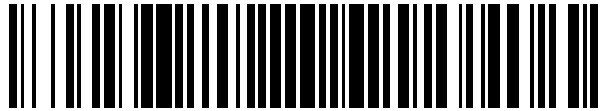


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 916**

51 Int. Cl.:

G01N 21/03	(2006.01)
G01N 21/64	(2006.01)
G01N 21/07	(2006.01)
G01N 35/04	(2006.01)
G01N 35/00	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)
B01F 15/02	(2006.01)
B01F 13/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2012 PCT/IB2012/051076**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120463**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2012 E 12754898 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2684022**

54 Título: **Dispositivo centrípeto fluídico**

30 Prioridad:

08.03.2011 US 201161450373 P

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

09.02.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITE LAVAL (50.0%)
2325 rue de l'Université
Québec, Québec G1V 0A6, CA y
GENEPOC INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PEYTAVI, RÉGIS y
CHAPDELAINE, SÉBASTIEN**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 653 916 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo centrípeto fluídico

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud provisional de EE.UU. Nº 61/450.373 presentada el 8 de marzo de 2011.

Campo técnico

La invención se refiere a dispositivos centrípetos fluídicos.

Antecedentes de la técnica

10 El diagnóstico molecular comprende la detección de compuestos moleculares útiles para identificar enfermedades, especies, individuos, etc. Estos compuestos moleculares pueden ser, por ejemplo, iones, azúcares, metabolitos, ácidos grasos, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas o lípidos. La prueba de ácido nucleico (NAT) comprende la identificación de ácidos nucleicos específicos de patógenos, o la identificación de secuencias de ácidos nucleicos específicas relacionadas con enfermedades tales como cáncer, enfermedades genéticas, firma genética de especies o individuos o marcadores para medicina personalizada. Los protocolos NAT a menudo comienzan con un paso de
15 preparación de muestra en el que las células se lisan para liberar sus ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos entonces se preparan específicamente con el fin de que estén listos para un procedimiento de amplificación objetivo tal como, por ejemplo, reacción en cadena de polimerasa (PCR) o Amplificación de Recombinasa Polimerasa (RPA) de amplificación isotérmica u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos. La amplificación objetivo produce amplímeros que se pueden analizar en tiempo real, lo que significa durante la amplificación, o al final de la
20 amplificación en un gel de agarosa o en una microagrupación, por ejemplo. También existen procedimientos de amplificación para amplificar una señal generada por la detección del analito y estos planteamientos de amplificación de señal también se pueden asociar con procedimientos de amplificación objetivo. Estas tecnologías requieren protocolos complejos llevados a cabo por personal altamente calificado en instalaciones dedicadas. Por estas razones, no todos los laboratorios, hospitales o centros de salud pueden realizar diagnósticos moleculares.

25 Hay una necesidad de automatizar los complejos protocolos de diagnóstico molecular. Algunos planteamientos se basan en unidades robóticas de alto rendimiento que generalmente son muy caras y pueden requerir mucho espacio. Hay una necesidad creciente de desarrollar instrumentos más compactos e instrumentaciones móviles tales como diagnósticos de Punto de Atención (POC) y de miniaturizar e integrar los pasos de un ensayo – desde la preparación de la muestra hasta la respuesta – en un único dispositivo desechable (por ejemplo, dispositivos de laboratorio en un chip o Microsistemas de Análisis Total: μ TAS).
30

Uno de los pasos difíciles principales de integrar en un sistema microfluídico desechable es la preparación de la muestra. La preparación de la muestra generalmente comienza con un paso de lisis celular que puede ser químico y/o mecánico. Entonces para eliminar o al menos controlar los inhibidores potenciales del proceso de prueba, se pueden purificar ácidos nucleicos. Las técnicas más comunes usadas para purificar ácidos nucleicos se basan en la
35 adsorción de fase sólida de los ácidos nucleicos sometido a condiciones específicas de pH y sal. Los inhibidores de la reacción enzimática tales como proteínas, metales y otras moléculas, se eliminan de los ácidos nucleicos adsorbidos en la fase sólida. Los ácidos nucleicos entonces se recuperan de la fase sólida usando una solución de elución adecuada. Todo el proceso requiere diferentes soluciones, que necesitan ser almacenadas y liberadas, una matriz de fase sólida y diferentes cámaras de reacción. Esto complica el proceso de integrar en un cartucho microfluídico desechable compacto.
40

En el desarrollo de dispositivos fluídicos, hay una necesidad de desplazar fluidos dentro y fuera de las diferentes áreas de procesamiento de una manera controlada. Se usan generalmente componentes de bombeo y de actuación con válvulas.

45 Algunos han desarrollado unidades fluídicas que permiten la automatización del diagnóstico molecular. Por ejemplo, existe un cartucho de preparación de muestra con una válvula rotativa y una bomba de pistón para mover los fluidos en los diferentes depósitos. También existe lisis mecánica usando ultrasonidos y partículas duras. Otros dispositivos usan un conjunto de plástico flexible para lisar las células y transferir los fluidos entre los sectores del recipiente comprimiendo el material flexible en una ubicación específica. Estas unidades fluídicas requieren varios actuadores para ser capaces de realizar las tareas.

50 El uso de plataformas centrípetas proporciona un formato simple y eficaz para la implementación de opciones de bombeo y actuación con válvulas. Cuando se gira, la presión del fluido inducida centrífugamente hace a un fluido fluir hacia dentro del dispositivo fluídico.

55 El bombeo centrípeto proporciona muchas ventajas sobre otros métodos de bombeo alternativos tales como una jeringa, un pistón, un bombeo peristáltico o uno electroosmótico. El bombeo centrípeto tiene menores requisitos de potencia eléctrica (la única actuación activa que es la necesaria para la rotación), es independiente del pH del fluido

o la fuerza iónica, y no necesita ninguna interconexión fluidica externa o tubos. Consecuentemente, se pueden combinar diferentes pasos de ensayo que requieren diferentes propiedades de muestra y de tampón (por ejemplo, energía superficial, pH) en un único dispositivo centrípeto fluidico.

5 Otra ventaja del bombeo centrípeto es que una válvula se puede implementar mediante el diseño geométrico de los microcanales fluidicos de tal forma que las fuerzas capilares equilibren la fuerza centrípeta debida a la rotación del disco. Diseñando estructuras microfluidicas con válvulas capilares de diferentes formas y en diferentes posiciones con respecto al centro de rotación del dispositivo centrípeto fluidico, el flujo de líquido se puede interrumpir y reanudar controlando la velocidad de rotación.

10 Dado que la mayoría de los procesos analíticos para material biológico requieren varios pasos, una actuación pasiva con válvulas puede ser difícil de implementar con robustez. Para más robustez, hay una necesidad de implementar válvulas activas en un dispositivo centrípeto. Por ejemplo, es posible bloquear un canal microfluidico usando un material de cambio de fase tal como un tapón de cera de parafina. Este tipo de válvula es independiente de la velocidad de rotación y puede ser accionada mediante calor. Por ejemplo, también se puede usar un tapón de partículas generadoras de calor y materiales de cambio de fase. Las partículas absorben las ondas
15 electromagnéticas de un dispositivo externo (por ejemplo, láser, lámpara de IR) y el material de cambio de fase se funde con el calor generado por las partículas. Las válvulas de material de cambio de fase se han descrito para bloquear un canal fluidico (Patente de EE.UU. N° 7.837.948) y se usan en un dispositivo de prueba de ácido nucleico centrípeto (Publicación EP 2375256).

20 Algunos planteamientos de válvula activa para dispositivos centrípetos se basan en la actuación de una onda electromagnética. Por ejemplo, un cierre de válvula en una ubicación deseada se puede abrir sin contacto a través de ablación con láser y sin perforar la capa externa del dispositivo microfluidico (véase, por ejemplo, la Publicación EP 1930635, la Publicación de Solicitud de Patente PCT N° WO2004/050242, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. US 2009/0189089, la Patente de EE.UU. N° 7.709.249, la Patente de EE.UU. N° 7.323.660).

25 La actuación de una válvula de material de cambio de fase se puede hacer usando electrodos que forman un calentador resistivo sobre el sustrato en sí mismo. Los electrodos generan calor en una región específica de interés en la red microfluidica para fundir el material de cambio de fase.

El documento US 6.063.589 se refiere a dispositivos y métodos para usar aceleración centrípeta para accionar movimiento de fluido en un sistema microfluidico.

30 El documento US 2011/0020194 A1 se refiere a un dispositivo microfluidico basado en la fuerza centrífuga para detección de proteínas y un sistema microfluidico que incluye el mismo.

Sigue existiendo la necesidad de un dispositivo centrípeto fluidico mejorado con control de flujo de muestra.

Compendio

35 El dispositivo centrípeto fluidico descrito en la presente memoria podría permitir combinar estructuras simplificadas y actuadores que aseguran la preparación de la muestra, la medición del volumen, el desplazamiento controlado de volúmenes en un mínimo de cámaras y canales al tiempo que permite el almacenamiento tanto de reactivos secos como húmedos requeridos para amplificación múltiple y detección de ácidos nucleicos

El dispositivo centrípeto fluidico descrito es muy adecuado para ser implementado en sistemas de punto de atención o de sobremesa para procesar simultáneamente múltiples muestras y producir resultados rápidos.

40 Según la invención, se proporciona un dispositivo centrípeto fluidico como se define en la reivindicación 1 adjunta. Según la invención, también se proporciona un aparato de prueba y un método de prueba que usa el dispositivo centrípeto fluidico.

En una realización, el instrumento proporciona un control de la temperatura del aire en múltiples zonas del dispositivo centrípeto fluidico.

45 En una realización, el instrumento proporciona un control de la temperatura en múltiples zonas en un dispositivo centrípeto colocando elementos térmicos en contacto con el dispositivo centrípeto fluidico giratorio.

En una realización, el aparato comprende además una tapa para el receptáculo de admisión de muestra para cerrar el acceso al receptáculo de admisión de muestra.

En una realización, la cámara que se puede llenar por la parte inferior tiene una forma oblonga y se extiende radialmente entre el lado interno y el lado externo.

50 La cámara que se puede llenar por la parte inferior incluye al menos un miembro desplazable que se desplaza dentro de la cámara que se puede llenar por la parte inferior en respuesta a un campo magnético fluctuante externo.

En una realización, el miembro desplazable que se desplaza en respuesta a un campo magnético fluctuante está compuesto de material paramagnético.

En una realización, el miembro desplazable que se desplaza en respuesta a un campo magnético fluctuante es un disco o una esfera.

5 En una realización, el miembro desplazable es ferromagnético.

En una realización, la cámara que se puede llenar por la parte inferior comprende además al menos un objeto que no reacciona en respuesta a un campo magnético fluctuante.

En una realización, el objeto es al menos uno de una cuenta, una cuenta de vidrio, una cuenta de circonio, una resina y una suspensión de cuenta y resina.

10 En una realización, el objeto se recubre con un material quelante adaptado para interactuar con los componentes de la muestra.

El objeto y el miembro desplazable son de mayor tamaño que el tamaño de la entrada de la cámara.

En una realización, la cámara que se puede llenar por la parte inferior es una cámara de homogeneización.

En una realización, la cámara que se puede llenar por la parte inferior es una cámara de lisis.

15 En una realización, la cámara que se puede llenar por la parte inferior es una cámara de clarificación.

En una realización, la cámara que se puede llenar por la parte inferior es una cámara de concentración objetivo.

El aparato comprende además una cámara de desbordamiento acoplada a una salida de excedente para la cámara que se puede llenar por la parte inferior, la salida de excedente que permite la salida de parte de la muestra de fluido desde la cámara que se puede llenar por la parte inferior a la cámara de desbordamiento.

20 La salida de excedente se proporciona cerca del lado interno de la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

La salida de excedente se proporciona en un lado longitudinal de la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

En una realización, el aparato comprende además una salida de descarga para la cámara que se puede llenar por la parte inferior, la salida de descarga que permite la salida de la muestra desde la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

25 En una realización, la salida de descarga está situada en un lado longitudinal de la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

El objeto y el miembro desplazable son de mayor tamaño que un tamaño de la salida de descarga.

En una realización, la salida de excedente está situada más cerca del lado interno que la salida de descarga.

30 En una realización, el aparato comprende además una cámara de retención, la cámara de retención que está acoplada a la salida de descarga en un lado interno de la cámara de retención, la cámara de retención que está situada más cerca del lado externo de la capa de componente fluido que la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

35 En una realización, la cámara de retención está acoplada a la salida de descarga a través de un canal de transferencia, el canal de transferencia para hacer circular al menos una parte de la muestra de fluido desde la cámara que se puede llenar por la parte inferior hasta la cámara de retención.

En una realización, el aparato además comprende un recipiente totalmente proporcionado en la cámara de retención y que contiene un reactivo líquido, el recipiente que está adaptado para mantener el reactivo líquido en el recipiente y liberar el reactivo líquido en la cámara de retención tras la aplicación de una fuerza externa a la cámara de retención.

40 En una realización, el aparato comprende además un canal de entrada para hacer circular la muestra de fluido desde la salida de muestra a una entrada de cámara de retención de la cámara de retención.

En una realización, la cámara de retención tiene un receptáculo para recibir la muestra de fluido.

En una realización, el receptáculo está situado en el lado externo de la cámara de retención.

45 En una realización, un volumen de capacidad del receptáculo es al menos igual a un volumen de capacidad de la muestra transferida a la cámara de retención.

- En una realización, el receptáculo incluye un reactivo seco.
- En una realización, el reactivo seco es un reactivo de control de inhibidor.
- En una realización, la cámara de retención es una cámara de dilución.
- En una realización, el receptáculo de la cámara de retención se vacía tras la liberación del diluyente.
- 5 En una realización, el recipiente está hecho de uno de vidrio, vidrio capilar, termoplástico polimérico y/o material sensible al calor.
- En una realización, el reactivo líquido es un agente de dilución.
- En una realización, el reactivo líquido es uno de agua, tampón, ion, polímero, proteína, azúcar, ácido nucleico, y/o una parte con capacidad A-dry de una solución.
- 10 En una realización, el recipiente tiene una tapa hecha de un material sensible al calor adaptado para fundirse a una temperatura de fusión, permitiendo que el reactivo líquido se desplace desde dentro del recipiente hasta el exterior del recipiente en la cámara de retención.
- En una realización, el recipiente está hecho de material sensible al calor.
- 15 En una realización, la fuerza externa es una fuerza mecánica, eléctrica, electromagnética, térmica, de choque y acústica.
- En una realización, el recipiente tiene una abertura liberable.
- En una realización, la cámara de retención tiene una salida de distribución para la cámara de retención, la salida de distribución que está situada en un lado externo de la cámara de retención, la salida de distribución que está acoplada a un canal de distribución transversal en un lado interno del canal de distribución transversal en un primer extremo transversal del canal de distribución, el canal de distribución transversal que tiene una serie de al menos una cubeta proporcionada en un lado externo del canal de distribución transversal.
- 20 En una realización, la salida de distribución está acoplada al canal de distribución a través de un canal de transferencia.
- En una realización, las cubetas incluyen un reactivo seco.
- 25 En una realización, el reactivo seco es para amplificación, y puede incluir una encima.
- En una realización, las cubetas incluyen un conjunto de iniciadores.
- En una realización, el reactivo seco en la cubeta está cubierto por una película de material sensible al calor o de cambio de fase que tiene una densidad menor que el agua.
- En una realización, el material sensible al calor es una cera.
- 30 En una realización, la cubeta está adaptada para ser consultada ópticamente para al menos un parámetro.
- En una realización, la cubeta tiene un cuerpo de cubeta con al menos una ventana ópticamente transparente en el cuerpo de cubeta, las ventanas ópticamente transparentes que están alineadas con una trayectoria de luz de una fuente de luz adaptada para proyectar luz de una longitud de onda predeterminada a lo largo de la trayectoria de luz.
- En una realización, el parámetro es uno de fluorescencia, absorbencia y colorimetría.
- 35 En una realización, el parámetro es fluorescencia y en donde la cubeta incluye una de una solución fluorescente en la cubeta, partículas cubiertas con fluoróforo en una solución en la cubeta, partículas de fluoróforo en una pared interna de la cubeta.
- En una realización, la cubeta es una cámara de detección.
- En una realización, la cubeta es una cámara de amplificación.
- 40 En una realización, la cubeta es una cámara de amplificación de ácido nucleico.
- En una realización, el canal de distribución transversal incluye una cámara de residuos en un segundo extremo transversal del canal de distribución.
- En una realización, la cámara de residuos incluye un sello activado por calor adaptado para sellar la entrada de la cubeta acoplada al canal de distribución.

ES 2 653 916 T3

En una realización, el sello activado por calor es una cera.

En una realización, al menos una de la entrada de la cámara, la salida de excedente, la salida de descarga, la salida de distribución que incluye una válvula antirreflujo.

5 En una realización, al menos una de la entrada de cámara, la salida de excedente, la salida de descarga, la salida de distribución que incluye una válvula de purga, la válvula de purga que se abre a una fuerza centrípeta predeterminada aplicada sobre el aparato.

En una realización, la válvula antirreflujo y la válvula de purga se proporcionan en una única válvula de purga antirreflujo.

En una realización, la capa de componente fluido está hecha de un material plástico.

10 En una realización, el material plástico es uno de material de policarbonato, polipropileno, PDMS, COC, SU-8.

En una realización, la capa de componente fluido está sellada en el lado posterior sustancialmente plano con una lámina de material plástico.

En una realización, la lámina de material plástico es una de material de policarbonato, polipropileno, PDMS, COC, SU-8.

15 En una realización, la capa de componente fluido está sellada con la lámina de material plástico a través de métodos de unión tales como adhesivo, material adhesivo sensible a la presión, transferencia de calor, unión con disolvente, adhesivo curable por UV, unión por ultrasonidos, soldadura láser, unión por RF.

20 En una realización, la característica de purga de las válvulas de purga es una combinación de su distancia desde el centro de rotación, el material plástico que constituye la placa de soporte, el material que constituye el sellado y la geometría de la válvula en sí misma moldeada en el material plástico

En una realización, el canal de distribución, las cubetas y la cámara de residuos se proporcionan en una parte de la placa del miembro de soporte que se extiende más allá del borde externo del soporte giratorio.

En una realización, la capa de componente fluido es rectangular.

En una realización, el soporte es un disco.

25 En una realización, la forma de la capa de componente fluido es una sección cónica de un anillo.

En una realización, la sección cónica de un anillo es una fracción de un anillo.

En una realización, la sección cónica de un anillo es un octavo de un anillo.

30 En una realización, el aparato comprende además salidas de ventilación para al menos uno de la cámara de desbordamiento, la cámara de retención y el canal de distribución, las salidas de ventilación que están conectadas a un canal de autoventilación.

En una realización, el canal de autoventilación está acoplado al receptáculo de admisión de muestra en un lado interno del receptáculo de admisión de muestra.

En una realización, la capa de componente fluido está adaptada para ser calentada al menos parcialmente.

En una realización, la capa de componente fluido está adaptada para ser controlada por temperatura.

35 En una realización, la capa de componente fluido está adaptada para ser dividida en al menos dos secciones distintas controlables por temperatura.

En una realización, una primera de las dos secciones distintas controlables por temperatura incluye la cámara que se puede llenar por la parte inferior y la cámara de retención.

40 En una realización, una primera de las dos secciones distintas controlables por temperatura incluye al menos la cámara de retención.

En una realización, la primera sección incluye el receptáculo de admisión de muestra, el canal de entrada, la cámara de desbordamiento y el canal de medición.

En una realización, una segunda de las dos secciones distintas controlables por temperatura incluye al menos el canal de distribución y las cubetas.

- En una realización, la segunda de las dos secciones incluye la cámara de desbordamiento y una parte del canal de transferencia.
- 5 En una realización, la muestra de fluido es al menos una de sangre, aspiración faríngea nasal, fluido oral, líquido de torunda oral resuspendida, líquido de torunda nasal resuspendida, líquido resuspendido de torunda anal, líquido resuspendido de torunda vaginal, saliva, orina (pura o diluida).
- En una realización, el soporte es un conjunto de rotor que comprende una parte inferior de un rotor que recibe el dispositivo centrífugo fluido y un anillo de retención para fijar el dispositivo centrífugo fluido.
- 10 En una realización, el aparato de prueba comprende además un recinto para el aparato de prueba que tiene una base, paredes y una tapa articulada, el recinto que encierra el conjunto de rotor, el soporte, el motor, el subsistema de acondicionamiento de temperatura y el subsistema de excitación
- En una realización, el aparato de prueba comprende además imanes permanentes proporcionados debajo del rotor.
- En una realización, el subsistema de acondicionamiento de temperatura controla una temperatura de dos zonas del dispositivo centrífugo fluido.
- 15 En una realización, el aparato de prueba comprende además compartimentos creados por al menos uno del recinto, la pared de separación del recinto, el conjunto del rotor, la pared de aislamiento del rotor, el soporte, el aislamiento de la tapa y la pared de aislamiento de la tapa.
- En una realización, el aparato de prueba comprende además materiales de aislamiento que se pueden usar para controlar la transferencia de calor entre compartimentos.
- 20 En una realización, el subsistema de acondicionamiento de temperatura comprende un elemento térmico situado uno de por encima y por debajo de una zona de calentamiento.
- En una realización, el elemento térmico es una bobina de calentamiento resistiva.
- En una realización, el aparato de prueba comprende además un termopar dentro de cada zona de calentamiento para medir la temperatura individual de cada zona.
- 25 En una realización, el aparato de prueba comprende además un soplador que fuerza que aire a temperatura ambiente entre en la zona de calentamiento.
- En una realización, el aparato de prueba comprende además una compuerta de salida para expulsar aire caliente fuera de la zona de calentamiento.
- En una realización, el subsistema de excitación incluye una fuente de luz, y elementos ópticos para conformar un haz de excitación.
- 30 En una realización, el subsistema de excitación incluye un módulo de detección para recoger la luz emitida por especies de interés dentro del dispositivo centrífugo fluido.
- En una realización, la rotación incluye además evacuar parte de la muestra a la cámara de desbordamiento.
- En una realización, el método de prueba comprende además hacer girar el conjunto de rotor a una segunda velocidad para activar el movimiento del miembro de desplazamiento dentro de la cámara que se puede llenar por la parte inferior.
- 35 En una realización, el método de prueba comprende además hacer girar el conjunto de rotor a una tercera velocidad para clarificar la muestra y reventar la salida de medición, en donde un volumen medido de la muestra se transfiere a la cámara de retención.
- En una realización, el volumen medido se transfiere al receptáculo de la cámara de retención.
- 40 En una realización, el método de prueba comprende además hacer girar el conjunto de rotor a una cuarta velocidad.
- En una realización, el método de prueba comprende además calentar la cámara de retención, liberando por ello el reactivo líquido del recipiente.
- En una realización, el método de prueba comprende además hacer girar el conjunto de rotor a una quinta velocidad para reventar la salida de la cámara de retención.
- 45 En una realización, el método de prueba comprende además mantener las cubetas a una temperatura por debajo de 65°C.

En una realización ejemplo, el método de prueba comprende además mantener las cubetas a una temperatura por debajo de 35°C.

En una realización, el método de prueba comprende además calentar las cubetas a una primera temperatura.

En una realización, el método de prueba comprende además calentar las cubetas a una segunda temperatura.

- 5 En una realización, el método de prueba comprende además alternar la temperatura de las cubetas entre una temperatura de prueba alta, una baja y una media.

En una realización, el método de prueba comprende además tomar una medición de fluorescencia al menos una longitud de onda de excitación al final de cada ciclo de temperatura.

En una realización, el método de prueba comprende además registrar mediciones de fluorescencia.

- 10 En una realización, el método comprende hacer girar el conjunto de rotor a una quinta velocidad para reventar la salida de la cámara de retención.

En una realización, la muestra se transfiere al receptáculo de la cámara de retención.

- 15 Según la invención, la característica fluidica es una cámara que se puede llenar por la parte inferior acoplada a un canal de entrada para recibir el fluido, la entrada de la cámara que se proporciona en un lado externo de la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

- 20 En otro ejemplo, la característica fluidica puede ser una cámara de retención acoplada a un canal de entrada para recibir el fluido, un recipiente totalmente proporcionado en la cámara de retención y que contiene un diluyente líquido, el recipiente que mantiene el diluyente líquido en el recipiente hasta que lo libere en el cámara de retención tras la aplicación de una fuerza externa al recipiente, restaurando por ello la conexión fluidica entre el diluyente líquido y el fluido en la cámara de retención.

Adicionalmente, la cámara de retención puede tener un receptáculo de desacoplamiento de flujo para recibir el fluido, situado en el lado externo de la cámara de retención e interrumpir una conexión fluidica entre la entrada y la salida de la cámara de retención.

- 25 En una realización, el aparato centrípeto fluidico comprende además un receptáculo de admisión para recibir el fluido, el receptáculo de admisión que se extiende hacia fuera de la capa de componente fluidico en una cara frontal de la capa de componente fluidico y que está situada cerca del lado interno, el receptáculo de admisión que termina en una salida del receptáculo de admisión, el canal de entrada que está acoplado a la salida del receptáculo de admisión en un extremo opuesto a la entrada de la cámara.

- 30 La cámara que se puede llenar por la parte inferior incluye al menos un miembro desplazable que se desplaza dentro de la cámara que se puede llenar por la parte inferior en respuesta a un campo magnético fluctuante externo.

En una realización, la cámara que se puede llenar por la parte inferior comprende al menos un objeto que no responde a un campo magnético fluctuante y en donde el objeto es al menos uno de una cuenta, una zeolita, una partícula, una partícula de filtración, una cuenta de vidrio, una cuenta de zirconio, una resina, una suspensión de cuenta y resina.

- 35 En una realización, al menos uno del objeto y el miembro desplazable está recubierto con al menos uno de un material quelante y un material ligante adaptado para interactuar con componentes del fluido.

