

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: &\* ' ) " ' \$

51) Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: & '\$+'&\$% D7 H# 6 &\$% (#) & \$\*

87) Fecha y número de publicación internacional: \$) '\$&'&\$% K C% \$% %&-

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: & '\$+'&\$% 9 '% + ( ( ' ' fl L

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: ' %\$) "&\$% 9 D' \$&+ ' %

54) Título: I b'WUfhi W c'XYZi JXc'mii b'dfcWXXja JYblc'dUfUdfcWgUf'i bUa i YghUXY`æi JXc

30) Prioridad: &- '\$+'&\$% ; 6 '&\$% % ) %

45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: \$' "%&'&\$%&

73) Titular/es: 5 H@ G; 9 B9 H7 G' @A #98 fl\$ \$' \$i L 8 YfVm7 ci fhi9 dgca 'Gei UfYZK \ Jh' < cfgY 6 i gjbYgg'DUf\_ Hfck VfJX[ YZK J]tg\ JfY65 % '\$L; ž; 6

72) Inventor/es: ?9B85 @@H5 M@CF ž>5 Mm 5 F @HHž69B

74) Agente/Representante: NEI 9F8C''6 @B7CžA UfJ5`JWU

9G&'&\*' ) '' '\$.H

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).

I b'WUfh W c XY Zi ]Xc`mi b'dfcWX]a ]Yblc'dUfUdfcWgUf'i bUa i YgfhUXY`æi ]Xc

8 YgW]dVQCB

5 7 Ua dc

Q\$\$\$Q La presente invención se refiere a un cartucho de fluido y un método para procesar una muestra de líquido, más particularmente donde el cartucho de fluido comprende un canal principal y uno o más canales de derivación que unen el canal principal.

10

5 bhWXYbhYg

Q\$\$\$&Q La preparación y análisis de la muestra presentan muchos problemas logísticos. Convencionalmente, se proporcionan muchas muestras médicas (tales como sangre, saliva, orina y eluato de hisopo) a un médico, por ejemplo, un médico practicante general (GP) o un médico de atención de principio (PCP), en una cirugía local sin el equipo necesario de análisis la muestra. Por lo tanto, la muestra debe ser enviada a un laboratorio donde se analiza la muestra. Los resultados de la prueba deben recopilarse y devolverse al GP para analizar los resultados y hacer un diagnóstico. Este enfoque es inadecuado. En primer lugar, existe un riesgo significativo de que una muestra se pierda en tránsito o que no coincida con el paciente equivocado. Además, si bien la evolución reciente de la tecnología ha reducido el tiempo global que se tarda en realizar la prueba, el retraso en el envío de la muestra a un laboratorio es insatisfactorio.

15

20

Q\$\$\$' Q Sin embargo, los sistemas de análisis de la clase que se encuentran en los laboratorios son complejos y a menudo es difícil para proporcionar cantidades suficientes de objetivos puros a partir de muestras de código para llevar a cabo de forma fiable ensayos analíticos aguas abajo. Esto generalmente prohíbe que las cirugías locales de GP puedan llevar a cabo tales pruebas en el sitio.

25

Q\$\$\$ ( Q Sin embargo, en los últimos años se han hecho esfuerzos para reducir la escala de los sistemas de análisis para hacer pruebas más rápidamente y que sean más fáciles de ejecutar, y requieran menores cantidades de muestra. Por ejemplo, los dispositivos "laboratorio sobre chip" (LOC) (un subconjunto de dispositivos microfluídicos) integran casi todas las pruebas médicas o operaciones diagnósticas realizadas en un hospital con un único chip microfluídico. Los canales que forman tales dispositivos microfluídicos manejan pequeños volúmenes de fluido y están conectados entre sí para conseguir una función deseada tal como mezcla de una muestra, desplazamiento de la muestra a través del dispositivo, reacción de la muestra con diferentes reactivos, etc. Estos chips pueden ser insertados en máquinas para controlar el rendimiento de una prueba y medir los resultados.

30

35

Q\$\$\$) Q Sin embargo, se ha encontrado que el manejo de una muestra en un dispositivo de microfluidos puede ser muy difícil. En canales tan pequeños como los que se encuentran en un LOC convencional, es difícil aplicar fuerzas externas para mover la muestra de un sitio a otro para realizar diferentes acciones sobre la muestra. También hay un límite a la complejidad de un dispositivo de LOC que funciona puramente usando la acción capilar. Además, debido a los tamaños de muestra pequeños de LOC, los dispositivos tienen una sensibilidad reducida y se reduce así la probabilidad de que un blanco esté presente en la muestra.

40

Q\$\$\$\* Q Un enfoque alternativo es utilizar un cartucho fluido. La escala de los componentes de un cartucho fluido es mayor que para un dispositivo microfluídico, por lo que es posible mover una muestra a través de diferentes sitios para realizar diferentes acciones sobre el mismo. Esto hace posible realizar pruebas más complejas que las que pueden realizarse utilizando dispositivos típicos de LOC, a la vez que sigue proporcionando un sistema analítico de uso potencial en una cirugía de GP local.

45

Q\$\$\$+ Q Los ensayos científicos útiles en el diagnóstico médico tienen procedimientos bioquímicos cada vez más implicados, tales como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). El ensayo de PCR ha proporcionado un método potente para analizar la presencia de segmentos definidos de ácidos nucleicos. Por lo tanto, es deseable realizar un ensayo de PCR en un cartucho de fluido.

50

Q\$\$\$ Q La reducción de la PCR para el nivel de microchip es importante para tecnologías de detección portátiles y sistemas de análisis de rendimiento alto. El método puede usarse para analizar fluidos corporales para la presencia de ácido nucleico específico para patógenos particulares, tales como la bacteria Chlamydia trachomatis, VIH o cualquier otro microbio patógeno.

55

Q\$\$\$- Q La introducción de ensayos de amplificación de ADN automatizados disponibles comercialmente ha permitido que más laboratorios introduzcan estas tecnologías para ensayos rutinarios de especímenes. Sin embargo, existe la necesidad de mejorar los dispositivos de fluido utilizados para este propósito.

60

Q\$\$\$% Q Dispositivos fluidicos se utilizan a menudo para preparación de muestras y análisis de muestras biológicas o líquidas químicas. Durante la preparación de la muestra, la muestra entra típicamente a través de un puerto de entrada de muestra y puede pasar a lo largo de un canal principal o dentro de una cavidad antes de llegar a una

65

cámara de muestras donde pueda analizarse. Pueden pasar reactivos, tampones, soluciones o fluidos adicionales a lo largo del canal para preparar la muestra para análisis. Por ejemplo, cuando se prepara una muestra bacteriana para análisis de PCR, se puede usar un tampón de lisis para lisar las bacterias, entonces se puede pasar un tampón de lavado para lavar cualquier matriz de muestra no deseada a través de un receptáculo de desecho, y entonces la muestra puede suspenderse en un tampón de elución final listo para la amplificación por PCR.

**Q** Surge un problema al automatizar este sistema, ya que todos los reactivos necesarios en la cámara de reacción para el análisis de muestras, tales como la amplificación de PCR, deben estar contenidos en una plataforma en la que la muestra se puede insertar en una operación controlada. El documento WO 97/16561 proporciona un sistema de ensayo que comprende una primera assembly que comprende una cámara de reacción, un segundo conjunto que comprende una fuente de calor y un tercer conjunto que comprende una pluralidad de cámaras de fluido. Los conjuntos pueden moverse uno con respecto al otro por deslizamiento o translocación, de manera que, por ejemplo, la comunicación de fluido entre los conjuntos resulta cuando el primero y el tercer ensamblaje están contiguos. El carrusel como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 97/16561 incluye diecisiete cámaras de fluido y cuando se hacen girar, estas cámaras de fluido se alinean con la cámara de reacción para evitar la contaminación cruzada de los reactivos. Requiere que las cámaras se alineen perfectamente con el fin de permitir la comunicación de fluido y que exista un volumen suficiente de tampones de lavado y soluciones de limpieza para asegurar que se eliminen cantidades traza de impurezas.

**Q** En muchos sistemas de análisis biológicos, en particular, en los sistemas que utilizan ensayos de amplificación, es importante eliminar ciertos reactivos desde el sistema antes de realizarse el análisis. Por ejemplo, puede ser extremadamente importante eliminar todos los trazos del tampón de lisis antes de realizar la amplificación por PCR. Además, cuando el dispositivo microfluídico puede ser reutilizado para una muestra diferente, es importante asegurar que el dispositivo se limpie para evitar la contaminación cruzada. El documento WO2010/149995 describe el uso de soluciones de limpieza (tales como un detergente, agente complejante, álcali o ácido) o descargas de gas para limpiar la cavidad de reacción antes de su reutilización. El aire o gas se pueden utilizar además para secar el canal o cavidad entre pases de fluido. Una sola longitud de trayectoria de fluido excesivamente larga requiere presiones elevadas para empujar la muestra y los reactivos a través del canal y también necesita grandes volúmenes de soluciones de limpieza para asegurar que toda la longitud del canal se limpie de manera efectiva para evitar el riesgo de contaminación cruzada entre pases de fluido. Los documentos WO2005/016536 y US2008/0069739 también describen métodos y sistemas para lavado, lavado y cebado de dispositivos de microescala. Un diseño alternativo, para evitar el uso de un solo canal de fluido, se describe en los documentos WO 03/078065 y WO2009/108260 y utiliza un canal principal con varios canales de intersección. Estos canales pueden estar conectados a puertos de entrada independientes, desviados del canal principal, y proporcionar un diseño alternativo para sistemas completamente automatizados, en el que todos los reactivos están contenidos en el dispositivo microfluídico al inicio del uso. Los canales pueden conectarse alternativamente a depósitos de residuos y pasar a través del regiones de análisis tales como en WO 03/078065. El documento WO2009/108260 describe soluciones de limpieza de lavado a través del canal principal para limpiar el circuito microfluídico y usar aire para empujar la muestra a través del canal principal.

**Q** La introducción de canales secundarios que entrecruzan con un canal principal, mientras que son beneficiosos en la introducción de diferentes fluidos o reactivos a través de canales separados, distintos, siempre van a crear 'piernas muertas'. Una pierna muerta es una sección del canal a través de la cual el fluido no fluye, y se considera que es una fuente de contaminación. A menudo se encuentran donde un canal lateral cruza un canal principal, ya que el fluido puede acumularse en o cerca del punto de intersección, en la pata muerta, y permanecer allí hasta que pase el siguiente fluido, añadiendo un riesgo de contaminación.

**Q** Por ejemplo, la FIG. 16 muestra una unión microfluídica B110 conocida, un canal de salida B111, y una pluralidad de unidades de circuito B112, B113, B114. Una unión microfluídica B110 es un área para la convergencia de fluidos múltiples. Un canal de salida B111 es capaz de recibir fluido desde la unión microfluídica B110. Un canal de salida B111 incluye un primer extremo conectado con la unión microfluídica B110, un segundo extremo conectado con un depósito de residuos B115 y una región de análisis B116 situada entre el primer extremo y el segundo extremo del canal de salida B111. Cada unidad de circuito incluye un canal fuente B117 con un primer extremo capaz de recibir fluido de muestra y un segundo extremo conectado con la unión microfluídica B110; un canal de derivación B118 conectado con el canal de fuente B117 en una intersección B119; y un sistema de desviación de flujo capaz de dirigir diferencialmente el fluido que fluye a través de un canal de fuente, ya sea en la unión microfluídica B110 o en un canal de derivación B118. El canal de derivación B118 está conectado además a un depósito de residuos B120. Cuando el fluido entra en las unidades de circuito B112, el fluido fluye a lo largo del canal de fuente B117 a la sección intermedia B119 y se dirige a continuar a través del canal de fuente B117 y a la unión microfluídica B110 o al canal de derivación B118. Los fluidos dirigidos hacia la unión B110 convergen en la unión B110 y fluyen hacia el canal de salida B111, a través de la región de análisis B116 y hacia el depósito de desechos B115.

**Q** En la FIG. 16, varias piernas muertas B108 existen en la intersección de los canales de derivación B118 con los canales de origen B117, y en la intersección del canal de origen B117 con el canal de salida B111. La FIG. 17 ilustra además una serie de canales de ramificación B101, B102, que unen un canal principal B100 y la presencia de

patas muertas B108 en los canales de derivación B101 y B102 en o cerca de estos puntos de intersección.

**Q**Es muy difícil eliminar completamente la presencia de piernas muertas. Las válvulas especiales pueden ser diseñadas para reducir la pierna muerta, pero todavía hay un volumen pequeño pero finito asociado con estas válvulas que puede permitir la acumulación de fluido. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de proporcionar un dispositivo microfluídico que permita la adición de reactivos desde canales secundarios al canal principal sin contaminación cruzada.

**F Ygi a Yb`XY`U]bj YbWjOB**

**Q**Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un cartucho fluídico para el procesamiento de una muestra líquida, que comprende: un canal principal para pasar la muestra a través del mismo líquido desde un extremo aguas arriba hasta un extremo aguas abajo; y uno o más canales de derivación que unen el canal principal para introducir líquido y gas en el canal principal después de que la muestra de líquido ha pasado hacia abajo del uno o más canales de ramificación, incluyendo uno o más canales de ramificación un primer canal de ramificación, el primer canal de derivación comprende: una entrada de gas para introducir un gas en el primer canal de ramificación; Una entrada de líquido para introducir un líquido en el primer canal de ramificación; Y una válvula configurada para moverse entre una posición cerrada en la que impide que el líquido y el gas en el primer canal de ramificación pasen al canal principal y una posición abierta en la que permita que el líquido y el gas en el primer canal de derivación pasen en el canal principal, en el que cada entrada de gas está situada más lejos de la unión del canal de derivación con el canal principal que cada entrada de líquido.

**Q**Esto permite la contención de un líquido, tal como un reactivo de prueba, en el cartucho de fluido en el inicio de uso y permite la introducción del líquido desde un canal independiente del canal principal, evitando así la contaminación del canal principal. Además, el gas puede introducirse en los canales ramificados y principales para limpiar los canales y también empujar el líquido y la muestra a través del canal principal.

**Q**Preferiblemente, el uno o más canales de derivación comprende además un segundo canal de rama que une el canal principal aguas abajo del primer canal de rama, en el que el segundo canal de rama comprende: una entrada de gas para introducir un gas en el segundo canal de rama; una entrada de líquido para introducir un líquido en el segundo canal de ramificación; y una válvula configurada para moverse entre una posición cerrada en la que impide que el líquido y el gas en el segundo canal de ramificación pasen al canal principal y una posición abierta en la que permita que el líquido y el gas en el segundo canal de ramificación pasen al canal principal.

**Q**El segundo canal de derivación puede usarse para introducir un líquido o reactivo diferente en el canal principal, y está dispuesto de manera que el segundo líquido pueda ser introducido después del paso de un primer líquido desde el primer canal de rama.

**Q**La o cada entrada de gas en el uno o más canales de derivación comprende preferentemente una válvula de entrada de gas a prevenir líquido y gas que fluye desde el canal de derivación a través de la entrada de gas. La válvula de entrada de gas reduce el riesgo de contaminación de la entrada de gas por el líquido de la entrada de líquido.

**Q**Preferiblemente, la o cada válvula en el uno o más canales de derivación está separado del canal principal, formando con ello una pierna muerta en el canal de rama entre la válvula y el canal principal. La introducción de canales secundarios que intersecan un canal principal normalmente creará 'piernas muertas'. Estas piernas muertas actúan como un riesgo de contaminación. La presencia de la entrada de gas y la válvula de entrada de gas en uno o más canales de ramificación proporciona un método para superar ese riesgo asegurando que los canales se pueden limpiar de una muestra de líquido y/o líquido antes de cada paso del siguiente líquido.

**Q**La o cada válvula en el uno o más canales de derivación puede estar situado en una unión entre el canal de derivación y el canal principal. Esto puede reducir la longitud del canal de derivación (ya que no se requiere para acomodar una válvula adicional), y así ahorrar espacio en el dispositivo de fluido.

**Q**Preferiblemente, la o cada entrada de líquido en el uno o más canales de derivación está acoplado a una cámara de líquido. La cámara contiene el líquido en el cartucho de fluido y evita la fuga del líquido que perjudicaría el uso del dispositivo.

**Q**Preferiblemente, la o cada cámara de líquido es una ampolla plegable adaptada, cuando está contraída, para expulsar un líquido contenido en el mismo a través de la entrada de líquido, en el canal de rama, y en el canal principal, por introducción del líquido en el canal principal después de que la muestra de líquido haya pasado corriente abajo de uno o más canales de ramificación. La ampolla contiene el líquido y proporciona un mecanismo para liberar el líquido en el dispositivo fluídico durante el funcionamiento que no implica la introducción externa de componentes líquidos.

**Q**La o cada cámara de líquido contiene preferiblemente un reactivo o un tampón tal como un tampón de lisis,

un tampón de lavado o un tampón de elución. Estos reactivos pueden ser capaces de realizar la lisis celular y de limpiar la muestra así como asegurar que la muestra se prepare para el análisis.

5 [0027] Preferiblemente, en el que un primer y un segundo canal de rama se unen al canal principal, la cámara de líquido acoplada a la entrada de líquido en el primer canal de rama contiene un tampón de lavado, y en el que la cámara de líquido acoplada a la entrada de líquido en el segundo canal de ramificación contiene un tampón de elución. Dado que los tampones de lavado son «tóxicos» para las reacciones posteriores subsiguientes (en particular, impiden la acción de los tampones de elución), el tampón de lavado es pasado primero y después los canales de ramificación y principales pueden limpiarse/evacuarse con un paso de gas. El tampón de elución puede entonces pasar a través de los canales y aguas abajo a la muestra líquida.

10 [0028] Preferiblemente, el cartucho fluídico comprende una interfaz neumática para la conexión a una fuente de presión positiva y/o calibre, la interfaz neumática comprende una pluralidad de puertos, y en la que la o cada válvula de entrada de la válvula o gas en el uno o más canales de derivación es una válvula neumáticamente accionada acoplada a al menos un puerto en la interfaz neumática de tal manera que puede accionarse por la fuente de presión positiva y/o de medida. Preferentemente, las primeras y segundas válvulas de entrada de gas en los canales de ramificación primero y segundo, respectivamente, están acopladas al mismo puerto en la interfaz neumática, de manera que las primeras y segundas válvulas de entrada de gas pueden accionarse simultáneamente. Esto simplifica el funcionamiento del cartucho.

15 [0029] La o cada entrada de gas en el uno o más canales de derivación está acoplada preferiblemente a la interfaz neumática para la conexión a un suministro de gas.

20 [0030] Preferiblemente, la o cada entrada de gas en el uno o más canales de derivación está acoplado a la interfase neumático para la conexión a un suministro de gas para hacer pasar un gas a través de la entrada de gas, en el canal de rama, y en el canal principal, para introducir el gas en el canal principal después de que la muestra líquida haya pasado corriente abajo de uno o más canales de ramificación. El paso de gas a través de la ramificación y canales principales evacua efectivamente las patas muertas y limpia los canales. El gas puede secar aún más los canales de residuos líquidos.

25 [0031] Preferiblemente, la o cada válvula accionada neumáticamente comprende una cámara de válvula que tiene primera y segunda aberturas conectadas al canal de rama; y una membrana flexible movable entre una posición cerrada, en la que la membrana flexible sella contra las aberturas primera y segunda para impedir el flujo de fluido a través del canal de ramificación y una posición abierta, en la que la membrana flexible está separada de las aberturas primera y segunda permiten que el fluido fluya a través del canal de ramificación.

30 [0032] Preferiblemente, la o cada válvula comprende además un paso de fluido que tiene una abertura en la cámara de válvula, la abertura separada de las aberturas primera y segunda por la membrana flexible, en la que el paso de fluido está acoplado a un orificio en la interfaz neumática para aplicar una presión positiva o de calibre en la cámara de válvula para mover la membrana flexible entre las posiciones abierta y cerrada. El conducto de fluido en la cámara de válvula controla la presión de la cámara, permitiendo que la membrana flexible actúe como válvula.

35 [0033] Preferiblemente, la interfaz neumática comprende los puertos primero a tercero, y en donde los puertos primero a tercero están acoplados, respectivamente, a: i) la válvula en el primer canal de rama; ii) la válvula en el segundo canal de ramificación; y iii) la válvula de entrada de gas en el primer canal de ramificación y la válvula de entrada de gas en el segundo canal de ramificación; de manera que las respectivas válvulas pueden ser accionadas por la fuente de presión positiva y/o de medida que actúa a través de los respectivos puertos. El acoplamiento de las válvulas de entrada de gas en los canales de ramificación primero y segundo permite el control de estas válvulas simultáneamente.

40 [0034] De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método de procesamiento de una muestra líquida en un cartucho fluídico, que comprende el cartucho de un canal principal y uno o más canales de derivación que unen el canal principal, que incluye un primer canal de rama que comprende una entrada de gas, una entrada de líquido y una válvula, comprendiendo el método; a) pasar una muestra líquida a través del canal principal; b) suministrar un gas a la entrada de gas; c) abrir la válvula en el primer canal de derivación y pasar un gas desde la entrada de gas a través del primer canal de derivación y hacia el canal principal para evacuar cualquier muestra de líquido residual en el primer canal de ramificación; d) cesar el suministro de gas; e) pasar un líquido desde la entrada de líquido a través del primer canal de ramificación y hacia el canal principal; f) suministrar un gas a la entrada de gas; y g) pasar un gas desde la entrada de gas a través del primer canal de ramificación y hacia el canal principal para evacuar cualquier líquido residual del primer canal de ramificación. Este método es particularmente eficaz puesto que el usuario puede confiar en el paso de gas a través de los canales de ramificación y principal para evacuar cualquier pierna muerta que está presente, así como para limpiar cualquier muestra líquida residual o líquido en los canales.

45 [0035] Preferiblemente, el cartucho fluídico comprende además una válvula de entrada de gas en el primer canal de derivación, y los pasos de procedimiento (b) y (f) de suministrar un gas a la entrada de gas comprenden además la

apertura de la válvula de entrada de gas, y en el que la paso (d) de cesación del suministro de gas comprende además el cierre de la válvula de entrada de gas y antes de cesar el suministro de gas. Esto evita que el líquido pase desde la entrada de líquido y hacia la entrada de gas cuando un líquido es expulsado de la cámara de líquido.

5 **[0036]** De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de procesamiento de un líquido en un cartucho fluídico, el cartucho que comprende un canal principal que tiene un extremo aguas arriba y un extremo aguas abajo y uno o más canales de derivación que unen el canal principal comprendiendo un primer canal de derivación y un segundo canal de ramificación aguas abajo del primer canal de derivación, comprendiendo cada canal de derivación una entrada de gas, una válvula de entrada de gas, una entrada de líquido y una válvula, comprendiendo el método:

15 a) pasar una muestra líquida a través del canal principal; b) suministrar un gas a la entrada de gas en el primer canal de ramificación y la entrada de gas en el segundo canal de ramificación; c) abrir las válvulas y las válvulas de entrada de gas en los canales de ramificación primero y segundo y pasar un gas desde las entradas de gas en los canales de ramificación primero y segundo a través del primer y segundo canal de ramificación y hacia el canal principal para evacuar cualquier muestra de líquido residual en los canales de ramificación primero y segundo; d) cerrar la válvula y la válvula de entrada de gas en el segundo canal de ramificación y la válvula de entrada de gas en el primer canal de ramificación; e) cesar el suministro de gas a la entrada de gas en el primer canal de ramificación y la entrada de gas en el segundo canal de ramificación; f) pasar un líquido desde la entrada de líquido en el primer canal de ramificación a través del primer canal de ramificación y hacia el canal principal; g) suministrar un gas a la entrada de gas en el primer canal de ramificación y la entrada de gas en el segundo canal de ramificación; h) abrir la válvula y la válvula de entrada de gas en el segundo canal de ramificación y la válvula de entrada de gas en el primer canal de ramificación y pasar un gas desde las entradas de gas en el primer y segundo canales de ramificación a través del primer y segundo canales de ramificación y al interior del canal principal para evacuar cualquier líquido residual en los canales de ramificación primero y segundo; i) cerrar la válvula y la válvula de entrada de gas en el primer canal de derivación y la válvula de entrada de gas en el segundo canal de ramificación; j) cesar el suministro de gas a la entrada de gas en el primer canal de ramificación y la entrada de gas en el segundo canal de ramificación; k) pasar un líquido desde la entrada de líquido sobre el segundo canal de ramificación a través del segundo canal de ramificación y hacia el canal principal; l) suministrar un gas a la entrada de gas en el segundo canal de ramificación y abrir la válvula de entrada de gas en el segundo canal de ramificación; y m) pasar un gas desde la entrada de gas en el segundo canal de ramificación a través del segundo canal de ramificación y hacia el canal principal para evacuar cualquier líquido residual en el segundo canal de ramificación. Este método permite el paso de una muestra líquida y dos reactivos líquidos a través del canal principal. El paso de la muestra y de los líquidos en pasos separadas, con el gas pasa entre ellos, asegura que los canales se evacuan y cualesquiera patas muertas presentes se despejan antes del próximo paso de líquido. Esto reduce el riesgo de contaminación.

40 **[0037]** Preferiblemente, los pasos de procedimiento (l) y (m) comprenden además el suministro de un gas a la entrada de gas en el primer canal de derivación y la apertura de la válvula de entrada de gas en el primer canal de rama y pasando un gas desde la entrada de gas en el primer canal de derivación a través del primer canal de ramificación y al canal principal para evacuar cualquier líquido residual en el primer canal de ramificación. En el caso improbable de que el tampón de elución haya pasado hacia arriba, este paso garantiza que el primer canal de ramificación tampoco tenga ningún tampón de elución, que es de particular importancia cuando se controlan los volúmenes de muestra y reactivo.

45 **[0038]** Cuando está en uso, el cartucho fluídico puede preferiblemente comprender además una interfaz neumática para la conexión a una fuente de presión positiva, y en el que la o cada entrada de gas en el uno o más canales de derivación está acoplado a la interfaz neumática para la conexión a un suministro de gas, en el que uno o más de los pasos de pasar un gas desde la entrada de gas comprende pasar un gas desde el suministro de presión de gas positivo al canal de ramificación.

50 **[0039]** Preferiblemente, el uno o más de los pasos de transmisión de un gas desde la entrada de gas en el uno o más canales de derivación y en el canal principal comprenden además purgar la muestra de líquido residual y/o líquido residual desde el canal principal. Esto asegura que el volumen total de la muestra líquida y/o líquido se pasa al extremo aguas abajo del canal principal, lo cual, como se ha indicado anteriormente, es importante cuando el volumen de líquido debe ser controlado con precisión.

60 **[0040]** Preferiblemente, la o cada entrada de líquido en el uno o más canales de derivación está acoplado a una cámara de líquido, y en el que uno o más de los pasos de hacer pasar un líquido desde la entrada de líquido comprende expulsar el líquido de la cámara de líquido en el canal de sucursal. La o cada cámara de líquido puede ser preferiblemente una ampolla plegable, y en el que uno o más de los pasos de pasar un líquido desde la entrada de líquido comprende plegar la ampolla plegable y, de este modo, expulsar el contenido líquido a través de la entrada de líquido, en el canal de rama y en el canal principal.

65 **[0041]** Preferiblemente, el paso de pasar un líquido a partir de la entrada de líquido en el primer canal de rama comprende un tampón de lavado de la cámara de líquido a través de la entrada de líquido en el primer canal de

rama y en el canal principal; y en el que el paso de pasar un líquido desde la entrada de líquido en el segundo canal de ramificación comprende expulsar un tampón de elución de la cámara de líquido a través de la entrada de líquido hacia el segundo canal de ramificación y hacia el canal principal. Estos pasos garantizan que el tampón de lavado y el tampón de elución se pasan independientemente al extremo aguas abajo del canal principal, evitando así cualquier contaminación de los tampones (lo que daría como resultado que el tampón de elución se volviera inactivo).

**Breve descripción de las figuras**

10 **[0042]**

La FIG. 1 es un diagrama esquemático de un cartucho de fluido a modo de ejemplo en el que puede proporcionarse la invención.

15 La FIG. 2 es una vista desde arriba de un cartucho de fluido a modo de ejemplo en el que puede proporcionarse la invención.

La FIG. 3 es una vista en despiece ordenado del cartucho de fluido ejemplar de la FIG. 2.

20 La FIG. 4 es una vista en perspectiva de la carcasa del cartucho de fluido a modo de ejemplo de la FIG. 2.

La FIG. 5 es una vista en perspectiva del subconjunto de ampollas del cartucho de fluido ejemplar de la FIG. 2.

25 La FIG. 6A es una vista desde arriba de la capa neumática del cartucho de fluido ejemplar de la FIG. 2.

La FIG. 6B es una vista desde abajo de la capa neumática del cartucho de fluido a modo de ejemplo de la FIG. 2.

30 La FIG. 7 es una vista desde arriba de la lámina neumática del cartucho de fluido ejemplar de la FIG. 2.

La FIG. 8A es una vista desde arriba de la capa fluídica del cartucho fluídico de la FIG. 2.

La FIG. 8B es una vista desde abajo de la capa fluídica del cartucho de fluido ejemplar de la FIG. 2.

35 La FIG. 9 es una vista desde arriba de la lámina fluídica del cartucho de fluido ilustrativo de la FIG. 2.

La FIG. 10 es una vista desde arriba de la capa de electrodo del cartucho fluídico ejemplar de la FIG. 2.

La FIG. 11 es una vista en sección de una disposición de válvula ventajosa.

40 La FIG. 12 es una vista en sección de otra disposición de válvula ventajosa.

La FIG. 13a es una vista en sección de una disposición de puerto de entrada ventajosa.

45 La FIG. 13b es una vista en sección en perspectiva de la disposición de orificios de entrada de la FIG. 13a.

La FIG. 14a es una vista en sección de una disposición ventajosa de columnas de captación.

50 La FIG. 14b es una vista en sección en perspectiva de una parte de la disposición de columnas de captura de la FIG. 14a.

La FIG. 15a es una vista en sección de una disposición de cámara de residuos ventajosa.

La FIG. 15b es una vista en sección en perspectiva de la disposición de cámara de desecho de la FIG. 15a.

55 La FIG. 16 es un sistema ejemplar de canales de interconexión que muestran el problema de las patas muertas.

La FIG. 17 es una ilustración adicional de canales que muestran el problema de las piernas muertas.

60 La FIG. 18a es un diagrama esquemático de canales dentro de un cartucho de fluido de acuerdo con una primera realización de la presente invención.

La FIG. 18b es una disposición alternativa de la primera realización mostrada en la FIG. 13a.

65 La FIG. 19a es un diagrama esquemático de canales dentro de un cartucho de fluido de acuerdo con una segunda realización de la presente invención.

La FIG. 19b es una disposición alternativa de la segunda realización mostrada en la FIG. 14a.

La FIG. 19c es otra disposición alternativa de la segunda realización mostrada en la FIG. 14a.

5 La FIG. 20a es una vista en sección de una ampolla adecuada para su uso en la presente invención.

La FIG. 20b es una vista desde arriba de la ampolla mostrada en la FIG. 15a.

10 La FIG. 21a es una vista en sección de una válvula adecuada para su uso en la presente invención, en la que la válvula está en la posición cerrada.

La FIG. 21b es una vista en sección de la válvula de la FIG. 16a, en la que la válvula está en la posición abierta.

15 La FIG. 22 es un diagrama esquemático de canales dentro de un cartucho de fluido de acuerdo con una tercera realización de la presente invención.

