

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 620**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2008 PCT/US2008/005577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2008 WO08137008**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2008 E 08743420 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2152417**

54 Título: **Dispositivo y método para análisis en sistemas microfluídicos**

30 Prioridad:

04.05.2007 US 927640 P

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

26.10.2018

73 Titular/es:

**OPKO DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)
4400 Biscayne Boulevard
Miami FL 33137, US**

72 Inventor/es:

**LINDER, VINCENT;
STEINMILLER, DAVID y
SIA, SAMUEL, K.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 687 620 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 y método para análisis en sistemas microfluídicos

5 **Campo de invención**

La presente invención se refiere en general a sistemas microfluídicos, y más específicamente, a métodos y dispositivos para realizar análisis en sistemas microfluídicos.

10 **Antecedentes**

El suministro de fluidos desempeña un papel importante en campos tales como química, microbiología y bioquímica. Estos fluidos pueden incluir líquidos o gases y pueden proporcionar reactivos, disolventes, reactantes o enjuagues para procesos químicos o biológicos. Mientras que diversos dispositivos y métodos microfluídicos, tales como ensayos microfluídicos, pueden proporcionar plataformas analíticas baratas, sensibles y precisas, el suministro de fluidos a la plataforma puede añadir un nivel de coste y sofisticación, ya que el funcionamiento de dispositivos microfluídicos requiere a menudo la capacidad de intercambiar fluidos entre el propio dispositivo y el entorno exterior. En algunos casos, el funcionamiento del dispositivo incluye una o una combinación de las siguientes: introducción de una muestra, introducción de reactivos, extracción de un fluido para análisis fuera del chip o transferencia de fluidos de un chip al siguiente.

Debido a que los dispositivos microfluídicos se benefician de la ley de escala, la mayoría de las aplicaciones requieren solo cantidades diminutas de fluido para llevar a cabo ensayos, en comparación con sus homólogos de sobremesa. Junto con el desarrollo de estos sistemas miniaturizado, la comunidad microfluídica ha invertido muchos esfuerzos en el diseño de superficies de contacto entre el dispositivo microfluídico y el entorno del laboratorio. El principal problema asociado con la conexión del entorno con el chip es el desajuste entre los volúmenes usados en el chip (por ejemplo, de femtolitros a microlitros) con respecto a los volúmenes manipulados normalmente en la mesa de laboratorio (por ejemplo, de microlitros a litros). Por ejemplo, muchos conectores del entorno con el chip tienen un volumen muerto, por ejemplo, volumen gastado que puede encontrarse en el núcleo del propio conector. Por ejemplo, en el caso de un tubo con un diámetro interno pequeño (por ejemplo, de 200 μm para inyectar pequeñas cantidades de fluido) que se conecta con un microcanal (por ejemplo, 10-200 μm de diámetro), puede quedar un hueco entre el borde del tubo y la entrada del microcanal. El volumen definido por ese hueco se denomina volumen muerto y, en algunos casos, puede ser del mismo orden de magnitud que el volumen total de muestra que va a analizarse. En la práctica, el volumen muerto de muchos dispositivos puede ser a menudo mayor que el volumen de muestra analizado por el chip; esto es un efecto no deseado para aplicaciones que se basan en un pequeño consumo de muestra/reactivo. Los documentos US 5.713.212 y US 6.184.029 B1 divulgan métodos y un dispositivo para realizar análisis.

Por consiguiente, serían beneficiosos avances en el campo que pudieran, por ejemplo, reducir el volumen muerto y/o permitir una superficie de contacto fácil entre el sistema microfluídico y el usuario.

Sumario de la invención

Se proporcionan métodos y dispositivos para realizar análisis (por ejemplo, inmunoensayos) en sistemas microfluídicos.

En la invención, un dispositivo para realizar análisis incluye un sistema microfluídico formado en un sustrato que comprende un primer canal microfluídico que incluye al menos una entrada y una salida y un segundo canal microfluídico que incluye al menos una entrada y una salida. El dispositivo de la invención también incluye un conector fluido que puede conectarse con el sustrato. El conector de fluido comprende una trayectoria de fluido que incluye una entrada de trayectoria de fluido y una salida de trayectoria de fluido, en el que, tras la conexión, la entrada de trayectoria de fluido se conecta con la salida del primer canal microfluídico para permitir la comunicación de fluido entre la trayectoria de fluido y el primer canal microfluídico, y la salida de trayectoria de fluido se conecta con la entrada del segundo canal microfluídico para permitir la comunicación de fluido entre la trayectoria de fluido y el segundo canal microfluídico. La trayectoria de fluido contiene una muestra dispuesta en el mismo antes de la conexión del conector fluido con el sustrato. En algunos casos, el sistema microfluídico se construye y dispone para funcionar sin recirculación de un fluido en el sistema.

En la invención, los canales microfluídicos primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso, y en el primer uso, los canales microfluídicos primero y segundo se ponen en comunicación de fluido entre sí.

El primer canal microfluídico comprende un primer reactivo dispuesto en el mismo antes de la conexión del conector fluido con el sustrato. El primer canal microfluídico puede comprender además un segundo reactivo dispuesto en el mismo antes de la conexión del conector fluido con el sustrato. Los reactivos primero y segundo pueden ser reactivos fluidos separados por un fluido inmiscible con dichos reactivos primero y segundo. Los reactivos primero y

segundo pueden ser, por ejemplo, reactivos líquidos y el fluido immiscible con dichos reactivos primero y segundo puede ser un gas. En la invención, el segundo canal microfluídico contiene un reactivo dispuesto en el mismo. El reactivo en el segundo canal microfluídico puede secarse antes del primer uso, y, en algunos casos, se adsorbe a una superficie del segundo canal microfluídico. El dispositivo puede comprender además una cubierta (por ejemplo, una cinta adhesiva) situada adyacente al sustrato para encerrar los canales microfluídicos primero y segundo.

En la invención, el dispositivo comprende además un área de reacción en comunicación de fluido con el segundo canal microfluídico, en el que el área de reacción permite la detección de una reacción química y/o biológica en el área de reacción. El área de reacción puede comprender al menos una región de canal sinuoso. En algunos casos, el área de reacción comprende al menos dos regiones de canal sinuoso conectadas en serie. Las al menos dos regiones de canal sinuoso pueden comprender una especie química y/o biológica que puede experimentar una reacción química y/o biológica. Cada una de las al menos dos regiones de canal sinuoso pueden permitir la formación y/o detección de una única señal homogénea en cada una de dichas regiones tras llevar a cabo una reacción química y/o biológica en dichas regiones.

El dispositivo puede comprender además un primer detector alineado con la primera región de canal sinuoso. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un segundo detector alineado con la segunda región de canal sinuoso.

El sistema microfluídico puede incluir cualquier número adecuado de intersecciones de canales; por ejemplo, el sistema puede incluir menos de 2 intersecciones de canales. En una realización, el sistema microfluídico no incluye ninguna intersección de canal.

En determinadas realizaciones, la trayectoria de fluido tiene un primer volumen y comprende además un elemento de control del volumen que puede permitir la introducción de un volumen controlado de fluido menor que el primer volumen en la trayectoria de fluido antes de la conexión del conector fluídico al sistema microfluídico. El conector fluídico puede comprender al menos una característica no fluídica complementaria a una característica del sustrato para formar una conexión no fluídica entre el conector fluídico y el sustrato tras la conexión. El conector fluídico puede comprender al menos una característica complementaria a una característica del sustrato para formar una conexión irreversible entre el conector fluídico y el sustrato. El conector fluídico puede comprender además un elemento de muestreo que puede recibir una muestra de fluido de una entidad biológica. El conector fluídico puede permitir la transferencia de fluido desde la entidad biológica hasta la trayectoria de fluido.

En algunos casos, el dispositivo comprende además una fuente de vacío que puede conectarse con una salida.

La invención también se refiere al método definido en las reivindicaciones para realizar análisis en el sistema microfluídico de la invención.

En otra realización de la divulgación, un dispositivo comprende un sistema microfluídico formado en un sustrato que comprende un primer canal microfluídico que incluye una entrada y una salida y un segundo canal microfluídico que incluye una entrada y una salida. El dispositivo también incluye un conector fluídico que puede conectarse con el sustrato que comprende una trayectoria de fluido que incluye una entrada de trayectoria de fluido y una salida de trayectoria de fluido, en el que, tras la conexión, la entrada de trayectoria de fluido se conecta con la salida del primer canal microfluídico y la salida de trayectoria de fluido se conecta con la entrada del segundo canal microfluídico. El conector fluídico comprende además al menos una característica no fluídica complementaria a una característica del sustrato para formar una conexión no fluídica entre el conector fluídico y el sustrato tras la conexión.

En algunos casos, el sistema microfluídico se construye y dispone para funcionar sin recirculación de un fluido en el sistema. En algunas realizaciones, los canales microfluídicos primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso, y en el primer uso, los canales microfluídicos primero y segundo se ponen en comunicación de fluido entre sí.

En otra realización de la divulgación, un dispositivo comprende un primer canal microfluídico formado en un sustrato y que contiene un primer reactivo dispuesto en el mismo, y un segundo canal microfluídico formado en el sustrato y que contiene un segundo reactivo dispuesto en el mismo, en el que los canales microfluídicos primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso, y en el primer uso, los canales microfluídicos primero y segundo se ponen en comunicación de fluido entre sí. El primer canal microfluídico puede comprender además un tercer reactivo, estando los reactivos primero y tercero separados por un fluido immiscible con dichos reactivos. El segundo reactivo se seca antes del primer uso.

En otra realización de la divulgación, un dispositivo comprende un sistema microfluídico formado en un sustrato que comprende un primer canal microfluídico que incluye una entrada y una salida y un segundo canal microfluídico que incluye una entrada y una salida. El dispositivo también incluye un conector fluídico que puede conectarse con el sustrato y puede comprender una trayectoria de fluido que incluye una entrada de trayectoria de fluido y una salida de trayectoria de fluido, en el que, tras la conexión, la entrada de trayectoria de fluido se conecta con la salida del

5 primer canal microfluídico para permitir la comunicación de fluido entre la trayectoria de fluido y el primer canal microfluídico, y la salida de trayectoria de fluido se conecta con la entrada del segundo canal microfluídico para permitir la comunicación de fluido entre la trayectoria de fluido y el segundo canal microfluídico. La trayectoria de fluido comprende además un elemento de control del volumen que puede permitir la introducción de un volumen controlado de fluido menor que el primer volumen en la trayectoria de fluido antes de la conexión del conector fluido con el sistema microfluídico. En algunos casos, el elemento de control del volumen es una frita.

10 En otra realización de la divulgación, un dispositivo comprende un sistema microfluídico formado en un sustrato que comprende un primer canal microfluídico que incluye una entrada y una salida y un segundo canal microfluídico que incluye una entrada y una salida. El dispositivo también incluye un conector fluido que puede conectarse con el sustrato y puede comprender una trayectoria de fluido que incluye una entrada de trayectoria de fluido y una salida de trayectoria de fluido, en el que, tras la conexión, la entrada de trayectoria de fluido se conecta con la salida del primer canal microfluídico y la salida de trayectoria de fluido se conecta con la entrada del segundo canal microfluídico. El conector fluido comprende además un elemento de muestreo que puede puncionar un componente biológico. El componente biológico puede ser piel humana. El elemento de muestreo puede usarse para recibir una muestra de fluido del componente biológico. El conector fluido puede permitir la transferencia de fluido desde la entidad biológica hasta la trayectoria de fluido.

20 En otro aspecto de la divulgación, se proporciona una serie de métodos. En una realización, un método de almacenamiento de reactivos comprende situar un primer reactivo en un primer canal microfluídico formado en un sustrato y situar un segundo reactivo en un segundo canal microfluídico formado en el sustrato, en el que los canales microfluídicos primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí durante las etapas de situar. El método también incluye sellar una entrada y/o salida del primer canal microfluídico para almacenar el primer reactivo en el primer canal microfluídico, y sellar una entrada y/o salida del segundo canal microfluídico para almacenar el segundo reactivo en el segundo canal microfluídico.

25 En algunas realizaciones, antes de sellar, el primer canal microfluídico contiene un tercer agente dispuesto en el mismo, los reactivos primero y tercero separados por un fluido inmiscible con dichos reactivos. El segundo reactivo puede secarse antes del sellado de la entrada del segundo canal microfluídico.

30 En otra realización, un método comprende proporcionar un primer canal microfluídico formado en un sustrato y que contiene un primer reactivo dispuesto en el mismo antes del primer uso, y proporcionar un segundo canal microfluídico formado en el sustrato y que contiene un segundo reactivo dispuesto en el mismo antes del primer uso. Los canales microfluídicos primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso, y en el que, en el primer uso, los canales microfluídicos primero y segundo se ponen en comunicación de fluido entre sí. El método también incluye provocar que los canales microfluídicos primero y segundo estén en comunicación de fluido entre sí.

35 En algunas realizaciones, la etapa de provocar comprende conectar una trayectoria de fluido entre los canales microfluídicos primero y segundo. La trayectoria de fluido puede contener una muestra dispuesta en la misma. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de fluido.

40 Otras ventajas y características novedosas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones no limitativas de la invención cuando se considere conjuntamente con las figuras adjuntas. En casos en los que la presente memoria descriptiva y un documento incorporado como referencia incluyan divulgación conflictiva y/o incoherente, la presente memoria descriptiva prevalecerá. Si dos o más documentos incorporados como referencia incluyen divulgación conflictiva y/o incoherente entre sí, entonces el documento que tenga la última fecha efectiva prevalecerá.

50 **Breve descripción de los dibujos**

Las realizaciones no limitativas de la presente invención se describirán a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas, que son esquemáticas y no se pretende que estén dibujadas a escala. En las figuras, cada componente idéntico o casi idéntico ilustrado se representa normalmente por un único número. Con propósitos de claridad, no todos los componentes están marcados en cada figura, ni todos los componentes de cada realización de la invención se muestran cuando no es necesaria la ilustración para permitir a los expertos habituales en la técnica comprender la invención. En las figuras:

60 las figuras 1A y 1B son diagramas esquemáticos de un dispositivo microfluídico que incluye un conector fluido según una realización de la invención;

la figura 2 es un diagrama de bloques de un sistema microfluídico que puede contener reactivos almacenados y pueden usarse para realizar una reacción química y/o biológica según una realización de la invención;

65 las figuras 3A-3D son diagramas esquemáticos de un dispositivo microfluídico que incluye un conector fluido y que contiene reactivos almacenados usados para realizar una reacción química y/o biológica según una realización de la

invención;

5 las figuras 4A-4D son diagramas esquemáticos de un dispositivo microfluídico que incluye un conector fluídico y que contiene reactivos almacenados usados para realizar una reacción química y/o biológica según una realización de la invención;

las figuras 5A-5F son fotografías de un dispositivo microfluídico que incluye un conector fluídico usado para realizar una reacción química y/o biológica según una realización de la invención;

10 la figura 6 es un diagrama de bloques de un sistema microfluídico según una realización de la divulgación. Esto no forma parte de la invención y se proporciona con propósitos de información solo.

15 Las figuras 7A-7D son diagramas esquemáticos de un dispositivo microfluídico que puede usarse con un dispositivo fluídico de extremos abiertos para realizar una reacción química y/o biológica según una realización de la invención. Estos no forman parte de la invención y se proporcionan con propósitos de información solo.

La figura 8A es un diagrama esquemático de un dispositivo fluídico de extremos abiertos y no forma parte de la invención.