- 40 El aparato centrípeto fluidico comprende una cámara de desbordamiento acoplada a una salida de excedente para la cámara que se puede llenar por la parte inferior, la salida de excedente que permite la salida de parte del fluido desde la cámara que se puede llenar por la parte inferior a la cámara de desbordamiento, en donde la salida de excedente se proporciona cerca del lado interno de la cámara que se puede llenar por la parte inferior en un lado longitudinal de la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

- 45 En una realización, el aparato centrípeto fluidico comprende además una salida de descarga para la cámara que se puede llenar por parte inferior, la salida de descarga que permite la salida del fluido de la cámara que se puede llenar por parte inferior, en donde la salida de descarga está situada en el lado longitudinal de la cámara que se puede llenar por la parte inferior, la salida de descarga que está situada más cerca del lado externo de la cámara que se puede llenar por la parte inferior que la salida de excedente, un volumen de medición de la cámara que se puede llenar por la parte inferior que está definido entre la salida de descarga y la salida de excedente.

- 50 En una realización, el aparato centrípeto fluidico comprende además una salida de descarga para la cámara que se puede llenar por la parte inferior, la salida de descarga que permite la salida del fluido de la cámara que se puede llenar por la parte inferior, en donde la salida de descarga está situada en un lado longitudinal de la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

En una realización, el aparato centrípeto fluídico comprende además una válvula de purga en la salida de descarga, la válvula de purga que se abre a una fuerza centrípeta predeterminada aplicada sobre el aparato, la válvula de purga que evita que el fluido salga de la cámara que se puede llenar por la parte inferior hasta la abertura.

5 En una realización, el aparato centrípeto fluídico comprende además una cámara de retención, la cámara de retención que está acoplada a la salida de descarga en un lado interno de la cámara de retención, la cámara de retención que está situada más cerca del lado externo de la capa de componente fluídico que la cámara que se puede llenar por la parte inferior, en donde la cámara de retención está acoplada a la salida de descarga a través de un canal de medición, el canal de medición para hacer circular al menos una parte del fluido desde la cámara que se puede llenar por la parte inferior hasta la cámara de retención.

10 En una realización, el aparato centrípeto fluídico comprende además un recipiente totalmente proporcionado en la cámara de retención y que contiene un diluyente líquido, el recipiente que está adaptado para mantener el diluyente líquido en el recipiente y liberar el diluyente líquido en la cámara de retención tras la aplicación de una fuerza externa al recipiente, en donde la fuerza externa es una de una fuerza mecánica, eléctrica, electromagnética, térmica, de choque y acústica, restaurando por ello la conexión fluídica entre el diluyente líquido y el fluido en la
15 cámara de retención.

En una realización, la cámara de retención tiene un receptáculo de desacoplamiento de flujo para recibir el fluido, en donde el receptáculo de desacoplamiento de flujo está situado en el lado externo de la cámara de retención, el receptáculo de desacoplamiento de flujo que interrumpe una conexión fluídica entre la salida del receptáculo de admisión y una salida de distribución de la cámara de retención.

20 En una realización, el receptáculo de desacoplamiento de flujo incluye un reactivo seco.

En una realización, la cámara de retención tiene una salida de distribución para la cámara de retención, la salida de distribución que está situada en un lado externo de la cámara de retención, la salida de distribución que está acoplada a un canal de distribución transversal en un lado interno del canal de distribución transversal en un primer extremo transversal del canal de distribución, el canal de distribución transversal que tiene una serie de al menos una cubeta proporcionada en un lado externo del canal de distribución transversal.
25

En una realización, al menos una de las cubetas incluye al menos uno de un reactivo seco y un material de cambio de fase.

En una realización, la cubeta está adaptada para ser consultada ópticamente para al menos un parámetro; el parámetro es uno de fluorescencia, absorbencia y colorimetría.

30 En una realización, el canal de distribución transversal incluye una cámara de residuos en un segundo extremo transversal del canal de distribución.

En una realización, la cámara de residuos incluye un material de cambio de fase.

En una realización, el canal de distribución, las cubetas y la cámara de residuos se proporcionan en una parte del componente de capa fluídica que se extiende más allá del borde externo del soporte giratorio.

35 En una realización, la capa de componente fluídico está adaptada para ser dividida en al menos dos secciones distintas controlables por temperatura, donde una primera de las dos secciones distintas controlables por temperatura incluye al menos la cámara de retención y una segunda de las dos secciones distintas controlables por temperatura incluye al menos el canal de distribución y las cubetas.

40 En una realización, el subsistema de acondicionamiento de temperatura controla una temperatura de al menos dos zonas del dispositivo centrípeto fluídico.

Definiciones

En esta especificación, el término "dispositivo centrípeto fluídico" se pretende que signifique una red fluídica con fluido motivado por la acción de la rotación.

45 En esta especificación, el término "Macro" en las expresiones "Macroestructura" y "Macrogeometría" se pretende que signifique una característica de dispositivo centrípeto fluídico de más de 1 mm. En particular, las dimensiones de una "Macroestructura" son, por ejemplo, de alrededor de 1 mm a alrededor de 10 mm.

En esta especificación, el término "Micro" en las expresiones "Microestructura" y "Microgeometría" se pretende que signifique una característica de dispositivo centrípeto fluídico de menos de 1 mm. En particular, las dimensiones de una "Microestructura" son de alrededor de 1 μ m a alrededor de 1 mm.

50 En esta especificación, el término "Muestra" se pretende que signifique cualquier suspensión de fluido, solución o mezcla a ser analizada. En particular, "muestra" puede ser una muestra "biológica" o "muestra biológica en bruto" y se pretende que signifique cualquier especie biológica de interés de sangre, componente sanguíneo, fluido corporal

nasal y/o faríngeo y/u oral, líquido de torunda nasal y/o oral y/o faríngeo resuspendido, líquido resuspendido de torunda anal/vaginal, saliva, exudado de herida, heces y orina.

En esta especificación, el término "Diluyente" se pretende que signifique una cantidad determinada de fluido que puede servir para diluir una muestra.

- 5 En esta especificación, el término "Receptáculo" se pretende que signifique una característica del dispositivo centrífugo fluido diseñado para recibir una cierta cantidad de fluido.

En esta especificación, el término "Canal" se pretende que signifique una trayectoria de microestructura o de macroestructura de un dispositivo centrífugo fluido que permita al fluido fluir entre las cámaras, receptáculos y receptáculos de muestras del dispositivo centrífugo fluido.

- 10 En esta especificación, el término "Entrada" se pretende que signifique una abertura a una cámara del dispositivo centrífugo fluido que permita al fluido entrar.

En esta especificación, el término "Salida" se pretende que signifique una abertura a una cámara del dispositivo centrífugo fluido que permita al fluido salir.

- 15 En esta especificación, el término "válvula de purga" o "válvula fluidica" se usa de manera intercambiable y se pretende que signifique una microestructura en un dispositivo centrífugo fluido que tiene la función principal de ayudar a evitar que el líquido fluya por debajo de una cierta cantidad de presión aplicada sobre el líquido, típicamente por la fuerza centrífuga creada por la rotación del dispositivo centrífugo fluido. El fluido fluye a través de la "válvula de purga" cuando la presión supera la fuerza producida por la tensión superficial del líquido.

Breve descripción de los dibujos

- 20 Habiendo descrito de esta manera en general la naturaleza de la invención, se hará referencia a los dibujos anexos, que muestran a modo de ilustración realizaciones ejemplo de la misma y en los que:

La FIG. 1A es una vista en perspectiva de un conjunto de rotor que contiene un dispositivo centrífugo fluido; la FIG. 1B representa una vista oblicua de despiece de un dispositivo centrífugo fluido en la parte inferior de un rotor; la FIG. 1C representa una vista oblicua de un dispositivo centrífugo fluido; la FIG. 1D es una vista en sección de un dispositivo centrífugo fluido;

- 25 la FIG. 2A ilustra un respiradero fluido conectado al receptáculo de admisión; la FIG. 2B ilustra una tapa para el receptáculo de admisión descrito en la FIG. 2A;

la FIG. 3A ilustra la construcción fluidica de una cámara de llenado por la parte inferior; la FIG. 3B ilustra una construcción alternativa de la cámara de llenado por la parte inferior con una conexión de puerto;

- 30 la FIG. 4A ilustra una construcción alternativa de la cámara de llenado por la parte inferior que incluye un miembro desplazable; la FIG. 4B ilustra una construcción alternativa de la cámara de llenado por la parte inferior que incluye un miembro desplazable y reactivos secos;

la FIG. 5 ilustra una construcción alternativa de la cámara de llenado por la parte inferior que incluye una cámara de desbordamiento;

- 35 la FIG. 6 ilustra una construcción alternativa de la cámara de llenado por la parte inferior que incluye una salida de medición;

la FIG. 7A ilustra una construcción alternativa de la cámara de llenado por la parte inferior que incluye un miembro desplazable, reactivos secos, cámara de desbordamiento y una salida de medición; la FIG. 7B ilustra una construcción alternativa de la cámara de llenado por la parte inferior que incluye un miembro desplazable, reactivos secos, filtro, cámara de desbordamiento y una salida de medición; la FIG. 7C ilustra la construcción alternativa de la FIG. 7B después de la disociación del filtro por un miembro desplazable;

- 40 la FIG. 8A ilustra el llenado de la cámara de llenado por la parte inferior mostrada en la FIG. 7A; la FIG. 8B ilustra el desplazamiento del desbordamiento de líquido hacia el elemento 309; la FIG. 8C ilustra el paso de definición del volumen; la FIG. 8D ilustra el desplazamiento del elemento desplazable; la FIG. 8E ilustra la granulación en la parte inferior de la cámara de llenado por la parte inferior de los elementos 308 y 307; la FIG. 8F ilustra el desplazamiento del volumen medido desde la cámara inferior a la cámara 313;

- 45 la FIG. 9A ilustra una vista en sección de la geometría de entrada y salida para ayudar a evitar que el objeto desplazable y/o las cuentas situadas en el material de fase sólida salgan de la cámara de llenado por la parte inferior; la FIG. 9B ilustra una vista superior de la geometría de entrada y salida para ayudar a evitar que el objeto desplazable y/o las cuentas situadas en el material de fase sólida salgan de la cámara de llenado por la parte inferior;

la FIG. 10A ilustra una estructura fluidica para mezclar o diluir una muestra; la FIG. 10B ilustra un fluido contenido en un receptaculo de cámara de retención; la FIG. 10C ilustra reactivos secos en el receptaculo de una cámara de retención; la FIG. 10D ilustra un recipiente de líquido dentro de una cámara de retención;

5 la FIG. 11A ilustra un recipiente de líquido en un receptaculo de cámara de retención antes del calentamiento; la FIG. 11B ilustra el fluido contenido en un receptaculo de cámara de retención durante el comienzo del proceso de calentamiento; la FIG. 11C ilustra la liberación del líquido desde el recipiente de fluido dentro de la cámara de retención; la FIG. 11D ilustra la mezcla del lisado con el fluido liberado desde el recipiente de líquido; la FIG. 11E ilustra el desplazamiento del lisado diluido desde la cámara de retención hacia la cámara 513;

la FIG. 12 ilustra una construcción alternativa del recipiente de líquido;

10 la FIG. 13 representa una construcción fluidica que incluye una cámara de llenado por la parte inferior con cámara de desbordamiento y una salida de medición conectada de manera fluida a una cámara de retención;

la FIG. 14A representa una construcción fluidica de cubetas de detección de un dispositivo centrípeto fluidico; la FIG. 14B ilustra una construcción alternativa de la cubeta de detección con reactivos secos almacenados previamente; la FIG. 14C ilustra una construcción alternativa de la cubeta de detección con reactivos secos almacenados previamente en las cubetas y cera de cubeta almacenada previamente en las cubetas en sí mismas; la FIG. 14D ilustra una construcción alternativa de la cubeta de detección con reactivos secos almacenados previamente en las cubetas y cera de cubeta almacenada previamente en una cámara de residuos;

15

la FIG. 15 ilustra la construcción fluidica descrita en la FIG. 14D cuando las cubetas se calientan y se llenan con una muestra;

20 la FIG. 16 representa una construcción fluidica que incluye una cámara de retención y cubetas de detección;

la FIG. 17 representa una construcción fluidica para la preparación y detección de muestra;

la FIG. 18 representa una vista en perspectiva de un instrumento que se puede usar para llevar a cabo una serie de dispositivos centrípetos fluidicos simultáneos;

la FIG. 19 representa una vista oblicua de la arquitectura interior del instrumento ilustrado en la FIG. 18;

25 la FIG. 20 muestra un diagrama de varios módulos de un instrumento;

la FIG. 21 ilustra regiones de control de temperatura de múltiples zonas en un dispositivo centrípeto fluidico;

la FIG. 22 ilustra una realización alternativa de las regiones de control de temperatura de múltiples zonas en un dispositivo centrípeto fluidico;

30 la FIG. 23 es una vista en sección transversal del sistema de control de la temperatura del aire de doble zona del instrumento ilustrado en la FIG. 18;

la FIG. 24 muestra una vista esquemática en sección de un módulo de excitación de múltiples longitudes de onda;

la FIG. 25 ilustra perfiles espectrales de LED, filtro de excitación y divisores de haces dicroicos adaptados para excitar colorantes fluorescentes FAM y Texas Red;

la FIG. 26 ilustra una vista esquemática en sección de un módulo de detección;

35 la FIG. 27 ilustra perfiles espectrales de un filtro interferencial paso banda de doble banda adaptado para la detección de colorantes fluorescentes FAM y Texas Red;

la FIG. 28 ilustra perfiles espectrales de un filtro interferencial paso banda pentabanda adaptado para la detección de colorantes fluorescentes comunes;

40 la FIG. 29 es un diagrama de flujo de los pasos implicados para procesar un ensayo PCR usando el instrumento ilustrado en la FIG. 21;

las FIG. 30A, 30B, 30C ilustran la velocidad del rotor y las temperaturas del dispositivo centrípeto fluidico con el tiempo para procesar una PCR, usando el instrumento ilustrado en la FIG. 18;

Se observará que en todos los dibujos adjuntos, características similares se identifican con los mismos números de referencia.

45 **Descripción detallada**

Conjunto de estructura de dispositivo centrípeto fluidico

La FIG. 1A y la FIG. 1B muestran un conjunto de rotor 1003 ejemplo. Una parte inferior ejemplo del rotor 2 conformada para recibir hasta ocho dispositivos centrípetos fluidicos 1. El conjunto de rotor incluye un rotor de parte inferior 2 y un anillo de retención 7 para retener el dispositivo centrípeto fluidico 1 insertado entre medias. La parte del cuerpo del conjunto del rotor superior del anillo de retención se eliminó en la FIG. 1B.

5 El dispositivo centrípeto fluidico 1 está compuesto por al menos dos capas de componentes. Como se muestra en las FIG. 1C y 1D, una capa fluidica tiene características en la cara inferior y/o la cara superior del dispositivo centrípeto fluidico 1. La capa fluidica 3 está compuesta por un receptáculo de admisión 5, cámaras 6a, 6b, 6c, canales y válvulas fluidicas. Se entenderá que la capa fluidica 3 se puede hacer usando varias capas unidas entre sí. La capa inferior delgada 4 está unida a la capa fluidica 3. La superficie de la parte inferior de la capa fluidica 3, cuando se acopla a la capa inferior delgada 4, forma una red fluidica de depósitos, canales y válvulas cerrados a través de los cuales fluye un fluido sometido a la fuerza centrípeta.

10 La capa fluidica 3 y la capa inferior delgada 4 se pueden hacer de material termoplástico. El material termoplástico puede ser al menos uno de copolímero de olefina cíclica (COC), policarbonato (PC), poliestireno (PS), polioximetileno (POM), perfluoralcoxi (PFA), cloruro de polivinilo (PVC), polipropileno (PP), polimetilmetacrilato (PMMA), copolímero de olefina cíclica (COC), poliamida (PA), polisulfona (PSU), polivinilideno (PVDF) así como otros materiales conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden usar con superficie no modificada o superficie modificada. La modificación de la superficie se puede aplicar a una o a ambas caras o sobre una región específica de interés sobre una o en ambas caras.

15 Varias técnicas de acoplamiento para ensamblar la capa fluidica 3 del dispositivo centrípeto fluidico con la capa inferior plana 4 están disponibles tales como unión térmica, unión por radiofrecuencia, soldadura láser, unión ultrasónica, adhesión o adhesión sensible a la presión y otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización ejemplo, la técnica de acoplamiento permite incorporar reactivo seco o líquido dentro del dispositivo centrípeto fluidico antes del montaje.

20 En otra realización ejemplo, la técnica de acoplamiento es a una temperatura de alrededor de 4°C a alrededor de 80°C.

25 En una realización ejemplo, la rotación del dispositivo centrípeto fluidico se crea colocando el dispositivo centrípeto fluidico en un rotor 2 dedicado, que se hace girar alrededor de un centro de rotación. El rotor 2 tiene un centro de rotación y un borde externo, en este caso, una circunferencia. El dispositivo centrípeto fluidico 1 se extiende radialmente entre el centro de rotación y el borde externo. Incluso se extiende más allá del borde externo en el ejemplo mostrado. Un lado interno del dispositivo centrípeto fluidico 1 está situado hacia el centro de rotación y un lado externo del dispositivo centrípeto fluidico 1 está situado hacia el borde externo.

30 El dispositivo centrípeto fluidico puede ser una parte de un disco que tiene un diámetro interno de alrededor de 5 mm y un diámetro externo de alrededor de 20 mm a alrededor de 50 mm. La parte de un disco puede ser 1/8 de un disco. No hay limitaciones en la forma del dispositivo centrípeto fluidico y en el número de dispositivos centrípetos fluidicos que puede recibir un rotor.

En una realización alternativa, el dispositivo centrípeto fluidico tiene una forma de disco y el rotor está adaptado para recibir un único dispositivo centrípeto fluidico.

35 En otra realización alternativa, la forma del dispositivo centrípeto fluidico corresponde a un portaobjetos de microscopio estándar de 25 mm x 75 mm. El rotor se puede adaptar para recibir entre 2 y 12 portaobjetos de microscopio.

Capa fluidica

La FIG. 1C ilustra la estructura de la cara superior de la capa fluidica 3 que incluye el receptáculo de admisión 5 para recibir una muestra y varios depósitos 6a, 6b, 6c. La forma de cada depósito está adaptada a los requisitos y a las funciones implementadas en el dispositivo centrípeto fluidico 1.

40 La FIG. 1D ilustra una vista en sección de la capa fluidica 3 con la capa inferior delgada 4. En una realización ejemplo, el diseño de la capa fluidica 3 se puede adaptar al proceso de moldeo por inyección. Puede ser ventajoso, para algunas aplicaciones, respetar un espesor de pared uniforme. Por ejemplo, un espesor de pared podría ser de alrededor de 0,7 a 1,2 mm. Puede ser ventajoso, para algunas aplicaciones, asegurar un ángulo de inclinación constante. Las caras verticales pueden tener un ángulo de inclinación de alrededor de 0,5° a 5°.

50 Receptáculo de admisión, canales ventilados y tapa de entrada de muestra del dispositivo centrípeto fluidico

Las FIG. 2A y 2B ilustran una realización ejemplo de un receptáculo de admisión. El receptáculo de admisión 5 está conectado de manera fluida a una cámara 901. La salida de ventilación 816 está conectada al canal de salida y a la cámara ventilada 905.

En una realización, la cámara ventilada 905 está conectada al receptáculo de admisión 5 con la conexión de ventilación de entrada 906 en la cara superior del dispositivo centrípeto flúidico cerca de la parte interna del receptáculo de admisión 5.

5 En una realización ejemplo, una cubierta 907 incluye una pieza de base 908 en contacto directo con el receptáculo de admisión 5, un brazo de conexión flexible 909 y una tapa 910 unida a la pieza de base 908 mediante el brazo de conexión 909. La cubierta 907 se puede colocar en una configuración cerrada con la tapa 910 asegurada en la pieza de base 908 o se puede colocar en una configuración abierta como se muestra en la FIG. 2B. En esta realización particular, la pieza de base 908 está diseñada para permitir la comunicación entre la cámara ventilada 905 y la cámara 901 a través de la conexión de ventilación de entrada 906 incluso cuando la cubierta 907 está en configuración cerrada.

10 En una realización alternativa (no ilustrada), la cámara ventilada 905 está desconectada de la cámara 901 (la conexión de ventilación de entrada 906 está ausente). La ventilación de aire se proporciona por un orificio proporcionado en la pieza de base 908 de la cubierta 907 que permite la comunicación de aire entre la cámara 901 y la cámara ventilada 905 a través de la cavidad libre formada entre la pieza de base 908 y la tapa 910 cuando la cubierta 907 está en la configuración cerrada.

Cámara que se puede llenar por la parte inferior

15 Las FIG. 3A y 3B ilustran la cámara que se puede llenar por la parte inferior de la red flúidica. En este ejemplo, el receptáculo de admisión 5 está conectado de manera fluida a la cámara que se puede llenar por la parte inferior 315 con el canal de entrada 302. La conexión entre el receptáculo de admisión y el canal de entrada se puede hacer opcionalmente a través de una conexión de puerto 303 o la salida del receptáculo de admisión se puede conectar directamente al canal de entrada.

20 En una realización, el material específico de cromatografía de fase sólida (tal como material de intercambio de iones) se puede colocar en el receptáculo 5. Durante la centrifugación para llenar la cámara que se puede llenar por la parte inferior, el material de cromatografía de fase sólida llenará el canal 302 permitiendo la formación de una columna de exclusión capaz de adsorber algún inhibidor de amplificación de ácido nucleico de la muestra cruda.

25 La entrada inferior 304 de la cámara que se puede llenar por la parte inferior 315 está situada en el lado externo de la cámara que se puede llenar por la parte inferior 315. Dado que el flujo de la muestra será desde el receptáculo de admisión 5 hasta el lado externo de la cámara que se puede llenar por la parte inferior, el lado externo de la cámara que se puede llenar por la parte inferior se conoce como la parte inferior de la cámara que se puede llenar por la parte inferior. Un canal de ventilación 305a está conectado a la salida de cámara 306 en el lado interno de la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

30 La dimensión de la cámara está comprendida entre varios centímetros de ancho, varios centímetros de alto y varios milímetros de profundidad. En una realización ejemplo, la dimensión de la cámara 315 está comprendida entre 1 cm de ancho, 2 cm de alto y 2 mm de profundidad. En otra realización ejemplo, las dimensiones son de 0,5 cm de ancho, 1,5 cm de alto y 1,3 mm de profundidad.

Reactivos y miembro desplazable

35 Con referencia ahora a las FIG. 4A y 4B, la cámara que se puede llenar por la parte inferior puede contener opcionalmente un objeto de miembro desplazable 307. El miembro desplazable puede ser ferromagnético y puede moverse en la cámara en respuesta a un campo magnético fluctuante. En una realización ejemplo, el campo magnético de fluctuación se genera mediante la rotación del dispositivo centrípeto flúidico por encima de los imanes fijos colocados alternativamente en una posición radial correspondiente a los bordes interno y externo de la cámara que se puede llenar por la parte inferior. En otra realización, el campo magnético de fluctuación se genera mediante la rotación de los imanes por encima de un dispositivo centrípeto flúidico fijo.

40 En una realización de ejemplo, los imanes fijos son imanes permanentes hechos de material magnético de tierras raras. En otra realización, son electroimanes.

45 La cámara también puede contener opcionalmente material sólido 308 que no responde a un campo magnético. El material sólido se puede usar para proporcionar una reacción química o bioquímica y puede incluir sal, tampón o enzima. El material sólido se puede usar para purificar la muestra adsorbiendo inhibidores enzimáticos y puede incluir una matriz de cromatografía, un soporte sólido para unión por afinidad, una extracción en fase sólida, un material quelante, resinas aniónicas y catiónicas y diferentes tipos de zeolita. El material sólido se puede usar para rotura de células y puede incluir una matriz dura. El material sólido se puede usar para el control del proceso y puede incluir células bacterianas o esporas. El material sólido se puede usar para concentrar el lisado usando una matriz higrométrica para absorber líquidos. El material sólido se puede funcionalizar con ligandos tales como anticuerpos específicos y se puede usar para capturar objetivos dentro de la cámara que se puede llenar por la parte inferior. El material sólido puede ser un filtro capaz de detener o atrapar microbios objetivo dentro de la cámara que se puede llenar por la parte inferior. El material sólido se puede funcionalizar con fracciones de intercambio iónico

capaces de adsorber microbios objetivo en su superficie, inmovilizándolos dentro de la cámara que se puede llenar por la parte inferior. Estos diferentes materiales sólidos se pueden usar solos o en combinación.

5 Cuando los materiales sólidos son una matriz dura para la pared celular y la rotura de la membrana, el material puede estar hecho de sílice o cuentas de zirconio con diámetros de alrededor de 50 μm a alrededor de 200 μm . Las cuentas se pueden recubrir opcionalmente con agente quelante para la absorción de los inhibidores enzimáticos.

En una realización ejemplo, el objeto que se puede desplazar es un disco metálico y el material sólido está compuesto de cuentas duras mezcladas con resina aniónica y catiónica y esporas

Desbordamiento

10 La FIG. 5 ilustra otra interconexión fluida de la cámara que se puede llenar por la parte inferior que incluye una cámara de desbordamiento 309 conectada de manera fluida a la salida de desbordamiento 310 de la cámara que se puede llenar por la parte inferior mediante el canal de desbordamiento 311. El canal de desbordamiento está colocado cerca de la parte interna de la cámara en uno de los lados longitudinales de la cámara. La cámara de desbordamiento está situada hacia el borde externo del dispositivo centrípeto fluido con respecto a la salida de desbordamiento 310 y la cámara de desbordamiento se ventila a través del canal de ventilación 305b. Esta configuración permite hacer una definición del volumen en la cámara que se puede llenar por la parte inferior al tiempo que desahoga simultáneamente la cámara que se puede llenar por la parte inferior y la cámara de desbordamiento 309. El volumen de la cámara de desbordamiento está comprendido entre 100 μl y varios mililitros. En una realización ejemplo, el volumen de la cámara de desbordamiento está comprendido entre 150 y 200 μl .