La FIG. 23 es un diagrama esquemático de canales dentro de un cartucho de fluido de acuerdo con una cuarta realización de la presente invención.

20 La FIG. 24 es un diagrama de flujo que muestra pasos en un método de funcionamiento del cartucho mostrado en la FIG. 18a.

La FIG. 25 es un diagrama de flujo que muestra pasos en un método de funcionamiento del cartucho mostrado en la FIG. 19a.

25

#### Descripción detallada

30 **[0043]** Las realizaciones de la invención ahora se describirá en el contexto de un cartucho de fluido a modo de ejemplo en el que se implementa la invención. Aunque no es necesario comprender la presente invención, es beneficioso proporcionar una descripción general de los principios de la estructura, fabricación, función y uso del cartucho de fluido y métodos asociados para realizar una prueba.

35 **[0044]** El cartucho de fluido a modo de ejemplo y métodos asociados elegidos para ilustrar la presente invención son para la detección de bacteria *Chlamydia trachomatis* usando amplificación por PCR y detección electroquímica. Sin embargo, el experto en la técnica comprenderá que la invención no está limitada al cartucho de fluido a modo de ejemplo y a los métodos asociados, y es adecuada para su uso con diversos cartuchos diferentes para una amplia variedad de técnicas de análisis de muestras o ensayos biológicos; por ejemplo, ensayos de secuencias de ácido nucleico diana en una muestra líquida.

40 **[0045]** Los expertos en la técnica comprenderán que los dispositivos y métodos de la invención aquí descritos e ilustrados en los dibujos adjuntos son ejemplos de realización no limitativos y que el alcance de la presente invención se define únicamente por las reivindicaciones. las características ilustradas o descritas en relación con un ejemplo de realización se pueden combinar con características de otras realizaciones. Tales modificaciones y variaciones están incluidas dentro del alcance de las presentes revelaciones.

45

50 **[0046]** El cartucho ejemplar comprende: una porción de fluido a través del cual los flujos de muestra y en el que tiene lugar amplificación y detección de ácido nucleico; una porción neumática que controla el flujo a través de la porción de fluido; y al menos dos electrodos que proporcionan una diferencia de potencial para la detección de un ácido nucleico amplificado de interés. La porción de fluido y la parte de neumático se pueden construir de una capa de fluido, una lámina de fluido, una capa de neumático y una lámina de neumático tales como los descritos en relación con el cartucho ejemplar a continuación. Sin embargo, la porción de fluido no necesariamente consiste sólo de una capa de fluido y una lámina de fluido y la porción de neumático no necesariamente consiste sólo en una capa de neumático y una lámina neumática. Más bien, las capas pueden interactuar para producir la porción de fluido y la porción de neumático de tal manera que partes de la totalidad o algunas de las capas conforman cada parte. En lugar de referirse a las capas particulares del cartucho, la porción de fluido se refiere a las áreas particulares del cartucho que proporcionan la función de permitir flujo de la muestra controlada, y la parte de neumático se refiere a las áreas particulares del cartucho que proporcionan la función de controlar el flujo a través de la parte fluidica.

55

60 **[0047]** La carcasa, la porción de fluido y la porción de neumático están hechas de plástico. Por plástico se entiende un material orgánico sintético o natural que pueden formarse cuando estén suaves y luego endurecerse, incluyendo resinas, resinoides, polímeros, derivados de celulosa, materiales de caseína, y plásticos de proteínas. Ejemplos de plásticos a partir del cual el cartucho puede ser construido incluyen, pero no se limitan a termoplásticos, por ejemplo policarbonato, tereftalato de polietileno, copolímeros de olefina cíclicos tales como topaz, acrilonitrilo butadieno estireno, y elastómeros termoplásticos, por ejemplo polipropileno. Carcasas de plástico, porciones fluidicas con la influencia y porciones de neumáticos pueden incluir componentes que no están hechos de plástico (por ejemplo ampollas hechas de lámina de metal, insertos metálicos en la entrada de la muestra), pero que se forman

65



principalmente a partir de plástico. El uso de materiales de plástico facilita la fabricación económica de los cartuchos.

**[0048]** Mientras que las láminas de neumáticos y de fluidos pueden estar hechas de una lámina de metal, los materiales preferidos son de plástico, incluyendo los mencionados anteriormente. En particular, se prefiere que las láminas son un compuesto de tereftalato de polietileno/polipropileno.

**[0049]** La secuencia de ácido nucleico diana es cualquier ácido nucleico a detectar en una muestra. El ácido nucleico diana a amplificar y detectarse en el cartucho por lo general será ADN, pero también es posible amplificar y detectar ARN. En algunas formas de realización, un cartucho puede permitir amplificación y/o la detección de ambas dianas de ADN y ARN.

**[0050]** La muestra líquida es la composición que se introduce en el cartucho con el fin de determinar si el ácido nucleico diana de interés está presente. La muestra puede ser una composición en la que el ácido nucleico a detectar se sospecha que está presente (por ejemplo, para el diagnóstico clínico), o puede ser una composición en la que el ácido nucleico a detectar está potencialmente presente (por ejemplo, para las pruebas de contaminación).

**[0051]** La muestra líquida puede tener varias fuentes. Por ejemplo, puede ser el material obtenido de un animal o planta (por ejemplo, para el diagnóstico de infecciones o para el genotipado). Tales muestras se pueden obtener con invasividad mínima o de forma no invasiva, por ejemplo, la muestra puede ser obtenida de un animal utilizando un hisopo, o puede ser un fluido corporal. Como alternativa, la muestra puede ser material obtenido de los alimentos o el agua (por ejemplo, para las pruebas de contaminación). La muestra incluirá generalmente células, y el ácido nucleico diana (si está presente) puede ser extraído de estas células dentro del cartucho. Un experto en la técnica apreciará que las muestras se pueden diluir o de otro modo tratarse antes de introducirse en el cartucho, pero se prefiere que el cartucho puede manejar material que no ha sido tratado previamente de esta manera.

**[0052]** Un animal del que se obtiene la muestra puede ser un vertebrado o animal no vertebrado. Los animales vertebrados pueden ser mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen pero no se limitan a ratón, rata, cerdo, perro, gato, conejo, primates o similares. El animal puede ser un primate, y es preferiblemente un humano. Así, el cartucho puede ser utilizado para el diagnóstico clínico de muestras humanas.

**[0053]** Además de analizar una muestra, el cartucho puede analizar un control positivo y/o negativo para proporcionar una confirmación de que el cartucho está funcionando como se espera. El control se puede introducir en el cartucho por un usuario, o puede ser incluido dentro de un cartucho antes de su uso.

**[0054]** La inclusión de ácido nucleico de control positivo interno permite a un usuario identificar si se ha obtenido un resultado negativo para la muestra debido a que la amplificación de ácido nucleico no ha tenido éxito (falso negativo). Si el ácido nucleico de control positivo no se detecta en la cámara de detección, a pesar de su presencia en una cámara de amplificación, el usuario será capaz de identificar la prueba como un potencial resultado falso negativo, y puede realizar otra prueba.

**[0055]** La inclusión de un control negativo internos permite que un usuario identifique si un resultado positivo ha sido falsamente obtenido debido a la presencia de contaminación. Un control negativo puede implicar la realización de PCR en una cámara en la que no se proporciona ningún ácido nucleico, o en el que una muestra se somete a una reacción de amplificación sin componentes necesarios por ejemplo PCR sin cebadores. Si el ácido nucleico se detecta, sin embargo, en la cámara de detección, a pesar de su ausencia prevista en una cámara de amplificación, el usuario será capaz de identificar la prueba como un resultado positivo falso potencial, y puede realizar otra prueba.

**[0056]** Un ácido nucleico de control positivo puede ser cualquier ácido nucleico que no se encuentra en una muestra utilizada en el cartucho. El ADN de control interno se puede tomar de una bacteria que no es patógeno para los animales y que contiene un ácido nucleico que es altamente específico para la bacteria. Un ejemplo de una posible bacteria de la que el ácido nucleico control puede ser tomado para una muestra animal es *Pectobacterium atrosepticum*, aunque cualquier ácido nucleico de control puede ser utilizado que no estará presente en una muestra.

**[0057]** La porción fluidica del cartucho comprende canales y las cámaras a través de los cuales fluye la muestra. El flujo de la muestra a través del cartucho se controla de dos maneras. En primer lugar, la porción de fluido tiene una entrada de gas. La entrada de gas está conectada a un suministro de gas, y la inyección de gas en la porción de fluido a través de esta entrada permite que la muestra sea empujada aguas abajo a través del cartucho, hacia la cámara de detección. El suministro de gas puede ser proporcionado por el lector. Como alternativa, el suministro de gas puede ser un suministro de gas de a bordo. Preferiblemente, el suministro de gas es proporcionado por una fuente externa y la entrada de gas es conectada a un circuito neumático de tal manera que el suministro de gas se proporciona a través de una entrada neumática en el cartucho. En segundo lugar, al menos una válvula de control neumático controla el movimiento local de la muestra a través de la parte fluidica. La válvula de control neumático se puede controlar de forma independiente de otras válvulas controladas neumáticamente y puede controlarse independientemente de la alimentación de gas que, generalmente, provoca el movimiento aguas abajo de la muestra

a través de la entrada de gas. La entrada de gas y la válvula de control neumático también permite que la muestra se elimine a través de la porción de fluido, para excluir el exceso de volúmenes de material. La porción fluida también tiene un tubo de escape que permite que el aire y el material de desecho salga de los canales y las cámaras de la porción de fluido sin que ocurra una acumulación de presión en el cartucho. Preferiblemente, el tubo de escape comprende una cámara de residuos y/o un orificio de ventilación de residuos.

**[0058]** La porción de fluido del cartucho incluye reactivos y/o componentes físicos para la lisis celular y de separación de ácido nucleico. Estos pueden ser cualquier reactivos o componentes físicos que son capaces de lisar las células y separación de ácidos nucleicos a partir de los residuos celulares y otros componentes celulares. Por ejemplo, pueden comprender (i) un tampón de lisis que es capaz de causar la lisis de las células diana que puede estar presente en la muestra por ejemplo tampones incluyendo un detergente tal como fenoxipolietoxietanol (disponible como NP-40) o t-octilfenoxipolietoxietanol, (disponible como Triton X 100), o incluyendo tiocianato de guanidina, y/o (ii) un soporte de captura o columna que se une específicamente a ácidos nucleicos, pero no se une a otros componentes celulares no deseados (por ejemplo, proteínas y lípidos). La columna de captura comprende un filtro de captura y puede comprender adicionalmente un filtro de profundidad. Los filtros pueden estar hechos de fibras de vidrio (disponibles como filtros Whatman), o pueden estar hechos de sílice, aunque se pueden usar cualquier columna o soporte que es capaz de separar los ácidos nucleicos a partir de otros componentes celulares. La elución usando un tampón de lavado para eliminar los desechos celulares y otros componentes celulares, seguido por elución utilizando un tampón de elución para eluir los ácidos nucleicos separados del soporte de captura o columna puede llevarse a cabo de tal manera que la columna de la captura puede separar ácidos nucleicos a partir de restos de células y otros componentes celulares.

**[0059]** Un canal a través del cual fluye la muestra conecta fluidamente la entrada de muestra a al menos una cámara de amplificación donde puede tener lugar la amplificación de ácido nucleico. El propósito de la cámara de amplificación consiste en permitir la amplificación de cualquier ácido nucleico diana de interés que está presente en la muestra (y, cuando está presente, cualquier ácido nucleico de control positivo). Cualquier amplificación de ácido nucleico puede ser utilizado y estos se describen en más detalle a continuación en relación con un cartucho ejemplar. Los diferentes reactivos de amplificación de ácidos nucleicos que se requieren para diferentes métodos de amplificación de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Estos reactivos se proporcionan en o aguas arriba de la cámara de amplificación de tal manera que la muestra (y cualquier control positivo) incluye todos los reactivos necesarios para la amplificación de ácido nucleico una vez que alcanza la cámara de amplificación. La adaptación de un método de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con el ácido nucleico diana a detectar es también bien conocido en la técnica (*por ejemplo*, diseño de cebadores). Por consiguiente, el experto en la materia sería capaz de adaptar los reactivos para la amplificación de ácido nucleico en consecuencia. El término "cámara" no denota cualquier tamaño o geometría particular, sino que significa una región dentro de la porción de fluido que está diseñada para permitir que se produzca la amplificación de ácido nucleico. Así, por ejemplo, podría ser una región en la que la muestra puede ser aislada fluidamente (*por ejemplo*, mediante el uso de válvulas de control neumático), mientras que los pasos necesarios para la amplificación de ácido nucleico (*por ejemplo*, ciclo térmico, etc.) ocurren, y pueden situarse dentro del cartucho de modo que está en la proximidad de cualesquiera recursos externos que sean necesarios (*por ejemplo*, al lado de una fuente de calor dentro de un lector de cartucho, permitiendo de esta manera que se produzca el ciclo térmico).

**[0060]** Múltiples canales y/o cámaras de amplificación de prueba pueden ser incluidas en el cartucho. Los diferentes canales y/o cámaras de amplificación de prueba pueden incluir reactivos necesarios para amplificar diferentes ácidos nucleicos de interés. Por lo tanto el uso de múltiples canales de ensayo y/o cámaras de amplificación permiten que múltiples pruebas se realicen en un solo cartucho, simultáneamente (incluyendo los controles). Como alternativa, los reactivos para la amplificación de múltiples ácidos nucleicos diferentes pueden estar presentes en una única cámara de amplificación, y los diferentes ácidos nucleicos (si múltiples ácidos nucleicos diana, o un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control) se pueden amplificar simultáneamente en la misma cámara de amplificación.

**[0061]** Un canal adicional a través del cual fluye la muestra después de la amplificación de ácido nucleico de forma fluida conecta la al menos una cámara de amplificación a al menos una cámara de detección donde se pueden detectar los resultados de la amplificación de ácido nucleico. En o aguas arriba de la cámara de detección son reactivos para la detección de ácido nucleico de tal manera que la muestra incluye todos los reactivos necesarios para la detección una vez que alcanza la cámara de detección. Los reactivos para la detección de ácido nucleico pueden ser específicos para el ácido nucleico diana particular, es decir, pueden permitir la detección de la presencia de secuencia específica de ácido nucleico. Como alternativa, los reactivos para la detección de ácidos nucleicos pueden ser reactivos genéricos para detectar la presencia de los ácidos nucleicos. Tales reactivos genéricos se pueden utilizar si todos los ácidos nucleicos que no sean el ácido nucleico diana se eliminan antes de la detección. Por ejemplo, esto puede conseguirse proporcionando una nucleasa que es capaz de hidrolizar todos los ácidos nucleicos presentes en la muestra que no sea ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana amplificado puede ser protegido de la hidrólisis, por ejemplo por inclusión de modificaciones químicas en los cebadores que se incorporan en el producto amplificado y que puede no hidrolizarse. Reactivos para la detección de ácidos nucleicos se describen a continuación en relación con un cartucho ejemplar pero por lo general comprenden una sonda que incluye una etiqueta. La sonda es capaz de hibridarse con el ácido nucleico amplificado que ha sido amplificado en

la cámara de amplificación. Tras hibridación de la sonda al ácido nucleico amplificado, la detección del ácido nucleico se puede producir a través de un cambio detectable en la señal de la etiqueta. En algunas realizaciones, el cambio puede ser causado por la hidrólisis de la sonda. Cuando se hidroliza la sonda, la hidrólisis se consigue normalmente utilizando una nucleasa específica de doble cadena, que puede ser una exonucleasa o una endonucleasa. Preferiblemente, la nucleasa es endonucleasa de T7. La señal procedente de la etiqueta es capaz de experimentar un cambio tras la hidrólisis de la sonda. Esto es debido a un cambio en el entorno de la etiqueta cuando se mueve de estar unido al resto de la sonda a ser libre del resto de la sonda o unido a un solo nucleótido o una parte corta de la sonda. Otros detalles de los tipos de sondas y los métodos de detección que se pueden usar se pueden encontrar en Hillier et al. *Bioelectrochemistry*, 63 (2004), 307-310. Como alternativa, se pueden usar métodos para provocar un cambio detectable en la señal de la etiqueta que no se basan en la hidrólisis de la sonda *p. ej.* véase Ihara et al. *Nucleic Acids Research*, 1996, vol. 24, No. 21 4.273-4.280. Este cambio en el entorno de la etiqueta conduce a un cambio en la señal de la etiqueta. El cambio en la señal de la etiqueta puede ser detectado con el fin de detectar la presencia del ácido nucleico de interés.

**[0062]** Cuando se usa un ácido nucleico de control positivo, los reactivos para la detección de ácido nucleico también pueden incluir una sonda de control positivo que incluye una etiqueta. La sonda de control positivo es capaz de hibridarse con el ácido nucleico de control amplificado. La señal proporcionada por las etiquetas de las sondas de control y de destino positivos puede ser igual, pero presente en las cámaras de detección separadas de tal manera que las señales correspondientes al control y ácidos nucleicos de ensayo pueden distinguirse. Como alternativa, la señal proporcionada por las etiquetas de las sondas de control y de destino puede ser diferente, de tal manera que las señales son distinguibles una de la otra, incluso si las sondas están presentes en la misma cámara de detección.

**[0063]** Canales y/o cámaras de detección de ensayo múltiple pueden incluirse en el cartucho. Los diferentes canales y/o cámaras de detección de prueba pueden incluir reactivos requeridos para detectar diferentes ácidos nucleicos de interés. Por lo tanto el uso de múltiples canales y/o cámaras de prueba de detección permite que varias pruebas se realicen en un cartucho único, simultáneamente. Como alternativa, los reactivos para la detección de múltiples ácidos nucleicos diferentes pueden estar presentes en una única cámara de detección, y los diferentes ácidos nucleicos (si múltiples ácidos nucleicos diana o un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control) se pueden detectar simultáneamente en la misma cámara de detección.

**[0064]** La etiqueta es detectable mediante el uso de electrodos del cartucho, y así la etiqueta será normalmente una etiqueta electroquímica, tal como un ferroceno. Los ejemplos de marcadores que se pueden usar se pueden encontrar en el documento WO03/074731, WO2012/085591 y PCT/GB2013/051643. La señal emitida por la etiqueta puede ser detectada por un lectura de cartucho.

**[0065]** La porción de neumático del cartucho comprende al menos un circuito neumático el cual controla al menos una válvula controlada neumáticamente. La parte neumática controla el flujo de muestra a través del cartucho por la apertura y cierre de las válvulas controladas neumáticamente. La apertura y cierre de las válvulas se controlan por cambios en la presión neumática en el circuito neumático que se aplica a través de una entrada de presión neumática. Normalmente, el cartucho contiene muchas válvulas neumáticamente controladas. Las válvulas neumáticamente controladas pueden ser controladas por las entradas de presión neumática separadas. Estas válvulas se pueden utilizar para evitar el movimiento aguas abajo de muestra a través de la porción de fluido hasta los pasos necesarios se han realizado y/o para evitar el movimiento inverso no deseado de la muestra aguas arriba. Por ejemplo, una válvula puede estar provista aguas arriba de la al menos una cámara de amplificación con el fin de evitar el movimiento aguas abajo en la cámara de al menos una amplificación hasta la lisis celular y tiene lugar la separación de ácidos nucleicos. Después de la lisis celular y separación de ácidos nucleicos de la válvula aguas arriba de la al menos una cámara de amplificación se pueden abrir con el fin de permitir el flujo de aguas abajo. A continuación, se puede cerrar de nuevo, para evitar el reflujos de la cámara de nuevo hacia la entrada de la muestra.

**[0066]** El cartucho comprende al menos dos electrodos que pueden proporcionar una diferencia de potencial a través de la al menos una cámara de detección. La diferencia de potencial provoca que la corriente fluya a través de la al menos una cámara de detección, permitiendo de este modo la detección de la señal de las etiquetas electroquímicamente activas.

**[0067]** Un cartucho ejemplar que opera de acuerdo con la descripción anterior se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos.

## 1. El cartucho ejemplar

### 1.1 Visión general

**[0068]** El cartucho ejemplar descrito a continuación pretende ser un cartucho desechable de un solo uso para realizar la una prueba en una muestra introducida en el cartucho. El cartucho ejemplar es un cartucho de fluido con canales de una escala apropiada (como se detalla más adelante). Sin embargo, la invención se puede realizar en un dispositivo de microfluidos, o un LOC. Una vez que la prueba ha sido ejecutada, se prefiere que se deshaga del cartucho. Sin embargo, si así se desea, el cartucho puede enviarse para su reprocesamiento para permitir que se

utilice de nuevo

5 **[0069]** Se prefiere que el cartucho comprenda todos los agentes biológicos necesarios para la realización de la prueba de elección. Por ejemplo, el cartucho ejemplar se utiliza para detectar la presencia, ausencia o cantidad de un patógeno de interés. Cualquier patógeno puede ser detectado. Ejemplos de patógenos que pueden ser detectados por el cartucho son *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma genitalium* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Para ello, el cartucho comprende reactivos para amplificación de ácido nucleico. Amplificación de ácidos nucleicos se puede realizar utilizando cualquier método de amplificación de ácido nucleico. El método de amplificación de ácido nucleico puede ser un método de termociclado en el que la temperatura a la que se lleva a cabo el método es variado de tal manera que diferentes pasos de la amplificación son capaces de tener lugar a diferentes temperaturas dentro del Ciclo. Por ejemplo fusión, hibridación de los cebadores y extensión pueden realizarse a diferentes temperaturas. Mediante el ciclado a través de las temperaturas, puede controlarse el momento de cada uno de los pasos del método. Como alternativa, la amplificación de ácido nucleico puede ser un método isotérmico en el que la temperatura se mantiene constante. 15 Tanto en el termociclado como en los métodos de amplificación isotérmica de ácido nucleico, la temperatura se controla durante la amplificación de ácido nucleico.

20 **[0070]** Los ejemplos de métodos de amplificación de ácidos nucleicos son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación dependiente de helicasa y la amplificación isotérmica mediada por bucle. Los reactivos para la amplificación de ácido nucleico pueden variar dependiendo del método de amplificación de ácido nucleico usada pero incluyen una polimerasa y trifosfatos de nucleótidos.

25 **[0071]** Como se explica a continuación, el cartucho también comprende reactivos de detección que son capaces de detectar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos amplificados que son el producto del método de amplificación de ácido nucleico. Los reactivos para la detección de ácido nucleico comprenden una sonda que es capaz de hibridarse con el ácido nucleico amplificado. La sonda incluye una etiqueta de ferroceno.

30 **[0072]** Después de la hibridación de la sonda con el ácido nucleico amplificado, la detección del ácido nucleico ocurre a través de un cambio detectable en la señal de la etiqueta. El cambio es causado por la hidrólisis de la sonda, que se consigue mediante una nucleasa de doble hebra específica. La nucleasa es una endonucleasa de T7. El ferroceno da señales electroquímicas diferentes cuando es parte de una sonda o cuando está unido únicamente a un solo nucleótido, y así se detecta la hidrólisis fácilmente. Por lo tanto, el cambio en la señal de la etiqueta permite la detección de la presencia del ácido nucleico de interés. 35

**[0073]** Los electrodos permiten que el cambio detectable en la señal de la etiqueta, lo cual se produce en presencia del ácido nucleico diana, pueda detectarse.

40 **[0074]** El cartucho está configurado para uso con un lector de cartucho (no mostrado). El cartucho comprende un número de interfaces neumáticas, mecánicas, térmicas y eléctricas (descritas en más detalle a continuación) a través del cual el lector interactúa con el cartucho para realizar la prueba. Por lo tanto, en uso, el cartucho se inserta en el lector, y el lector se activa para comenzar a interactuar con el cartucho a través de las interfaces para realizar la prueba. A los efectos de la comprensión de la presente invención, no es necesario describir exactamente cómo el cartucho interactúa con el lector para llevar a cabo una prueba en particular y proporcionar los resultados de las pruebas, pero una visión general de una operación ejemplar de un cartucho está provisto de aquí en adelante. 45

## 1.2 Diagrama esquemático del cartucho ejemplar

50 **[0075]** Antes de explicar la estructura y disposición de los componentes de un cartucho de fluido a modo de ejemplo en detalle, es útil describir el diseño del cartucho ejemplar en un nivel alto con referencia al esquema mostrado en la FIG. 1.

55 **[0076]** Es conveniente considerar el diseño general del cartucho en términos del flujo de líquidos, incluyendo la muestra líquida, a través del cartucho. A menos que se especifique lo contrario en lo sucesivo, el paso de líquidos, incluyendo la muestra líquida y los tampones líquidos se conoce como la 'vía de fluido' que tiene un extremo aguas arriba y un extremo corriente abajo. A menos que se especifique lo contrario en lo sucesivo, 'corriente arriba' se refiere generalmente a la dirección del flujo de los líquidos y 'corriente abajo' se refiere a la dirección opuesta a la dirección del flujo. La vía de fluido en el cartucho ejemplar puede tener diferentes ramas (y por lo tanto formar diferentes vías de fluido), pero todas las vías tienen una dirección reconocible de flujo que permite que un experto en la materia identifique las direcciones aguas arriba y aguas abajo. Sin embargo, hay una excepción a esta definición general, que es cuando la muestra de líquido se bombea entre la cámara de mezcla 10 y el fuelle 20. En este caso, el fluido se bombea intermitentemente de nuevo aguas arriba en la dirección opuesta a la general dirección del flujo de fluido, que es corriente abajo. Esta mezcla sirve para mezclar la lisis y la muestra y para rehidratar el control interno. 60 65

- 5 **[0077]** La muestra líquida se introduce en el cartucho a una muestra de la cámara de mezcla 10 a través de un puerto de entrada. Una disposición particular de un puerto de entrada preferido puede por sí mismo formar un aspecto de la invención aislado del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación. Un indicador de muestra 12 está acoplado de manera fluida a la cámara 10 de mezcla de la muestra de tal manera que una muestra introducida en la cámara 10 de mezcla de la muestra es visible en el indicador de la muestra 12. También conectada a la cámara 10 de mezcla de la muestra es una ampolla 14 que contiene un tampón de lisis. El tampón de lisis comprende tiocianato de guanidina. Una vez que la muestra se ha introducido en la cámara 10 de mezcla de muestra, y se inicia un ensayo, la ampolla de lisis 14 se contrae para expulsar el tampón de lisis en la cámara 10 de mezcla donde se mezcla con la muestra de líquido introducida en la misma.
- 10 **[0078]** Aguas abajo de la cámara 10 de mezcla, a lo largo de un canal principal 16 de la muestra, es un filtro grueso 18. El filtro grueso 18 filtra cualesquiera residuos de gran tamaño en la muestra líquida, tal como la piel o el pelo corporal, cuando la muestra de líquido pasa a través del canal principal 16.
- 15 **[0079]** Aguas abajo del filtro grueso 18, a lo largo del canal principal 16, es un fuelle 20 que tiene una válvula de fuelle 22a aguas arriba y una válvula de fuelle corriente abajo 22b. Como se describe en más detalle a continuación, el fuelle 20, junto con sus válvulas aguas arriba y aguas abajo 22a-b, es capaz de bombear la muestra líquida desde el extremo aguas arriba de la vía de fluido (es decir, desde la cámara 10 de mezcla de la muestra) al extremo aguas abajo. En resumen, esto se logra en virtud de membranas flexibles dentro de los fuelles 20 y las válvulas de fuelle 20 aguas arriba y aguas abajo 22a-b que accionan para crear diferencias de presión locales para, por un lado, aceptar la muestra de líquido de la cámara de mezcla de muestra 10 en el fuelle 20 y, por el otro lado, desde el fuelle 20 corriente más abajo a través del canal principal 16. Esto se consigue mediante el accionamiento neumático cuidadosamente coreografiado de las membranas flexibles en las válvulas. Disposiciones particulares de una válvula preferida pueden por sí mismas formar aspectos inventivos aislados del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación.
- 20 **[0080]** Aguas abajo del fuelle a lo largo del canal principal 16 es una columna de captura 24. El propósito de la columna de captura 24 consiste en separar los ácidos nucleicos a partir de los residuos celulares y otros componentes celulares. La columna de captura comprende un filtro de captura y un filtro de profundidad hechos de fibras de vidrio. Una disposición particular de una columna de captura puede por sí mismo formar un aspecto inventivo aislado del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación.
- 25 **[0081]** Dos canales de derivación 26, 28 se unen al canal principal 16 entre la válvula de fuelle aguas abajo 22b y la columna de captura 24. El propósito de los canales de derivación consiste en introducir tampones líquidos necesarios para realizar la prueba deseada. Por ejemplo, con la prueba realizada por el cartucho ejemplar, es necesario introducir un tampón de elución y un tampón de lavado en el canal principal una vez que la muestra ha pasado a su través. El tampón de lavado está contenido en una ampolla de tampón de lavado 30 y el tampón de elución está contenido en una ampolla de tampón de elución 32. La introducción del tampón de lavado y tampón de elución en el canal principal 16 está controlada por la válvula de tampón de lavado 34 y la válvula tampón de elución 36, respectivamente. En el punto adecuado en la prueba, las ampollas de lavado y tampón de elución 30, 32 se contraen para expulsar los tampones de lavado y de elución en los canales de derivación 26, 28 y por tanto en el canal principal 16 a través de las válvulas de tampón de lavado y elución 34, 36.
- 30 **[0082]** Aguas abajo de la columna de captura 24, a lo largo de una rama de residuos 16a del canal principal 16, es una cámara de residuos 38. Una disposición particular de una cámara de residuos preferidos pueden por sí mismo formar un aspecto aislado de la invención del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación. El propósito de la cámara de residuos 38 consiste en recoger los restos de células y componentes celulares distintos de los ácidos nucleicos y los contienen, evitando de este modo que entren en el canal de ensayo 54a o el canal de control 54b. La cámara de residuos 38 es ventilada a la atmósfera a través de un orificio de ventilación de residuos 40, y se proporciona un impactador de aerosol 42 entre la cámara de residuos 38 y el desperdicio de ventilación 40 para evitar que la materia particulada se escape de la cámara de residuos 38 a la atmósfera. Una válvula de cámara de residuos 44 en la rama de residuos de canal principal 16a del canal principal 16 permite e impide que los fluidos pasen a la cámara de residuos 38 en puntos apropiados durante la prueba.
- 35 **[0083]** Aguas abajo de la columna de captura 24, a lo largo de una rama de elución 16b del canal principal 16, se sitúa una cámara de elución 46. El propósito de la cámara de elución 46 consiste en permitir que la preparación de muestras se asiente y para que las burbujas se dispersen antes de que la muestra entre en las cámaras de amplificación. Una válvula de la cámara de elución 48 en la rama de elución 16b del canal principal 16 permite y evita que los fluidos pasen a la cámara de elución 46 en puntos apropiados durante la prueba.
- 40 **[0084]** Aguas abajo de la cámara de elución 46 se encuentra un canal de mezcla intrincado 52. Aquí, la muestra preparada se mezcla antes de pasar por la válvula de aislamiento 50.
- 45 **[0085]** En la presente solicitud, los componentes aguas arriba de la válvula de aislamiento 50 son referidos como comprendidos en el 'extremo frontal' del cartucho, mientras que los componentes aguas abajo de la válvula de aislamiento 50 se conocen como por comprenderse en el 'extremo posterior' del cartucho. En términos generales, la
- 50
- 55
- 60
- 65

muestra líquida se prepara para el análisis en el extremo frontal del cartucho, y el análisis se lleva a cabo sobre la muestra en el extremo posterior del cartucho.