20 Las figuras 8B-8D son diagramas esquemáticos de conectores fluídicos según realizaciones de la invención;

las figuras 9A-9F son diagramas esquemáticos de conectores fluídicos monolíticos según una realización de la invención;

25 las figuras 10A y 10B son diagramas esquemáticos de otro conector fluídico según una realización de la invención;

las figuras 11A y 11B son diagramas esquemáticos de conectores fluídicos que pueden conectarse ortogonalmente o en el mismo plano que los canales de un sistema microfluídico según una realización de la invención;

30 las figuras 12A-12E son diagramas esquemáticos de un conector fluídico que incluye pinzas que pueden usarse para unir el conector fluídico a un sustrato según una realización de la invención;

35 la figura 13 es un diagrama esquemático de características que pueden incluirse en, por ejemplo, un conector fluídico y/o un sustrato para garantizar la unión entre el conector y el sustrato según una realización de la invención;

las figuras 14A y 14B son diagramas esquemáticos que muestran una vista en perspectiva de un dispositivo que incluye un elemento de alineación, un conector fluídico y un sustrato según una realización de la invención;

40 las figuras 15A y 15B son diagramas esquemáticos que muestran una vista en sección transversal de un dispositivo que incluye un elemento de alineación y un sustrato que están formados por una única pieza según una realización de la invención;

45 las figuras 16A y 16B son diagramas esquemáticos que muestran una vista en sección transversal de un dispositivo que incluye un elemento de alineación y un sustrato que están formados por piezas diferenciadas según una realización de la invención;

las figuras 17A-17C son diagramas esquemáticos de un dispositivo que incluye zonas de detección en forma de regiones sinuosas según una realización de la invención;

50 las figuras 18A y 18B son diagramas esquemáticos de un sistema óptico para detectar un componente en una zona de detección de un dispositivo según una realización de la invención;

55 la figura 19 es un diagrama esquemático de un sistema óptico para detectar componentes en diferentes zonas de detección de un dispositivo según una realización de la invención;

la figura 20 es un diagrama esquemático de un sistema óptico que incluye una fuente de luz óptica y un detector alineado con cada zona de detección de un dispositivo según una realización de la invención.

60 Descripción detallada

65 Se proporcionan métodos y dispositivos para realizar análisis (por ejemplo, inmunoensayos) en sistemas microfluídicos. En la invención, se usa un conector fluídico que tiene una trayectoria de fluido para conectar dos canales independientes formados en un sustrato para permitir la comunicación de fluido entre los dos canales independientes. Ambos canales independientes se llenan previamente con reactivos (por ejemplo, disoluciones de anticuerpo, tampones de lavado y reactivos de amplificación), que pueden usarse para realizar el análisis. Estos reactivos pueden almacenarse en los canales del sustrato durante largos periodos de tiempo (por ejemplo, 1 año)

antes de su uso. Antes de la conexión del conector de fluido y el sustrato, la trayectoria de fluido se llena con una muestra (por ejemplo, sangre). La muestra puede obtenerse, por ejemplo, pinchando un dedo de un usuario hasta que se extrae sangre del dedo dentro de la trayectoria de fluido (por ejemplo, por fuerzas capilares). Tras la conexión del conector fluido y los canales del sustrato, la muestra puede pasar a través de un área de reacción dentro del segundo canal del sustrato. Este procedimiento puede permitir que los componentes de la muestra interactúen con los componentes dispuestos en el área de reacción. Después de eso, los reactivos del primer canal pueden fluir hasta el área de reacción por medio de la trayectoria de fluido, permitiendo que los componentes en el área de reacción se procesen (por ejemplo, se amplifiquen para producir una señal detectable). Los componentes en el área de reacción pueden determinarse entonces usando diversos métodos de detección.

Los sistemas microfluídicos descritos en el presente documento pueden ser útiles para realizar reacciones químicas y/o biológicas, especialmente inmunoensayos, con una o más ventajas tales como: (a) uso de pequeñas cantidades de muestra con poco o ningún desperdicio de muestra, (b) estabilidad a largo plazo de reactivos químicos y/o biológicos almacenados en el dispositivo, (c) reducción de la contaminación cruzada entre los reactivos almacenados y/o entre la muestra y el reactivo, (d) dosificación de la muestra, (e) facilidad de uso para usuarios no formados para introducir una muestra en el dispositivo, (f) mezclado eficaz de los reactivos y (g) fiabilidad del ensayo. Estas y otras ventajas se describen en más detalle a continuación en relación con la descripción y las figuras.

Los artículos, sistemas y métodos descritos en el presente documento pueden combinarse con los descritos en la publicación de patente internacional n.º WO2005/066613 (solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/US2004/043585), presentada el 20 de diciembre de 2004 y titulada "Assay Device and Method" (Dispositivo y método de ensayo), la publicación de patente internacional n.º WO2005/072858 (solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/US2005/003514), presentada el 26 de enero de 2005 y titulada "Fluid Delivery System and Method" (Sistema y método de suministro de fluidos) y la publicación de patente internacional n.º WO2006/113727 (solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/US06/14583), presentada el 19 de abril de 2006 y titulada "Fluidic Structures Including Meandering and Wide Channels" (Estructuras fluidicas que incluyen canales sinuosos y amplios).

La figura 1 muestra un dispositivo microfluídico 10 según la invención. Tal como se muestra en esta realización ilustrativa, el dispositivo 10 comprende dos unidades que pueden usarse: el sustrato 20, que incluye un sistema microfluídico 22, y un conector fluido 40, que puede usarse para conectar dos canales microfluídicos independientes del sustrato. El sistema microfluídico 22 del sustrato 20 incluye un canal 24 que tiene una entrada 26 y una salida 28, así como un canal 34 que tiene una entrada 36 y una salida 38. Tal como se muestra en la realización ilustrativa de la figura 1A, los canales 24 y 34 no están conectados; es decir, no hay comunicación de fluido entre los canales. Tal como se describe en más detalle a continuación, los canales no conectados pueden ser ventajosos en determinados casos, tales como para almacenar diferentes reactivos en cada uno de los canales. Por ejemplo, el canal 24 puede usarse para almacenar reactivos secos y el canal 34 puede usarse para almacenar reactivos húmedos. Tener los canales físicamente separados entre sí puede potenciar la estabilidad a largo plazo de los reactivos almacenados en cada uno de los canales, por ejemplo, manteniendo el/reactivo(s) almacenado(s) en forma seca protegidos de la humedad que puede producirse por reactivo(s) almacenado(s) en forma húmeda.

Tal como se muestra, el conector fluido 40 incluye una trayectoria de fluido 42 que tiene una entrada 46 y una salida 44. El conector fluido 40 puede conectarse con el sustrato 20, por ejemplo, por medio de las entradas y salidas. Tras la conexión, la entrada 46 de trayectoria de fluido se conecta con la salida 38 del canal microfluídico 34 y la salida 44 de la trayectoria de fluido se conecta con la entrada 26 del canal microfluídico 24. Esta conexión provoca la comunicación de fluido entre los canales 24 y 34 por medio de la trayectoria de fluido 42. Las conexiones entre las entradas y salidas del artículo y el sustrato pueden formar sellos estancos a los fluidos para impedir fugas en los puntos de conexión. Por consiguiente, tal como se ilustra en la figura 1B, si fluye fluido en la dirección de la flecha 56, al menos una porción de un fluido en el canal 34 puede fluir dentro de la trayectoria de fluido 42 y luego dentro del canal 24, opcionalmente saliendo en la salida 28.

Aunque la figura 1A muestra solo dos canales diferenciados que forman el sistema microfluídico 22, en otras realizaciones, un sistema microfluídico puede incluir más de dos canales diferenciados, y puede usarse un conector fluido para conectar tres o más de tales canales de un sustrato. En tales realizaciones, un conector fluido puede tener múltiples trayectorias de fluido (que pueden estar interconectadas o ser independientes) y/o múltiples entradas y/o salidas que pueden conectarse con varios canales microfluídicos diferentes del sustrato. Adicionalmente, aunque la figura 1 muestra dos canales 24 y 34 diferenciados sobre el mismo sustrato, el artículo 40 puede usarse para conectar canales sobre diferentes sustratos.

El sistema microfluídico formado por la conexión de dos canales independientes de un sustrato usando un conector fluido, tal como se muestra en la figura 1B, es un ejemplo de un sistema de "bucle abierto". Tal como se usa en el presente documento, un sistema de "bucle abierto" se construye y dispone para funcionar sin recirculación de un fluido dentro del sistema microfluídico. En otras palabras, una porción de fluido que comienza en una primera posición dentro del sistema microfluídico no pasa por la primera posición de nuevo tras abandonar esa posición. En su lugar, la porción de fluido puede salir del dispositivo en una salida (a menos, por ejemplo, que la porción de fluido

se procese o se use en el sistema microfluídico). Por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 1B, una porción de fluido inicialmente en la posición "A" y que fluye en la dirección de la flecha 56 puede fluir dentro de la trayectoria de fluido 42 y luego dentro del canal 24, saliendo opcionalmente en la salida 28; sin embargo, el diseño del sistema microfluídico no permite que la porción de fluido vuelva a entrar en el canal 34 y que pase a través de la posición "A" de nuevo. De manera similar, una porción de fluido inicialmente en la posición "B" y que fluye en la dirección de la flecha 56 puede salir por la salida 28; esta porción de fluido no puede entrar en el canal 34 o 24 para permitir que la porción pase a través de la posición "B" de nuevo. En algunos casos, el sistema microfluídico no permite la recirculación de un fluido dentro del sistema (por ejemplo, durante el uso previsto).

En otras realizaciones, un conector fluídico puede usarse para formar un sistema de "bucle cerrado". Tal como se usa en el presente documento, un sistema de "bucle cerrado" puede permitir la recirculación de un fluido dentro del sistema microfluídico de modo que una porción de fluido que comienza en una primera posición dentro del sistema microfluídico puede pasar la primera posición de nuevo después de que abandone esa posición. Por ejemplo, si se usó un segundo conector fluídico (por ejemplo, uno similar al conector fluídico 40) para conectar la entrada 36 y la salida 28 del sustrato 20 de la figura 1B, se formaría un sistema de bucle cerrado. Alternativamente, si se diseñó el sistema microfluídico 22 de modo que la entrada 36 y la salida 28 se unieron de modo que los canales 24 y 34 formaron un único canal continuo, la conexión del conector fluídico 40 con la entrada 38 y la salida 26 formaría un sistema de bucle cerrado.

También debe entenderse que un dispositivo descrito en el presente documento puede incluir más de un conector fluídico. Son útiles múltiples conectores de fluido para conectar múltiples canales (o porciones de canales) de uno o más sustratos.

En determinadas realizaciones, puede usarse un conector fluídico para conectar dos (o más) porciones de un único canal microfluídico de un sustrato. Debe entenderse que cuando se describen al menos canales diferenciados (independientes) primero y segundo de un sustrato en la presente divulgación, puede usarse un conector fluídico para conectar realizaciones similares pero cuando al menos una porción del primer canal está en comunicación de fluido con al menos una porción del segundo canal (por ejemplo, para formar un único canal interconectado) antes de la conexión usando el conector fluídico. En la presente invención, los canales microfluídicos primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso.

Opcionalmente, y tal como se describe en más detalle a continuación, el conector fluídico 40 puede incluir al menos una característica no fluídica 52 complementaria a una característica 54 del sustrato para formar una conexión no fluídica entre el conector fluídico y el sustrato tras la conexión de la trayectoria de fluido. Esta conexión no fluídica puede ayudar a estabilizar la conexión entre el conector fluídico y el sustrato.

En la invención, se usa el conector fluídico 40 para introducir una o más muestras tales como sangre, suero, plasma, líquido lagrimal, saliva, orina, esperma o esputo, en el sistema microfluídico de sustrato 20. Esto puede permitir que la muestra sortee al menos un canal del sustrato. Por ejemplo, si una muestra se introduce en primer lugar en la trayectoria de fluido 42 y entonces el conector fluídico 40 se conecta al sustrato 20 tal como se muestra en la figura 1B, el flujo de los fluidos en la dirección de la flecha 56 permite que la muestra contenida en la trayectoria de fluido 42 fluya en el canal 24, pero no en el canal 34. Un diseño de este tipo puede ser útil para casos en los que la muestra que va a administrarse por medio de la trayectoria de fluido 42 contamina o afecta de otro modo de manera no deseable a uno o más componentes dentro del canal 34. Debe entenderse, sin embargo, que no necesita usarse el conector fluídico para introducir fluidos en el dispositivo, pero puede usarse, en algunas realizaciones según la presente divulgación, simplemente para conectar de manera fluida al menos dos canales de un dispositivo o dispositivos.

Tal como se describió anteriormente, puede introducirse un fluido en la trayectoria de fluido 42 por medio de la entrada 46 (o salida 44, que puede actuar como una entrada con los propósitos de introducción de fluido). Toda o una porción de trayectoria de fluido 42 puede llenarse con el fluido. Opcionalmente, el conector fluídico 40 puede incluir una trayectoria de flujo secundaria 48, que conecta la entrada 50 con la trayectoria de flujo 42. Este diseño puede permitir, por ejemplo, la introducción de un fluido en la trayectoria de flujo de fluido 42 por medio de la entrada 50 y trayectoria secundaria 48 antes o después de que el conector fluídico se haya conectado con el sustrato (por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1B). Alternativamente, puede introducirse un fluido en la trayectoria de fluido 42 por medio de la entrada 50 antes de la conexión del conector fluídico y el sustrato. En algunas realizaciones, la entrada 50 y la trayectoria de fluido secundaria 48 pueden bloquearse (por ejemplo, con un pistón o usando cualquier otro método adecuado) tras introducir el fluido en la trayectoria de fluido 42 por medio de la entrada 50 y la trayectoria de fluido secundaria 48. Este bloqueo puede disminuir el número de intersecciones de canales del sistema microfluídico durante el funcionamiento del dispositivo, y puede ser ventajoso por los motivos descritos a continuación.

En algunas realizaciones, los sistemas microfluídicos descritos en el presente documento (incluyendo sustratos de dispositivo y conectores fluídicos) contienen reactivos almacenados antes del primer uso del dispositivo y/o antes de la introducción de una muestra en el dispositivo. El uso de reactivos almacenados puede simplificar el uso del sistema microfluídico por un usuario, puesto que esto minimiza el número de etapas que el usuario tiene que realizar

con el fin de hacer funcionar el dispositivo. Esta simplicidad puede permitir que usuarios no entrenados puedan usar los sistemas microfluídicos descritos en el presente documento, tales como aquellos en ámbitos de diagnóstico inmediato. Los reactivos almacenados en dispositivos microfluídicos son particularmente útiles para dispositivos diseñados para realizar inmunoensayos.

La figura 2 muestra un diagrama de bloques 60 de un dispositivo microfluídico que puede contener reactivos almacenados y puede usarse para realizar una reacción química y/o biológica (por ejemplo, un inmunoensayo). El dispositivo microfluídico incluye una entrada de reactivo 62 en comunicación de fluido con un área de almacenamiento de reactivo 64, que puede incluir, por ejemplo, uno o más canales y/o depósitos. El dispositivo puede incluir también un área 66 de carga de muestra, tal como un conector fluídico que puede conectar el área de almacenamiento de reactivo 64 con el área de reacción 68. El área de reacción, que puede incluir una o más áreas para detectar un componente en una muestra (por ejemplo, zonas de detección), puede estar en comunicación de fluido con el área de desecho 70 y acoplada a la salida 72. En algunas realizaciones, el área de reacción 68 es un área de inmunoensayo.

En la realización a modo de ejemplo mostrada en la figura 2, la sección 80 comprende el área de entrada de reactivo y almacenamiento de reactivo, y la sección 82 comprende el área de reacción, el área de desecho y la salida. En la invención, los reactivos se almacenan tanto en las secciones 80 como 82. Por ejemplo, en una realización particular, se almacena un reactivo en forma de un fluido (por ejemplo, un líquido o un gas) en el área de almacenamiento de reactivo 64 de la sección 80, y se almacena un reactivo en forma de una película seca en el área de reacción 68 de la sección 82.

En algunas realizaciones de la divulgación, las secciones 80 y 82 están en comunicación de fluido entre sí (por ejemplo, por medio del área de carga de muestra 66) antes de la introducción de una muestra en el dispositivo. Por ejemplo, si el área de carga de muestra 66 incluía el conector fluídico 40 de la figura 1, el conector fluídico puede conectar con el sustrato para provocar comunicación de fluido entre las secciones 80 y 82. Posteriormente, puede introducirse una muestra en el dispositivo por medio de la entrada 50 y la trayectoria de fluido secundaria 48.