Medición

20 La FIG. 6 ilustra una salida de descarga 312 opcional a la cámara que se puede llenar por la parte inferior para conectar de manera fluida la cámara que se puede llenar por la parte inferior a una cámara 313 posterior con el canal de transferencia 314. La salida de descarga está situada en uno de los lados longitudinales de la cámara que se puede llenar por la parte inferior. La salida de descarga puede ser una válvula de purga que tenga una dimensión micrométrica. La dimensión de la válvula micrométrica puede ser de 1 a 100 μm de profundidad, de 10 μm a 1 mm de ancho y de unas pocas micras a unos pocos milímetros de longitud. En una realización ejemplo, la dimensión de la válvula micrométrica está comprendida entre 30 y 75 μm de profundidad, de 70 a 120 μm de ancho y de 0,5 a 1,5 mm de longitud. La salida de descarga se puede colocar a cualquier distancia entre los bordes interno y externo de la cámara que se puede llenar por la parte inferior siempre que la salida de descarga esté colocada en una posición externa con respecto a la salida de desbordamiento. La distancia entre la salida de descarga y la salida de desbordamiento definirá el volumen a ser medido y se envía a la siguiente cámara.

El volumen de fluido medido por la salida de descarga puede estar comprendido entre 10 y 50 μl . En una realización ejemplo, el volumen definido es 20 μl .

35 La FIG. 7A ilustra una cámara que se puede llenar en la parte inferior que tiene algunas de las configuraciones opcionales descritas anteriormente. El receptáculo de admisión 5 está conectado de manera fluida al canal de entrada 302, la cámara que se puede llenar por la parte inferior 315 y la entrada inferior 304. Una cámara de desbordamiento 309 está conectada de manera fluida a la cámara que se puede llenar por la parte inferior a través de la salida de desbordamiento 310 y el canal de desbordamiento 311. La salida de descarga 312 permite transferir líquidos situados entre la salida de desbordamiento y la salida de descarga a una cámara 313 posterior a través del canal de salida 312. La cámara contiene un miembro desplazable 307 y un material sólido 308.

40 La FIG. 7B ilustra una cámara que se puede llenar por la parte inferior con un obturador objetivo 316. El obturador se coloca con el fin de forzar a la muestra a atravesarlo. El agua y una molécula pequeña atravesarán, pero el objetivo se retendrá. Dado que la mayoría del líquido cargado en el receptáculo de admisión 5 fluirá a través del rebosadero 309 a través del obturador objetivo 316, el objetivo se concentrará en el pequeño porcentaje de líquido presente en la cámara que se puede llenar por la parte inferior.

45 La FIG. 7C muestra la liberación de las bacterias atrapadas después de que el obturador de patógeno está siendo disociado mediante el movimiento desplazable del miembro desplazable 307. El objetivo puede ser al menos uno de células, bacterias, hongos, virus, etc. En una realización, el obturador objetivo 316 es un filtro de exclusión de tamaño. En otra realización, el obturador objetivo 316 es una resina de intercambio de iones. En otra realización, el obturador de patógeno 316 incluye cuentas que se funcionalizan con anticuerpos específicos.

50 La FIG. 8 ilustra la progresión fluida en la cámara que se puede llenar por la parte inferior descrita en la FIG. 7. Las FIG. 8A a la FIG. 8F describen el movimiento de fluido secuencial en la cámara que se puede llenar por la parte inferior. El llenado de la cámara ocurre en la FIG. 8A, el desbordamiento de líquido a la cámara de desbordamiento ocurre en la FIG. 8B y la FIG. 8C, la homogenización de muestras y la lisis accionada por movimiento desplazable ocurre en la FIG. 8D, la clarificación por sedimentación de materiales insolubles ocurre en la FIG. 8E y la transferencia del líquido medido a la siguiente cámara ocurre en la FIG. 8F.

55

Con referencia ahora a la FIG. 9A y la FIG. 9B, la geometría de la entrada de la parte inferior 304 y la salida de desbordamiento opcional 310 y la salida de descarga opcional 312 están adaptadas para ayudar a evitar que el objeto desplazable y/o las cuentas salgan de la cámara que se puede llenar por la parte inferior. En una realización, la dimensión más pequeña del objeto desplazable y las cuentas contenidas en el material sólido debería ser mayor que la anchura 317a o la profundidad 318a y mayor que la anchura 317b o la profundidad 318b.

Cámara de retención

Una realización ejemplo de una estructura fluidica para retener y/o diluir una muestra se ilustra en las FIG. 10A a 10D. En esta realización, un canal de entrada de fluido 401 está conectado de manera fluida a la entrada 402, situada en el lado interno de la cámara 403. La salida de ventilación 404 está situada en el lado interno de la cámara para permitir el desplazamiento de aire en la cámara. El depósito tiene un volumen de alrededor de 1 μ l a alrededor de 2 ml. La salida 405 del depósito está situada en el lado externo de la cámara y generalmente es una válvula de purga.

En la realización ejemplo de la FIG. 10A, la cámara de retención tiene un receptáculo opcional 406 situado en el lado externo de la cámara. El receptáculo está adaptado generalmente para contener líquido 407 que viene del canal de entrada para ayudar a evitar que el líquido entre en contacto con la salida de cámara 405 tras la entrada inicial en la cámara de retención como se muestra en la FIG. 10B.

Opcionalmente, el receptáculo puede contener reactivos secos 408 como se muestra en la FIG. 10C. Los reactivos secos 408 pueden ser, pero no están restringidos a, enzimas, tampón y/o productos químicos.

En la realización ejemplo ilustrada en la FIG. 10D, la cámara de retención puede incluir opcionalmente un recipiente de líquido 409 colocado dentro de la cámara de retención y que contiene un diluyente 410. El diluyente puede ser, pero no está limitado a, agua, tampón o alguna parte de tampón que no se puede secar. El recipiente de líquido 409 generalmente, pero no necesariamente, está hecho de un material tolerante al calor y/o material sensible de cambio de fase. El material tolerante al calor puede tener un punto de fusión por encima de 100°C y puede ser uno de vidrio, polímero termoplástico así como otros materiales conocidos por los expertos en la técnica. El material de cambio de fase puede fundirse y solidificarse a una cierta temperatura. La fase sólida puede estar por debajo de alrededor de 45°C y la temperatura de la fase de fusión puede estar entre alrededor de 45°C y 85°C. El material de cambio de fase puede ser cera, cera de parafina, cera microcristalina, cera sintética, cera natural, pegamento u otros materiales de sellado conocidos por los expertos en la técnica.

Las estructuras descritas anteriormente se pueden usar como un novedoso tipo de válvula que llamamos Válvula de Desacoplamiento de Flujo. La Válvula de Desacoplamiento de Flujo contiene dos elementos, un receptáculo de desacoplamiento de flujo para interrumpir la conexión fluidica entre la entrada y salida de una cámara de retención, y un recipiente de líquido que encierra un diluyente que se puede liberar tras la aplicación de una fuerza externa. La liberación del diluyente restaura la conexión fluidica dentro del circuito.

En una realización ejemplo, una extremidad de material de cambio de fase 411 del recipiente 410 libera el líquido cuando la cámara de retención se calienta por encima de una cierta temperatura. El recipiente de líquido puede ayudar a evitar la evaporación del líquido encerrado durante un período de alrededor de 1 a 3 años y tiene una capacidad de un microlitro a dos mililitros.

La FIG. 11 ilustra la progresión fluidica del movimiento de fluido secuencial en la realización de la cámara de retención. Mostrado en la FIG. 11A está el líquido 407 que viene de la entrada que está en el receptáculo, en la FIG. 11B, la cámara de retención se calienta 416 y la extremidad del material de cambio de fase está derriéndose 411a, 411b, en la FIG. 11C, se libera el diluyente 410, en la FIG. 11D, el líquido 407 que viene de la entrada se mezcla con el diluyente 410, y en la FIG. 11E, el diluido 415 se evacúa por la salida de la válvula de purga 405.

Una realización ejemplo alternativa se ilustra en la FIG. 12 para diluir un fluido en una cámara de retención. Una cámara de diluyente 412 puede estar situada encima o en el lado interno de la cámara de retención 403. El líquido se libera en la cámara de retención activando una válvula de material de cambio de fase 413 colocada en la salida de diluyente 414. En esta realización ejemplo, la válvula del material de cambio de fase es una válvula de cera activada por calor por encima de alrededor de 50°C. En otra realización, el calor se genera mediante ondas electromagnéticas tales como radiación de infrarrojos, láser, microondas y cualquier otro material conocido por los expertos en la técnica. En una realización alternativa (no ilustrada), el líquido del recipiente de líquido se puede liberar mecánicamente. Por ejemplo, un mecanismo de perforación se puede activar mediante un émbolo. En otra realización alternativa (no ilustrada), el líquido del recipiente de diluyente se puede liberar mediante un actuador electromagnético.

Una realización ejemplo de un sistema de medición de fluido conectado a la cámara de retención se muestra en la FIG. 13. En este ejemplo, la salida de muestra 303 está conectada de manera fluida a la cámara que se puede llenar por la parte inferior 315, a través de la entrada de la parte inferior 304. Una cámara de desbordamiento 309 está conectada a la cámara que se puede llenar por la parte inferior 315 con la salida de desbordamiento 310 y el canal de desbordamiento 311. La salida de medición 312 permite transferir el líquido contenido, entre la salida de

desbordamiento 310 y la salida de medición 312 de la cámara 315, al receptáculo de la cámara de retención 406 a través del canal de medición 314 y la entrada de la cámara de retención 402.

- Tras el calentamiento, el diluyente 410 contenido en el recipiente de dilución 409 se libera en la cámara de retención 403. El líquido liberado 410 se mezcla con el volumen medido contenido en el receptáculo de la cámara de retención 406. Una vez que el diluyente y el volumen medido se mezclan entre sí, el volumen total es lo suficientemente grande como para poner la dilución en contacto con la salida 405 que actúa como una válvula de purga. De esta manera, la liberación del líquido del recipiente 409 trae un líquido al lugar correcto en el momento adecuado y también reactiva la circuitería fluidica. De hecho, antes de que se caliente el recipiente de líquido, el líquido que viene de la cámara 315 se retiene en el receptáculo 406. En esta realización particular, el receptáculo de la cámara de retención permite una alta tasa de estallido de RPM para la válvula de purga 312 de salida de medición y ayuda a evitar que el líquido salga de la cámara de retención controlando la localización del fluido para ayudar a evitar el contacto con la válvula de salida de la cámara de retención 405. El mecanismo de esta novedosa Válvula de Desacoplamiento de Flujo disocia la válvula de purga 312 de salida de medición pasiva de la válvula de salida pasiva 405, permitiendo un control fluídico robusto sin la necesidad de válvulas activas complejas.
- En otra realización ejemplo, el material de cambio de fase 411 del recipiente de líquido 409 tiene una densidad superior al líquido medido 407 retenido en el receptáculo 406 y el diluyente 410. Cuando se calienta, el líquido 410 contenido en el recipiente de líquido 409 se libera a la cámara 403. El material de cambio de fase 411 se moverá por debajo de la mezcla de diluyente 410 y fluido 407 y se desplazará este último de modo que pueda estar en contacto con la salida 405 que puede actuar como una válvula de purga. En esta realización particular, la cámara de retención se puede vaciar una vez que se libera el líquido de mayor densidad.

En algunas realizaciones, los reactivos secos 408 se pueden almacenar en la cámara de retención 403.

Cubeta, cámara de detección y cámara de distribución

- La FIG. 14 ilustra una realización de una disposición de cubetas de detección fluidicas. En la realización ejemplo de la FIG. 14A, un depósito de muestra 601 está conectado de manera fluida a una o más cubetas de detección 602a, 602b y 602c a través del canal de entrada 603, el canal de distribución 604 y las entradas de las cubetas. En el ejemplo mostrado, el número de cubetas es tres. El extremo del canal de distribución 604 está conectado de manera fluida a la cámara de residuos 605 y una salida ventilada 606 está situada cerca del extremo del canal de distribución 604.

- En una realización ejemplo de la FIG. 14B, los reactivos secos 607a, 607b y 607c se han almacenado en las respectivas cubetas 602a, 602b, 602c. Los reactivos secos pueden ser conjuntos de iniciadores, mezclas de enzimas, sondas de fluorescencia y sales para realizar el proceso de amplificación enzimática y/o la detección. El fluido transferido en las cubetas resuspenderá los reactivos secos.

- En otra realización mostrada en la FIG. 14C, un material de cambio de fase sensible al calor 608 se puede colocar directamente dentro de cada cubeta, por ejemplo, encima de los reactivos secos 607. El material de cambio de fase sensible al calor 608 puede tener una gravedad específica menor que la gravedad específica del fluido entrante. Por ejemplo, el punto de fusión del material 608 está por encima de 50°C y tiene una gravedad específica por debajo de uno. En una realización ejemplo, el material de cambio de fase es cera. En esta realización, el volumen de la cubeta menos el volumen del material de cambio de fase define el volumen de la reacción de amplificación que generalmente está entre 5 y 100 μ l. Tras el calentamiento, el material de cambio de fase se fundirá y sometido a la fuerza centrípeta se moverá hasta la entrada de cubeta 610. En esta realización, una entrada de cubeta bien diseñada cuando se llena con el material de cambio de fase ayudará a evitar la evaporación y la contaminación cruzada entre cada cubeta.

- En otra realización ilustrada en la FIG. 14D, la cámara de residuos puede contener un material de cambio de fase sensible al calor 612 con una gravedad específica menor que la gravedad específica de la muestra. Por ejemplo, el punto de fusión del material está por encima de 50°C y tiene una gravedad específica por debajo de 1. En una realización ejemplo, el material de cambio de fase es cera. Como se ilustra en la FIG. 15, cuando la cámara de residuos 605, el canal de distribución 604 y las cubetas 602 se calientan 611, y cuando un excedente de fluido 609 entra en la cámara de residuos 605, la cera fundida 612b se mueve dentro del canal de distribución 604 en la parte superior de las entradas de cubetas.

- En otra realización, se coloca un material de cambio de fase 612 en los residuos. El líquido que viene de la cámara de retención se lleva al canal de distribución con una temperatura inferior al punto de fusión del material de cambio de fase presente en los residuos.

- En una realización, se coloca un material de cambio de fase tanto en las cubetas como en los residuos. En esta realización particular, el punto de fusión del material de cambio de fase 612 colocado en los residuos es igual o menor que el punto de fusión del material de cambio de fase 608 colocado en las cubetas.

La FIG. 16 muestra otra realización ejemplo en la que una cámara de retención 403 como se ha descrito anteriormente está conectada de manera fluida al canal de distribución 604. En una realización, la salida de

ventilación 606 del canal de distribución y la salida de ventilación 404 de la cámara de retención opcionalmente se pueden fundir en un único canal de ventilación 704 cerca de la salida de ventilación 404 de la cámara de retención 403.

5 La FIG. 17 muestra otra realización ejemplo en la que un puerto de muestra 303 está conectado de manera fluida a la cámara que se puede llenar por la parte inferior 315, en la que la cámara incluye un miembro desplazable 307 y cuentas duras 308. La cámara que se puede llenar por la parte inferior está conectada a una cámara de desbordamiento 309 y una salida de medición de la válvula de purga 312 está conectada de manera fluida a una entrada de la cámara de retención 402. La cámara de retención 403 contiene un receptáculo 406 y un recipiente de líquido 409 como se ha descrito anteriormente para permitir la dilución del fluido. El fluido diluido alcanza la salida 10 405 y se transfiere a las cubetas 602 a través de la salida de válvula de purga 405 de la cámara de retención 403 y el residuo 605 contiene cera 612. En esta realización ejemplo, los reactivos secos 607 y la cera (no ilustrada) se almacenan en las cubetas. La salida de ventilación 606, 404 y 815 de las cubetas, la cámara de retención y la cámara que se puede llenar por la parte inferior se funden entre sí para permitir la ventilación de la circuitería fluidica completa a través de un único puerto de ventilación 816.

15 Configuración ejemplar del instrumento

La FIG. 18 ilustra un instrumento ejemplo 1000 para procesar un dispositivo centrípeto fluidico como se ha presentado anteriormente. El aparato 1000 es, en esta realización ejemplo, de 30 cm de ancho x 30 cm de profundidad x 20 cm de alto. Incluye una base 1001, una tapa articulada 1002 y un conjunto de rotor 1003 colocado dentro del recinto de centrifugación 1004. El conjunto de rotor 1003 colocado dentro del recinto de centrifugación 20 1004 se hace girar en un plano paralelo a la base del instrumento.

La FIG. 19 muestra el instrumento 1000 con más detalle, especialmente los componentes situados dentro de la base 1001. El movimiento de rotación del conjunto de rotor 1003 se produce por el motor 1005, situado debajo del recinto de centrifugación 1004. El controlador 1008 proporciona un microprocesador, una memoria, electrónica y software para controlar el instrumento 1000. En este ejemplo, el controlador proporciona una interfaz hardware de protocolo de comunicaciones tal como Ethernet, serie, I/O digital e I/O analógica. En esta realización ejemplo, la pantalla táctil LCD 1006 proporciona una interfaz gráfica de usuario (GUI) usada para operar el software del instrumento integrado en el controlador 1008. El LCD se comunica con el controlador usando un protocolo de comunicación serie. El controlador se comunica con los controladores de motor 1010 y la placa de adquisición de señal óptica 1011 usando enlaces serie. La placa de acondicionamiento de temperatura 1012 está conectada a entradas analógicas y la placa de control de fuentes de excitación 1013 está conectada a la salida digital del controlador 1008. 25 30

Este instrumento ejemplo 1000 proporciona múltiples controles de zona de temperatura para controlar la temperatura en regiones de interés predeterminadas de un dispositivo centrípeto fluidico. En esta realización ejemplo, el recinto de centrifugación 1004, el conjunto de rotor 1003 y la tapa 1001 están diseñados para asegurar un control de temperatura de aire de doble zona.

35 El módulo de excitación 1007 proporciona al menos una longitud de onda de excitación. La trayectoria del haz de excitación va hacia arriba para excitar especies fluorescentes dentro de las cubetas de los dispositivos centrípetos fluidicos desde la cara inferior.

El módulo de detección 1009 está situado en la parte posterior del recinto de centrifugación. El módulo de detección 1009 aloja los elementos ópticos que recogen la luz emitida por especies fluorescentes en el dispositivo centrípeto fluidico al menos en una longitud de onda. En esta realización ejemplo, el detector es un PMT. 40

Descripción general de funciones del instrumento

El instrumento incluye módulos integrados: motor 1005, recinto de centrifugación 1004, controlador de temperatura de múltiples zonas 2000, óptica 1014, controlador 1008 y una interfaz humano máquina 1006. Se entenderá que la disposición de los diversos componentes o módulos mostrados en la FIG. 20 es ejemplar y no se pretende que sea limitante. 45

Recinto de centrifugación

El conjunto de rotor 1003 está colocado dentro de un recinto de centrifugación 1004 que da vueltas para controlar el movimiento de fluido en el dispositivo centrípeto fluidico 1. El movimiento de rotación del conjunto de rotor se produce por el motor 1005. El conjunto de rotor se puede fijar permanentemente dentro del recinto centrífugo o se puede quitar del recinto centrífugo para permitir la colocación del dispositivo o de los dispositivos centrípetos fluidicos en el rotor antes de colocar el rotor dentro del recinto centrífugo. El conjunto del rotor puede hacerse girar en un plano paralelo a la base del instrumento o alternativamente en un plano perpendicular a la base del instrumento. Las velocidades de revolución del conjunto del rotor pueden variar entre 0 y 10.000 RPM en el sentido de las agujas del reloj y/o en el sentido contrario a las agujas del reloj con una tasa de aceleración entre 0 y 20.000 RPM/s. Por ejemplo, la secuencia de rotación se realiza automáticamente por el controlador 1008. 50 55

Se puede colocar un imán permanente (no mostrado) dentro del recinto de centrifugación para activar magnéticamente el miembro desplazable 307 situado en la cámara que se puede llenar por la parte inferior de algunas realizaciones de dispositivo centrípeto fluido. Un ejemplo de acción magnética para un disco fluido centrífugo se ha descrito por Kido et al., en "A novel, compact disk-like centrifugal microfluidics system for cell lysis and sample homogenization", *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 58 (2007) 44 -51.

Control de la temperatura de múltiples zonas

El instrumento 1000 también permite que el controlador de temperatura de múltiples zonas 2000 module la temperatura de las regiones de interés (ROI) predeterminadas 1300, 1302 de un dispositivo centrípeto fluido. El calentamiento/enfriamiento se puede lograr con técnicas resistivas (alambre de nicromo, calentador cerámico), con o sin ventilador, técnicas termoeléctricas (Peltier), calentamiento por bombilla halógena, así como otros sistemas de calentamiento/enfriamiento conocidos por los expertos en la técnica.

Ahora con referencia a la FIG. 21, una vista superior simplificada de un dispositivo centrípeto fluido ilustra esquemáticamente dos áreas de ROI 1300, 1302. En esta realización ejemplo, las dos áreas de ROI no se solapan y tienen forma de anillo. El calentamiento/enfriamiento de diferentes ROI se puede lograr independientemente en puntos de tiempo específicos.

Con referencia de nuevo a la FIG. 20, los calentadores 2001a y 2001b pueden calentar aire y el aire caliente fuerza que la ROI seleccionada del dispositivo centrípeto fluido sea calentada y, en consecuencia, el fluido sea calentado. El recinto de centrifugación 1004 puede comprender una estructura aislante para confinar aire calentado a los compartimentos respectivos del recinto para asegurar el control de temperatura de la ROI del dispositivo centrípeto fluido. La temperatura del aire calentado en cada compartimento se puede medir mediante un sensor de temperatura. El sensor de temperatura puede ser termopares, termistor, detector de temperatura de resistencia (RTD) así como también otro sensor de temperatura conocido por los expertos en la técnica. Un control de bucle de realimentación de temperatura se puede implementar en el controlador 1008 para controlar con precisión la temperatura del aire.

En algunas realizaciones, se puede usar un ventilador para recircular aire caliente alrededor de una ROI. Alternativamente o además, un ventilador puede forzar que el aire fresco sea calentado por un calentador antes de contactar la ROI de interés.

En algunas realizaciones, al menos un respiradero (no mostrado) permite que el aire caliente salga del compartimento del recinto centrífugo. El respiradero puede ser abierto momentánea o permanentemente.

En algunas realizaciones, el ventilador 2002 se puede usar para enfriar una ROI específica del dispositivo centrípeto fluido. Se puede usar un ventilador para forzar que el aire frío (temperatura ambiente) entre en un compartimento específico del recinto centrífugo para enfriar una ROI específica del dispositivo centrípeto fluido.

En algunas realizaciones, al menos una ROI del dispositivo centrípeto de fluido se puede mantener por debajo de 35°C cuando se calienta otra ROI entre 25°C y 99°C.

Preferiblemente, se puede implementar un algoritmo de bucle de realimentación de temperatura en el controlador 1008 para realizar una incubación isotérmica de al menos una de las ROI del dispositivo centrípeto fluido. Alternativamente o además, se pueden implementar algoritmos de bucle de realimentación de temperatura para realizar un ciclo térmico en al menos una ROI del dispositivo centrípeto fluido.

En una realización, la incubación isotérmica de una ROI se puede usar para controlar la inhibición de amplificación de ácido nucleico, más específicamente, para controlar la inhibición de la amplificación por PCR. Alternativamente o además, la incubación isotérmica se puede usar para calentar material de cambio de fase. En una realización más específica, la ROI de interés en el dispositivo centrípeto fluido incluye al menos la cámara de retención de la realización del dispositivo centrípeto fluido descrita anteriormente.

En una realización, la incubación isotérmica de al menos una ROI de un dispositivo centrípeto fluido se puede usar para realizar una amplificación isotérmica de ácido nucleico. En una realización más específica, la ROI comprende las cubetas de un dispositivo centrípeto fluido de la realización descrita anteriormente.

En otra realización, un ciclo térmico de al menos una ROI de un dispositivo centrípeto fluido se puede usar para realizar amplificación por PCR. En una realización más específica, la ROI comprende las cubetas de un dispositivo centrípeto fluido de la realización descrita anteriormente.

Ahora con referencia a la FIG. 22, la temperatura del fluido se puede controlar en una ROI más específica 2201, 2202a, 2202b, 2202c de un dispositivo centrípeto fluido. Puede ser adecuado evitar el calentamiento de áreas innecesarias del dispositivo centrípeto fluido para minimizar la masa térmica y aumentar la tasa de calentamiento/enfriamiento. La temperatura en cada ROI específica se puede controlar colocando elementos de calentamiento/enfriamiento y sensores de temperatura en contacto con la cara inferior y/o la cara superior del dispositivo centrípeto fluido sobre el rotor. La potencia se puede transmitir a los elementos de calentamiento a

través de anillos deslizantes (no mostrados) colocados entre el motor y el conjunto del rotor. Los datos del sensor de temperatura también se pueden transmitir a través del conjunto del anillo deslizante y/o de forma inalámbrica.