5 **[0086]** La válvula de aislamiento 50 está abierta para permitir que la muestra de líquido preparada pase desde el extremo delantero hasta el extremo posterior del cartucho. En un punto apropiado en la prueba, después de que la muestra líquida haya sido preparada y se encuentra dentro del extremo posterior del cartucho para el análisis, la válvula de aislamiento 50 se cierra para evitar que la muestra vuelva a entrar en el extremo frontal. Una vez que la válvula de aislamiento 50 se cierra, no se puede abrir de nuevo. La válvula de aislamiento 50 también actúa como una salvaguardia en caso de un fallo de alimentación, en el que el lector cierra la válvula de aislamiento 50 para prevenir fugas.

10 **[0087]** Aguas abajo de la válvula de aislamiento 50, la vía de fluido se divide en un canal de prueba de amplificación 54a y un canal de control de la amplificación 54b. Cada uno de los canales de amplificación 54a-b comprende una cámara de amplificación 56a-b que tiene una cámara de amplificación de válvula de entrada 58a-b y una cámara de amplificación de la válvula de salida 60a-b. Cualquier método de amplificación de ácido nucleico puede realizarse en la cámara de amplificación de ácido nucleico. Si se usa PCR, las cámaras de amplificación de ácidos nucleicos contienen una polimerasa de ADN termoestable, dNTPs, un par de cebadores que son capaces de hibridarse con el ácido nucleico que se ha de amplificar. Opcionalmente, las cámaras de amplificación de ácido nucleico pueden contener adicionalmente sales de tampón, MgCl<sub>2</sub>, agentes de pasivación, N-glicosilasa de uracilo y dUTP. Un ejemplo de una polimerasa de ADN termoestable que se puede usar es polimerasa de Taq de *Thermus aquaticus*.

15 **[0088]** Cada una de las cámaras de amplificación de ácido nucleico en el cartucho ejemplar comprende características de contención de reactivos en forma de pocillos poco profundos primero y segundo formados en la capa de fluido. Los reactivos que se utilizarán en el cartucho se manchan en los pocillos. En el cartucho ejemplar, los reactivos específicos para pruebas y los reactivos genéricos están aislados unos de otros mediante la detección de cada uno en un pocillo diferente. Por lo tanto, los reactivos específicos para pruebas se han manchado en un primer pocillo en la cámara y los reactivos genéricos son vistos en un segundo pocillo en la cámara. Mediante la identificación de los reactivos por separado, es más fácil intercambiar los reactivos específicos para pruebas durante la fabricación para un conjunto diferente de reactivos específicos para pruebas, para así llevar a cabo una prueba diferente, manteniendo los reactivos genéricos como son.

20 **[0089]** En el cartucho de ejemplo, la relación de cámaras de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de las cámaras es de 1: 2. La muestra preparada entra en el extremo posterior del cartucho a la válvula de aislamiento 50 y se divide en dos cámaras de amplificación de ácidos nucleicos. Después del procesamiento, cada una de las dos medidas procesadas de muestra de la cámara de amplificación de ácido nucleico se divide en dos cámaras de detección. Por lo tanto, para cada muestra introducida en el cartucho ejemplar, cuatro cámaras de detección pueden ser llenadas a partir de dos cámaras de amplificación de ácidos nucleicos, facilitando por lo tanto la amplificación de duplex y la detección 4-plex.

25 **[0090]** Sin embargo, se apreciará que uno o tres o más cámaras de amplificación de ácidos nucleicos se pueden proporcionar para proporcionar cualquier nivel de multiplexación deseado, y que el número de las cámaras de detección proporcionado puede ajustarse en consecuencia para mantener una relación de 1:2 de las cámaras de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de cámaras.

30 **[0091]** Se prefiere la relación 1:2 para el cartucho ejemplar porque una tal relación permite que dos veces el número de ácidos nucleicos diana se ensayen en comparación con el número de diferentes etiquetas requeridas para la detección en las cámaras de detección. Sin embargo, se apreciará que la relación se puede cambiar en función del número de etiquetas y objetivos de PCR para la muestra de líquido. Por ejemplo, la relación puede ser de 1:1, 1:3 o 1:n tal que hay cámaras de detección n que provienen del canal principal de cada vía de fluido cuando hay n veces las dianas de PCR multiplexadas para el número de etiquetas.

35 **[0092]** Los cebadores de PCR específicos para *Chlamydia trachomatis* se secan en la cámara de amplificación en el canal de prueba de amplificación junto con los otros reactivos requeridos para la amplificación de ácido nucleico. Los cebadores de PCR específicos para un ácido nucleico de control positivo se secan en la cámara de amplificación en el canal de control de amplificación junto con los otros reactivos necesarios para la amplificación de ácido nucleico. Un ácido nucleico de control positivo también se proporciona en la cámara de amplificación en el canal de control de amplificación, tomado de *Pectobacterium atrosepticum*. Los reactivos secos se reconstituyen cuando la muestra líquida los alcanza.

40 **[0093]** Aguas abajo de las válvulas de salida de cámara de amplificación 60a-b cada uno de los canales de amplificación 54a-b se divide en dos canales de detección adicionales, dando lugar a dos cámaras de detección para cada cámara de amplificación, dando un total de cuatro cámaras de detección 62a-d en total. Los reactivos para la detección de ácido nucleico, incluyendo la sonda diana, se secan abajo en las cámaras de detección 62a-d de aguas abajo de la cámara de amplificación de ensayo 56a o 56b. Los reactivos para la detección de ácido nucleico que incluye la sonda de control se secan abajo en las cámaras de detección de aguas abajo de la cámara de amplificación de control 56a o 56b (lo que no sea la cámara de ensayo mencionada anteriormente). Cada cámara

de detección 62a-d está provista de su propio muelle de gas 64a-d que forma un punto muerto en el extremo aguas abajo de la vía de fluido.

**[0094]** Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos son proporcionados en cámaras de detección. Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos incluyen sondas que tienen una etiqueta de ferroceno. Estas sondas son capaces de hibridar con los ácidos nucleicos amplificados. Después de la hibridación de las sondas a los ácidos nucleicos amplificados, las sondas se hidrolizan por una nucleasa específica de doble cadena que hace que la etiqueta se libere del resto de la sonda. Como se explicó anteriormente, la liberación de la etiqueta del resto de la sonda provoca un cambio detectable en la señal de la etiqueta. La sonda de control se proporciona en las cámaras de detección separadas a la sonda para la diana y la detección del ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control tienen lugar en diferentes cámaras de detección, de manera que las señales son distinguibles una de otra.

**[0095]** Aguas abajo de las válvulas de salida de amplificación 60a-b, pero aguas arriba de las horquillas que crean los cuatro canales de detección, dos canales de derivación 66a-b se unen respectivamente a los dos canales de amplificación 54a-b. El propósito de los canales de derivación 66a-b consiste en eliminar el exceso de muestra de líquido dentro de los canales de amplificación 54a-b antes de que la muestra de líquido entre en las cámaras de detección 62a-d. Los canales de derivación 66a-b se conectan a una válvula de derivación 68, que también se acopla de manera fluida a la rama de cámara de elución 16b del canal principal 16, corriente abajo de la válvula de aislamiento 50, antes de que el canal se divide en canales de amplificación 54a y 54b.

**[0096]** Una disposición particular de una cámara preferida en el cartucho, tal como las cámaras de amplificación primera y segunda o las cámaras de detección primera a cuarta, puede en sí formar un aspecto de la invención aislado del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación.

**[0097]** Se apreciará que el número de cámaras de amplificación, y el número de cámaras de detección en el cartucho ejemplar pueden variar dependiendo de la implementación preferida. Por otra parte, otras configuraciones de canales, cámaras, válvulas y así sucesivamente son posibles sin apartarse del alcance de la invención, como se define por las reivindicaciones.

**[0098]** La estructura física y la operación de los diversos componentes del cartucho ejemplar introducido anteriormente se explicarán ahora con referencia a las FIGS. 2 a 10.

### 1.3 Estructura física de un cartucho ejemplar

#### 1.3.1 Descripción y características externas del cartucho ejemplar

**[0099]** Un cartucho ejemplar se muestra en la FIG. 2. Como se describió anteriormente, el lector interactúa con el cartucho a través de una pluralidad de interfaces. Las interfaces que se muestran en el cartucho ejemplar 100 son: una interfaz neumática 101; una interfaz eléctrica 102; una interfaz de válvula de derivación 103; y una interfaz de válvula de aislamiento 104. Cada una de estas interfaces se describe con más detalle a continuación. Se apreciará que más o menos interfaces podrían proporcionarse, dependiendo de la implementación preferida.

**[0100]** También prevista en el cartucho, pero no mostrada, es una interfaz térmica. La interfaz térmica permite que la temperatura de las cámaras de amplificación se regule para permitir que la amplificación del ácido nucleico tenga lugar.

**[0101]** El cartucho ejemplar 100 mostrado en la FIG. 2 comprende un extremo de inserción 105 para la inserción en el lector, y un extremo no de inserción 106. Proximal al extremo no de inserción 106 es una entrada de muestra 107 para introducir una muestra en la cámara 10. En el cartucho de mezcla ejemplar, la muestra suele incluir células, y el ácido nucleico diana (si está presente) se puede extraer de estas células, pero otras muestras de fluido tales como un eluato de bolita, orina, semen, sangre, saliva, heces, sudor y lágrimas podrían utilizarse en otras implementaciones. La muestra puede ser introducida en la cámara de mezcla de muestra 10 a través de la entrada de muestra 107 usando una pipeta, por ejemplo.

**[0102]** El cartucho ejemplar 100 y el lector están configurados de manera que cuando se inserte el cartucho en el lector, todas las interfaces mencionadas se pueden actuar por el lector. Por otra parte, la muestra de entrada 107 permanece externa al lector de tal manera que una muestra puede ser introducida en la cámara de mezcla 10, mientras que el cartucho se inserta en el lector de la muestra.

**[0103]** El cartucho ejemplar 100 mostrado en la FIG. 2 comprende además una ventana del indicador de muestra 109, a través del cual el indicador de muestra 12 es visible para determinar si una muestra se ha introducido en la cámara de mezclado de la muestra 10.

**[0104]** Todas las interfaces neumáticas, mecánicas y eléctricas en el cartucho ejemplar 100 se encuentran en la misma cara del cartucho, en este caso la cara superior 110. La interfaz térmica (no mostrada) se proporciona en la cara inferior de cartucho. Esto simplifica el diseño del lector, lo que puede proporcionar las piezas asociadas

neumáticas, mecánicas y eléctricas que interactúan con esas interfaces en la misma región del lector, haciendo con ello que se mejore el uso del espacio. También permite que la parte térmica del lector se proporcione separadamente de las piezas neumáticas, mecánicas y eléctricas.

5 1.3.2 Los componentes internos del cartucho

10 **[0105]** El cartucho ejemplar 100 mostrado en la FIG. 2 se forma a partir de diversos componentes que se describirán ahora. La FIG. 3 muestra una vista en despiece del cartucho de ejemplar 100 de la FIG. 2. El cartucho 100 comprende, de arriba a abajo, una carcasa 111, el submontaje de una ampolla 112, un neumático, una lámina 113, una capa neumática 114, una capa de fluido 115 y una lámina de fluido 116. también se muestra en la FIG. 3 una capa de electrodo 117, dos filtros 118 y una pluralidad de almohadillas absorbentes 119, que se describirán en más detalle a continuación.

15 **[0106]** La carcasa 111 se fabrica a partir de estireno de butadieno de acrilonitrilo. Las láminas de neumáticos y de fluidos 113, 116 se fabrican a partir de un compuesto de tereftalato de polietileno/polipropileno. Las capas de neumáticos y de fluidos 114, 115 son fabricadas de polipropileno.

20 **[0107]** Con la excepción de la carcasa 111, los filtros 118 y las almohadillas 119, cada uno de los componentes mencionados en el párrafo anterior se adhieren a su componente adyacente o componentes. Por lo tanto, el subconjunto de ampolla 112 se adhiere a la lámina de neumático 113, que se adhiere a la neumática, la capa 114, que se adhiere a la capa de fluido 115, que se adhiere a la lámina de fluido 116. La capa de electrodo 117 se adhiere a la capa de fluido 115 también.

25 **[0108]** La adhesión de las capas entre sí proporciona una serie de canales de fluido estanco en el cartucho, junto con cámaras asociados, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes. Los canales que pasan un líquido a su través son estancos a los canales que pasan un gas a su través son estancos a los gases. Opcionalmente, todos los componentes son tanto estancos a los líquidos como a los gases. Por ejemplo, rebajes y aberturas formadas en uno o ambos lados de las capas neumáticas y fluidicas crean, cuando se intercalan y se adhieren a las láminas de neumáticos y de fluidos, respectivamente, las formas necesarias para proporcionar los canales mencionados, cámaras, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes.

30 **[0109]** Cada uno de los componentes mencionados anteriormente en la FIG. 3 se describirá ahora en más detalle.

35 1.3.3 Carcasa 111

40 **[0110]** La FIG. 4 muestra la carcasa 111 en más detalle. Como se muestra, la carcasa 111 comprende una superficie superior de forma generalmente rectangular 120 y las paredes 121 dependiendo de la misma en los cuatro lados (dos de los cuales son visibles en la FIG. 4). Un propósito principal de la carcasa 111 consiste en proteger ciertos componentes del cartucho, más notablemente el submontaje de ampolla 112 y la interfaz de válvula de aislamiento 104. Por consiguiente, se observa que la carcasa 111 es más corta que las capas de neumáticos y de fluidos 114, 115 de tal manera que se superpone a sólo una parte de las capas cuando el cartucho 100 está montado. En el cartucho ejemplar 100, la interfaz neumática 101, interfaz electrónica 102, y la interfaz de válvula de derivación 103 no están cubiertas por la carcasa 111 para proporcionar la facilidad de acceso por parte del lector.

45 **[0111]** La superficie superior 120 de la carcasa 111 tiene tres aberturas 122a-c en la misma, teniendo cada una paredes dependiendo de las periferias de las aberturas para formar, cuando el cartucho está montado, tres rebajes. El propósito de los rebajes consiste en alojar las ampollas del subconjunto de ampolla 112 de tal manera que se puede acceder a las ampollas y presionarlas por el lector, pero están protegidas de otra forma de impacto accidental. Naturalmente, dado que el cartucho ejemplar comprende tres ampollas, la carcasa 111 comprende tres aberturas correspondientes formando tres rebajes correspondientes 122a-c. Se apreciará que más o menos ampollas, aberturas y escotaduras pueden estar provistas, en función relativa a la aplicación preferida. Alternativamente, la carcasa 111 podría comprender una sola abertura que forma una sola carcasa que aloje todas las ampollas disponibles.

55 **[0112]** Las paredes laterales 121 de la carcasa 111 que se extienden a lo largo de la longitud de la carcasa 111 entre el extremo de inserción 105 y el extremo no de inserción 106 del cartucho 100 comprenden bridas 123 a lo largo de al menos una porción de sus bordes inferiores. El propósito de las bridas 123 es doble. En primer lugar, comprenden una o más ventanas 124a-b para recibir un número correspondiente de pestañas formadas en la capa neumática 114 para mantener el cartucho 100. En segundo lugar, las bridas 123 están dimensionadas de manera que sobresalgan más allá de la superficie inferior de la lámina de fluido 116 cuando el cartucho está montado, de tal manera que la lámina de fluido 116 está suspendida por encima de una superficie plana sobre la que se coloca el cartucho 100. Esto evita daños accidentales a la lámina de fluido 116 que podrían resultar de lo contrario.

65 **[0113]** A pesar de que en el cartucho ejemplar representado en la FIG. 4, las bridas 123 se proporcionan a lo largo de sustancialmente la longitud de dos lados opuestos del cartucho, se apreciará que las bridas se pueden proporcionar a lo largo de tres o cuatro bordes del cartucho y todavía suspender la lámina por encima de una



superficie plana sobre la que se coloca el cartucho. Del mismo modo, aunque el cartucho representado en la FIG. 4 muestra bridas 123 que se extienden a lo largo de sustancialmente toda la longitud del borde, una pestaña que se extiende sólo parcialmente a lo largo de un borde puede proporcionarse, o múltiples bridas pueden proporcionarse a lo largo de cada borde.

**[0114]** La carcasa 111 comprende además, en el extremo no de inserción 106, un agarre 125 para facilitar la inserción del cartucho en y la extracción del cartucho 100 desde el lector de mano. El mango 125 comprende una serie de crestas y ranuras formadas en la carcasa 111, pero estructuras alternativas para aumentar la fricción, tales como moletas, también son posibles.

**[0115]** La carcasa 111 comprende además una abertura de entrada de muestra 126 a través de la cual una muestra se puede introducir en la cámara de mezcla de muestra 10 del cartucho 100 usando una pipeta, por ejemplo. Alrededor de la abertura de entrada 126 para un diámetro dado es una cuenca 127 empotrada en la superficie superior 120 de la carcasa 111 para adecuarla a una cierta cantidad de derrame de la muestra líquida. Mientras que la cuenca 127 de la realización ejemplar es sustancialmente plana, puede estar inclinada hacia la abertura de entrada 126, de manera que todo desagüe derrame a través de la abertura de entrada 126.

**[0116]** La carcasa ejemplar 111 comprende además una pluralidad de escotaduras: un primer recorte 128 que forma la ventana de muestra 109, y un segundo recorte 129 para proporcionar acceso a la interfaz de válvula de aislamiento 104. Como con los rebajes que protegen las ampollas, proporcionando acceso a la interfaz de válvula de aislamiento 104 sólo a través de un recorte 129 en la carcasa 111, la interfaz de válvula de aislamiento 104 está protegida en cierta medida de impacto accidental, que podría accionar la válvula de aislamiento y hacer que el cartucho sea inoperable.

#### 1.3.4 Subconjunto de ampolla 112

**[0117]** La FIG. 5 muestra el subconjunto de ampolla 112 en más detalle. El subconjunto de ampolla 112 puede ser fabricado por separado, durante lo cual las ampollas se precargan con los reactivos líquidos necesarios para la realización de la prueba preferida, y posteriormente se adhieren a la lámina de neumático 113.

**[0118]** Subconjuntos de ampolla (o 'ampollas') son familiares para una persona experta. Una ampolla es una cámara plegable para contener un líquido, que puede expulsarse de la ampolla presionando en la ampolla y colapsándolo. En paquetes de ampolla típicos, la cámara de una ampolla se sella mediante una lámina u otra capa frangible que se rompe una vez que la presión dentro de la cámara alcanza una magnitud particular a medida que se contraiga la ampolla.

**[0119]** En el cartucho ejemplar, el subconjunto de ampolla 112 comprende tres ampollas 130a-c. Estos contienen, respectivamente, el tampón de lisis que comprende reactivos capaces de realizar la lisis celular, el tampón de lavado y el tampón de elución.

**[0120]** Los ejemplos de subconjunto de ampolla 112 comprenden un sustrato 131 sobre el cual las ampollas antes mencionadas 130a-c están formadas por una capa polimérica deformable que está conformada para proporcionar las cámaras. Tres aberturas 132a-c, que corresponden a las tres ampollas 130a-c, pasan a través del sustrato 132. Cada una de las aberturas está cubierta por la capa polimérica deformable que forma la cámara, que de este modo conecta la abertura a la cámara salvo por un sello 133a-c entre las respectivas aberturas 132a-c y las cámaras. Tras aplicación de una presión adecuada en la ampolla 130a-c, el sello 133a-c se rompe, dando lugar a que el contenido líquido de la ampolla se expulse de la ampolla y fluya a través de la abertura 132a-c en el sustrato 131 fuera del subconjunto de ampolla.

**[0121]** Como se muestra, los sellos 133a-c, al menos parcialmente rodean la periferia de las cámaras, donde se reúnen con el sustrato 131. En el punto en cada sello 133a-c que está diseñado para romperse (formando de este modo el paso de líquido entre la abertura 132a-c y la cámara), el sello 133a-c puede ser más débil que el resto de la periferia. Esto asegura que la parte correcta del sellado 133a-c cuando se aplica la presión adecuada.

**[0122]** Las ampollas pueden ser colapsadas por el lector cuando se inserta el cartucho. Uno o más actuadores mecánicos (tales como un pie) pueden ser aplicados por el lector en el rebaje con el fin de contraer la ampolla.

**[0123]** El subconjunto de ampolla 112 comprende además dos agujeros de referencia 134a-b configurados para permitir que un aparato de montaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento del conjunto durante la fabricación.

#### 1.3.5 Capa de neumático 114

**[0124]** FIGS. 6A y 6B muestran la capa de neumático 114 con mayor detalle. La FIG. 6A es una vista superior de la capa neumática y la FIG. 6B es una vista inferior. La capa neumática 114 se compone de una capa de plástico rígido 135 que, en ciertos lugares, es sobremoldeada con una pluralidad de membranas flexibles para formar ciertos

componentes cuando el cartucho está montado. Las membranas flexibles se fabrican a partir de un elastómero termoplástico.

**[0125]** La capa de plástico rígido 135 tiene una pluralidad de huecos de varias formas y aberturas a su través. En combinación con la capa de fluido 115, ciertas cavidades dentro de, y/o aberturas a través de, la capa de plástico rígido 135 forman un número de componentes, entre ellos: la cámara 136 de mezcla de la muestra; la cámara de residuos 137; la columna de captura 138; la cámara de elución 139; las cámaras de amplificación primera y segunda 140a-b; y las cámaras de detección primera a cuarta 141 a-d. También se proporciona una abertura 142 para dar acceso a la capa de electrodo 117.

**[0126]** En combinación con las membranas flexibles sobremoldeadas y la lámina de neumático 113, ciertas otras aberturas a través de la capa de plástico rígido forman un número de otros componentes, entre ellos: la válvula de fuelle aguas arriba 142; el fuelle 143; una interfaz neumática 144; el fuelle aguas abajo de la válvula 145; la válvula de entrada de tampón de lavado 146; la válvula de entrada de aire de tampón de lavado 146a; la válvula de entrada de tampón de elución 147; la válvula de entrada de aire de tampón de elución 147a; la válvula de cámara de residuos 148; la válvula de la cámara de elución 149; la válvula de aislamiento 150; las válvulas de entrada de cámara de amplificación primera y segunda 151a-b; y las válvulas de salida de cámara de amplificación primera y segunda 152a-b. Una abertura adicional, en combinación con una membrana de sobremoldeado flexible (pero no la lámina neumática) forma una válvula de derivación 153.

**[0127]** Con la excepción de la válvula de aislamiento 150 y la válvula de derivación 153, las válvulas formadas en la capa neumática son válvulas neumáticamente accionables. Es decir, cada válvula es operable para abrir y cerrar un canal fluido en el que se encuentra la válvula, y esta válvula se acciona mediante la aplicación de una presión particular, a un conducto de control neumático acoplado a la válvula. Las líneas de control neumáticas están acopladas a la interfaz neumática 144, a la que el lector tiene acceso cuando se inserta en la misma el cartucho 100. Por lo tanto, para accionar una válvula neumática dada, el lector simplemente aplica una presión adecuada a la línea de control neumática asociada con esa válvula para abrir o cerrar la válvula.

**[0128]** La válvula de aislamiento 150 y la válvula de derivación 153 también son accionadas por el lector, pero mecánicamente. Una vez más, cada válvula es operable para abrir y cerrar un canal fluido en el que se encuentra la válvula, pero la válvula se acciona mediante la aplicación de uno o más actuadores mecánicos (tales como un pie) a la válvula.

**[0129]** La capa de neumático comprende además dos agujeros de referencia 154a-b configurados para permitir que un aparato de montaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento de la capa durante la fabricación. Cuando el cartucho está montado, los agujeros de referencia 154a-b en la capa de neumático se alinean con los agujeros de referencia 134a-b en el subconjunto de ampolla.

**[0130]** La capa neumática comprende adicionalmente aberturas 155a-c que, cuando el cartucho está montado, se alinean con las aberturas 132a-c que pasan a través del sustrato 131 del subconjunto de ampolla (a través de la lámina de neumático, como se describe abajo)

### 1.3.6 Lámina neumática 113

**[0131]** La FIG. 7 muestra la lámina de neumático 113 con mayor detalle. Como se explicó anteriormente, la lámina de neumático 113 se adhiere a la superficie superior de la capa de neumático 114, sellando fluidamente de esta manera los canales, cámaras, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes formados. Por lo tanto, en su mayor parte, la lámina de neumático 113 es una hoja de lámina generalmente rectangular y planar con el fin de proporcionar un sello efectivo. De forma beneficiosa, la lámina de neumático 113 es inerte de tal manera que no reacciona con los reactivos que se mueven a través de la capa de neumático 114.

**[0132]** Sin embargo, la lámina neumática 113 no se superpone a toda la capa de neumático 114. En particular, la lámina neumática 113 no recubre la cámara de mezcla de muestra 136 o la cámara de residuos 137 en el extremo no de inserción 106 del cartucho 100, o la válvula de derivación 153 en el extremo de inserción 105. Además, la lámina de neumático 113 comprende escotaduras 156, 157, de manera que no recubre la válvula de aislamiento 150 o la interfaz neumática 144, respectivamente.

**[0133]** La lámina neumática 113 comprende además tres aberturas 158a-c que, cuando el cartucho 100 se monta, se alinean con las aberturas 132a-c que pasan a través del sustrato 131 del subconjunto de ampolla y 155a-c que pasa por la capa de neumático 114. Las aberturas 158a-c permiten que los reactivos líquidos dentro de las ampollas pasen a la capa de neumático 114, y de allí a la capa de fluido 115 a través de aberturas 155a-c.

**[0134]** La lámina de neumático 113 comprende dos agujeros de referencia 159a-b configurados para permitir que un elemento de montaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento de la capa durante la fabricación. Cuando el cartucho está montado, los agujeros de referencia 159a-b en la lámina neumática se alinean con los agujeros de referencia en las otras capas.

**[0135]** La lámina de neumático es una lámina compuesta fabricada de una capa de tereftalato de polietileno, para proporcionar fuerza, con una capa de polipropileno en la parte superior para proporcionar un material inerte para poner en contacto la muestra líquida y tampones, y también para permitir que el papel de aluminio se selle por calor a la capa de neumático (también fabricada a partir de polipropileno).

5

### 1.3.7 Capa de neumático 115

**[0136]** FIGS. 8A y 8B muestran la capa de fluido 115 en más detalle. FIG. 8A es una vista superior de la capa neumática, y FIG. 8B es una vista inferior. La capa de fluido 115 se compone de una capa de plástico rígido 160. Como se ha explicado anteriormente, el lado superior de la capa de fluido 115 (no mostrado) está adherido al lado inferior de la capa de neumático 113 (véase FIG. 5B) de tal manera que se alinean los diversos canales, cámaras, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes formados por una combinación de las capas neumáticas y fluidicas.

10

**[0137]** Al igual que con la capa de plástico rígido 135 de la capa neumática 113, la capa de plástico rígido 160 de la capa de fluido 115 tiene una pluralidad de cavidades de diferentes formas y las aberturas a su través. En combinación con la capa de neumático 113 y la lámina de fluido 116, ciertos huecos en el interior, y/o aberturas a través de la capa de plástico rígido 160 forma ciertos componentes, incluyendo: la cámara de entrada de muestra 136; la columna de captura 138; la cámara de elución 139; las cámaras de amplificación primera y segunda 140a-b; y la cámara de detección primera a cuarta 141a-d, la válvula de fuelle aguas arriba 142; el fuelle 143; la interfaz neumática 144; la válvula de fuelle aguas abajo 145; la válvula de entrada de tampón de lavado 146; la válvula de entrada de aire de tampón de lavado 146a; la válvula de entrada de tampón de elución 147; la válvula de entrada de aire de tampón de elución 147a; la válvula de cámara de residuos 148; la válvula de la cámara de elución 149; la válvula de aislamiento 150; las válvulas de entrada de cámara de amplificación primera y segunda 151a-b; y válvulas de salida de cámara de amplificación primera y segunda 152a-b. Una abertura 161 también se proporciona para dar acceso a la capa de electrodo 117.

15

20

25

**[0138]** Por otra parte, en combinación con la lámina de fluido 116 (pero no la capa de neumático 114), rebajes en la capa de fluido 115 también proporciona el filtro grueso 162, el canal de mezcla 163, y una pluralidad de canales que, cuando se monta el cartucho, conectan los componentes mencionados anteriormente para permitir el paso de la muestra líquida y reactivos líquidos a través del cartucho, y facilitar el accionamiento neumático de las válvulas, bombas de mezcla, fuelle y otros componentes.

30

**[0139]** La capa de fluido comprende dos agujeros de referencia 164a-b configurados para permitir que un aparato de montaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento de la capa durante la fabricación. Cuando el cartucho está ensamblado, los agujeros de referencia 164a-b en la capa de fluido se alinean con los agujeros de referencia en las otras capas.

35

**[0140]** Como se mencionó anteriormente, los canales están formados entre la interfaz neumática y las diversas válvulas y el fuelle descrito anteriormente. En el cartucho de ejemplo, la interfaz neumática comprende 11 puertos que están conectados a los diversos componentes de la siguiente manera.

40

Puerto 1:	fuelle
Puerto 2:	válvula de fuelle aguas arriba válvulas de entrada de cámara de amplificación primera y segunda
	válvulas de salida de la cámara de amplificación primera y segunda
45 Puerto 3:	válvula de fuelle aguas abajo
Puerto 4:	válvula de entrada de tampón de lavado
Puerto 5:	entrada de aire de tampón de lavado
Puerto 6:	válvula de entrada de aire de tampón de lavado válvula de entrada de aire de tampón de elución
Puerto 7:	Entrada de aire de tampón de elución
50 Puerto 8:	Válvula de entrada de tampón de elución
Puerto 9:	Línea de presión de referencia
Puerto 10:	Válvula de cámara de elución
Puerto 11:	Válvula de cámara de residuos

50

**[0141]** Se entenderá que, si bien los diversos aspectos inventivos del cartucho ejemplar pueden implementarse utilizando los específicos de las conexiones mencionadas anteriormente (en particular, las válvulas de entrada y salida de cámara de amplificación primera y segunda conectándose a un solo puerto; y las entradas de aire de tampón de lavado y elución conectándose a un solo puerto); la configuración precisa enumerada anteriormente no es esencial.

60

### 1.3.8 Lámina neumática

**[0142]** FIG. 9 muestra la lámina de fluido 116 en más detalle. Como se explicó anteriormente, la lámina de fluido 116 se adhiere a la superficie inferior de la capa de fluido 115, con lo que se sella fluidamente los canales, cámaras, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes formados. Por lo tanto, en su mayor parte, la lámina de fluido 116 es una hoja de lámina generalmente rectangular y plana para proporcionar un sellado efectivo. De forma beneficiosa, la

65

lámina 116 es inerte de tal manera que no reacciona con los reactivos que se mueven en la capa de neumático.

**[0143]** Sin embargo, la lámina de fluido 116 no se superpone a toda la capa de fluido 115. En particular, la lámina de fluido 116 no recubre las cámaras de detección 141 a-d en el extremo de inserción 105.

**[0144]** La lámina de fluido 116 comprende dos agujeros de referencia 165a-b configurados para permitir que un aparato de montaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento de la capa durante la fabricación. Cuando el cartucho está ensamblado, los agujeros de referencia 165a-b en la lámina de fluido se alinean con los agujeros de referencia en las otras capas.

**[0145]** La lámina fluidica es una lámina de material compuesto fabricado a partir de una capa de tereftalato de polietileno, para proporcionar resistencia, con una capa de polipropileno en la parte superior para proporcionar un material inerte para poner en contacto la muestra y tampones líquidos, y también para permitir que el papel de aluminio se selle por calor a la capa de fluido (también fabricado a partir de polipropileno).