En la invención, las secciones 80 y 82 no están en comunicación de fluido entre sí antes de la introducción de una muestra en el dispositivo. Por ejemplo, si el área de carga de muestra 66 incluía el conector fluídico 40 de la figura 1 que no tenía la entrada 50 o la trayectoria de fluido secundaria 48, el conector fluídico puede llenarse en primer lugar con una muestra y conectarse después con el sustrato para provocar comunicación de fluido entre las secciones 80 y 82. En este ejemplo, la muestra se introduce en los canales del sustrato en el momento en el que (o poco después) se forma comunicación de fluido entre las secciones 80 y 82. En tales casos, las secciones 80 y 82 no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso del dispositivo, en las que en el primer uso, las secciones se ponen en comunicación de fluido entre sí.

Tal como se describe en el presente documento, se almacenan y/o se disponen uno o más reactivos que pueden usarse en una reacción química y/o biológica en el dispositivo (por ejemplo, en un sustrato de dispositivo y/o un conector de fluido) antes del primer uso y/o antes de la introducción de una muestra en el dispositivo. Tales reactivos pueden almacenarse y/o disponerse en forma de fluido y/o seca, y el método de almacenamiento/eliminación puede depender de la aplicación particular. Los reactivos pueden almacenarse y/o disponerse, por ejemplo, como un líquido, un gas, un gel, una pluralidad de partículas o una película. Los reactivos pueden situarse en cualquier porción adecuada de un dispositivo, incluyendo, pero sin limitarse a, en un canal, depósito, sobre una superficie, y en o sobre una membrana, que puede ser opcionalmente parte de un área de almacenamiento de reactivo. Un reactivo puede asociarse con un sistema microfluídico (o componentes de un sistema) de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, los reactivos pueden reticularse (por ejemplo, de manera covalente o iónica), absorberse, o adsorberse (fisorberse) sobre una superficie dentro del sistema microfluídico. En una realización particular, toda o una porción de un canal (tal como una trayectoria de fluido de un conector de fluido o un canal del dispositivo sustrato) se recubre con un anticoagulante (por ejemplo, heparina). En algunos casos, un líquido está contenido dentro de un canal o depósito de un dispositivo antes del primer uso y/o antes de la introducción de una muestra en el dispositivo.

En algunas realizaciones, se almacenan reactivos secos en una sección de un dispositivo microfluídico y se almacenan reactivos húmedos en una segunda sección de un dispositivo microfluídico. Alternativamente, dos secciones diferenciadas de un dispositivo pueden contener ambas reactivos secos y/o reactivos húmedos. Las secciones primera y segunda pueden estar en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso, y/o antes de la introducción de una muestra en el dispositivo, en algunos casos. En otros casos, las secciones no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso y/o antes de la introducción de una muestra en el dispositivo. Durante el primer uso, un reactivo almacenado puede pasar desde una sección hasta otra sección del dispositivo. Por ejemplo, un reactivo almacenado en forma de un fluido puede pasar desde una primera sección hasta una segunda sección del dispositivo después de que las secciones primera y segunda se conecten por medio de una trayectoria de fluido (por ejemplo, un conector fluídico). En otros casos, un reactivo almacenado como una sustancia seca se hidrata con un fluido, y después pasa desde la primera sección hasta la segunda sección tras la conexión de las secciones. En aún otros casos, un reactivo almacenado como una sustancia seca se hidrata con un fluido, pero no pasa desde una sección hasta otra sección tras la conexión de las secciones. Se describen métodos de

almacenamiento de reactivos en más detalle a continuación.

Debe entenderse que aunque el sistema microfluídico presentado por el diagrama de bloques 60 incluye solo dos secciones 80 y 82, un dispositivo microfluídico puede incluir secciones adicionales en otras realizaciones. Adicionalmente, la secuencia de flujo de fluido entre el área de almacenamiento de reactivo 64, el área de carga de muestra 66 y el área de reacción 68 puede ser diferente en algunos dispositivos según la presente divulgación. Por ejemplo, el flujo de fluido puede dirigirse desde un área de almacenamiento de reactivo hasta un área de reacción seguido por flujo de fluido desde un área de carga de muestra hasta el área de reacción en la presente divulgación. Otras disposiciones también son posibles.

Las figuras 3A-3D muestran un ejemplo de un dispositivo microfluídico que incluye un conector fluídico y que contiene reactivos almacenados que pueden usarse en una reacción química y/o biológica. El dispositivo 100 incluye una primera sección 106 que incluye un área de almacenamiento de reactivo 110, que está en forma de un canal 112 e incluye una entrada 116 y una salida 118. Pueden almacenarse diferentes reactivos en el canal 112 según la aplicación particular. Por ejemplo, si el dispositivo va a usarse para realizar un inmunoensayo, el canal puede tener almacenado en el mismo, en serie, un fluido de aclarado 120, un fluido de anticuerpo 122, un fluido de aclarado 124, un fluido marcado con anticuerpo 126 y un fluido de aclarado 128. También pueden estar presentes reactivos y fluidos de aclarado adicionales según sea necesario. Estos reactivos pueden estar en forma de tapones (por ejemplo, tapones de líquido) que se separan entre sí mediante tapones de fluido inmiscible 130 (por ejemplo, un fluido de separación tal como un gas (por ejemplo, aire, nitrógeno o argón) o un aceite (por ejemplo, un fluorocarburo o hidrocarburo)). En la figura 3A, la entrada 116 y la salida 118 se sellan para evitar la evaporación y contaminación de los reactivos almacenados.

El dispositivo 100 también incluye una segunda sección 150 que tiene una entrada 154, una salida 156, un canal 158, un área de reacción 160 y un área de desecho 174. El área de reacción puede incluir varias zonas de detección 162, 164, 166 y 168. Las zonas de detección pueden tener cualquier configuración y/o disposición adecuada. En una realización, cada una de las zonas de detección está en forma de un canal sinuoso (serpentina), tal como se describe en más detalle a continuación y en la publicación de patente internacional n.º WO2006/113727 (solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/US06/14583), presentada el 19 de abril de 2006 y titulada "Fluidic Structures Including Meandering and Wide Channels" (Estructuras fluídicas que incluyen canales sinuosos y amplios). Las zonas de detección pueden disponerse para detectar, por ejemplo, diferentes componentes de muestra, o pueden usarse como controles positivos y/o negativos. En algunos casos, una o más de las zonas de detección contienen un reactivo almacenado en las mismas. En una realización particular, un dispositivo usado para realizar un inmunoensayo incluye una serie de reactivos secos almacenados. Los reactivos pueden fisorberse sobre una superficie del canal sinuoso. Por ejemplo, la zona de detección 162 puede incluir un control negativo (por ejemplo, un detergente que se sabe que evita la adhesión de proteínas), las zonas de detección 164 y 166 pueden incluir diferentes concentraciones de anticuerpos que pueden unirse a un componente en una muestra (o dos anticuerpos diferentes que pueden unirse a diferentes componentes en la muestra), y la zona de detección 168 puede incluir un control positivo (por ejemplo, el mismo antígeno que se espera determinar a partir de una muestra). El control positivo puede usarse como control cualitativo; por ejemplo, si una señal alcanza un determinado umbral, la prueba puede considerarse válida. Adicionalmente y/o alternativamente, el control positivo también puede usarse como herramienta cuantitativa; por ejemplo, la intensidad de la señal puede ser parte de un proceso de calibración sobre chip.

Tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 3A, cada una de las áreas dentro de la sección 150 están en comunicación de fluido entre sí, pero ninguna está en comunicación de fluido con ninguno de los componentes de la sección 106. En determinadas realizaciones, la sección 150 que contiene reactivos secos almacenados y la sección 106 que contiene reactivos húmedos almacenados están configuradas para no estar en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso porque esta configuración puede promover el almacenamiento a largo plazo de cada uno de los reactivos en sus secciones respectivas, tal como se describe adicionalmente a continuación.

Tal como se muestra en la figura 3B, las secciones 106 y 150 pueden conectarse usando el conector fluídico 178, provocando que las secciones 106 y 150 estén en comunicación de fluido entre sí. Si la salida 118 y la entrada 154 están cubiertas con un sello (por ejemplo, una cinta biocompatible) en la figura 3A, esta conexión puede provocar que los sellos sobre la salida y entrada se perforen, se rompan o se retiren.

Se usa el conector fluídico 178 para carga de muestra e incluye la muestra 180 contenida en el mismo. Tal como se describe en el presente documento, la muestra 180 puede introducirse en el conector fluídico 178 mediante cualquier método adecuado, y se introduce en el conector fluídico antes de que haya comunicación de fluido entre las secciones 106 y 150.

Tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 3C, los fluidos en el área de almacenamiento de reactivo 110 y la muestra 180 pueden fluir desde la sección 106 hacia la sección 150. Puede tener lugar flujo de fluido, por ejemplo, aplicando una presión positiva a la entrada 116 (por ejemplo, usando un pistón, gravedad o una bomba) o aplicando una fuente de vacío a la salida 156. En tales realizaciones, una fuente de presión positiva y/o vacío puede conectarse con una o más entradas y/o salidas, respectivamente.

La muestra 180 fluye en primer lugar en el área de reacción 160 (figura 3C), y después en el área de desecho 174 (figura 3D). El paso de la muestra a través de las zonas de detección permite la interacción (por ejemplo, unión) entre uno o más componentes de la muestra (por ejemplo, un antígeno) y uno o más componentes en el área de reacción (por ejemplo, un anticuerpo). Tal como se describe en el presente documento, el/los componente(s) del área de reacción puede(n) estar en forma de reactivos secos almacenados en el área de reacción antes del primer uso. Esta interacción puede formar un producto tal como un complejo de par de unión. En algunos casos, esta interacción sola provoca que se determine una señal (por ejemplo, medida) mediante un detector acoplado al sistema microfluídico. En otros casos, con el fin de que el detector determine una señal precisa, el producto se trata mediante uno o más reactivos del área de almacenamiento de reactivo 110. Por ejemplo, un reactivo almacenado en el área de almacenamiento de reactivo 110 puede ser un anticuerpo marcado que interactúa con un antígeno de la muestra. Esta interacción puede permitir que el producto se marque o que la señal del producto se amplifique.

En una realización particular que implica un inmunoensayo, los reactivos almacenados en el área de almacenamiento incluyen una disolución de amplificación enzimática y un tinte de precipitación (por ejemplo, diaminobencidina, DAB). El uno o más reactivos del área de almacenamiento de reactivo 110 se permite que pase a través de cada una de las zonas de detección. Estos reactivos pueden interactuar además con un complejo de par de unión, por ejemplo, para amplificar la señal y/o para marcar el complejo, tal como se representa en las zonas de detección 164 y 168 de la figura 3D.

Manteniendo un fluido inmisible (un fluido de separación) entre cada uno de los reactivos en el área de almacenamiento de reactivo, los fluidos almacenados pueden administrarse en secuencia desde el área de almacenamiento de reactivo mientras se evita el contacto entre cualquiera de los fluidos almacenados. Cualquier fluido inmisible que separa los reactivos almacenados puede aplicarse al área de reacción sin alterar las condiciones del área de reacción. Por ejemplo, si se ha producido unión de anticuerpo-antígeno en una de las zonas de detección del área de reacción, puede aplicarse aire al sitio con efecto mínimo o sin efecto sobre cualquier unión que se haya producido.

Tal como se describe en el presente documento, almacenar reactivos en un sistema microfluídico puede permitir que los reactivos se dispensen en un orden particular para un proceso aguas abajo (por ejemplo, amplificar una señal en un área de reacción). En casos en los que se desea un tiempo particular de exposición a un reactivo, la cantidad de cada fluido en el sistema microfluídico puede ser proporcional a la cantidad de tiempo que el reactivo se expone a un área de reacción aguas abajo. Por ejemplo, si el tiempo de exposición deseado para un primer reactivo es el doble del tiempo de exposición deseado para un segundo reactivo, el volumen del primer reactivo en un canal puede ser el doble del volumen del segundo reactivo en el canal. Si se aplica un diferencial de presión constante para hacer fluir los reactivos desde el canal hasta el área de reacción, y si la viscosidad de los fluidos es la misma o similar, el tiempo de exposición de cada fluido en un punto específico, tal como un área de reacción, puede ser proporcional al volumen relativo del fluido. También pueden alterarse factores tales como geometría, presión o viscosidad del canal para cambiar las velocidades de flujo de fluidos específicos del canal.

Adicionalmente, esta estrategia de almacenar reactivos en secuencia, especialmente reactivos de amplificación, puede adaptarse a una amplia variedad de análisis químicos. Por ejemplo, pueden usarse diversos análisis químicos de amplificación que producen señales ópticas (por ejemplo, absorbancia, fluorescencia, quimioluminiscencia de tipo glow o flash, electroquimioluminiscencia), señales eléctricas (por ejemplo, resistencia o conductividad de estructuras de metal creadas por un proceso sin corriente eléctrica) o señales magnéticas (por ejemplo, perlas magnéticas) para permitir la detección de una señal mediante un detector.

El uso de tapones gaseosos (por ejemplo, aire) para separar reactivos requiere que el dispositivo microfluídico global sea compatible con muchas burbujas de aire. Aunque las burbujas de aire pueden estabilizarse y/o controlarse dentro de los dispositivos microfluídicos usando una variedad de métodos, un método particular usado en determinadas realizaciones descrito en el presente documento incluye limitar el número de intersecciones de canales en el sistema. Por consiguiente, los dispositivos microfluídicos descritos en el presente documento pueden diseñarse para tener unas pocas (por ejemplo, menos de 5, 4, 3 o 2), una, o ninguna intersección de canales. Tal como se usa en el presente documento, una intersección de canal incluye, al menos, tres canales (o porciones de uno o más canales) que intersecan en un único punto (por ejemplo, formando una "Y"). Por ejemplo, el dispositivo 100 de la figura 3 no tiene ninguna intersección de canal y el dispositivo 200 de la figura 4 solo tiene una intersección de canal 219. Los dispositivos que no tienen ninguna intersección de canal pueden ser útiles, por ejemplo, para realizar reacciones que no requieren mezclado de reactivos (por ejemplo, reactivos almacenados).

Las figuras 4A-4D muestran otro ejemplo de un dispositivo microfluídico que incluye un conector fluido y que contiene reactivos almacenados que pueden usarse en una reacción química y/o biológica. Tal como se muestra en estas realizaciones ilustrativas, el dispositivo 200 incluye una primera sección 202 que comprende el área de almacenamiento de reactivo 204. El área de almacenamiento de reactivo tiene dos partes: una porción superior 205 y una porción inferior 206. La porción superior incluye el canal 208 que tiene la entrada 216 conectada al mismo y el canal 209 que tiene la entrada 217 conectada al mismo. Los canales 208 y 209 se separan en la porción superior y se encuentran en la intersección 219, que se conecta con el canal 212 de la porción inferior. El canal 212 se conecta

con una salida 218. El dispositivo 200 que tiene dos entradas 216 y 217, cada una conectada con un canal diferente, puede ser útil, por ejemplo, para realizar reacciones en las que dos reactivos necesitan almacenarse por separado en el dispositivo, pero que requieren mezclado durante el uso o inmediatamente antes del uso.

5 En una realización particular, el dispositivo 200 se usa para realizar un inmunoensayo para determinar IgG humana, que usa potenciación con plata para amplificación de señales. Se almacena una disolución de sales de plata en el canal 208 y se almacena una disolución de hidroquinona en el canal 209. Dado que estos dos componentes, que pueden producir amplificación de señales tras mezclado, se ubican en canales diferenciados, no pueden mezclarse entre sí hasta que el flujo conduzca ambas disoluciones hacia la intersección 219.

10 Los reactivos que no tienen que mezclarse entre sí pueden almacenarse en la porción inferior 206 del área de almacenamiento de reactivo. Estos reactivos pueden incluir, por ejemplo, fluidos de aclarado, fluidos de anticuerpo y otros fluidos según sea necesario. Los reactivos pueden estar en forma de tapones que se separan entre sí mediante tapones de fluido inmiscible 230 (por ejemplo, un fluido de separación tal como un gas (por ejemplo, aire) o un aceite). En la figura 4A, las entradas 216 y 217, y la salida 218 se sellan para evitar la evaporación y contaminación de los reactivos almacenados.