En otra realización alternativa, se puede integrar un subcontrolador en el conjunto de rotor giratorio para implementar el bucle de realimentación de control de temperatura de uno o más elementos de calentamiento directamente sobre el rotor. Se puede suministrar energía eléctrica a la placa electrónica giratoria mediante una de las baterías colocadas en la placa electrónica giratoria, transferencia de potencia de inducción entre la parte no giratoria y la placa electrónica colocada sobre el rotor o con una interfaz de anillo deslizante entre el motor y el rotor. Se puede implementar una interfaz de comunicación entre este subcontrolador y el controlador 1008 a través de una comunicación en serie a través de un anillo deslizante, comunicación de RF o cualquier otro modo de transmisión inalámbrica. En algunas realizaciones, la temperatura se puede medir en diferentes ROI de un dispositivo centrípeto
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

La FIG. 23 ilustra el control de temperatura del aire de doble zona. En este ejemplo, hay dos compartimentos: el compartimento #1 1301 para calentar la cámara de retención 403 y el compartimento #2 1303 para calentar y enfriar el área de las cubetas 602 del dispositivo centrípeto
 1. El confinamiento del aire en cada área se logra a través de una combinación de compartimentos delimitados por el recinto de centrifugación 1004, la pared de separación del recinto de centrifugación 1304, la parte inferior del rotor 2, la pared de aislamiento del rotor 1305, el anillo de retención 7, el aislamiento de la tapa 1307 y la pared de aislamiento de la tapa 1308. Se pueden usar materiales aislantes para controlar la transferencia de calor entre componentes adyacentes y/o acoplados y también para evitar el flujo de calor no controlado fuera del recinto de centrifugación 1004. Para generar calor dentro de cada compartimento, un elemento térmico 1309a está colocado debajo del dispositivo centrípeto
 2. El enfriamiento del aire en el compartimento #2 1303, y un elemento de calentamiento 1309b está colocado encima del dispositivo centrípeto
 1. Los termopares 1310a y 1310b están colocados dentro de cada compartimento para medir la temperatura individual del compartimento. En el instrumento 1000, los elementos de calentamiento en ambos compartimentos son bobinas de calentamiento resistivas. Para controlar la tasa de enfriamiento del compartimento #2 1303, el soplador 3111 fuerza que aire a temperatura ambiente entre en el compartimento #2 1303. Cuando el soplador 3111 está soplando aire dentro, la compuerta de salida 3112 se abre para expulsar aire caliente fuera del compartimento #2 1303. Un algoritmo de bucle de realimentación de temperatura se implementa en el controlador electrónico 1008 para controlar con precisión la temperatura en cada compartimento. Esta configuración permite que una tasa de calentamiento del aire para ambos compartimentos sea, por ejemplo, de entre 1 a 20°C/s. La tasa de enfriamiento de aire del compartimento #2 1303 es, por ejemplo, de entre 0,1 a 20°C/s. Se pueden implementar algoritmos de bucle de realimentación de control para realizar la incubación isotérmica de cada región de interés del dispositivo centrípeto
 1. Los programas de ciclo térmico tales como la amplificación por PCR para el compartimento #2 1303.

40 Óptica

Con referencia de nuevo a la FIG. 20, la óptica 1014 del instrumento 1000 ejemplo incluye dos módulos: módulo de excitación 1007 y módulo de detección 1009. Estos dos módulos están configurados para interrogar ópticamente un líquido 1608 en un dispositivo centrípeto
 1. Es adecuado para medir especies fluorescentes en las cubetas del dispositivo centrífugo
 1. En algunas realizaciones, la óptica de fluorescencia se puede usar para realizar una PCR en tiempo real o detección isotérmica en tiempo real.

En otra realización, la óptica 1014 solamente incluye un módulo de detección para interrogar al líquido en el dispositivo centrípeto
 1.

El módulo de excitación 1007 incluye una fuente o fuentes de luz y elementos mecánicos y ópticos para conformar tanto espectral como espacialmente un haz de excitación. Se pueden alojar varias fuentes de luz en un módulo de excitación y sus salidas se pueden acoplar a una única trayectoria de haz. Alternativamente, un actuador puede permitir conmutar entre fuentes de luz para excitar especies fluorescentes a diferente longitud de onda. En una realización, la selección de longitud de onda y el ajuste de potencia de salida se realizan automáticamente por el controlador 1008 del instrumento.

En una realización, las fuentes de luz son diodos emisores de luz (LED). En otra realización, se pueden usar lámparas láser, halógenas o de mercurio.

En algunas realizaciones, el módulo de excitación 1007 contiene de 1 a 6 LED para excitar especies fluorescentes en 1 a 6 longitudes de onda diferentes. Cada LED se puede filtrar espectralmente por un único filtro interferencial paso banda antes de ser acoplado a una única trayectoria de haz. Alternativamente, se puede usar un filtro interferencial paso banda múltiple para filtrar LED después de ser acoplados a una única trayectoria de haz.

El módulo de detección 1009 comprende elementos ópticos para recoger luz emitida por las especies de interés dentro del dispositivo centrípeto fluídico. Los elementos ópticos pueden ser lentes, para conformar la luz recogida espacialmente a un fotodetector, filtro interferencial para seleccionar una banda de longitud de onda correspondiente al espectro de emisión de la especie fluorescente. En una realización, el detector es un PMT. En otra realización, los detectores pueden ser fotodiodos.

En algunas realizaciones, el módulo de detección puede detectar de 1 a 6 longitudes de onda diferentes en un único detector. Cada longitud de onda se puede filtrar por un único filtro interferencial paso banda y un actuador puede permitir la conmutación entre filtros para detectar secuencialmente especies fluorescentes. Alternativamente, se puede usar un filtro interferencial paso banda múltiple para evitar la necesidad de que un actuador conmute entre longitudes de onda. En este caso, todas las longitudes de onda se detectarán simultáneamente por el detector. Puede ser necesario excitar especies fluorescentes secuencialmente con el módulo de excitación para distinguir cada especie. Por ejemplo, esta tarea se realiza automáticamente por el controlador 1008.

La FIG. 24 ilustra una vista esquemática en sección que ilustra un módulo de excitación 1007 según una realización de la invención. En esta realización, el combinador de haces 1607 está compuesto de dos LED 1601a y 1601b, dos lentes fuente 1602a y 1602b, dos filtros de excitación 1603a y 1603b, un espejo dicróico 1604, una abertura 1605 y lentes de proyección 1606a y 1606b. Después de que se focaliza a través de una lente 1602a, la luz del LED 1601a se filtra espacialmente por el filtro 1603a. Entonces, la luz pasa a través del divisor de haz dicróico 1604 y la focalización de la lente 1602a es en la abertura 1605. La luz emitida por el LED 1601b se conforma y filtra usando la lente 1602b y el filtro 1603b y también se focaliza en la abertura 1605 reflejándose en el divisor de haz 1604. La abertura 1605 filtra espacialmente la luz emitida desde los dos LED 1601a y 1601b. La luz entonces se proyecta a la muestra 1608 en el dispositivo centrípeto fluídico 1 a través de un par de lentes 1606a y 1606b para excitar especies fluorescentes.

La FIG. 25 ilustra las características espectrales de los LED 1601a y 1601b ejemplo, los filtros 1602a y 1602b y el divisor de haz 1604. Las características espectrales del divisor de haz permiten combinar un LED azul y un LED ámbar que tienen una potencia pico a 471 nm y 590 nm, respectivamente. Esta disposición espectral es muy adecuada para excitar tanto carboxifluoresceína (5-FAM) como/o Texas Red® usadas comúnmente en amplificación por PCR en tiempo real.

Ahora con referencia a la FIG. 26, las vistas laterales esquemáticas en sección ilustran un módulo de detección ejemplo para recoger la luz emitida por las especies fluorescentes de interés en dos longitudes de onda de la muestra 1608 situada en el dispositivo centrípeto fluídico 1. La fluorescencia emitida se recoge y colima por la lente objetivo 1801. Entonces, después de ser filtrada espacialmente a través del filtro interferencial 1802 que tiene dos bandas de transmisión correspondientes al espectro de emisión de la especie fluorescente, la trayectoria de haz de fluorescencia 1807 se conforma por separado en ambos planos mediante dos lentes cilíndricas 1803 y 1804. El haz entonces se filtra espacialmente por la parada de campo de apertura rectangular 1805 y el fotocátodo rectangular del PMT 1806.

La FIG. 27 ilustra la característica espectral del filtro de doble banda. Esta configuración espectral permite la transmisión centrada a 524 nm y 628 nm. Esta configuración es muy adecuada para la detección de 5-carboxifluoresceína (5-FAM) y Texas Red® usadas comúnmente en amplificación por PCR en tiempo real. Además, este módulo puede tener varias configuraciones dependiendo de las necesidades de la aplicación prevista.

La FIG. 28 muestra características espectrales más complejas con 5 bandas de transmisión: [420-460 nm], [510-531 nm], [589-623 nm], [677-711 nm] y [769-849 nm]. Este filtro paso banda múltiple es muy adecuado para la detección secuencial de los cinco colorantes siguientes: AlexaFluor350, 5-carboxifluoresceína (5-FAM), Texas Red®, Cy5 y Alexa 750.

Método de prueba para amplificación termocíclica

La FIG. 29 ilustra un flujo de trabajo ejemplo que usa el instrumento 1000 y el dispositivo centrípeto fluídico ejemplo de la FIG. 17 para realizar la preparación de muestra de material biológico, controlar los inhibidores potenciales y detectar con una PCR en tiempo real. Este diagrama de flujo enumera temperaturas, duraciones, velocidades y pasos ejemplo.

El primer paso 1201 consiste en cargar una muestra biológica en el receptáculo de admisión 5. Entonces, colocar el dispositivo centrípeto fluídico en el instrumento y presionar el botón de inicio 1202. A partir de este punto, el instrumento se encargará de todo el proceso. La rotación comenzará a la velocidad #1 1203 para transferir el líquido desde el receptáculo de admisión 5 a la cámara de lisis 315 y evacuará parte de la muestra a la cámara de desbordamiento 309. La velocidad de rotación cambiará a la velocidad #2 1204 para activar el movimiento del miembro de desplazamiento 307 dentro de la cámara de lisis que se puede llenar por la parte inferior. Unos imanes permanentes colocados por debajo del rotor 2 crean un campo magnético fluctuante cuando los dispositivos centrípetos fluídicos rotan sobre él. Después de una cantidad de tiempo predeterminada, la rotación se cambia de nuevo a la velocidad #3 1205 para clarificar el lisado y reventar la salida de medición 312.

El volumen medido se transfiere al receptáculo de la cámara de retención 406. En el paso 1206, la rotación se cambia de nuevo a la velocidad #4. El compartimiento #1 se calienta de modo que la ROI #1 del dispositivo centrípeto fluídico alcanza 95°C durante 3 minutos, por ejemplo, para controlar los inhibidores potencialmente presentes en la muestra biológica. Este calentamiento también fundirá la tapa de cera del recipiente líquido 411 para liberar el diluyente 410 dentro de la cámara de retención 403. Se debería observar que el compartimiento #2 del instrumento y la ROI #2 del dispositivo centrípeto fluídico se mantienen a una temperatura por debajo de 35°C, por ejemplo, activando el soplador si se necesita.

Al final del paso 1206, el lisado generalmente está bien mezclado con el diluyente y está listo para ser transferido al canal de distribución y a las cubetas 602. La transferencia se hace calentando el compartimiento #2 a una temperatura de manera que la ROI #2 alcanza una temperatura por encima de 50°C, por ejemplo, para fundir la cera 608 en la cámara de residuos 605 y cambiando la rotación a la velocidad #3, paso 1207. La salida del depósito de dilución 405 revienta y el líquido se transfiere a las cubetas 602 para resuspender los reactivos secos 607 por PCR almacenados previamente. En el paso 1208, la velocidad de rotación se cambia a la velocidad #4 y la enzima de arranque en caliente contenida en los reactivos 607 se activa por el compartimiento de calentamiento #2 de modo que la ROI #2 del dispositivo centrípeto fluídico alcance 94°C, por ejemplo, durante un período de entre 3 a 10 minutos dependiendo de los reactivos específicos usados.

Durante este tiempo, la zona de calentamiento #1 se enfría de manera natural a una temperatura de alrededor de 45°C. Continuando a la velocidad de rotación #4, se inicia el protocolo de ciclo por PCR en tiempo real 1209. La temperatura en el compartimiento #2 se alterna de modo que la temperatura en la ROI #2 se alterna entre alrededor de 95°C, 56°C y 72°C durante períodos que varían respectivamente de 1 a 15 s, de 0 a 15 s y de 1 a 20 s. Al final de cada ciclo de 72°C, se toma la medición de la fluorescencia a 1 a 6 diferentes longitudes de onda de excitación/detección simultánea o secuencialmente. Los ciclos se hacen de 35 a 45 veces. La curva de fluorescencia por PCR en tiempo real entonces se analiza, y se interpreta mediante un algoritmo basado en ordenador. Los resultados se registran en una base de datos y se transmiten opcionalmente al operador de la prueba o a un médico.

La FIG. 30A ilustra el perfil de velocidad de rotación, el perfil de temperatura térmica de la ROI #1 y la ROI #2 para la realización ejemplo descrita en relación con la FIG. 29. La FIG. 30B ilustra el período anterior a la PCR en tiempo real y la FIG. 30C ilustra 3 ciclos de detección por PCR en tiempo real.

En otra realización, el instrumento puede procesar alternativamente la preparación de muestras y la detección isotérmica en tiempo real. La amplificación isotérmica usada puede ser, pero no está limitada a, RMA (amplificación mediada por ribonucleasa), HDA (Amplificación Dependiente de Helicasa), RPA (Amplificación de Recombinasa Polimerasa) y SPIA (Amplificación Isotérmica de Iniciador Único), LAMP (Amplificación Isotérmica mediada por bucle.), SDA (amplificación por desplazamiento de cadena), NASBA (Amplificación Basada en Secuencia de Ácido Nucleico), wGA (Amplificación de Genoma Completo), pWGA (Amplificación de Genoma Completo basada en primasa), ICAN (Amplificación de Ácidos nucleicos iniciada por iniciador isotermo y quimérico), EXPAR (Reacción de amplificación exponencial), NEAR (Reacción de amplificación de enzimas de corte), RCA (Amplificación de círculo rodante), TMA (Amplificación Mediada por Transcripción).

Se reconocerá por los expertos en la técnica que se puede fabricar una pluralidad de dispositivos centrípetos fluídicos con aplicaciones específicas en mente, permitiendo la definición del volumen de muestra, la homogeneización de la muestra, la lisis de la muestra, la medición de la muestra, la dilución de la muestra, la mezcla de la muestra y la detección de la muestra.

Método de prueba para amplificación isotérmica

En una realización alternativa del diagrama de flujo ilustrado en la FIG. 29, los pasos 1207, 1208, 1209 y 1210 se modifican para realizar la preparación de muestra de material biológico, controlar los inhibidores potenciales y detectar con una amplificación isotérmica en tiempo real. En una realización más particular, la amplificación isotérmica en tiempo real es la Amplificación de Recombinasa Polimerasa en tiempo real (RPA en tiempo real).

Los pasos son como sigue: cargar una muestra biológica en el receptáculo de admisión 5. Entonces, colocar el dispositivo centrípeto fluídico en el instrumento y presionar el botón de inicio. A partir de este punto, el instrumento se encargará de todo el proceso. La rotación comenzará a una velocidad #1 para transferir el líquido desde el receptáculo de admisión 5 a la cámara de lisis 315 y evacuará parte de la muestra a la cámara de desbordamiento 309. La velocidad de rotación cambiará a la velocidad #2 para activar el movimiento del miembro de desplazamiento 307 dentro de la cámara de lisis que se puede llenar por la parte inferior. Los imanes permanentes colocados por debajo del rotor 2 crean un campo magnético fluctuante cuando los dispositivos centrípetos fluídicos rotan sobre él. Después de una cantidad de tiempo predeterminada, la rotación se cambia de nuevo a la velocidad #3 para clarificar el lisado y reventar la salida de medición 312.

El volumen medido se transfiere al receptáculo de la cámara de retención 406. La rotación se cambia de nuevo a la velocidad #4. El compartimiento #1 se calienta de modo que en la ROI #1 del dispositivo centrípeto fluídico la temperatura está a 95°C durante 3 minutos, por ejemplo, para controlar los inhibidores potencialmente presentes en la muestra biológica. Este calentamiento también fundirá la tapa de cera del recipiente de líquido 411 para liberar el

diluyente 410 dentro de la cámara de retención 403. Se debería observar que el compartimiento #2 se mantiene a una temperatura más baja de modo que la ROI #2 se mantenga a una temperatura por debajo de 35°C, por ejemplo, activando el soplador si se necesita.

5 El lisado generalmente se mezcla bien con el diluyente y se enfría a una temperatura igual o por debajo de 42°C y está listo para ser transferido al canal de distribución y a las cubetas 602. En esta realización, el diluyente es agua y magnesio. La transferencia se hace manteniendo el compartimiento #2 a una temperatura de modo que la ROI #2 se mantenga a 37-42°C, y cambiando la rotación a la velocidad #3. La salida del depósito de dilución 405 revienta y el líquido se transfiere a las cubetas 602 para resuspender los reactivos secos por PCR almacenados previamente 607. En esta realización, el reactivo seco 607 comprende una sonda fluorescente RPA, iniciadores, recombinasa, polimerasa, exonucleasa, el agente de hacinamiento, GP32, uvsY y uvsX. La velocidad de rotación se cambia a la velocidad #4 y el compartimiento #2 se calienta de modo que la ROI #2 alcance 37-42°C.

10 Durante este tiempo, la zona de calentamiento #1 se enfría de manera natural a una temperatura por debajo de 45°C. La medición de fluorescencia se toma en 1 a 6 diferentes longitudes de onda de excitación/detección simultánea o secuencialmente cada pocos minutos. El paso de amplificación se detiene después de 20 minutos. La señal de fluorescencia RPA en tiempo real entonces se analiza, y se interpreta mediante un algoritmo basado en ordenador. Los resultados se registran en una base de datos y se transmiten opcionalmente al operador de la prueba o a un médico.

15 En otra realización, el instrumento puede procesar alternativamente la preparación de la muestra y la detección isotérmica en tiempo real. La amplificación isotérmica usada puede ser, pero no está limitada a, RMA (amplificación mediada por ribonucleasa), HDA (Amplificación Dependiente de Helicasa), RPA (Amplificación de Recombinasa Polimerasa) y SPIA (Amplificación Isotérmica de Iniciador Único), LAMP (Amplificación Isotérmica mediada por Bucle.), SDA (amplificación por desplazamiento de cadena), NASBA (Amplificación Basada en Secuencia de Ácido Nucleico), wGA (Amplificación de Genoma Completo), pWGA (Amplificación de Genoma Completo basada en primasa), ICAN (Amplificación de Ácidos nucleicos iniciada por iniciador isoterma y quimérico), EXPAR (Reacción de amplificación exponencial), NEAR (Reacción de amplificación de enzimas de corte), RCA (Amplificación de círculo rodante), TMA (Amplificación Mediada por Transcripción).

20 Se reconocerá por los expertos en la técnica que se puede fabricar una pluralidad de dispositivos centrípetos fluidicos con aplicaciones específicas en mente, permitiendo la definición del volumen de la muestra, la homogeneización de la muestra, la lisis de la muestra, la medición de la muestra, la dilución de la muestra, la mezcla de la muestra y la detección de la muestra.

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo es ilustrativo y no se pretende que sea limitante.

El presente ejemplo se refiere a la detección de la presencia de estreptococos del Grupo B a partir de una torunda vaginal-anal de mujer embarazada.

35 El dispositivo centrípeto fluidoico usado para el propósito de este ejemplo tiene la forma externa descrita en la FIG. 1C y está compuesto de los elementos fluidoicos mostrados y descritos en la FIG. 17.

Tabla 1. Compendio de los detalles de las estructuras de dispositivos centrípetos fluidoicos

Capa Fluídica	Material: policarbonato transparente (Lexan HP1-112) Proceso de fabricación: moldeado por inyección + micromolienda de la salida de la cámara de lisis y la salida de la cámara de retención
Capa inferior delgada	Policarbonato (espesor = 0,015" (0,0381 cm)) (McMaster Carr #85585K14)
Adhesivo sensible a la presión	9493R, 3M™
Miembro desplazable	Elementos Magnéticos de Movimiento de Agitación de Acero Inoxidable V&P Scientific, Inc. #721-F (diámetro = 4 mm, espesor = 0,5 mm)
Reactivos de cámara de lisis	Suspensión de cuentas de vidrio G1145 en solución acuosa de PVP al 1%
Reactivos de PCR	2 µl de iniciadores GBS específicos

ES 2 653 916 T3

	<p>Sag59 TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA</p> <p>Sag190 GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT</p> <p>Sonda Taqman:</p> <p>(FAM)CCCAGCAAATGGCTCAAAGC(BHQ-1)OmniMix HS (Takara #700-2102)</p>
Recipiente de líquido	<p>Pajita de restaurante de plástico (diámetro = 4 mm)</p> <p>Pegamento caliente Arrow BAP 5-4</p> <p>Cera de parafina (Calwax® #CAL-140)</p> <p>Agua tratada por PCR</p>
Cámara de residuos	<p>Cera de parafina (Calwax® #CAL-120)</p>

El recipiente de líquido se fabricó usando el siguiente protocolo: cerrar una extremidad de la pajita de plástico con pegamento caliente; cargar 140 µl de agua tratada por PCR; sellar el recipiente con cera de parafina fundida.

5 El dispositivo centrípeto fluídico se ensambló usando el siguiente protocolo: colocar un disco paramagnético en la cámara de lisis; cargar 60 µl de suspensión de cuentas de vidrio; cargar 2 µl de iniciadores en cada cubeta; cargar 0,5 µl de sonda TaqMan; secar la suspensión y los iniciadores al vacío durante la noche; colocar el recipiente de líquido en la cámara de retención; dispensar cera de Parafina de Bajo Punto de Fusión en la cámara de residuos.

10 Los siguientes pasos se hacen en una guantera sometida a una atmósfera de argón: colocar una cuenta de OmniMix HS por cubeta de detección; unir la capa inferior delgada a la capa fluídica usando el adhesivo sensible a la presión; colocar el dispositivo centrípeto fluídico ensamblado en una bolsa de aluminio con desecante y sellar la bolsa.

Experimento

Durante un estudio clínico, se recogieron torundas vaginales/anales de mujeres embarazadas usando la tecnología de válvula de retención de Empaquetado Clínico llena con 600 µl de Tris EDTA 10 mM (TE).

15 Después de la resuspensión de la torunda con los 600 µl de TE, se coloca una cantidad de 170 µl de la solución de la torunda directamente en el receptáculo de admisión del dispositivo centrípeto fluídico descrito anteriormente.

El dispositivo centrípeto fluídico está conectado al instrumento y se realiza el siguiente protocolo en el instrumento de control de temperatura de doble zona para la preparación de la muestra.

Los parámetros para la medición, la lisis y el control de los inhibidores de la PCR usados en este ejemplo son los siguientes:

20 Tabla 2. Carga de la cámara que se puede llenar por la parte inferior

Paso	Parámetros	Condición
1	Aceleración	Velocidad -900 RPM, tasa de aceleración 50 RPM/s
2	Esperar	25 s

Tabla 3. Paso de lisis

Paso	Parámetros	Condición
3	Aceleración	Velocidad -200 RPM, tasa de aceleración 1.000 RPM/s
4	Esperar	300 s

ES 2 653 916 T3

Tabla 4. Paso de clarificación y transferencia a receptáculo de cámara de retención

Paso	Parámetros	Condición
5	Aceleración	Velocidad -3.500 RPM, tasa de aceleración 50 RPM/s
6	Esperar	60 s

Tabla 5. Control de inhibidores de PCR

Paso	Parámetros	Condición
7	Aceleración	Velocidad -600 RPM, tasa de aceleración 50 RPM/s
8	Zona de calor #1	Temp 110°C, 180 s
9	Esperar	20 s

5

Tabla 6. Llenado de cubeta de PCR

Paso	Parámetros	Condición
10	Aceleración	Velocidad -3.000 RPM, tasa de aceleración 500 RPM/s
11	Espera	155 s
12	Parar zona de calentamiento #1	
13	Arrancar zona de soplador #2	
14	Esperar	30 s
15	Parar zona de soplador #2	
16	Parar	

El dispositivo centrípeto fluídico entonces se transfiere sobre un rotor adaptado diseñado específicamente para trabajar en un Rotor-Gene para procesar la PCR en tiempo real usando las siguientes condiciones.

Tabla 7. Condiciones del proceso

Ciclo		Punto de ciclo
Mantener	@ 94°C, 3 min	
Alternar (45)		Paso 1 @ 95°C, mantener 20 s
		Paso 2 @ 56°C, mantener 60 s
		Paso 3 @ 72°C, mantener 30 s

10

Resultados:

La torunda encontró positivo para la presencia de detección de GBS en una CT de 28,30.

Ejemplo 2

El siguiente ejemplo es ilustrativo y no se pretende que sea limitante.

15 El presente ejemplo se refiere al uso de una realización ejemplo del dispositivo centrípeto fluídico para detectar la presencia de estreptococos del Grupo B a partir de torundas vaginales-anales de mujeres embarazadas.

ES 2 653 916 T3

El dispositivo centrípeto fluídico usado con el propósito de este ejemplo tiene la forma externa descrita en la FIG. 1C y está compuesto de los elementos fluídicos mostrados y descritos en la FIG. 17.

Tabla 8. Compendio de los detalles de las estructuras de dispositivos centrípetos fluídicos

Capa Fluídica	Material: policarbonato transparente (Lexan HP1-112) Proceso de fabricación: Moldeado por inyección
Capa inferior delgada	Policarbonato (espesor = 0,015" (0,0381 cm)) (McMaster Carr #85585K14)
Adhesivo sensible a la presión	9795R, 3M™, en contacto con la capa fluídica 467 MP, 3M™, en contacto con la capa inferior y la capa 9795R
Miembro desplazable	Elementos Magnéticos de Movimiento de Agitación de Acero Inoxidable V&P Scientific, Inc. #721-F (diámetro = 4 mm, espesor = 0,5 mm)
Reactivos de cámara de lisis (cámara que se puede llenar por la parte inferior)	Suspensión de cuentas de vidrio #G1145 (150-212 micras) en solución acuosa de PVP al 0,5%
Reactivos PCR, secados en cada cubeta, por reacción	Iniciadores y sondas para los ensayos GBS como se enumera en la Tabla 15 a 0,4 µM para iniciadores SEQ ID 1-2 y SEQ ID 4-5; 0,2 µM para sondas SEQ ID 3 y SEQ ID 6; secuencia objetivo de control interno SEQ ID 7 a 500 copias por reacción Tampón de PCR, 1X BSA, 3,3 mg/ml dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dTTP, 0,2 mM Polimerasa GoTaq™, Promega #PRM3005 Trehalosa, 6%
Recipiente de líquido	Tubos de Polialómero, 5 x 20 mm Beckman Coulter #34263 Pegamento caliente Arrow BAP 5-4 Cera de parafina (Calwax® #CAL-140) Líquido diluyente de PCR (5,83 mM MgCl ₂)
Cámara de residuos	Cera de parafina (Calwax® #CAL-120)

- 5 El recipiente de líquido se fabricó usando el siguiente protocolo: cargar 120 µl de líquido diluyente de PCR; sellar el tubo de polialómero con pegamento caliente Arrow BAP 5-4.