### 1.3.9 Capa de electrodo 117

**[0146]** Finalmente, FIG. 10 muestra la capa de electrodo 117 en más detalle. Como se explicó anteriormente, la capa de electrodo 117 está adherido a la capa de fluido 115. La capa de electrodo 117 comprende cuatro conjuntos de electrodos de detección 166a-d. Cada conjunto de electrodos de detección 166a-d comprende contactos eléctricos primero a tercero 168a-d que se acoplan con los correspondientes contactos eléctricos en el lector cuando se inserta el cartucho. Preferiblemente, los contactos eléctricos están hechos de plata para optimizar la conexión eléctrica. Preferiblemente, los electrodos que son de plata plateada con cloruro de plata se utilizan para garantizar un comportamiento galvánico óptimo.

**[0147]** Cada conjunto de electrodos de detección 166a-d comprende un electrodo de trabajo 169a-d; un contraelectrodo 170a-d y un electrodo de referencia 171. Cada uno de los electrodos está acoplado a un respectivo contacto eléctrico. Cada conjunto de electrodos de detección 166a-d también comprende un dieléctrico 172a-d que cubre la interfaz entre los electrodos y los respectivos contactos eléctricos.

**[0148]** Un experto en la materia entiende que la señalización electroquímica se puede usar para indicar la presencia de dianas genéticas o inmuno. En el cartucho ejemplar este proceso se realiza en las cámaras de detección primera a cuarta 141a-d que están optimizadas para proporcionar la interfaz de prueba electroquímica.

**[0149]** Los electrodos 166a-d están dispuestos de tal manera que una muestra de líquido dentro de las cámaras de detección primera a cuarta 141a-d se pone en contacto con los conjuntos de electrodos primer a cuarto 166a-d. En las cámaras de detección, algunos compuestos en la muestra de fluido (denominada 'electrolito') tienen una tendencia natural a migrar a electrodos e intercambiar electrones. Este efecto galvánico es cómo funcionan las baterías.

**[0150]** Todas las combinaciones de compuestos solubles tienen alguna actividad electroquímica, y la velocidad a la que se produce esta actividad (es decir, la cantidad de carga intercambiada) se determina exactamente por referencia a esos compuestos. Por lo tanto, es posible medir la presencia de diferentes analitos en la muestra líquida, mediante la búsqueda de elementos característicos de su electroquímica redox.

**[0151]** En el cartucho ejemplar, la corriente requerida para mantener un estado redox dado en las cámaras de detección 141a-d se controla en diferentes estados redox. Se suministra corriente a través del electrolito de los electrodos de trabajo 169a-d para contrarrestar electrodos 170a-d.

**[0152]** Los electrodos de referencia 171 a-d también contactan con el electrolito. Los voltajes se declaran con respecto a este electrodo de referencia, ya que su tensión es en gran medida independiente de las condiciones redox y por lo tanto esto significa que sólo es el estado redox de la química en el electrodo de control que se está midiendo.

**[0153]** Un barrido de voltaje se aplica entre los electrodos de trabajo 169a-d y contraelectrodos 170a-d por el lector, lo que genera el rango característico de las condiciones redox. La corriente que pasa entre los electrodos de trabajo 169a-d y contra-electrodos 170a-d se mide a continuación, para obtener los resultados de la prueba. El barrido de voltaje es un conjunto que se incrementa lentamente de voltajes aplicados entre los electrodos. Preferiblemente, el barrido es de aproximadamente -0,7 voltios a alrededor de 1 voltios con respecto al electrodo de referencia. El voltaje se aplica en pulsos de incremento consecutivo que tienen una amplitud de modulación de impulsos de entre 30 y 80 milivoltios (preferiblemente entre 40 y 60 milivoltios, más preferiblemente 50 milivoltios). Preferiblemente, el incremento de paso de un pulso al siguiente es entre 1 y 5 milivoltios (preferiblemente entre 2 y 4 milivoltios, más preferiblemente 3 milivoltios). Mediante la aplicación de estos voltajes a través de los electrodos, se puede obtener mediciones de corriente en la escala de 100s de nanoamperios.

**[0154]** La disposición particular de electrodos de detección ilustrada en la FIG. 10 puede en sí formar un aspecto de

la invención aislado del cartucho. Convencionalmente, el contraelectrodo en un potencióstato es más grande que el electrodo de trabajo para proporcionar un amplio suministro de electrones excedentes. Sin embargo, se ha encontrado que la inversión de esta convención sorprendentemente ofrece mejores resultados para el cartucho ejemplar. Para la electroquímica realizada sobre la muestra líquida descrita anteriormente en el cartucho ejemplar, se ha encontrado que tener un electrodo de trabajo que es mayor que el contraelectrodo proporciona señales de mayor tamaño y mejora de los resultados por medio de un aumento de la sensibilidad. En otras palabras, el tener un flujo de corriente desde un electrodo de trabajo relativamente grande a un contraelectrodo relativamente pequeño ofrece mejoras con respecto a la disposición convencional.

5  
10 **[0155]** Preferiblemente, cada electrodo de trabajo 169a-d se forma en una forma de U y cada contraelectrodo 170a-d se forma en una forma alargada recta entre los dos dientes del respectivo electrodo de trabajo en forma de U.

**[0156]** El método de operación del cartucho ejemplar introducido anteriormente se explicará ahora brevemente.

15 1.4 Método de funcionamiento del cartucho ejemplar

1.4.1 El extremo delantero

20 **[0157]** Como se describió anteriormente, una muestra de fluido (tal como una muestra de orina) se introduce en la cámara de mezcla 10 utilizando una pipeta de muestra. Una parte de la muestra pasa al indicador de muestra 12 para mostrar que una muestra está presente en la cámara de mezcla de la muestra.

25 **[0158]** Una vez que el cartucho 100 con una muestra en la cámara de mezcla 10 se inserta en un lector, y se activa el lector, la prueba puede comenzar. En primer lugar, el lector aplicará un accionador mecánico (tal como un pie) para colapsar el tampón de lisis de la ampolla 14. De este modo, el tampón de lisis será expulsado en la cámara de mezcla de la muestra 10 donde se mezclará con la muestra.

30 **[0159]** El fuelle 20 y sus válvulas 22a-b se mueven entonces el tampón de muestra y la lisis de líquido hacia atrás y adelante en la muestra de la cámara 10 de mezcla a fin de mezclar la lisis y la muestra y para rehidratar el control interno. Después del paso de mezcla, la incubación de la muestra y el tampón de lisis se produce para permitir que tenga lugar la lisis celular.

35 **[0160]** El fuelle 20 y sus válvulas 22a-b comenzarán entonces la operación de bombear la muestra de la cámara de mezcla de muestra 10, en el canal principal 16, a través del filtro grueso 18 y hacia la captura de la columna 24. Dentro de la columna de captura 24, ácidos nucleicos se vinculan específicamente a un filtro en la columna de captura sobre la base de su tamaño y carga. La muestra de líquido no deseada pasa a través de la cámara de residuos 38.

40 **[0161]** Una vez que la muestra de líquido no deseada ha pasado a la cámara de residuos 38, dejando los ácidos nucleicos unidos a la columna de captura 24, el lector aplica un accionador mecánico (tal como un pie) para contraer la ampolla de tampón de lavado 30. Al hacerlo, el tampón de lavado será expulsado en el primer canal de rama 26, y de allí en el canal principal 16. Una vez más, el fuelle 20 y sus válvulas 22a-b, comienzan a funcionar para bombear el tampón de lavado a través del canal principal 16 y a través de la columna de captura 24 para lavar cualquier residuo celular no deseado restante y otros componentes celulares fuera de la columna de captura con el tampón de lavado a través de la cámara de residuos 38, o bien el tampón de lavado se vaciará en las cámaras de desecho usando aire del lavado y/o entradas de aire de tampón de elución.

45 **[0162]** Una vez que la muestra de lavado ha pasado a la cámara de residuos 38, dejando sólo los ácidos nucleicos unidos y purificados en la columna de captura 24, el lector aplica un accionador mecánico (tal como un pie) para contraer la ampolla de tampón de elución 32. De este modo, el tampón de elución será expulsado hacia el segundo canal de rama 28, y de allí en el canal principal 16. Una vez más, el fuelle 20 y sus válvulas 22a-b, comienzan a funcionar para bombear el tampón de elución a través del canal principal 16 y a través de la columna de captura 24 para eluir los ácidos nucleicos de la columna de captura, o de lo contrario el tampón de elución se vaciará en la columna de captura usando el aire del lavado y/o entradas de aire de tampón de elución. La muestra líquida preparada pasa entonces a través de la cámara de elución 46; de nuevo, ya sea por bombeo o enjuague como se ha descrito anteriormente.

50 **[0163]** La muestra se instala en la cámara de elución 46 permitiendo que las burbujas se dispersen antes de entrar en las cámaras de amplificación.

60 1.4.2 El extremo posterior

65 **[0164]** El fuelle 20 y sus válvulas 22a-b comenzarán entonces la operación de bombear la muestra de líquido de la cámara de elución 46, a través de la válvula de aislamiento 59, a través del canal de mezcla 52 y en las cámaras de amplificación 56a-b, o bien la muestra se lava en las cámaras de amplificación usando el aire del lavado y/o entradas de aire de tampón de elución. En las cámaras de amplificación de ácido nucleico 56a-d el ácido nucleico de

interés, si está presente, se amplifica tal que está presente a un nivel detectable. El ácido nucleico de control también se amplifica tal que está presente a un nivel detectable. Como se mencionó anteriormente, cualquier método de amplificación de ácido nucleico puede ser utilizado. Cuando se usa PCR, los cebadores se hibridan específicamente con el ácido nucleico de interés y se extienden por una polimerasa termoestable tales como polimerasa de Taq mediante la adición de dNTPs al extremo 3' de cada uno de los cebadores. Cualquier muestra de líquido en exceso puede ser eliminada de la vía de fluido a través de los canales de derivación 68.

**[0165]** El fuelle 20 y sus válvulas 22a-b comenzarán entonces la operación de bombear la muestra de líquido desde las cámaras de amplificación 56a-b y en las cámaras de detección 62a-d, o de lo contrario la muestra se vaciará en las cámaras de detección utilizando ain de las entradas de aire de tampón de lavado y/o elución. En las cámaras de detección, la sonda diana se hibrida específicamente con el ácido nucleico amplificado diana de interés y la sonda de control se hibrida específicamente con el ácido nucleico de control amplificado. La nucleasa hidroliza las sondas de diana y de control después de la hibridación de las sondas con el ácido nucleico amplificado. La hidrólisis de las sondas de diana y de control libera las etiquetas de las sondas dando lugar a que se produzca un cambio detectable en la señal de las etiquetas.

**[0166]** Una vez que la muestra líquida ocupa las cámaras de detección, el lector aplica un accionador mecánico a la válvula de aislamiento 50 para cerrar la válvula y aislar la muestra de líquido en el extremo posterior del dispositivo.

**[0167]** Los electrodos proporcionan una diferencia de potencial a través de la al menos una cámara de detección. Dependiendo del estado de la etiqueta (es decir, si se une a la sonda de longitud completa o la sonda ha sido hidrolizada y está libre o unido a un solo nucleótido o una parte corta de la sonda), la corriente que es capaz de fluir a través de la cámara de detección será diferente. Por consiguiente, los electrodos permiten la detección por el lector de la modificación de la señal de la etiqueta que resulta de la hidrólisis de la sonda hibridada.

**[0168]** La presente invención se describirá ahora con referencia a las FIGS. 18 a 25.

## 2. Canales y método para borrar piernas muertas

**[0169]** La siguiente sección describe la presente invención con más detalle con referencia a las FIGS. 18 a 25. La invención puede ser implementada en el cartucho de fluido descrito anteriormente, específicamente en la parte del canal principal entre el fuelle 20 y la columna de captura 24, en la que una pluralidad de fluidos se introduce desde los canales de ramificación en el canal principal. La invención se puede practicar con un canal principal y un solo canal de rama, pero cualquier número de canales de derivación se puede proporcionar, dependiendo de la implementación preferida.

**[0170]** La FIG. 18a ilustra una primera realización de la invención, que comprende canal principal B100 y un primer canal de rama B101. El canal principal B100 comprende un extremo B100A aguas arriba y un extremo B100B aguas abajo, en el que el extremo B100A aguas arriba es capaz de recibir una muestra y haciendo pasar la muestra líquida desde el extremo B100A aguas arriba al extremo B100B aguas abajo. El canal de derivación B101 se une a la canal principal B100 de la región de canal principal B100 entre estos dos extremos.

**[0171]** El primer canal de rama B1 D1 comprende además una entrada de gas B101A para introducir un gas en el primer canal de rama, una entrada de líquido B101d para introducir un líquido en el primer canal de rama, y una válvula B101c. La válvula B101c está configurada para moverse entre una posición cerrada en la que impide que el líquido y gas en el primer canal de rama de paso en el canal principal y una posición abierta en la que permite líquido y gas en el primer canal de rama pasen al canal principal.

**[0172]** FIG. 18b ilustra una disposición alternativa de la primera realización de la invención, en la que el primer canal de rama comprende además una válvula de entrada de gas B101b para evitar que el líquido y el gas fluyan desde el primer canal de rama a través de la entrada de gas B101A. La válvula de entrada de gas B101 está configurada para moverse entre una posición cerrada en la que impide que el líquido en el primer canal de rama pase a la entrada de gas y una posición abierta en la que permite que el gas desde la entrada de gas pase en el primer canal de rama. La válvula de entrada de gas reduce el riesgo de contaminación de la entrada de gas por el líquido desde la entrada de líquido. Opcionalmente, la entrada de gas y la válvula de entrada de gas se pueden acoplar juntos, o en una realización alternativa la entrada de gas y la válvula de entrada de gas pueden ser independientes.

**[0173]** FIG. 19a ilustra una segunda realización de la invención, en la que el cartucho de fluido incluye un canal principal B100, un primer canal de derivación B101 y un segundo canal de rama B102. El canal principal B100 comprende un extremo B100A aguas arriba y un extremo B100B aguas abajo, en el que el extremo B100A aguas arriba es capaz de recibir una muestra y hacer pasar la muestra líquida desde el extremo B100A aguas arriba al extremo B100B aguas abajo. El primer canal de derivación B101 se une al canal principal B100 en la región del canal principal B100 entre estos dos extremos, y el segundo canal de derivación B102 se une al canal principal B100 aguas abajo del primer canal de rama B101.

**[0174]** El segundo canal de rama B102 comprende adicionalmente una entrada de gas B102A para introducir un gas

en el segundo canal de rama, una entrada de líquido B102d para introducir un líquido en el segundo canal de rama, y una válvula B102c. La válvula B102c está configurada para moverse entre una posición cerrada en la que impide que el líquido y el gas en el segundo canal de rama de paso en el canal principal y una posición abierta en la que permite líquido y gas en el segundo canal de rama para pasar al canal principal.

5 **[0175]** FIG. 19b ilustra una disposición alternativa de la segunda forma de realización, en la que los canales de derivación primero y segundo B101, B102 comprenden además una válvula de entrada de gas B101b, B102b para evitar que el líquido y el gas fluyan desde el canal de derivación a través de la entrada de gas B101A, B102A. La válvula de entrada de gas B101b, B102b se configura para moverse entre una posición cerrada en la que impide que el líquido en el canal de rama pase a la entrada de gas y una posición abierta en la que permite que gas desde la entrada de gas pase al canal de rama. La válvula de entrada de gas reduce el riesgo de contaminación de la entrada de gas por el líquido desde la entrada de líquido. Opcionalmente, la entrada de gas y la válvula de entrada de gas se pueden acoplar juntos, o, en una realización alternativa, la entrada de gas o la válvula de entrada de gas pueden ser independientes (FIG. 19c). En una realización adicional, las válvulas de entrada de gas primera y segunda B101b, B102b en el primer y segundo canal de derivación, respectivamente, pueden ser accionadas de forma simultánea como se describe en más detalle a continuación.

20 **[0176]** El experto en la materia entendería que, aunque las presentes realizaciones ilustran un primer y un segundo canal de rama que se unen a un canal principal, cualquier número de canales de derivación adicionales podrían conectarse de manera fluida al canal principal en cualquier secuencia o orientación.

25 **[0177]** Los canales de derivación B101 y B102 en las FIGS. 18 y 19 se ilustran por unir el canal principal en una unión de 90 grados, o cruce. Sin embargo, la persona experta en la técnica apreciará que uno o más canales de derivación pueden unirse al canal principal B100 en cualquier otro ángulo, tal como a 90 grados o un ángulo agudo, todos los cuales están cubiertos por el alcance de esta invención.

30 **[0178]** Las válvulas B101c, B102c en uno o más canales de derivación B101, B102 pueden estar espaciadas desde el canal principal B100, formando de esta manera una pierna muerta B108 en el canal de rama B101, B102 entre la válvula y el canal principal B100 (Figura 18 y 19). Cuando la muestra de líquido pasa a lo largo del canal principal B100 del extremo B100A aguas arriba al extremo B100B aguas abajo, un volumen de la muestra de líquido se acumulará en la pierna muerta B108. Pasos de fluido posterior pueden estar contaminados por la presencia del líquido acumulado.

35 **[0179]** Alternativamente, las válvulas B101c, B102c en uno o más canales de derivación B101, B102 pueden estar situadas en una unión entre el canal de rama B101, B102 y el canal principal B100. Las válvulas B101c, B102c pueden ser una válvula en T, por ejemplo. Incluso cuando tales válvulas B101c, B102c se proporcionan en la unión, sin embargo, es imposible cerrar la válvula exactamente a nivel con el canal principal B100 a fin de dejar el canal principal completamente ininterrumpido. Por lo tanto, incluso cuando la válvula B101c, B102c se proporciona en la unión, siempre habrá una sección exterior de la trayectoria de flujo del canal principal B100 que proporcionará una pierna muerta B108. Cuando la muestra de líquido pasa a lo largo del canal principal B100 del extremo B100A aguas arriba al extremo B100B aguas abajo, un volumen de muestra líquida se acumulará en la pierna muerta B108.

45 **[0180]** Con el fin de eliminar la muestra de líquido residual de las piernas muertas, es ventajoso tener una entrada de gas en el canal de rama. El paso de gas desde la entrada de gas B101A, B102A en uno o más canales de ramificación se utiliza para borrar los canales de derivación de muestra de líquido residual, y también se puede utilizar para secar los canales de derivación después de que la muestra de líquido ha pasado a través del canal principal.

50 **[0181]** La entrada de líquido B101d, B102d en uno o más canales de derivación B101, B102 puede acoplarse a una cámara de líquido. La cámara de líquido puede contener reactivos líquidos o un tampón, donde el tampón puede incluir un tampón de lisis, un tampón de lavado o un tampón de elución. En una realización, la cámara de líquido acoplada a la entrada de líquido B101 en el primer canal de ramificación B101 puede contener un tampón de lavado, y la cámara de líquido acoplada a la entrada de líquido B102d en el segundo canal de rama B102 puede contener un tampón de elución. La introducción de diferentes líquidos a través de entradas de líquido independientes B101d en canales de derivación separados evita que se pasen diferentes líquidos o reactivos a través de una sola entrada, lo que podría conducir a contaminación cruzada de los reactivos anteriores a las reacciones aguas abajo. Sin embargo, la presencia de múltiples canales de derivación con entradas de líquido individuales B101d, B102d puede también conducir a la acumulación de más líquidos o reactivos en las piernas muertas B108 de los canales de derivación. Las entradas de gas B101A, B102A también se pueden utilizar para limpiar cualquier líquido introducido de las entradas de líquido B101d, B102d, tales como reactivos, de uno o más canales de derivación B101, B102. Es particularmente beneficioso si la entrada de gas se encuentra más lejos de la unión del canal de derivación con el canal principal de la entrada de líquido. Este diseño permite la evacuación completa de cualquier muestra de líquido residual o líquido de piernas muertas B108 en el canal de rama.

65 **[0182]** La cámara de líquido B500 puede ser una ampolla plegable (tales como las descritas anteriormente) adaptada, cuando se contrae, para expulsar un líquido contenido en el mismo a través de la entrada de líquido

B101d, B102d, en el canal de rama B101, B102, y en el canal principal B100, para que den origen al líquido en el canal principal B100 después de que la muestra de líquido ha pasado aguas abajo de uno o más canales de derivación B101, B102. FIGS. 20a y 20b ilustran una ampolla plegable B500 que puede estar formada de un material polímero y sellado con una lámina plana secundaria B501. La superficie inferior de la lámina B501 se sujeta a una superficie superior del cartucho fluídico B1 utilizando cinta adhesiva. El sello en la ampolla, entre la lámina y el cartucho, está diseñado de tal manera que es permanente alrededor del perímetro de la ampolla B500, excepto en una pequeña región B503 adyacente a la entrada de líquido. En esta región B503 el sello es frangible. En aplicación de una fuerza, por ejemplo usando un accionador mecánico, las láminas están deslaminadas en la región de la junta frangible, donde el sello es más débil. El líquido en la cámara de B500 se libera entonces y se dirige a la entrada de líquido B101d a través de un canal de fluido en el cartucho.

**[0183]** La capacidad de fluido de la cámara de líquido puede ser de entre 100 y 800  $\mu\text{L}$ , preferiblemente entre 200 y 750  $\mu\text{L}$ . La capacidad de cámara de tampón de lavado debe ser más preferentemente entre 400 y 700  $\mu\text{L}$ , y más preferiblemente entre 450 y 650  $\mu\text{L}$ . La capacidad de cámara de tampón de elución debería ser más preferiblemente entre 150 y 5000  $\mu\text{L}$ , y más preferiblemente entre 200 y 400  $\mu\text{L}$ .

**[0184]** Se han desarrollado muchos tipos diferentes de válvulas para uso en fluidos de control en dispositivos microfluídicos y se contemplan para su uso en la presente invención. En el cartucho de ejemplo, la o cada válvula de entrada de gas o válvula B101b, B102b en el uno o más canales de derivación es una válvula accionada neumáticamente.

**[0185]** La FIG. 21 ilustra una válvula accionada neumáticamente adecuada para uso en la presente invención. La válvula comprende una cámara de válvula B601d B600 que tiene una primera abertura B601a y una segunda abertura B601b conectada al canal de rama B601. La válvula B601d comprende además una membrana flexible móvil B602 entre una posición cerrada (FIG. 21a), en la que la membrana flexible B602 se sella contra las aberturas primera y segunda B601a, B601b para evitar el flujo de fluido a través del canal de rama B601, y una posición abierta (FIG. 21b), en la que la membrana flexible B602 está separada de las aberturas primera y segunda B601a, B601b para permitir que el fluido fluya a través del canal de derivación. La válvula B601c comprende además un paso de fluido B603 que tiene una abertura en la cámara de la válvula B603a B600. La apertura B603a está separada de las aberturas primera y segunda B601a, B601b por la membrana flexible B602. El paso de fluido B603 sirve como un canal de actuación para mover la membrana flexible entre sus posiciones abiertas y cerradas, y por lo tanto acciona la válvula.

**[0186]** El cartucho de fluido ejemplar descrito anteriormente comprende una interfaz neumática para la conexión a una fuente de presión positiva y/o la presión manométrica. La interfaz neumática comprende una pluralidad de puertos. El paso de fluido B603 está acoplado a un puerto en la interfaz neumática para aplicar una presión positiva y/o presión manométrica en la cámara de la válvula B600 a fin de mover la membrana flexible B602 entre las posiciones abierta y cerrada (véase las FIGS. 21a y 21b). Cuando se aplica una presión de gas positiva a través del paso de fluido B603, la presión dentro de los pliegues de la cámara de válvula B600 se incrementa más allá del canal de derivación B601 y la membrana flexible B602 será forzada a la posición cerrada. A la inversa, cuando se aplica un vacío o medidor de presión a través del paso de fluido B603, la presión dentro de la cámara de la válvula B600 se reduce por debajo de la del canal de derivación B601 y membrana flexible B602 se pone en la posición abierta.

**[0187]** Las válvulas de entrada de gas primera y segunda B101b y B102b en los canales de derivación primero y segundo, respectivamente, se pueden acoplar a diferentes puertos en la interfaz neumática. Sin embargo, la FIG. 22 ilustra una realización preferida en la que las válvulas de entrada de gas primera y segunda B101b y B102b en los canales de rama primero y segundo, respectivamente, se acoplan entre sí, al mismo puerto B901 en la interfaz neumática B900, permitiendo que las válvulas de entrada de gas B101b y B102b en los canales de derivación primero y segundo para accionarse simultáneamente.

**[0188]** Las entradas de gas B101A, B102A en uno o más canales de derivación B101, B102 pueden estar acopladas a un suministro de gas. Opcionalmente, las entradas de gas B101A, B102A se acoplaron a la interfaz neumática para la conexión a un suministro de gas. El suministro de gas es adecuado para hacer pasar el gas a través de la entrada de gas, en el canal principal y se puede utilizar para introducir el gas en el canal principal antes o después de que la muestra de líquido haya pasado aguas abajo de uno o más canales de rama B101, B102, preferiblemente después. Opcionalmente, las entradas de gas primera y segunda B101A, B102A en los canales de rama primero y segundo B101, B102, respectivamente, están acopladas a los puertos independientes en la interfaz neumática para la conexión al suministro de gas independientes. En el cartucho de ejemplo, el suministro de gas es proporcionado por el lector cuando se inserta el cartucho en el lector.

**[0189]** Las entradas de gas primera y segunda B101A, B102A están acopladas a sus respectivos suministros de gas a través de canales de suministro de gas independientes con el fin de reducir el riesgo de contaminación cruzada del suministro de gas. En uso, el gas se suministra a través de las entradas de gas B101A, B102A y las válvulas de entrada de gas se abren simultáneamente a través de una presión positiva aplicada por la interfaz neumática B900 para empujar cualquier líquido a través de los canales de derivación. Siempre que una o más de las válvulas B101c



y B102c estén abiertas, el gas evacuará cualquier líquido de las piernas muertas, en uno o más canales de derivación.

5 **[0190]** En una realización, con respecto a la presencia de dos canales de derivación, la interfaz neumática B900 puede comprender los puertos primero a tercero B901, B902, B903. La FIG. 23 ilustra los puertos primero a tercero que están acoplados, respectivamente, a:

- 10 i. La cámara de válvula de la válvula B101c en el primer canal de derivación (acoplado al puerto B902);  
 ii. La cámara de válvula de la válvula B102c en el segundo canal de rama (acoplado al puerto B903);  
 iii. La cámara de válvula de la válvula de entrada de gas en el primer canal de rama B101b y la cámara de válvula de la válvula de entrada de gas en el segundo canal de rama B102b (acoplado al puerto B901).

15 **[0191]** Los puertos están acoplados a las cámaras de válvula para accionar las válvulas. Las válvulas B101c, B102c en los canales de derivación primer y segundo pueden ser operadas independientemente entre sí y las válvulas de entrada de gas B101 b, B102b o en combinación unos con otros con el fin de abrir y cerrar todas las válvulas y válvulas de entrada de gas simultáneamente. El funcionamiento de las válvulas y válvulas de entrada de gas es controlado por la interfaz neumática B900.

20 **[0192]** Se debe entender que la terminología de puertos "primero", "segundo" y "tercero" no necesariamente reflejan el orden en que los puertos están ubicados en el cartucho fluídico o que las cámaras de válvula están conectadas a la interfaz neumática.

25 **[0193]** Los canales principales y secundarios típicamente pueden tener un diámetro entre 0,5 y 1,4 mm, preferiblemente entre 0,6 y 1,0 mm y más preferiblemente entre 0,7 mm y 0,9 mm. Estos diámetros se optimizan para permitir una alta velocidad de flujo de gas (a fin de limpiar y secar los canales) y las superficies de los canales son lisas para asegurar un flujo de fluido lineal.

30 **[0194]** El canal principal y uno o más canales de derivación pueden estar formados en la capa de fluido del cartucho, como se describe anteriormente. El paso de fluido B603 puede estar formado en la capa de neumático del cartucho. Las capas fluídicas y neumáticas pueden ser fabricadas a partir de polipropileno.

35 **[0195]** El funcionamiento del cartucho fluídico que se muestra en la FIG. 18 se describirá ahora con referencia al método de procesamiento de una muestra de líquido B700 de la FIG. 24. En funcionamiento, la muestra de líquido se puede hacer pasar a través del canal principal B100. El líquido que entra en el canal principal fluye desde el extremo B100A aguas arriba al extremo B100B aguas abajo. La válvula B101c evita el flujo de la muestra líquida del canal principal B100 y en el canal de rama B101. Sin embargo, es probable que la muestra de líquido se acumule en las piernas muertas B108 del primer canal de rama B101. Un gas se puede pasar a través del primer canal de rama B101 y en el canal principal B100 para eliminar la muestra de líquido acumulado. Como tal, la fuente de gas está activada (paso B702) y la válvula de entrada de gas se abre B101b. El gas se hace pasar a continuación a partir de la entrada de gas B101A a través del primer canal de derivación B101 y en el canal principal B100 de evacuación de cualquier muestra de líquido residual en las piernas muertas B108. Una vez que se elimina el tramo muerto la válvula de entrada de gas B101b puede ser cerrada y la fuente de gas apagada. El cierre de la válvula de entrada de gas impide que el líquido pase desde la entrada de líquido y en la entrada de gas cuando un líquido es expulsado de la cámara de líquido.

45 **[0196]** Un líquido puede entonces ser transmitido de la entrada de líquido B101d a través del primer canal de derivación B101 y en el canal principal B100. El líquido puede ser expulsado de una cámara de líquido acoplado a la entrada de líquido. El líquido puede ser un reactivo para reaccionar con la muestra de líquido aguas abajo del canal principal. Puede ser necesario controlar con precisión el volumen de líquido que reacciona con la muestra de líquido, y como tal, es importante que todo el volumen de líquido pasa al canal principal B100. El gas puede ser utilizado para purgar el reactivo líquido del canal de derivación B101 y piernas muertas B108 en el canal principal B100, asegurando así que el volumen total de reactivo líquido se hace pasar al extremo B100B aguas abajo del canal principal. Por lo tanto, los pasos B706 y B707 definitivos requieren que la fuente de gas esté activada, y la válvula de entrada de gas se abre B101b de modo que un gas puede pasar de la entrada de gas B101A a través del primer canal de derivación B101 y en el canal principal B100 para para evacuar cualquier líquido residual del primer canal de rama B101.

60 **[0197]** El cartucho de fluido puede comprender además una válvula de entrada de gas B101b en el primer canal de rama (FIG. 18b) de tal manera que cuando la válvula de entrada de gas está cerrada, se evita que el líquido y el gas fluyan desde el primer canal de rama a través de la entrada de gas B101A. Para permitir el paso del gas desde el suministro de gas, a través de la entrada de gas B101A y en el canal de rama, la válvula de entrada de gas B101b debe ser abierta después de que el suministro de gas esté encendido. Una vez que se borre el tramo muerto, la válvula de entrada de gas B101b puede ser cerrada y el suministro de gas apagado. El cierre de la válvula de entrada de gas impide que el líquido pase desde la entrada de líquido y en la entrada de gas cuando un líquido es expulsado de la cámara de líquido.

**[0198]** El gas debe ser suministrado a la entrada de gas B101A antes de abrir la válvula de entrada de gas B101b o válvula B101c en el primer canal de rama a fin de mantener una presión hacia delante de la entrada de aire B101A.