15 El dispositivo 200 también incluye una segunda sección 250 que tiene una entrada 254, una salida 256, un canal 258, un área de reacción 260 y un área de desecho 274. El área de reacción puede incluir varias zonas de detección 262, 264, 266 y 268. Opcionalmente, una o más zonas de detección pueden estar en forma de una región de canal sinuoso, tal como se describe en el presente documento. Las zonas de detección pueden estar dispuestas para detectar, por ejemplo, diferentes componentes de muestra, o usarse como controles positivos y/o negativos. En la invención, una o más de las zonas de detección contienen un reactivo almacenado en las mismas. En una realización, un dispositivo usado para realizar un inmunoensayo incluye una serie de reactivos secos almacenados. Los reactivos pueden fisorberse sobre una superficie de un canal sinuoso de una zona de detección.

20 En una realización particular, en la que el dispositivo 200 se usa para realizar un inmunoensayo para determinar IgG humana y usa potenciación con plata para amplificación de señales, una o más superficies de los canales sinuosos del área de reacción se modifica mediante biomoléculas tales como BSA (albúmina sérica bovina) o Tween, un control negativo (por ejemplo, un detergente que se sabe que evita adhesión de proteínas), diferentes concentraciones de anticuerpos (por ejemplo, anti-IgG humana) que pueden unirse a un componente en una muestra, e IgG humana, un control positivo (por ejemplo, el mismo antígeno que se espera que se determine a partir de una muestra). Estos reactivos se almacenan en la sección 250 antes del uso mediante sellado de la entrada 254 y salida 256.

25 Tal como se muestra en la figura 4B, las secciones 202 y 250 pueden conectarse usando el conector fluido 278, haciendo que las secciones 202 y 250 estén en comunicación de fluido entre sí. El conector fluido 278 se usa para carga de muestra e incluye la muestra 280 (por ejemplo, sangre) contenida en el mismo. Tal como se describe en el presente documento, la muestra 280 puede introducirse en el conector fluido 278 mediante cualquier método adecuado, y, en la invención, se introduce en el conector fluido antes de que haya comunicación de fluido entre las secciones 202 y 250.

30 Tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 4C, los fluidos en el área de almacenamiento de reactivo 204 y la muestra 280 pueden fluir hacia la sección 250. Puede tener lugar flujo de fluido, por ejemplo, aplicando una presión positiva a las entradas 216 y 217 (por ejemplo, usando un pistón, gravedad o una bomba) o aplicando una fuente de vacío a la salida 256. La muestra 280 fluye en primer lugar en el área de reacción 260 (figura 4C), y luego en el área de desecho 274 (figura 4D). El paso de la muestra a través de las zonas de detección permite la interacción (por ejemplo, unión) entre uno o más componentes de la muestra y uno o más componentes almacenados en el área de reacción. Estas interacciones pueden formar, por ejemplo, un producto tal como un complejo de par de unión. El flujo de fluidos posterior desde el área de almacenamiento de reactivo sobre las zonas de detección puede provocar el marcaje del producto y/o amplificación de señales.

35 En una realización particular, se usa el dispositivo 200 para realizar un inmunoensayo para determinar IgG humana y usa potenciación con plata para amplificación de señales. Tras la administración de una muestra que contiene IgG humana desde el conector fluido hasta el área de reacción, puede tener lugar la unión entre la IgG humana y un reactivo seco almacenado, anti-IgG humana. Esta unión puede formar un complejo de par de unión en una zona de detección. Los reactivos almacenados de la porción inferior 206 de área de almacenamiento de reactivo 204 pueden fluir entonces sobre este complejo de par de unión. Uno de los reactivos almacenados puede incluir una disolución de coloide metálico (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con oro) que se une específicamente al antígeno que va a detectarse (por ejemplo, IgG humana). Este coloide metálico puede proporcionar una superficie catalítica para la deposición de un material opaco, tal como una capa de metal (por ejemplo, plata), sobre una superficie de la zona de detección. La capa de metal puede formarse usando un sistema de dos componentes tal como se describió anteriormente: un precursor de metal (por ejemplo, una disolución de sales de plata), que puede almacenarse en el canal 208, y un agente de reducción (por ejemplo, hidroquinona), que puede almacenarse en el canal 209. A medida que se aplica al sistema un diferencial de presión positivo o negativo, la sal de plata y disoluciones de hidroquinona se combinan eventualmente en la intersección 219, donde se mezclan lentamente (por

ejemplo, debido a difusión) a lo largo del canal 212, y después fluyen sobre el área de reacción. Por tanto, si se produce unión de anticuerpo-antígeno en el área de reacción, el flujo de la disolución de precursor metálico a través del área puede dar como resultado la formación de una capa opaca, tal como una capa de plata, debido a la presencia del coloide metálico catalítico asociado con el complejo de anticuerpo-antígeno. La capa opaca puede incluir una sustancia que interfiere con la transmitancia de luz a una o más longitudes de onda. Cualquier capa opaca que se forma en el canal microfluídico puede detectarse ópticamente, por ejemplo, midiendo una reducción en la transmitancia de luz a través de una porción del área de reacción (por ejemplo, un canal sinuoso) en comparación con una porción de un área que no incluye el anticuerpo o antígeno. Alternativamente, puede obtenerse una señal midiendo la variación de transmitancia de luz en función del tiempo, puesto que la película se forma en una zona de detección. La capa opaca puede proporcionar un aumento en la sensibilidad del ensayo cuando se compara con técnicas que no forman una capa opaca.

Las figuras 5A-5F muestran imágenes de un dispositivo usado para realizar un inmunoensayo de IgG humana según una realización de la invención, y se describe en más detalle en la sección de ejemplos.

Aunque se describen principalmente inmunoensayos, debe entenderse que los dispositivos descritos en el presente documento pueden usarse para cualquier reacción química y/o biológica adecuada, y pueden incluir, por ejemplo, otros ensayos de fase sólida que implican reacción de afinidad entre proteínas u otras biomoléculas (por ejemplo, ADN, ARN, hidratos de carbono), o moléculas que no se producen de manera natural.

Además, aunque la invención descrita en el presente documento incluye el uso de un conector fluídico para conectar dos canales, las realizaciones de la presente divulgación también incluyen artículos y métodos para introducir una muestra en un sistema microfluídico sin usar un conector fluídico. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente divulgación, puede usarse un dispositivo fluídico de extremos abiertos (es decir, un dispositivo en el que solo un extremo se conecta con un sistema microfluídico) para introducir una muestra en el sistema microfluídico.

La figura 6 no forma parte de la invención y se proporciona solo como información. Muestra un diagrama de bloques 560 de un dispositivo microfluídico que es compatible con el uso un dispositivo de extremo abierto para introducción de muestra. El dispositivo microfluídico puede contener reactivos almacenados y puede usarse para realizar una reacción química y/o biológica (por ejemplo, un inmunoensayo). El dispositivo microfluídico incluye una entrada de reactivo 562 en comunicación de fluido con un área de almacenamiento de reactivo 564, que puede incluir, por ejemplo, uno o más canales y/o depósitos. El dispositivo también puede incluir una entrada de muestra 565, área de carga de muestra 566 y área de reacción 568. El área de reacción, que puede incluir una o más áreas para detectar un componente en una muestra, puede estar en comunicación de fluido con el área de desecho 570, y puede acoplarse a la salida 572. En algunas realizaciones, el área de reacción 568 es un área de inmunoensayo.

Las figuras 7A-7D tampoco forman parte de la invención y se proporcionan solo como información. Muestran un ejemplo de un sistema microfluídico que tiene las características descritas en la figura 6. El sistema microfluídico 590 es compatible con un dispositivo fluídico de extremos abiertos para introducir una muestra en el sistema. En la figura 7A, se almacenan reactivos fluidos en el área de almacenamiento de reactivo 564 y se almacenan reactivos secos en el área de reacción 568. Las entradas 562 y 565, y la salida 572 se sellan antes del uso. Tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 7B, un sello sobre la entrada de muestra 565 puede perforarse, retirarse o romperse para permitir que una muestra 592 se introduzca en la entrada de muestra 565, que puede fluir en el área de carga de muestra 566, que puede incluir un canal sinuoso vacío 594. El flujo de la muestra puede tener lugar inicialmente mediante fuerzas capilares. Opcionalmente, puede colocarse un sello sobre la entrada de muestra 565 y puede aplicarse vacío a la salida 572 para provocar flujo de fluido hacia la salida (figura 7C). La muestra fluye en el área de reacción 568, seguida por los reactivos fluidos almacenados del área de almacenamiento de reactivo 564. Tal como se muestra en la figura 7D, después de que todos los reactivos hayan pasado a través del área de reacción, pueden contenerse en el área de desecho 570 (u, opcionalmente, pueden salir fuera del dispositivo por medio de la salida).

Tal como se describe en el presente documento, pueden introducirse fluidos (por ejemplo, muestras) en un dispositivo microfluídico usando una variedad de dispositivos tales como un dispositivo fluídico de extremos abiertos y/o un conector fluídico. Aunque se muestran varias configuraciones de tales dispositivos en las figuras 8-13, debe entenderse que la invención no se limita a estas configuraciones y que otras configuraciones y/o disposiciones son posibles. Adicionalmente, aunque las descripciones en el presente documento que implican componentes de introducción de muestra (por ejemplo, dispositivos fluídicos de extremos abiertos y conectores fluídicos) describen principalmente la introducción de muestras en sustratos microfluídicos, tales componentes pueden usarse según la presente divulgación para introducir cualquier sustancia adecuada tal como reactivos (por ejemplo, tampones, reactivos de amplificación, un componente de un sistema de dos partes), gases y partículas. En la presente invención, la trayectoria de fluido del conector fluídico contiene una muestra dispuesta en el mismo antes de la conexión del conector fluídico con el sustrato.

Para dispositivos usados en ámbitos de diagnóstico inmediato, los componentes de introducción de muestra pueden diseñarse para proteger al usuario de peligros laborales. Adicionalmente, la complejidad de la etapa de manejo de muestra puede minimizarse para permitir el uso del dispositivo fuera de laboratorios médicos. Estos factores pueden

considerarse cuando se elige un diseño particular para un componente de introducción de muestra.

5 El componente de introducción de muestra de la invención es un conector fluido, y puede incluir cualquier artículo adecuado que tiene una trayectoria de fluido dispuesta en el mismo. El componente de introducción de muestra (así como otros canales del sistema microfluídico) pueden tener un diámetro interno constante o variable y pueden tener una proporción de longitud con respecto a diámetro interno de, por ejemplo, más de 10 a 1, más de 50 a 1, o más de 100 a 1. Según la aplicación, pueden usarse componentes de introducción de muestra (o canales microfluídicos) de cualquier diámetro, y en muchas aplicaciones puede tener un diámetro interno de, por ejemplo, menos de 1 cm, menos de 5 mm, menos de 1 mm, menos de 500 micrómetros, menos de 200 micrómetros, menos de 100 micrómetros, o menos de 50 micrómetros. Un componente de introducción de muestra (o canal microfluídico) con una mayor proporción de longitud con respecto a diámetro interno puede ser útil para indicar visualmente la cantidad de cada fluido contenido en el componente (o canal microfluídico). Por ejemplo, una medición lineal de un tapón de fluido en un dispositivo fluido o conector fluido de diámetro interno conocido puede dar una indicación precisa del volumen o el volumen relativo del fluido. En algunas realizaciones, el componente de introducción de muestra comprende un tubo. Los tubos están fácilmente disponibles en diferentes diámetros, longitudes y materiales. Los tubos pueden ser flexibles y pueden ser translúcidos o transparentes. Los tapones de fluido en un tubo pueden medirse linealmente como indicación del volumen del tapón.

20 El componente de introducción de muestra, si un tubo u otra forma, puede incluir dos o más ramas o secciones que pueden estar en comunicación de fluido entre sí y con el interior restante del componente. En algunas realizaciones, un tubo puede tener dos, tres, cuatro o más ramas que pueden interconectarse. Las ramas y confluencias de ramas pueden o no incluir válvulas. Las válvulas pueden usarse para separar temporalmente una o más ramas, y cualquier líquido contenido en las mismas, del resto del tubo.

25 En algunas realizaciones, un componente de introducción de muestra que es un conector fluido incluye un elemento de control del volumen. El elemento de control del volumen puede permitir que un fluido rellene una porción, pero no toda, de una trayectoria de fluido de un componente de introducción de muestra. El elemento de control del volumen puede usarse para dosificar un volumen particular de fluido para introducción en un sistema microfluídico. En una realización, un elemento de control del volumen es una frita, que puede colocarse dentro de una trayectoria de fluido de un componente de introducción de muestra para detener la introducción de fluido adicional dentro de la trayectoria de fluido después de que el fluido alcanza un volumen particular. El volumen de fluido (por ejemplo, muestra) en el componente de introducción de muestra puede definirse mediante el volumen de la trayectoria de fluido entre el punto de entrada (por ejemplo, una entrada) para la introducción de fluido y la frita; el volumen restante puede ocuparse por aire.

35 En otra realización, un elemento de control del volumen incluye una o más marcas de dosificación que indican hasta qué punto(s) debe introducirse un fluido en la trayectoria de fluido. El volumen de fluido en la trayectoria de fluido puede controlarse por el usuario.

40 En aún otra realización, un elemento de control del volumen incluye un cambio en el diámetro (por ejemplo, ensanchamiento) de una trayectoria de fluido dentro del componente de introducción de muestra. Por ejemplo, un conector fluido puede incluir un primer extremo (por ejemplo, una abertura), una primera porción de una trayectoria de fluido que tiene un primer diámetro, una segunda porción de la trayectoria de fluido que tiene un segundo diámetro, seguido por un segundo extremo (por ejemplo, una abertura). El segundo diámetro puede ser mayor que el primer diámetro. El primer diámetro puede ser favorable para provocar que el fluido fluya en la trayectoria de fluido por medio de fuerzas capilares, mientras que el segundo diámetro puede ser menos favorable (o inadecuado) para acción capilar. Por consiguiente, un fluido puede entrar en la primera porción de la trayectoria de fluido por medio del primer extremo y el fluido puede detener la entrada en la trayectoria de fluido cuando alcanza la segunda porción de la trayectoria de fluido. En esta realización, el volumen de fluido (por ejemplo, muestra) en el componente de introducción de muestra puede definirse por el volumen de la primera porción de la trayectoria de fluido; el volumen restante (por ejemplo, la segunda porción de la trayectoria de fluido) puede ocuparse por aire. Los expertos habituales en la técnica saben cómo determinar diámetros de trayectorias de fluido que son favorables o menos favorables para acción capilar.

55 En aún otra realización, un elemento de control del volumen incluye una superficie con patrones dentro de una trayectoria de fluido del componente de introducción de muestra. Por ejemplo, un componente de introducción de muestra puede incluir un primer extremo (por ejemplo, una abertura), una primera porción de una trayectoria de fluido que tiene una primera superficie hidrófila, una segunda porción de la trayectoria de fluido que tiene una segunda superficie hidrófoba, seguido por un segundo extremo (por ejemplo, una abertura). La primera superficie hidrófila puede provocar que un fluido hidrófilo (por ejemplo, un fluido acuoso) fluya en la trayectoria de fluido por medio de fuerzas capilares, mientras que la segunda superficie hidrófoba es menos favorable para acción capilar. Por consiguiente, un fluido puede entrar en la primera porción de la trayectoria de fluido por medio del primer extremo y el fluido puede detener la entrada en la trayectoria de fluido cuando alcanza la segunda porción de la trayectoria de fluido. En esta realización, el volumen de fluido (por ejemplo, muestra) en el componente de introducción de muestra puede definirse mediante el volumen de la primera porción de la trayectoria de fluido; el volumen restante (por ejemplo, la segunda porción de la trayectoria de fluido) puede ocuparse por aire. En una

realización particular, una porción hidrófila de la trayectoria de fluido se define mediante la presencia de un anticoagulante (por ejemplo, heparina, un quelante (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético, EDTA) o citrato), y una porción hidrófoba de la trayectoria de fluido se define mediante la ausencia de un anticoagulante (o la presencia de una o más moléculas hidrófobas). Los expertos habituales en la técnica conocen métodos y materiales para superficies con patrón de trayectorias de fluido.