El dispositivo centrípeto fluídico se ensambló usando el siguiente protocolo: Colocar el disco paramagnético en la cámara de lisis; cargar 60 µl de suspensión de cuentas de vidrio; cargar 4,6 µl de reactivos de PCR en cada cubeta; secar la suspensión y los reactivos de PCR sometido a calor y vacío; colocar el recipiente de líquido en la cámara de retención; dispensar cera de Parafina de Bajo Punto de Fusión en la cámara de residuos.

- 10

Unir las capas premontadas 9795R/467 MP/policarbonato a la capa fluídica y aplicar una presión usando una prensa con un par de apriete de 10,1 Nm (90 in.lbs). Colocar el dispositivo centrípeto fluídico ensamblado en una bolsa de aluminio con desecante y sellar la bolsa.

Experimento

Durante un estudio clínico, se recogieron torundas vaginales/anales de mujeres embarazadas usando la tecnología de válvula de cierre de Empaquetado Médico llena con 600 µl de Tris EDTA 10 mM (TE).

5 Después de la resuspensión de la torunda con los 600 µl de TE, se colocan 170 µl de la dilución de la torunda directamente en el receptáculo de admisión de muestra del dispositivo centrípeto fluídico descrito anteriormente.

El dispositivo centrípeto fluídico se coloca en el instrumento y se realiza el siguiente protocolo en el instrumento de control de temperatura de doble zona para la preparación de la muestra.

Los parámetros para la medición, la lisis y el control de los inhibidores de PCR usados en este ejemplo son los siguientes:

10 Tabla 9. Carga de la cámara que se puede llenar por la parte inferior

Paso	Parámetros	Condición
1	Aceleración	Velocidad -1.000 RPM, tasa de aceleración 300 RPM/s
2	Esperar	30 s

Tabla 10. Paso de lisis

Paso	Parámetros	Condición
3	Aceleración	Velocidad -180 RPM, tasa de aceleración 1.000 RPM/s
4	Esperar	300 s

Tabla 11. Paso de clarificación y transferencia a receptáculo de cámara de retención

Paso	Parámetros	Condición
5	Aceleración	Velocidad -1.500 RPM, tasa de aceleración 50 RPM/s
6	Aceleración	Velocidad -3.500 RPM, tasa de aceleración 300 RPM/s
7	Esperar	30 s

15

Tabla 12. Control de inhibidores de PCR mediante calentamiento y dilución de fluido

Paso	Parámetros	Condición
8	Aceleración	Velocidad -450 RPM, tasa de aceleración 1.000 RPM/s
9	Zona de calor #1	Temp 165°C, 180 s
10	Esperar	Velocidad -3.000 RPM, tasa de aceleración 300 RPM/s

Tabla 6. Llenado de cubeta de PCR

Paso	Parámetros	Condición
11	Aceleración	Velocidad -3.000 RPM, tasa de aceleración 500 RPM/s
12	Espera	155 s
13	Parar zona de calentamiento #1	
14	Arrancar zona de soplador #2	

ES 2 653 916 T3

15	Esperar	30 s
16	Parar zona de soplador #2	
17	Parar	

El dispositivo centrífugo líquido entonces se transfiere sobre un rotor adaptado diseñado específicamente para trabajar en un Rotor-Gene para procesar la PCR en tiempo real usando las siguientes condiciones.

Tabla 7. Condiciones del termociclo

Ciclo		Punto de ciclo
Mantener	@ 94°C, 3 min	
Alternar (45)		Paso 1 @ 97°C, mantener 20 s
		Paso 2 @ 58°C, mantener 20 s
		Paso 3 @ 72°C, mantener 20 s

5 Resultados:

Las torundas se encontraron positivas para la presencia de detección de GBS en una CT entre 27 y 32.

Ejemplo 3

El siguiente ejemplo es ilustrativo y no se pretende que sea limitante.

- 10 El presente ejemplo se refiere al uso de una realización ejemplo del dispositivo centrífugo líquido para detectar la presencia de gen de beta-globina humana de una muestra de torunda de mejilla humana, *Escherichia coli* de muestras de orina humana y *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) de muestras de torundas de nariz humana.

Tabla 15. Lista de iniciadores de amplificación seleccionados y sondas de detección para los diferentes ensayos

Combinación de ensayo	Tipo de oligonucleótido	SEQ ID	Secuencia a
GBS	Iniciador de amplificación	SED ID 1	TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA
	Iniciador de amplificación	SED ID 2	GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT
	Sonda Taqman de Detección FAM-BHQ	SED ID 3	CCCAGCAAATGGCTCAAAAGC
	Iniciador de Amplificación de IC	SED ID 4	TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA
	Iniciador de Amplificación de IC	SED ID 5	GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT
	Sonda Taqman de Detección de IC Cal Red-BHQ	SED ID 6	TCTCTTGGATCTTGCTCATGCCCC
	Objetivo de IC	SED ID 7	TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTAAGCTT GTAATGGACCTCCCGGTGGAACACGGT TACTTCTAGATAATCTCTTGGATCTTG CTCATGCCCCATTCACTCATACATCCAC TTTTGCAAAGGCTGGAGTGCCCAAG TTTGGTGAAGTTTTTAACACCTACCTCG GGTCTCCAAGGATACTGGGATCCATAT CCAATCGATATCAAAGATAATGTTCAG GGAAC
B globina	Iniciador de Amplificación	SED ID 8	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

ES 2 653 916 T3

	Iniciador de Amplificación	SED ID 9	CAACTTCATCCACGTTCCACC
	Sonda Taqman de Detección FAM-BHQ	SED ID 10	CATCACTTAGACCTCACCCCTGTGGAG
UTI / E. coli	Iniciador de Amplificación	SED ID 11	GTGGGAAGCGAAAATCCTG
	Iniciador de Amplificación	SED ID 12	CCAGTACAGGTAGACTTCTG
	Sonda LNA Taqman de Detección FAM-BHQ	SED ID 13	CTTCTTcacCAAcTTTgATG
	Iniciador de Amplificación de IC	SED ID 14	GTGGGAAGCGAAAATCCTG
	Iniciador de Amplificación de IC	SED ID 15	CCAGTACAGGTAGACTTCTG
	Sonda Taqman de Detección de IC Cal Red-BHQ	SED ID 16	TCTCTTGGATCTTGCTCATGCCCC
	Objetivo de IC	SED ID 17	GGGAAGCGAAAATCCTGCTTCTTTACA GCCTCCATCAGGGTTTTTAATTCATGCT GAGCTTGTAAATGGACCTCCCGGTGGAA CACGGTTTACTTCTAGATAATCTCTTGG ATCTTGCTCATGCCCCATTCATCATA ATCCACTTTTGCAAAGGCTGGAGTGT CCCAAGTTTGGTGAAGTTTTTAACACCT ACCTCGGGTCTCCAAGGATACTGGGAT CCATATCCAATCGATATGGAATTTAAA CCACCGTGTATTGTTTTATCGACAATCG GGATATCAAACCCGGGAAACTAGAAG GCAAAGCACACAGCAGTGAGCAACA CATCTTCATCAACTCCAGAAGTCTACCT GTA
MRSA	Iniciador de amplificación	SED ID 14	GGATCAAACGGCCTGCACA
	Iniciador de amplificación	SED ID 15	GTCAAAAATCATGAACCTCATTACTTAT G
	Iniciador de amplificación	SED ID 16	ATTTTCATATATGTAATTCCTCCACATCT C
	Iniciador de amplificación	SED ID 17	CAAATATTATCTCGTAATTTACCTTGTT C
	Iniciador de amplificación	SED ID 18	CTCTGCTTTATATTATAAAATTACGGCT G
	Iniciador de amplificación	SED ID 19	CACTTTTTATTCTTCAAAGATTTGAGC
	Sonda Taqman de Detección FAM-BHQ	SED ID 20	CGTCTTACAACGCAGTAACTACGCACT ATCATTACAGC
	Iniciador de amplificación de IC	SED ID 21	CAAATATTATCTCGTAATTTACCTTGTT C
	Iniciador de amplificación de IC	SED ID 22	CTCTGCTTTATATTATAAAATTACGGCT G
	Sonda Taqman de Detección de IC Cal Red-BHQ	SED ID 23	ATGCCTCTTCACATTGCTCCACCTTTCC TGTG
	Objetivo de IC	SED ID 24	TCTCGTAATTTACCTTGTTGGAAGGTCG

ES 2 653 916 T3

			<p>GTACAAACAGTCACCGGAGTAGAGATG TTGAAATTGCAGGCCAAATTGATTGATTT CACCAGCTGTATTAGAAGTACAAGAAG GTTGGTTACAACCCAAAGACAGCTGTG CATGAATTGCAGAAAATTTATTGCAGC TTCGCCACAGGAAAGGTGGAGCAATGT GAAGAGGCATCATGCCATCTGCTGTAG GCTATCAACCAATGGTAAGACTCTTCT GGAAGCAATTGAGCTATGGTCATGCCA GGTGACAACATATGATGAGTCATCAGC CGTAATTTTATAATATAAAGCAGAG</p>
<p>^a Minúscula en sonda LNA Taqman indica Locked nucleic acids (LNA™)</p>			

Tabla 16. Compendio de los detalles de las estructuras de dispositivos centrífugos fluidicos

Capa Fluídica	<p>Material: Policarbonato transparente (Lexan HP1-112) Proceso de fabricación: Moldeado por inyección</p>
Capa inferior delgada	<p>Policarbonato (espesor = 0,015" (0,0381 cm)) (McMaster Carr #85585K14)</p>
Adhesivos sensibles a la presión	<p>9795R, 3M™, en contacto con la capa fluídica 467 MP, 3M™, en contacto con la capa inferior y la capa 9795R</p>
Miembro desplazable	<p>Elementos Magnéticos de Movimiento de Agitación de Acero Inoxidable V&P Scientific, Inc. #721-F (diámetro = 4 mm, espesor = 0,5 mm)</p>
Reactivos de cámara de lisis (cámara que se puede llenar por la parte inferior)	<p>Suspensión de cuentas de vidrio #G1145 (150-212 micras) en solución acuosa de PVP al 0,5%</p>
Reactivos de PCR, secados en cubetas, por reacción	<p>Iniciadores y sondas para los diferentes ensayos como se enumera en la Tabla 15 a concentraciones que oscilan desde 0,2-1,0 µM dependiendo del ensayo. Los controles internos cuando están presentes en los múltiples ensayos fueron a 500 copias por cubeta BSA, 2,15 mg/ml 1,15 Unidades de polimerasa, Trehalosa (Eurogentec) HGS Diamond Taq, 6%</p>
Recipiente de líquido	<p>Tubos de Polialómero, 5 x 20 mm Beckman Coulter #34263 Pegamento caliente Arrow BAP 5-4 Cera de parafina (Calwax® #CAL-140) 120 µL de líquido diluyente de PCR (3,5 mM MgCl₂ en almacenador temporal HGS PCR 1X)</p>
Cámara de residuos	<p>Cera de parafina (Calwax® #CAL-120)</p>

Los dispositivos centrípetos fluidicos usados con el propósito de este ejemplo tienen la forma externa descrita en la FIG. 1C y están compuestos de los elementos fluidicos mostrados y descritos en la FIG. 17.

Los dispositivos centrípetos fluidicos usados con el propósito de este ejemplo contenían los componentes enumerados en la Tabla 16.

- 5 El recipiente de líquido se fabricó usando el siguiente protocolo: cargar 120 µl de líquido diluyente de PCR; sellar el tubo de polialómero con pegamento caliente Arrow BAP 5-4.

- 10 El dispositivo centrípeto fluidico se ensambló usando el siguiente protocolo: colocar un disco paramagnético en la cámara de lisis; cargar 60 µl de suspensión de cuentas de vidrio; cargar 4,6 µl de reactivos de PCR en cada cubeta; secar la suspensión y los reactivos de PCR sometido a calor y vacío; colocar el recipiente de líquido en la cámara de retención; dispensar cera de Parafina de Bajo Punto de Fusión en la cámara de residuos.

Unir las capas premontadas 9795R/467 MP/polycarbonato a la capa fluidica y aplicar una presión usando una prensa con un par de 10,1 Nm (90 in.lbs).

Experimento

- 15 Se recogió una torunda de cepillado de mejillas de un voluntario humano usando una torunda de Empaquetamiento Médico con tecnología de válvula de retención llenada con 600 µl de Tris EDTA 10 mM (TE). La torunda se puso en contacto con la superficie interna de la mejilla y se dieron vueltas durante 30 s. La torunda se colocó de nuevo en su manguito y la válvula de retención se rompió para liberar los 600 µl de TE. Después de 5 minutos de tiempo de espera, la torunda se agita durante 1 minuto. Esta muestra diluida suspendida sirvió para la prueba.

Muestras de orina recogidas de pacientes se diluyeron 1/56 en TE. Esta muestra diluida sirvió para la prueba.

- 20 Durante un estudio clínico, se recogieron torundas nasales de voluntarios y resuspendieron en 600 µl de TE. Esta muestra diluida suspendida sirvió para la prueba.

Se coloca un volumen de 140 µl de las muestras diluidas directamente en el receptáculo de admisión de muestra del dispositivo centrípeto fluidico descrito anteriormente.

- 25 Los dispositivos centrípetos fluidicos se colocan en el instrumento y los protocolos se realizaron según las Tablas 9, 10, 11, 12 y 13.

En algunas pruebas, el protocolo se pausó y se reanudó en el paso 8 para examinar la posición del fluido en el receptáculo de la cámara de retención.

El termociclo se realizó sometido a cualquiera de las condiciones enumeradas en la Tabla 17 o la Tabla 18, dependiendo del ensayo.

- 30 Tabla 17. Condiciones de termociclo para el ensayo de beta-globina

Ciclo		Punto de ciclo
Mantener	@ 94°C, 3 min	
Alternar (45)		Paso 1 @ 95°C, mantener 5 s
		Paso 2 @ 55°C, mantener 15 s
		Paso 3 @ 72°C, mantener 20 s

Tabla 18. Condiciones de termociclo para ensayos UTI y MRSA

Ciclo		Punto de ciclo
Mantener	@ 99°C, 12 min	
Alternar (45)		Paso 1 @ 95°C, mantener 20 s
		Paso 2 @ 61°C, mantener 40 s
		Paso 3 @ 72°C, mantener 40 s

Resultados:

5 Los controles internos revelaron ninguna inhibición o solamente mínima por las muestras. Todas las muestras que ya se sabía que contenían el ADN objetivo mediante otro método de prueba se encontraron en efecto positivas con el dispositivo centrípeto fluídico y, de manera similar, las muestras que ya se sabía que eran negativas para el ADN objetivo se encontraron en efecto negativas con el dispositivo centrípeto fluídico.

Este ejemplo ilustra la versatilidad de la tecnología centrípeta fluídica de esta invención para detectar ácidos nucleicos a partir de una variedad de muestras biológicas y células. Las muestras fecales diluidas también se probaron con éxito para la detección de patógenos bacterianos responsables de la diarrea.

Ejemplo 4

10 El siguiente ejemplo es ilustrativo y no se pretende que sea limitante.

El presente ejemplo se refiere al uso de una realización ejemplo del dispositivo centrípeto fluídico y más específicamente de la cámara que se puede llenar por la parte inferior y otros elementos de esta invención para concentrar células y microbios.

Tabla 19. Compendio de los detalles de las estructuras del dispositivo centrípeto fluídico.

Capa Fluídica	Material: Policarbonato transparente (Lexan HP1-112) Proceso de fabricación: Moldeado por inyección
Capa inferior delgada	Policarbonato (espesor = 0,015" (0,0381 cm)) (McMaster Carr #85585K14)
Adhesivos sensibles a la presión	9795R, 3M™, en contacto con la capa fluídica 467 MP, 3M™, en contacto con la capa inferior y la capa 9795R
Miembro desplazable	Elementos Magnéticos de Movimiento de Agitación de Acero Inoxidable V&P Scientific, Inc. #721-F (diámetro = 4 mm, espesor = 0,5 mm)
Reactivos de cámara de lisis (cámara que se puede llenar por la parte inferior)	Suspensión de cuentas de vidrio #G1145 (150-212 micras) en solución acuosa de PVP al 0,5%

15 Los dispositivos centrípetos fluídicos usados con el propósito de este ejemplo tienen la forma externa descrita en la FIG. 1C y están compuestos de los elementos fluídicos mostrados y descritos en la FIG. 17.

Los dispositivos centrípetos fluídicos usados con el propósito de este ejemplo contenían los componentes enumerados en la Tabla 19.

20 El dispositivo centrípeto fluídico se ensambló usando el siguiente protocolo: colocar un disco paramagnético en la cámara de lisis; cargar 60 µl de suspensión de cuentas de vidrio; secar la suspensión durante la noche sometido a vacío; unir las capas premontadas 9795R/467 MP/policarbonato a la capa fluídica y aplicar una presión usando una prensa con un par de 10,1 Nm (90 in.lbs).

Experimento

25 Se mezclaron 10 µl (10⁵ Unidades de Formación de Colonias; CFU) de un cultivo diluido de las bacterias *Enterococcus faecalis* con 190 µl de TE.

La mezcla de 200 µl se colocó directamente en el receptáculo de admisión de muestra del dispositivo centrípeto fluídico descrito anteriormente.

30 Los dispositivos centrípetos fluídicos se colocaron en el instrumento y los siguientes protocolos se realizaron según las Tablas 9 y 10.

El dispositivo centrípeto fluídico se desmontó retirando las capas sensibles a la presión de modo que el líquido en la cámara que se puede llenar por la parte inferior y en la cámara de desbordamiento podría ser cosechado y diluido para realizar recuentos de placas de las células bacterianas presentes en cada cámara.

Resultados:

Los recuentos de placas revelaron que el número de células bacterianas era superior en la cámara que se puede llenar por la parte inferior en comparación con el número de células bacterianas presentes en la cámara de desbordamiento en un factor de 1,5 a 3 veces.

- 5 Las realizaciones descritas anteriormente se pretende que sean solamente ejemplares. El alcance de la invención, por lo tanto, se pretende que esté limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo centrípeto fluídico (1) para probar componentes de un material biológico en un fluido, dicho dispositivo centrípeto fluídico (1) que tiene una forma adaptada para ser recibida dentro de un soporte giratorio (2), dicho soporte giratorio que tiene un centro de rotación y un borde externo, dicho dispositivo centrípeto fluídico (1) que se extiende radialmente entre dicho centro de rotación y dicho borde externo, un lado interno de dicho dispositivo centrípeto fluídico que está situado hacia dicho centro de rotación y un lado externo de dicho dispositivo centrípeto fluídico que está situado hacia dicho borde externo, el dispositivo (1) que comprende:
- una capa de componente fluídico (3) que tiene características fluídicas en al menos una cara frontal, dichas características fluídicas que incluyen
- un canal de entrada (302) para hacer circular dicho fluido, dicho canal de entrada que está acoplado a una entrada de cámara (304);
- una cámara que se puede llenar por la parte inferior (315) acoplada a dicho canal de entrada (302) en dicha entrada de cámara (304) para recibir dicho fluido, dicha entrada de cámara (304) que se proporciona en un lado externo de dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior (315), en donde dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior comprende al menos un miembro desplazable (307) que se desplaza dentro de dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior (315) en respuesta a un campo magnético fluctuante externo, la geometría de la entrada de cámara (304) que está adaptada para evitar salidas del miembro desplazable de la cámara que se puede llenar por la parte inferior, dicho canal de entrada que hace circular dicho fluido desde cerca de dicho lado interno a dicha entrada de cámara;
- una salida de excedente (310);
- una cámara de desbordamiento (309) acoplada a dicha salida de excedente (310) para dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior (315), dicha salida de excedente (310) que permite la salida de parte de dicho fluido desde dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior a dicha cámara de desbordamiento (309), en donde dicha salida de excedente se proporciona cerca de dicho lado interno de dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior en un lado longitudinal de dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior;
- un canal de ventilación (305b) que ventila simultáneamente dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior (315) y dicha cámara de desbordamiento (309); y
- una capa de componente inferior (4) unida a dicha capa de componente fluídico (3) creando por ello una red fluídica a través de la cual dicho fluido fluye sometido a la fuerza centrípeta.
2. El dispositivo según la reivindicación 1, que comprende además un receptáculo de admisión (5) para recibir dicho fluido, dicho receptáculo de admisión que se extiende hacia fuera desde dicha capa de componente fluídico (3) en una cara frontal de dicha capa de componente fluídico y que está situado cerca de dicho lado interno, dicho receptáculo de admisión (5) que termina en una salida de receptáculo de admisión, dicho canal de entrada (302) que está acoplado a dicha salida de receptáculo de admisión en un extremo opuesto a dicha entrada de cámara (304).
3. El dispositivo según la reivindicación 1 o 2, en donde la cámara que se puede llenar por la parte inferior comprende además al menos un objeto que no responde a un campo magnético fluctuante (308), donde dicho objeto es al menos uno de una cuenta, una zeolita, una partícula, una partícula de filtración, una cuenta de vidrio, una cuenta de zirconio, una resina, una suspensión de cuenta y resina.
4. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos uno de dicho objeto (208) y dicho miembro desplazable (307) está recubierto con al menos uno de un material quelante y un material de ligando adaptado para interactuar con componentes de dicho fluido.
5. El dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una salida de descarga (312) para dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior (315), dicha salida de descarga que permite la salida de dicho fluido desde dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior, en donde dicha salida de descarga (312) está situada en dicho lado longitudinal de dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior, dicha salida de descarga que está situada más cerca de dicho lado externo de dicha cámara de llenado por la parte inferior que dicha salida de excedente (310), un volumen de medición de dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior que está definida entre dicha salida de descarga y dicha salida de excedente.
6. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una salida de descarga (312) para dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior, dicha salida de descarga que permite la salida de dicho fluido desde dicha cámara que se puede llenar la parte inferior (315), en donde dicha salida de descarga está situada en un lado longitudinal de dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior.

7. El dispositivo según la reivindicación 5 o 6, que comprende además una válvula de purga en dicha salida de descarga, dicha válvula de purga que se abre a una fuerza centrípeta predeterminada aplicada sobre dicho dispositivo, dicha válvula de purga que evita que fluido salga de dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior hasta dicha apertura.
- 5 8. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende además una cámara de retención (403), dicha cámara de retención que está acoplada a dicha salida de descarga (312) en un lado interno de dicha cámara de retención, dicha cámara de retención que está situada más cerca de dicho lado externo de dicha capa de componente fluídico (3) que dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior (315), en donde dicha cámara de retención está acoplada a dicha salida de descarga (312) a través de un canal de medición (314), dicho canal de medición para hacer circular al menos una parte de dicho fluido desde dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior hasta dicha cámara de retención.
- 10 9. El dispositivo según la reivindicación 8, que comprende además un recipiente (409) totalmente provisto en dicha cámara de retención (403) y que contiene un diluyente líquido (410), dicho recipiente que está adaptado para mantener dicho diluyente líquido en dicho recipiente y liberar dicho diluyente líquido en dicha cámara de retención tras la aplicación de una fuerza externa a dicho recipiente, en donde dicha fuerza externa es una de una fuerza mecánica, eléctrica, electromagnética, de calor, de choque y acústica, restaurando por ello la conexión fluídica entre dicho diluyente líquido y dicho fluido en dicha cámara de retención.
- 15 10. El dispositivo según la reivindicación 1, dichas características fluídicas que incluyen además:
- 20 un receptáculo de admisión (5) para recibir dicho fluido, dicho receptáculo de admisión que se extiende hacia fuera desde dicha capa de componente fluídico en una cara frontal de dicha capa de componente fluídico y que está situado cerca de dicho lado interno, dicho receptáculo de admisión que termina en una salida de receptáculo de admisión, dicho canal de entrada (302) que está acoplado a dicha salida de receptáculo de admisión en un extremo;
- 25 una cámara de retención (403), dicha cámara de retención que está acoplada a dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior (315) para recibir dicho fluido en dicha cámara de retención;
- una salida de distribución (405) para dicha cámara de retención, dicha salida de distribución que está situada en un lado externo de dicha cámara de retención;
- 30 un canal de distribución transversal (604) que tiene una serie de al menos una cubeta (602) proporcionada en un lado externo de dicho canal de distribución transversal, dicha salida de distribución (405) que está acoplada a dicho canal de distribución transversal en un lado interno de dicho canal de distribución transversal en un primer extremo transversal de dicho canal de distribución, y
- una cámara de residuos (605) en un segundo extremo transversal de dicho canal de distribución.
11. Un aparato de prueba (1000) que usa un dispositivo centrípeto fluídico para probar componentes de un material biológico en un fluido, el aparato de prueba que comprende:
- 35 al menos uno de dichos dispositivos centrípetos fluídicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un conjunto de rotor (1003);
- un soporte para recibir dicho al menos uno de dicho dispositivo centrípeto fluídico que usa dicha capa de componente fluídico, dicho soporte que está acoplado a dicho rotor;
- un motor (1005) para hacer girar dicho conjunto de rotor;
- 40 un controlador de velocidad (1010) para dicho motor para controlar al menos uno de una duración y una velocidad de rotación de dicho conjunto de rotor;
- un subsistema de acondicionamiento de temperatura (2000) para controlar una temperatura de al menos una parte de dicho dispositivo centrípeto microfluídico;
- un subsistema de detección (1009) para detectar una característica de dicho fluido; y
- 45 una interfaz de usuario (1006) para recibir un comando de usuario y para enviar un comando a al menos uno de dicho controlador de velocidad, dicho subsistema de acondicionamiento de temperatura, dicho subsistema de excitación y dicho subsistema de detección.
12. El aparato de prueba según la reivindicación 11, en donde dicho subsistema de acondicionamiento de temperatura (2000) controla una temperatura de al menos dos zonas de dicho dispositivo centrípeto fluídico.
- 50 13. Un método de prueba que usa un dispositivo centrípeto fluídico (1) para probar componentes de un material biológico en un fluido, el método que comprende:

- 5 proporcionar al menos uno de dichos dispositivos centrífugos fluidicos (1) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; proporcionar un aparato de prueba (1000) según la reivindicación 11 o 12; proporcionar un fluido con material biológico; cargar dicho fluido en dicho receptáculo de admisión (5) de dicho dispositivo centrípeto fluidico; colocar dicho dispositivo centrípeto fluidico (1) en dicho soporte de dicho aparato de prueba; proporcionar un comando de usuario para comenzar una secuencia de prueba; hacer girar dicho conjunto de rotor (1003) a una primera velocidad para transferir dicho fluido desde dicho receptáculo de admisión a dicha cámara que se puede llenar por la parte inferior (315).
- 10 14. El método de ensayo de la reivindicación 13, en donde el fluido se selecciona del grupo que consiste en sangre, aspiración faríngea nasal, fluido oral, líquido de torunda oral resuspendida, líquido de torunda nasal resuspendida, líquido resuspendido de torunda anal, líquido resuspendido de torunda vaginal, saliva y orina.
15. El método de prueba de la reivindicación 13 o 14, para probar al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en iones, azúcares, metabolitos, ácidos grasos, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos.