**[0199]** El funcionamiento del cartucho fluídico se muestra en 19b se describirá ahora con referencia al método de procesamiento de una muestra de líquido B800 de la FIG. 20. En funcionamiento, la muestra de líquido se puede hacer pasar a través del canal principal B100. El líquido que entra en el canal principal fluye desde el extremo B100A aguas arriba al extremo B100B aguas abajo. Las válvulas B101c, B102c impiden que la muestra líquida fluya desde el canal principal B100 y en canales de rama primero o segundo B101, B102. Sin embargo, es probable que la muestra de líquidos se acumule en las piernas muertas B108 de los canales de rama primero y segundo B101, B102. Para evacuar cualquier muestra líquida acumulada y también para purgar la muestra de líquido desde el canal principal, un gas se puede pasar a través de los canales de rama primero y segundo B101, B102 y B100 en el canal principal. Como tal, se suministra gas a las entradas primera y segunda de gas B101A, B102A (paso B802), se abren las válvulas de entrada de gas B101b, B102b y las válvulas B101c, también se abren B102c. Si las válvulas de entrada de gas se conectan al mismo puerto en la interfaz neumática B900, se abrirán simultáneamente. El gas se hace pasar a continuación a partir de la entrada de gas B101A, B102A a través de los canales de derivación primero y segundo B101, B102 y en el canal principal B100 evacuando cualquier muestra de líquido residual en las piernas muertas B108. Una vez que se eliminan las piernas muertas, las válvulas de entrada de gas B101b, B102b pueden ser cerradas y la fuente de gas apagada. El cierre de la válvula de entrada de gas impide que el líquido pase desde las entradas de líquido y en la entrada de gas cuando un líquido es expulsado de la cámara de líquido. Para asegurar que los residuos de presión en los canales de derivación primer y segundo se liberan a la presión atmosférica después de que el gas ha eliminado los canales de derivación, las válvulas de bombeo de fuelle aguas arriba y aguas abajo 22a-b se pueden abrir temporalmente.

**[0200]** Las válvulas en los canales de derivación primero y segundo pueden entonces abrirse o cerrarse para permitir el paso de líquido desde la entrada de líquido en uno de los canales de derivación. Preferiblemente, el líquido de la entrada de líquido en el primer canal de rama B101d se pasa a través de los canales antes del líquido de la entrada de líquido en el segundo canal de rama B102d. Esto reduce el riesgo de contaminación cruzada del segundo reactivo líquido con el primer reactivo líquido mediante la reducción de la longitud de la trayectoria de fluido del segundo reactivo líquido. Para evitar adicionalmente la contaminación cruzada de los canales de derivación, las válvulas se pueden utilizar para restringir el flujo del líquido. En particular, el cierre de la válvula B102c en el segundo canal de rama antes de pasar un líquido desde la entrada de líquido en el primer canal de rama B101d a través del primer canal de derivación B101 y en el canal principal B100 impide que el líquido fluya desde el primer canal de derivación más allá en el segundo canal de rama que la pierna muerta B108.

**[0201]** En un uso particular, el líquido de la entrada de líquido en el primer canal de derivación puede ser un tampón de lavado. Ya que tampones de lavado a menudo pueden ser tóxicos para las reacciones de aguas abajo es importante asegurar que el tampón de lavado se retire antes de que cualquier líquido adicional pase a través de los canales. El gas puede ser usado para evacuar cualquier pierna muerta B108 y también para asegurar que los canales de derivación primero y segundo y el canal principal están claros antes de que pase cualquier líquido adicional. El siguiente paso B807 del método B800 incluye girar la conexión de fuente de gas a la entrada de gas B101A en el primer canal de rama, y girar la conexión de fuente de gas a la entrada de gas B102A en el segundo canal de rama. A continuación, se abren la válvula B102c en el segundo canal de rama y las válvulas de entrada de gas B101b, B102b en el primer y segundo canal de derivación y se pasa un gas desde la entrada de gas B101A a través del primer canal de derivación B101 y la entrada de gas B102A a través del segundo canal de derivación B102 en el canal principal B100. La apertura de las válvulas B101c, B102c asegura que se elimine cualquier líquido residual de las piernas muertas en los canales de derivación primero y segundo. Una vez que se haya despejado las piernas muertas las válvulas de entrada de gas B101b, B102b pueden cerrarse y las fuentes de gas se apagan. Para asegurar que los residuos de presión en los canales de derivación primero y segundo se lanzan a la presión atmosférica después de que el gas haya despejado los canales de derivación, una válvula de bomba de fuelle aguas arriba y abajo se puede abrir temporalmente.

**[0202]** Un segundo líquido (que puede o no puede ser el mismo que el primer líquido) puede entonces pasar desde la entrada de líquido B102d a través del segundo canal de derivación B102 y en el canal principal B100. La válvula B101c en el primer canal de rama se cierra para impedir cualquier flujo de retorno del líquido en el primer canal de rama, y se abre la válvula B102c en el segundo canal de rama. El líquido se hace pasar desde la entrada de líquido en el segundo canal de rama B102d a través del segundo canal de derivación B102 y en el canal principal B100. En un uso particular, el líquido de la entrada de líquido en el segundo canal de rama puede ser un tampón de elución. Pasos de gas posterior se utilizan para garantizar que el volumen total de tampón de elución ha pasado a través de los canales de derivación y en el canal principal para reaccionar con la muestra líquida. Los pasos B811 y B812 definitivos requieren que se suministra gas a las entradas de gas B101A, B102A en los canales de derivación primero y segundo de modo que un gas puede pasar de las entradas de gas B101A, B102A a través de los canales de ramificación primero y segundo y en el canal principal B100. El volumen total de tampón de elución de este modo debería haber pasado en el extremo corriente abajo del canal principal B100B.

**[0203]** Al pasar el gas a través de los canales de derivación y el canal principal, se suministra gas a las entradas de gas B101A, B102A antes de abrir las válvulas de entrada de gas B101b, B102b o válvula B101c, B102c en los

canales de derivación primero y segundo. Esto mantiene una presión hacia delante de las entradas de aire B101A, B102A. Uno o más pasos de hacer pasar un gas desde la entrada de gas B101A, B102A en el uno o más canales de derivación y en el canal principal B100 comprende, además, purgar la muestra de líquido residual y/o líquido residual desde el canal principal B100. La muestra líquida y/o líquido residual puede pasar a una cámara de receptáculo tal como una cámara de reacción, la columna de captura o cámara de residuos.

**[0204]** Las válvulas de entrada de gas B101b, B102b se proporcionan para que cuando estén cerradas impiden que cualquier líquido pase en las entradas de gas B101A, B102A.

**[0205]** Los cartuchos fluídicos pueden comprender además una interfaz neumática, y es esta interfaz que controla el accionamiento de las válvulas B101c, B102c y válvulas de entrada de gas B101b, B102b. Los suministros de gas también pueden ser conectados a puertos de la interfaz neumática que se pueden acoplar a las entradas de gas B101A, B102A. La interfaz neumática puede ser utilizada para suministrar una fuente de presión de gas positiva que se hace pasar luego a través de las entradas de gas B101A, B102A y en los canales de derivación B101, B102.

**[0206]** Los pasos de evacuación de cualquier líquido residual de los canales de ramificación resulta en la limpieza de las piernas muertas tal que ningún líquido residual (ya sea muestra líquida, o líquido de las entradas de líquido) permanece dentro de los canales de derivación. Esto reduce el riesgo de contaminación posterior de los reactivos o de la muestra. Como se ha descrito, la presencia de cualquier tampón de lavado puede ser 'tóxica' a las reacciones de los elementos subsecuentes posteriores, particularmente en reacciones sensibles tales como PCR. Se impide que los tampones de elución actúen si queda cualquier rastro de tampón de lavado, y por lo tanto es importante asegurar que todo el tampón de lavado se retira antes de pasar el tampón de elución a través de los canales.

**[0207]** Los pasos de hacer pasar un líquido desde la entrada de líquido puede comprender expulsar el líquido de la cámara de líquido en el canal de rama. Cuando la cámara de líquido es una ampolla plegable, el paso de pasar un líquido a partir de la entrada de líquido comprende el colapso de la ampolla plegable y expulsar con ello el contenido líquido a través de la entrada de líquido, en el canal de rama y en el canal principal. Debe reconocerse que otros arreglos, configuraciones y métodos deben ser fácilmente evidentes para una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Otros canales de derivación se pueden unir al canal principal, y como tal, diversos reactivos pueden estar contenidos dentro de las cámaras de líquido conectadas a las entradas de líquido del canal de rama. Es más, cualquier válvula accionada neumáticamente se puede sustituir por cualquier otra válvula de microfluidos adecuada. Debe entenderse que diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento se pueden emplear en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definen el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes se incluyan en la misma.

### 3. Aspectos adicionales aislados

**[0208]** La siguiente es una lista no exhaustiva de aspectos aislados del cartucho ejemplar descrito anteriormente. Estos aspectos se describen con referencia a las FIGS. 11 a 15.

#### 3.1 Válvulas para reducir al mínimo el volumen muerto

**[0209]** A continuación se describirá una disposición ventajosa para una válvula en un cartucho fluídico. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona una válvula para un cartucho de fluido, comprendiendo el válvula:

una cavidad de válvula que tiene aberturas primera y segunda conectadas a vías de paso primera y segunda, respectivamente; y

una membrana flexible móvil entre una posición cerrada, en la que los sellos de membrana flexible contra las aberturas primera y segunda para evitar el flujo de fluido entre las vías de paso primera y segunda, y una posición abierta, en la que la membrana flexible está separada de las aberturas primera y segunda para permitir que el fluido fluya entre las vías de paso primera y segunda;

en las que la cavidad de válvula comprende un techo y un suelo, comprendiendo el suelo dichas aberturas primera y segunda; y que comprende además:

un tope entre la membrana flexible y el techo de la cavidad de la válvula, de manera que el tope limita el movimiento de la membrana en su posición abierta.

**[0210]** Preferiblemente, el tope está dispuesto en la membrana flexible, y comprende uno o más del saliente, una jaula, un labio o una estructura de cruz.

**[0211]** A veces es ventajoso limitar el grado en que la membrana flexible en una válvula descrita aquí es capaz de desplazarse en su posición abierta. Es decir, es deseable poder reducir al mínimo la distancia que la membrana de válvula se mueve a su posición abierta, y así minimizar la distancia que se debe recorrer para cerrar. Al minimizar esta distancia, el volumen muerto dentro de la cavidad de la válvula se reduce, mejorando la reactividad de la válvula.

5 **[0212]** Por lo tanto, como se muestra en más detalle en la FIG. 11, una válvula 300 comprende además un tope 302. El tope del ejemplo ilustrado es una estructura de cruz, pero en diferentes realizaciones puede ser un saliente, jaula, labio o similar, que se adjunta a la superficie superior de la membrana flexible 304 con el fin de ponerse en contacto con el techo 306 de la cavidad de la válvula y por lo tanto limitar el movimiento de la membrana en su posición abierta.

**[0213]** Se debe apreciar que los canales y aberturas de la válvula no se muestran en la FIG. 11.

10 **[0214]** El tope es particularmente ventajoso al colocar las cámaras de amplificación del cartucho ejemplar, ya que reduce el volumen muerto en la cavidad de válvula y por lo tanto limita la distancia entre la superficie inferior de la membrana flexible y las aberturas de la cavidad de la válvula, permitiendo de este modo un volumen más preciso de fluido que se dosifica en las cámaras de amplificación.

15 3,2 Presión de disparo en válvulas

**[0215]** A continuación se describirá una disposición ventajosa para una válvula en un cartucho fluídico. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona una válvula para un cartucho de fluido, comprendiendo el válvula:

20 una cavidad de válvula que tiene aberturas primera y segunda conectadas a las vías de paso primera y segunda, respectivamente;  
 una membrana flexible dentro de la cavidad de válvula móvil entre una posición cerrada, en la que la membrana flexible se sella contra las aberturas primera y segunda para evitar el flujo de fluido entre las vías de paso primera y segunda, y una posición abierta, en la que la membrana flexible está espaciada aparte de las aberturas primera y segunda para permitir que el fluido fluya entre las vías de paso primera y segunda; en donde  
 25 la válvula está configurada de tal manera que una presión requerida en la primera vía de paso para mover la membrana flexible de la posición cerrada a la posición abierta es superior a una presión requerida en la segunda vía de paso para mover la membrana flexible de la posición cerrada a la posición abierta.

30 **[0216]** Se apreciará que dentro de la cavidad de la válvula hay una porción (conocida como la cámara de válvula) entre la membrana flexible y el suelo. También hay una porción dentro de la cavidad de la válvula en el otro lado de la membrana flexible a la cámara de válvula. Esta parte tendrá un volumen. La presión dentro de ese volumen puede ser cambiada mediante la aplicación de una presión positiva o calibre al volumen a través de un canal de actuación, por ejemplo. El canal de actuación puede estar conectada a una fuente de presión positiva o calibre a través de una interfaz neumática, por ejemplo. La presión dentro del volumen se conoce como la presión de actuación. Esta  
 35 operación se describe en más detalle anteriormente.

40 **[0217]** En una disposición, las aberturas primera y segunda pueden disponerse de manera que el fluido en los primeros actos de vía de paso sobre la membrana flexible sólo sobre un área de sección transversal relativamente pequeña mientras que el fluido en el segundo paso de vía actúa en la membrana flexible sobre un área de sección transversal mayor, con preferentemente sustancialmente toda la membrana.

**[0218]** El efecto de esto es que la válvula es capaz de soportar una mayor presión en la primera vía de paso que en la segunda vía de paso.

45 **[0219]** Preferiblemente, la cavidad de la válvula tiene un suelo que comprende las aberturas primera y segunda y una o más paredes entre las cuales se extiende la membrana flexible; y en la que la segunda abertura se acopla a un rebaje en el suelo, entre la abertura y la membrana flexible, teniendo el rebaje un área de sección transversal mayor que la abertura.

50 **[0220]** Preferiblemente, la primera abertura está situada centralmente dentro del suelo y el rebaje se extiende alrededor de la primera abertura, de manera que la segunda abertura se encuentra entre la primera abertura y una pared de la cavidad de válvula. En una disposición particularmente preferida, la cavidad de válvula tiene una sección transversal circular, y el rebaje es un rebaje anular que rodea la primera abertura.

55 **[0221]** Preferiblemente, la abertura de la segunda vía de paso fluido se encuentra adyacente al perímetro de la cámara de válvula. Preferiblemente, la cámara de válvula tiene un diámetro de entre 2 y 10 mm, preferiblemente entre 3 y 7 mm y más preferiblemente de 4 y 6 mm. Más preferiblemente, la segunda abertura es compensada por 2 mm de la primera abertura.

60 **[0222]** Una válvula de ejemplo se muestra en la FIG. 12 en su posición cerrada. La válvula 310 puede ser utilizada en lugar de cualquiera de las válvulas del cartucho fluídico de ejemplo mostrado anteriormente. La válvula comprende una cavidad de válvula 312 que tiene una membrana flexible 314 que recubre un suelo de la cavidad 316 en la que se proporcionan aberturas primera 318 y segunda 320, que conduce a vías de paso primera 322 y segunda 324, respectivamente.

65 **[0223]** La cavidad 312 se forma a partir de un vacío en una primera capa de polímero (preferiblemente la capa de

fluido 114 del cartucho ejemplar) junto con una segunda capa de polímero (preferiblemente la segunda capa de fluido 115 del cartucho ejemplar).

**[0224]** La membrana flexible 314 se muestra en el suelo 316 de la cavidad de tal manera que la válvula se muestra en su posición cerrada. La válvula es móvil desde esta posición a una posición abierta (en la que está espaciada desde el suelo 316 y las aberturas 322,324 para formar una cámara de válvula), como se describe en el presente documento.

**[0225]** La primera abertura 318 de la válvula está situada centralmente dentro del perímetro del vacío formado en la primera capa de polímero, y por lo tanto está situada en la cavidad de válvula 312. La segunda abertura 324 de la válvula está desplazada desde la primera abertura 322. La segunda abertura está acoplada a un rebaje anular 326 en el suelo, y por lo tanto el área en sección transversal sobre la cual el fluido en el segundo conducto 324 actúa sobre la membrana flexible 314 es mucho más grande que el área de sección transversal sobre la cual el fluido en el primer conducto 322 actúa sobre la membrana flexible.

**[0226]** La presión de un fluido en la primera vía de paso actúa sobre la membrana flexible sólo sobre una parte relativamente pequeña de área de sección transversal de la membrana flexible. Por lo tanto, al actuar la presión de un fluido en la cavidad de válvula en el otro lado de la membrana flexible sobre toda la membrana, puede ser inferior, sin permitir que la membrana se mueva a su posición abierta.

**[0227]** En contraste, la presión de un fluido en la segunda vía de paso actúa sobre la membrana flexible sobre un área de sección transversal relativamente grande de la membrana flexible. Al ser las respectivas áreas de sección transversal más cercas, también lo es la presión en la segunda vía de paso que la membrana flexible es capaz de soportar vis-à-vis la presión en la cavidad de la válvula.

**[0228]** Preferiblemente, áreas de sección transversal respectivas a partir de las aberturas de las vías de paso permite que la membrana resista presiones de alrededor de 2,5 veces la presión de actuación en la primera vía de paso central, fluida, pero sólo presiones iguales a la presión de accionamiento (es decir, la presión en la cavidad de la válvula) en la apertura de la segunda vía de paso de desplazamiento de fluido.

### 3.3 Diseño de puerto de entrada

**[0229]** A continuación se describirá una disposición ventajosa para un puerto de entrada en un cartucho fluídico. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un cartucho fluídico para el procesamiento de una muestra líquida, teniendo el cartucho una muestra de cámara que comprende la mezcla de:

una abertura de entrada de muestra para introducir una muestra líquida en la cámara de mezcla de la muestra;  
una jaula que rodea la abertura de entrada y que se extiende en la muestra de la cámara de mezcla, comprendiendo la jaula uno o más salientes que se extienden radialmente hacia el interior para hacer tope contra un dispositivo de suministro de muestra introducida a través de la entrada de la muestra.

**[0230]** El cuerpo de la jaula puede estar formado por uno o más bares alargados, o una o más paredes sólidas, dependiendo del techo de la cámara de mezcla de la muestra. Si se proporcionan paredes sólidas, hay preferiblemente una abertura en la parte inferior de las paredes a través de la cual puede pasar una muestra de líquido introducido por el dispositivo de entrega de la muestra. Preferiblemente, las barras o la pared que forman el cuerpo están ahusadas para ajustarse a la punta de un dispositivo de entrega de la muestra convencional introducida a través de la entrada de la muestra.

**[0231]** Las paredes sólidas tienen la ventaja adicional de que proporcionan una barrera para evitar que el fluido introducido en la cámara de mezcla se escape de la abertura de entrada, que es particularmente útil si el cartucho se gira boca abajo durante el uso.

**[0232]** Si la jaula está formada de paredes sólidas, la protrusión puede ser un saliente que se extiende hacia dentro desde las paredes dejando una abertura. Preferiblemente, el saliente que se extiende desde los lados de la abertura de entrada está colocada encima del suelo de la cámara de mezcla de la muestra; más preferentemente por encima de un nivel de llenado de líquido de la cámara de mezcla de la muestra. Esto evita que la muestra de líquido sea aspirada de nuevo en el dispositivo de entrega de la muestra una vez que se introduzca en la cámara de mezcla.

**[0233]** Preferiblemente, un orificio de ventilación se proporciona en la cámara de mezcla de muestra para permitir que el aire escape de la cámara durante la introducción de la muestra. Esto es particularmente útil cuando la abertura de entrada está sellada por el dispositivo de entrega de la muestra.

**[0234]** Preferiblemente, un canal de guía se proporciona dentro de la cámara de mezcla de muestra (una parte del cual es preferiblemente directamente debajo de la abertura de entrada) para dirigir la muestra introducida por un dispositivo de entrega de la muestra en una zona de indicador visual. Una región de indicador visual ejemplar se describe anteriormente en relación con el cartucho ejemplar.

**[0235]** Preferiblemente, un cambio en el índice de refracción de la zona de indicador visual descrito en este documento identifica cuando una muestra se ha introducido. La región de indicador visual puede comprender un paso de fluido estrecho, que se llena por la muestra de fluido a través de la acción capilar. El llenado del paso de fluido estrecho cambia el índice de refracción de la zona de indicador visual y un cambio de color identifica cuando

una muestra se ha introducido.

**[0236]** Una realización preferida de este aspecto se describirá ahora con referencia al cartucho fluídico ejemplar. La carcasa 111 (véase la FIG. 4) comprende una abertura de entrada de muestra 126 a través de la cual una muestra se puede introducir en la cámara 10 del cartucho 100 de mezcla usando una pipeta, por ejemplo de muestra. Como se muestra en más detalle en la FIG. 13a, la muestra de la cámara 10 de mezcla se forma a partir de la capa de neumático 114, que tiene un techo adyacente a la carcasa 111 en la región de la abertura de entrada y una abertura de entrada correspondiente a través de la cual una muestra puede ser introducida en la cámara de mezcla de la muestra 10.

**[0237]** El techo de la cámara de mezcla 10 comprende una estructura de jaula formada por las paredes 330 que rodean la abertura de entrada 126 que se extienden en la cámara de mezcla 10 desde el techo de la muestra, y una repisa 332 que se extiende radialmente hacia dentro desde las paredes 330. La forma de la estructura de jaula permite que un dispositivo de suministro de muestra, tal como una pipeta, que se encuentra en la posición correcta en la cámara 10 de mezcla de muestra, y el saliente 332 impide que la pipeta contacte con las superficies de la cámara de mezcla de muestra 10, reduciendo de este modo el riesgo de contaminación. Las paredes 330 pueden ser cónicas para aumentar aún más el acoplamiento con la pipeta.

**[0238]** Una vez que el dispositivo de entrega de la muestra se encuentra a través de la abertura, el usuario puede dispensar la muestra. El saliente 332 está colocado encima de un nivel nominal de llenado de líquido (no mostrado) de la cámara de mezcla a fin de evitar que el usuario absorba accidentalmente la muestra después de la dispensación en la cámara de muestra.

**[0239]** Un respiradero 334 en la cámara se proporciona para permitir que escape el aire en el caso de que la abertura de entrada esté sellada por el dispositivo de entrega de la muestra.

**[0240]** Una guía 336 se proporciona dentro de la cámara de muestra de mezcla 10, una parte de la cual está directamente debajo de la abertura de entrada 126 para dirigir la muestra introducida por un dispositivo de entrega de la muestra en una zona de indicador visual 338. Una zona de indicador visual ejemplar se describe anteriormente en relación con el cartucho ejemplar.

#### 3.4 Bolsillos de aislamiento térmico

**[0241]** A continuación se describirá una disposición ventajosa para los bolsillos de aislamiento térmico para una cámara de amplificación de ácido nucleico en un cartucho fluídico. En la amplificación de ácido nucleico y la detección, es preferible aplicar el calor uniformemente por toda la muestra líquida. Aunque es posible hacer esto sin dificultad en un laboratorio mediante la colocación de fuentes de calor de forma equidistante alrededor de la muestra, es mucho más difícil de lograr en un cartucho.

**[0242]** Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un cartucho de fluido para llevar a cabo la amplificación de ácido nucleico en una muestra líquida, el cartucho comprende al menos una cámara de procesamiento de la muestra y una región térmicamente aislante adyacente a la cámara para evitar la pérdida de calor de la cámara a través de la región aislante térmicamente. Preferiblemente, al menos una cámara de procesamiento de la muestra es una o ambas de una cámara de amplificación de ácido nucleico y una cámara de detección de ácidos nucleicos (de ahora en adelante 'cámara de procesamiento').

**[0243]** Preferiblemente, la cámara de procesamiento de ácidos nucleicos es adyacente a una superficie (de preferencia una superficie inferior) del cartucho para la aceptación de calor de una fuente externa, la cámara situada entre la región térmicamente aislante y la superficie de tal manera que el calor pasa desde la fuente externa a través de la superficie y de allí la cámara no se pierde por el otro lado de la cámara debido a la presencia de la región térmicamente aislante. Se ha encontrado que esta disposición realiza el cambio de temperatura dentro de la cámara (por ejemplo cuando se enciende y se apaga la fuente de calor) tan rápido como sea posible, lo cual es beneficioso para la realización de PCR rápida, por ejemplo.

**[0244]** Esto es particularmente ventajoso porque una única fuente de calor puede colocarse adyacente al cartucho para suministrar calor para el proceso de amplificación de un lado (el lado calentado), y sin embargo la muestra dentro del cartucho se calienta sustancialmente y la cantidad de calor perdida a través del lado no calentado minimizada en la medida de lo posible.

**[0245]** Preferiblemente, el cartucho se compone de al menos una capa de fluido y una capa de neumático en contacto con la disposición. La cámara de procesamiento de ácido nucleico puede estar formado en la capa de fluido y la región de aislamiento térmico se puede formar en la capa de neumático. Preferiblemente, el cartucho de fluido comprende además una lámina de fluido por debajo de la capa de fluido, formando la lámina la superficie antes mencionada para la aceptación de calor. El uso de una lámina delgada maximiza la transferencia de calor desde la fuente externa. El material de la lámina puede elegirse para optimizar la transferencia calor. Por ejemplo, una lámina de metal puede ser usada, pero se prefiere que un material compuesto de tereftalato de polietileno/polipropileno se

utiliza debido a las ventajas en la facilidad de fabricación del cartucho, junto con la resistencia del material y las propiedades de transferencia de calor aceptables.

5 **[0246]** Preferiblemente, la región térmicamente aislante se forma a partir de uno o más bolsillos de aislamiento térmico sellados térmicamente en la capa neumática y sellada por una lámina de neumático. Los bolsillos pueden rellenarse con gas tal como aire o pueden evacuarse durante el proceso de fabricación de tal manera que proporcionan un vacío.

10 **[0247]** Una realización preferida de este aspecto se describirá ahora con referencia al cartucho fluídico ejemplar. Como se muestra en la FIG. 3, el cartucho ejemplar 100 comprende, de arriba a abajo, una carcasa 111, un subconjunto de ampolla 112, una lámina de neumático 113, una capa de neumático 114, una capa de fluido 115 y una lámina de fluido 116.

15 **[0248]** Haciendo referencia a las FIGS. 6A y 6B, que muestran la capa de neumático, se proporcionan seis regiones térmicamente aislantes 140a-b, 141a-d. Las regiones aislantes 140a-b se encuentran adyacentes a dos correspondientes cámaras de amplificación formadas en la capa de fluido 115, mientras que las regiones aislantes 141a-d se encuentran adyacentes a cuatro cámaras de detección correspondientes formadas en la capa de fluido 115, cuando se monta el cartucho. Como se muestra, las regiones aislantes 140a-b se componen de una pluralidad de bolsillos de aislamiento térmico, mientras que las regiones aislantes 141a-d consisten cada uno en un único bolsillo. Durante la amplificación y detección de ácido nucleico, tiene lugar el termociclado de las cámaras de detección y amplificación. Las cámaras de la capa de fluido se pueden calentar mediante la aplicación de calor a la parte inferior del cartucho 100, adyacente a la capa de fluido 115. Los bolsillos de aislamiento térmico retienen el calor dentro del cartucho, minimizando la pérdida de calor de la capa de fluido 115 en la capa de neumático 114. Los bolsillos de aislamiento térmico también eliminan la necesidad de calefacción del cartucho de fluidos tanto de las superficies superior e inferior por ejemplo, calentando tanto la capa de fluidos como la capa de neumático, simplificando el diseño general del cartucho y del lector.

20

25

30 **[0249]** El bolsillo de aislamiento térmico puede comprender un bolsillo grande o varios bolsillos más pequeños. La ventaja de usar múltiples bolsillos más pequeños es que se reduce el riesgo de corrientes convección, permitiendo así aislamiento térmico máximo.

### 3.5 Columna de captura

35 **[0250]** Una disposición ventajosa para un dispositivo de filtrado en un cartucho fluídico (preferiblemente una 'columna de captura') se describirá ahora. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un cartucho de fluido que comprende un canal a través del cual puede pasar una muestra líquida, teniendo el canal un filtro para capturar los componentes biológicos y que comprende además:

40 una parte aguas arriba y una parte aguas abajo; y una parte de captura entre las partes aguas arriba en las que está dispuesto el filtro; en el que:

el diámetro de la porción de captura es mayor que el diámetro de las porciones aguas arriba y hacia abajo. cámara 344 en un extremo aguas abajo 348.

45 **[0251]** Preferiblemente, la parte de captura es una cámara dentro del canal, teniendo la cámara una superficie de entrada que tiene una abertura acoplada a la parte aguas arriba del canal y una superficie de salida que tiene una abertura acoplada a la parte aguas abajo del canal.

50 **[0252]** Preferiblemente, el cartucho de fluido comprende al menos dos capas de polímero, en las que la parte aguas arriba y una parte aguas arriba de la parte de captura del canal se forman en una primera capa de polímero y la parte aguas abajo y parte aguas abajo de la parte de captura del canal están formadas en una segunda capa de polímero; y en el que el filtro se sujeta entre las capas poliméricas primera y segunda.

55 **[0253]** Preferiblemente, la superficie de entrada de la cámara comprende los conductos de distribución que proceden radialmente hacia fuera desde la abertura a fin de dirigir una muestra de líquido que pasa a través de la abertura en la superficie de entrada radialmente hacia fuera.

60 **[0254]** Preferiblemente, la superficie de salida de la cámara comprende conductos de distribución que proceden radialmente hacia dentro hacia la abertura para dirigir una muestra de líquido que ha pasado a través del filtro radialmente hacia dentro hacia la abertura en la superficie de salida.

65 **[0255]** Una realización preferida de este aspecto se describirá ahora con referencia al cartucho fluídico ejemplar. En el cartucho ejemplar descrito en este documento, una columna de captura 24 se proporciona a lo largo del canal principal (véase la FIG. 1). Como se muestra en las FIGS. 14a y 14b, la columna de captura 24 tiene filtrado 340 que se une ADN a partir de material lisado antes de liberarlo durante la elución. Como se muestra en la FIG. 14a, la columna de captura 24 comprende un canal de entrada 342 que conduce a una cámara de captura 344 en un

extremo aguas arriba 346, y un canal de salida 350 que conduce desde la cámara de captura 344 en un extremo aguas abajo 348.

5 **[0256]** Un filtro 340 se proporciona en la cámara 344, perpendicular a la dirección de flujo de fluido a través del canal principal, tal que el fluido debe pasar a través del filtro 340 cuando pasa desde el extremo aguas arriba del canal principal 342 al extremo aguas abajo 350 del canal principal.

10 **[0257]** Haciendo referencia ahora a la FIG. 14b, las paredes de entrada y de salida (sólo se muestra una) de la cámara comprenden conductos de distribución 352 configurados para dirigir el fluido radialmente hacia fuera en la cámara 344, a medida que entra en la cámara, y radialmente hacia dentro hacia la abertura de salida después de que ha pasado por el filtro 340.

### 3.6 Cámara de residuos

15 **[0258]** A continuación se describirá una disposición ventajosa para la cámara del residuo en un cartucho fluídico. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un cartucho de fluido que comprende un canal a través del cual puede pasar una muestra líquida y una cámara de residuos para recibir fluido desde el canal, comprendiendo la cámara de residuos:

20 un tubo, acoplado al canal, que se extiende desde una superficie inferior de la cámara de residuos y que tiene una abertura elevada por encima de la superficie inferior que pase fluido desde el canal en la cámara; y un orificio de ventilación dentro de la cámara de residuos configurada para ventilar la cámara de residuos a la atmósfera. Preferiblemente, el respiradero comprende un segundo tubo, acoplado a un canal de ventilación dentro del cartucho, se extiende desde la superficie inferior de la cámara de residuos y que tiene una abertura elevada por encima de la superficie inferior. Preferiblemente, la vía de paso de ventilación comprende al menos un impactador de Anderson. Preferiblemente, al menos una almohadilla absorbente se proporciona dentro de la cámara de residuos.