En algunas realizaciones, un componente de introducción de muestra que es un conector fluido puede incluir una combinación de elementos de control del volumen tales como los descritos anteriormente. Un componente de introducción de muestra que incluye uno o más elementos de control del volumen puede llenarse usando cualquier método adecuado tal como mediante fuerzas capilares, aplicación de un vacío, aplicación de una presión positiva y mediante el uso de válvulas.

Tal como se describe en más detalle a continuación, pueden conectarse componentes de introducción de muestra con un sustrato usando una variedad de métodos. Por ejemplo, un componente de introducción de muestra y/o sustrato puede incluir uno o más de lo siguiente: ajustes de presión, ajustes de fricción, conectores hilados tales como ajustes de tornillo, ajustes de cierre, ajustes de adhesivo, pinzas, conectores magnéticos, u otros mecanismos de acoplamiento adecuados.

La figura 8A no forma parte de la invención y muestra un ejemplo de un tubo capilar de extremo abierto 700 (por ejemplo, dispositivo fluido de extremos abiertos) que puede usarse para introducir una muestra en una entrada de un dispositivo (por ejemplo, entrada de muestra 565 de la figura 7A, que no forma parte de la invención). El tubo 700 puede tener un extremo abierto 704 (por ejemplo, para insertar en una entrada de un dispositivo); el extremo 702 puede estar o bien abierto o bien cerrado. Tal como se muestra en la figura 8B, un tubo capilar 710 también puede usarse como conector fluido para conectar dos canales (o porciones de un canal) de un sistema microfluido, por ejemplo, tal como se describe en relación con la figura 3. El tubo 710 puede incluir extremos abiertos 712 y 714. El uso de un capilar doblado para formar una forma de "U" es uno de los muchos dispositivos posibles que pueden usarse para conectar dos canales (o porciones de un canal).

Los dispositivos de la figura 8A (que no forma parte de la invención) y la figura 8B pueden estar hechos de cualquier material adecuado (por ejemplo, un polímero o cerámica) y pueden ser rígidos o flexibles. Los ejemplos no limitativos de tales materiales incluyen vidrio, cuarzo, silicio, PTFE (Teflón), polietileno, policarbonato, poli(dimetilsiloxano), PMMA, poliestireno, un copolímero de cicloolefina (COC) y polímero de cicloolefina (COP). En determinadas realizaciones en las que los tubos están formados por un material flexible, el tubo puede colocarse en un soporte de un material lo suficientemente rígido para mantener el tubo en su forma final. Por ejemplo, tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 8C, el tubo 720 puede colocarse en la ranura 732 de soporte 730 para mantener la forma del tubo. Opcionalmente, una cubierta 734 puede usarse para cubrir el soporte y puede unirse al soporte, por ejemplo, mediante sellado, pegamento, unión, usando adhesivos, o mediante unión mecánica (por ejemplo, sujetándolo en el recipiente). En otras realizaciones, en lugar de colocar el tubo en una ranura, el soporte puede incluir características elevadas (por ejemplo, pinzas) para sujetar el tubo. Los extremos 722 y 724 pueden exponerse para permitir la conexión con o más canales de un sistema microfluido (figura 8D).

En otra realización, un conector fluido puede estar hecho de un material sensible a la radiación tal como un plástico flexible que se endurece tras la exposición a calor o luz UV. Tras plegar o doblar el dispositivo en la forma deseada (por ejemplo, una forma de "U"), la exposición a las radiaciones adecuadas puede provocar que el capilar mantenga su forma nueva.

En aún otra realización, en lugar de doblar capilares rectos para formar un diseño con forma de U, el conector fluido puede fabricarse directamente en su forma final. Un ejemplo incluye un capilar hecho de vidrio soplado en la forma curvada, que puede permitir la carga de muestra sobre el dispositivo microfluido y/o conexión de fluido entre canales o porciones de un canal. También pueden usarse otras técnicas y materiales de fabricación, incluyendo moldeo por inyección o extrusión de plásticos.

Tal como se muestra en las realizaciones ilustradas en las figuras 9A-9F, pueden usarse dispositivos monolíticos 800 y 830 que tienen volúmenes huecos y elongados (por ejemplo, microcanales 804) como conectores fluidos. Los dispositivos pueden ser rígidos (por ejemplo, para evitar la necesidad de que el usuario doble un capilar) y pueden incluir opcionalmente un mango para el manejo simple (por ejemplo, un mango vertical 810 tal como se muestra en la figura 9B o un mango lateral 812 tal como se muestra en la figura 9E). En tales realizaciones, un bucle de tubos de un capilar con forma de U puede sustituirse con microcanales 804 que tienen cualquier dimensión adecuada formados en un sustrato 816. Las dimensiones de los microcanales pueden ajustarse para acomodar un amplio intervalo de volúmenes de fluido (por ejemplo, 1-1000 μ l). Tales dispositivos pueden llenarse completamente con la muestra o pueden llenarse parcialmente con la muestra (por ejemplo, usando un elemento de control del volumen para dosificar la cantidad de fluido en la trayectoria de fluido). Además, las dimensiones de los microcanales también pueden elegirse para permitir la introducción del fluido en los canales con fuerzas capilares, o alternativamente, el fluido puede aspirarse usando vacío.

Los canales pueden cubrirse mediante una cubierta (por ejemplo, cubiertas 820 y 822), que pueden ser, por

ejemplo, un bloque, una película de adhesivo o una cinta. El dispositivo presentado en las figuras 9A-9C puede requerir una etapa de unión (por ejemplo, mediante el uso de un adhesivo) entre la cubierta 820 y el sustrato 816. En algunas realizaciones, una etapa de unión de este tipo puede evitarse aplicando una cubierta 822 tal como una película de adhesivo (por ejemplo, cinta) sobre la superficie del dispositivo (figuras 9D-9F).

5 Tal como se ilustra en las figuras 9A y 9D, los dispositivos 800 y 830 pueden incluir orificios de acceso 806 y 808 (por ejemplo, entradas y salidas) que pueden permitir que se introduzca un fluido en la trayectoria de fluido y/o para permitir la comunicación de fluido entre canales (o porciones de un canal) de un sistema microfluídico. Los orificios de acceso pueden tener cualquier forma adecuada para permitir la formación de un sello estrecho con los orificios del sistema microfluídico. Tal como se muestra en las realizaciones ilustradas en la figura 9, los orificios pueden tener una forma cónica que son complementarios a aberturas cónicas de un dispositivo microfluídico.

10 En algunas realizaciones, una vez se conecta un conector fluido con un dispositivo microfluídico (por ejemplo, los dispositivos mostrados en las figuras 1, 3 y 4), se aplica vacío a una salida del dispositivo para provocar flujo de fluido en el sistema. En estas realizaciones, el vacío puede fortalecer la calidad del sello entre los orificios complementarios.

Otro ejemplo de un conector fluido se muestra en las figuras 10A y 10B. En las realizaciones ilustradas en las figuras 10A y 10B, se prepara el conector fluido 852 ensamblando dos partes 850. El conector fluido 852 muestra la implementación de una trayectoria de fluido 855 dentro de un sustrato rígido 858, aunque en otras realizaciones, puede usarse cualquier geometría arbitraria incluyendo una configuración de canal sinuoso. Los orificios de entrada y salida 862 y 864 pueden ser parte de una protuberancia cónica 865 para formar un sello hermético con las aberturas cónicas del chip microfluídico. Tal como se describe en más detalle a continuación, puede implementarse un sistema de conexión más elaborado, tal como mecanismos de cierre o ajustes no cónicos. El conector fluido puede optimizarse para permitir el manejo simple para el usuario (incluyendo la adición de un mango al diseño), si se desea.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el conector fluido se conecta con un dispositivo microfluídico (por ejemplo, un sustrato que incluye canales microfluídicos dispuestos en el mismo), insertando los orificios del conector fluido en agujeros de acceso ubicados directamente por encima del/de los microcanal(es) del sustrato. Como resultado, la trayectoria de fluido del conector fluido puede estar en un plano ortogonal con respecto al plano de los microcanales del sustrato, tal como se muestra en la figura 11A. En algunas aplicaciones, sin embargo, hay ventajas para colocar el conector fluido en el mismo plano que la red de microcanales (por ejemplo, usando una conexión lateral). Una ventaja de esta configuración puede ser maximizar el área disponible para observación del dispositivo microfluídico (por ejemplo, para ensayos muy paralelos). Otra ventaja puede ser permitir el apilamiento de un mayor número de dispositivos encima de cada uno mientras que se permite que cada dispositivo sea accesible a dispensadores de fluido u otros instrumentos, lo que puede ahorrar espacio de almacenamiento en un instrumento. En tales realizaciones, un conector fluido 872 puede conectarse con una porción de extremo 876 de un sustrato 880. En otros casos, el conector fluido puede conectarse con un sustrato a un ángulo de entre 90 y 180 grados o entre 0 y 90 grados. Por consiguiente, los conectores fluidos descritos en el presente documento pueden conectarse con un sustrato en cualquier configuración adecuada.

La fiabilidad y simplicidad de formar un buen sello (por ejemplo, hermético a los fluidos) entre un conector fluido y un sustrato microfluídico es un aspecto del diseño crítico de un dispositivo para su uso en ámbitos de diagnóstico inmediato. En ese aspecto, el conector fluido o el sustrato en sí pueden incluir características adicionales para ayudar al usuario a insertar el dispositivo sobre o en el sustrato microfluídico. Por ejemplo, en una realización, el conector fluido incluye al menos una característica no fluidica complementaria a una característica del sustrato para formar una conexión no fluidica entre el conector fluido y el sustrato tras la unión. La característica complementaria no fluidica puede ser, por ejemplo, una característica que sobresale del conector fluido y cavidades complementarias correspondientes del sustrato microfluídico, que pueden ayudar al usuario a alinear el conector fluido con el sustrato. Además, estas características de guía también pueden ayudar a mantener el dispositivo en su sitio. En otros casos, el sustrato incluye características sobresalientes complementarias a cavidades del conector fluido. En aún otra realización, un dispositivo incluye un elemento de alineación asociado con el sustrato y construido y dispuesto para encajarse con el conector fluido y de ese modo colocar el conector en una configuración predeterminada y establecida en relación con el sustrato. Los ejemplos de estas y otras características se describen en más detalle a continuación.

Las figuras 12A-12E ilustran realizaciones que permiten la unión de un conector fluido a un sustrato microfluídico cerrando los dos componentes juntos para formar una conexión. Esta configuración puede ser especialmente útil para aplicaciones que implican diagnóstico inmediato, puesto que el mecanismo de cierre puede permitir un buen sellado entre los componentes, y puede disminuir la probabilidad de que usuario maneje inadecuadamente la herramienta de diagnóstico. El ruido y/o la sensación experimentados por el usuario mientras cierra el conector fluido en el sustrato puede usarse como guía o control para la unión ventajosa de los componentes.

65 Tal como se ilustra en la figura 12A, un conector fluido 900 puede incluir dos primeras porciones idénticas 910 (solo se muestra una) que forman una trayectoria de fluido 912 tras cerrar ambas mitades una contra la otra. En

5 otros casos, el conector fluídico incluye una única pieza integral que incluye una trayectoria de fluido 912 dispuesta en el mismo. Las porciones de extremo 916 y 918 (por ejemplo, una entrada y salida) de la trayectoria de fluido pueden estar conectadas con un sustrato microfluídico (no mostrado) por medio de las características 922 y 924, que pueden ser complementarias a las características del sustrato. El conector fluídico también puede incluir aberturas 930 para insertar las pinzas 934. Las pinzas pueden incluir dos o más características de cierre (por ejemplo, hendiduras) 936 y 938; estas características pueden formarse de cualquier material adecuado (por ejemplo, un polímero) y pueden formarse del mismo material o diferente que el clip y/o el sustrato. La característica 938 puede usarse para conectar el clip con la primera porción 910, y la característica 936 puede usarse para conectar el clip con el sustrato microfluídico. Tales características pueden permitir que el clip se una de manera irreversible al conector de fluido y/o al sustrato. La figura 12B ilustra una vista aumentada del clip. En otras realizaciones, el conector fluídico puede fabricarse con las características de cierre, que pueden ser directamente una parte de 910; por ejemplo, el conector fluídico puede incluir la característica 936 sin el uso del clip 934 (no mostrado).

15 Tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 12C, una vez se inserta un clip en las aberturas 930 (por ejemplo, cuando la característica 938 se encuentra con la abertura 930-B), el clip puede unirse a la porción 910 del conector fluídico. Asimismo, tal como se ilustra en la figura 12D, el conector fluídico puede insertarse en una porción de un sustrato microfluídico 940 para provocar la unión del conector fluídico al sustrato (figura 9E). Las características de cierre pueden guiar el conector fluídico a la posición correcta en el sustrato microfluídico. Tal como se describe en más detalle a continuación, la unión de un conector fluídico a un sustrato puede ser reversible o irreversible. Esta unión puede provocar comunicación de fluido entre un primer canal en la posición 942 del sustrato y un segundo canal (o una porción del primer canal) en la posición 944 del sustrato por medio de la trayectoria de fluido 912. En la presente invención, el conector fluídico se carga con una muestra (por ejemplo, por medio de la porción de extremo 916 o 918) antes de la unión.

25 Como alternativa al mecanismo de cierre descrito en relación con las figuras 12A-12E, puede unirse un conector fluídico a un sustrato microfluídico usando un mecanismo de cierre de cremallera, tal como se ilustra en la figura 13. La figura 13 muestra un componente 955 que incluye las características 956 (por ejemplo, protuberancias) que son complementarias a la porción 960, que incluye las características 962 (por ejemplo, hendiduras). El componente 955 puede ser parte de un conector fluídico y la porción 960 puede ser parte de un sustrato microfluídico. En algunos casos, el componente 955 incluye una trayectoria de fluido 958 dispuesta en el mismo.

35 Aunque se describen características para conectar un artículo y un sustrato, tal como las mostradas en las figuras 9, 10, 12 y 13, con referencia a los conectores fluídicos y sustratos de la invención, tales características también pueden usarse para conectar otros artículos de un dispositivo. Por ejemplo, tales características pueden usarse para conectar componentes tales como un dispositivo fluídico de extremos abiertos y un sustrato en la presente divulgación, un sustrato y una cubierta, y/o múltiples capas de sustrato de un dispositivo.

40 En realizaciones descritas en el presente documento que implican un artículo (por ejemplo, un conector fluídico) que comprende al menos una característica complementaria a una característica del sustrato, las características pueden diseñarse para formar una conexión reversible entre el artículo y el sustrato. Tales realizaciones pueden ser útiles, por ejemplo, para dispositivos reutilizables. En otras realizaciones, tales características complementarias forman una conexión irreversible entre el artículo y el sustrato. La conexión irreversible puede provocar que el artículo y el sustrato se conecten de manera integrada. Tal como se usa en el presente documento, el término "conectado de manera integrada", cuando se hace referencia a dos o más objetos, significa objetos que no se separan entre sí durante el transcurso de uso normal, por ejemplo, no pueden separarse manualmente; la separación requiere al menos el uso de herramientas, y/o provocar daño a al menos uno de los componentes, por ejemplo, rompiendo, pelando o separando los componentes fijados juntos por medio de adhesivos o herramientas. Los dispositivos que incluyen características que forman una conexión irreversible pueden ser útiles, por ejemplo, para dispositivos de un solo uso (por ejemplo, desechables). Tales dispositivos pueden formar una conexión irreversible de modo que el usuario no puede interferir con una reacción química y/o biológica que se está realizando en el dispositivo tras la conexión.

55 Los ejemplos ilustrados en las figuras 12 y 13 incluyen más de dos conexiones (por ejemplo, conexiones fluídicas o no fluídicas) entre un conector fluídico y un sustrato microfluídico. Esta característica puede ser útil porque puntos adicionales de conexión (por ejemplo, conexiones no fluídicas) pueden aumentar la estabilidad de la unión frente al estrés mecánico (por ejemplo, debido al manejo por el usuario) y choques (por ejemplo, uso inadecuado del dispositivo). Adicionalmente, cada punto adicional de conexión puede aumentar el área de contacto entre el conector fluídico y el sustrato, mientras que el área asociada con la formación del sello hermético a fluidos entre el conector fluídico y el sustrato puede permanecer inalterada. Alternativamente, una única conexión no fluídica puede ser suficiente para proporcionar buenas propiedades de sellado.

