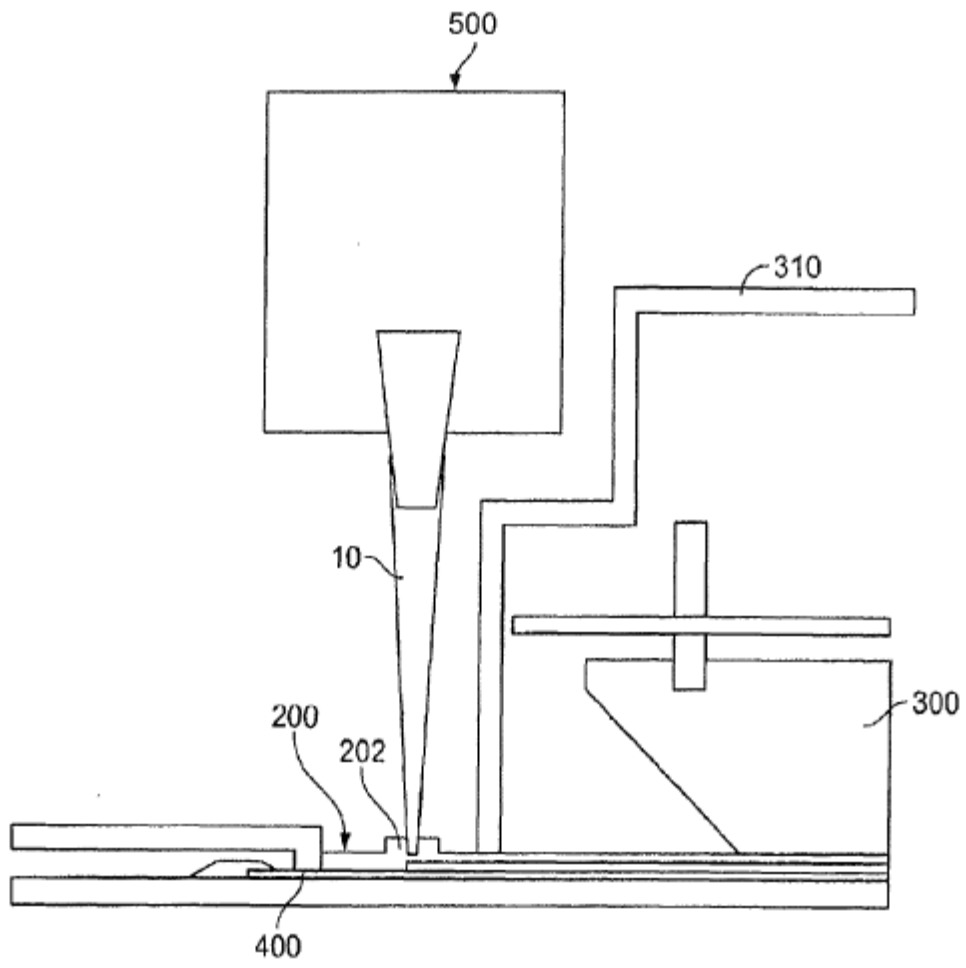


FIG. 35

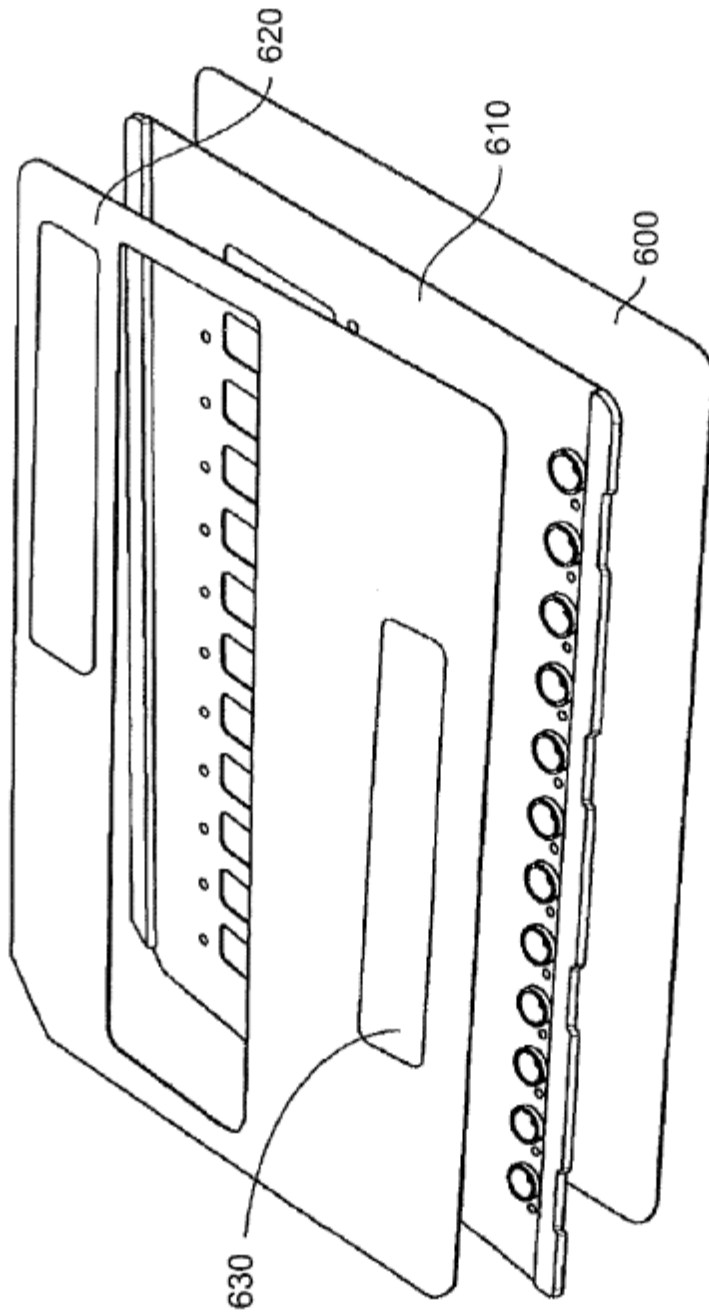


FIG. 36



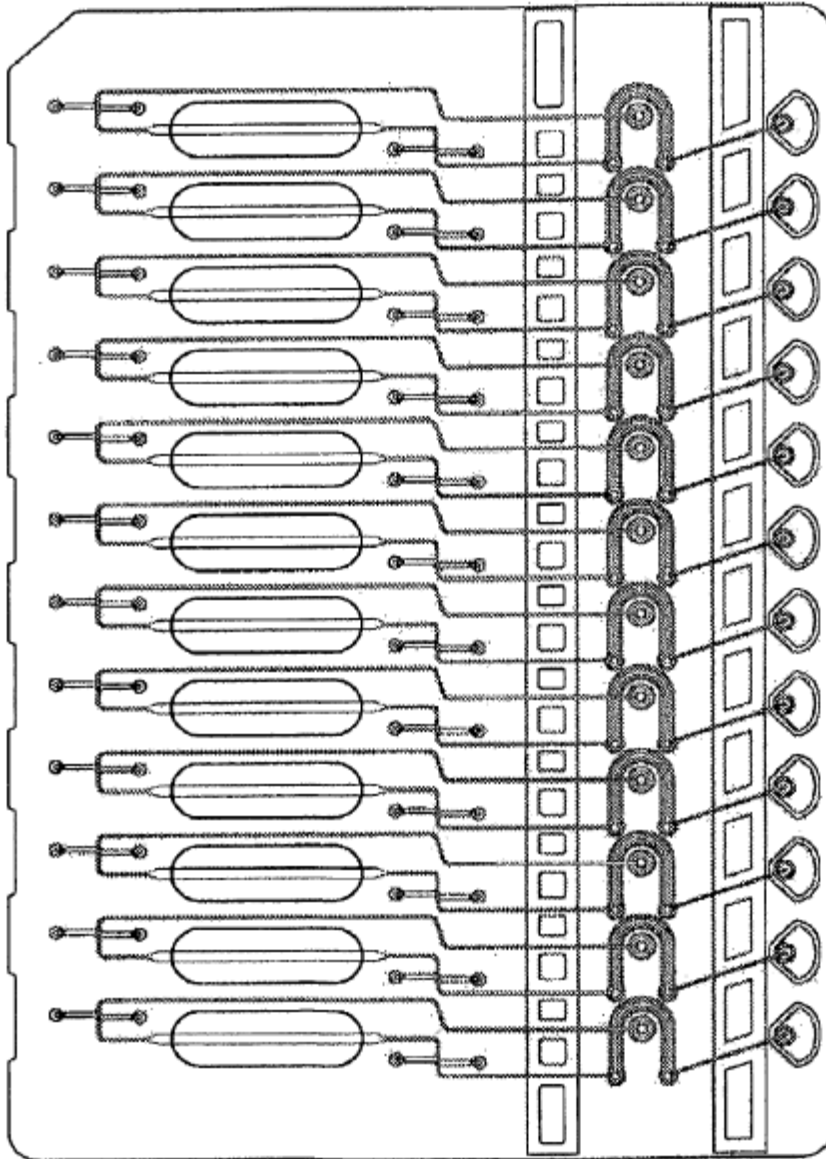


FIG. 37

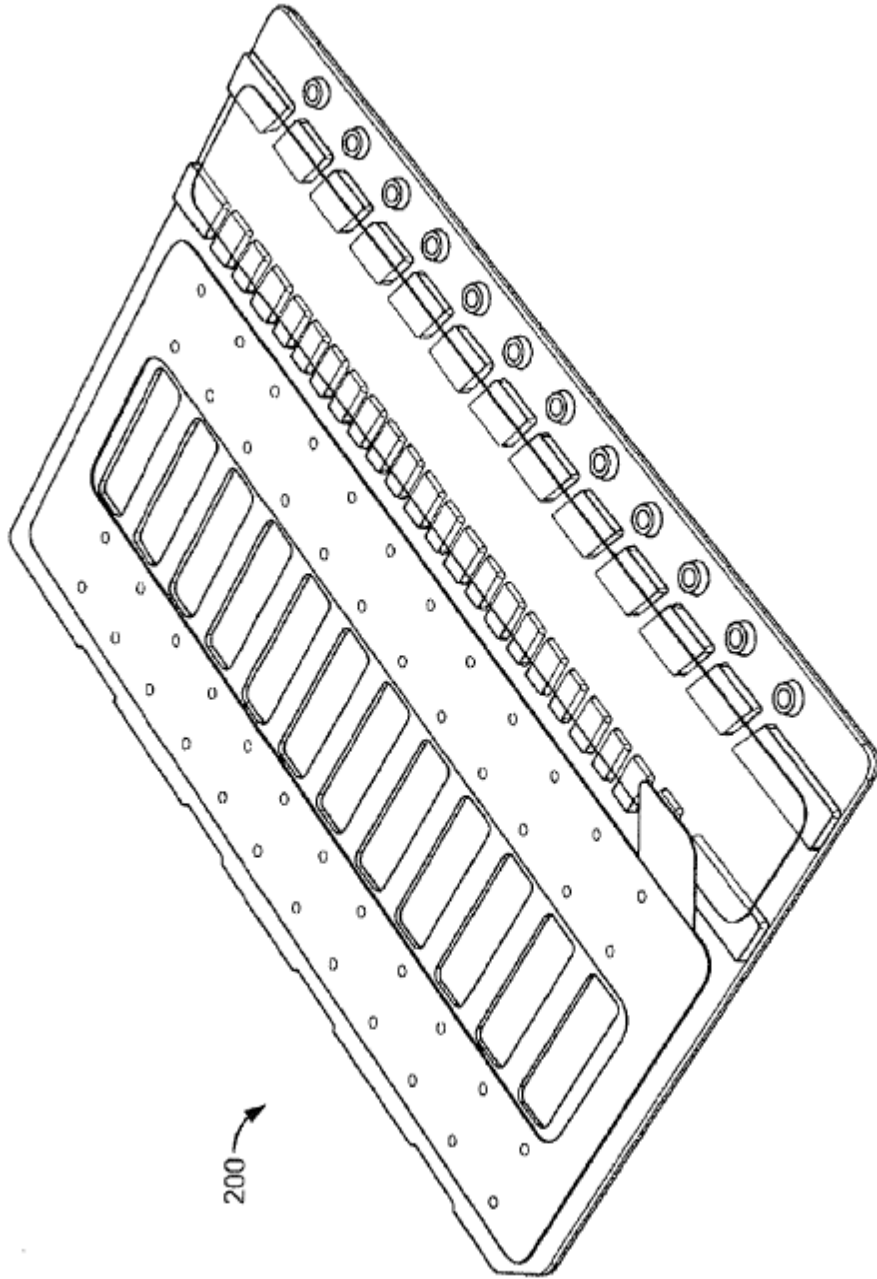


FIG. 38A

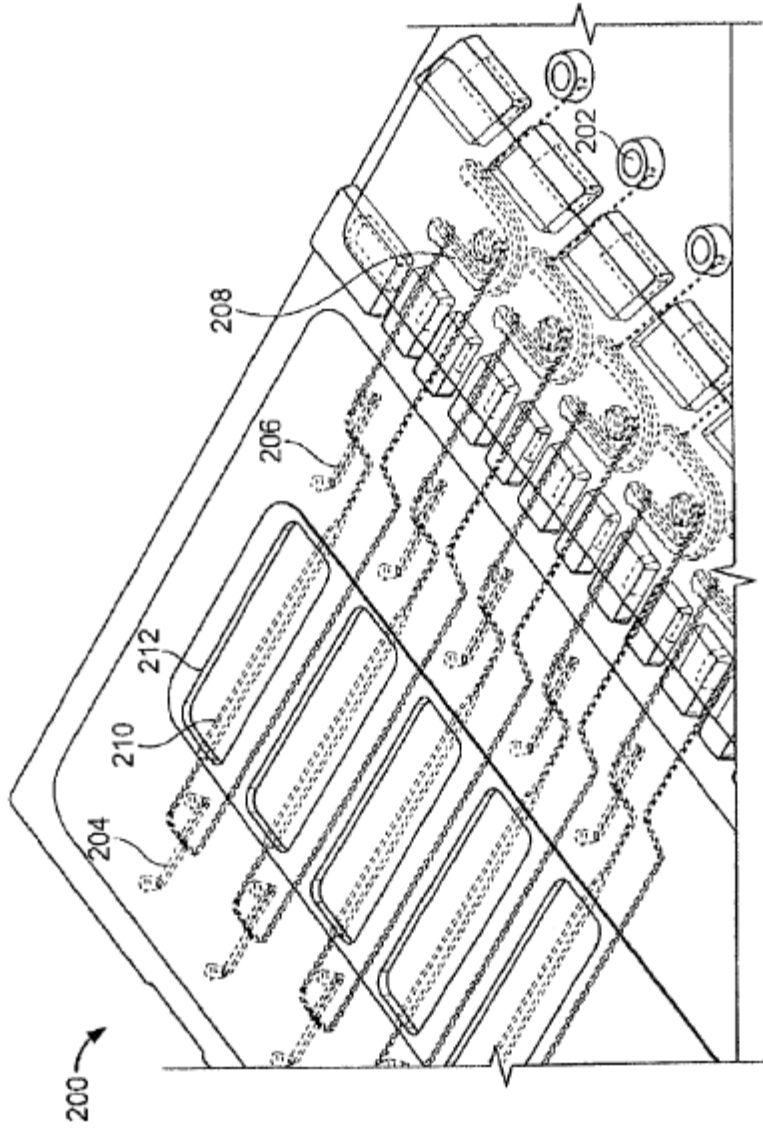


FIG. 38B

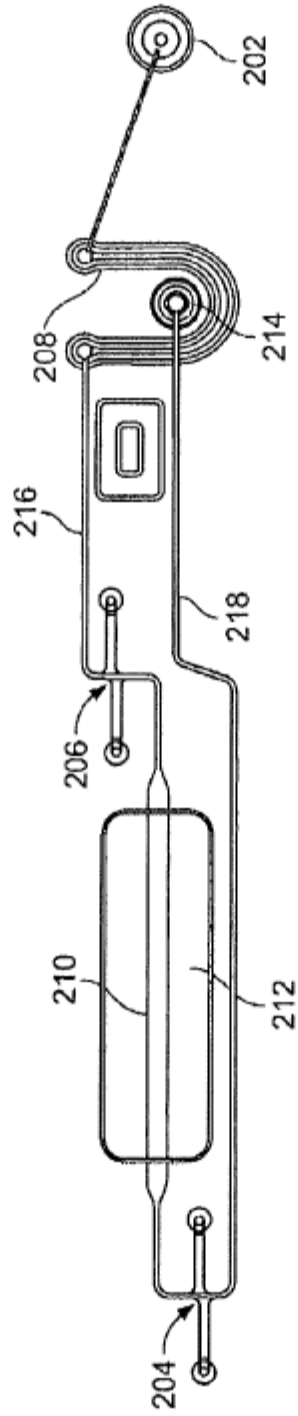


FIG. 39A

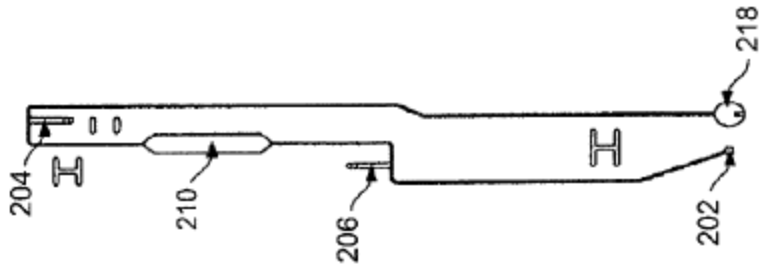
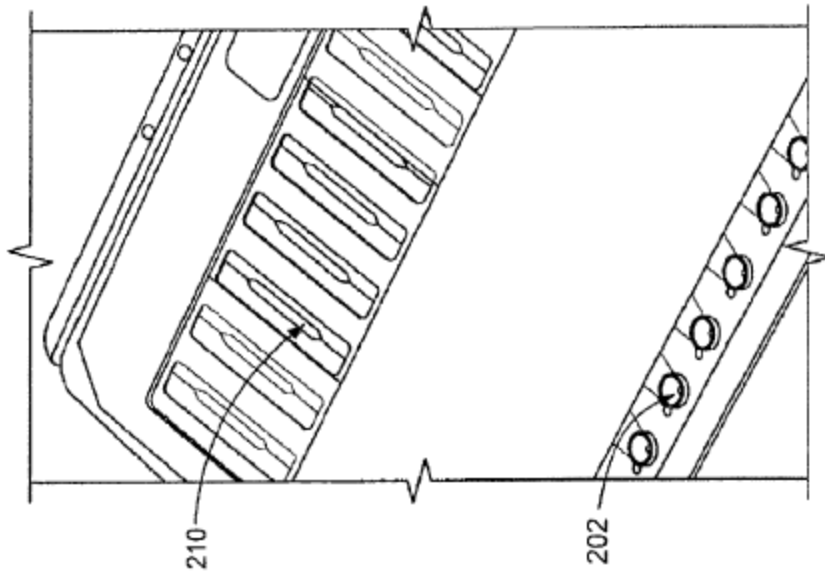


FIG. 39B

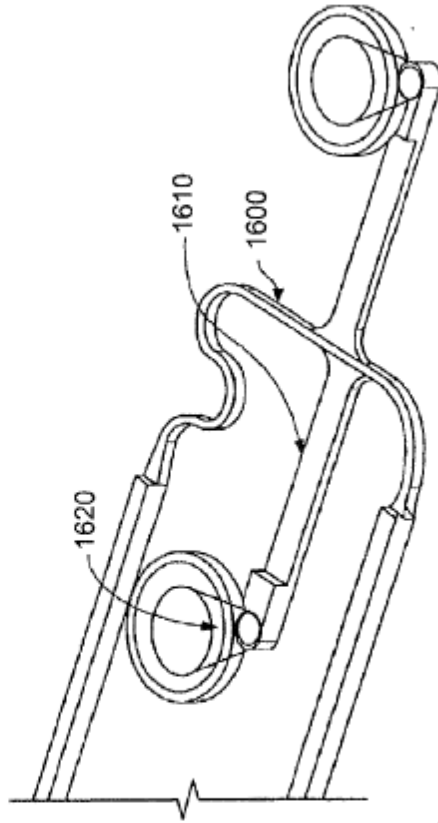
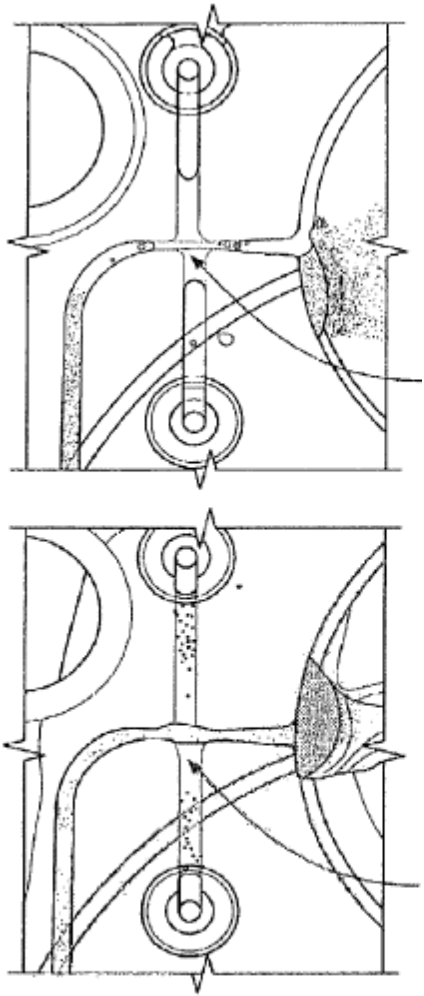