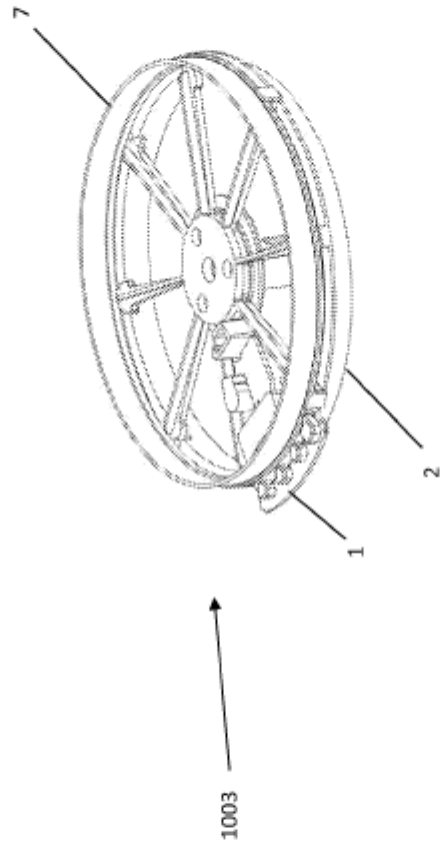


Fig. 1A

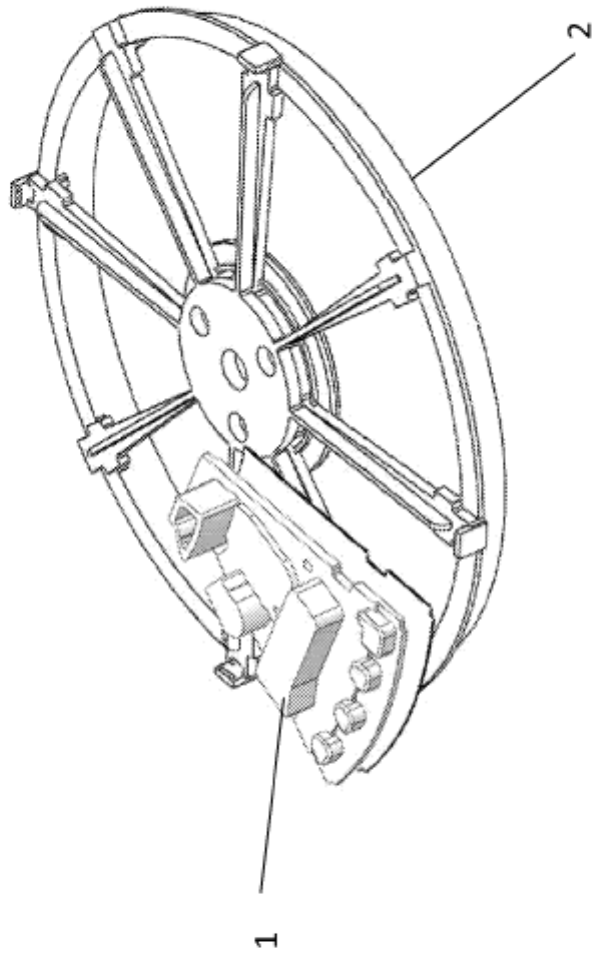


Fig. 1B

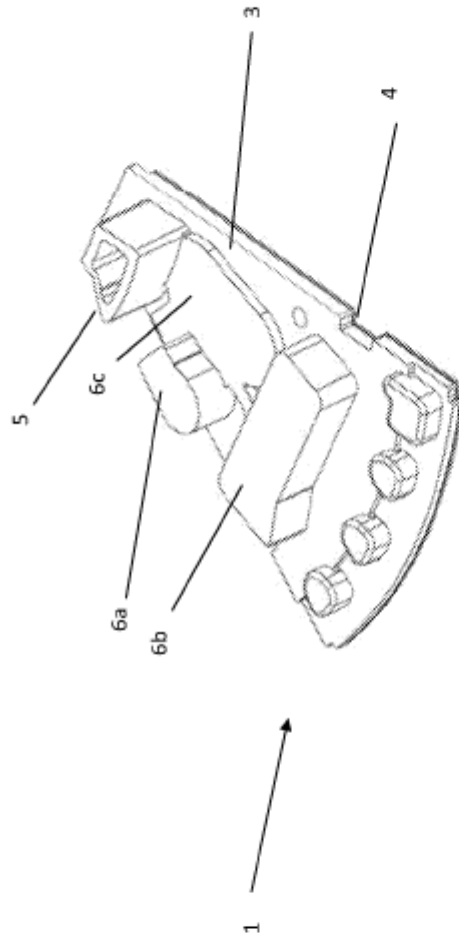


Fig. 1C

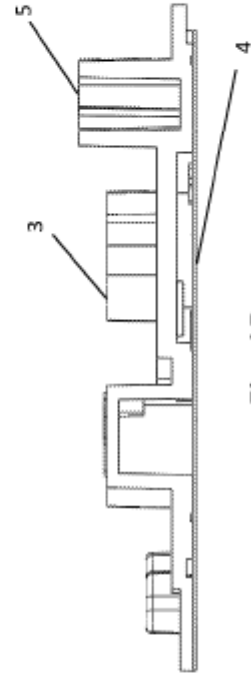


Fig. 1D

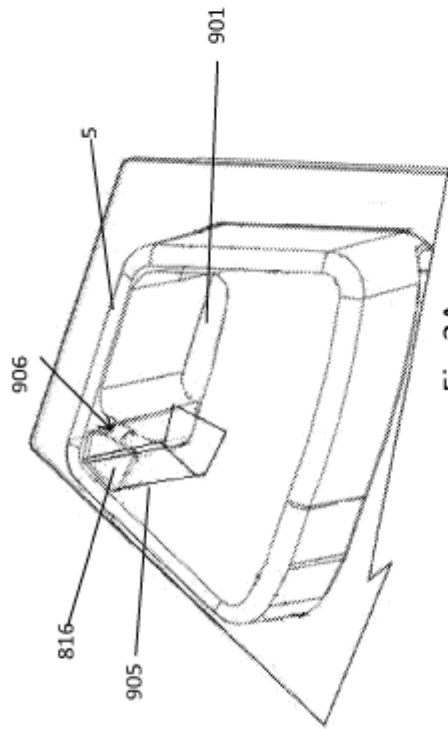


Fig. 2A

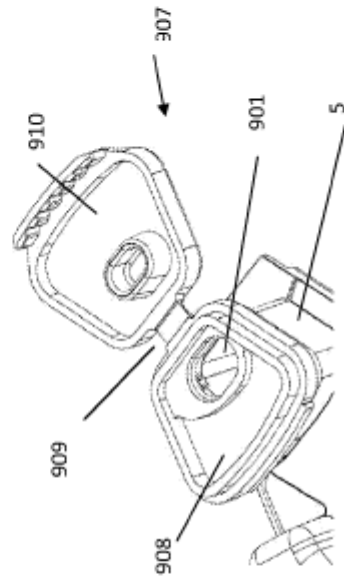


Fig. 2B

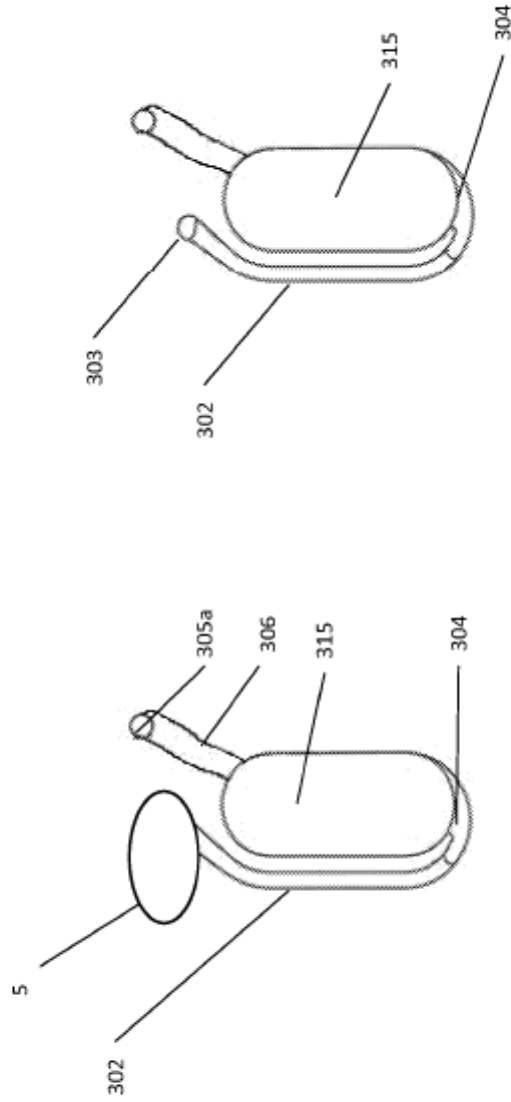


Fig. 3B

Fig. 3A

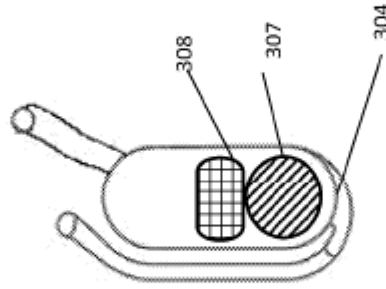


Fig. 4B

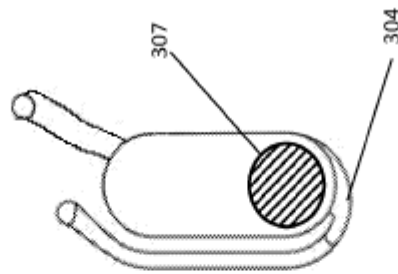


Fig. 4A

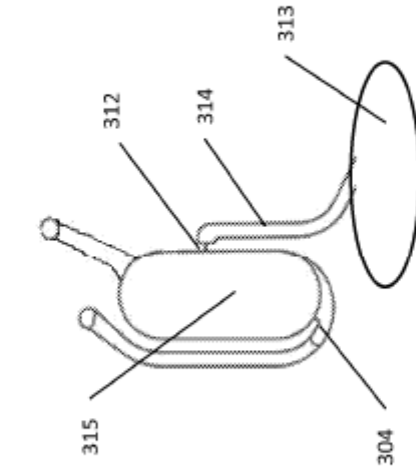


Fig. 6

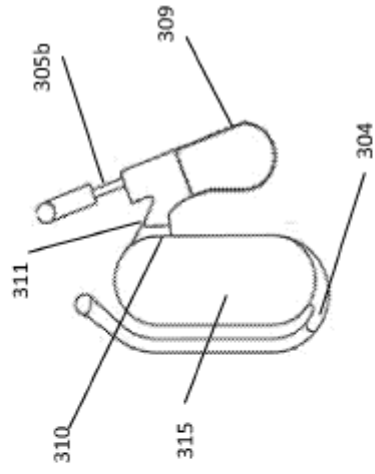


Fig. 5

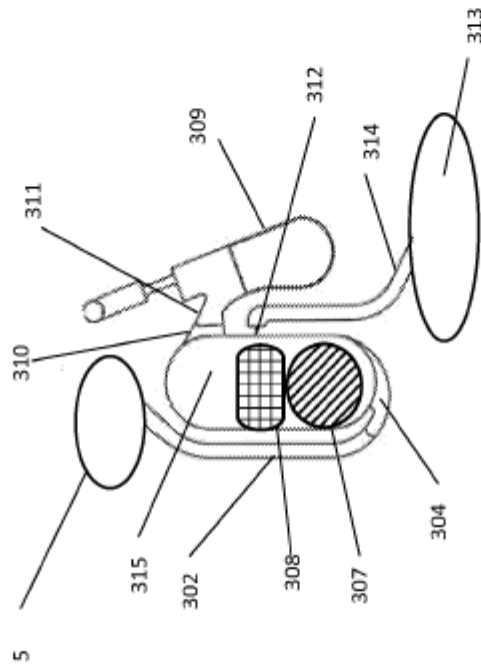


Fig. 7A

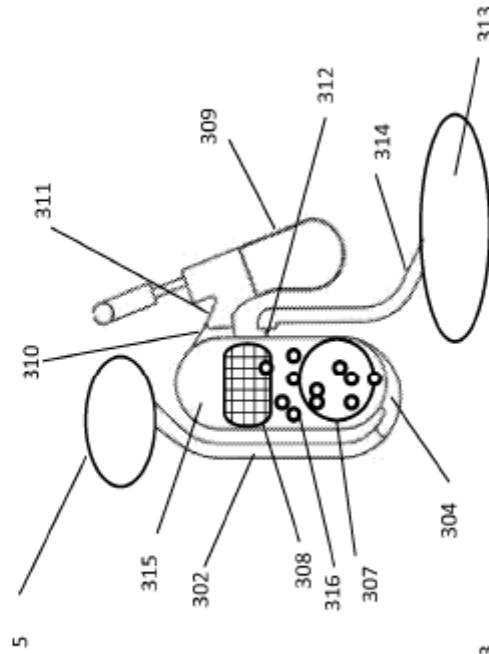


Fig. 7B

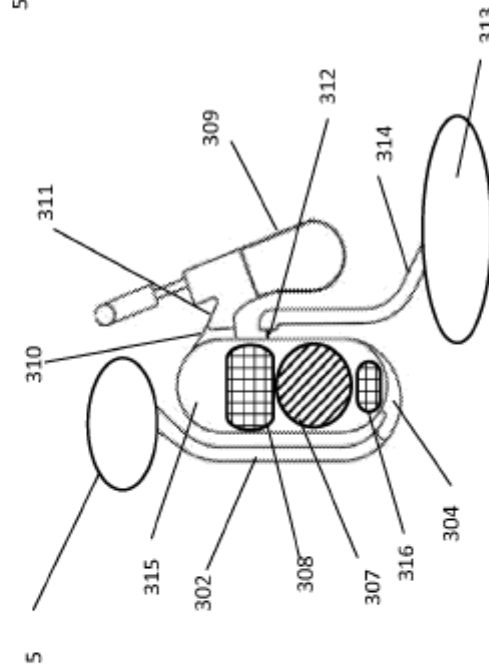


Fig. 7C

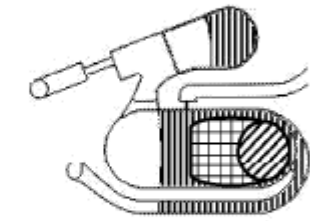


Fig. 8C

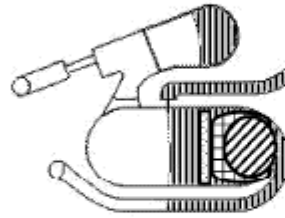


Fig. 8F

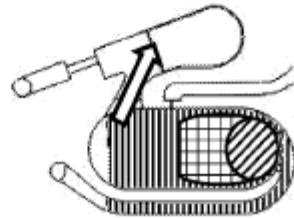


Fig. 8B

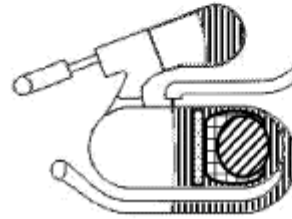


Fig. 8E

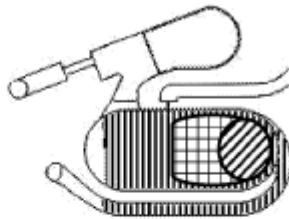


Fig. 8A

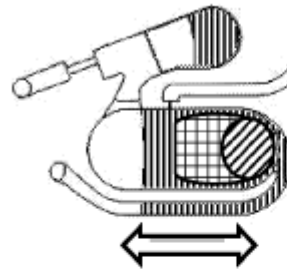


Fig. 8D

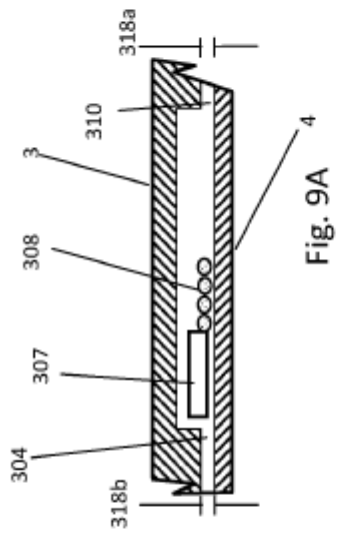


Fig. 9A

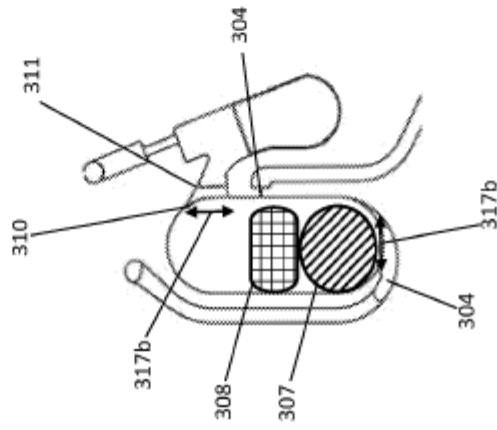


Fig. 9B

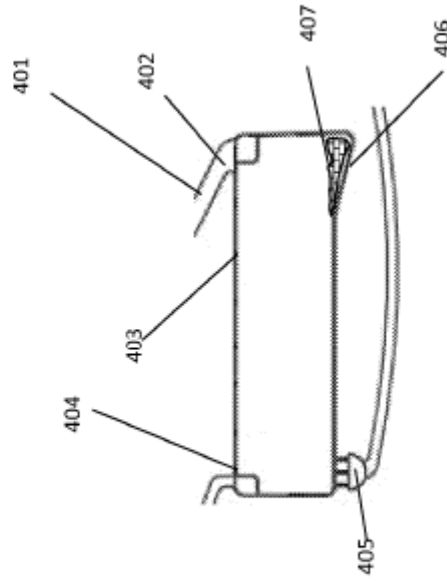


Fig. 10B

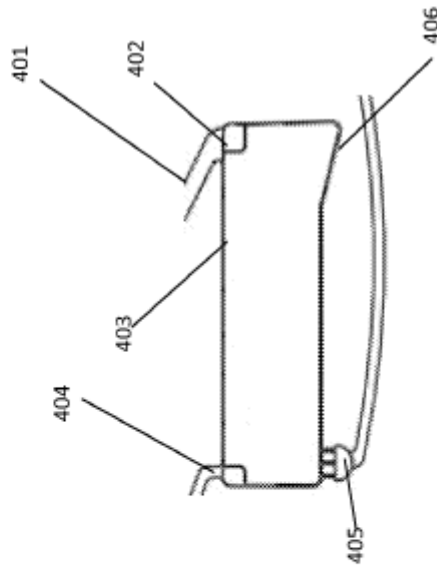


Fig. 10A

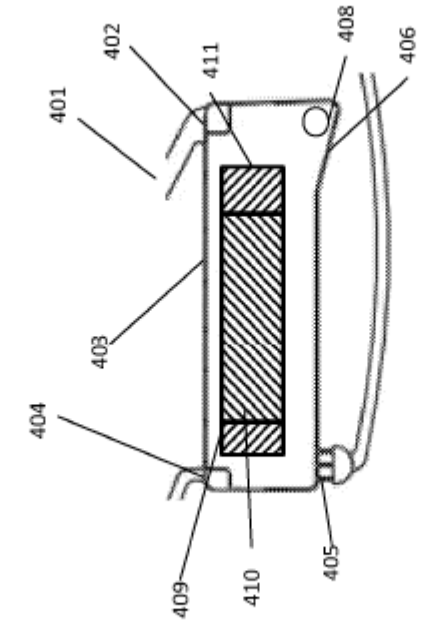


Fig. 10D

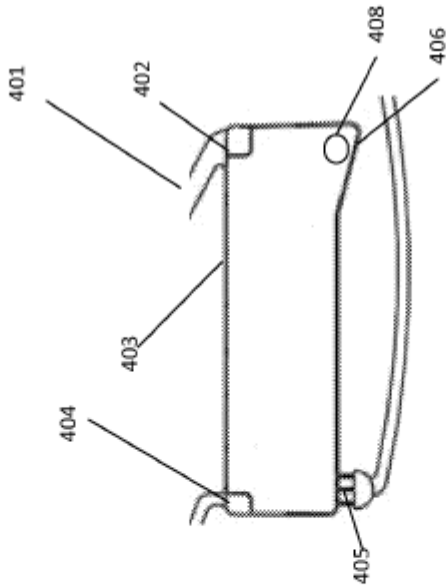
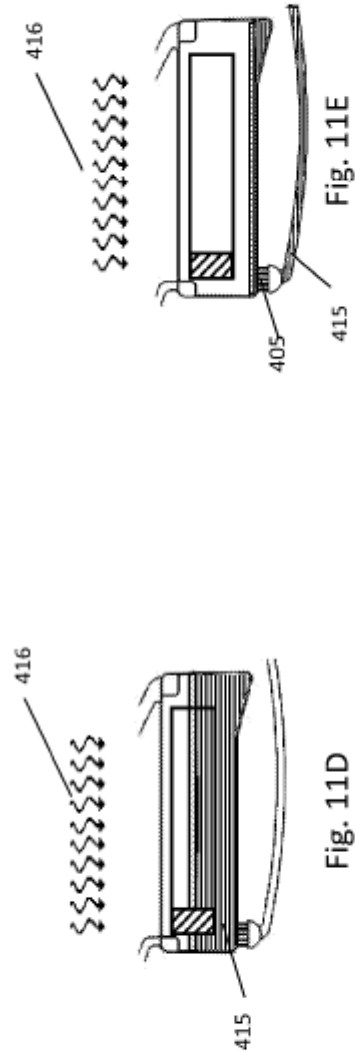
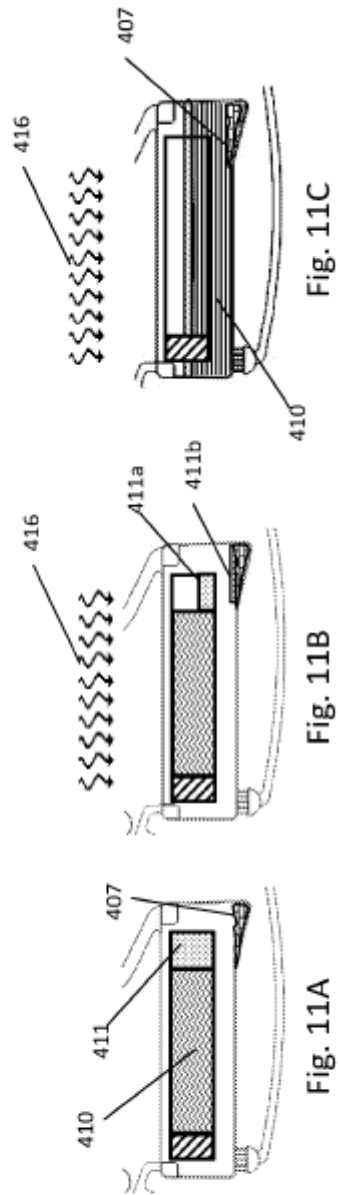