25

30 **[0259]** Una realización preferida de este aspecto se describirá ahora con referencia al cartucho fluídico ejemplar. En el cartucho ejemplar descrito en el presente documento, se proporciona una cámara de residuos para recoger y almacenar fluido de desecho que se produce durante el lavado etc. La cámara de residuos 10 se muestra con más detalle en las FIGS. 15a y 15b. La cámara de residuos 38 comprende un tubo 360, que se extiende sustancialmente en vertical desde una superficie inferior 362 de la cámara de residuos 38. El tubo 38 define un canal que tiene un primer extremo 364 conectado a la superficie inferior de la cámara de residuos 38 y conectado de forma fluida con el canal principal 16. Un segundo extremo 366 de la tubería de fluido 360 se dispone dentro de la cámara de residuos 38, y tiene una abertura a través del cual el fluido puede fluir en la cámara de residuos.

35

40 **[0260]** Preferiblemente, el tubo 360 es sustancialmente vertical, y perpendicular a la superficie inferior de la cámara de residuos 38. La abertura en el segundo extremo del tubo 360 está situada cerca de la parte superior de la cámara de residuos 38 tal como se muestra en la FIG. 15b. Al proporcionar la primera abertura cerca de la parte superior de la cámara de residuos, se reduce al mínimo el riesgo de fuga en el caso de que se invierta el cartucho.

45 **[0261]** Las almohadillas absorbentes 368 también se proporcionan en la cámara de residuos. Preferiblemente, la superficie superior de las almohadillas absorbentes 368 también debe estar cerca de la parte superior de cámaras de residuos 38, incluso más preferiblemente, la parte superior de almohadillas absorbentes 368 debe estar sustancialmente a nivel con la abertura en el segundo extremo 366.

50 **[0262]** En el cartucho ejemplar descrito en el presente documento, una segunda abertura 370 se proporciona en la cámara de residuos 38 tal como se muestra en la FIG. 15b. La segunda abertura 370 está configurada para ventilar el canal principal 16 a través de la cámara de residuos 28 a la presión atmosférica. Esto evita la aplicación de una presión a lo largo del canal principal a medida que el canal de residuos se llena de líquido. Preferiblemente, la segunda abertura 370 está prevista en el extremo de un segundo tubo 372 sobresaliendo de la superficie inferior de la cámara de residuos 38. La segunda abertura 370 puede estar conectada de forma fluida a una vía de paso de ventilación (no mostrada) que tiene una abertura exterior de la carcasa del cartucho para permitir que la cámara de residuos permanezca a presión atmosférica. Sin embargo, la ventilación de la cámara de residuos fuera del cartucho conlleva un pequeño riesgo de contaminación de aerosol. Para reducir esto, la trayectoria de ventilación tiene trampas y respiraderos de impacto por bajo la cubierta del cartucho.

55



**Reivindicaciones**

1. Un cartucho fluidico para el procesamiento de una muestra líquida, que comprende:

5 un canal principal (B100) para hacer pasar la muestra a través del mismo líquido desde un extremo aguas arriba (B100A) a un extremo aguas abajo (B100B); y uno o más canales de derivación que unen el canal principal para la introducción de líquido y gas en el canal principal después de que la muestra de líquido haya pasado aguas abajo de los uno o más canales de derivación, incluyendo uno o más canales de derivación un primer canal de rama (B101), en el que el primer canal de rama comprende:

10 una entrada de gas (B101 a) para introducir un gas en el primer canal de rama;  
 una entrada de líquido (B101d) para introducir un líquido en el primer canal de rama; y  
 una válvula (B101c) configurada para mover entre una posición cerrada en la que impide que el líquido y gas en el primer canal de rama pasen al canal principal y una posición abierta en la que permite que líquido y gas  
 15 pasen al primer canal de rama en el canal principal,  
 en el que la o cada entrada de gas se encuentra más lejos de la unión del canal de rama con el canal principal de la o cada entrada de líquido.

20 2. El cartucho de fluido de la reivindicación 1, en el que el uno o más canales de derivación comprende además un segundo canal de rama (B102) que se une al canal principal aguas abajo del primer canal de rama (B101), en el que el segundo canal de rama comprende:

25 una entrada de gas (B102A) para introducir un gas en el segundo canal de rama;  
 una entrada de líquido (B102d) para introducir un líquido en el segundo canal de rama; y  
 una válvula (B102c) configurada para moverse entre una posición cerrada en la que impide que el líquido y el gas pasen al segundo canal de rama en el canal principal y una posición abierta en la que permite que líquido y gas en el segundo canal de rama pasen al interior del canal principal.

30 3. El cartucho de fluido de cualquier reivindicación precedente, en el que la o cada entrada de gas (B101A, B102A) en el uno o más canales de derivación comprende una válvula de entrada de gas (B101b, B102b) para evitar que el líquido y el gas fluyan desde el canal de derivación a través de la entrada de gas.

35 4. El cartucho de fluido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la o cada válvula (B101c, B102c) en el uno o más canales de derivación está separado del canal principal (B100), formando de este modo un tramo muerto (B108) en el canal de rama entre la válvula y el canal principal.

40 5. El cartucho de fluido de la reivindicación 3, en el que la o cada válvula de entrada de gas (B101 b, B102b) está situada más lejos de la unión del canal de derivación con el canal principal de la o cada entrada de líquido (B101 d, B102d), y la o cada entrada de gas (B101 a, B102A) está situada más lejos de la unión del canal de derivación con el canal principal de la o cada válvula de entrada de gas (B101 b, B102b).

45 6. El cartucho de fluido de cualquier reivindicación precedente, en el que la o cada entrada de líquido (B101d, B102d) en el uno o más canales de derivación está acoplado a una cámara de líquido, preferiblemente en el que la o cada cámara de líquido es una ampolla plegable (B500) adaptada, cuando se colapsa, para expulsar un líquido contenido en el mismo a través de la entrada de líquido (B101d, B102d), en el canal de rama, y en el canal principal (B100), para introducir el líquido en el canal principal después de que la muestra líquida ha pasado aguas abajo de los uno o más canales de derivación.

50 7. El cartucho de fluido de cualquier reivindicación precedente, que comprende además una interfaz de neumático (B900) para conectar a una fuente de presión positiva y/o manométrica, comprendiendo la interfaz neumática una pluralidad de puertos, y en el que la o cada válvula (B101c, B102c) o la válvula de entrada de gas (B101b, B102b) en el uno o más canales de derivación es una válvula accionada neumáticamente acoplada a al menos un puerto en la interfaz neumática de tal manera que pueda accionarse por la fuente positiva y/o manómetro.

55 8. El cartucho de fluido de la reivindicación 7, cuando depende de la reivindicación 2, en el que las válvulas de entrada de gas primera y segunda (B101 B, B102b) en los canales de rama primero y segundo, respectivamente, se acoplan al mismo puerto en la interfaz neumática, de tal manera que las válvulas de entrada de gas primera y segunda pueden accionarse simultáneamente.

60 9. El cartucho de fluido de cualquier reivindicación precedente, en el que la o cada entrada de gas (B101A, B102A) en el uno o más canales de derivación está acoplado a la interfaz neumática para la conexión a un suministro de gas, preferiblemente para hacer pasar un gas a través de la entrada de gas, en el canal de rama, y en el canal principal (B100), para introducir el gas en el canal principal después de que la muestra de líquido haya pasado aguas abajo de los uno o más canales de derivación.

65 10. El cartucho de fluido de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, cuando depende de la reivindicación 2 o

cualquier reivindicación dependiente de la reivindicación 2, en el que la interfaz neumática comprende los puertos primero a tercero (B901, B902, B903), y en donde los puertos primero a tercero están respectivamente acoplados a:

- 5 i. La válvula en el primer canal de rama;
- ii. La válvula en el segundo canal de rama; y
- iii. La válvula de entrada de gas en el primer canal de rama y la válvula de entrada de gas en el segundo canal de rama;

de tal manera que las válvulas respectivas pueden ser accionadas por la fuente de presión positiva y/o manométrica actuando a través de los puertos respectivos.

11. Un método de procesamiento de una muestra líquida en un cartucho fluídico, comprendiendo el cartucho un canal principal (B100) y uno o más canales de derivación que se unen al canal principal, que incluye un primer canal de rama (B101) que comprende una entrada de gas (B101A), una entrada de líquido (B101d) y una válvula (B101c), comprendiendo el método;

- a) hacer pasar una muestra de líquido a través del canal principal;
- b) suministrar un gas a la entrada de gas;
- 20 c) abrir la válvula en el primer canal de rama y pasar un gas desde la entrada de gas a través del primer canal de rama y en el canal principal para evacuar cualquier muestra de líquido residual en el primer canal de rama;
- d) cesar el suministro de gas;
- e) hacer pasar un líquido desde la entrada de líquido a través del primer canal de rama y en el canal principal;
- f) suministrar un gas a la entrada de gas; y
- 25 g) hacer pasar un gas desde la entrada de gas a través del primer canal de rama y en el canal principal para evacuar cualquier líquido residual del primer canal de rama.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el cartucho de fluido comprende además una válvula de entrada de gas (B101 b) en el primer canal de rama (B101), y en el que los pasos (b) y (f) de suministrar un gas a la entrada de gas comprenden además la abertura de la válvula de entrada de gas, y en el que el paso (d) de cesar el suministro de gas es comprende además el cierre de la válvula de entrada de gas y antes de cesar el suministro de gas.

13. Un método de procesamiento de una muestra líquida en un cartucho fluídico, comprendiendo el cartucho un canal principal (B100) que tiene un extremo aguas arriba (B100A) y un extremo aguas abajo (B100B) y uno o más canales de rama que se unen al canal principal, incluyendo un primer canal de rama (B101) y el segundo canal de derivación (B102) aguas abajo del primer canal de rama, comprendiendo cada canal de ramal una entrada de gas (B101A, B102A), una válvula de entrada de gas (B101b, B102b), una entrada de líquido (B101d, B102d) y una válvula (B101c, B102c), comprendiendo el método:

- a) hacer pasar una muestra de líquido a través del canal principal;
- 40 b) suministrar un gas a la entrada de gas en el primer canal de derivación y la entrada de gas en el segundo canal de rama;
- c) abrir las válvulas y las válvulas de entrada de gas en los canales de ramificación primero y segundo y pasando un gas desde las entradas de gas en los canales de derivación primero y segundo a través de los canales de ramificación primero y segundo y en el principal canal para evacuar cualquier muestra de líquido residual en los
- 45 canales de derivación primero y segundo;
- d) cerrar la válvula y la válvula de entrada de gas en el segundo canal de rama y la válvula de entrada de gas en el primer canal de derivación;
- e) cesar el suministro de gas a la entrada de gas en el primer canal de derivación y la entrada de gas en el
- 50 segundo canal de rama;
- f) hacer pasar un líquido desde la entrada de líquido en el primer canal de derivación a través del primer canal de rama y en el canal principal;
- g) suministrar un gas a la entrada de gas en el primer canal de derivación y la entrada de gas en el segundo canal de rama;
- h) abrir la válvula y la válvula de entrada de gas en el segundo canal de rama y la válvula de entrada de gas en el
- 55 primer canal de derivación y pasando un gas a partir de las entradas de gas en los canales de derivación primero y segundo a través de los canales de ramificación primero y segundo y en el canal principal para evacuar cualquier líquido residual en los canales de derivación primero y segundo;
- i) cerrar la válvula y la válvula de entrada de gas en el primer canal de derivación y la válvula de entrada de gas en el segundo canal de rama;
- 60 j) cesar el suministro de gas a la entrada de gas en el primer canal de derivación y la entrada de gas en el segundo canal de rama;
- k) hacer pasar un líquido desde la entrada de líquido en el segundo canal de rama a través del segundo canal de rama y en el canal principal;
- l) suministrar un gas a la entrada de gas en el segundo canal de rama y la apertura de la válvula de entrada de
- 65 gas en el segundo canal de rama; y
- m) hacer pasar un gas desde la entrada de gas en el segundo canal de rama a través del segundo canal de rama

y en el canal principal para evacuar cualquier líquido residual en el segundo canal de rama.

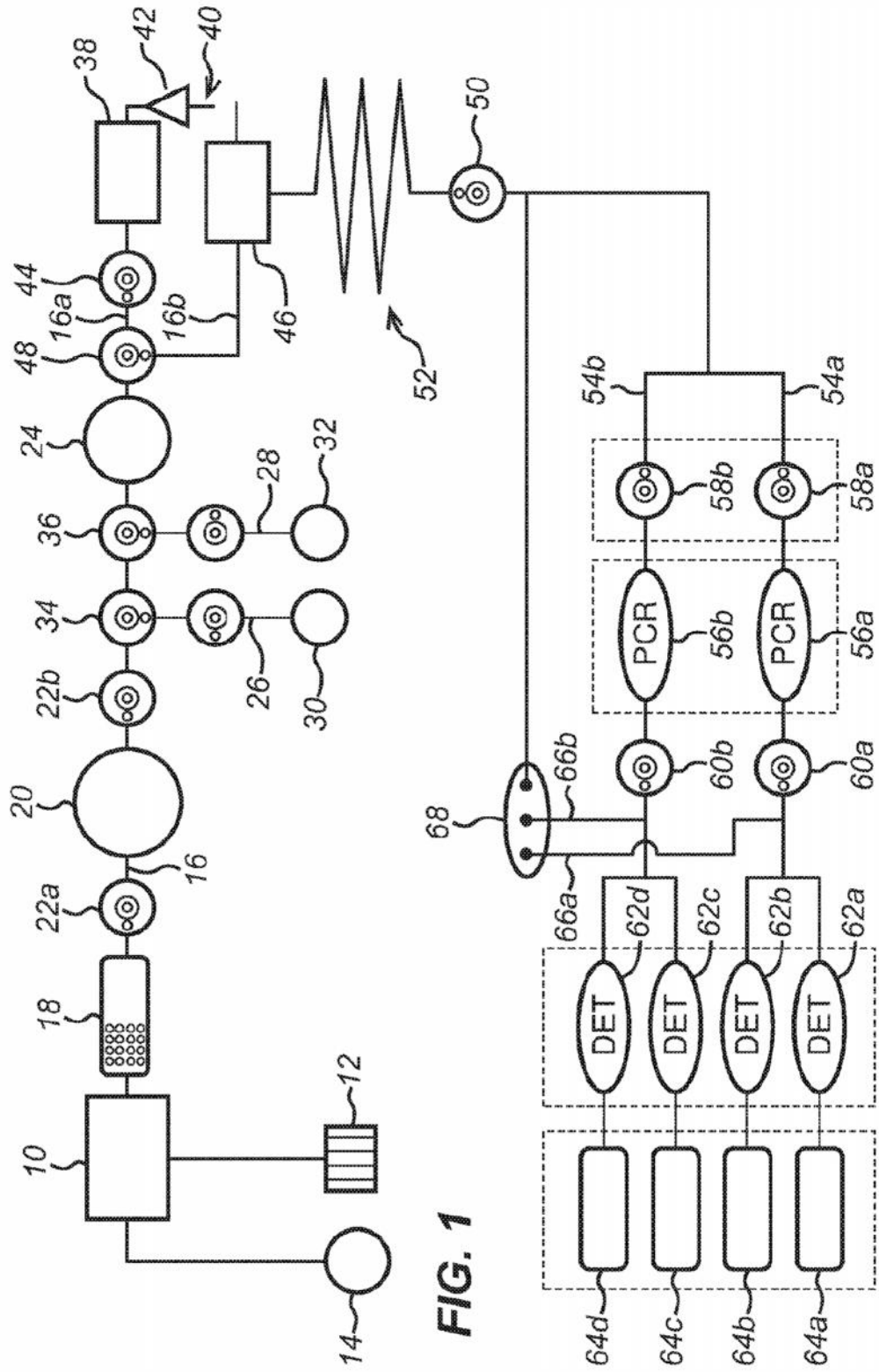
5 **14.** El método de la reivindicación 13, en el que los pasos (l) y (m) comprenden además el suministro de un gas a la entrada de gas (B101A) en el primer canal de rama (B101) y la apertura de la válvula de entrada de gas (B101b) en el primer canal de rama y pasar un gas desde la entrada de gas en el primer canal de derivación a través del primer canal de rama y en el canal principal (B100) para evacuar cualquier líquido residual en el primer canal de rama.

10 **15.** El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el cartucho de fluido que comprende además una interfaz neumática (B900) para la conexión a una fuente de presión positiva, y en el que la o cada entrada de gas en el uno o más canales de derivación está acoplado a la interfaz neumática para la conexión a un suministro de gas, en el que uno o más de los pasos de hacer pasar un gas desde la entrada de gas comprende hacer pasar un gas desde el suministro de presión de gas positiva en el canal de rama.

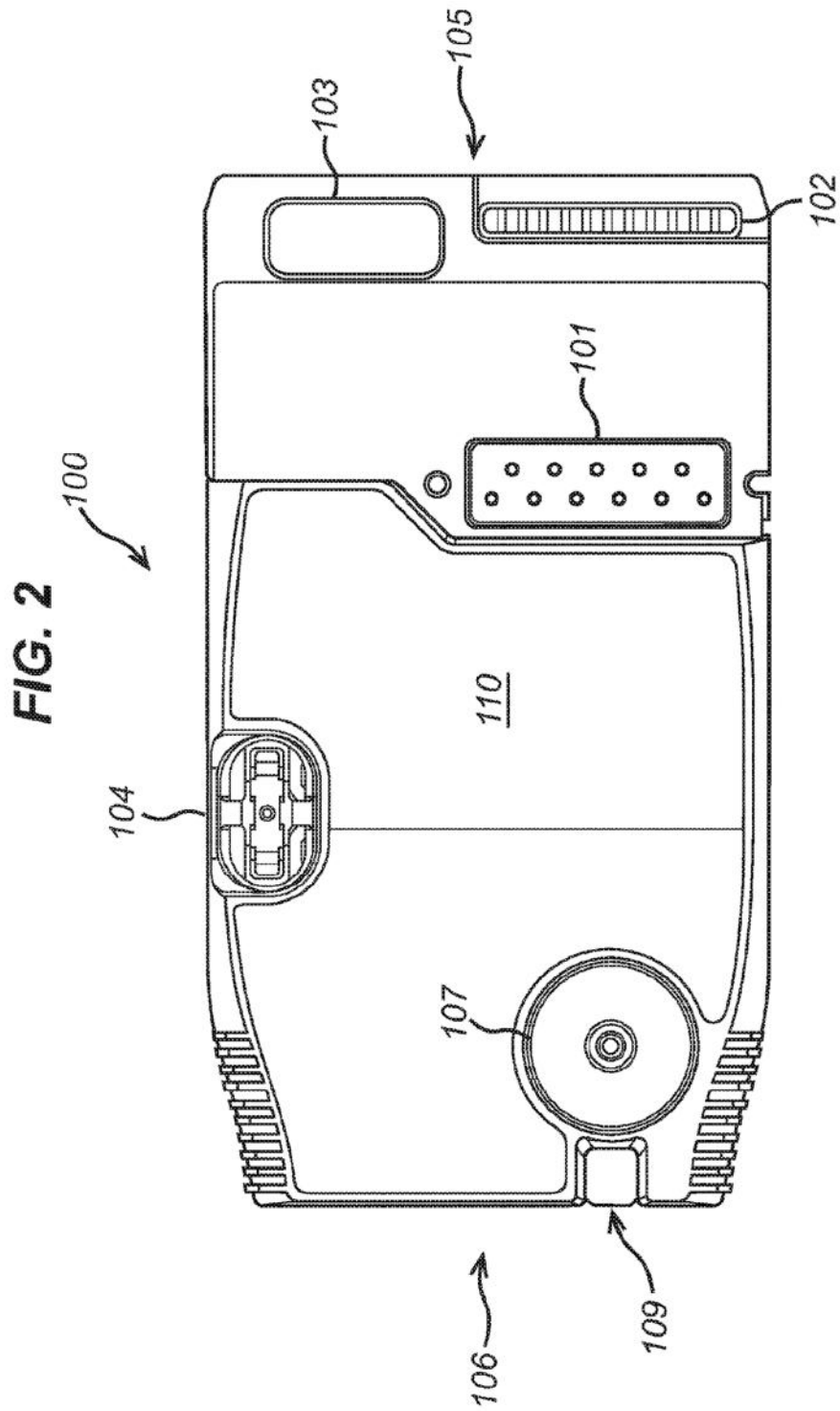
15 **16.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que uno o más de los pasos de hacer pasar un gas desde la entrada de gas (B101A, B102A) en el uno o más canales de derivación y en el canal principal (B100) comprende además purgar el muestra líquida residual y/o líquido residual desde el canal principal.

20 **17.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que la o cada entrada de líquido (B101d, B102d) en el uno o más canales de derivación está acoplada a una cámara del líquido, y en donde uno o más de los pasos de hacer pasar un líquido desde la entrada de líquido comprende expulsar el líquido de la cámara de líquido en el canal de rama, preferiblemente en el que la o cada cámara de líquido es una ampolla plegable (B500) (y en el que uno o más de los pasos de hacer pasar un líquido desde la entrada de líquido comprende el colapso de la ampolla plegable y expulsar con ello el contenido líquido a través de la entrada de líquido, en el canal de rama y en el canal principal (B100).