FIG. 40A

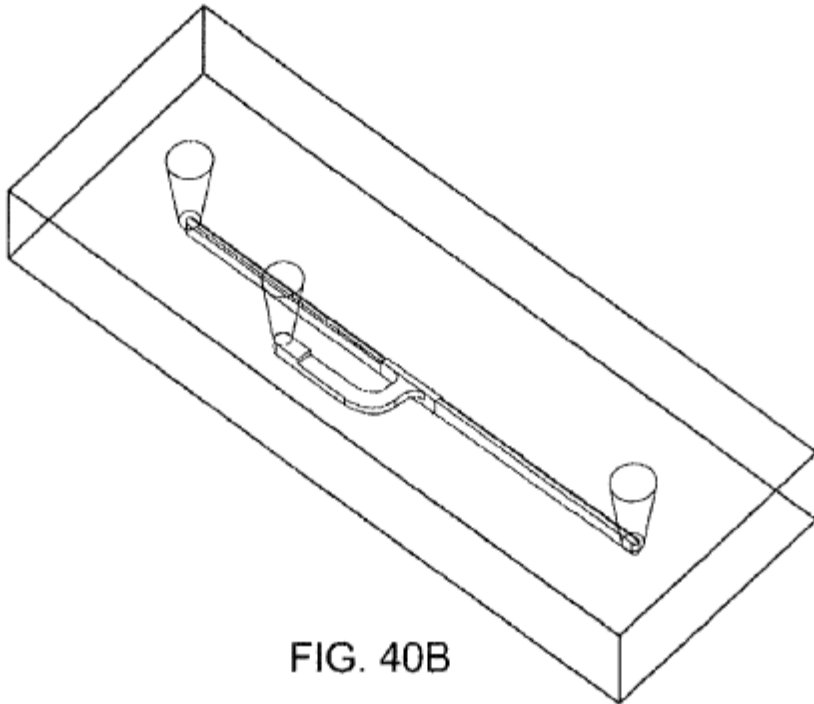


FIG. 40B

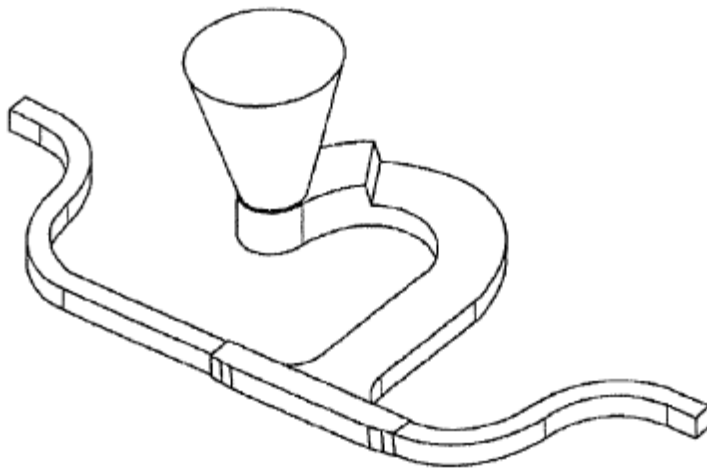


FIG. 40C

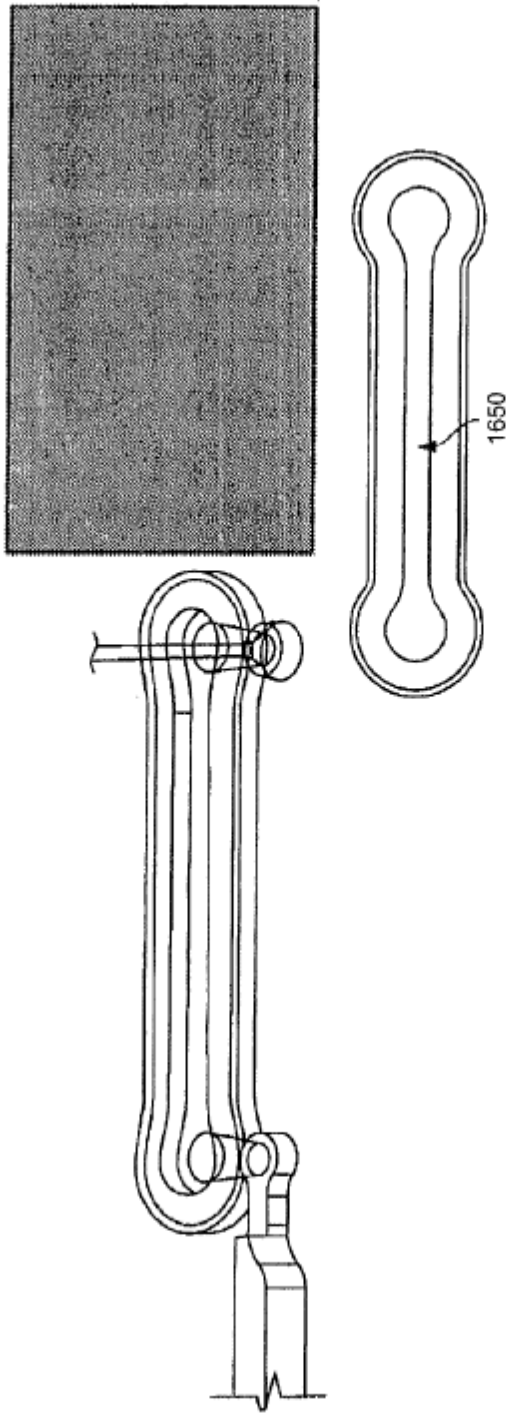


FIG. 41



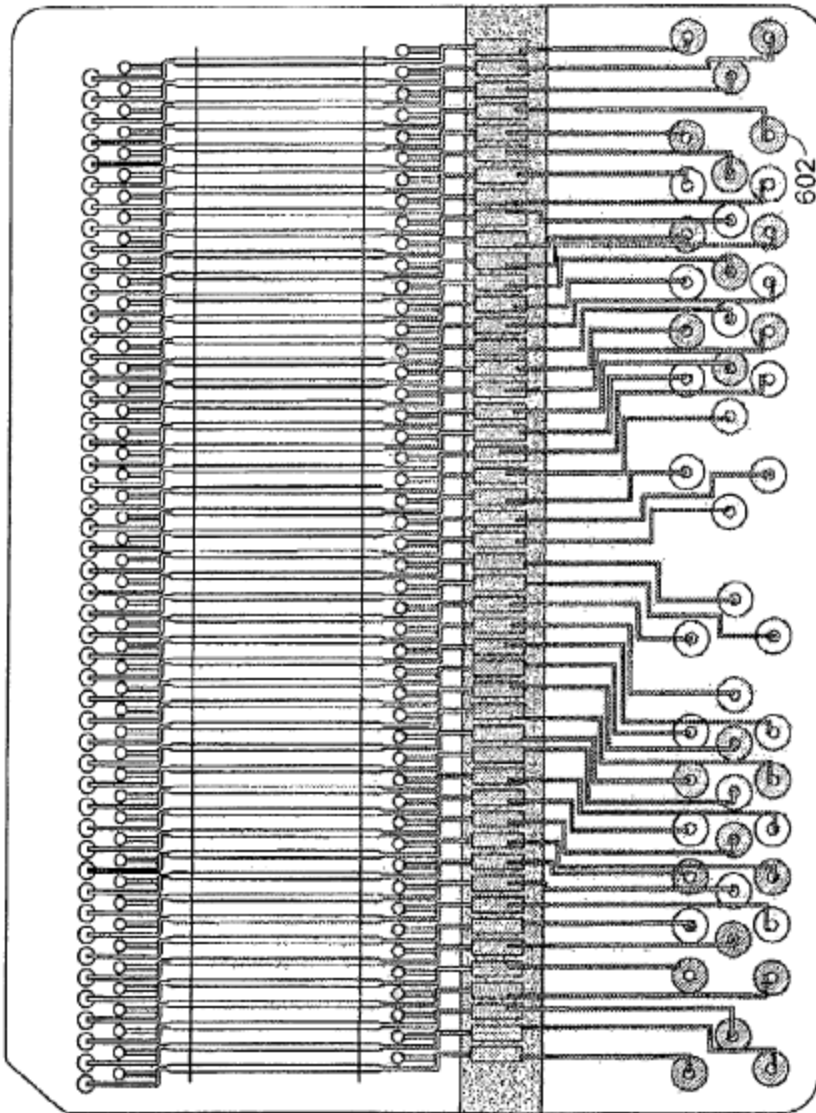


FIG. 42

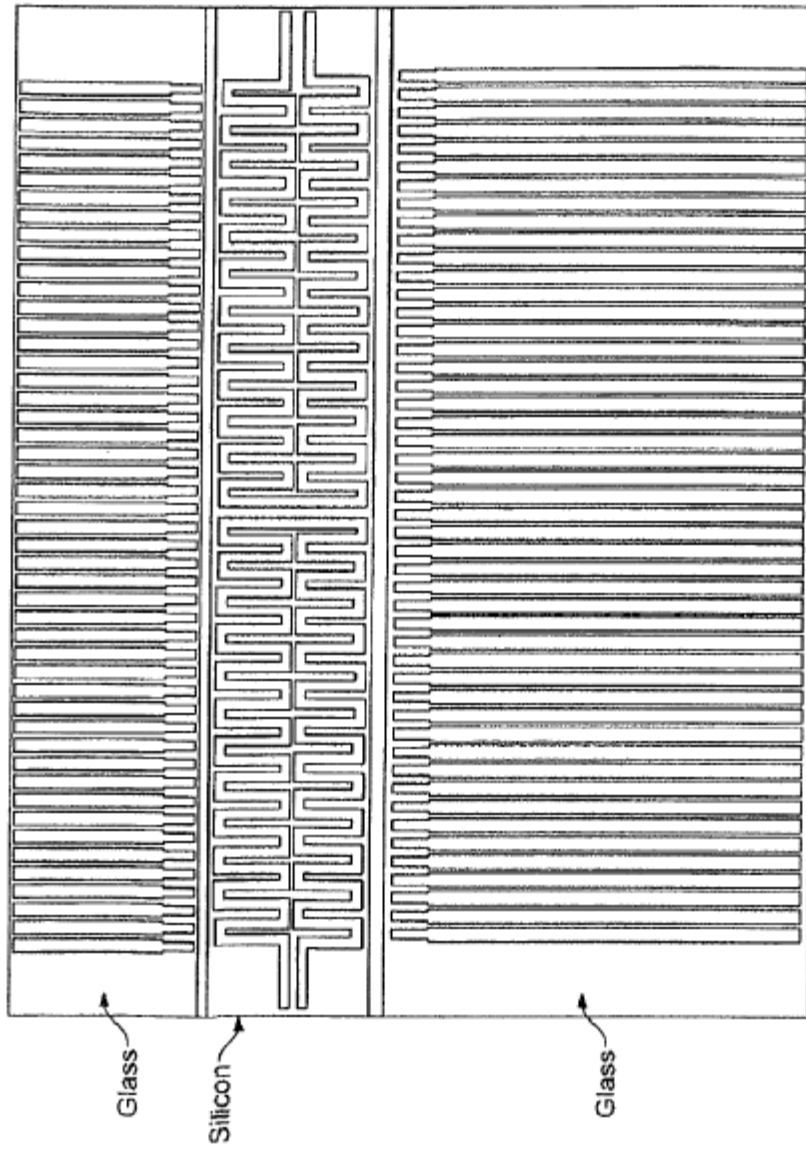


FIG. 43

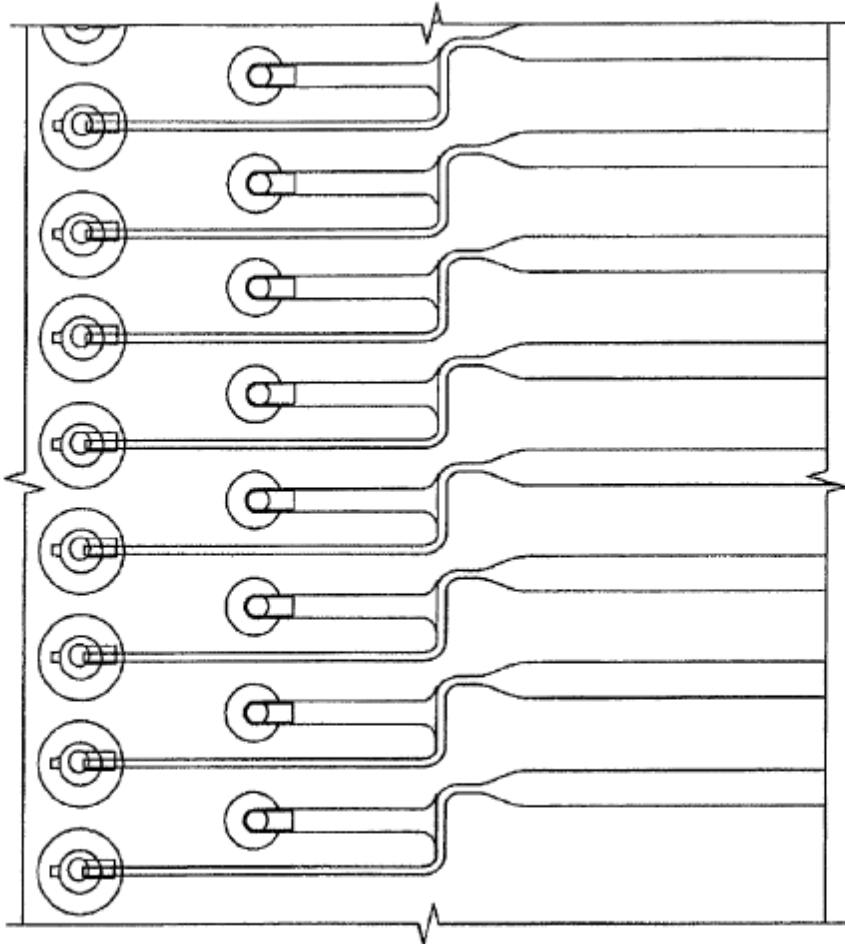


FIG. 44

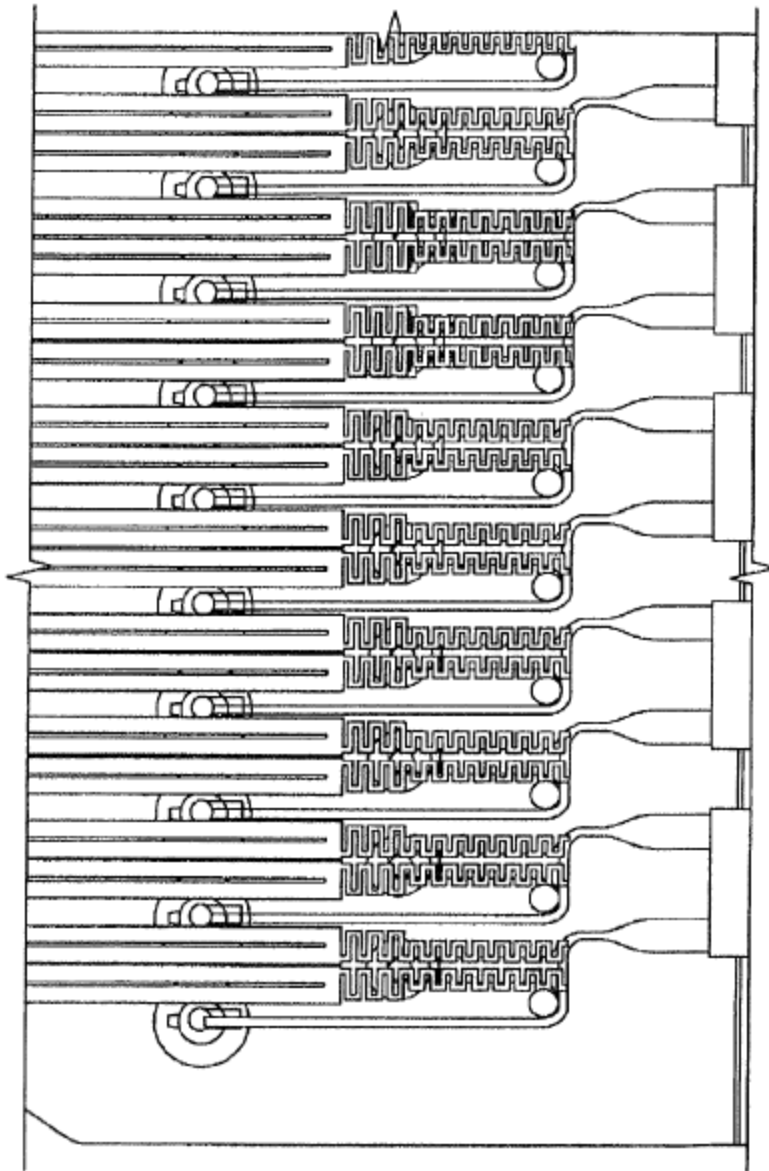


FIG. 45

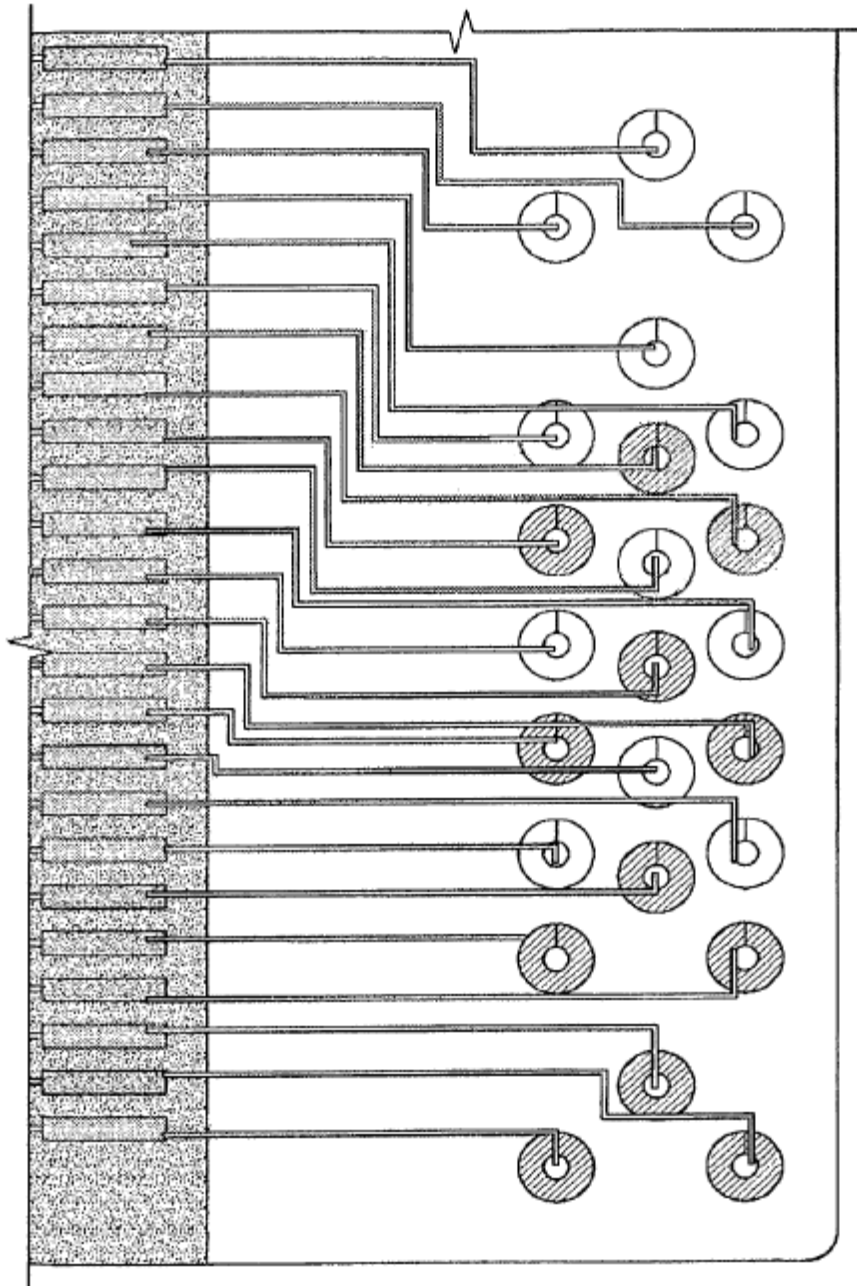


FIG. 46

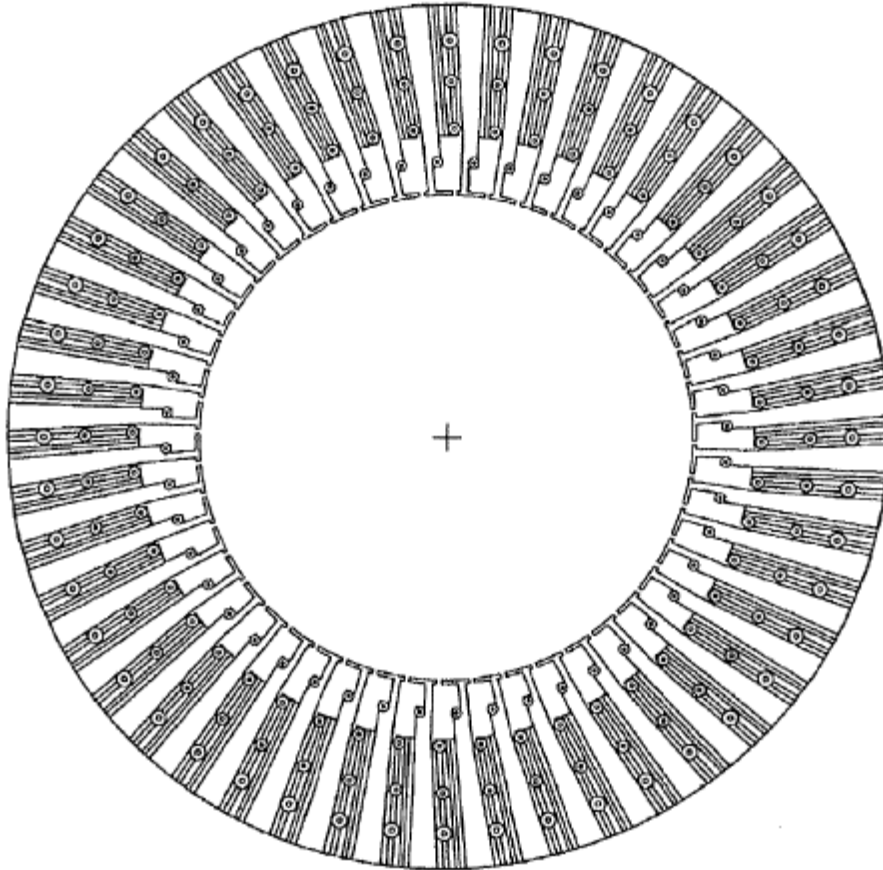


FIG. 47A

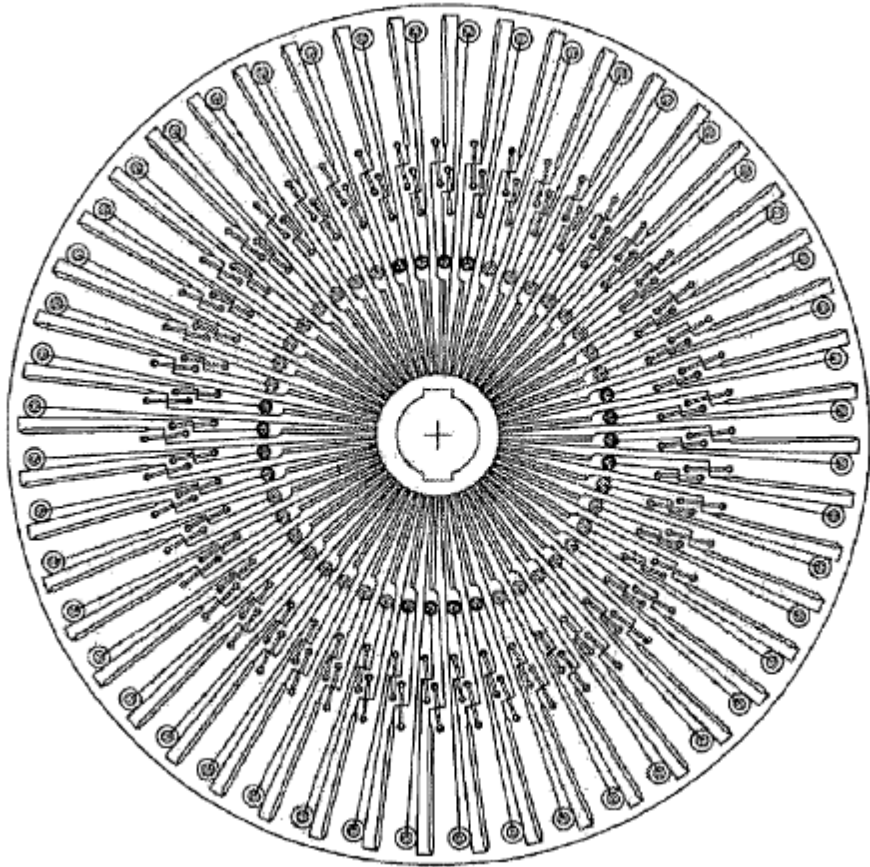


FIG. 47B

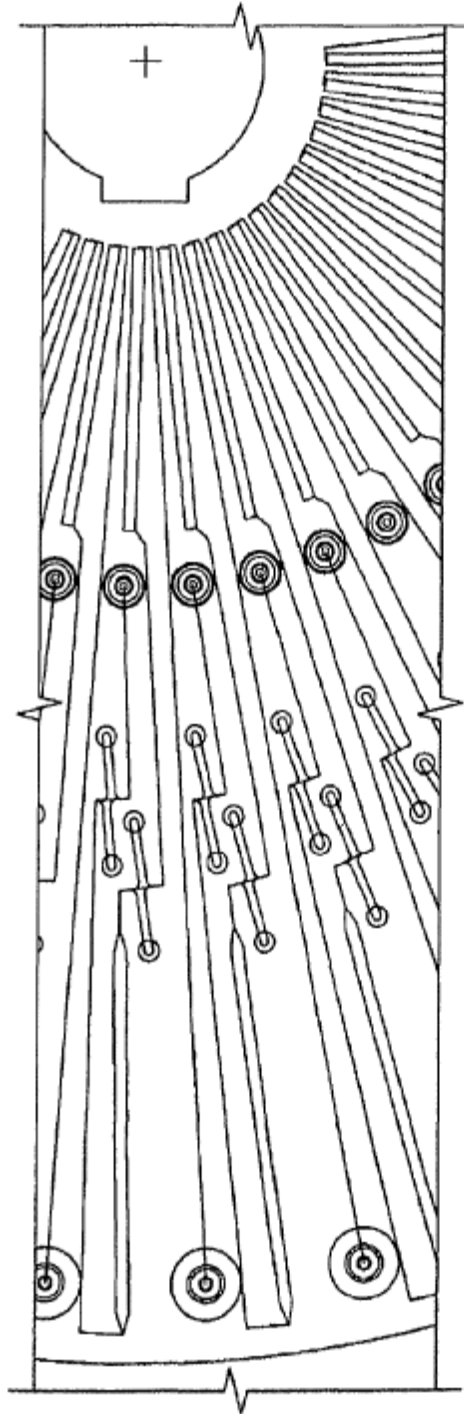


FIG. 47C



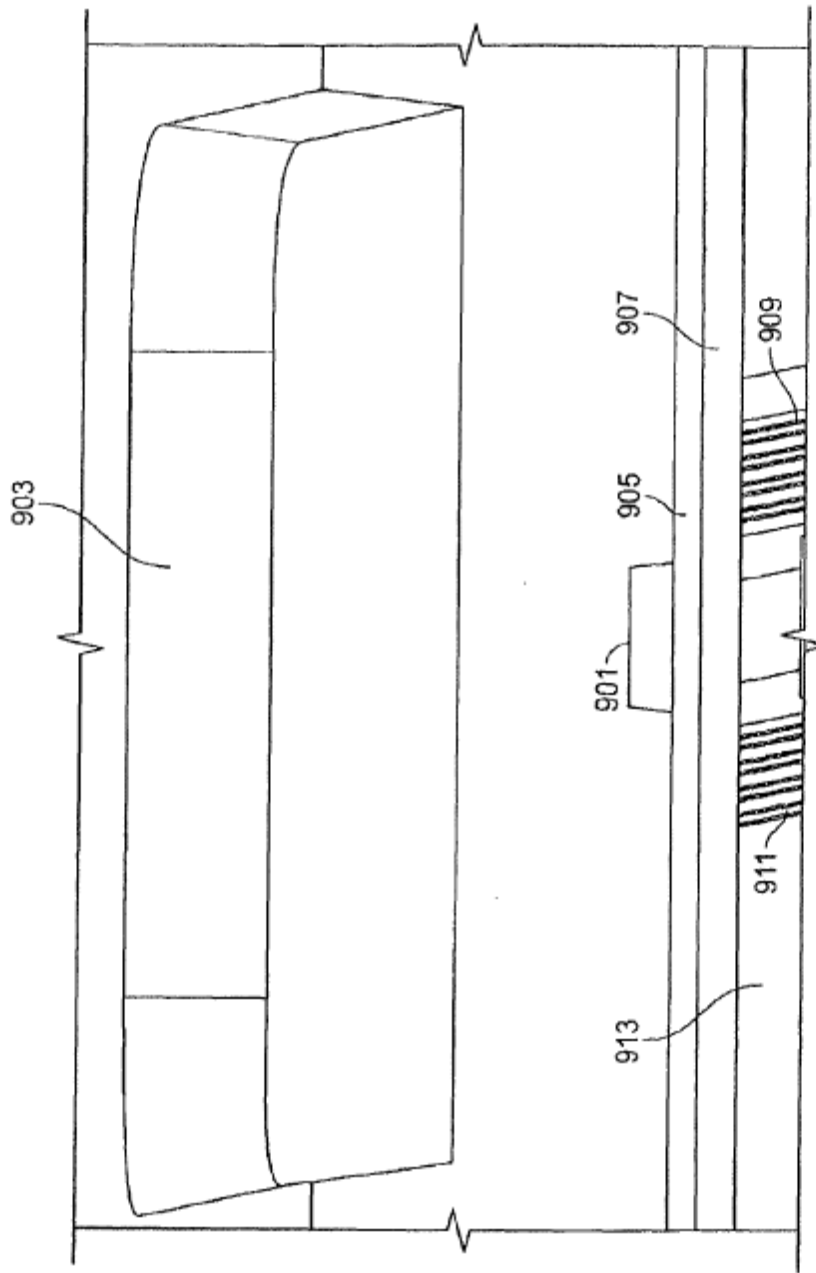


FIG. 48

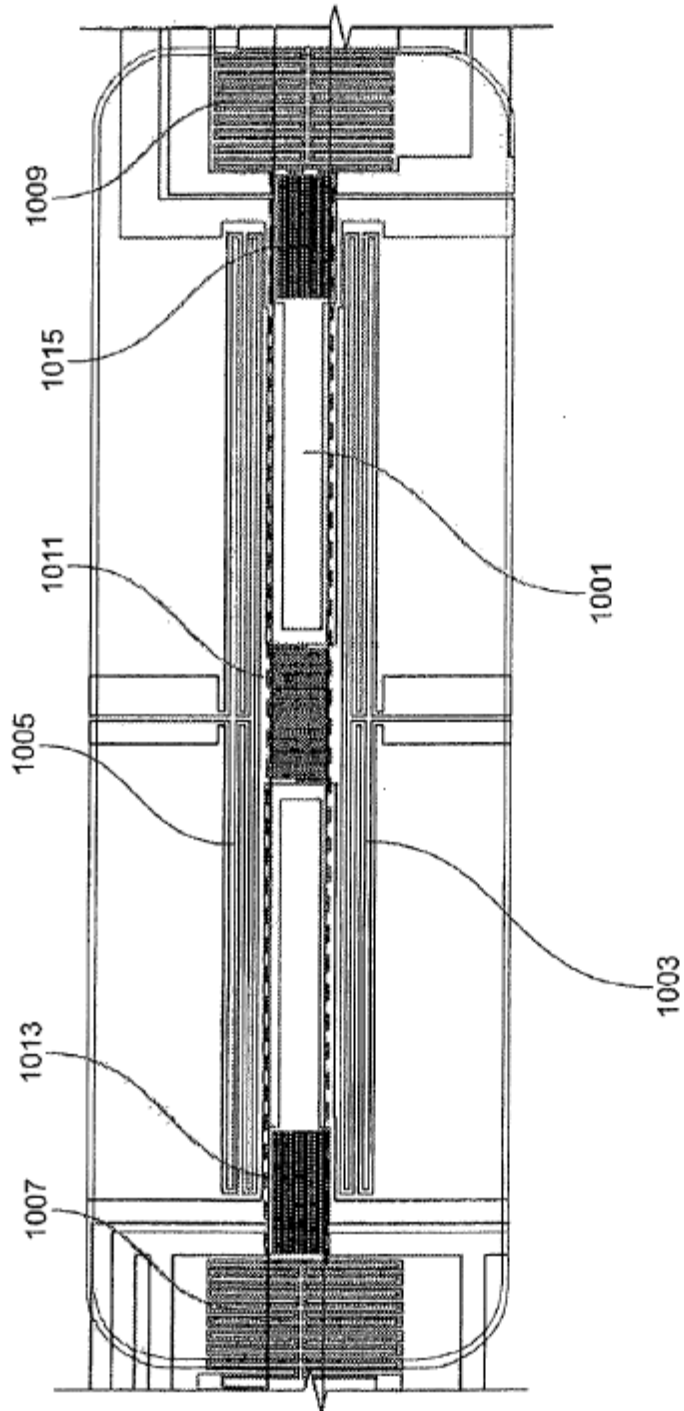
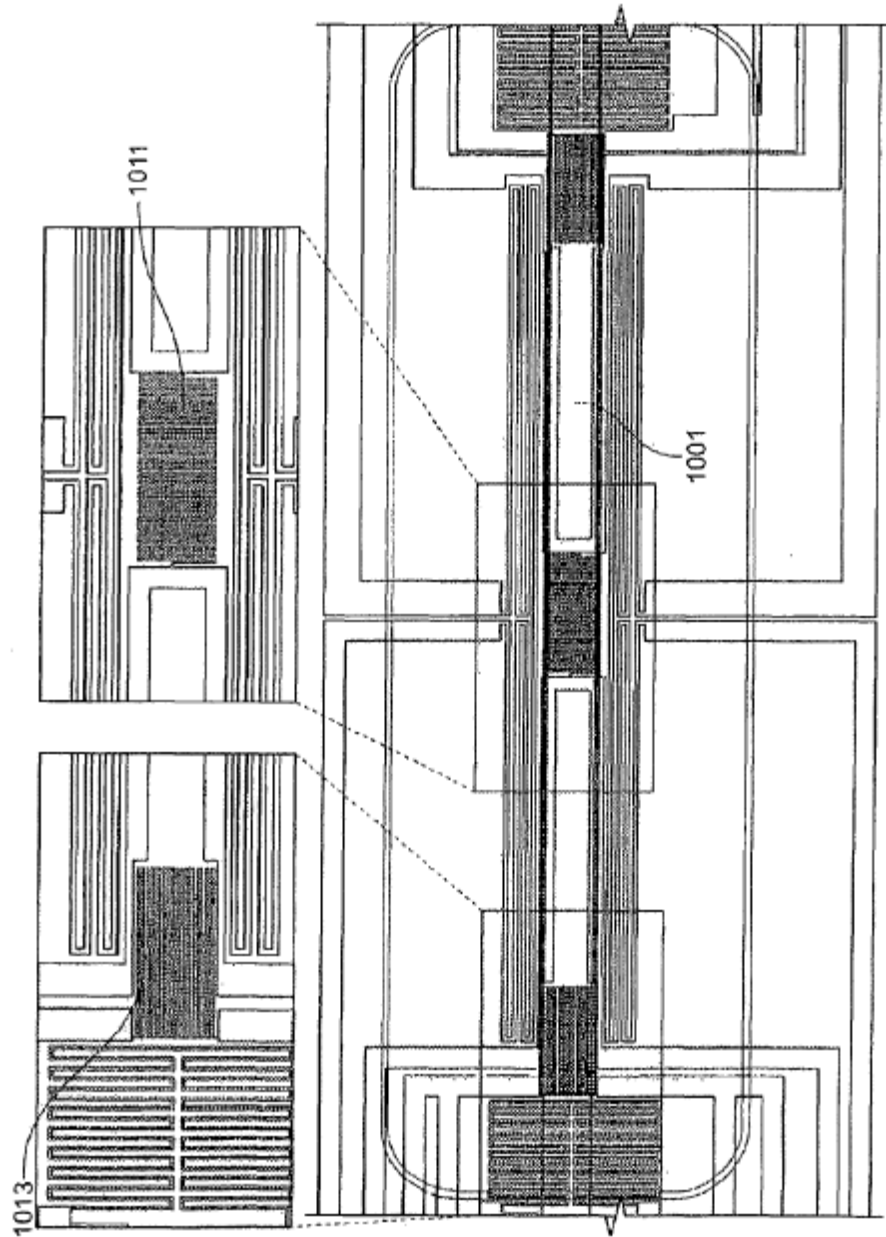