Fig. 10C



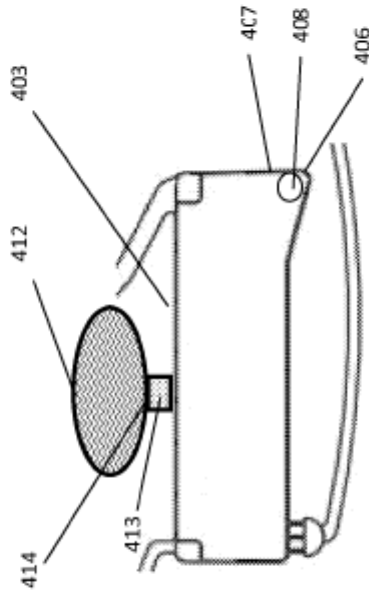


Fig. 12

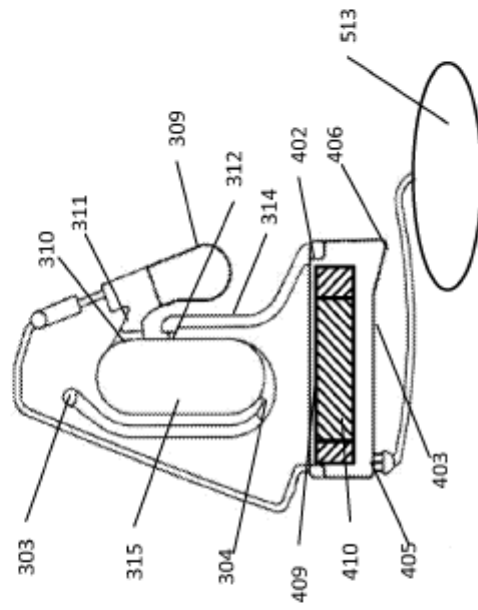


Fig. 13

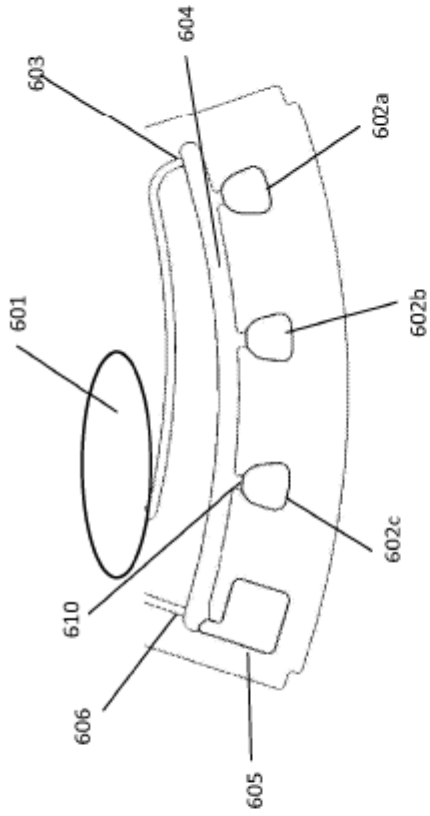


Fig. 14A

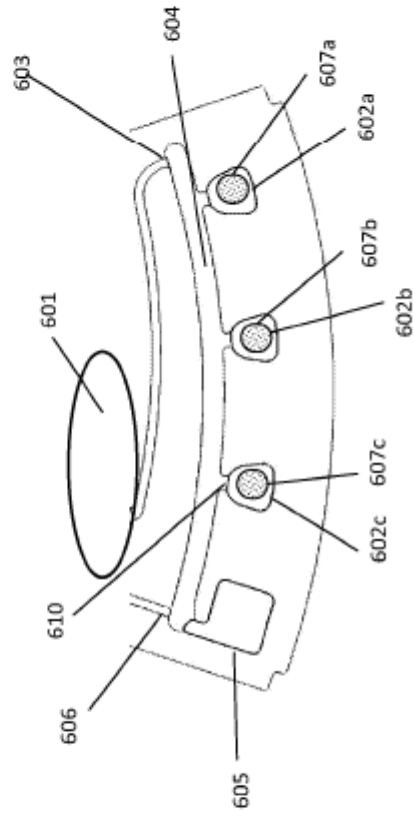


Fig. 14B

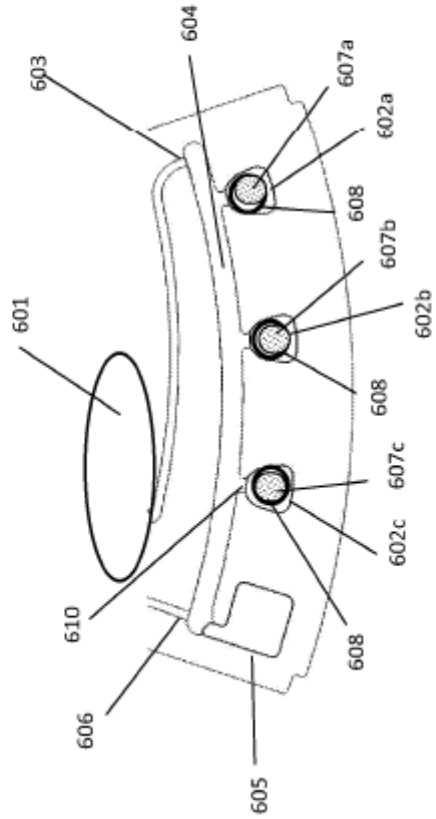


Fig. 14C

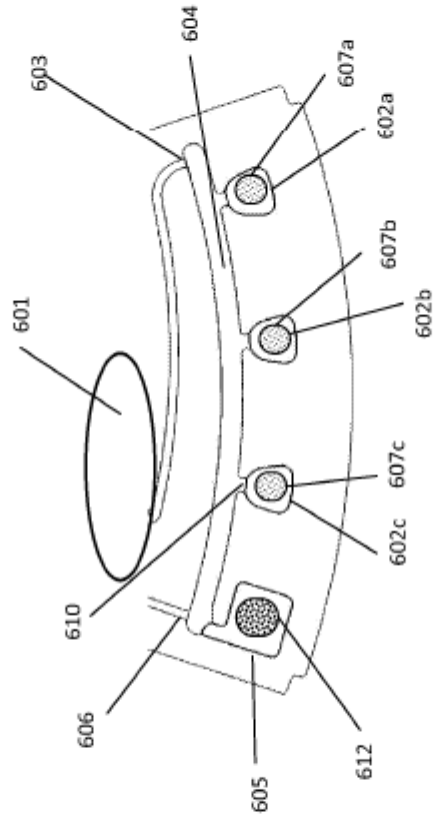


Fig. 14D

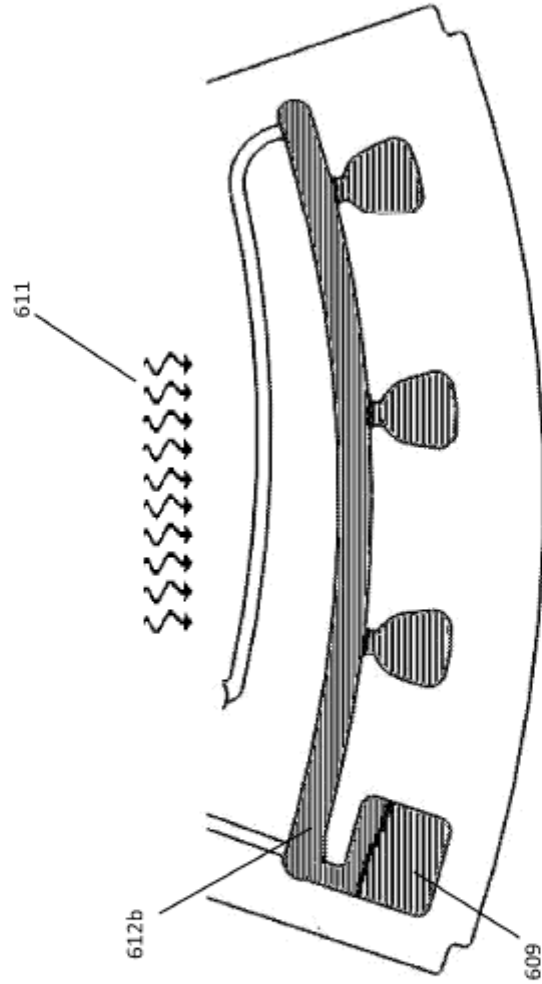


Fig. 15

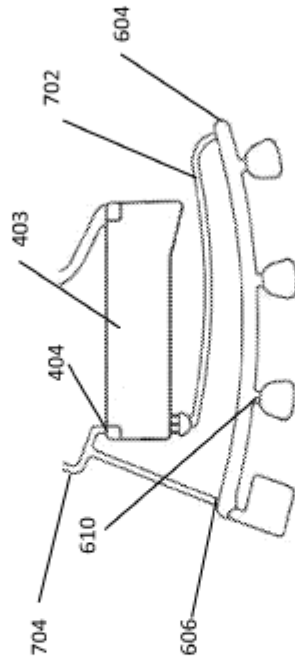


Fig. 16

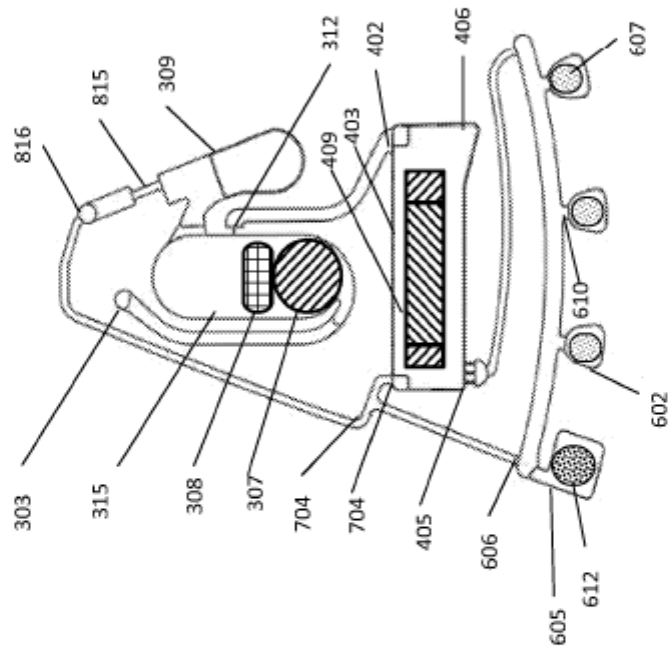


Fig. 17

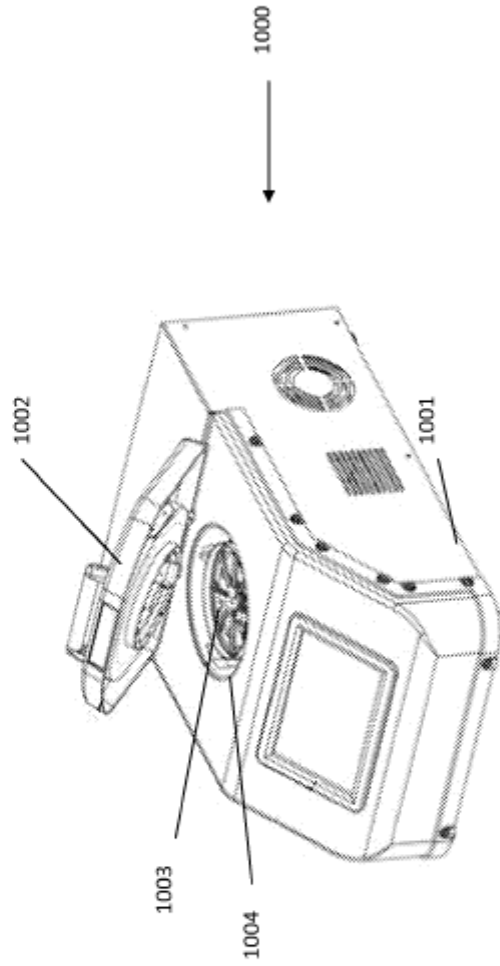


Fig. 18

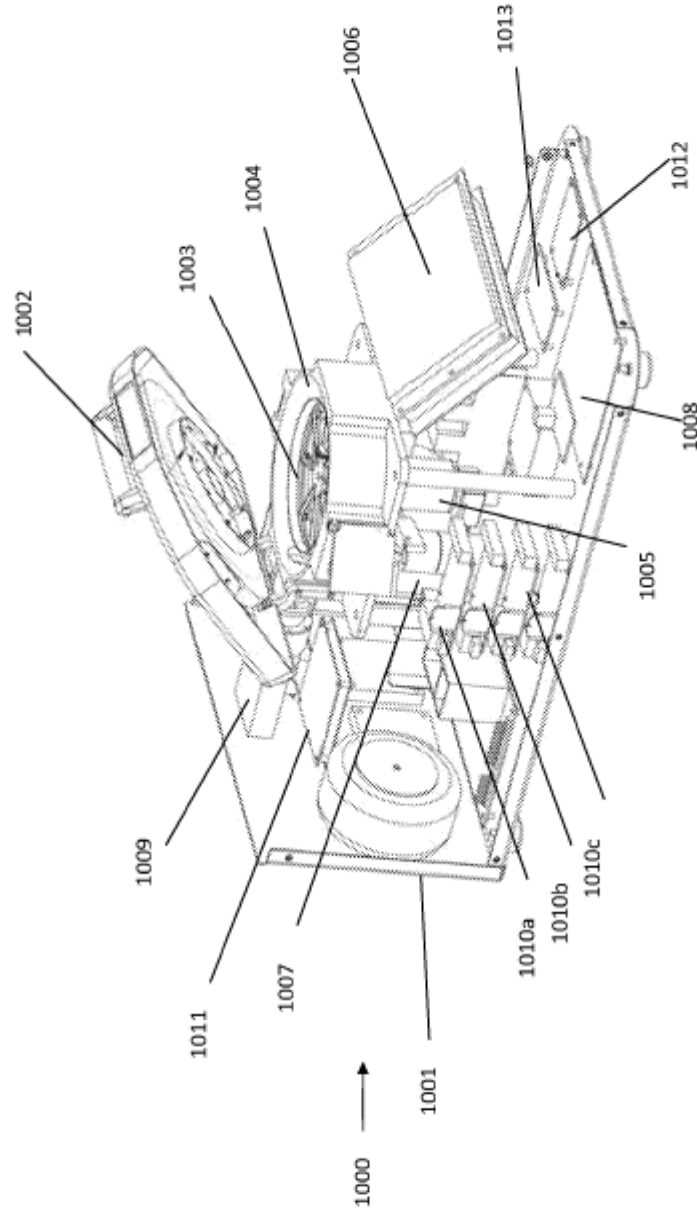


Fig. 19

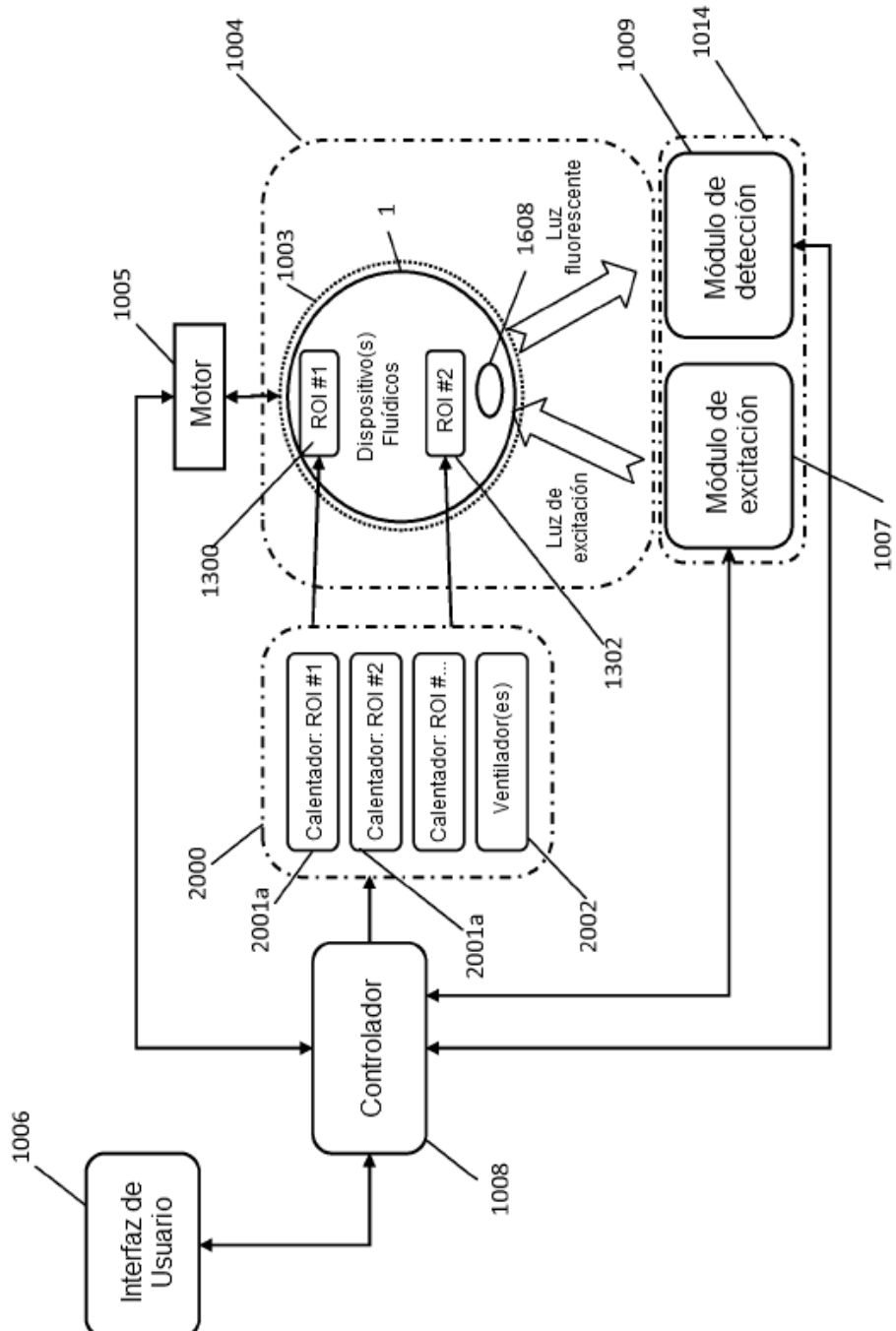