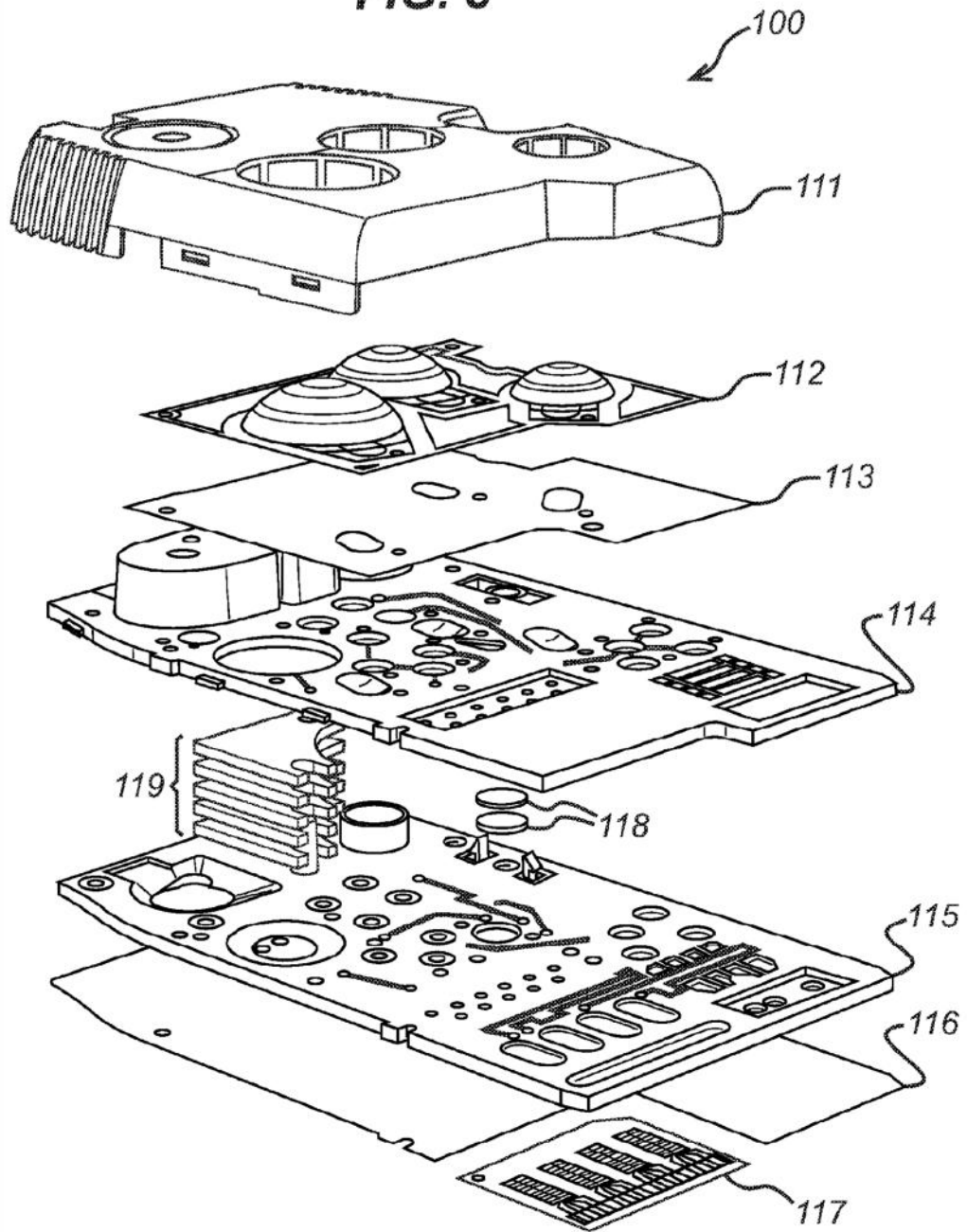
25

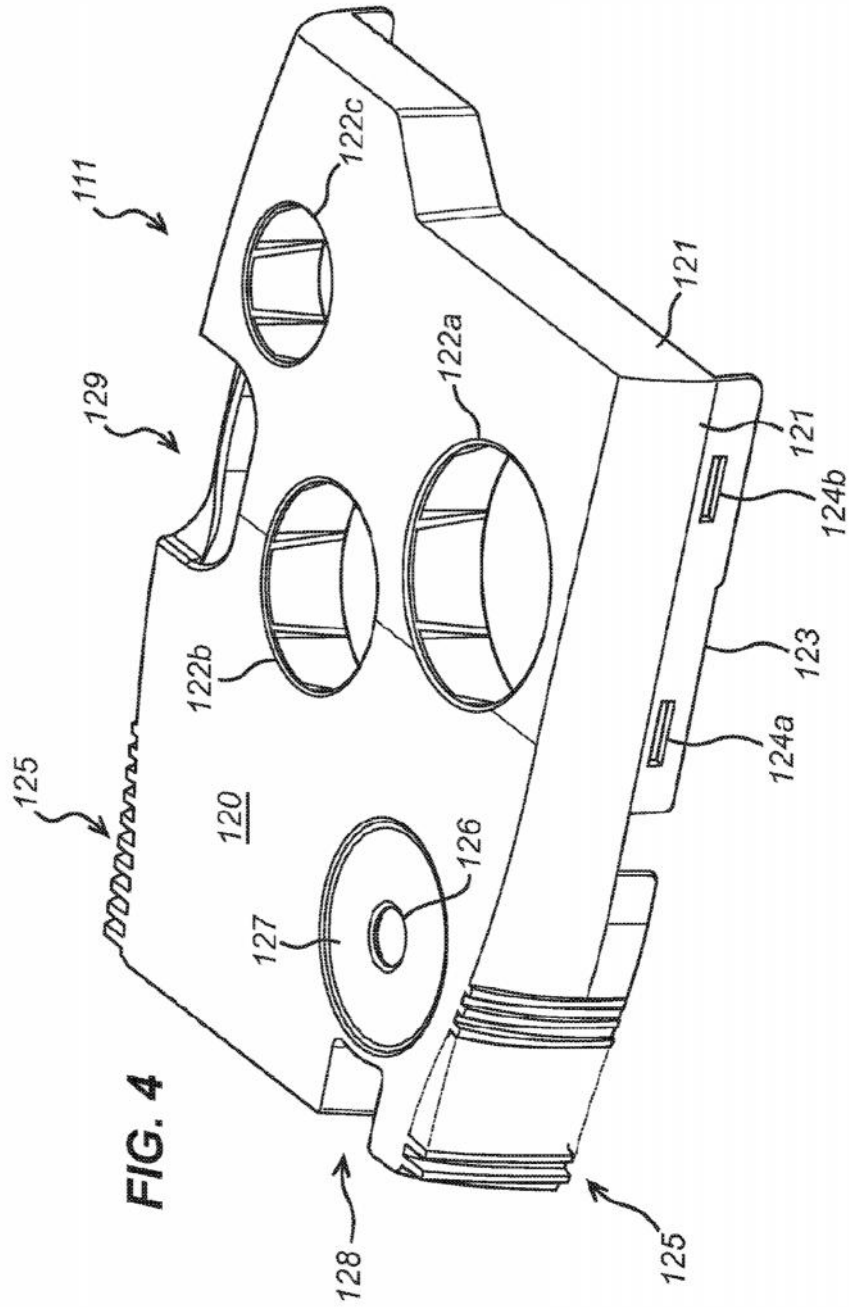


**FIG. 1**

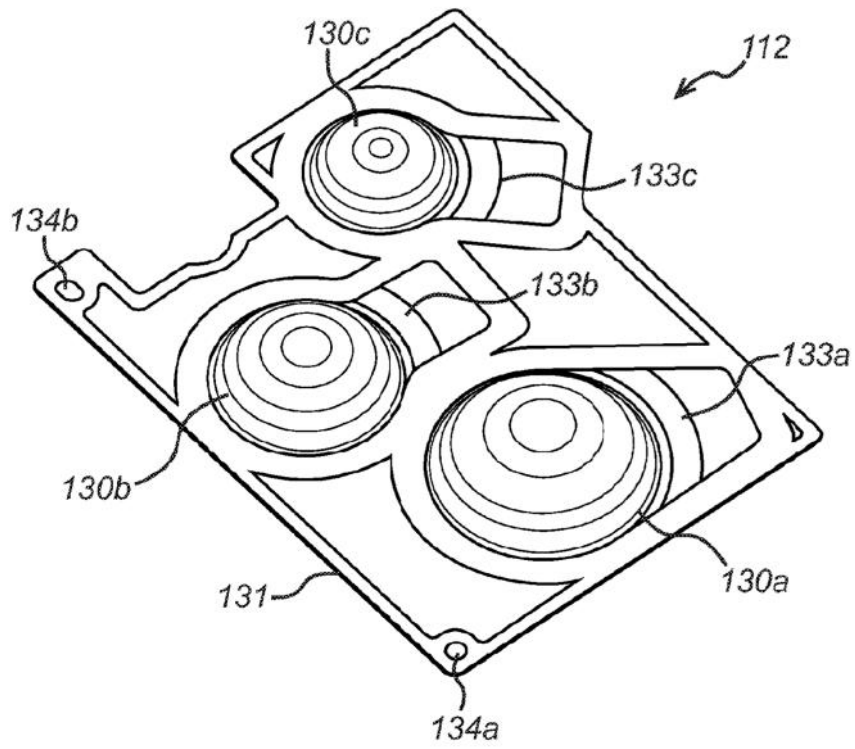


**FIG. 3**

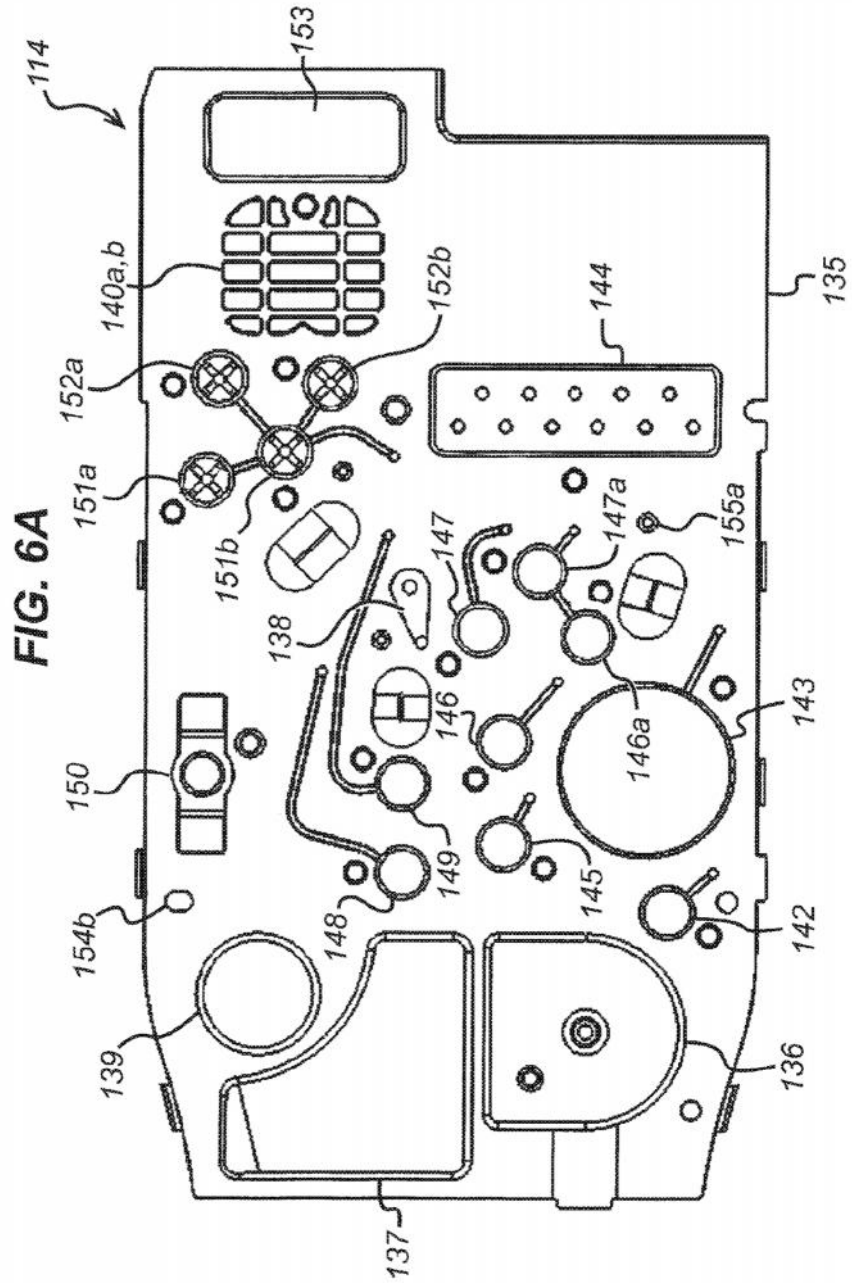


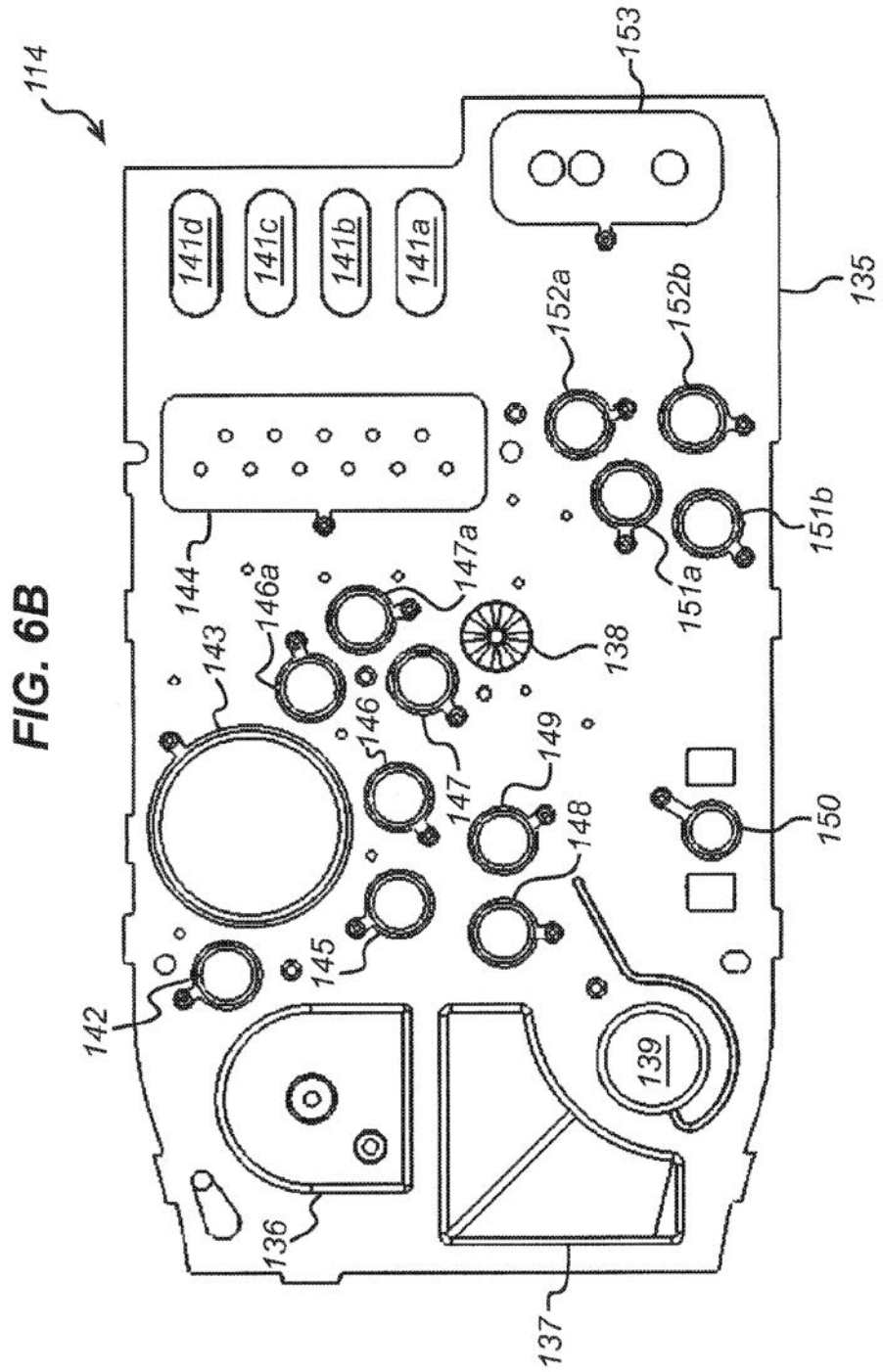


**FIG. 5**









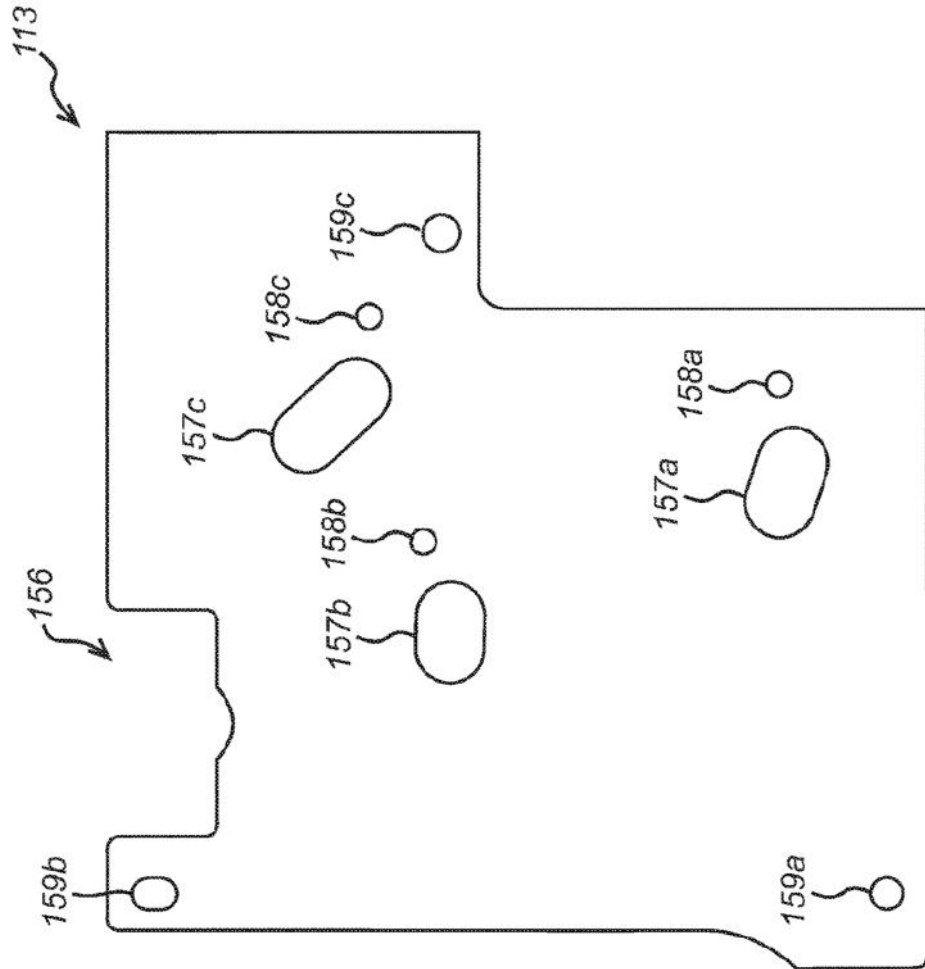


FIG. 7

FIG. 8A

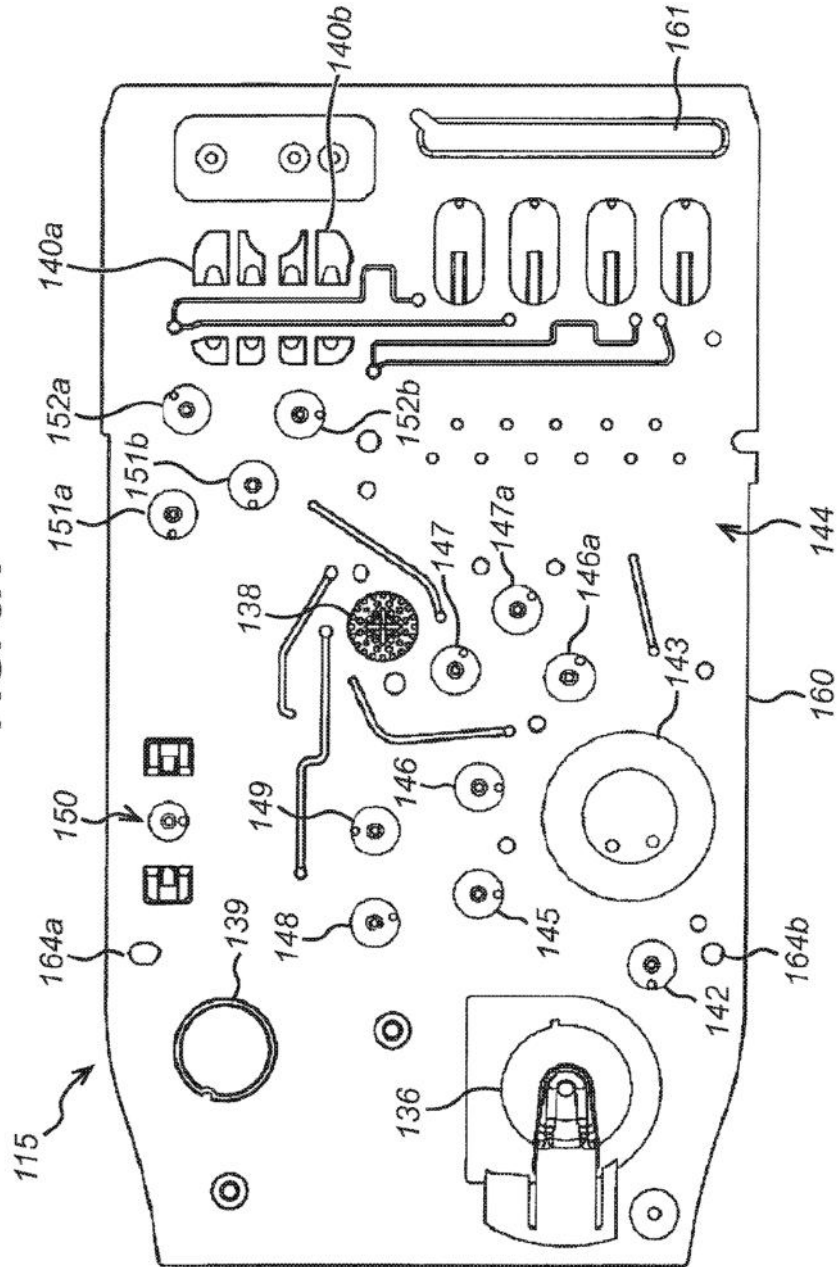
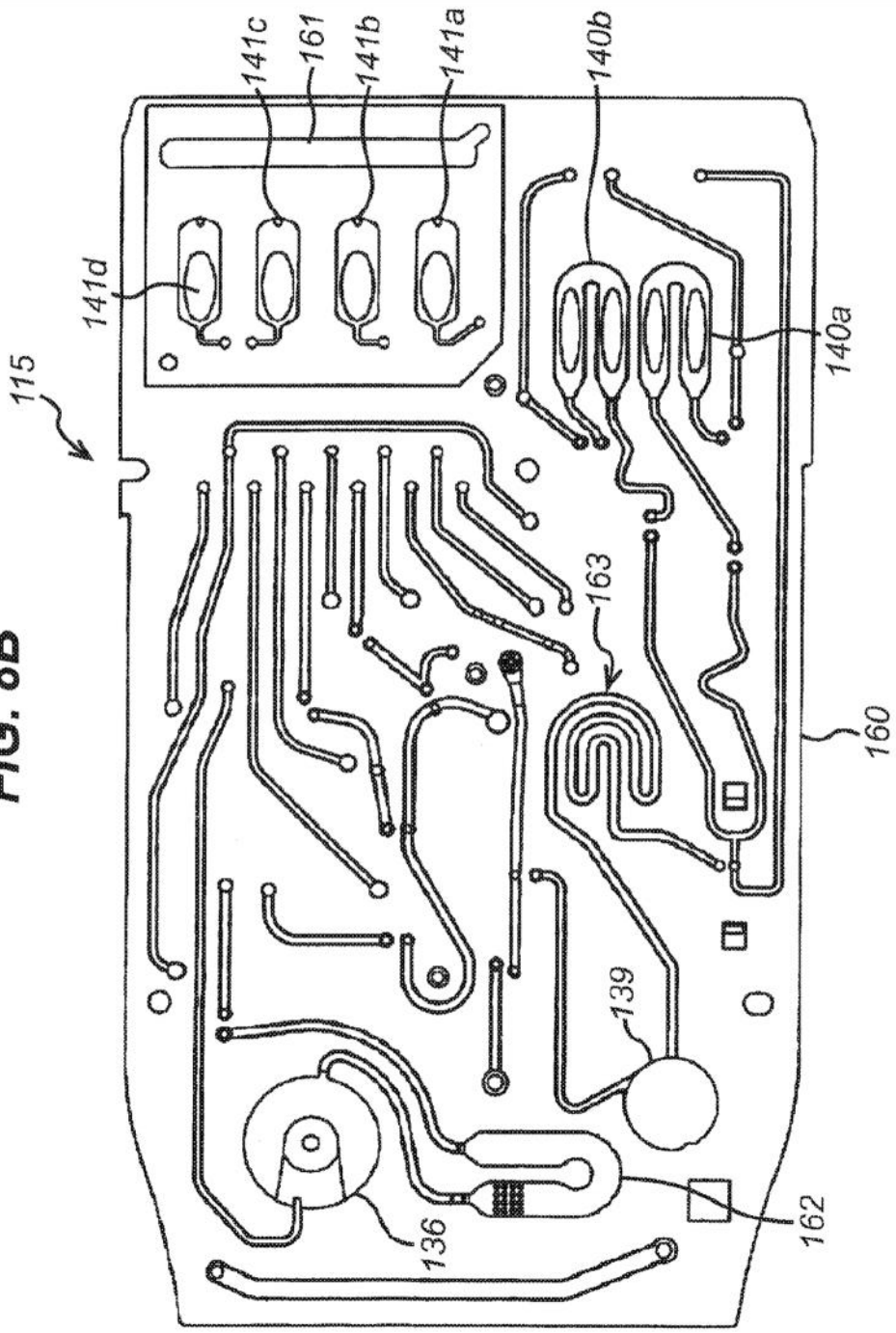
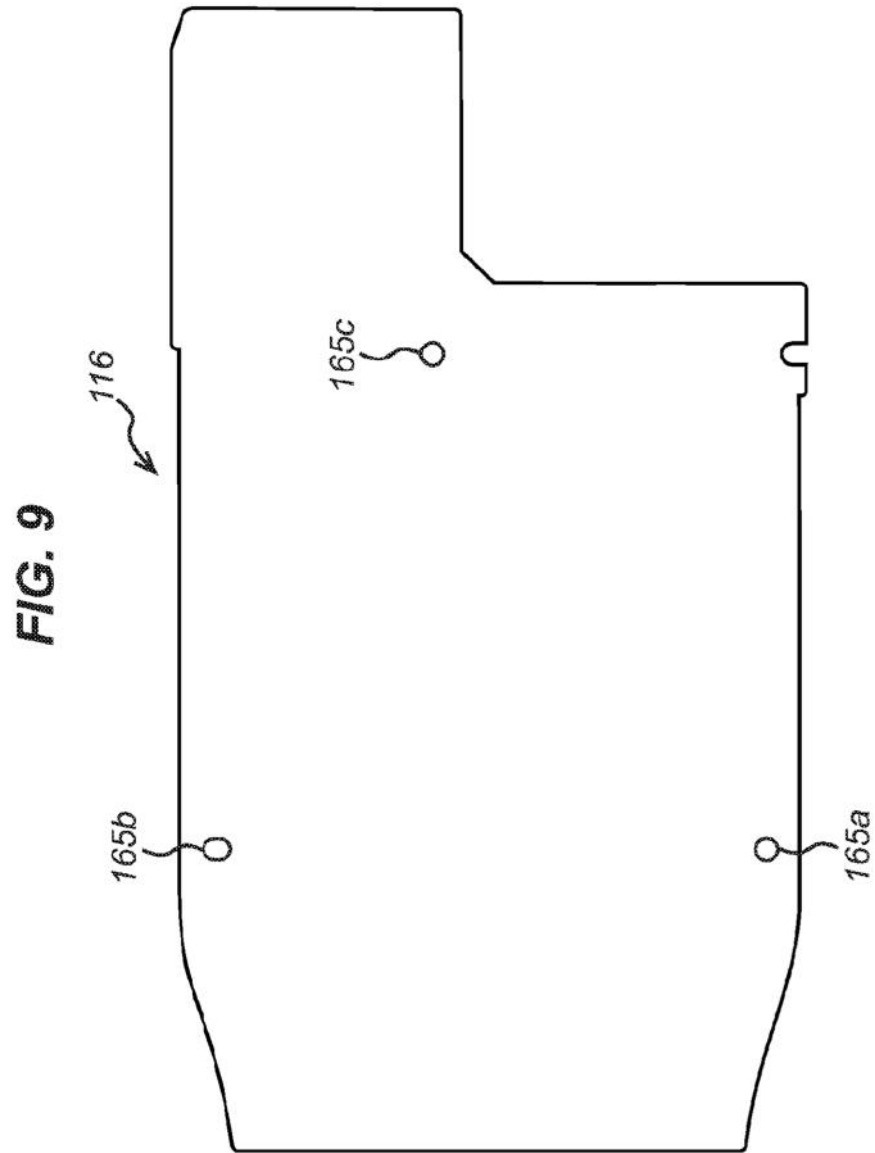
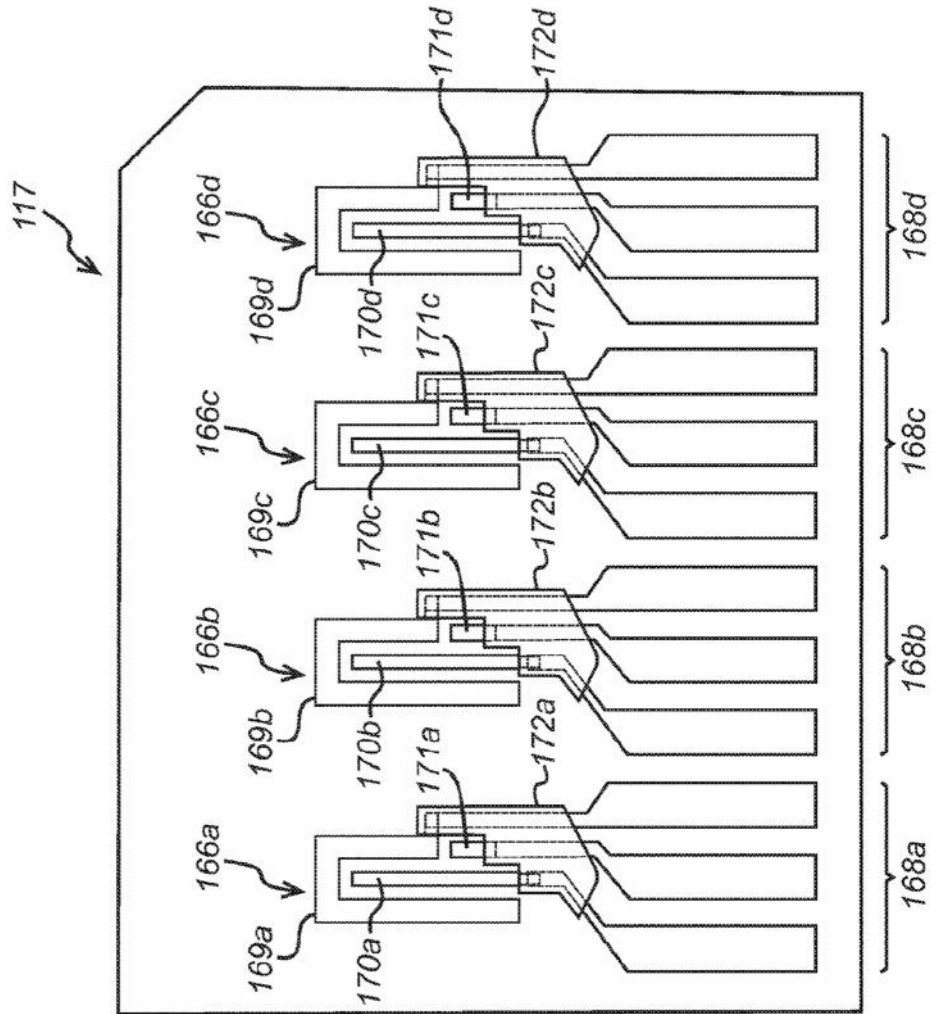