FIG. 49A



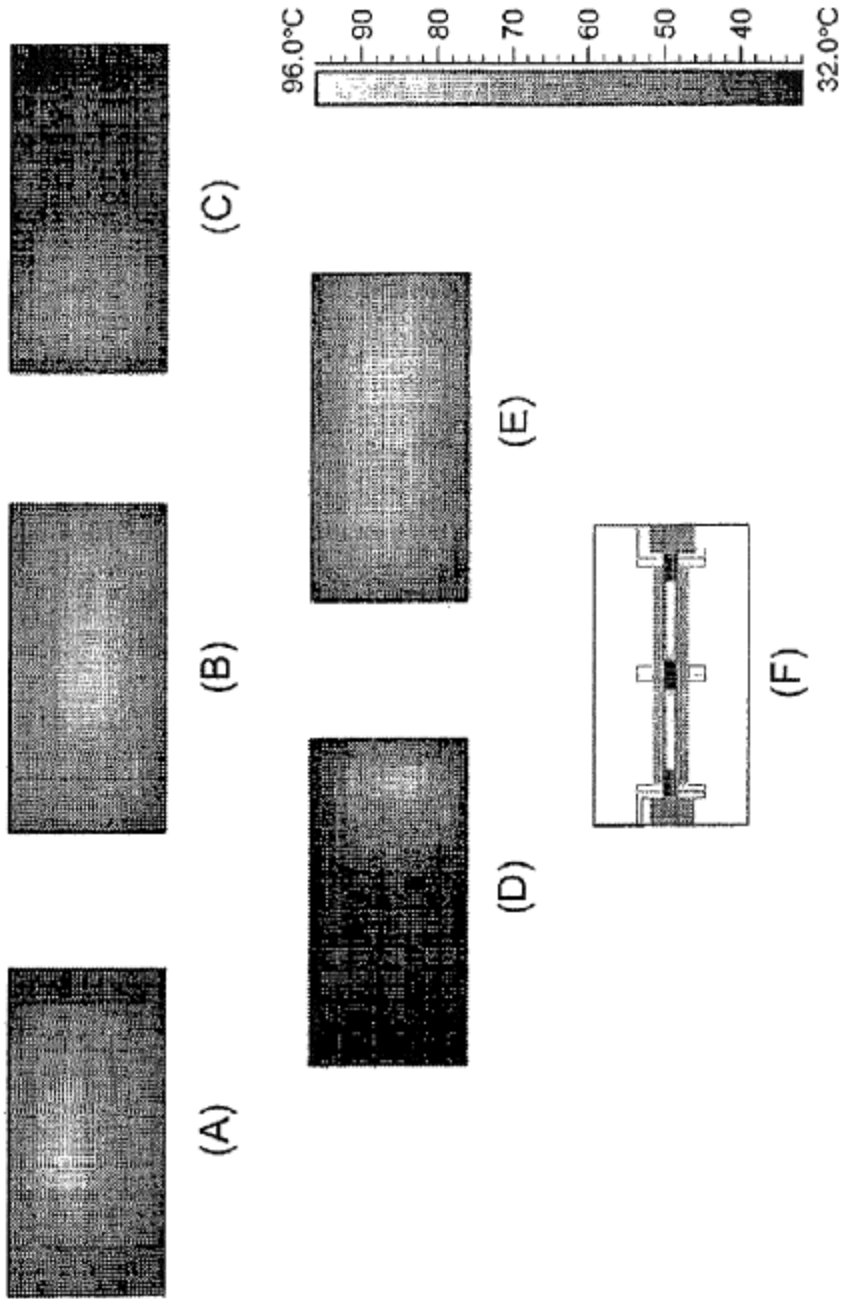


FIG. 50

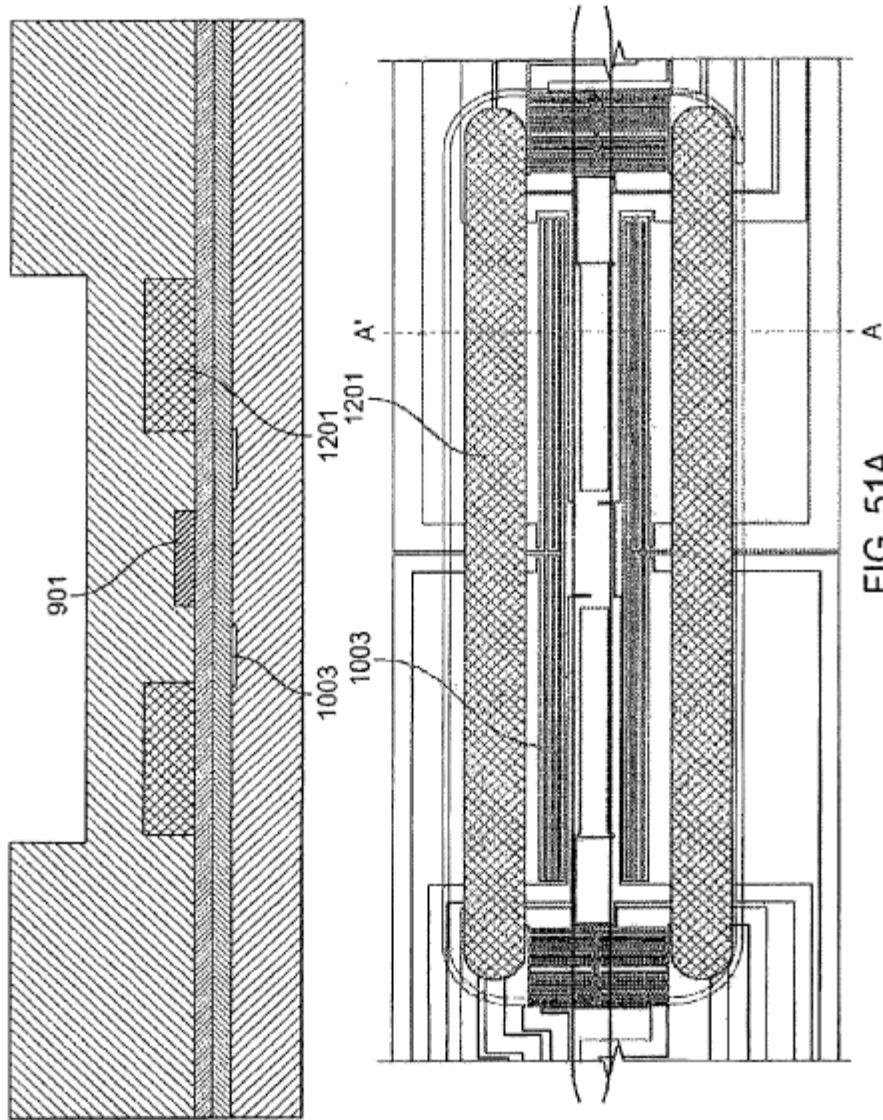


FIG. 51A

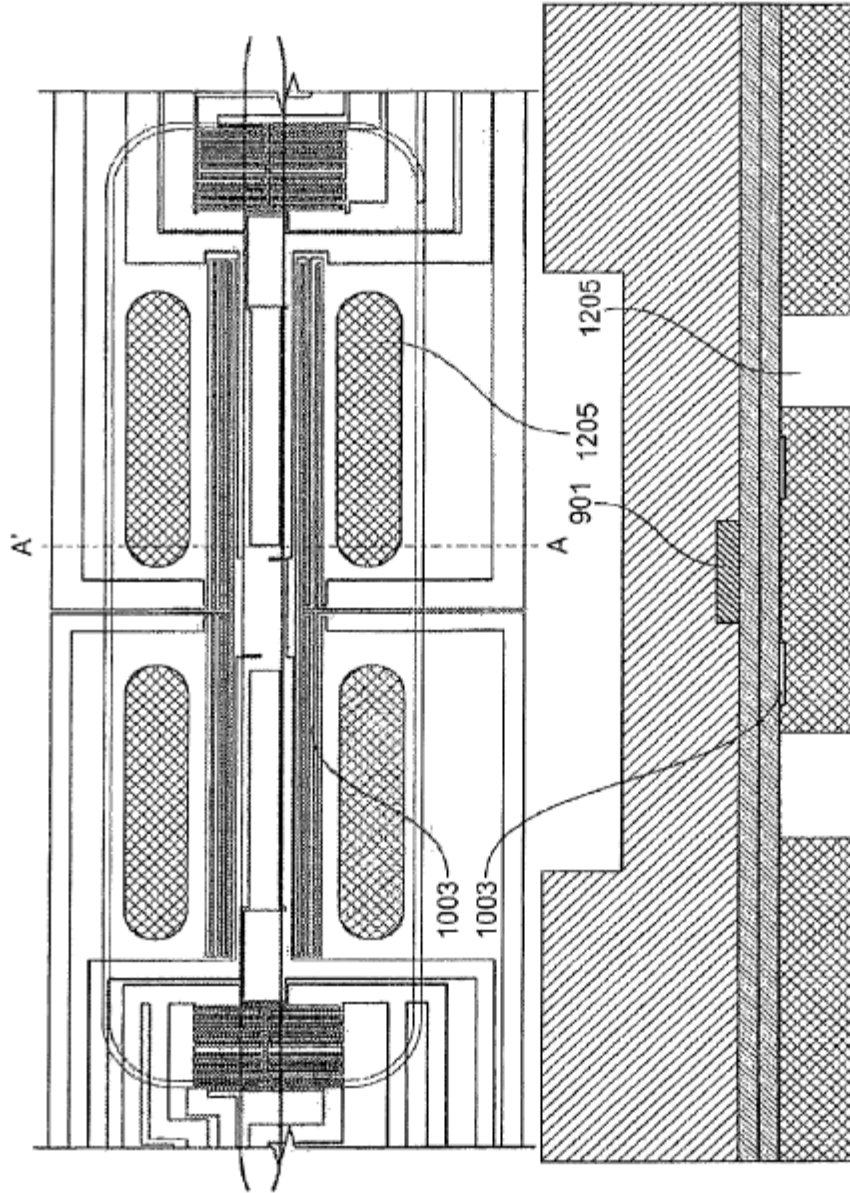


FIG. 51B

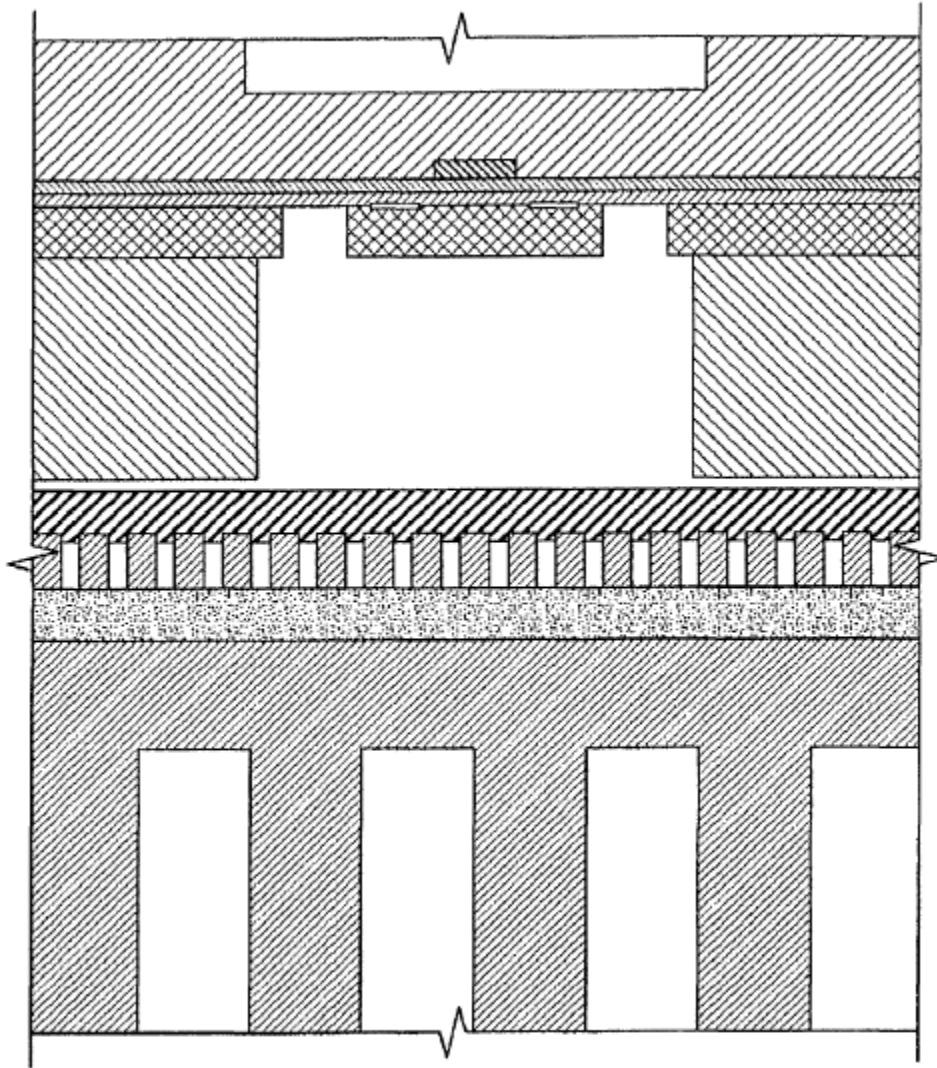


FIG. 51C

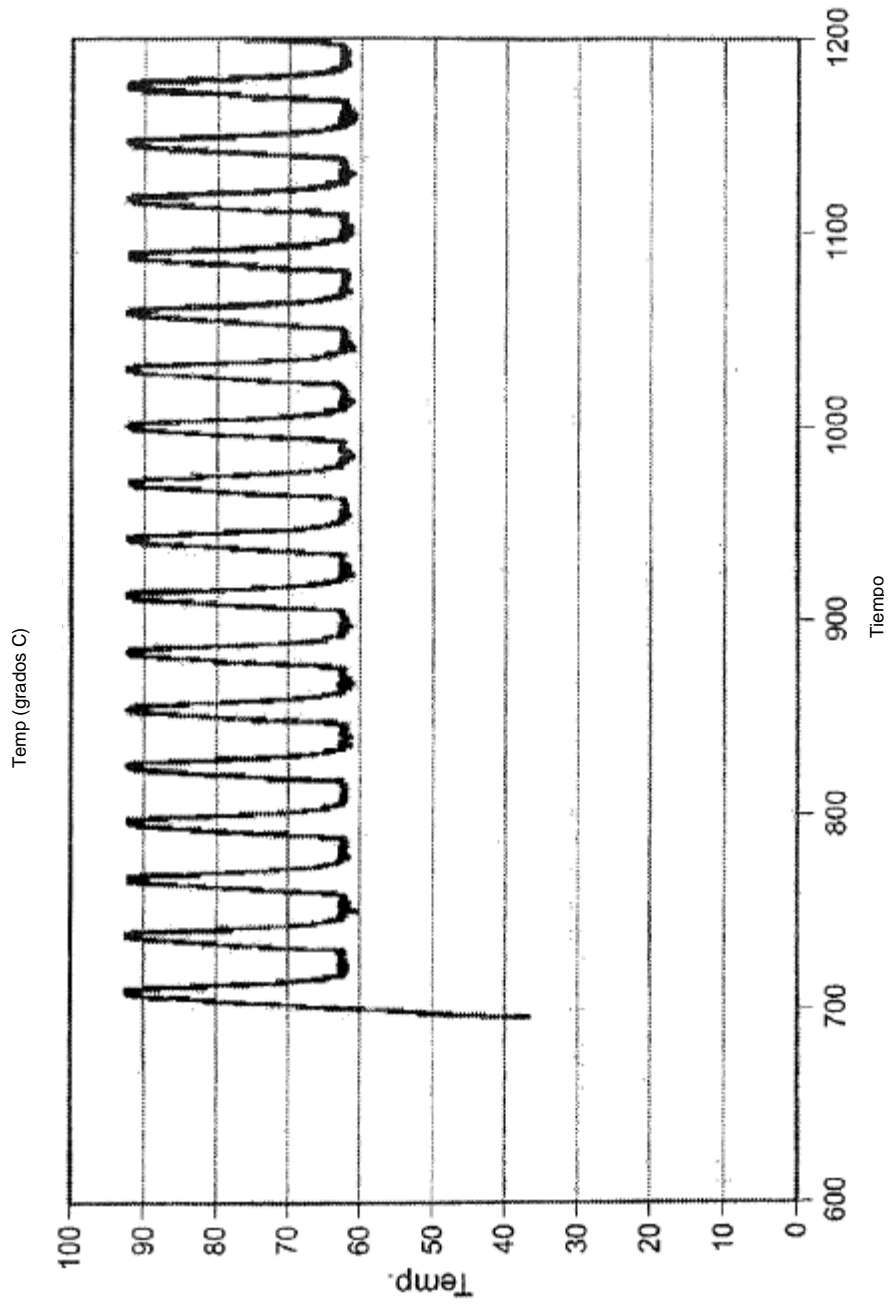


FIG. 52



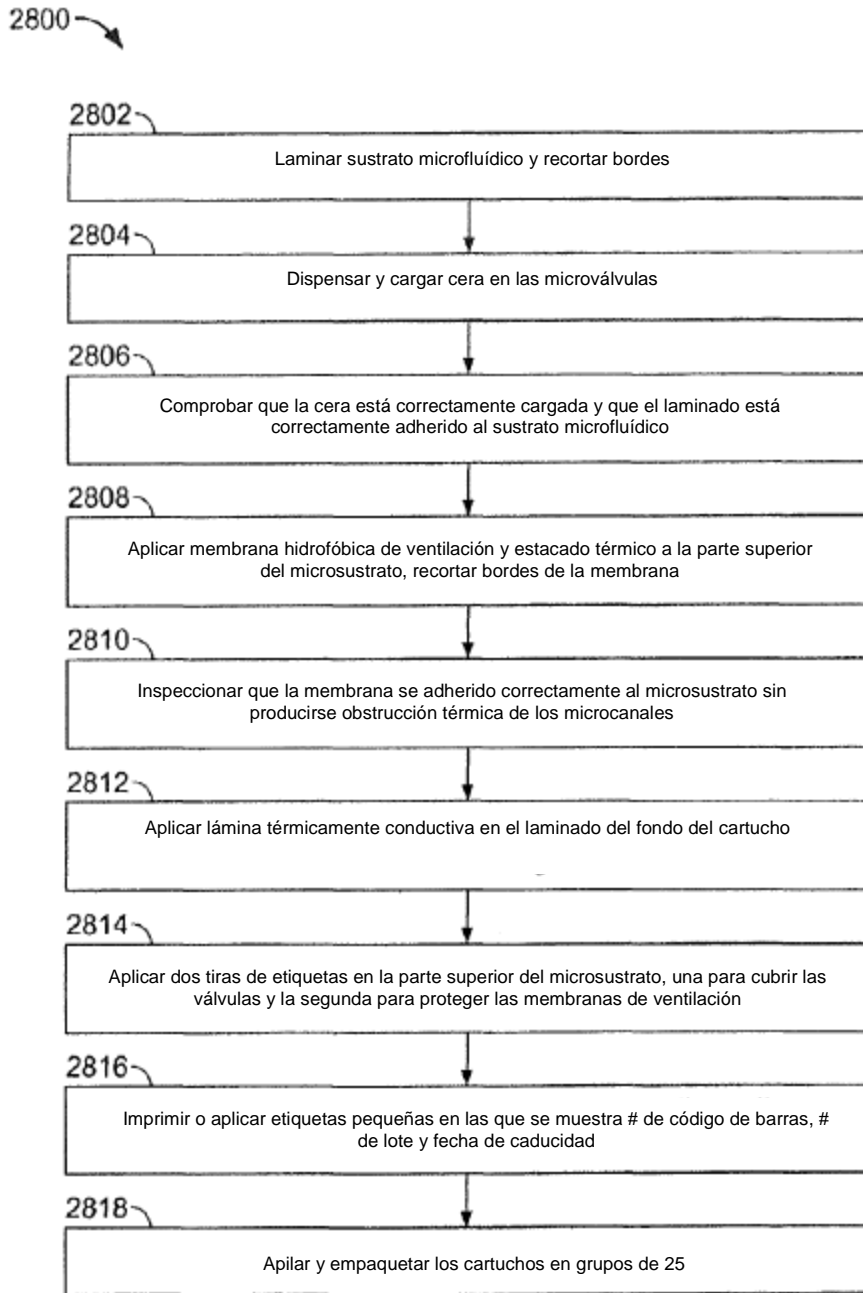


FIG. 53

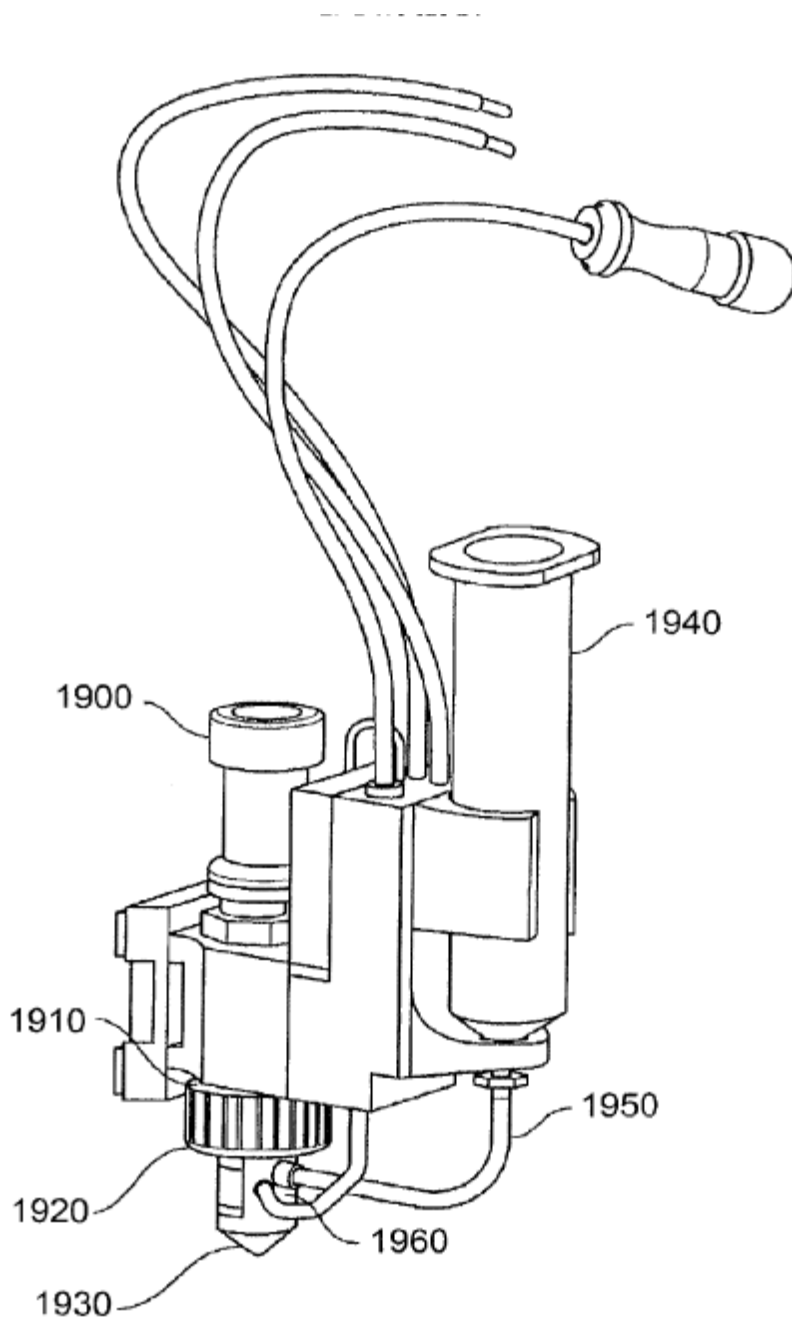


FIG. 54A

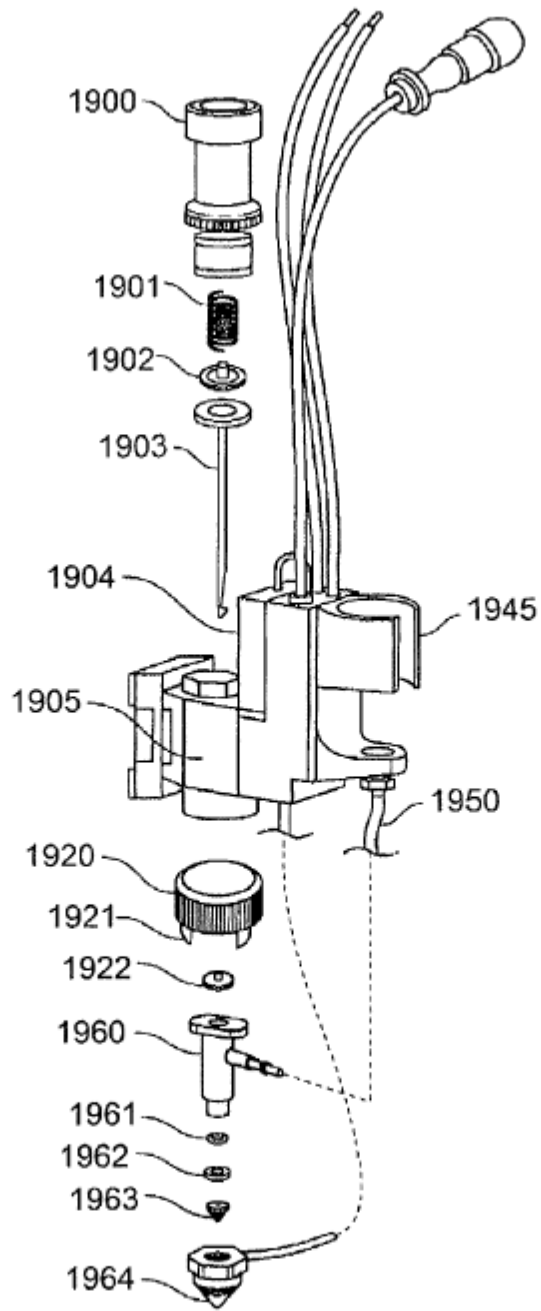


FIG. 54B

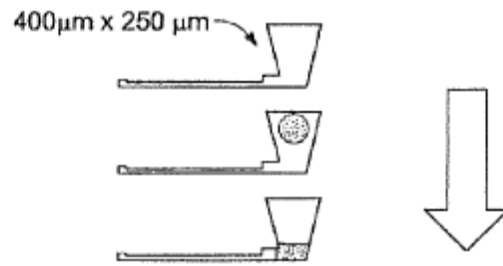
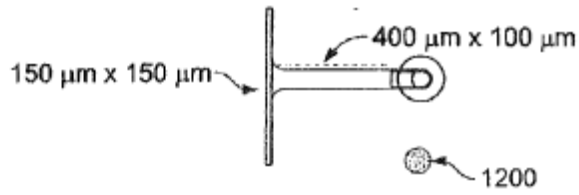