65 Aunque muchas realizaciones descritas en el presente documento incluyen componentes de introducción de muestra (por ejemplo, conectores fluídicos) que tienen una única trayectoria de fluido, debe entenderse que un componente de introducción de muestra puede incluir más de una trayectoria de fluido y/o trayectorias de ramificación de fluido. Por ejemplo, tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 12E, el conector fluídico 900 puede incluir opcionalmente una trayectoria de flujo secundaria 946, que conecta la entrada 947 con la

trayectoria de flujo 912. Este diseño puede permitir, por ejemplo, la introducción de un fluido en la trayectoria de flujo de fluido 912 por medio de la entrada 947 y trayectoria secundaria 946 después de que el conector fluido 900 se haya conectado con un sustrato. Alternativamente, puede introducirse un fluido en la trayectoria de fluido 912 por medio de la entrada 947 antes de la conexión del conector fluido y el sustrato. En la presente invención, la trayectoria de fluido contiene una muestra antes de la conexión del conector fluido con el sustrato.

Además, los componentes de introducción de muestra tales como conectores de fluido descritos en el presente documento pueden incluir uno o más elementos de muestreo usados para recibir una muestra de fluido de una entidad biológica. El elemento de muestreo puede estar en forma de una jeringuilla o hisopo, por ejemplo. El elemento de muestreo puede estar unido de manera reversible o irreversible a un componente de introducción de muestra. En algunos casos, el elemento de muestreo puede perforar un componente biológico. Por ejemplo, tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 12E, el conector fluido 900 puede incluir un elemento de muestreo (esterilizado) 948, por ejemplo, en forma de un punto hueco y puntiagudo (por ejemplo, una jeringuilla), que puede usarse para perforar un componente tal como piel humana. Esta configuración puede permitir que el elemento de muestreo reciba una muestra de fluido del componente biológico y puede permitir la transferencia de un fluido desde la entidad biológica a la trayectoria de fluido 912 (por ejemplo, mediante fuerzas capilares). Después de que el fluido se haya introducido en la entrada 947, la trayectoria de fluido secundaria 946 puede bloquearse, por ejemplo, usando el componente 949, que puede tener una forma complementaria a la de la trayectoria de fluido 946. Este bloqueo puede evitar que el fluido vuelva a entrar en la trayectoria de fluido secundaria de modo que solo hay una trayectoria de fluido por flujo. Esta disposición también puede evitar que el usuario se exponga adicionalmente al elemento de muestreo 948.

En otra realización, el componente 949 (que incluye opcionalmente una trayectoria de fluido) puede usarse para obtener una muestra, y tras la inserción del componente en la trayectoria de fluido secundaria 946, la muestra puede transferirse desde el componente hasta la trayectoria de fluido 912. En determinadas realizaciones, la inserción del componente evita que el fluido vuelva a entrar en la trayectoria de fluido secundaria de modo que solo hay una trayectoria de fluido por flujo.

En algunas realizaciones, un componente de introducción de muestra incluye un elemento de muestreo conectado directamente con una trayectoria de fluido primaria. Por ejemplo, en la realización ilustrada en la figura 10, las protuberancias cónicas 865, que pueden ser complementarias a una característica de un sustrato microfluido, pueden incluir elementos de muestreo en los extremos que pueden permitir la perforación de un componente biológico. También pueden estar presentes elementos de muestreo como parte de un dispositivo fluido de extremos abiertos (por ejemplo, tal como se muestra en la figura 8A, que no forma parte de la presente invención) y/u otros conectores fluidos descritos en el presente documento como parte de la invención (por ejemplo, la figura 8B).

Los dispositivos descritos en el presente documento pueden incluir opcionalmente un elemento de alineación asociado con el sustrato. El elemento de alineación puede construirse y disponerse para encajarse con el conector fluido y de ese modo colocar el conector fluido en una configuración predeterminada y establecida en relación con el sustrato. Tal como se muestra en las realizaciones ilustradas en las figuras 14A y 14B, el dispositivo 964 puede incluir un sustrato 966, un conector fluido 968 y un elemento de alineación 980. El sustrato 966 puede incluir un sistema microfluido tal como el descrito en el presente documento, por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 1-7, 11, 17-18. Los sistemas de las figuras 6 y 7 no forman parte de la presente invención. El sistema microfluido comprende al menos un primer canal microfluido que incluye una entrada y una salida y un segundo canal microfluido que incluye una entrada y una salida (no mostrado). El conector fluido 968, que puede tener una configuración tal como se describe en el presente documento y puede construirse para coincidir la conexión con el sustrato. El conector fluido puede incluir una trayectoria de fluido 970 que tiene una entrada de trayectoria de fluido 972 y una salida de trayectoria de fluido 974. Tras la conexión del conector fluido con el sustrato, la entrada de trayectoria de fluido se conecta con la salida del primer canal microfluido del sustrato, y la salida de trayectoria de fluido 974 se conecta con la entrada del segundo canal microfluido del sustrato. Esta conexión da como resultado comunicación de fluido entre los canales microfluidos primero y segundo del sustrato.

Tal como se muestra en las realizaciones ilustrativas de las figuras 14A y 14B, el dispositivo puede incluir un elemento de alineación 980 asociado con el sustrato y que se extiende aproximadamente perpendicular al sustrato. Por ejemplo, aunque el sustrato 966 (así como los canales microfluidos primero y segundo) se encuentra generalmente en el plano definido entre las flechas 975 y 977, el elemento de alineación 980 se extiende generalmente perpendicular al sustrato en el plano definido por las flechas 975 y 976. En otras realizaciones, el elemento de alineación puede extenderse aproximadamente paralelo al sustrato.

Tal como se ilustra, el elemento de alineación 980 incluye una cavidad 981 construida y dispuesta para recibir y encajar el conector fluido y de ese modo colocar el conector en una configuración predeterminada y establecida en relación con el sustrato. La cavidad puede tener una profundidad de, por ejemplo, al menos 0,5 cm, al menos 1 cm, al menos 1,5 cm, al menos 2 cm, o al menos 3 cm (por ejemplo, tal como se mide a partir de la posición de la entrada de trayectoria de fluido y/o la salida de trayectoria de fluido tras el encajamiento del conector fluido y el elemento de alineación). La cavidad puede tener una profundidad similar o igual a la altura del conector fluido. La

cavidad no tiene necesariamente que abarcar todos los lados del conector fluido, siempre que se construya y se disponga para recibir y encajar el conector fluido y de ese modo colocar el conector en una configuración predeterminada y establecida en relación con el sustrato.

5 En algunas realizaciones, la configuración del elemento de alineación y el conector fluido puede estar adaptada para permitir la inserción del conector fluido en el elemento de alineación mediante un movimiento de deslizamiento. Por ejemplo, el conector fluido puede deslizarse contra una o más superficies del elemento de alineación cuando el conector fluido se inserta en el elemento de alineación.

10 Un elemento de alineación puede tener cualquier configuración adecuada para encajar un conector de fluido. En algunas realizaciones, el elemento de alineación (o una cavidad de un elemento de alineación) puede estar en contacto con 1, 2, 3, 4 o más superficies, por ejemplo, las superficies 984, 985, 986 y/o 987, del conector de fluido tras encajar. Una o más superficies del elemento de alineación en contacto con el conector fluido pueden extenderse desde el sustrato, por ejemplo, a lo largo de los planos definidos entre las flechas 976 y 977, entre las
15 flechas 976 y 975, y entre medias.

Además, toda o una porción del elemento de alineación puede tener una altura, un grosor o una profundidad (por ejemplo, para la inserción de un conector fluido) que puede ser, por ejemplo, mayor de o igual a al menos 1, 2, 3, 4, 5, etc., veces el grosor 979 del sustrato. El elemento de alineación puede tener una altura o un grosor de, por
20 ejemplo, al menos 0,5 cm, al menos 1 cm, al menos 1,5 cm, al menos 2 cm o al menos 3 cm (por ejemplo, tal como se mide desde la posición de la entrada de trayectoria de fluido y/o salida de trayectoria de fluido tras el encaje del conector fluido y el elemento de alineación). Una altura/grosor mayor del elemento de alineación puede permitir, en algunas realizaciones, una estabilización y/u orientación adicional del conector fluido en el elemento de alineación. Las dimensiones pueden variar y pueden depender de una variedad de factores tales como las dimensiones del
25 conector fluido y el sustrato.

Opcionalmente, el elemento de alineación puede incluir uno o más componentes de encaje que pueden encajarse con una porción del conector fluido. La figura 14A muestra el conector fluido que tiene componentes de encaje 982. El componente de encaje puede tener una altura de, por ejemplo, al menos 0,5 cm, al menos 1 cm, al menos
30 1,5 cm o al menos 2 cm tal como se mide desde la posición de la entrada de trayectoria de fluido y/o salida de trayectoria de fluido tras el encaje del conector fluido y el elemento de alineación.

En algunos casos, el elemento de alineación incluye un componente de encaje complementario a un componente de encaje del conector fluido. Un componente de encaje puede incluir, por ejemplo, una ranura u otra indentación, un saliente (por ejemplo, tal como se muestra en la figura 13) y/o un mecanismo tal como una junta tórica que puede ser al menos parcialmente deformable. Debe entenderse que un componente de encaje puede tener cualquier conformación y/o forma adecuada. En algunos casos, un componente de encaje crea una resistencia sustancial al movimiento del conector fluido en relación con el sustrato y/o elemento de alineación tras recibir el elemento de
35 alineación el componente fluido (por ejemplo, tras la inserción del componente fluido en el elemento de alineación) y/o durante el uso previsto del dispositivo. Por ejemplo, el acto individual de insertar el conector 968 fluido en la cavidad del elemento de alineación 980 puede provocar que los componentes de encaje del conector fluido y el elemento de alineación interaccionen, creando de ese modo una resistencia sustancial al movimiento del conector fluido en relación con el sustrato y/o elemento de alineación. Por tanto, en determinadas realizaciones, no se requieren abrazaderas diferenciadas u otros mecanismos de sujeción, y/o etapas secundarias para la sujeción.
45

En algunas realizaciones, el componente de encaje provoca que el conector fluido esté conectado integralmente con el elemento de alineación. En una realización particular, los componentes de encaje son características de ajuste a presión que pueden acoplarse en una característica del elemento de alineación (o conector fluido). Tales otras características pueden permitir, en algunas realizaciones, que el conector fluido se una irreversiblemente (por
50 ejemplo, se conecte integralmente) al elemento de alineación y/o al sustrato. En otros casos, el elemento de alineación y el conector fluido están diseñados para unirse reversiblemente entre sí. Por consiguiente, un componente de encaje puede facilitar el encaje del conector fluido y el sustrato en una configuración predeterminada, establecida en relación con el sustrato tras su conexión.

55 En algunas realizaciones, la configuración de una cavidad y/o una superficie de encaje de un elemento de alineación provoca que la trayectoria de fluido del conector de fluido se encuentre aproximadamente perpendicular al sustrato (y, por tanto, aproximadamente perpendicular a los canales microfluídicos dentro del sustrato). Por ejemplo, tal como se ilustra en las figuras 14A y 14B, la trayectoria de fluido 970 es aproximadamente perpendicular al sustrato en el plano definido por las flechas 975 y 976. En otras realizaciones, una trayectoria de fluido del conector de fluido se encuentra en un ángulo de entre 90 y 180 grados o entre 0 y 90 grados en relación con el sustrato.
60

Aunque las figuras 14A y 14B muestran el elemento de alineación 980 situado en un extremo del sustrato, en otras realizaciones, un componente de alineación puede extenderse a lo largo de la longitud, L, del sustrato, por ejemplo, hacia extremos opuestos del sustrato. Por ejemplo, el componente de alineación puede ser un bloque que tiene una
65 longitud y anchura similares a las del sustrato, pero puede incluir una cavidad en donde el conector fluido va a insertarse. Además, aunque las figuras 14A y 14B muestran el elemento de alineación 980 en forma de dos

componentes, en algunas realizaciones un elemento de alineación puede estar en forma de un único componente. En otras realizaciones, el elemento de alineación está en forma de más de dos componentes.

5 En algunas realizaciones, el elemento de alineación y el sustrato están en forma de un único trozo de material, que, en algunos casos, puede fabricarse en una etapa, por ejemplo, mediante moldeo por inyección. Por ejemplo, tal como se muestra en la realización a modo de ejemplo de las figuras 15A y 15B, el elemento de alineación 990 puede ser parte de un sustrato 991 que contiene un sistema microfluídico.

10 En cambio, tal como se muestra en la realización a modo de ejemplo de las figuras 16A y 16B, un sustrato 992, que incluye un sistema microfluídico, y un elemento de alineación 994 son partes diferenciadas que pueden unirse entre sí antes de su uso. El elemento de alineación y el sustrato pueden conectarse insertando pinzas 934 en porciones del sustrato, por ejemplo, tal como se describe en relación con las figuras 12A y 12B. Esta conexión puede realizarse antes de que el usuario receptor use el dispositivo. En otros casos, el usuario puede insertar el elemento de alineación en el sustrato, seguido por el conector fluido en el elemento de alineación. Alternativamente, el usuario puede insertar el conector fluido en el elemento de alineación, seguido por el elemento de alineación en el sustrato.

15 Las figuras 14 y 15 también muestran un elemento de alineación que incluye componentes de encaje 983, que se encajan con los componentes de encaje 982 del conector fluido. El dispositivo puede estar configurado de manera que un conector fluido 969 puede insertarse en el elemento de alineación en la dirección de la flecha 978, al tiempo que se impide o se inhibe la retirada del componente fluido del elemento de alineación tras su inserción (por ejemplo, en la dirección opuesta de la flecha 978).

20 Debe entenderse que pueden combinarse elementos de alineación con otras características tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un elemento de alineación puede asociarse con un conector fluido que incluye al menos una característica no fluida complementaria a una característica del sustrato para formar una conexión no fluida entre el conector fluido y el sustrato tras la unión, por ejemplo, tal como se describe en relación con las figuras 1 y 12.

25 Hay varias ventajas del uso de dispositivos microfluídicos con conectores fluidos, especialmente cuando se realizan reacciones químicas y/o biológicas (por ejemplo, inmunoensayos) en el dispositivo. Por consiguiente, los dispositivos descritos en el presente documento pueden tener una o más ventajas tales como: (a) uso de pequeñas cantidades de muestra con poco o ningún desperdicio de muestra, (b) estabilidad a largo plazo de reactivos químicos y/o biológicos almacenados en el dispositivo, (c) reducción de la contaminación cruzada entre reactivos almacenados y/o entre muestra y reactivo, (d) dosificación de la muestra, (e) facilidad de uso para usuarios no formados para introducir una muestra en el dispositivo, (f) mezclado eficaz de los reactivos y (g) fiabilidad del ensayo. En algunas realizaciones, los dispositivos tienen todas las ventajas enumeradas anteriormente.

30 Pueden usarse pequeñas cantidades de muestra con poco o ningún desperdicio de muestra debido a que los conectores fluidos pueden diseñarse para que tengan un volumen interno que coincide con el volumen de muestra requerido para realizar la reacción química y/o biológica. Esto puede reducir la cantidad de volumen muerto en un sistema. Opcionalmente, tal como se describió anteriormente, los conectores fluidos pueden incluir uno o más elementos de control del volumen para permitir la recogida de un volumen particular de muestra.

35 Los dispositivos descritos en el presente documento pueden usarse para aplicaciones de punto de atención, y pueden fabricarse varios meses (o años) antes del primer uso. En algunas realizaciones que requieren el almacenamiento de componentes en el dispositivo antes del primer uso, es importante que todas las biomoléculas y reactivos introducidos en el momento de fabricación permanezcan estables durante periodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, en un área de reacción, los anticuerpos de captura pueden someterse a fisisorción a la superficie de los microcanales, y pueden estabilizarse en una forma seca usando estabilizadores (por ejemplo, trehalosa).