FIG. 8B

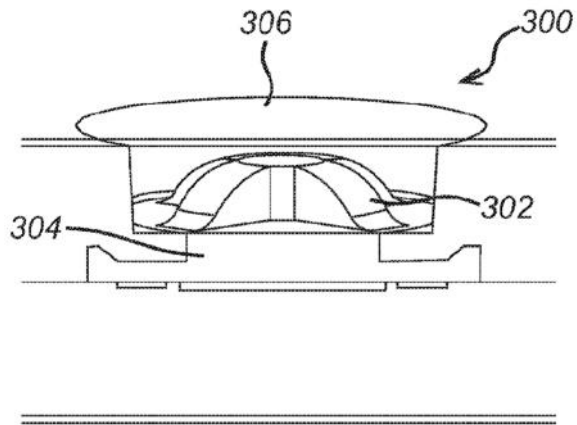




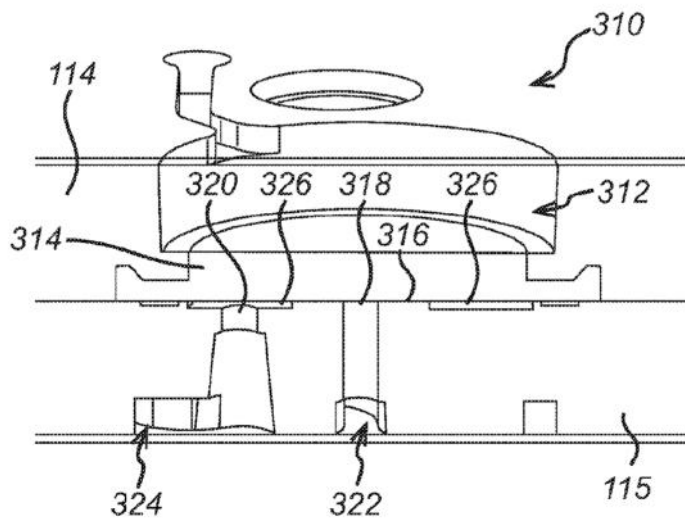


**FIG. 10**

**FIG. 11**

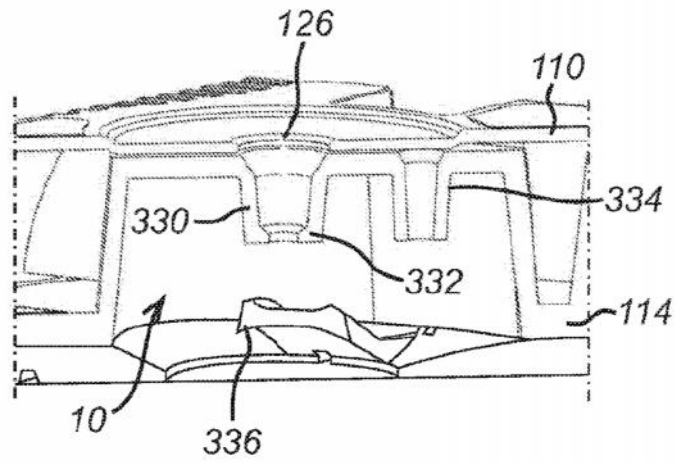


**FIG. 12**

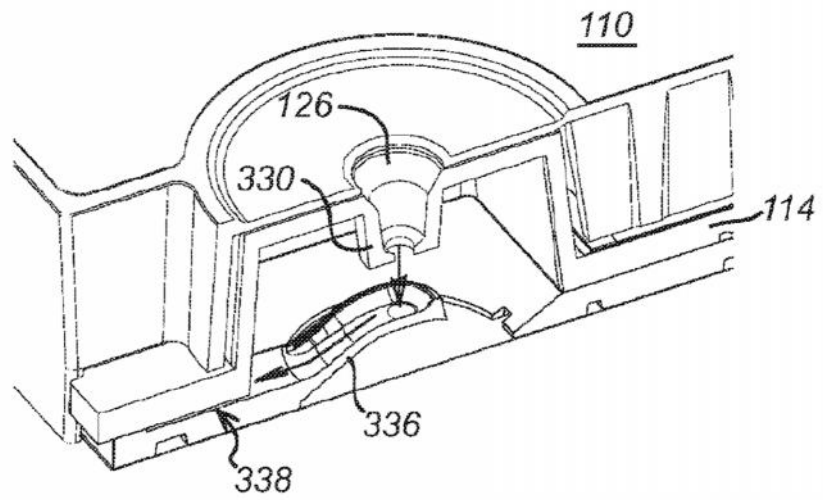




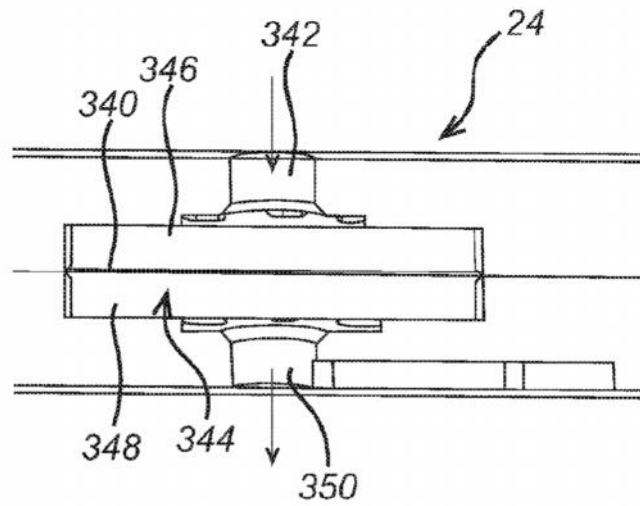
**FIG. 13a**



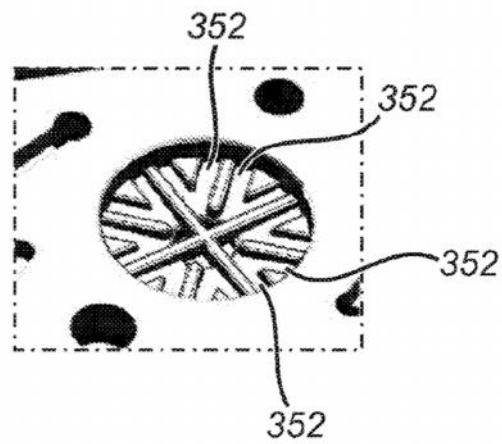
**FIG. 13b**



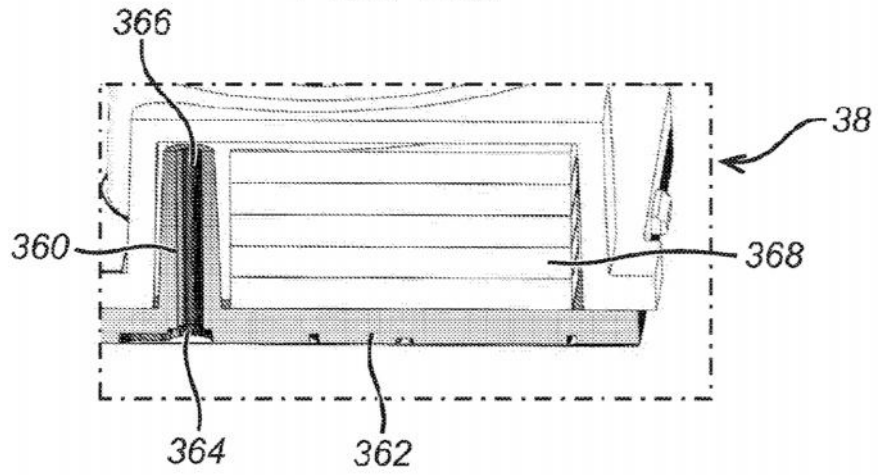
**FIG. 14a**



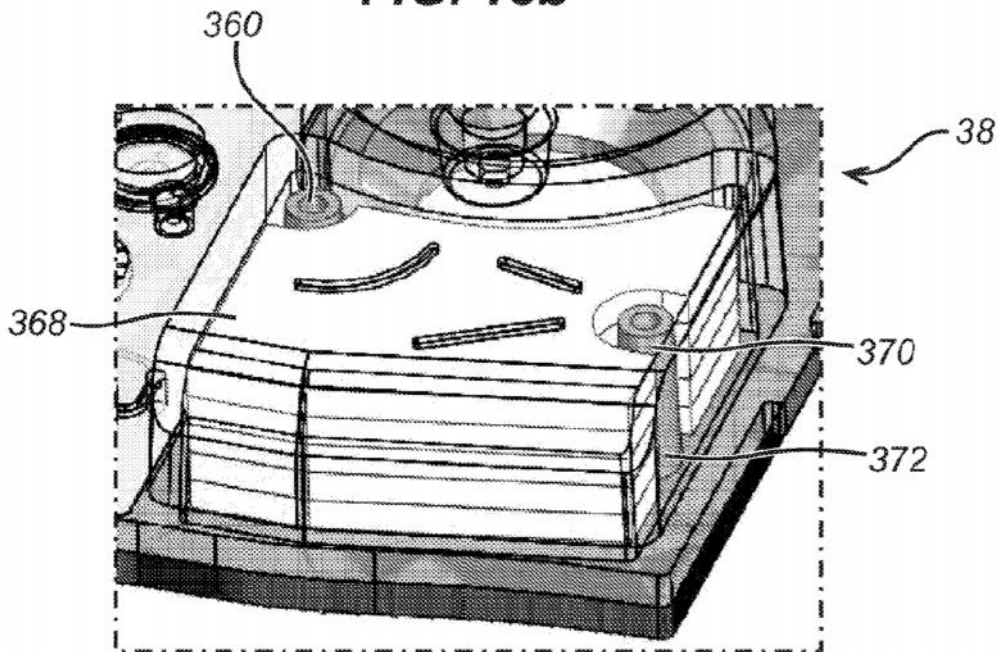
**FIG. 14b**



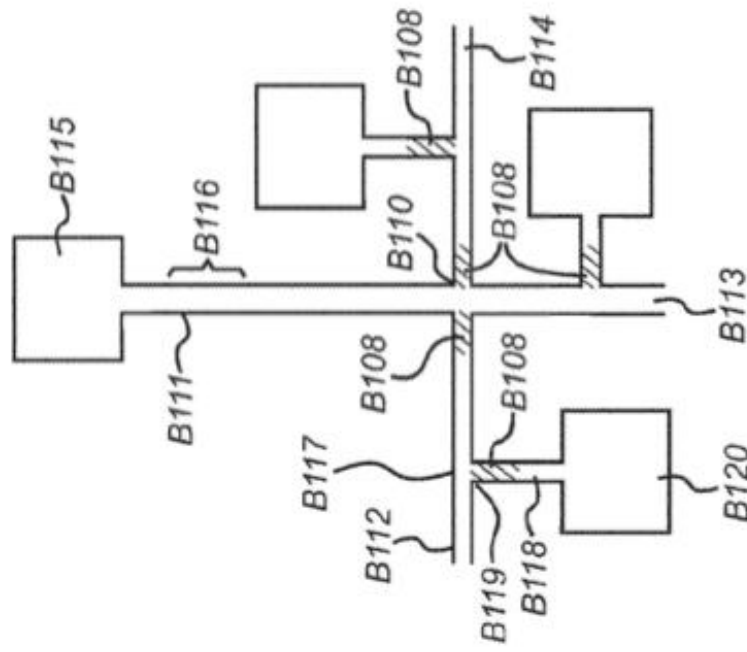
**FIG. 15a**



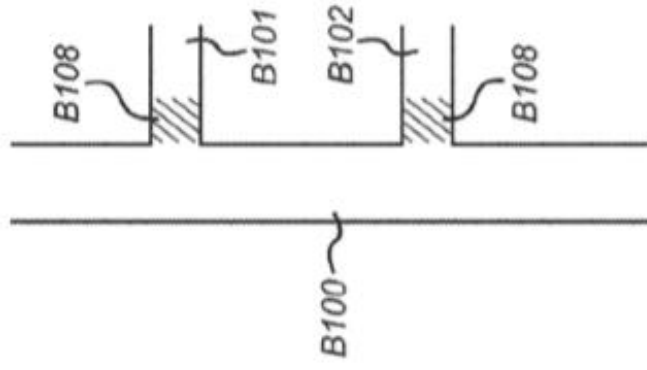
**FIG. 15b**

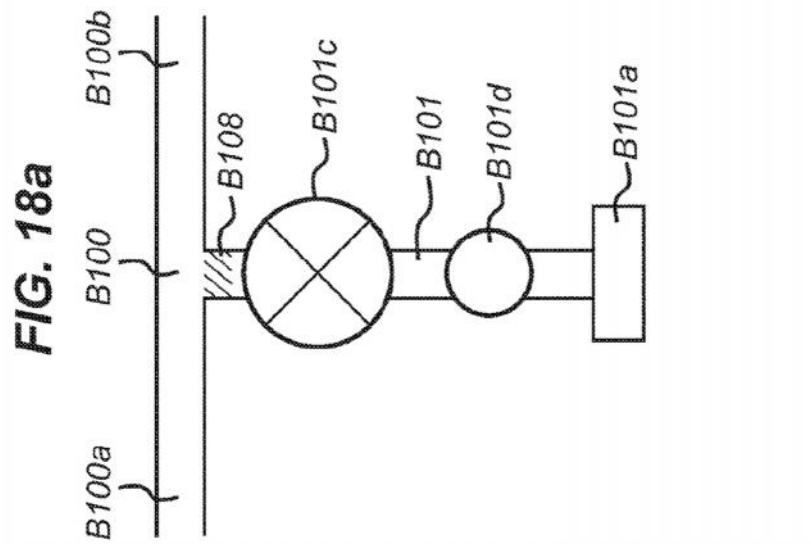
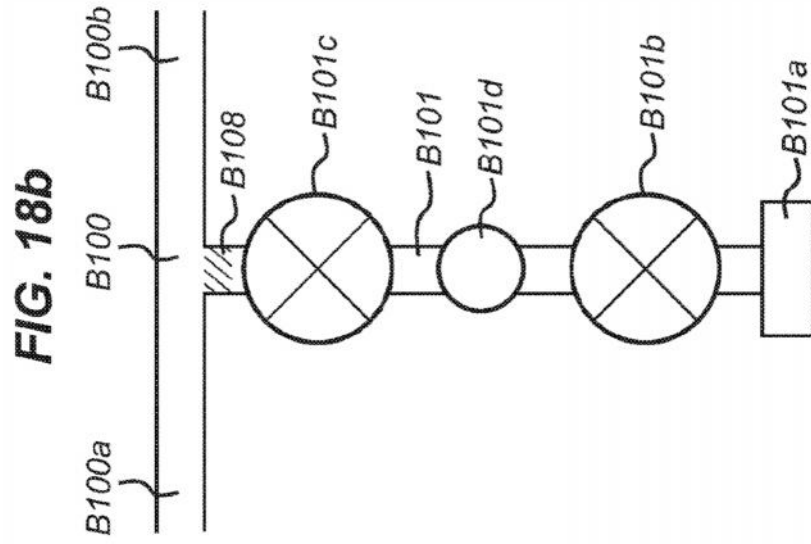


**FIG. 16** (Técnica anterior)

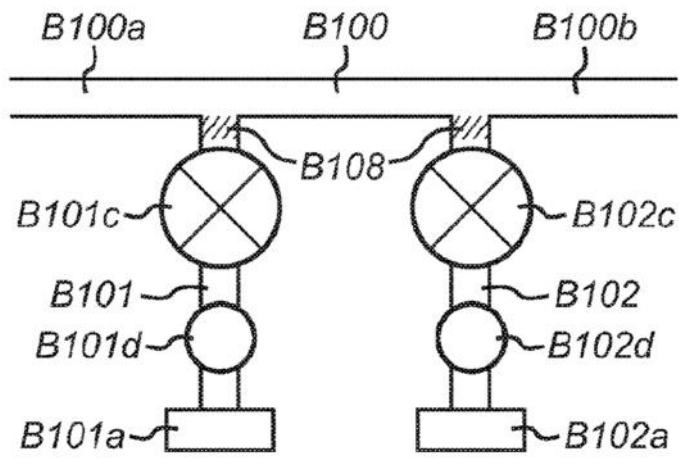


**FIG. 17**

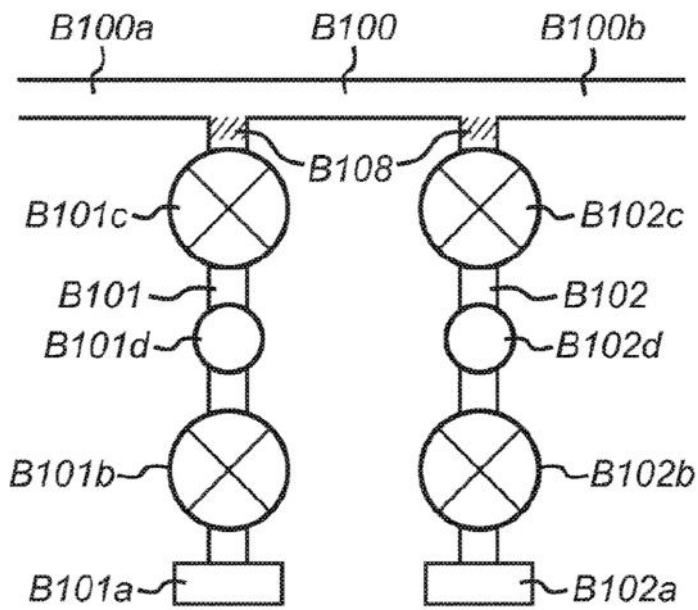




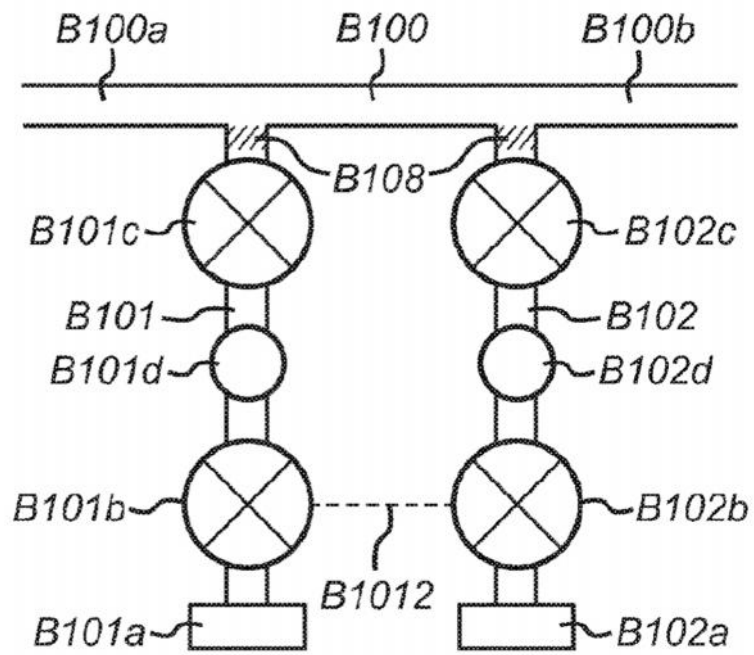
**FIG. 19a**



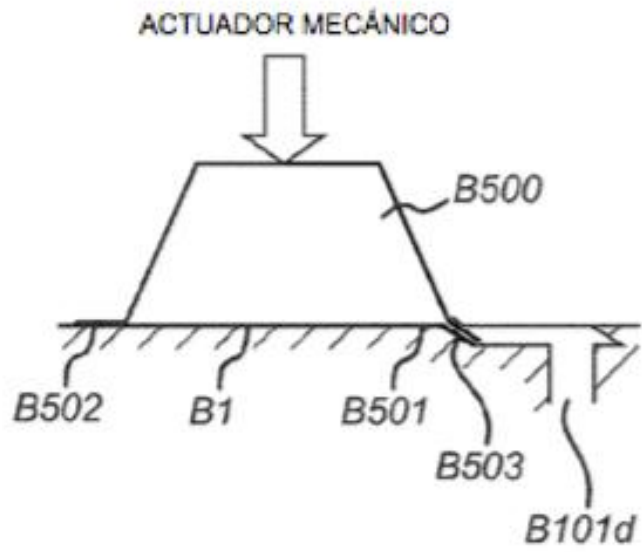
**FIG. 19b**



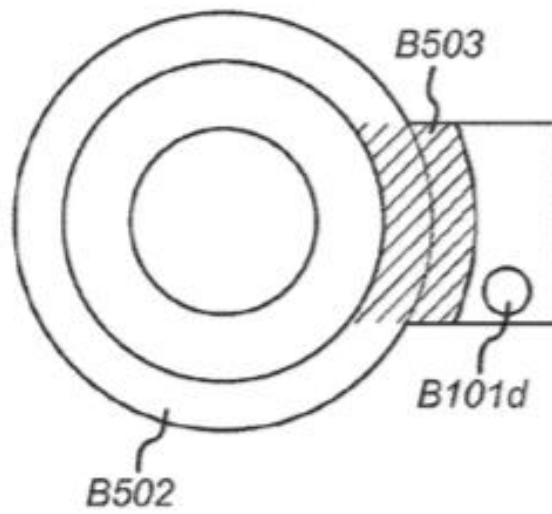
**FIG. 19c**



**FIG. 20a**

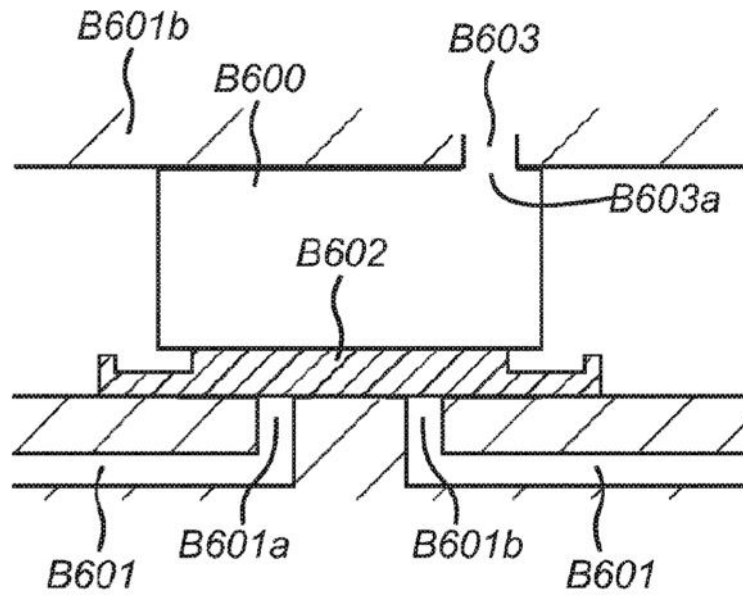


**FIG. 20b**





**FIG. 21a**



**FIG. 21b**

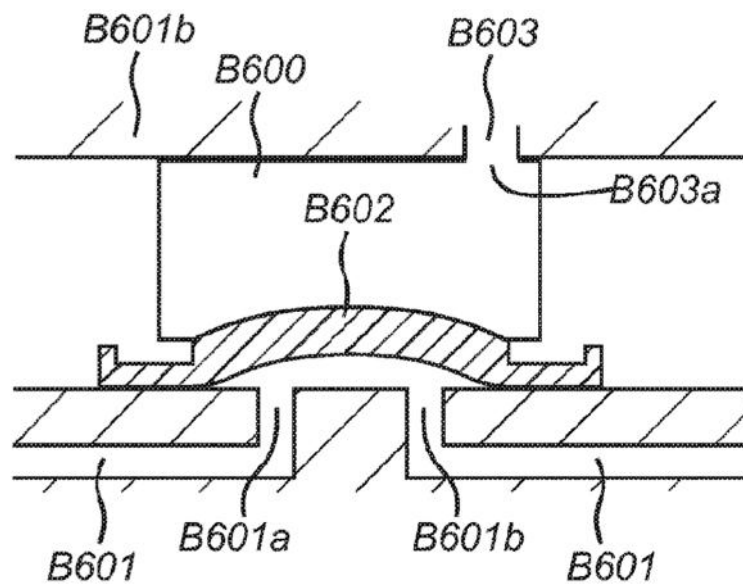


FIG. 22

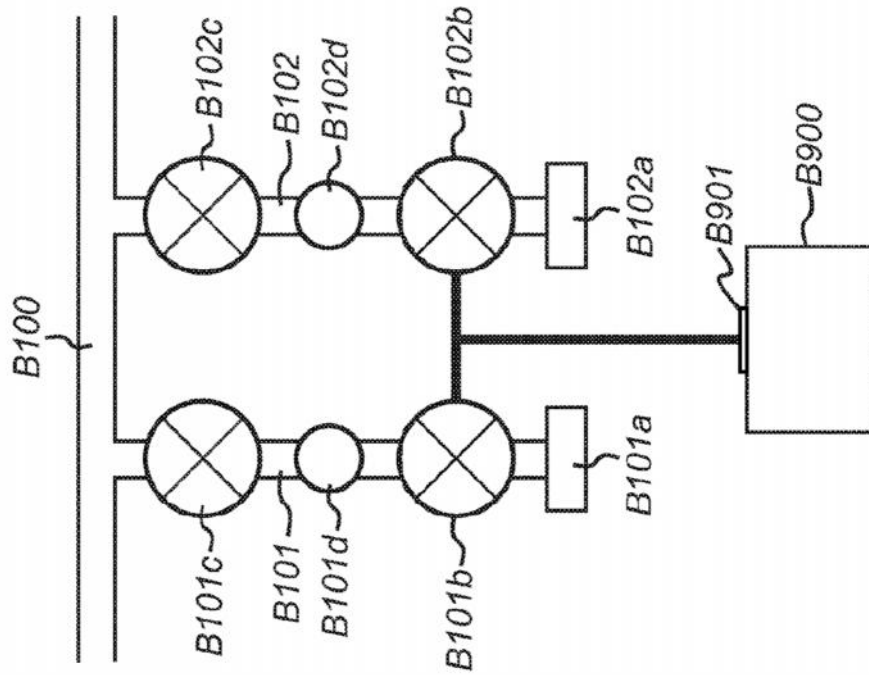
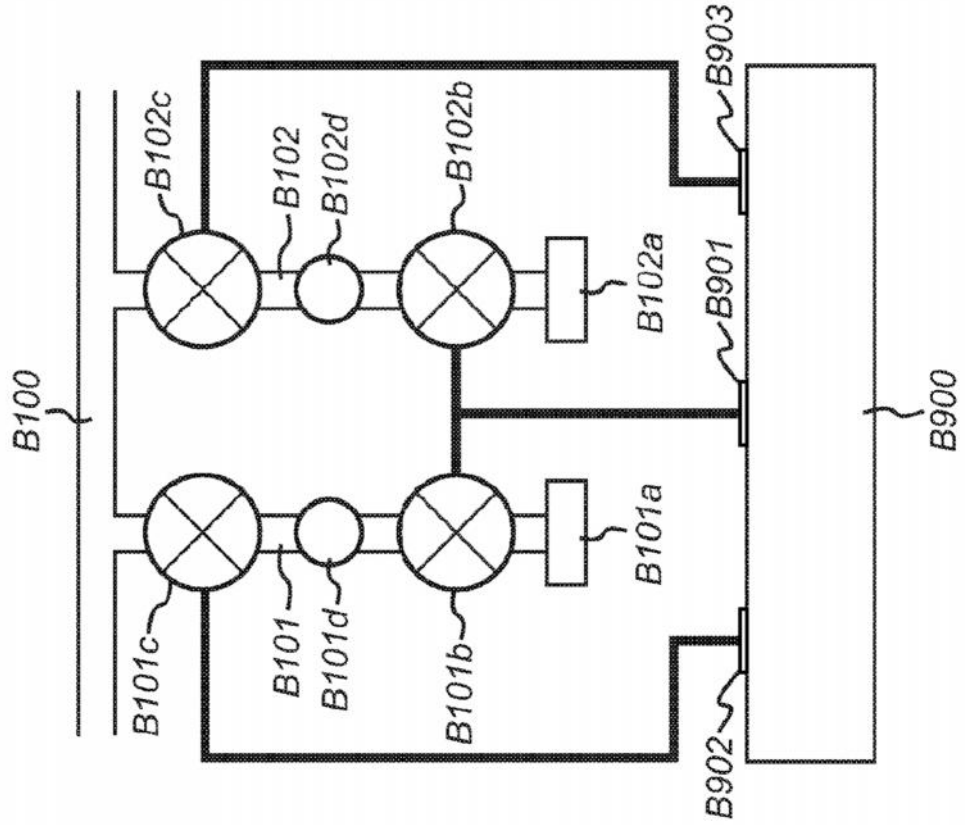
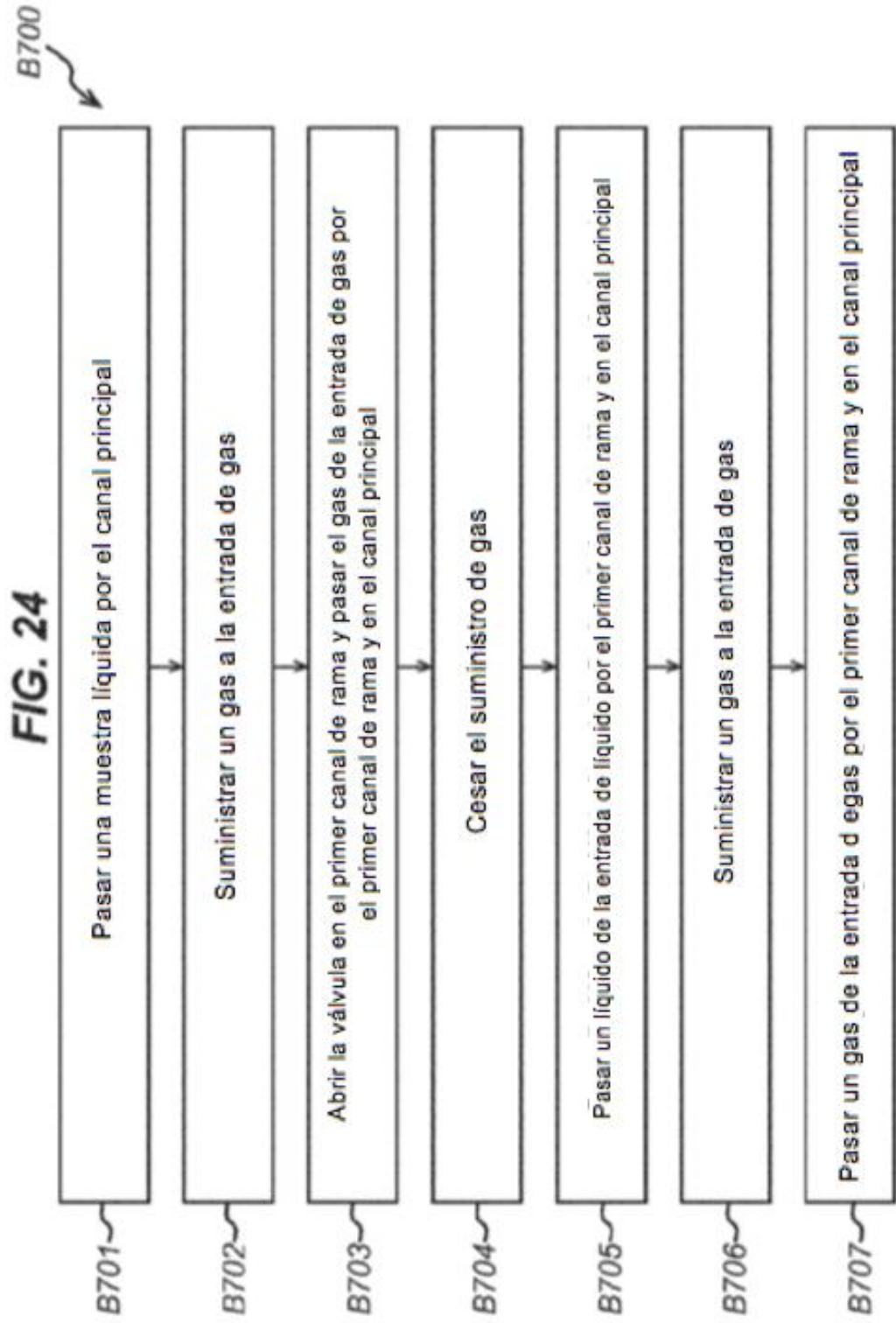
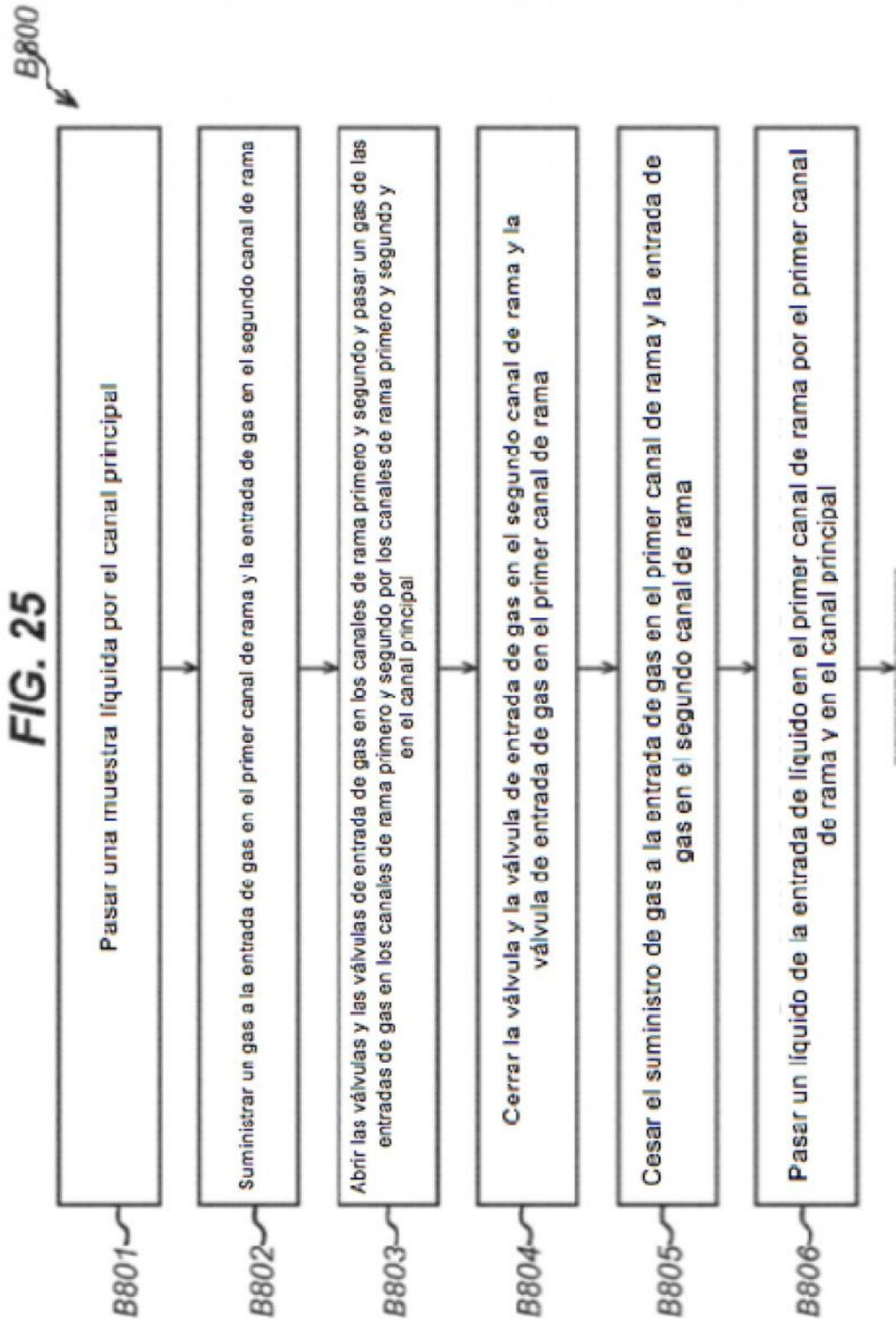


FIG. 23







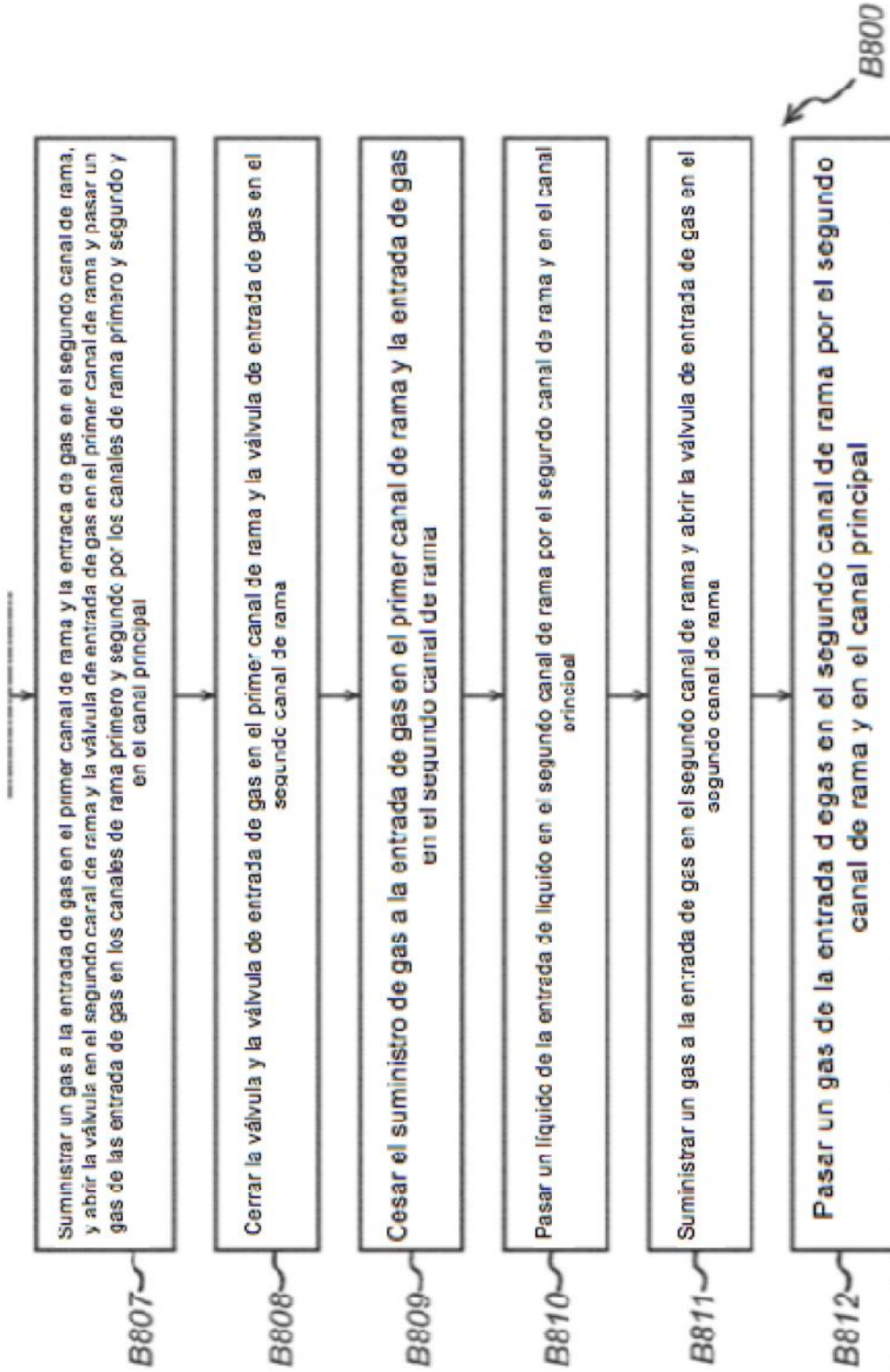


FIG. 25 (contd.)