FIG. 55A

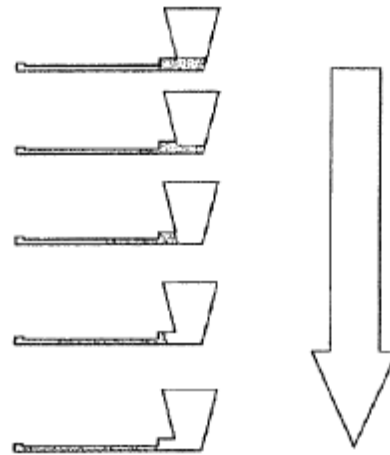


FIG. 55B

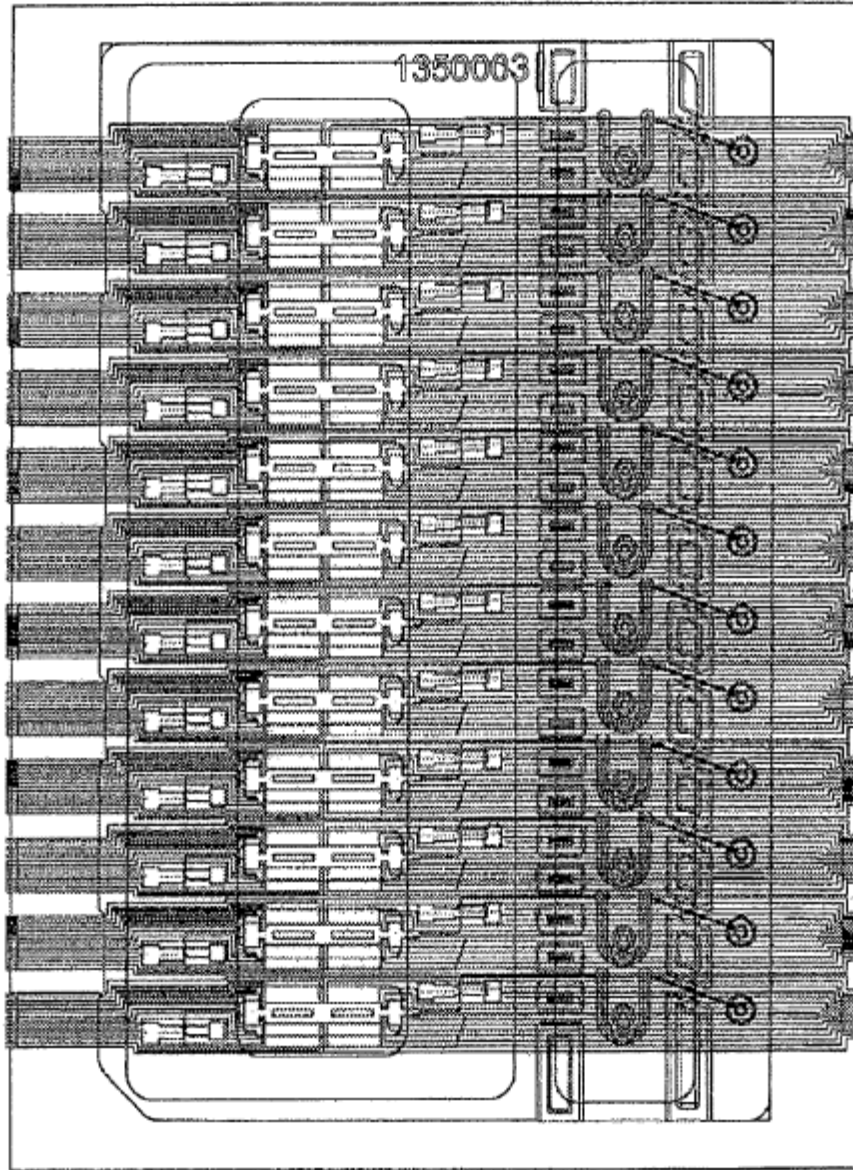


FIG. 56

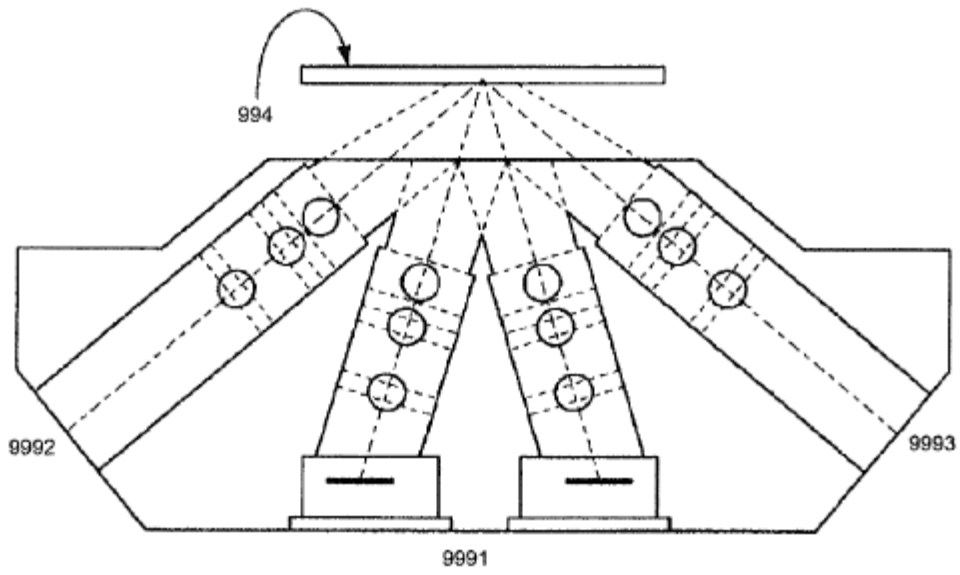


FIG. 57

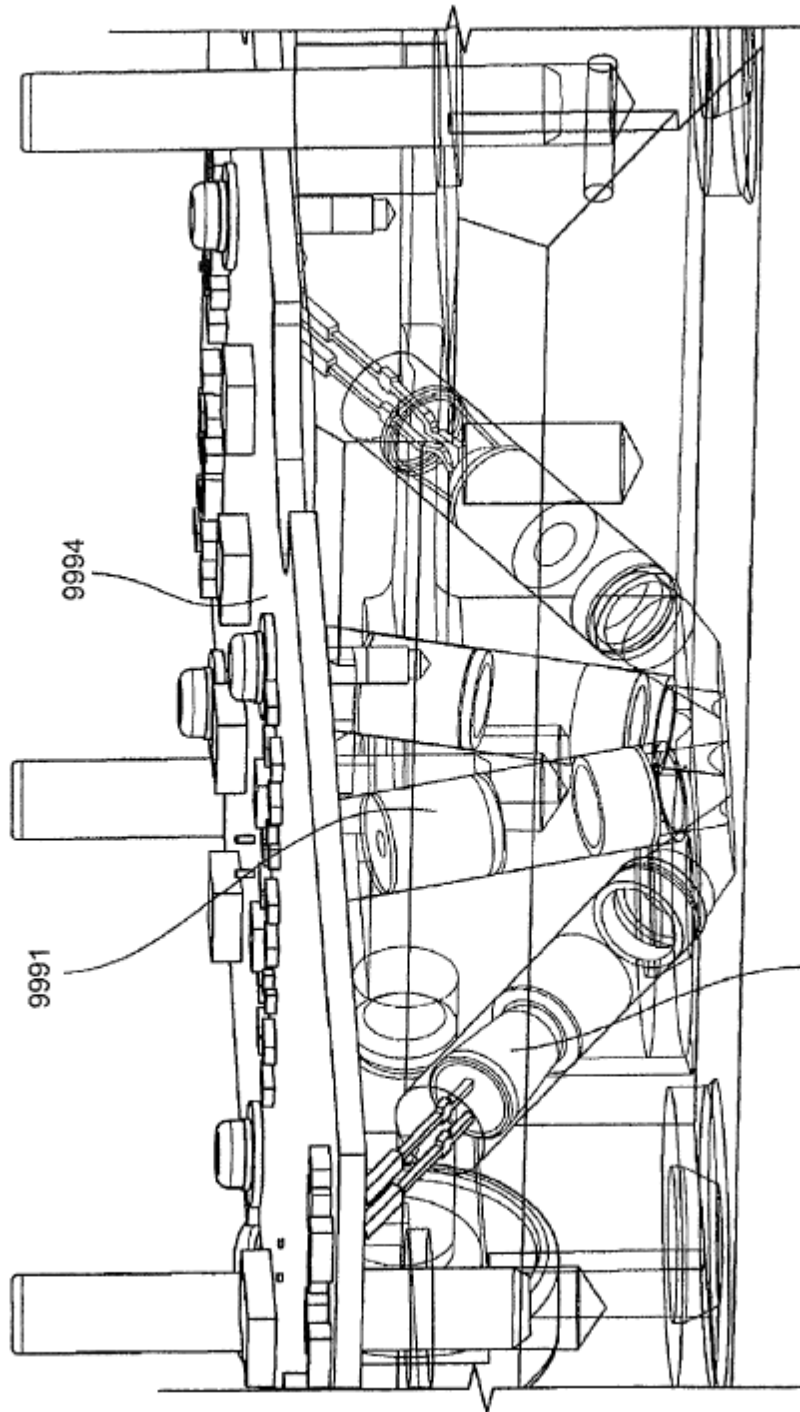


FIG. 58

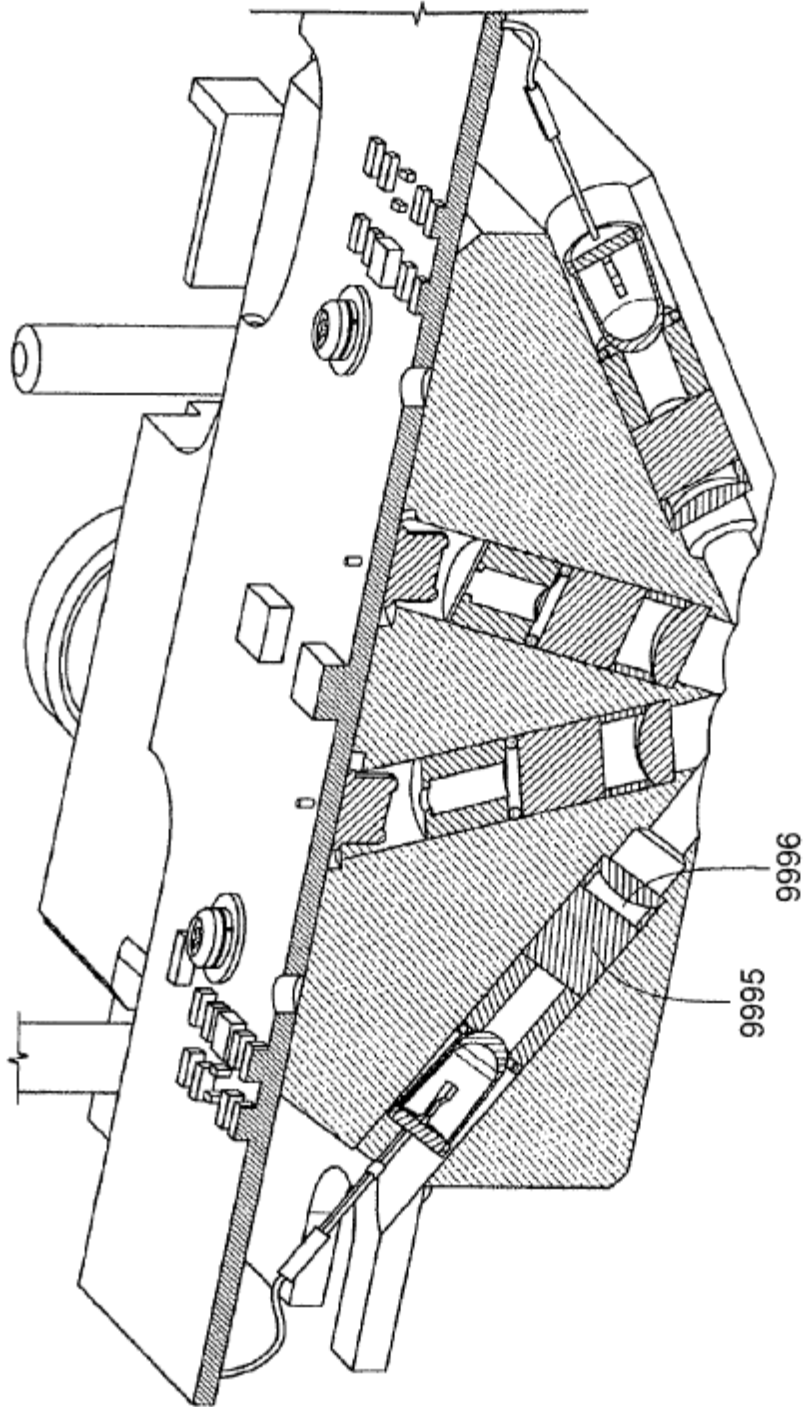


FIG. 59



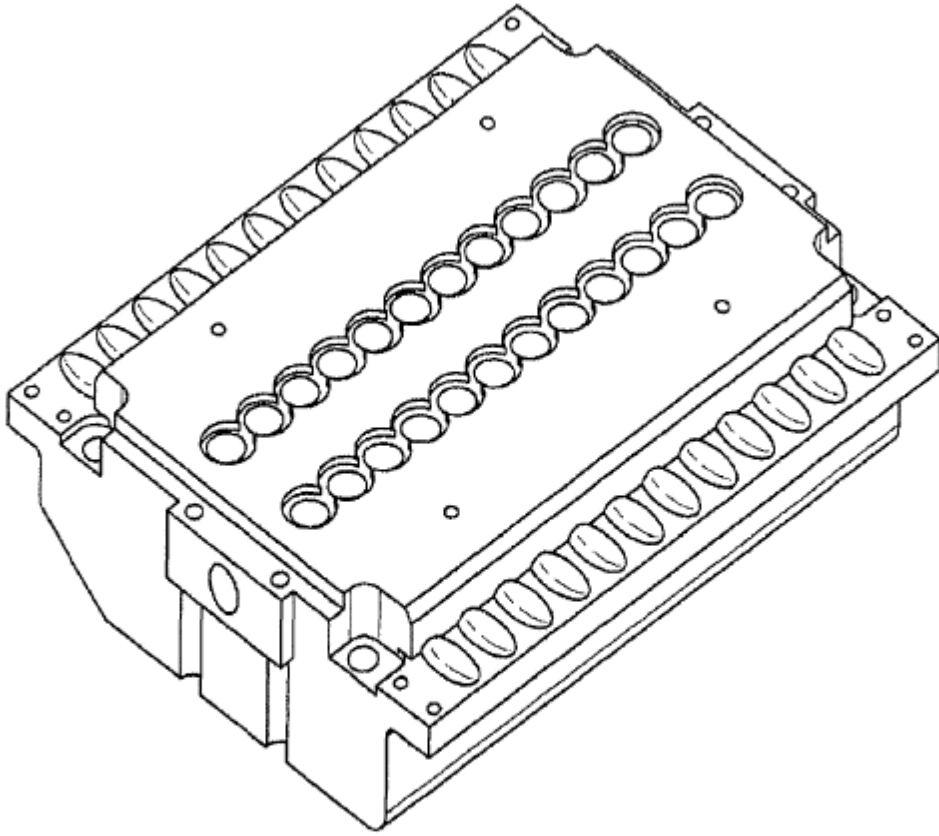


FIG. 60

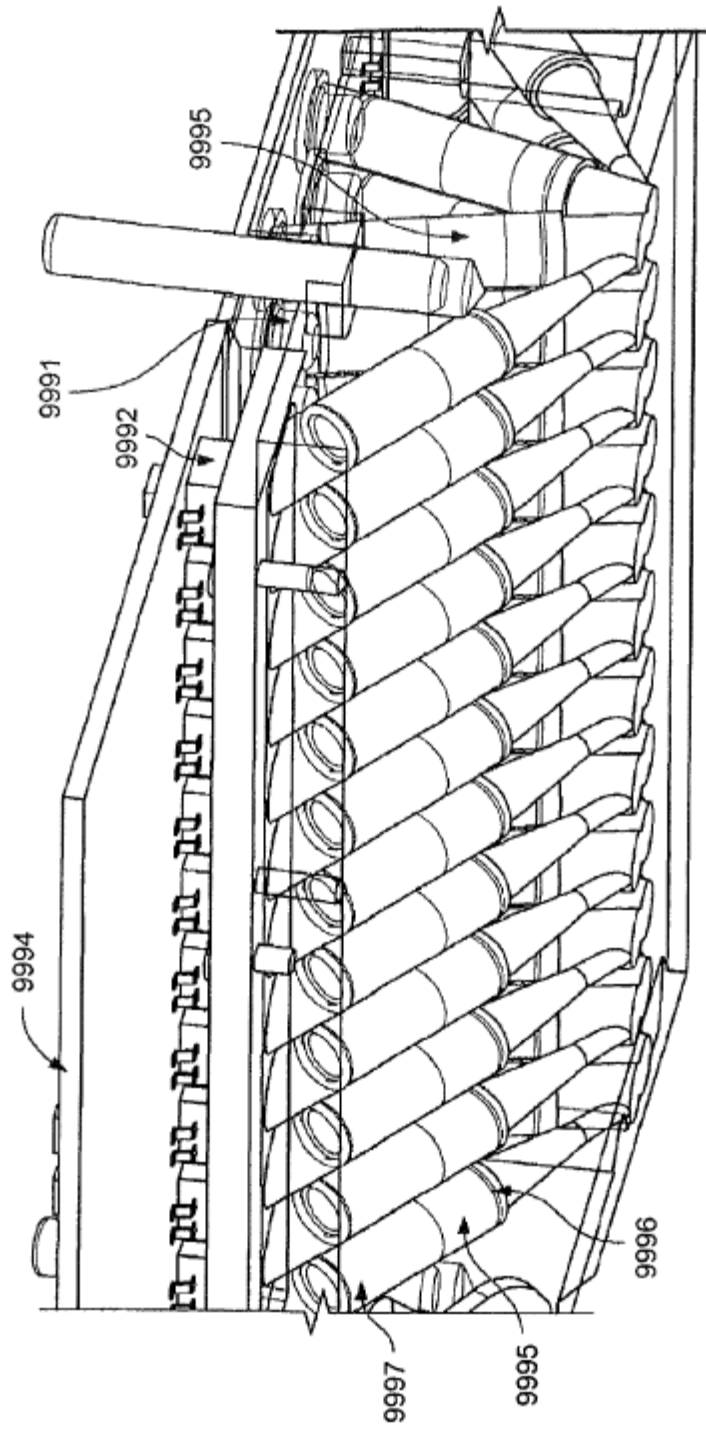