Fig. 20

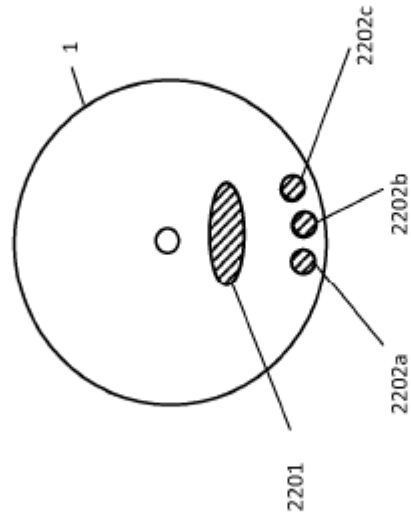


Fig. 22

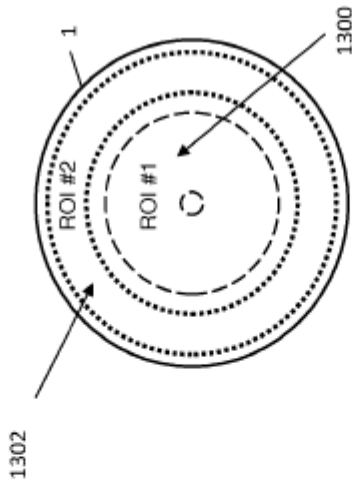


Fig. 21

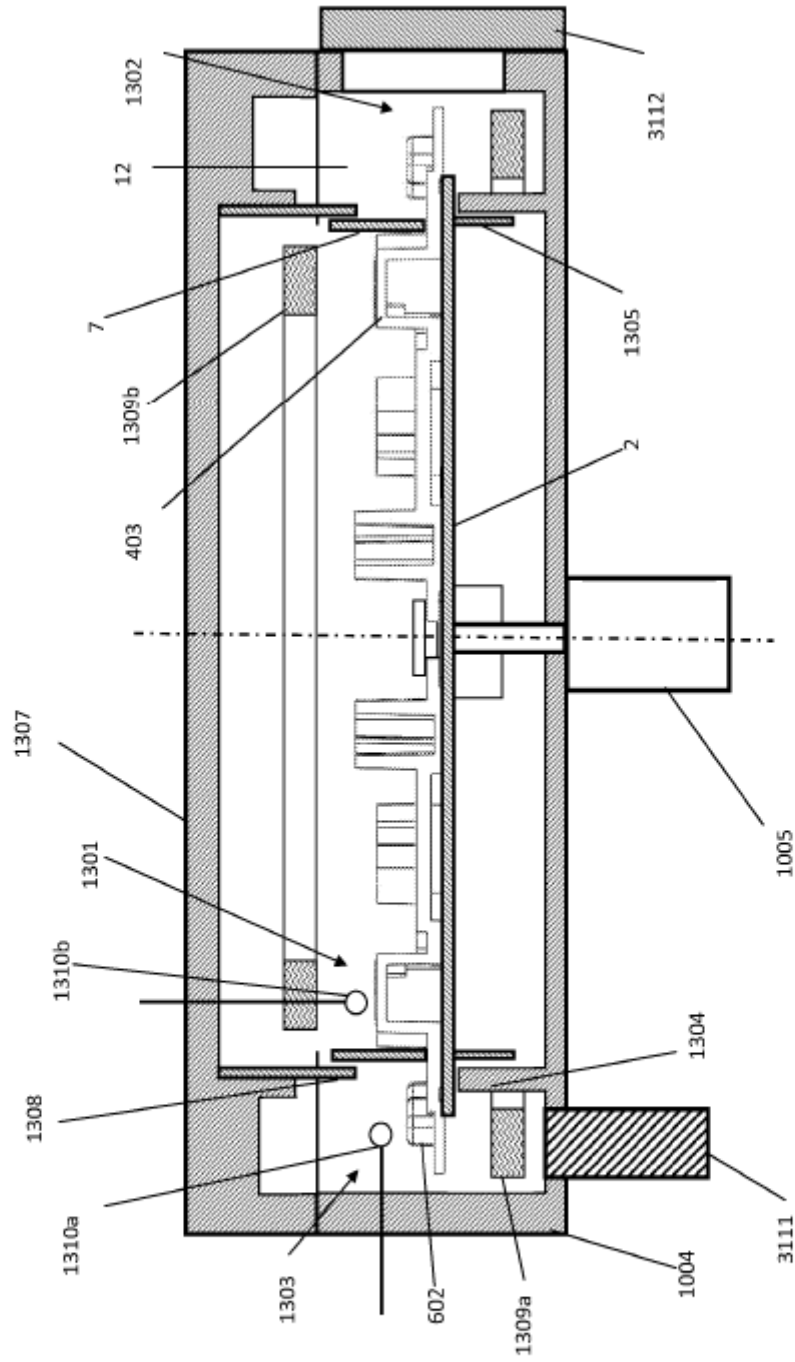


Fig. 23

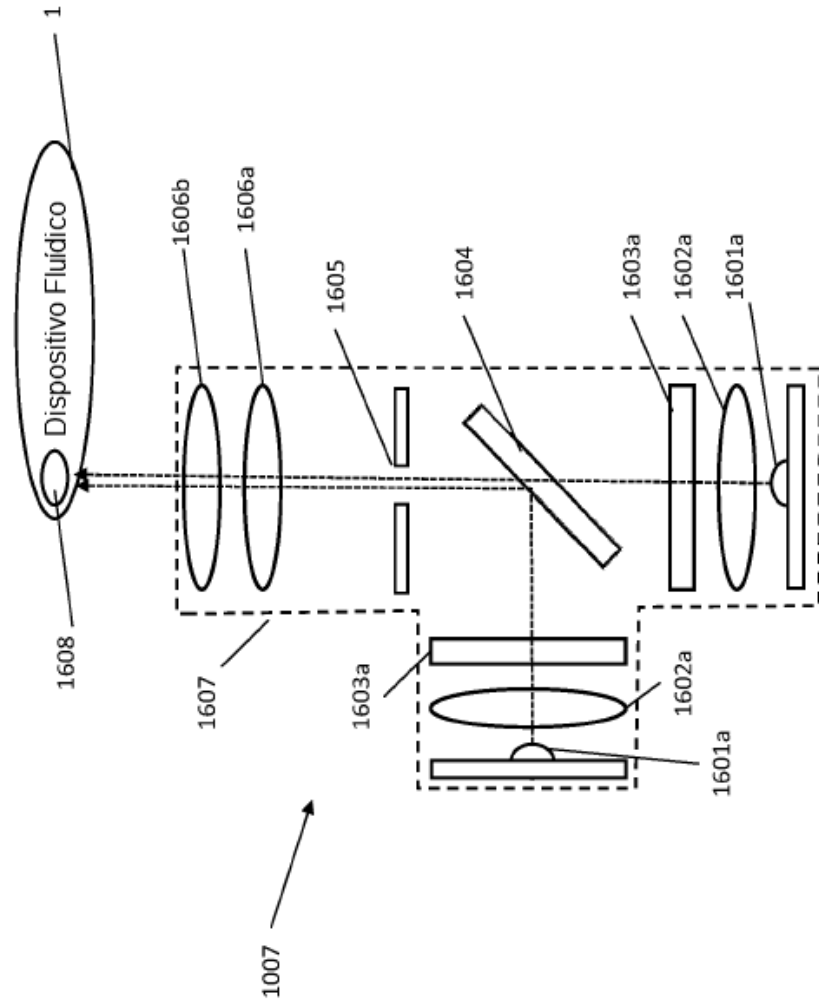


Fig. 24

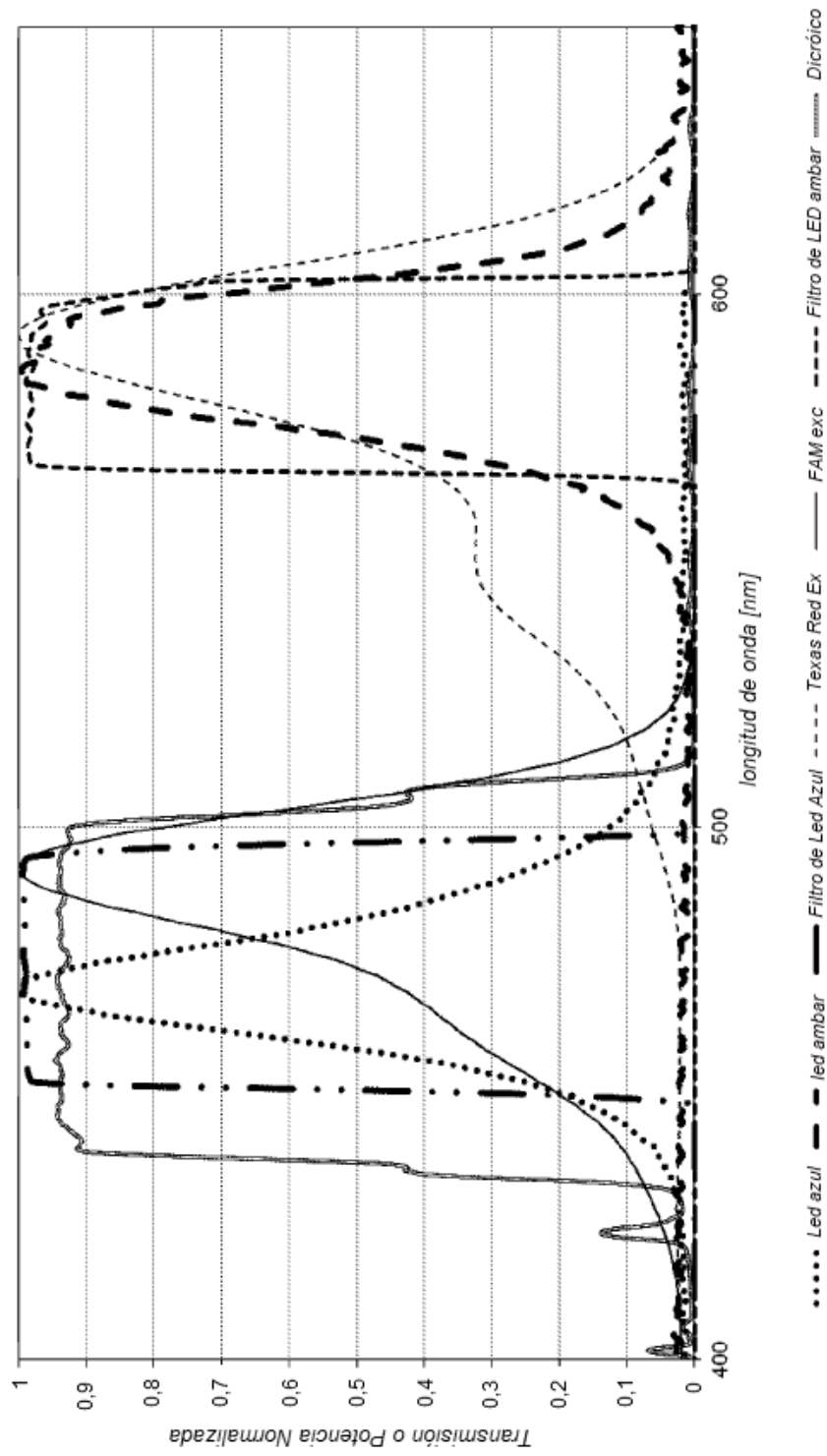


Fig. 25

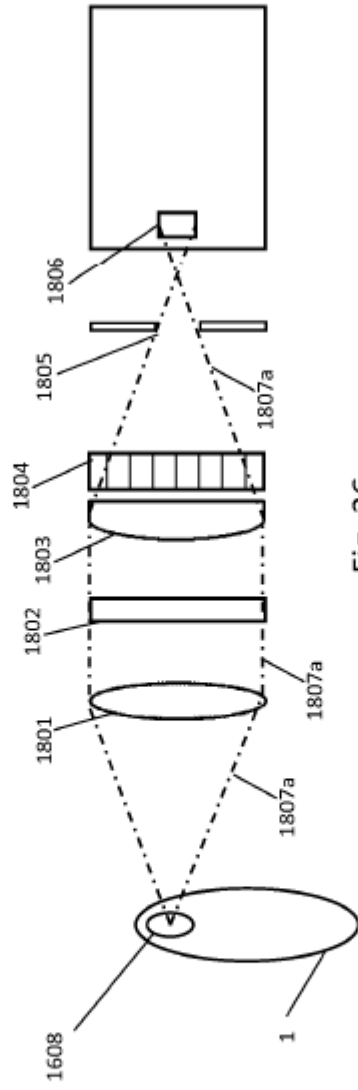


Fig. 26

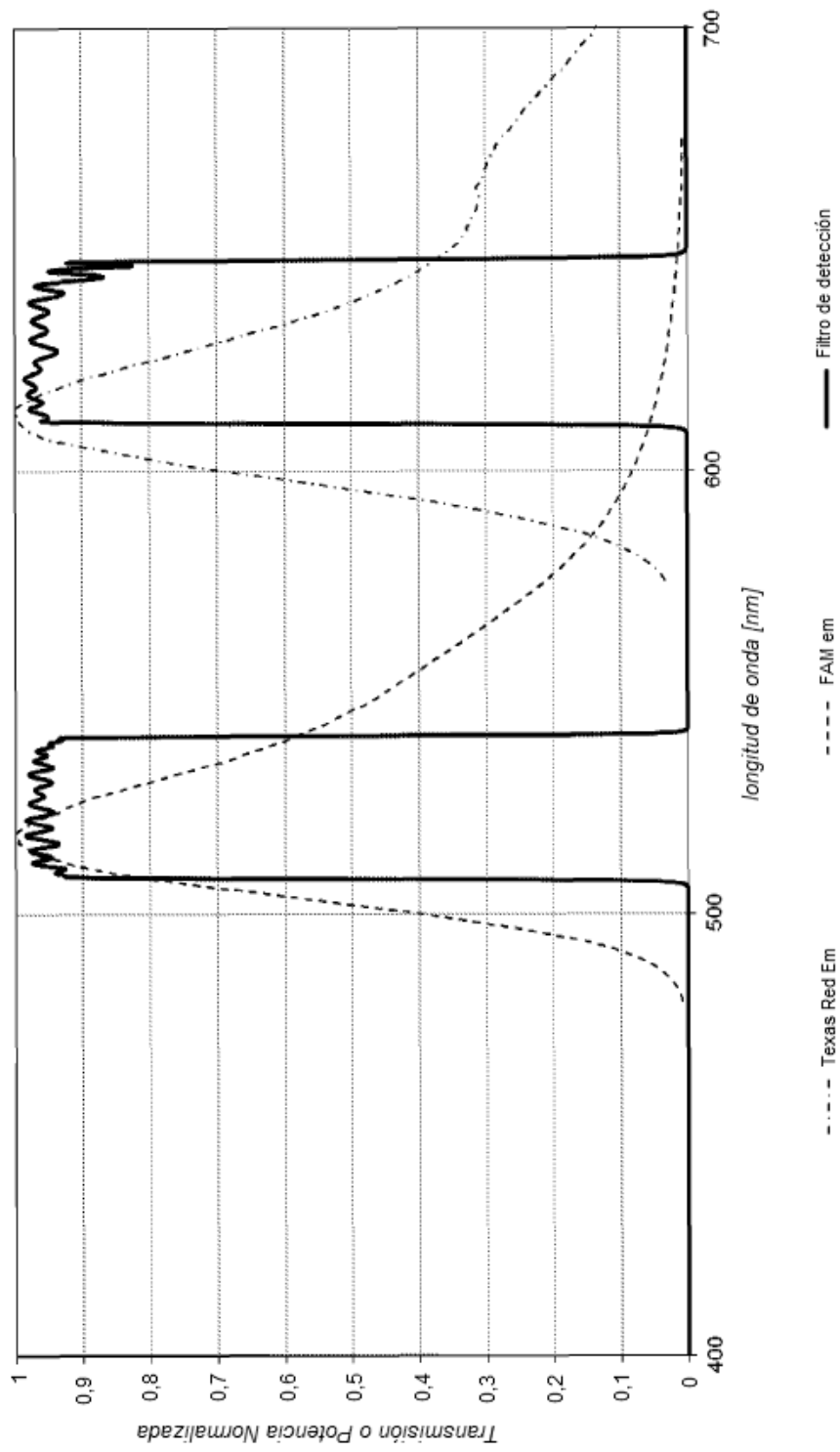


Fig. 27

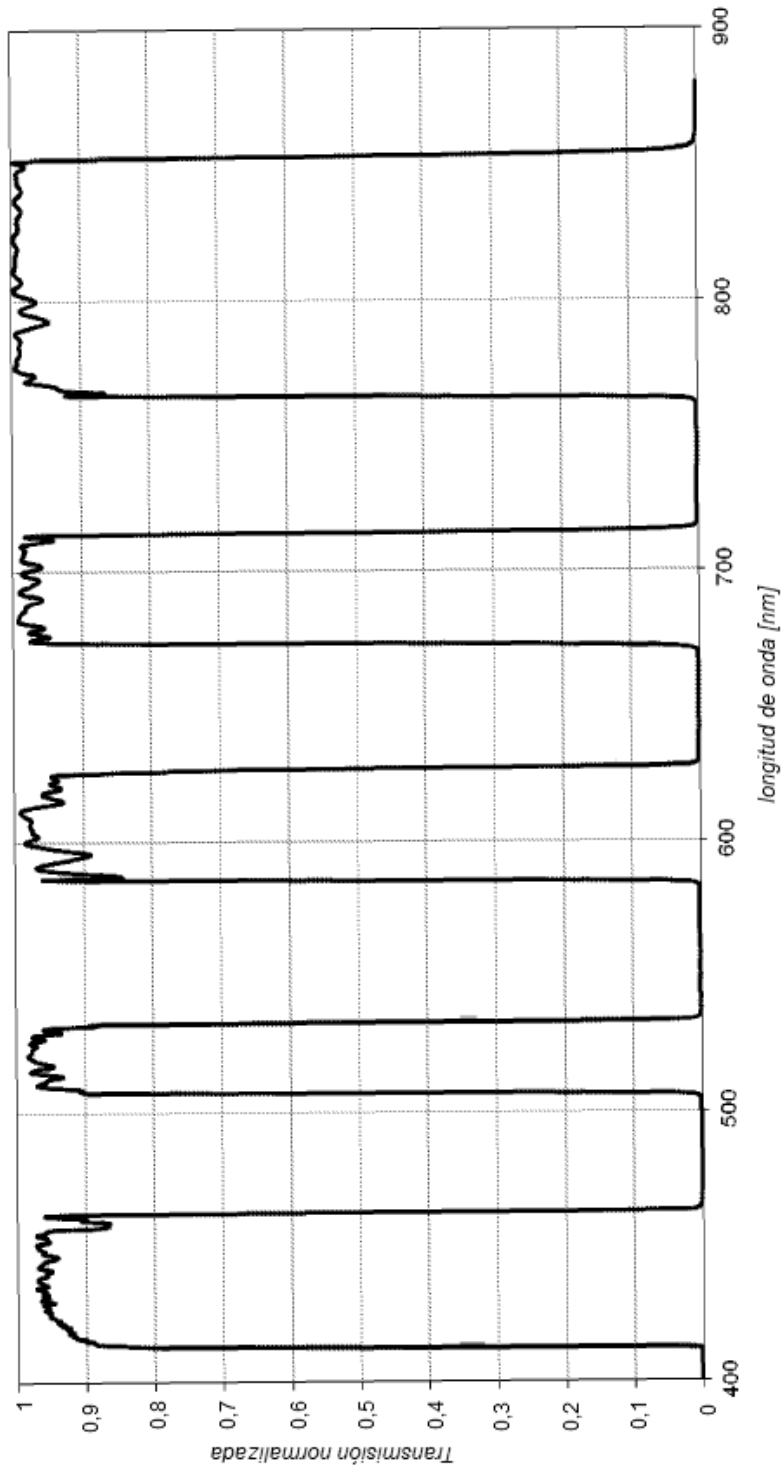


Fig. 28

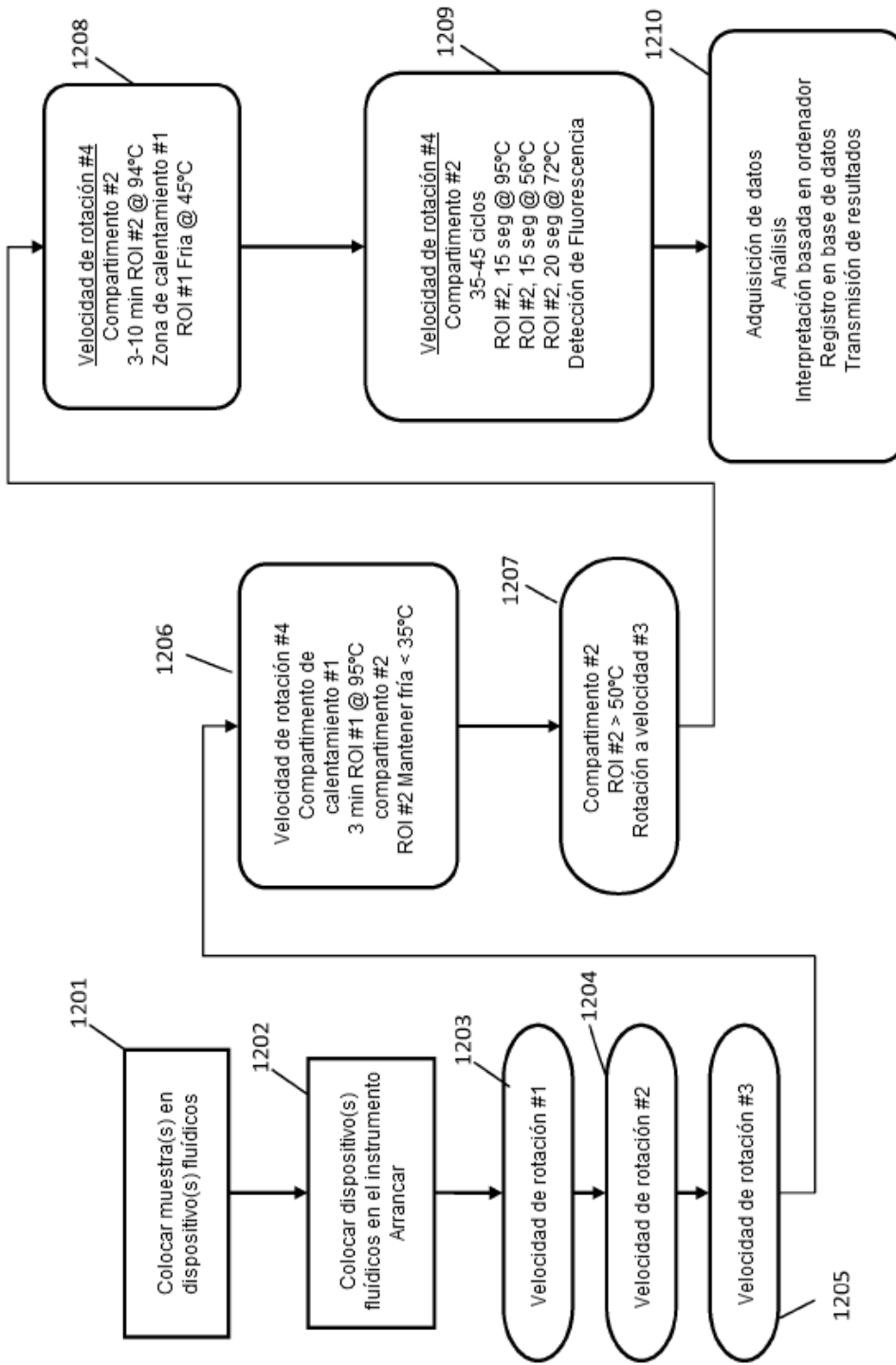


Fig. 29

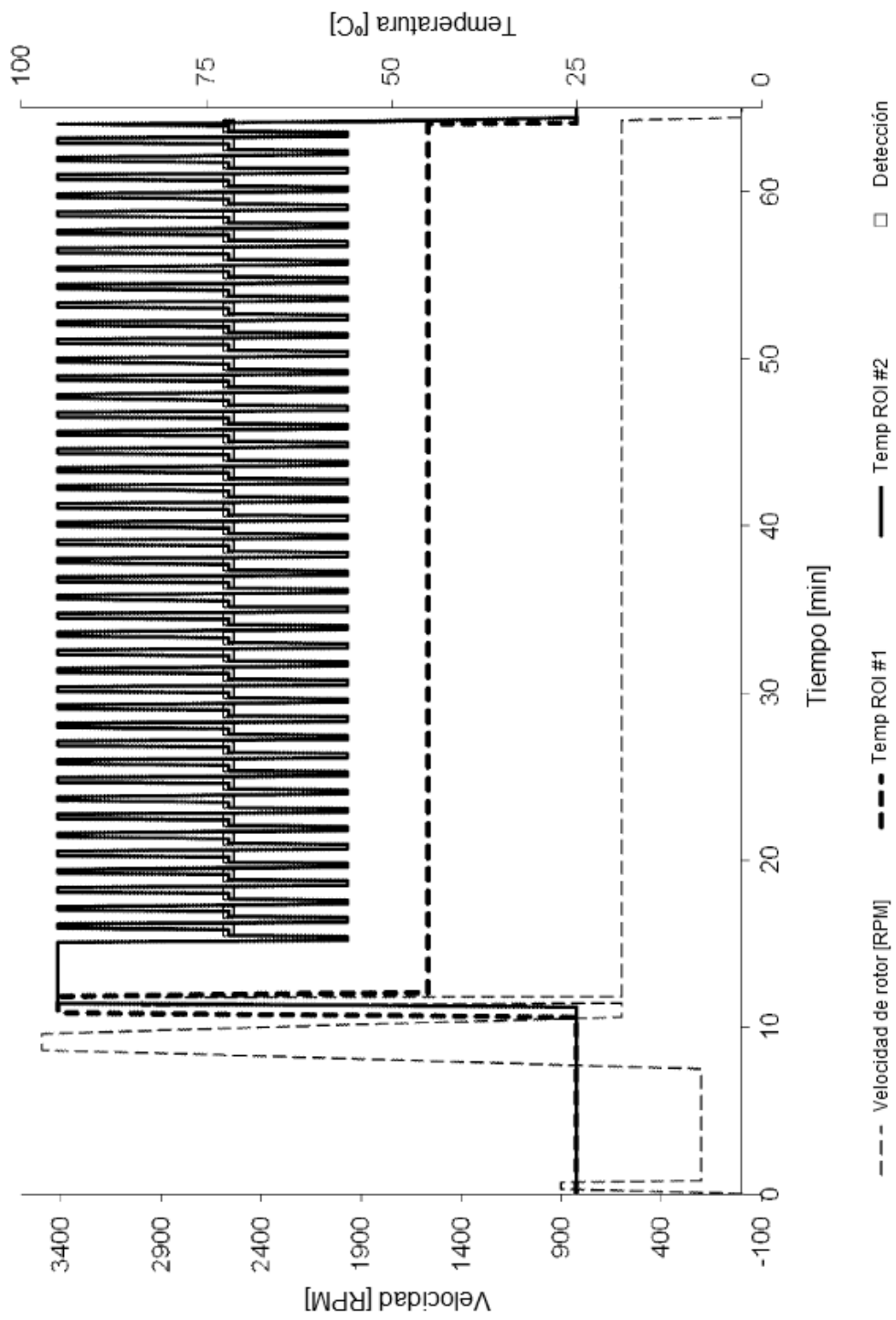


Fig. 30A

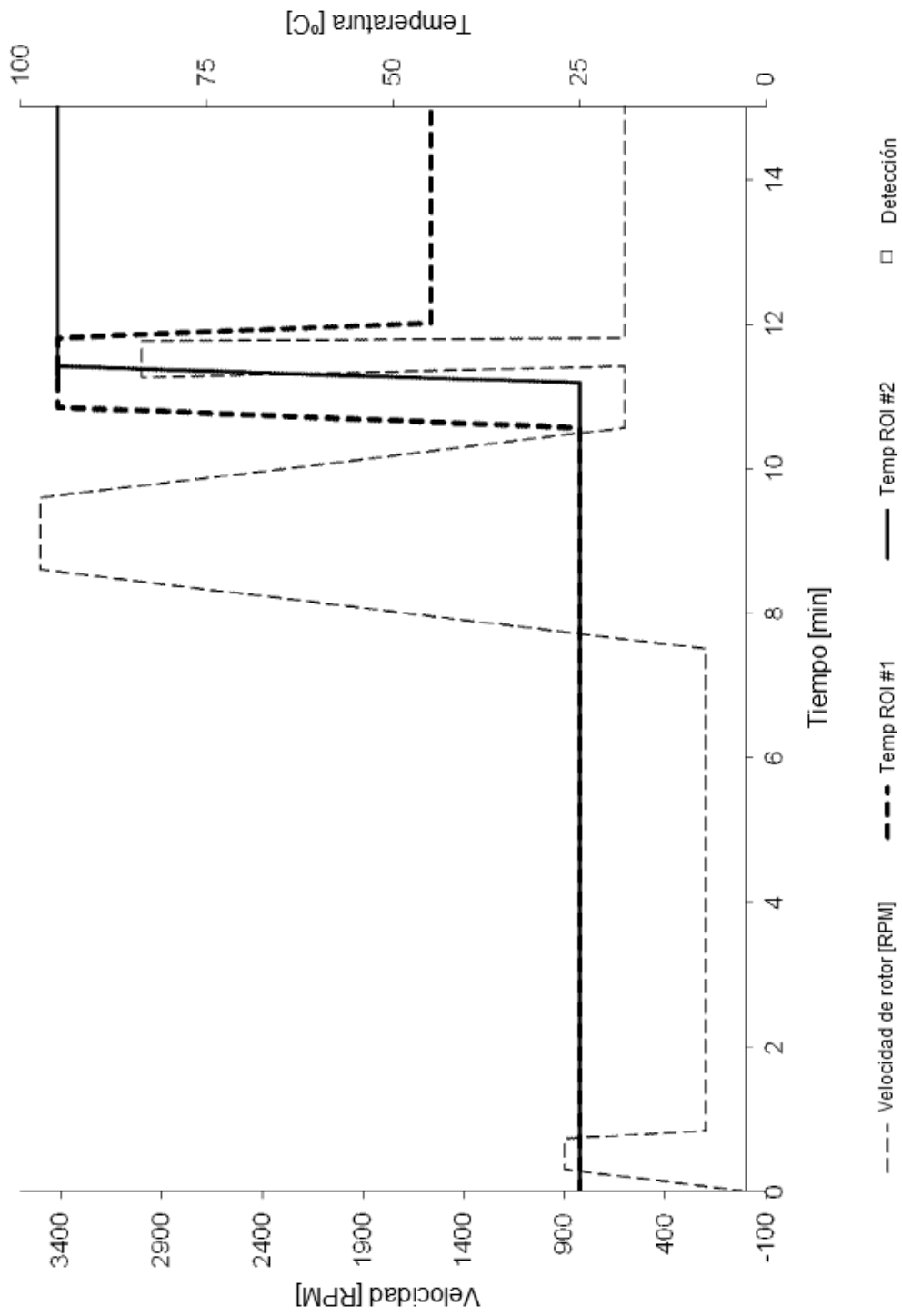


Fig. 30B

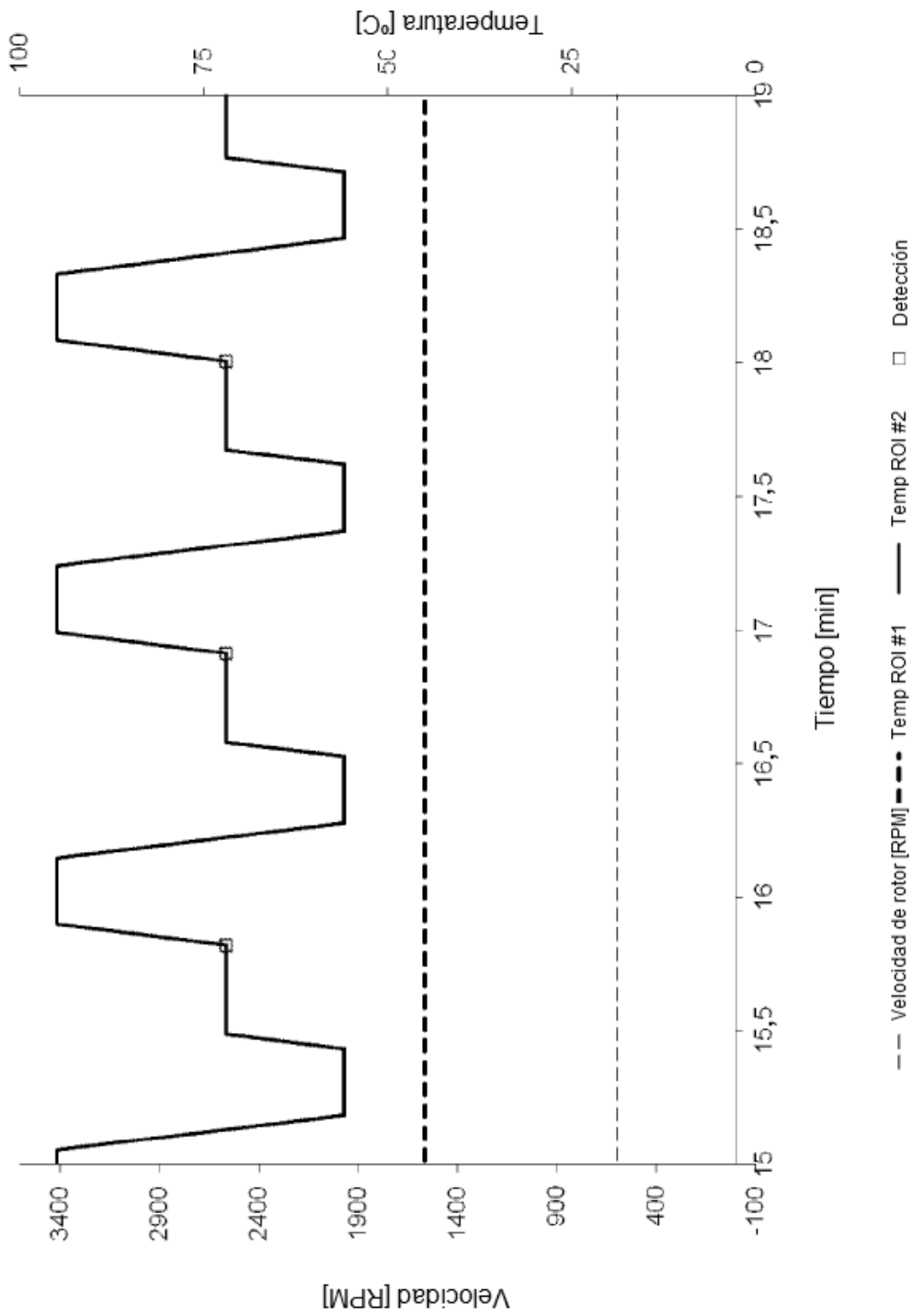


Fig. 30C