40 Se ha demostrado anteriormente que el almacenamiento de los reactivos en forma de tapones de líquido separados por huecos de aire eran estables durante periodos de tiempo prolongados (véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO2005/072858 (solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/US2005/003514), presentada el 26 de enero de 2005 y titulada "Fluid Delivery System and Method" (Sistema y método de suministro de fluidos)).

45 Pueden almacenarse tanto reactivos secos como líquidos en un único sustrato microfluídico. Tal como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, un canal que contiene un reactivo líquido no está en comunicación de fluido con un canal que contiene un reactivo seco puesto que, según las condiciones del entorno particular (por ejemplo, almacenamiento), si los canales que contienen los reactivos están en comunicación de fluido entre sí, el transporte de vapores de agua puede dar como resultado que el reactivo húmedo se seque y que las moléculas secas se hidraten. Esto puede afectar a la estabilidad a largo plazo de todos los reactivos almacenados en determinados dispositivos. Un sistema que implica el uso de un conector fluido y un sustrato microfluídico que incluye reactivos secos separados físicamente (por ejemplo, en diferentes canales) y no en comunicación fluida con los reactivos húmedos puede permitir la comunicación de fluido solo en el momento de uso del dispositivo

microfluídico. Esta configuración puede potenciar la estabilidad de los reactivos para almacenamiento a largo plazo. En otras realizaciones, sin embargo, pueden almacenarse reactivos líquidos y secos en comunicación de fluido entre sí (por ejemplo, para almacenamiento a más corto plazo).

5 Otra ventaja de los dispositivos microfluídicos descritos en el presente documento puede ser la reducción de la contaminación cruzada entre reactivos almacenados y/o entre muestra y reactivo. La contaminación cruzada puede producirse, en determinadas realizaciones, en las intersecciones entre canales microfluídicos, en donde pueden quedar atrapados tapones de reactivos. Estos reactivos pueden contaminar reactivos posteriores que fluyen por la misma intersección. El uso de un conector fluídico puede simplificar enormemente una red de microcanales, reduciendo u obviando el número de intersecciones en un dispositivo, y por tanto cualquier posible problema de contaminación cruzada.

15 La dosificación de la muestra es otro requisito importante para muchas aplicaciones microfluídicas. A menudo esto se realiza fuera del chip y se carga un volumen de muestra preciso sobre el chip con la esperanza de que todo el volumen fluya dentro del dispositivo. Con los conectores fluídicos descritos en el presente documento, el volumen de muestra que puede introducirse dentro del dispositivo microfluídico puede medirse con precisión, y puede enviarse todo el volumen de muestra a un área de reacción del dispositivo.

20 Tal como se describe en el presente documento, los componentes de introducción de muestras de la invención (conectores fluídicos) pueden usarlos usuarios no formados (véanse, por ejemplo, las realizaciones descritas en relación con las figuras 8B, 8C, 8D y 9-16). Estos componentes pueden diseñarse para facilitar el procedimiento de carga de muestras y para permitir una unión sencilla de un conector fluídico a un sustrato microfluídico. Tales dispositivos pueden ser especialmente útiles en ámbitos de diagnóstico inmediato por usuarios no formados.

25 Otra ventaja de los sistemas y métodos descritos en el presente documento pueden incluir un mezclado eficaz de reactivos en un dispositivo. Un ejemplo de mezclado eficaz se ha descrito en el presente documento en relación con la química de potenciación con plata basada en la reducción de iones de plata por un agente reductor (por ejemplo, hidroquinona) mediante un catalizador (por ejemplo, un metal noble). En realizaciones que implican inmunoensayos, pueden marcarse anticuerpos secundarios coloides de oro (catalizador). En presencia de una mezcla de iones de plata e hidroquinona, pueden crearse múltiples capas de plata en la superficie del coloide de oro, aumentando el tamaño del coloide. Tras aproximadamente 10 minutos de amplificación, el tamaño del coloide puede aumentar en un factor de, por ejemplo, aproximadamente 1000, produciendo sobre la superficie granos de plata que pueden observarse con una configuración óptica. Para lograr buenos resultados de amplificación (por ejemplo, una amplificación de señal grande con poca amplificación del fondo), el reactivo de amplificación puede almacenarse por separado, por ejemplo, en canales o recipientes diferenciados, y mezclarse solo inmediatamente antes de su uso. En dispositivos microfluídicos, la dimensiones de sección transversal del canal pueden ser pequeñas y los flujos pueden ser laminares, lo que significa que se produce el mezclado principalmente por difusión, que es normalmente ineficaz y lenta. Sin embargo, el carácter laminar del flujo de reactivos puede disminuir cuando se desplaza a través de una trayectoria de fluido de un conector de fluido, puesto que la trayectoria de fluido puede tener una dimensión de sección transversal relativamente mayor (y, por tanto, un volumen relativamente mayor) que la de los microcanales del sustrato. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, cada conector de fluido puede actuar como un mezclador caótico y puede mejorar significativamente el mezclado de dos o más reactivos. En el ejemplo descrito anteriormente, este mezclado puede mejorar la reproducibilidad de la química de amplificación.

45 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, los dispositivos microfluídicos incluyen solo un único canal interconectado con, por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2 o 1 intersección/intersecciones de canales cuando están en uso (por ejemplo, tras la unión de un conector fluídico y un sustrato). Un trazado basado en un único canal con intersecciones mínimas o sin ellas puede ser fiable porque solo hay una trayectoria de flujo posible para cualquier fluido que se desplace a través del chip microfluídico. En estas configuraciones, la fiabilidad de una reacción química y/o biológica que va a realizarse en el dispositivo mejora enormemente en comparación con diseños que tienen muchas intersecciones. Esta mejora se produce porque en cada intersección (por ejemplo, una intersección de tres vías o más), el fluido tiene la posibilidad de entrar en el canal incorrecto. La capacidad de cargar una muestra sin intersecciones de canales puede eliminar el riesgo de que el fluido entre en el canal incorrecto. Debido a que una intersección puede representar un factor de riesgo que debe tenerse en cuenta en el desarrollo del producto, deben establecerse controles (o bien en el chip o bien basados en inspección externa) para garantizar el comportamiento correcto del fluido en cada interconexión. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, puede aliviarse la necesidad de tales controles adicionales.

60 Tal como se describió anteriormente, pueden almacenarse reactivos en un dispositivo microfluídico usando una variedad de métodos. Tales métodos pueden depender al menos en parte de la forma en la que el reactivo se almacena (por ejemplo, seco o húmedo), la configuración de los canales dentro del sistema microfluídico (por ejemplo, si los canales están interconectados o no conectados), la duración del tiempo de almacenamiento y/o la aplicación particular.

65 En referencia de nuevo a la figura 2, en la invención un primer reactivo (o serie de reactivos) se coloca en un primer canal formado en un sustrato, tal como en un canal o depósito de área de almacenamiento de reactivo 64. Un

segundo reactivo (o serie de reactivos) se coloca en un segundo canal formado en un sustrato, tal como un canal o depósito de área de inmunoensayo 68. En la invención, los canales primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí durante la colocación de los reactivos. El reactivo primero y/o segundo puede colocarse en su canal respectivo haciendo fluir en primer lugar los reactivos en los canales y luego sellando cualquier entrada y/o salida de los canales.

Los reactivos primero y/o segundo pueden alterarse sustancialmente tras colocarse en sus canales respectivos. Por ejemplo, en algunos casos los reactivos primero y/o segundo se secan tras hacer fluir el/los reactivo(s) en un canal. Opcionalmente, los reactivos secados pueden tratarse con un tercer agente (por ejemplo, un agente de bloqueo) que puede, por ejemplo, reducir la adsorción no específica durante la realización de un ensayo. El/los reactivo(s) secados puede(n) almacenarse en un canal sellando una o más entradas y/o salidas del canal microfluídico.

En algunos casos, se coloca un reactivo en un canal antes de completar la fabricación de un sistema de canales microfluídicos. Un sistema de canales microfluídicos no está completo si, por ejemplo, un sistema que está diseñado para tener canales encerrados tiene canales que no están aún completamente encerrados. Un canal está encerrado si al menos una porción del canal tiene una sección transversal que está completamente encerrada, o si todo el canal está completamente encerrado a lo largo de toda su longitud con la excepción de su(s) entrada(s) y/o salida(s).

En algunas realizaciones, se colocan uno o más reactivos en una zona de detección de un sustrato colocando una gota del reactivo en la zona de detección (por ejemplo, zonas de detección 162, 164, 166 y 168 de la figura 3). El sustrato puede estar formado por un material hidrófobo, lo que puede impedir la propagación de reactivos acuosos a través de zonas de detección adyacentes. Los reactivos en las zonas de detección pueden secarse y puede colocarse una cubierta adyacente al sustrato para completar la fabricación del sistema de canales. Posteriormente, puede sellarse cualquier entrada y/o salida del canal.

En otra realización, se colocan uno o más reactivos (por ejemplo, se estampan) sobre una cubierta, y luego se usa la cubierta para encerrar sistema de canales microfluídicos formado en un sustrato. Los reactivos sobre la cubierta pueden estar alineados con determinadas áreas dentro del sistema microfluídico. Por ejemplo, en una realización particular, los reactivos (por ejemplo, anticuerpos) se estampan en una disposición (por ejemplo, conformación y dimensión) que coincide con las zonas de detección 162, 164, 166 y 168 de la figura 3. Los reactivos pueden secarse, y luego puede sellarse la cubierta contra el sustrato de manera que los reactivos se colocan en las zonas de detección del sistema microfluídico. La cubierta puede ser, por ejemplo, un adhesivo biocompatible (por ejemplo, preparado sobre un sustrato) y puede estar hecha de un polímero (por ejemplo, PE, COC, PVC) o un material inorgánico. Para algunas aplicaciones, el material y las dimensiones de una cubierta se eligen de manera que la cubierta es sustancialmente impermeable al vapor de agua. En otras realizaciones, la cubierta puede ser no adhesiva, pero puede unirse térmicamente al sustrato microfluídico mediante la aplicación directa de calor, energía de láser o energía ultrasónica. Cualquier entrada y/o salida del canal puede sellarse (por ejemplo, colocando un adhesivo sobre la(s) entrada(s) y/o salida(s)) tras introducir reactivos en el dispositivo.

Los reactivos húmedos se almacenan normalmente en un sistema microfluídico tras haberse cubierto completamente los canales del sistema. Un reactivo fluido que va a almacenarse en el sistema puede introducirse en una entrada de un canal, y tras llenarse al menos parcialmente el canal con el fluido, la(s) entrada(s) y/o salida(s) del canal puede(n) sellarse, por ejemplo, para retener el fluido e impedir la contaminación de fuentes externas.

En algunos casos, uno o más fluidos que van a almacenarse en un sistema microfluídico se transfieren desde un recipiente (por ejemplo, un cartucho, tubo o conector fluídico) hasta el sistema microfluídico. El recipiente puede contener, por ejemplo, dos o más fluidos distintos separados por un tercer fluido que es inmisible con ambos. Cualquiera de varios fluidos distintos puede estar contenido en un recipiente. Por ejemplo, en una realización, el recipiente es un tubo que incluye un tapón de disolución de reactivo seguido por un tapón de aire, seguido por un tapón de disolución de enjuague. Un tapón de aire adicional puede separar el primer tapón de disolución de enjuague de un segundo tapón de disolución de enjuague. Los tapones de líquido pueden conservar sus posiciones relativas en el tubo y puede evitarse el contacto entre sí por los tapones de aire intermedios. Se describen artículos y métodos para suministrar fluidos a un sistema microfluídico en más detalle en la publicación de patente internacional n.º WO2005/072858 (solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/US2005/003514), presentada el 26 de enero de 2005 y titulada "Fluid Delivery System and Method" (Sistema y método de suministro de fluidos).

El uso de un recipiente que contiene tapones de fluido en orden lineal puede permitir la introducción de fluido desde el recipiente hasta un sistema microfluídico en una secuencia particular. Estos fluidos pueden almacenarse en la secuencia particular en el sistema microfluídico (por ejemplo, en un área de almacenamiento de reactivo). La(s) entrada(s) y/o salida(s) del canal que contiene los fluidos puede(n) sellarse, por ejemplo, para retener el fluido y para impedir la contaminación de fuentes externas. En algunas realizaciones, una secuencia particular de fluidos está contenida en un conector fluídico. Por ejemplo, la secuencia particular de fluidos puede incluir reactivos (por ejemplo, una muestra, un tapón, un componente que se une con la muestra, etc.) colocados en serie y pueden estar opcionalmente separados por fluidos inmiscibles. Esta secuencia de fluidos puede introducirse en un sustrato microfluídico conectando de manera fluida el conector fluídico y el sustrato.

En algunas realizaciones, un canal microfluídico o conector fluídico que tiene una razón de longitud con respecto a diámetro interno relativamente grande (o una alta razón de área de superficie con respecto a volumen) se usa para almacenar uno o más fluidos. Esta configuración puede permitir una medición lineal de uno o más tapones de fluido en un dispositivo fluídico o conector fluídico de diámetro interno conocido, y puede proporcionar una indicación precisa del volumen o el volumen relativo del fluido. Esta característica puede ser útil para determinar si una cantidad correcta o precisa de fluido está contenida en un canal, especialmente tras el almacenamiento a largo plazo o corto plazo de uno o más fluidos en el canal. Por ejemplo, si el canal tiene una razón de longitud con respecto al diámetro interno relativamente grande (por ejemplo, mayor de 10 a 1, mayor de 50 a 1 o mayor de 100 a 1), un usuario puede ser capaz de determinar si una cantidad precisa o correcta de fluido está contenida en el canal mediante inspección simple, puesto que la pérdida de fluido (por ejemplo, mediante evaporación) puede dar como resultado burbujas de aire o la presencia porciones vacías en el canal. Si tales burbujas de aire o porciones vacías están presentes, o la cantidad de fluido en el canal está fuera de un intervalo indicado en el dispositivo, puede avisarse al usuario (por ejemplo, mediante instrucciones que acompañan al dispositivo) de que el dispositivo no debe usarse. Esta inspección visual puede ser difícil en determinados dispositivos que usan depósitos que tienen una razón de longitud con respecto a diámetro interno relativamente pequeña (o una baja razón de área de superficie con respecto al volumen) para almacenar fluidos.

Pueden almacenarse reactivos en un sistema microfluídico durante diversas cantidades de tiempo. Por ejemplo, un reactivo puede almacenarse durante más de 1 hora, más de 6 horas, más de 12 horas, más de 1 día, más de 1 semana, más de 1 mes, más de 3 meses, más de 6 meses, más de 1 año o más de 2 años. Opcionalmente, el sistema microfluídico puede tratarse de una manera adecuada con el fin de prolongar el almacenamiento. Por ejemplo, los sistemas microfluídicos que tienen reactivos almacenados contenidos en los mismos pueden sellarse al vacío, almacenarse en un entorno oscuro y/o almacenarse a bajas temperaturas (por ejemplo, por debajo de 0 °C). La duración del almacenamiento depende de uno o más factores tales como los reactivos particulares usados, la forma de los reactivos almacenados (por ejemplo, húmeda o seca), las dimensiones y los materiales usados para formar el sustrato y la(s) capa(s) de cubierta, el método de adhesión del sustrato y la(s) capa(s) de cubierta, y como se trata o almacena el dispositivo en su totalidad.

Tal como se describe en el presente documento, diferentes secciones de un depósito o canal microfluídico, especialmente dentro de un área de reacción, pueden modificarse cada una con una especie diferente (por ejemplo, molécula de captura) que puede almacenarse en el canal o depósito, de modo que una muestra que se desplaza por todo el canal de microcanal puede desplazarse sucesivamente sobre cada una de las especies. Las secciones del canal microfluídico pueden ser, por ejemplo, zonas de detección (por ejemplo, regiones de canal sinuoso) tal como se describe en el presente documento en relación con las figuras 2-7 y 14-17. En algunas realizaciones, estas secciones están conectadas en serie. En otras realizaciones, las secciones están conectadas en paralelo. En aún otras realizaciones, un dispositivo puede incluir una combinación de secciones conectadas en serie y en paralelo. En realizaciones que incluyen zonas de detección conectadas en serie (y/o en paralelo), múltiples componentes de la muestra pueden someterse a prueba individualmente en cada una de las zonas de detección del canal. Las zonas de detección pueden tener diferentes configuraciones según la aplicación; por ejemplo, una zona de detección puede estar en forma de un depósito (que puede estar soportado por una matriz de pilares) o una región de canal sinuoso, tal como se describe en detalle adicional a continuación. En determinadas realizaciones, un dispositivo incluye una pluralidad (por ejemplo, al menos 2, 4, 6, 8, 10, o más) de secciones, comprendiendo cada sección una única especie química y/o biológica que puede experimentar una reacción química y/o biológica (o que puede no ser reactiva hacia componentes particulares de una muestra, como en un control negativo). La especie química y/o biológica en una sección puede ser la misma (por ejemplo, misma especie y concentración) o diferente (por ejemplo, diferentes especies y/o concentración) que la especie de otra sección.