FIG. 61

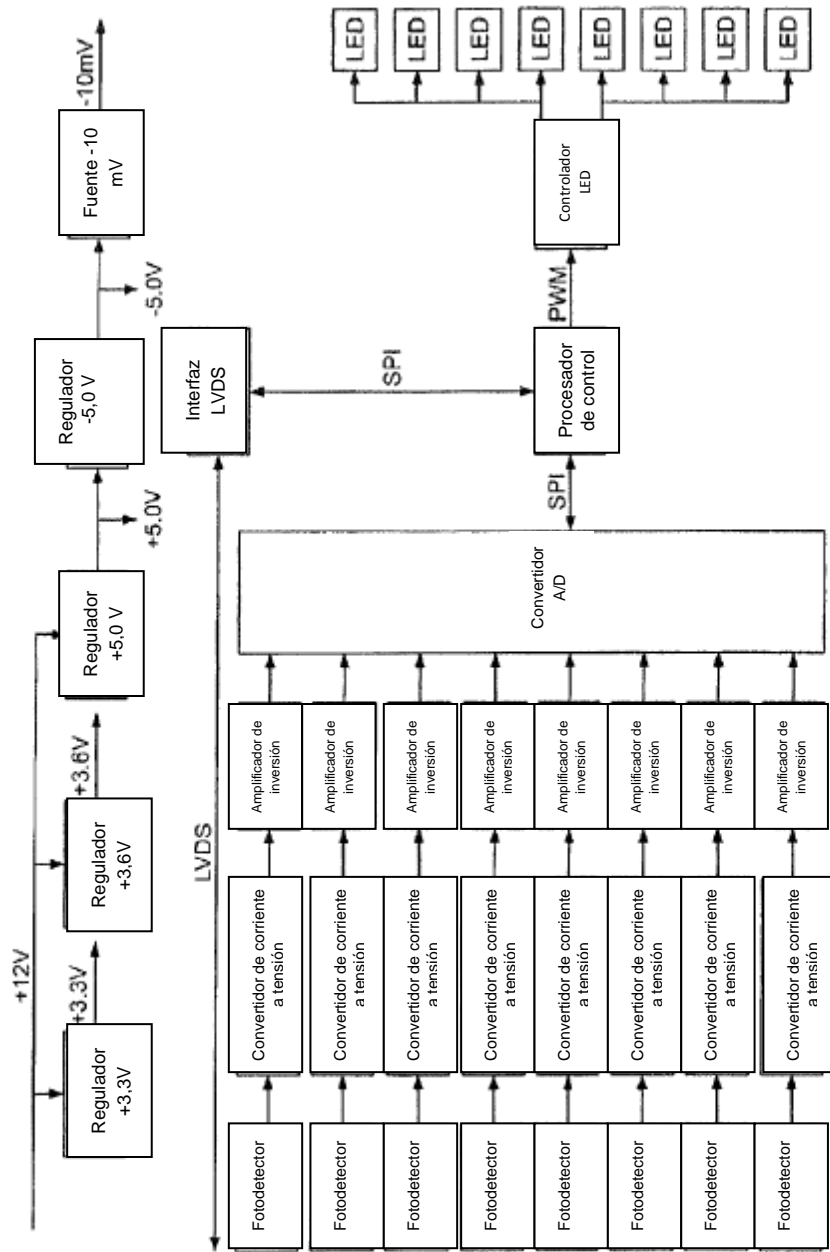


FIG. 62

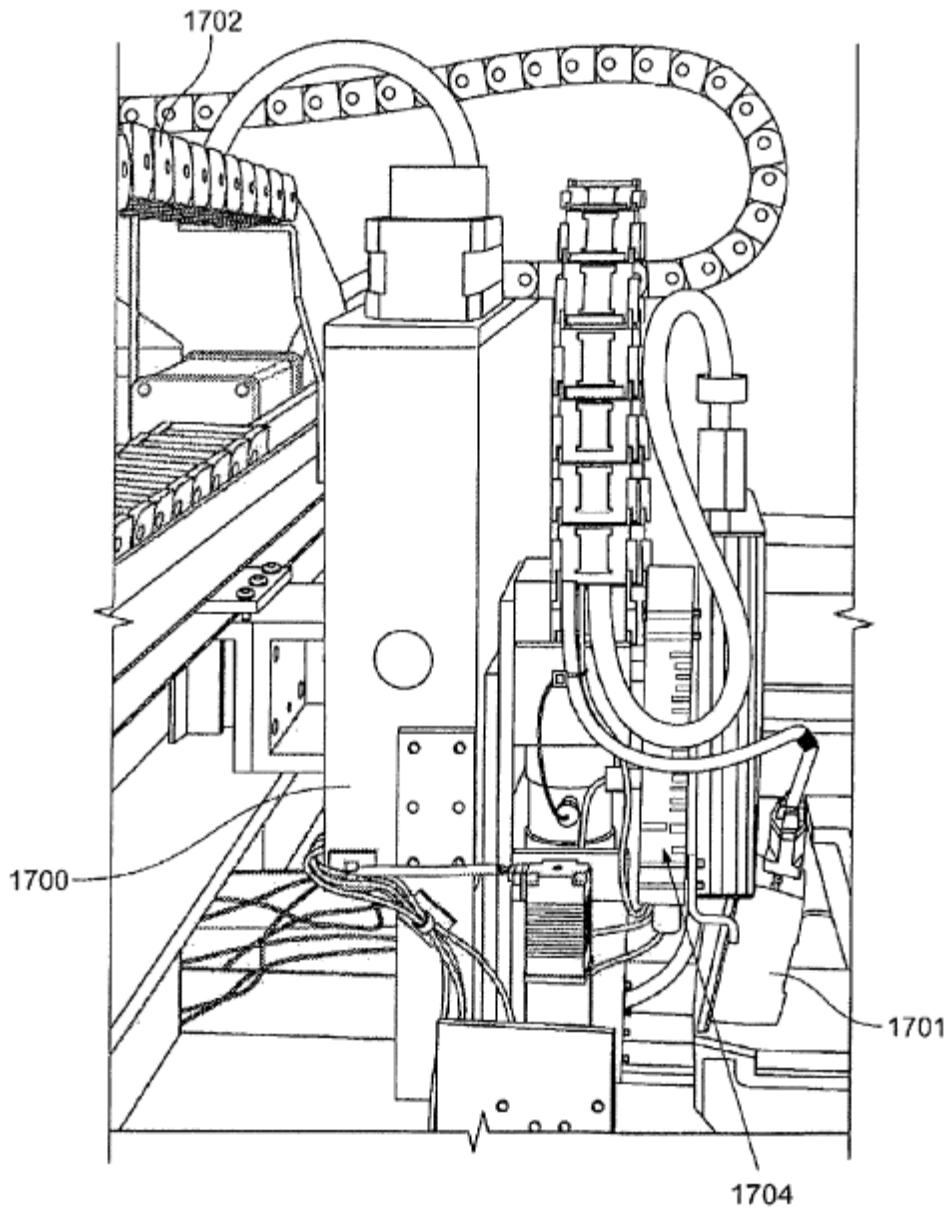


FIG. 63

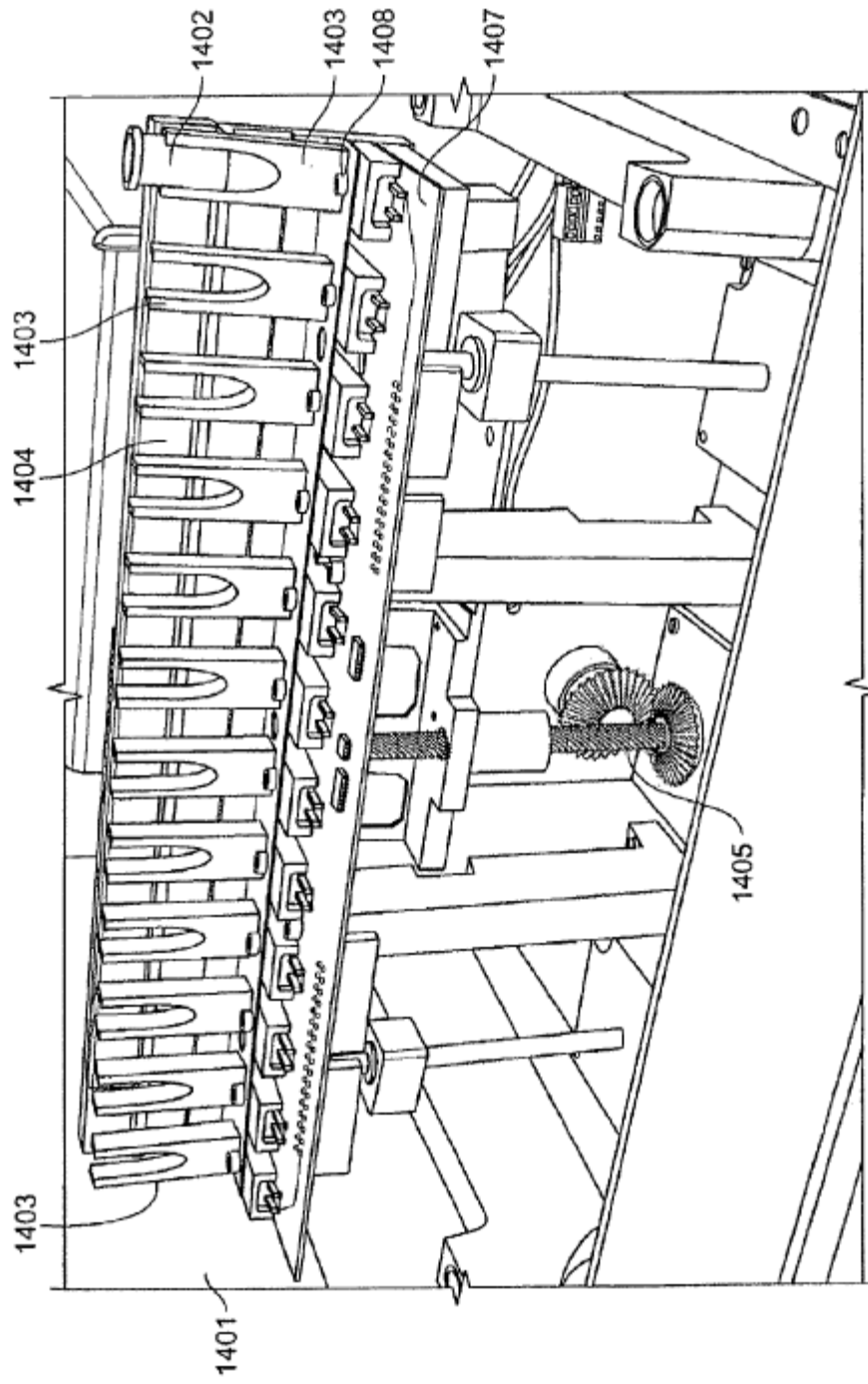


FIG. 64

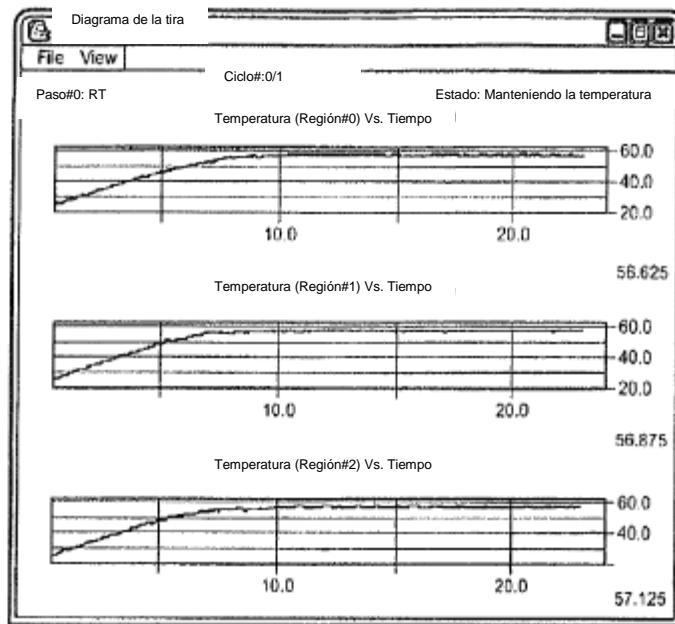


FIG. 65A

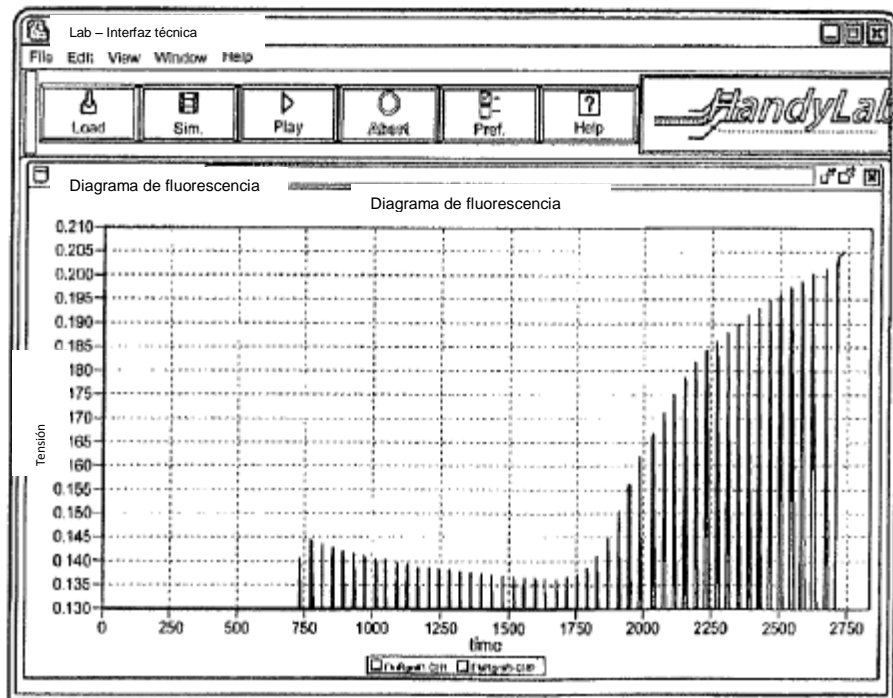


FIG. 65B

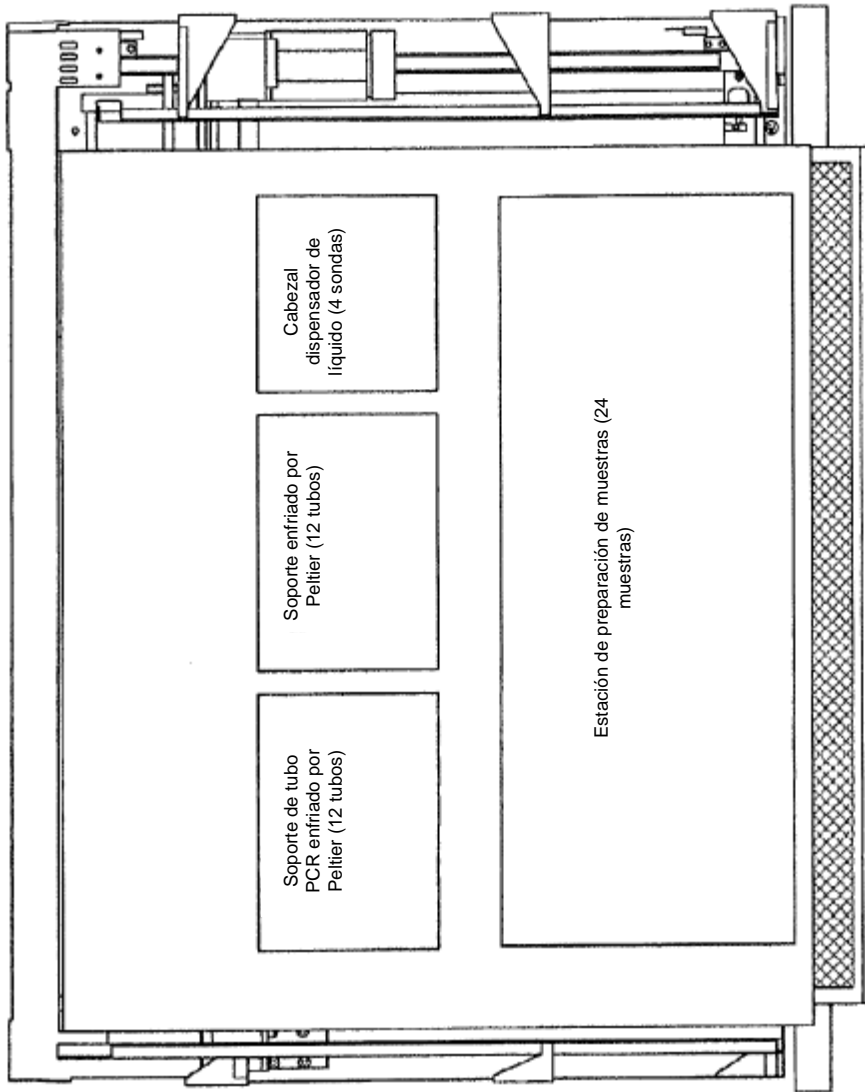
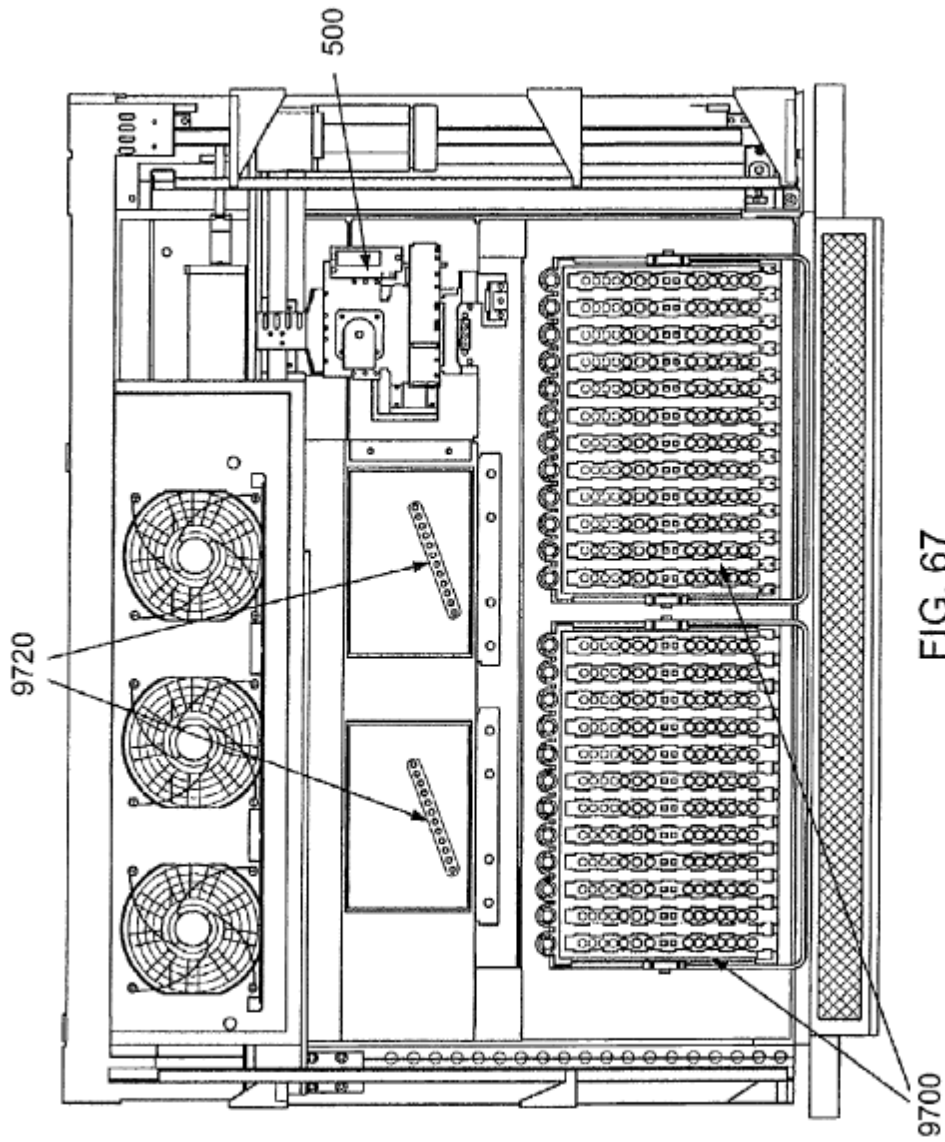


FIG. 66





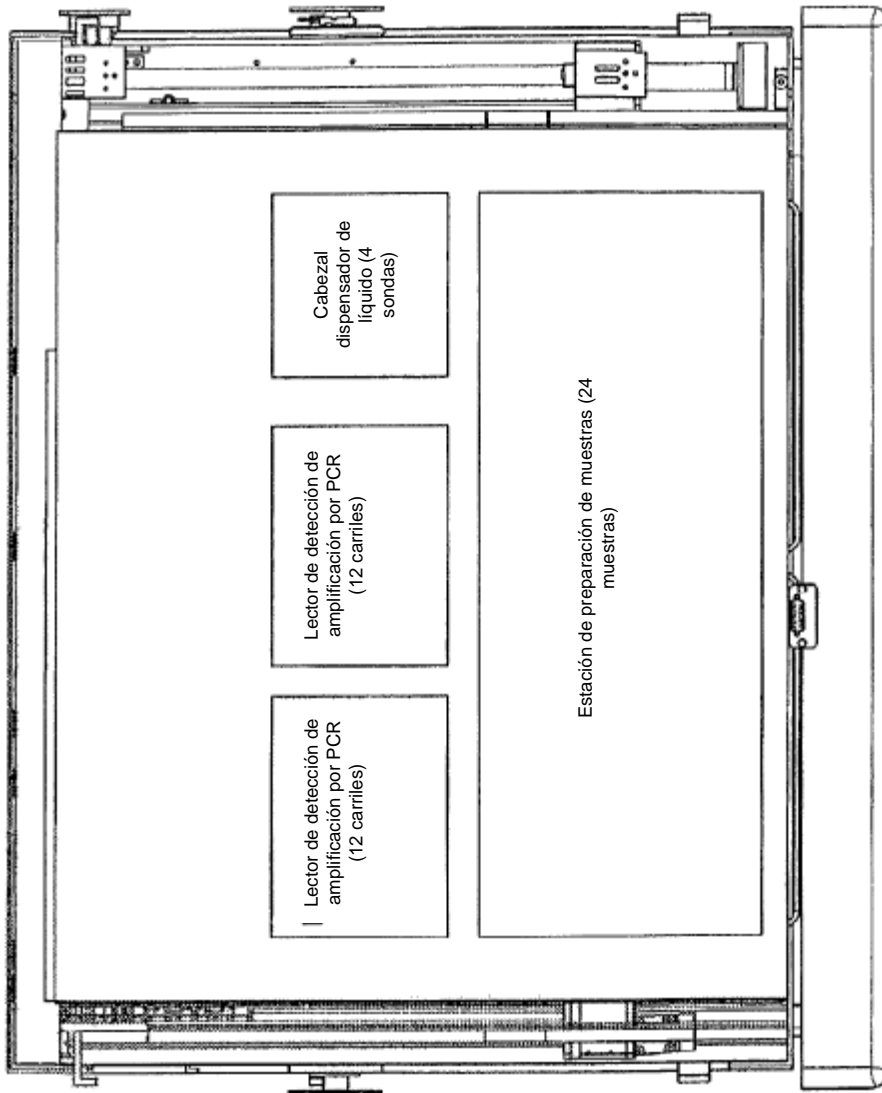


FIG. 68

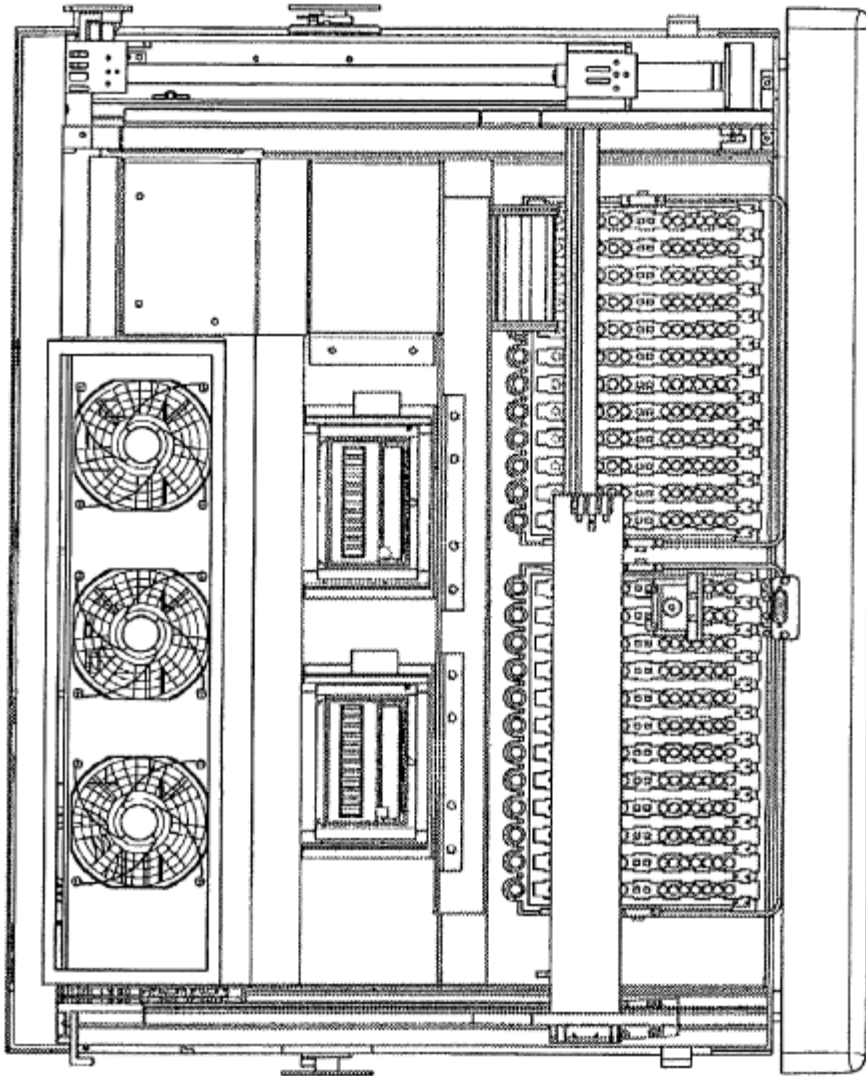


FIG. 69

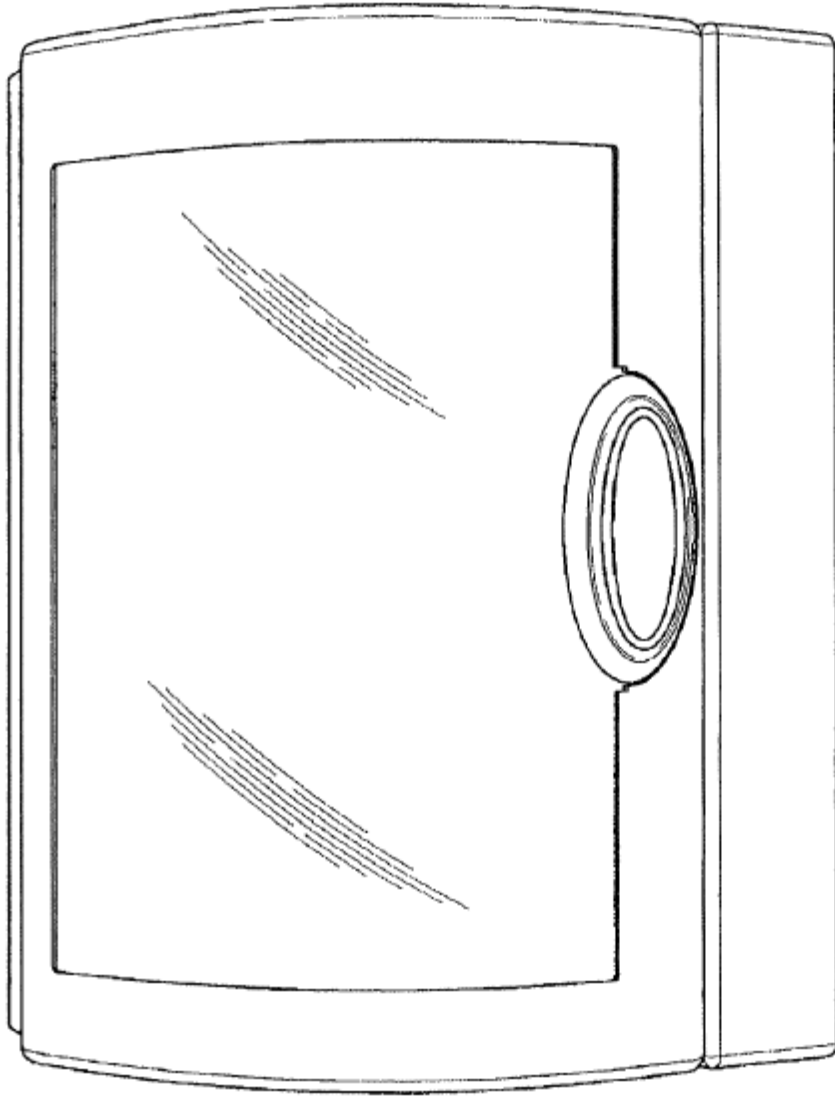


FIG. 70

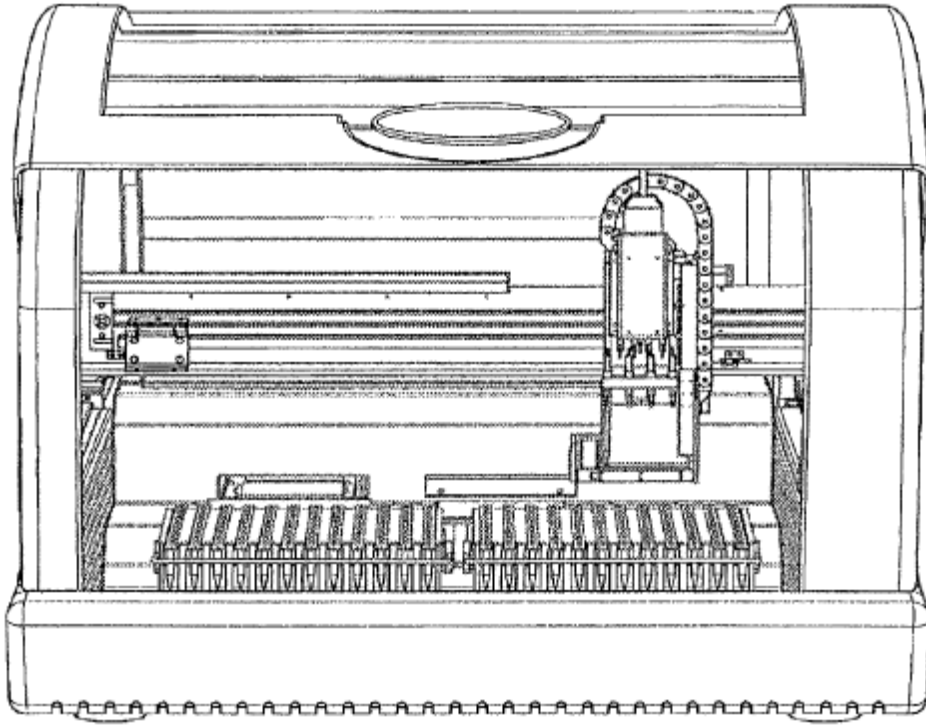


FIG. 71

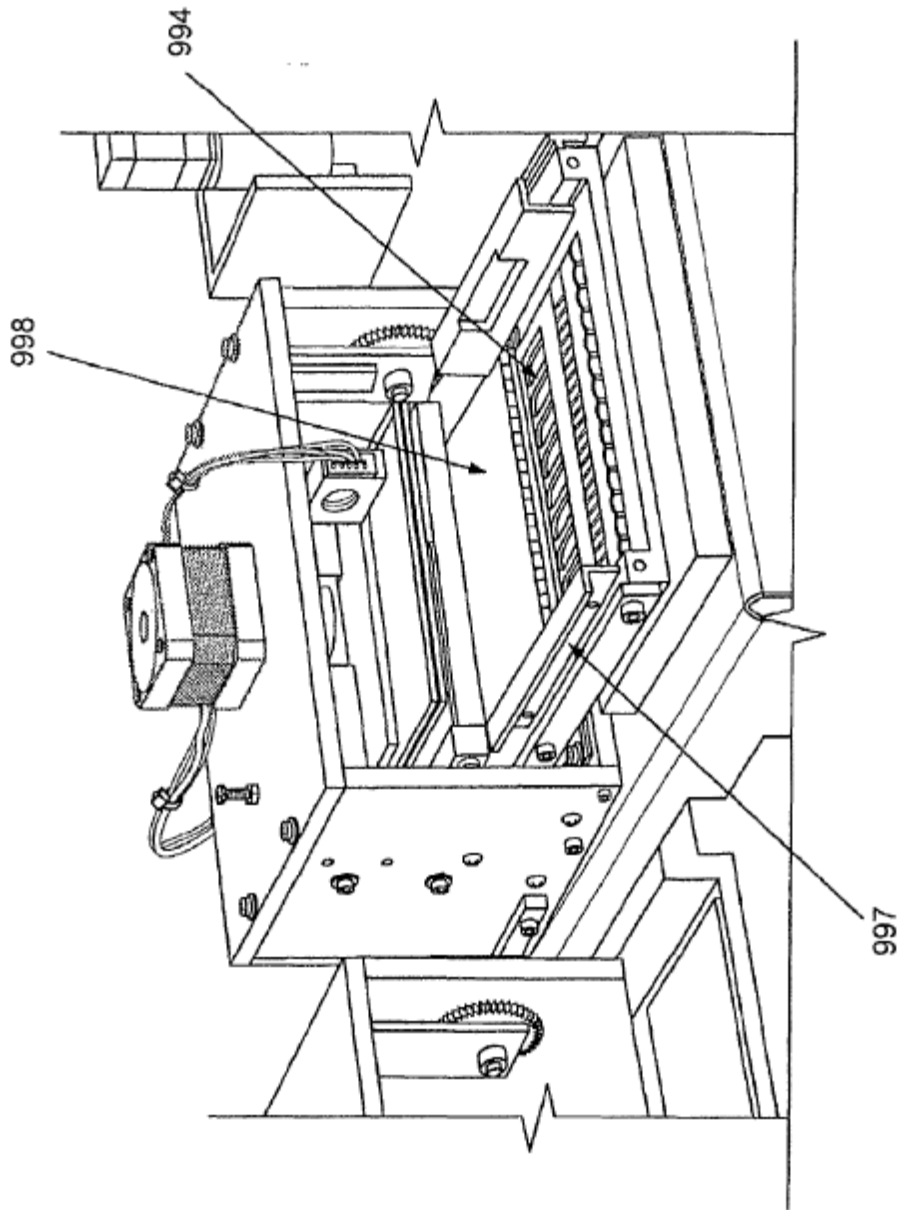


FIG. 72A

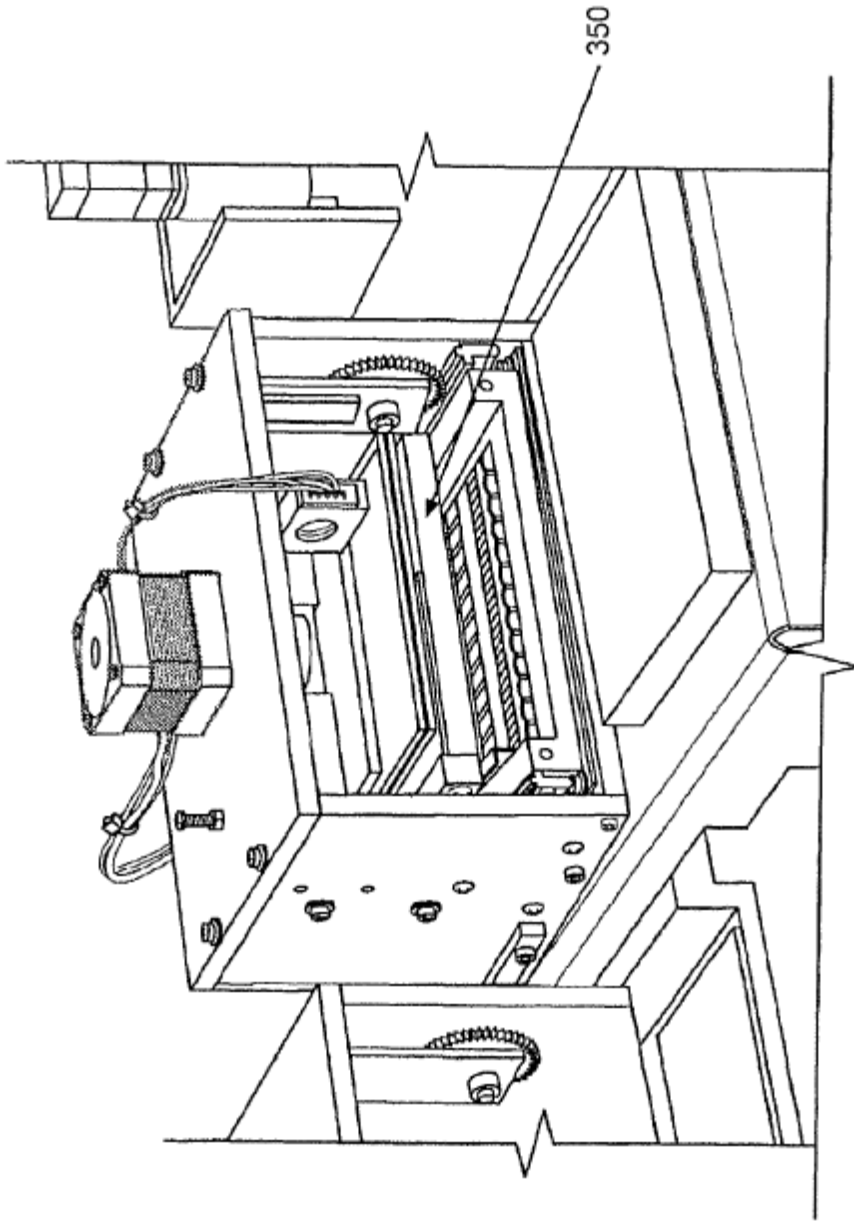


FIG. 72B

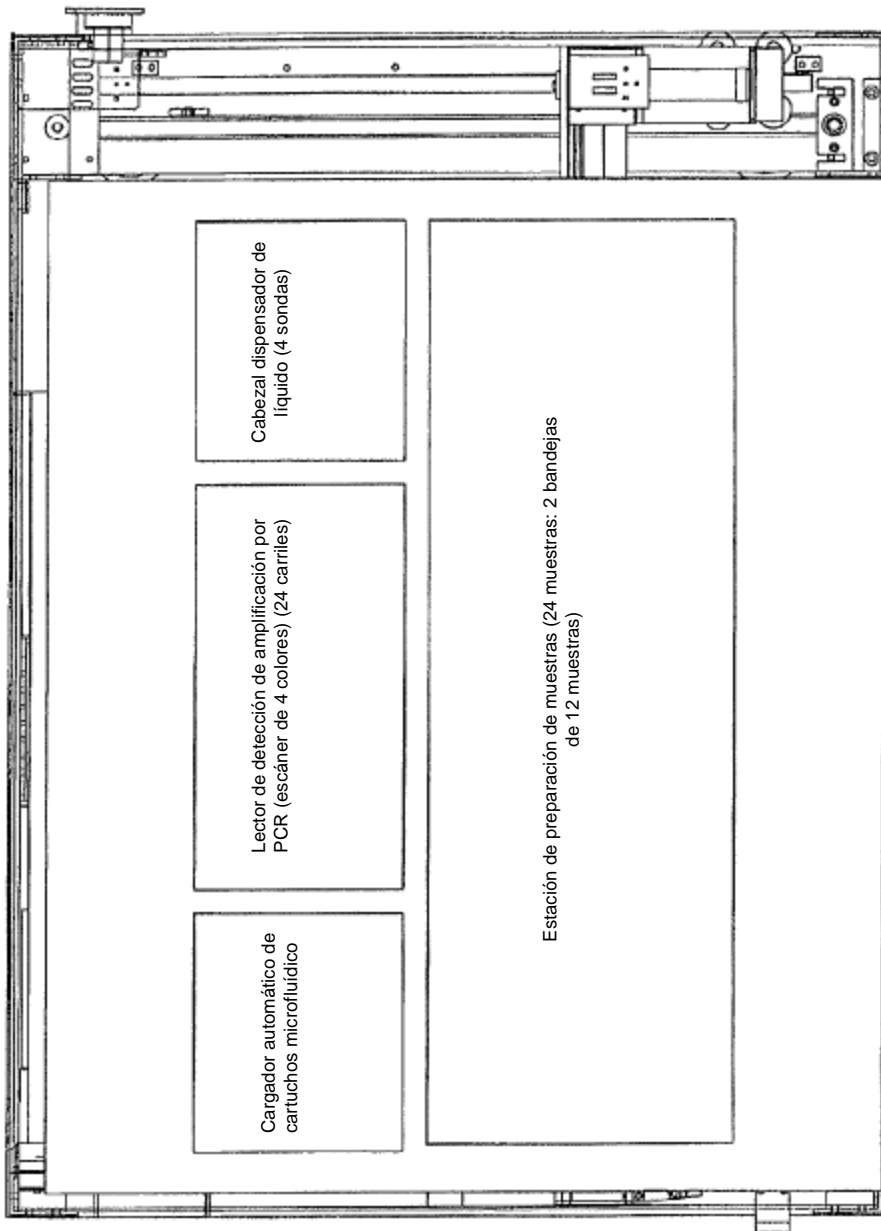


FIG. 73

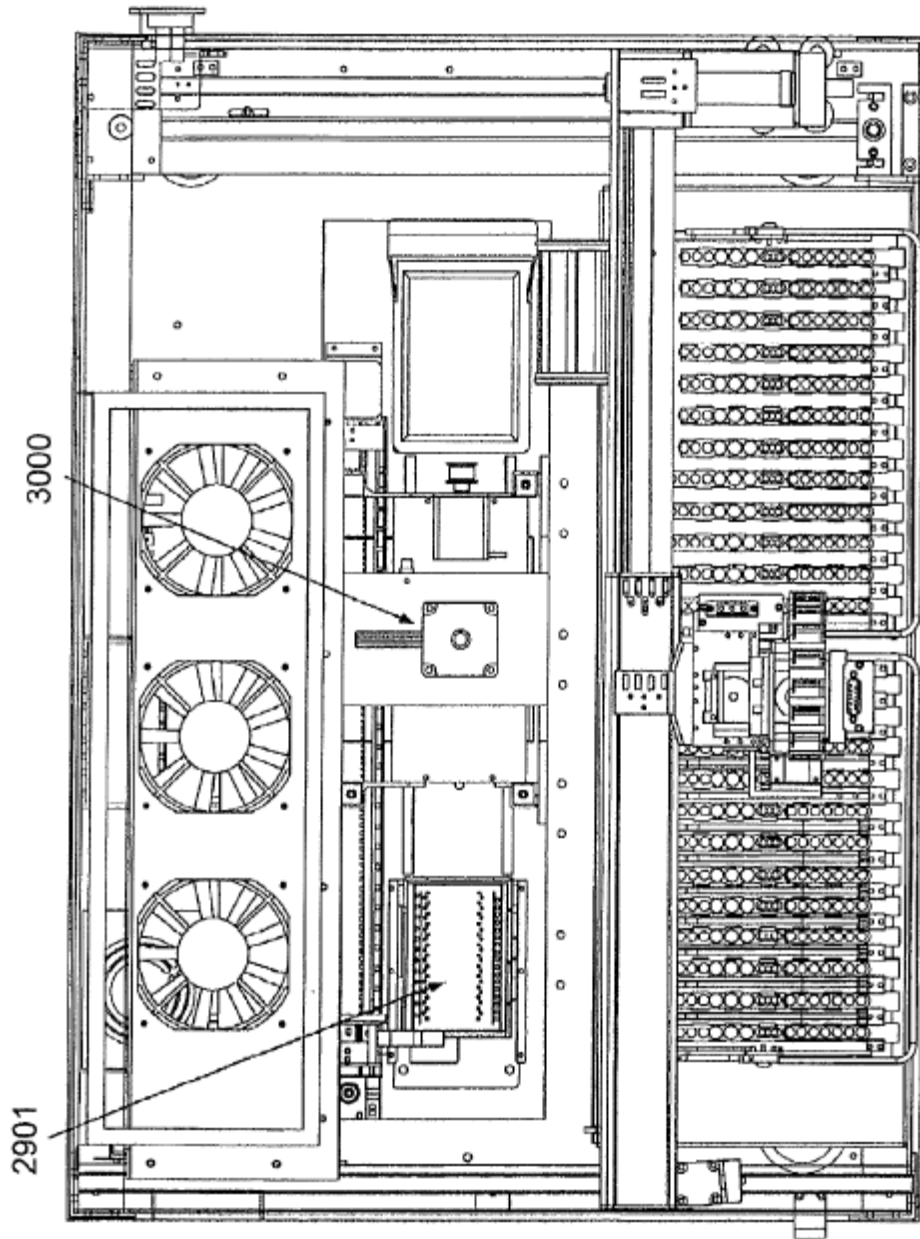


FIG. 74



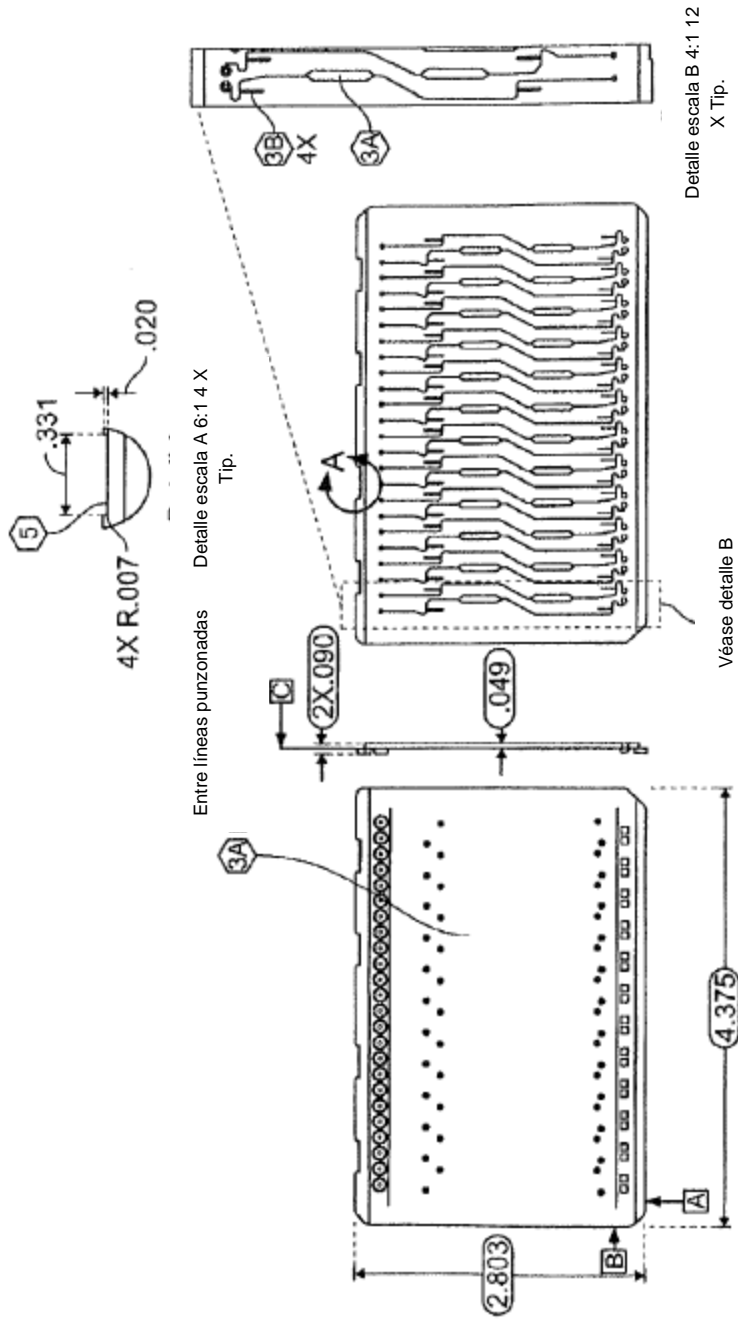


FIG. 75

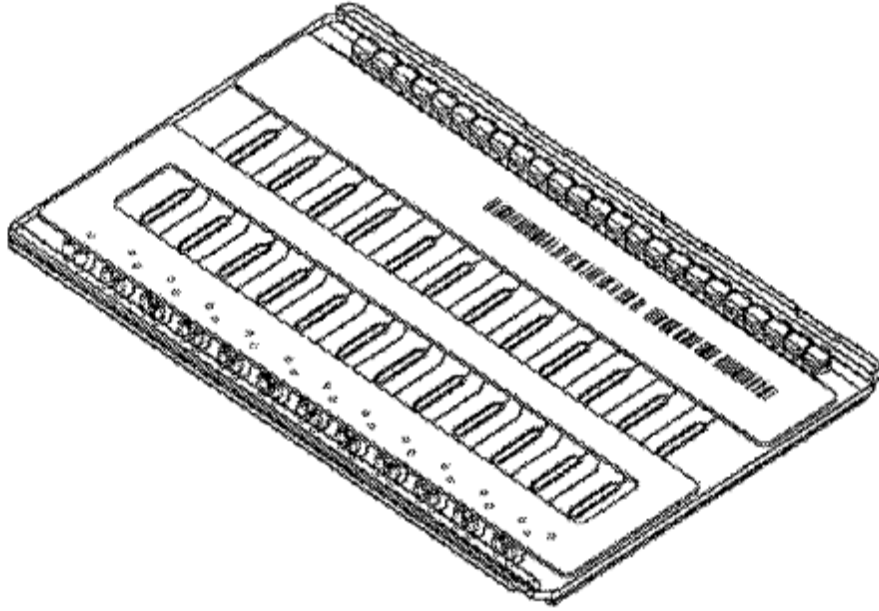


FIG. 76

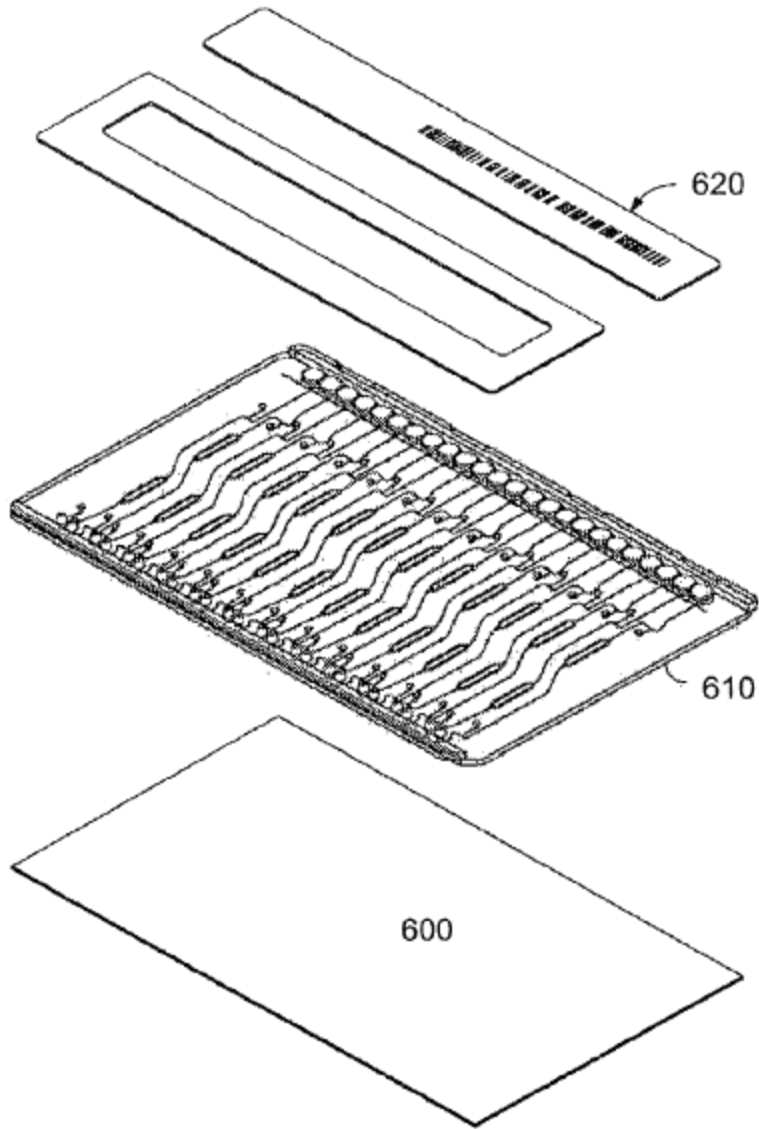


FIG. 77

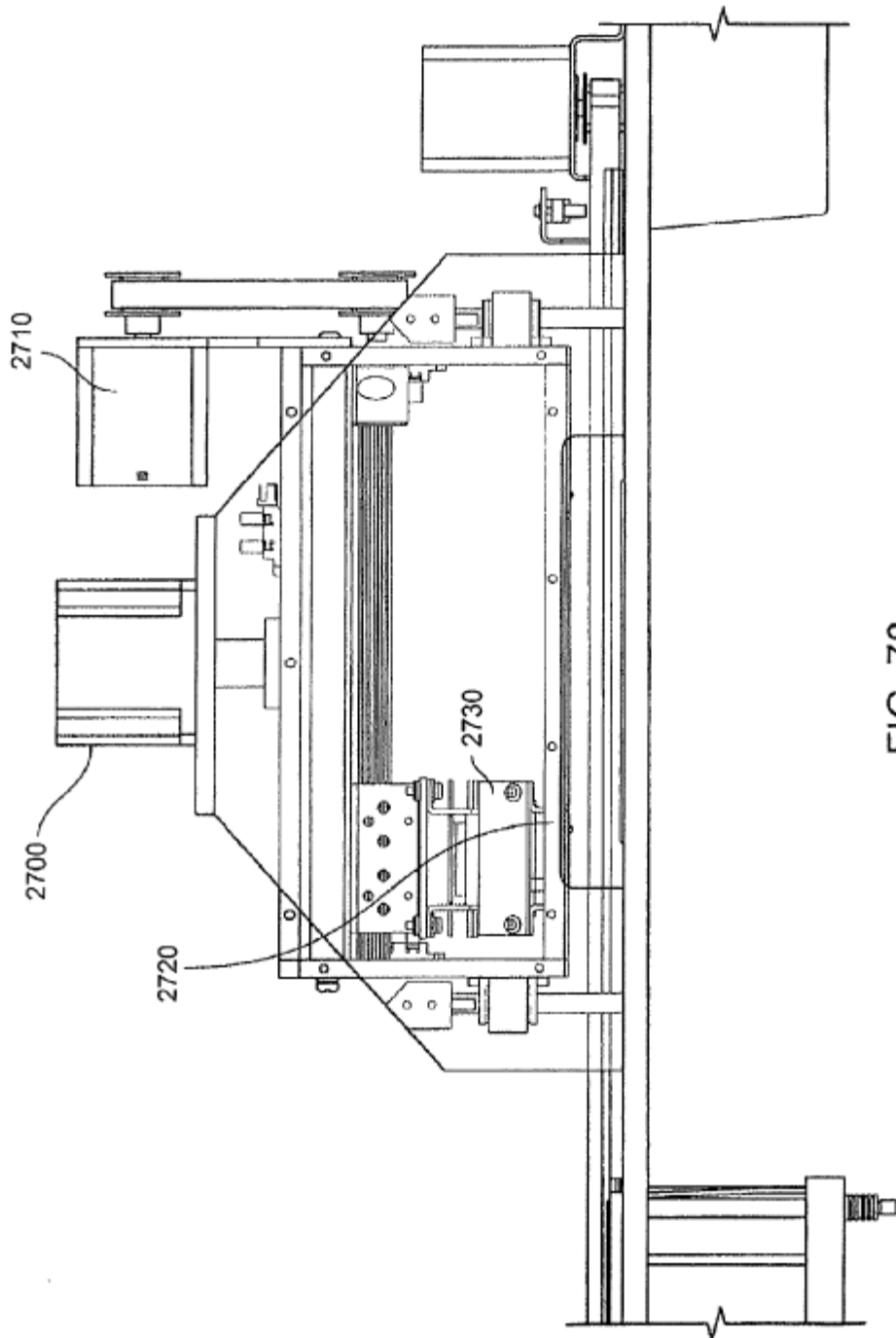


FIG. 78

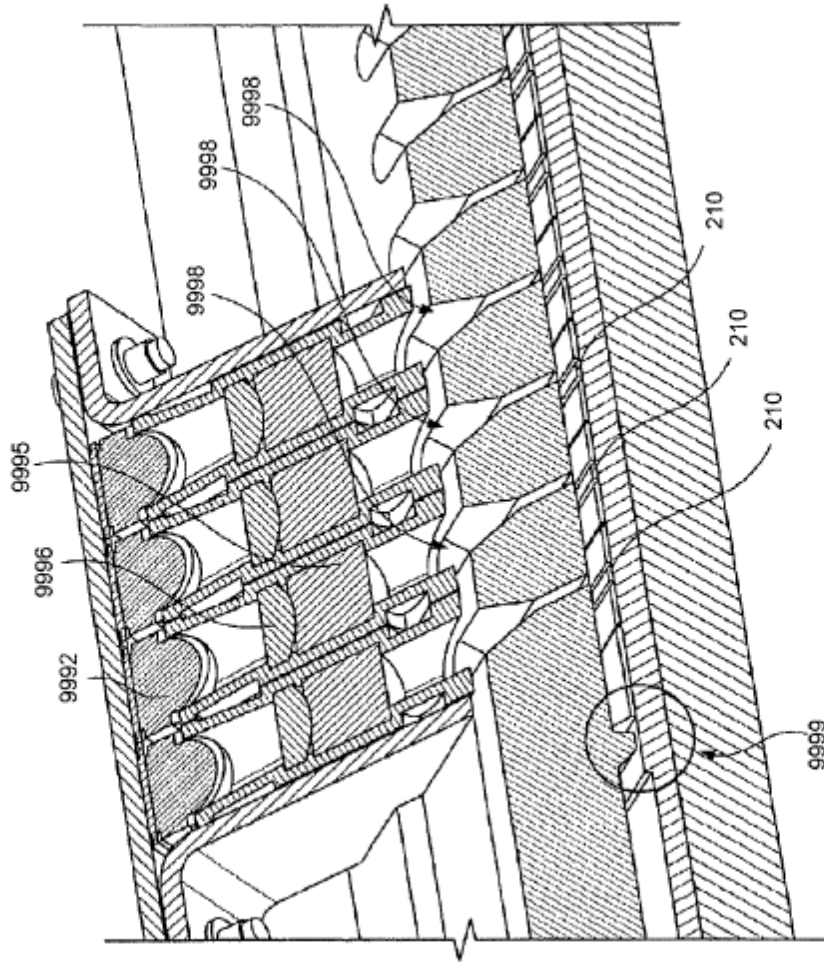
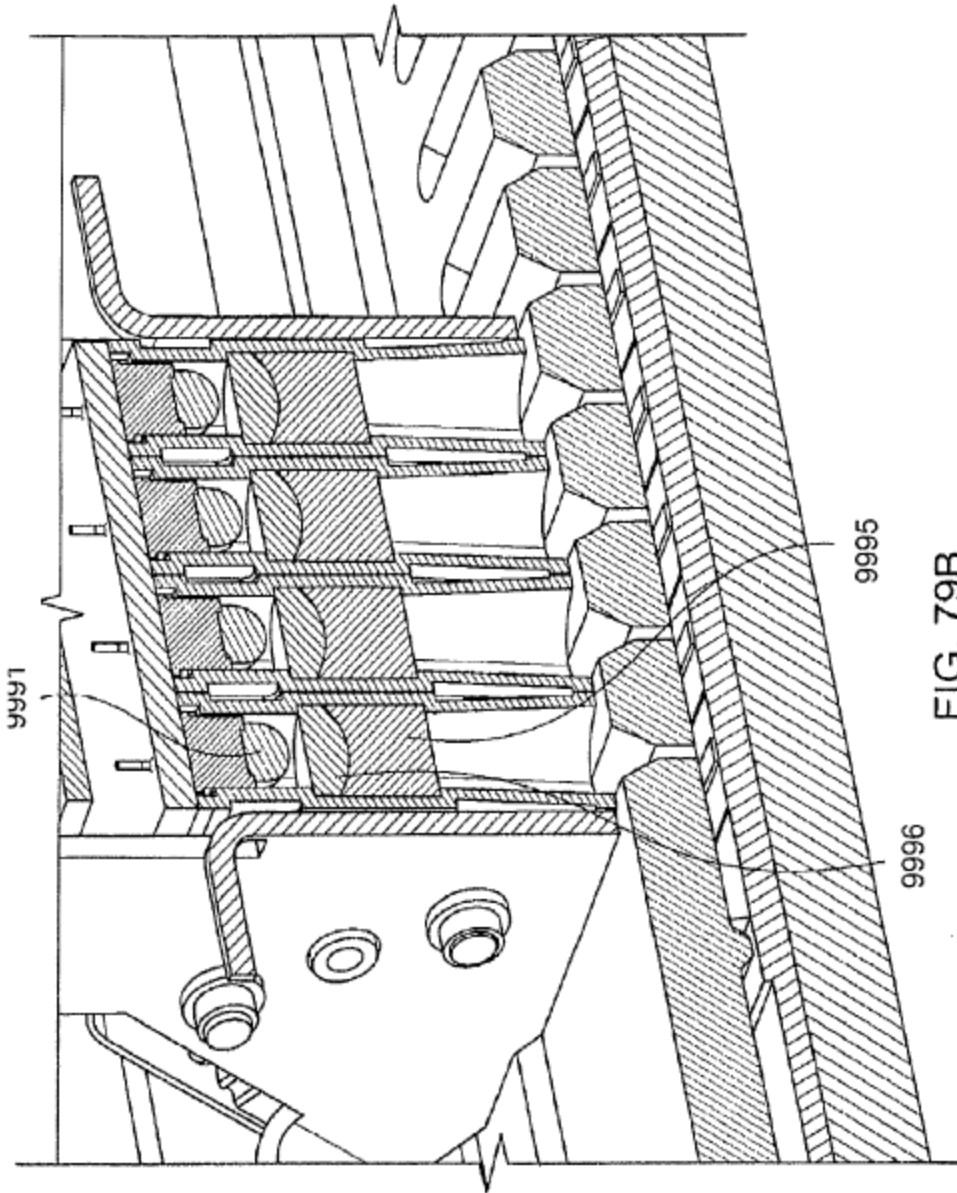
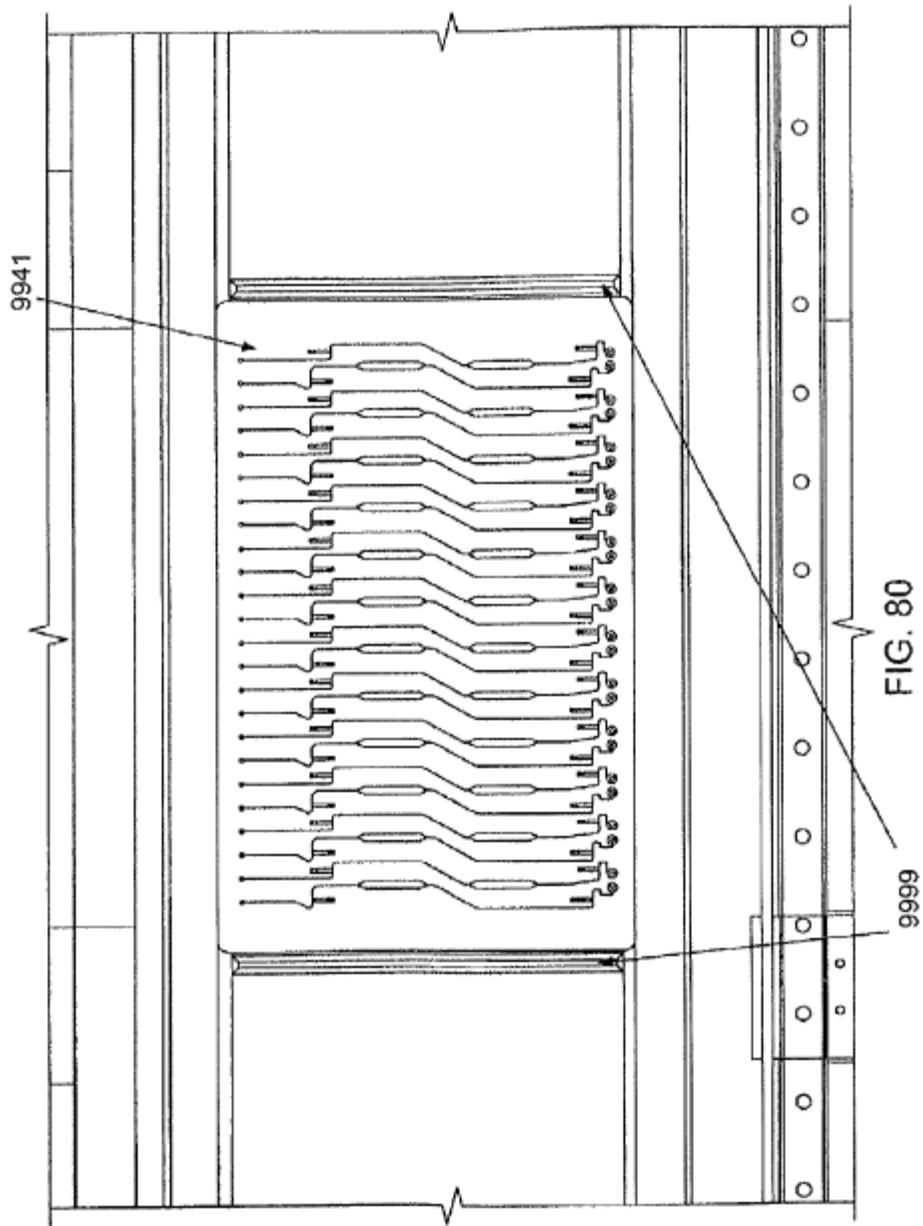


FIG. 79A





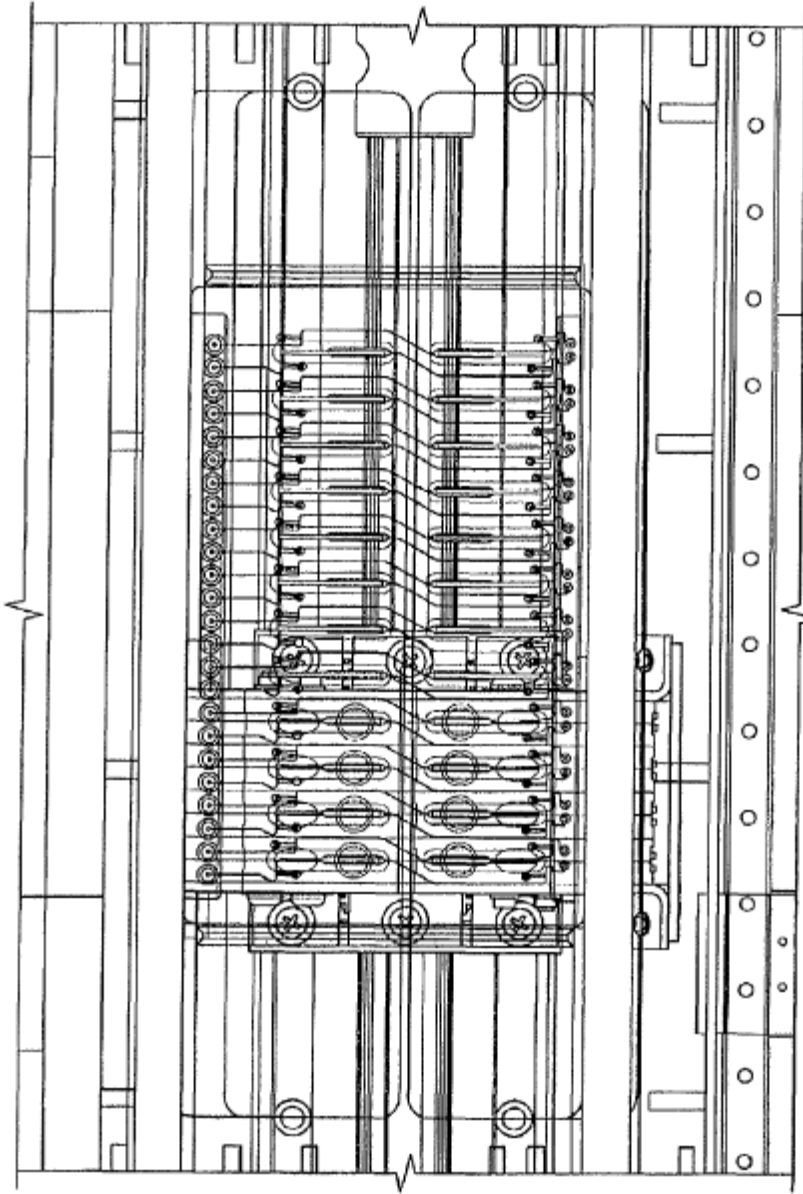


FIG. 81



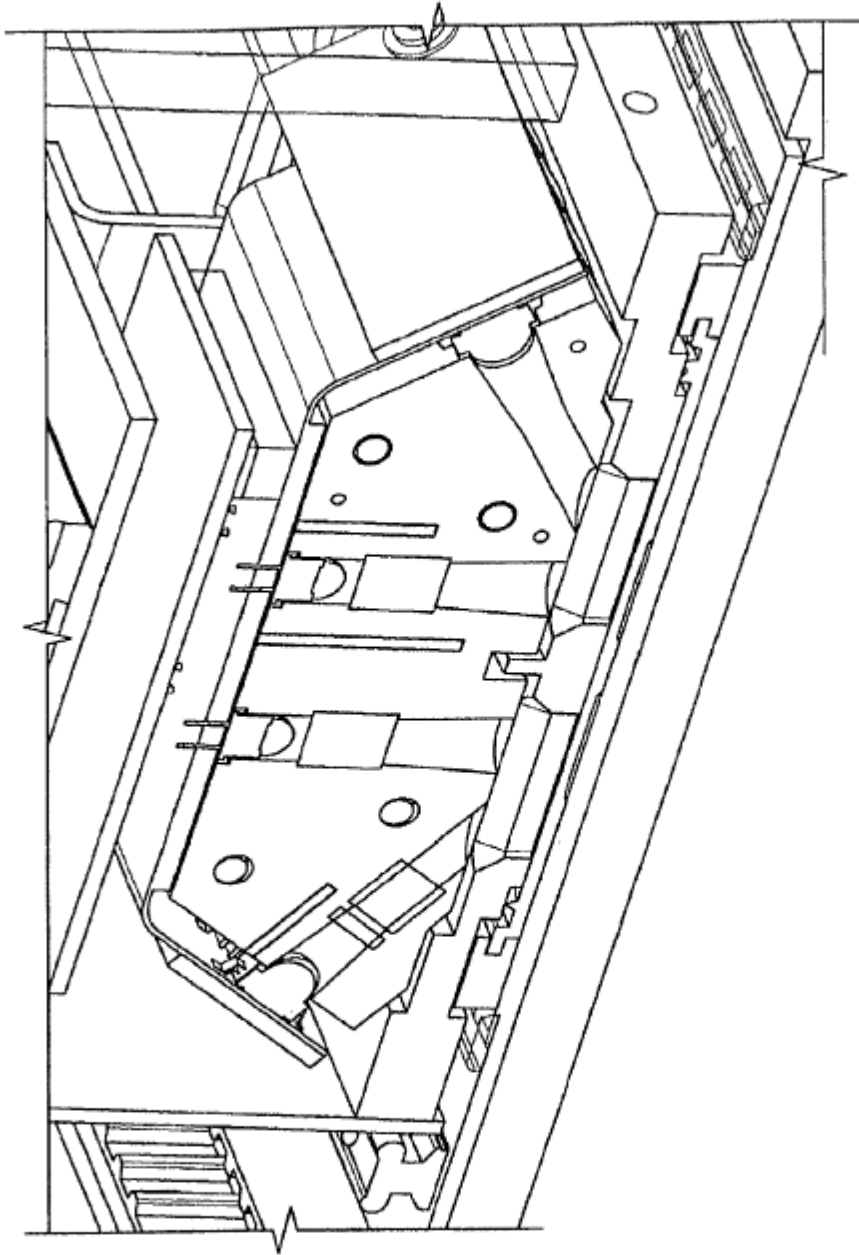


FIG. 82

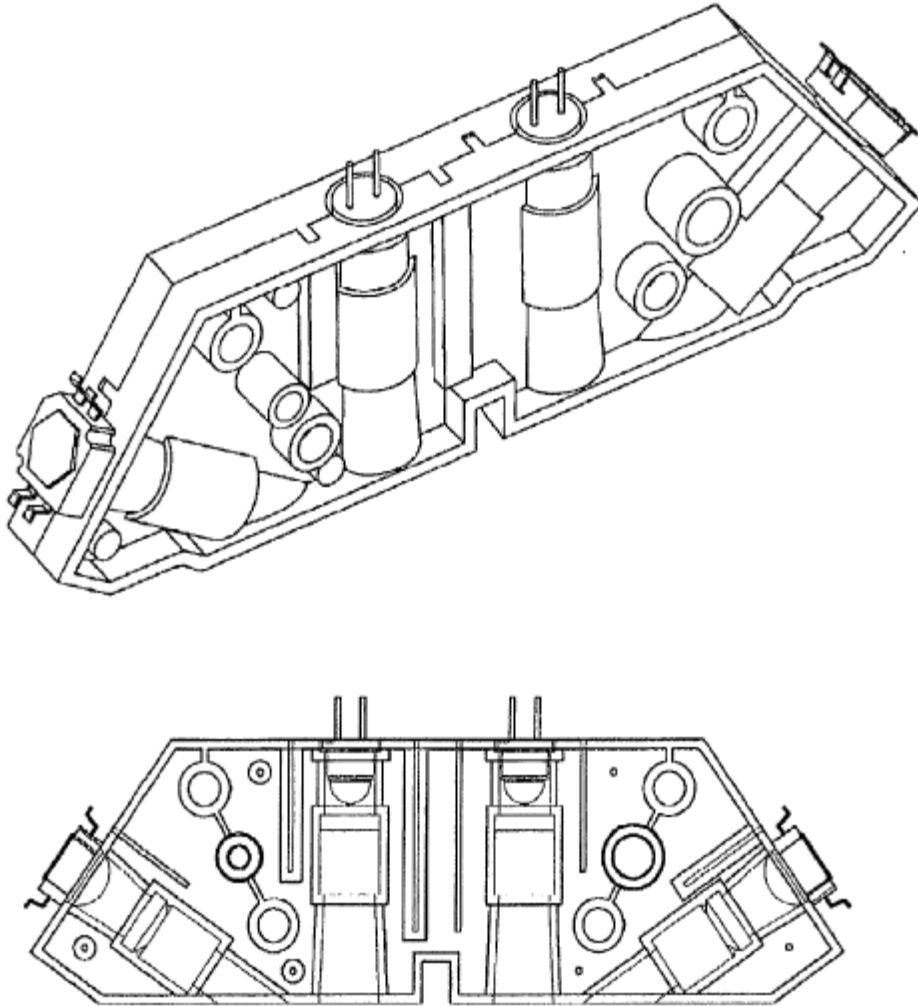
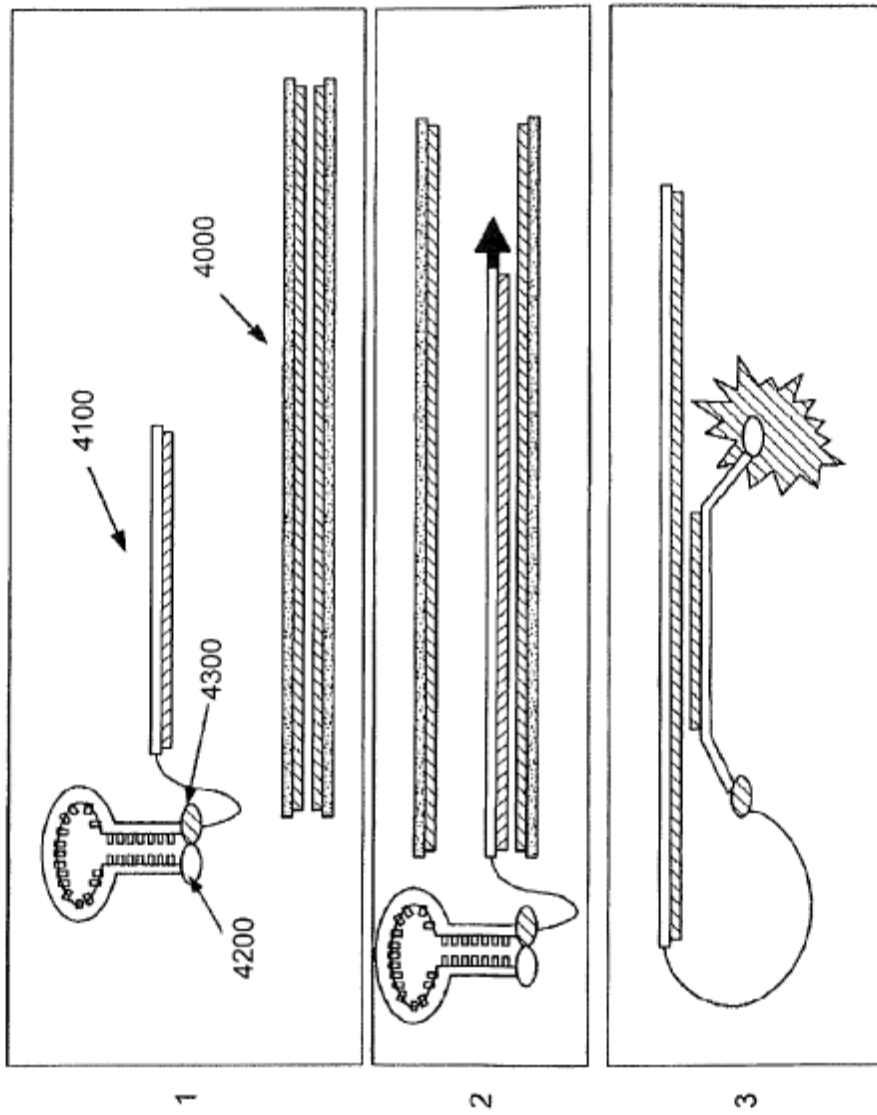


FIG. 83



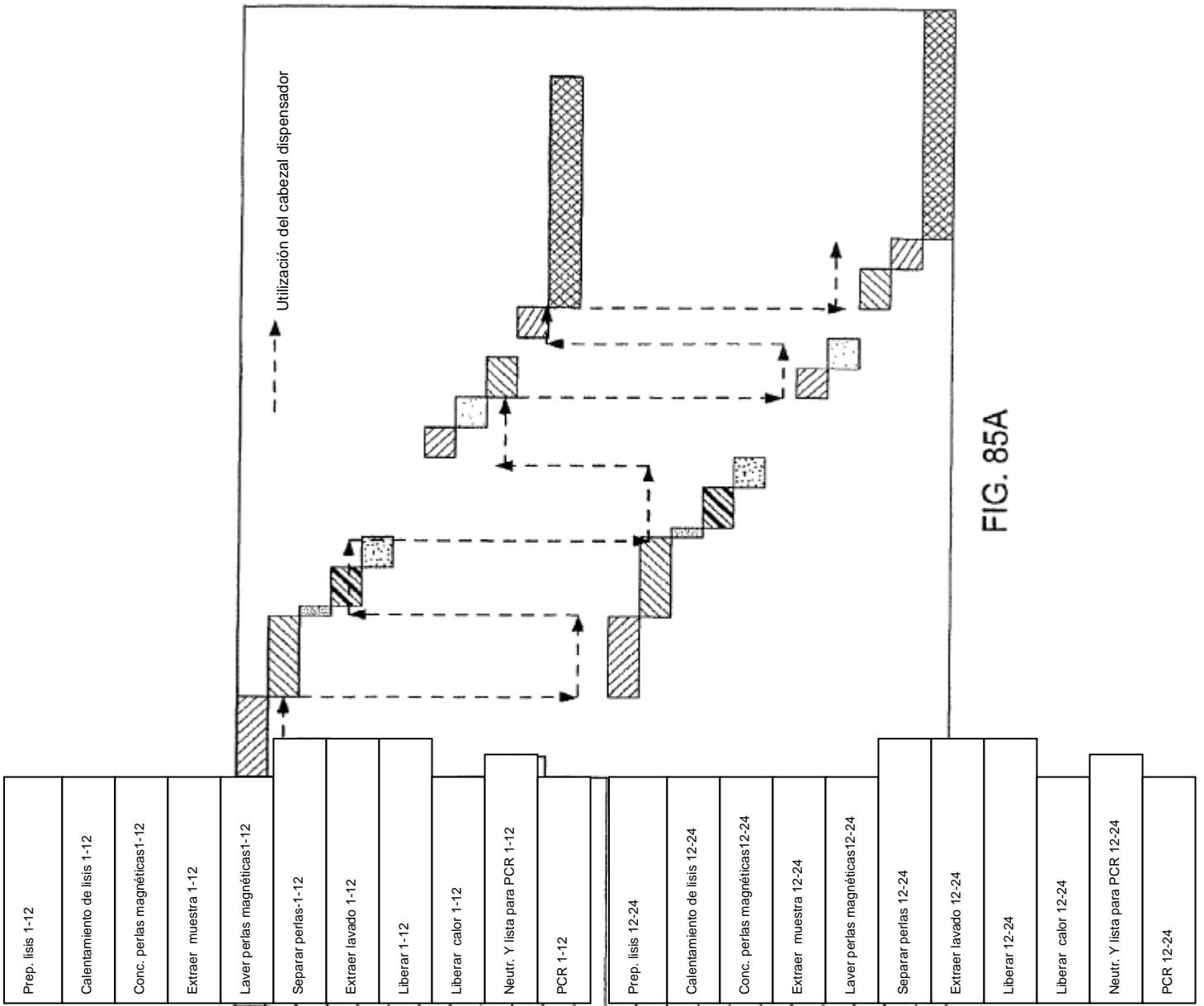


FIG. 85A

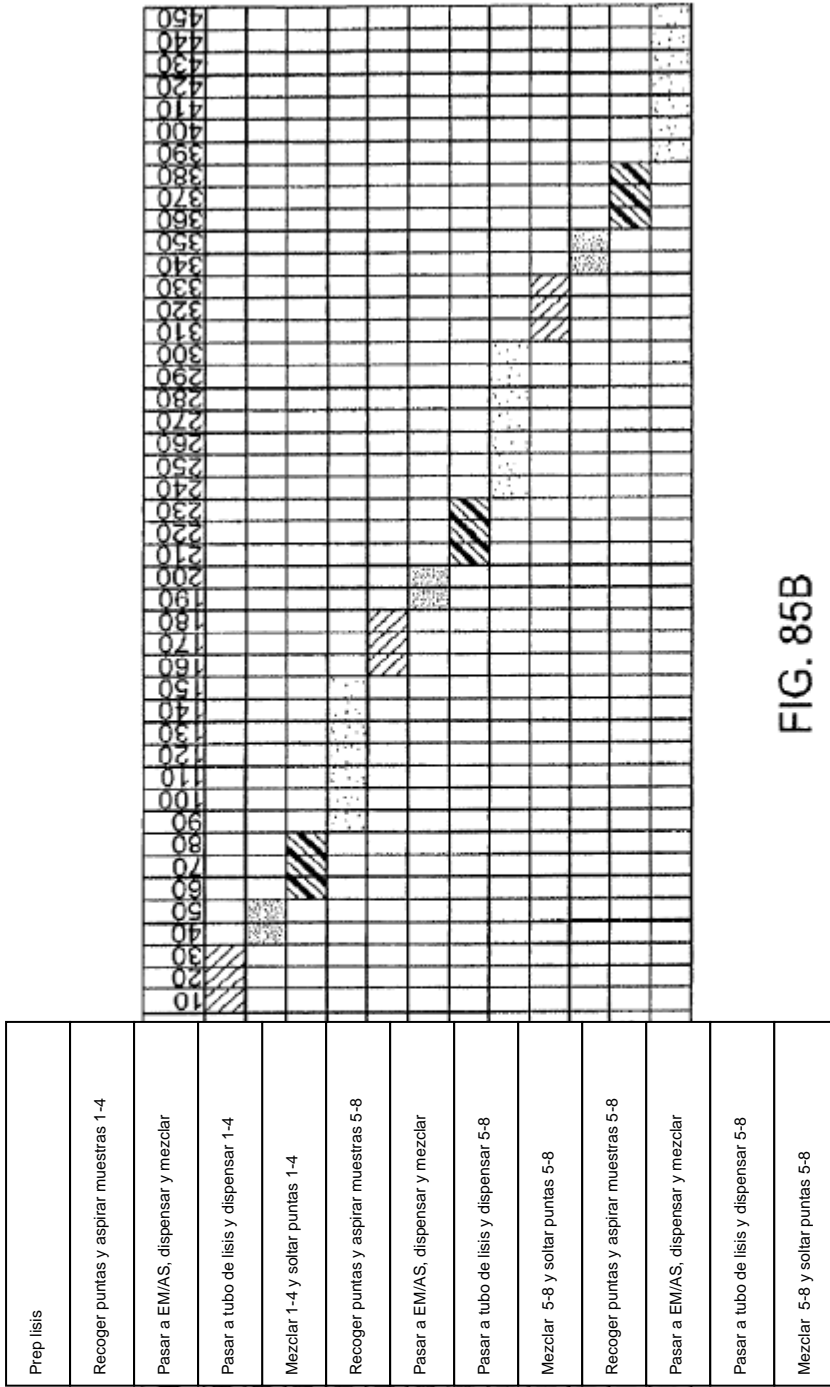


FIG. 85B

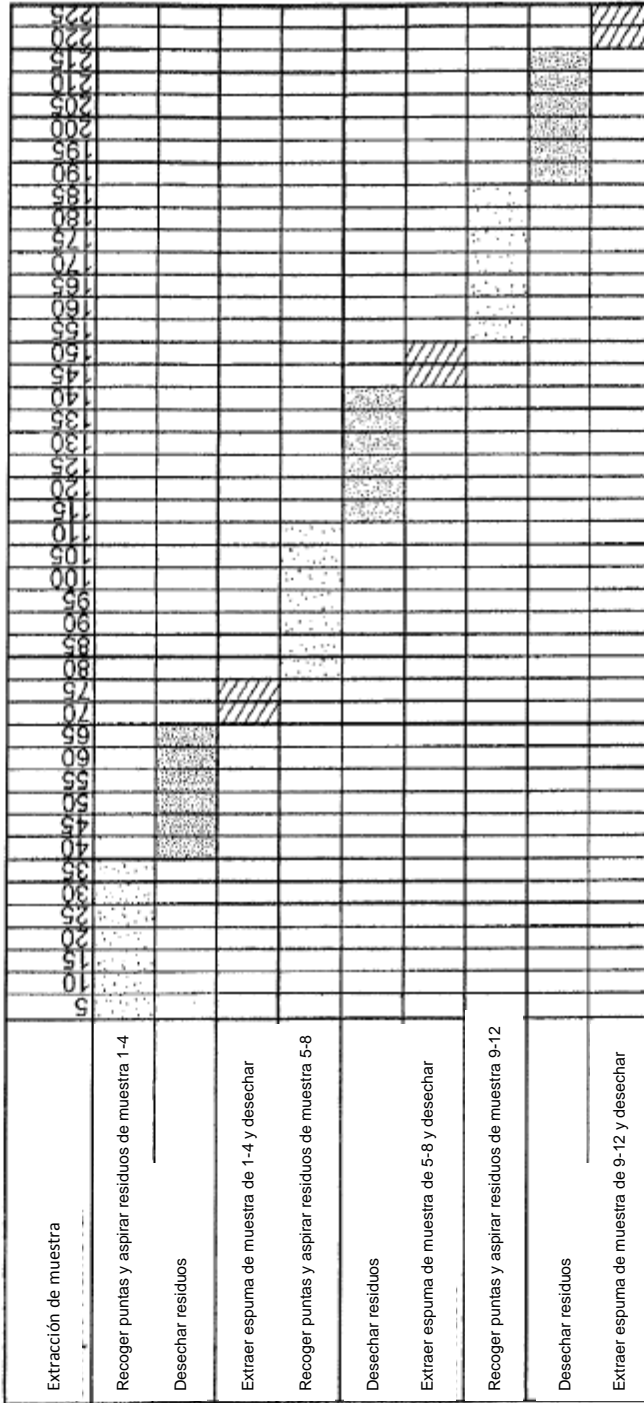


FIG. 85C

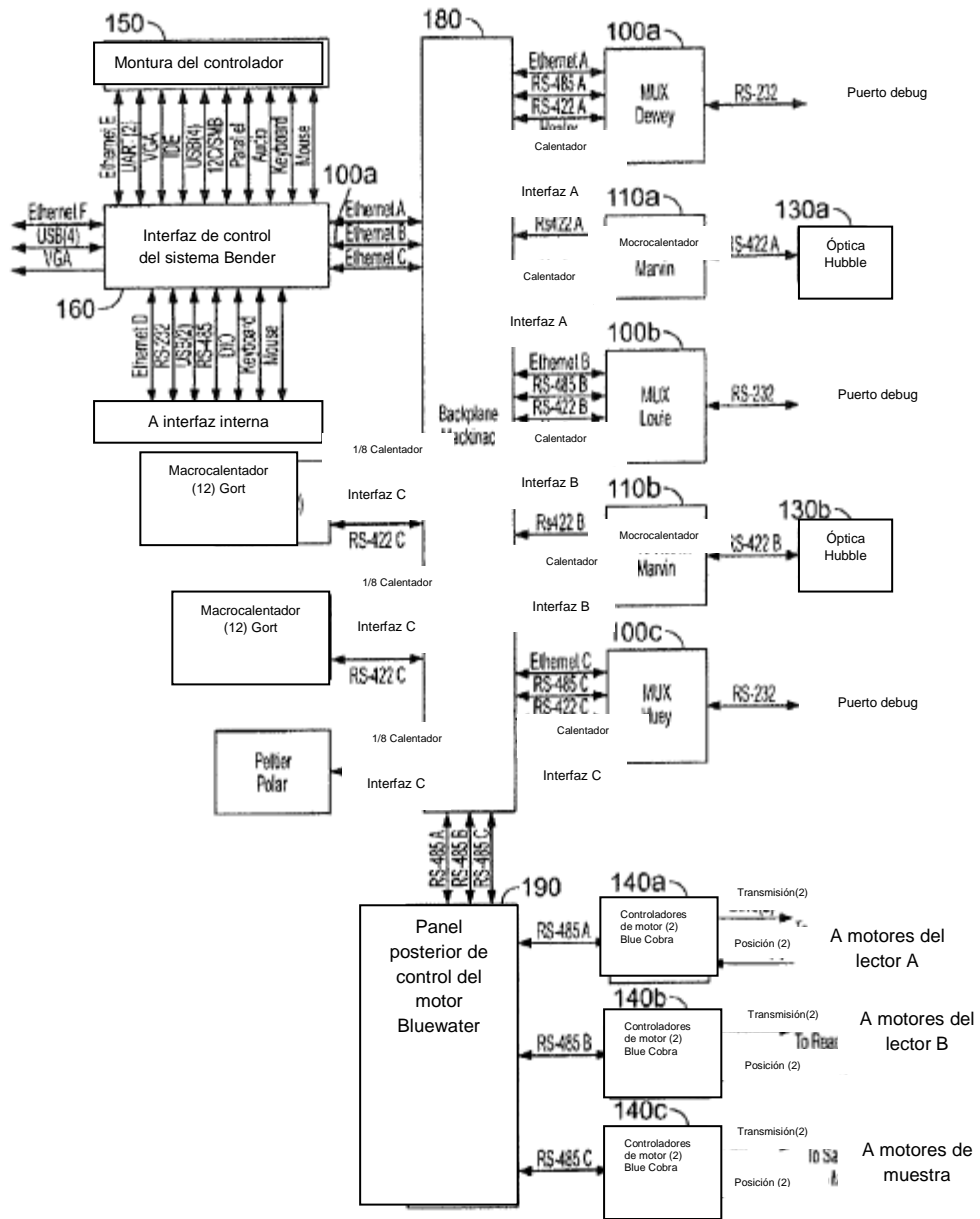


FIG. 86 Diagrama de bloques del sistema electrónico

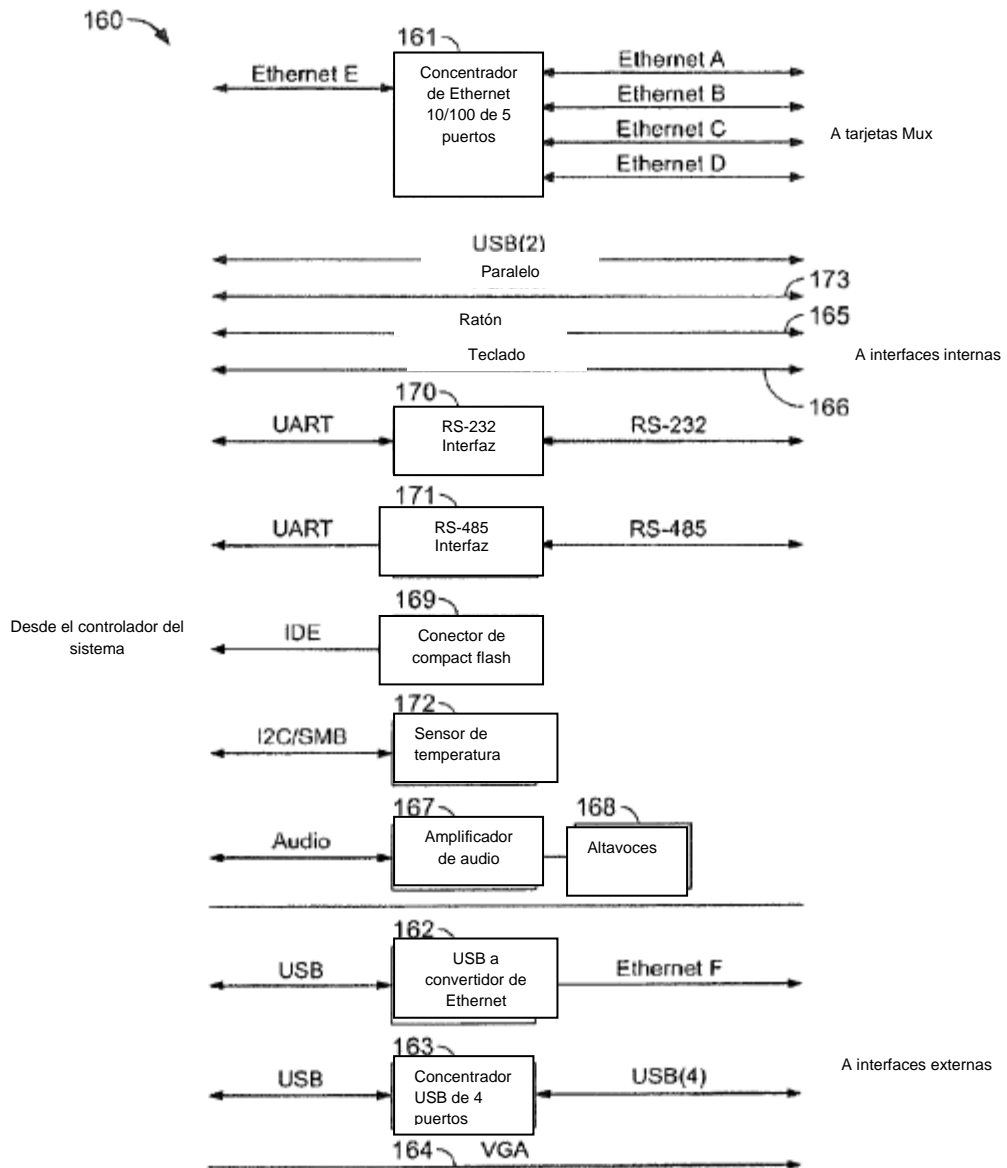


FIG. 87 Diagrama de bloques de la placa base del procesador



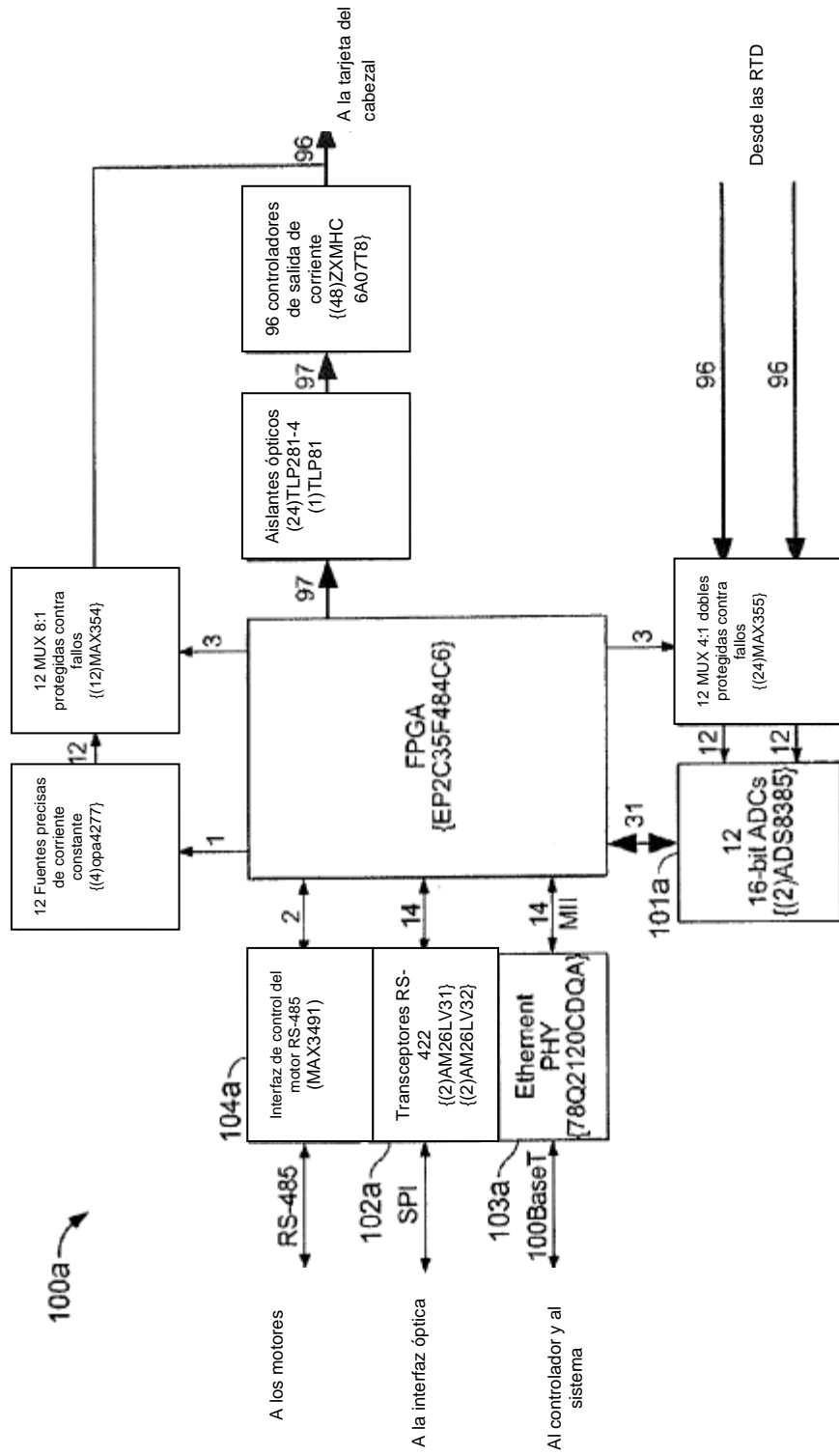


FIG. 88 Diagrama de bloques de tarjetas MUX

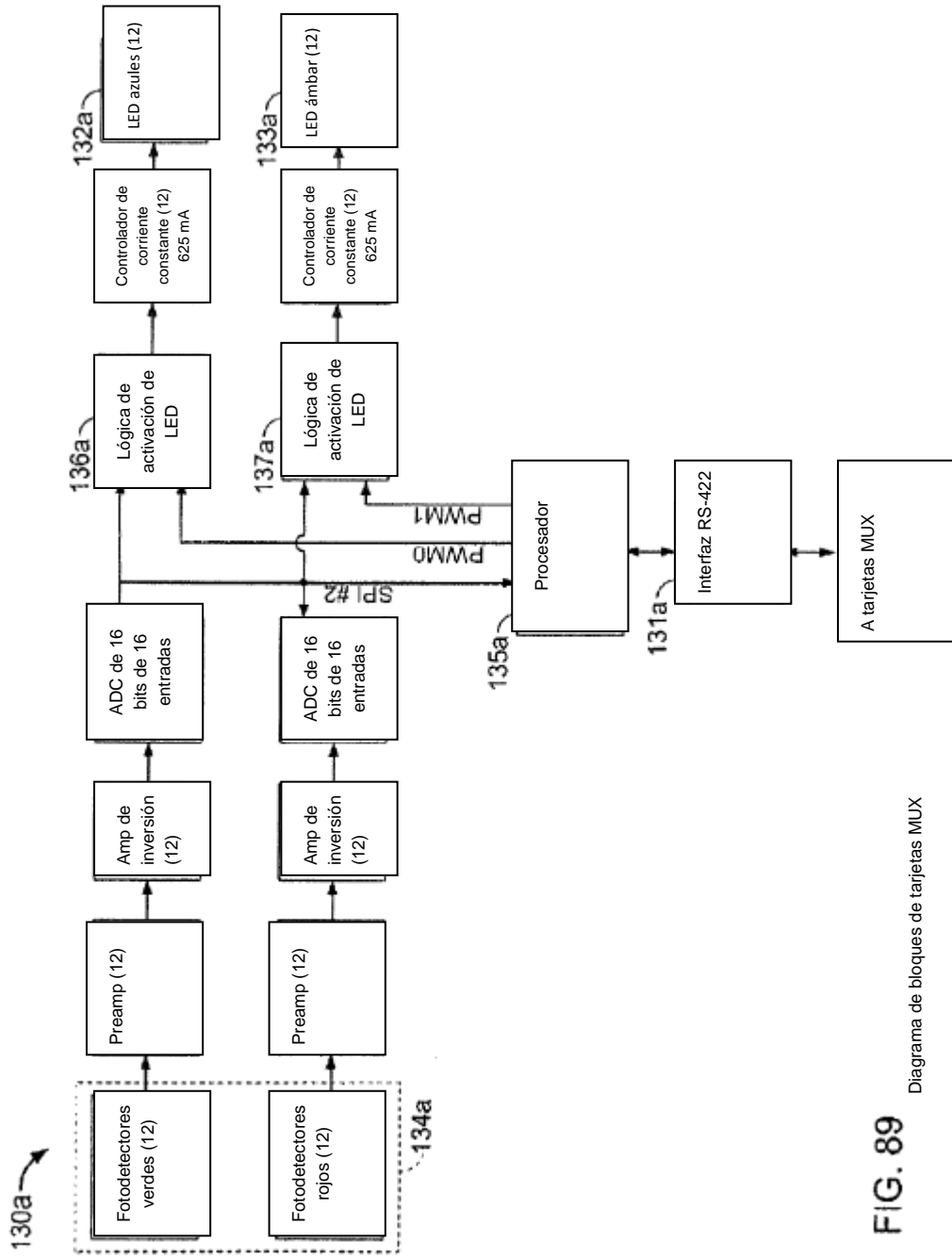


FIG. 89

Diagrama de bloques de tarjetas MUX

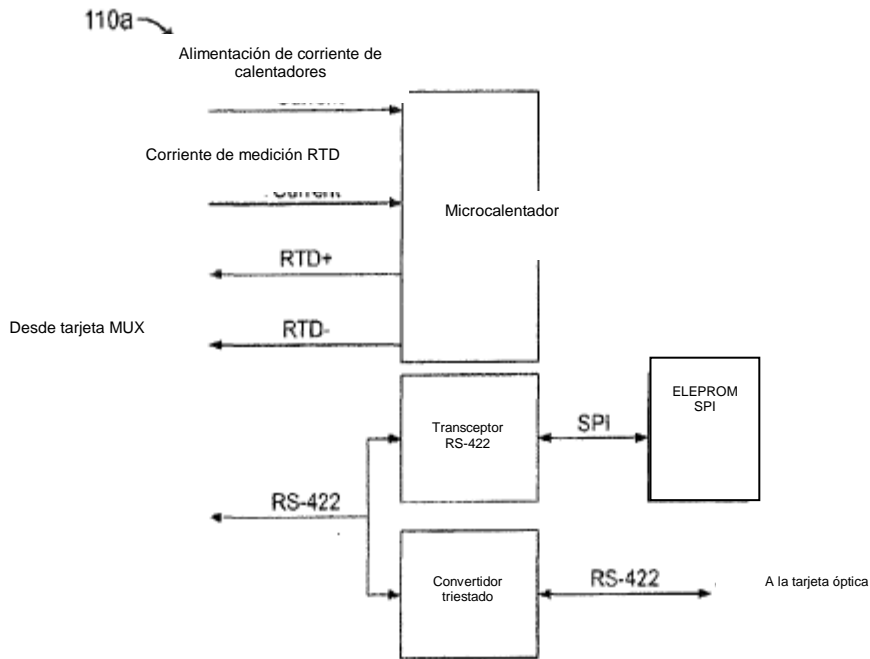


FIG. 90 Diagrama de las tarjetas de los microcalentadores

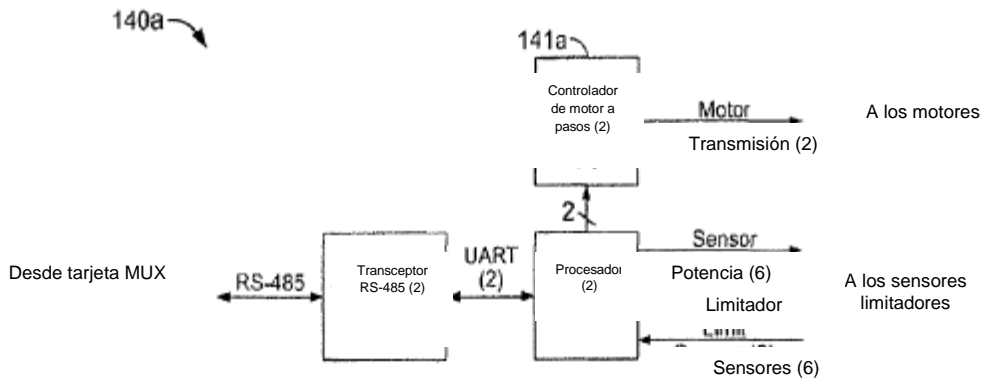


FIG. 91 Diagrama de bloques de la tarjeta de control del motor