Para simplificar la cuantificación de la señal, cada zona de detección (por ejemplo, región de canal sinuoso) puede tener un área relativamente grande en comparación con una dimensión de sección transversal de un canal microfluídico del sistema. Por ejemplo, la zona de detección puede tener un área mayor de 0,1 mm², mayor de 0,2 mm², mayor de 0,4 mm², mayor de 0,6 mm², mayor de 0,8 mm² o mayor de 1 cm². El área puede ser, por ejemplo, de entre 0,1 mm² y 0,3 mm², entre 0,2 mm² y 0,4 mm², entre 0,4 mm² y 0,6 mm² o entre 0,5 mm² y 1 cm². Diferentes proporciones de la zona de detección pueden comprender una ruta de detección óptica. Por ejemplo, al menos el 20 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 % o al menos el 80 % del área de la zona de detección puede comprender una ruta de detección óptica. El área abarcada por la zona de detección puede estar definida por el área rectangular rodeada por los puntos más externos de la zona de detección a lo largo de cada eje. Una señal producida en la zona de detección puede propagarse homogéneamente a lo largo de un área grande, simplificando así la alineación de un dispositivo de lectura óptica.

Tal como se muestra en las realizaciones ilustradas en las figuras 17A-17C, el dispositivo 1000 puede incluir un área de reacción 1010 que tiene varias zonas de detección 1012, 1014, 1016 y 1018. Cada una de estas zonas de detección puede estar en forma de una región sinuosa 1012-A, 1014-A, 1016-A y 1018-A, respectivamente (figura 14B). Las regiones sinuosas incluyen varios segmentos de canal 1024. Las regiones sinuosas pueden estar conectadas entre sí (es decir, en comunicación de fluido entre sí) por medio del canal microfluídico 1020. El fluido que fluye en el canal 1020, por ejemplo, en la dirección de la flecha 1028, puede fluir a través de las regiones

sinuosas secuencialmente.

Tal como se describe en el presente documento, una superficie del canal sinuoso en cada región sinuosa puede modificarse con una o más biomoléculas (por ejemplo, en forma de un reactivo almacenado) para una aplicación particular. Para proporcionar un control de calidad en el chip, la región sinuosa 1018-A puede modificarse con una disolución de bloqueo tal como BSA o Tween 20 para proporcionar una referencia negativa para el ensayo. De un modo similar, la región sinuosa 1012-A puede modificarse con un control positivo. La elección de estos patrones puede ser tal tras la finalización exitosa del ensayo, el patrón negativo no debe indicar señal (o señal de fondo muy débil), y la señal positiva debe indicar una señal clara. En general, la elección del reactivo/biomolécula que va a inmovilizarse en cada región sinuosa puede estar dictada por la prueba particular que va a realizarse; por ejemplo, para la medición de IgG humana total en suero, pueden someterse a fisorción anticuerpos contra las globulinas humanas en las regiones sinuosas 1014-A y 1016-A.

La figura 17C es un diagrama esquemático que muestra las regiones sinuosas tras la realización de una reacción química y/o biológica en las regiones sinuosas. La región sinuosa 1018-B usada como control negativo tiene una señal débil y aparece de color gris claro. Las regiones sinuosas 1014-B y 1016-B que incluían reactivos sometidos a fisorción que pueden usarse para determinar un componente en la muestra pueden incluir una señal detectable (por ejemplo, una película gris). La región sinuosa 1018-B usada como control positivo puede incluir una señal fuerte (por ejemplo, una película negra).

Las figuras 17A-17C muestran un ejemplo de un ensayo múltiple que puede realizarse en un dispositivo microfluídico descrito en el presente documento. En otras realizaciones, pueden incluirse regiones sinuosas adicionales (por ejemplo, más de 5, 8, 10, 15 o 20 regiones sinuosas, que pueden estar conectadas en serie y/o en paralelo), en un dispositivo para permitir la detección de componentes adicionales en una muestra.

Tras realizar una reacción química y/o biológica en una zona de detección (por ejemplo, región sinuosa), puede aparecer una señal en la zona de detección. El tipo y la fuerza de la señal pueden depender de la elección del marcador y/o química de amplificación usada. Por ejemplo, en una realización, puede usarse química de potenciación con plata para producir una señal que puede detectarse mediante un detector sencillo, tal como el descrito en la publicación de patente internacional n.º WO2005/066613 (solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/US2004/043585), presentada el 20 de diciembre de 2004 y titulada "Assay Device and Method" (Dispositivo y método de ensayo).

Cuando se realiza más de una reacción química y/o biológica (por ejemplo, un ensayo múltiple) en un dispositivo, la adquisición de la señal puede llevarse a cabo moviendo un detector sobre cada zona de detección. En un enfoque alternativo, un único detector puede detectar señal(es) en cada una de las zonas de detección simultáneamente. En otra realización, un analizador puede incluir, por ejemplo, varios sensores/detectores ópticos en paralelo, cada uno alineado con una zona de detección y conectado a la electrónica de un lector (por ejemplo, las figuras 18A y 18B). Las figuras 18A y 18B ilustran un sistema óptico 1050 en reposo (figura 18A) y durante la medición (figura 18B). Tal como se muestra en la realización ilustrada en la figura 18A, el sistema óptico 1050 incluye un dispositivo 1054 que tiene un área de detección 1060 que incluye las zonas de detección 1062, 1064 y 1066. La configuración óptica también incluye un artículo 1070 que comprende una matriz de fuentes de luz 1072, 1074 y 1076, así como un artículo 1080 que comprende una matriz de detectores 1082, 1084 y 1086. En algunas realizaciones, los artículos 1070 y 1080 se combinan para formar un analizador. Los detectores y las fuentes de luz pueden alinearse con las zonas de detección del dispositivo. Durante la medición, una ruta óptica 1092 entre la fuente de luz óptica 1072, la zona de detección 1062 y el detector 1082 permite la determinación de una señal en la zona de detección. Las rutas ópticas en paralelo 1094 y 1096 pueden permitir la determinación simultánea de señales en las zonas de detección 1064 y 1066, respectivamente.

El interior de un analizador puede estar diseñado para permitir la lectura simultánea (por ejemplo, detección o determinación de una señal) en todas las zonas de detección sin interferencia entre cada ruta óptica en el sistema. Por ejemplo, en la realización ilustrada en la figura 19, el sistema 1100 incluye la fuente de luz 1072 y el detector 1082 alineados entre sí y la zona de detección 1062. Adicionalmente, la fuente de luz 1074 puede estar alineada con la zona de detección 1064 y el detector 1084 y la fuente de luz 1076 puede estar alineada con la zona de detección 1066 y el detector 1086. Los detectores y las fuentes de luz pueden estar en comunicación electrónica con la unidad de control 1098 (por ejemplo, un microprocesador). En algunas realizaciones, pueden colocarse uno o más filtros ópticos entre un detector y una zona de detección. Adicional y/o alternativamente, cada detector puede incluir un filtro electrónico para filtrar diferentes longitudes de onda de luz. Para reducir adicionalmente la interferencia entre rutas ópticas, la luz de cada fuente de luz puede modularse a una frecuencia diferente para cada ruta óptica; es decir, las rutas ópticas 1092, 1094 y 1096 pueden incluir cada una luz de diferentes longitudes de onda. La señal electrónica generada por la fuente de luz 1072 puede diferenciarse de la señal de ruido que surge de fuentes de luz vecinas 1074 y 1076 usando, por ejemplo, un filtro electrónico. En un enfoque diferente, la lectura puede realizarse secuencialmente para evitar señal(es) de ruido que surge(n) de las fuentes de luz vecinas. El uso de un par de fuente de luz-detector para cada zona de detección puede ser ventajoso cuando los componentes ópticos son relativamente sencillos y/o baratos.

En algunas realizaciones, uno o más componentes ópticos pueden compartirse entre zonas de detección. Por ejemplo, en la realización ilustrada en la figura 20, un sistema 1120 incluye un detector 1072 y un elemento óptico 1122 (por ejemplo, una óptica de recogida tal como una fibra óptica), que están alineados entre sí y con la zona de detección 1062. De manera similar, el sistema incluye un detector 1074 y un elemento óptico 1124 alineados con la zona de detección 1064, así como un detector 1076 y un elemento óptico 1126 alineados con la zona de detección 1066. Los elementos ópticos pueden estar conectados todos con un conmutador óptico 1130 y con un detector de luz común 1132, tal como un fotodiodo de avalancha o un tubo fotomultiplicador. El detector común puede usarse para detectar señales en cada una de las zonas de detección (por ejemplo, secuencialmente). La luz de cada zona de detección puede recogerse mediante los elementos ópticos, que pueden estar alineados por debajo de cada zona de detección.

Puede usarse una variedad de técnicas de determinación (por ejemplo, medición, cuantificación, detección y cualificación). Las técnicas de determinación pueden incluir técnicas basadas en óptica tales como transmisión de luz, absorbanza de luz, dispersión de luz, reflexión de luz y técnicas visuales. Las técnicas de determinación también pueden incluir técnicas de luminiscencia tales como fotoluminiscencia (por ejemplo, fluorescencia), quimioluminiscencia, bioluminiscencia y/o electroquimioluminiscencia. Los expertos habituales en la técnica conocen cómo modificar dispositivos microfluídicos según la técnica de determinación usada. Por ejemplo, para dispositivos que incluyen especies quimioluminiscentes usadas para la determinación, puede preferirse un fondo opaco y/u oscuro. Para la determinación usando coloides de metal, puede preferirse un fondo transparente. Además, puede usarse cualquier detector adecuado con los dispositivos descritos en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse detectores ópticos simplificados, así como espectrofotómetros y lectores ópticos convencionales (por ejemplo, lectores de placas de 96 pocillos).

En algunas realizaciones, las técnicas de determinación pueden medir la conductividad. Por ejemplo, pueden usarse microelectrodos colocados en lados opuestos de una porción de un canal microfluídico para medir la deposición de un material conductor, por ejemplo un material depositado sin electricidad. A medida que un mayor número de partículas individuales de metal crecen y entran en contacto entre sí, la conductividad puede aumentar y proporcionar una indicación de la cantidad de material conductor, por ejemplo, metal, que se ha depositado sobre la porción. Por tanto, puede usarse la conductividad o resistencia como medida cuantitativa de la concentración de analito.

Otra técnica analítica puede incluir la medición de un cambio de concentración de un precursor desde el momento en el que el precursor entra en el canal microfluídico hasta el momento en el que el precursor sale del canal. Por ejemplo, si se usa una disolución de sal de plata (por ejemplo, nitrato, lactato, citrato o acetato), un electrodo sensible a plata puede ser capaz de medir una pérdida de la concentración de plata debida a la deposición de plata en un canal a medida que el precursor pasa a través del canal.

Diferentes técnicas de detección óptica proporcionan varias opciones para determinar los resultados de reacción (por ejemplo, ensayo). En algunas realizaciones, la medición de la transmisión o absorbanza significa que puede detectarse luz a la misma longitud de onda a la que se emite desde una fuente de luz. Aunque la fuente de luz puede ser una fuente de banda estrecha que emite en una única longitud de onda, puede ser también una fuente de amplio espectro, que emite a lo largo de un intervalo de longitudes de onda, ya que muchos materiales opacos pueden bloquear eficazmente un amplio intervalo de longitudes de onda. El sistema puede hacerse funcionar con un mínimo de dispositivos ópticos (por ejemplo, un detector óptico simplificado). Por ejemplo, el dispositivo de determinación puede estar libre de un fotomultiplicador, puede estar libre de un selector de longitud de onda tal como una rejilla, un prisma o un filtro, puede estar libre de un dispositivo para dirigir o columnar la luz tal como un columnador, o puede estar libre de óptica de aumento (por ejemplo, lentes). La eliminación o reducción de estas características puede dar como resultado un dispositivo menos caro, más robusto.

En una realización, la fuente de luz puede estar modulada en forma de pulso, por ejemplo, a una frecuencia de 1000 Hz. Para hacer coincidir la fuente de luz modulada en forma de pulso, un detector puede incluir un filtro que funciona a la misma frecuencia. Usando una fuente de luz modulada en forma de pulso, se ha encontrado que el sistema puede ser menos sensible a fuentes de luz extrínsecas. Por tanto, puede ejecutarse un ensayo en diversas condiciones de luz, incluyendo luz diurna amplia, lo que podría hacer poco práctico usar las técnicas existentes. Los resultados experimentales indican que mediante el uso de una fuente de luz modulada en forma de pulso y un filtro, los resultados son constantes independientemente de las condiciones de luz en las que se realiza la prueba.

La fuente de luz puede ser un LED (diodo emisor de luz) o un diodo láser. Por ejemplo, puede usarse un diodo láser semiconductor rojo InGaAlP que emite a 654 nm. El fotodetector puede ser cualquier dispositivo capaz de detectar la transmisión de luz que emite la fuente de luz. Un tipo de fotodetector es un circuito integrado (IC) óptico que incluye un fotodiodo que tiene una sensibilidad pico a 700 nm, un amplificador y un regulador de voltaje. Si la fuente de luz está modulada en forma de pulso, el fotodetector puede incluir un filtro para eliminar el efecto de la luz que no está a la frecuencia seleccionada. Cuando se detectan señales múltiples y vecinas al mismo tiempo, la fuente de luz usada para cada zona de detección puede modularse a una frecuencia suficientemente diferente de la de su fuente de luz vecina. En esta configuración, el detector puede estar dotado de un filtro de frecuencia coincidente (en comparación con su fuente de luz atribuida), evitando de ese modo la interferencia de la luz de pares ópticos vecinos.

Tal como se describe en el presente documento, un canal sinuoso de un área de reacción puede estar configurado y dispuesto para alinearse con un detector de manera que, tras la alineación, el detector puede medir una única señal a través de más un segmento adyacente del canal sinuoso. En algunas realizaciones, el detector puede detectar una señal dentro de al menos una porción del área del canal sinuoso y a través de más de un segmento del canal sinuoso de manera que una primera porción de la señal, medida a partir de un primer segmento del canal sinuoso, es similar a una segunda porción de la señal, medida a partir de un segundo segmento del canal sinuoso. En tales realizaciones, debido a que la señal está presente como parte de más de un segmento del canal sinuoso, no hay necesidad de una alineación precisa entre un detector y una zona de detección.

La colocación del detector sobre la zona de detección (por ejemplo, una región sinuosa) sin la necesidad de precisión es una ventaja, puesto que no se requiere equipo externo (y posiblemente, caro) tal como microscopios, lentes y fases de alineación (aunque pueden usarse en determinadas realizaciones). En su lugar, la alineación puede realizarse a simple vista, o mediante métodos de bajo coste que no requieren una etapa de alineación por el usuario. En una realización, un dispositivo que comprende una región sinuosa puede colocarse en un soporte sencillo (por ejemplo, en una cavidad que tiene la misma conformación que el dispositivo), y el área de medición puede ubicarse automáticamente en un haz de luz del detector. Las posibles causas de una alineación errónea provocada por, por ejemplo, variaciones de chip a chip, la ubicación exacta del chip en el soporte y el uso normal del dispositivo, son insignificantes en comparación con las dimensiones del área de medición. Como resultado, la región sinuosa puede permanecer dentro del haz de luz y la detección no se interrumpe debido a estas variaciones.

El detector puede detectar una señal dentro de toda, o una porción, de una zona de detección (por ejemplo, incluyendo una región sinuosa). En otras palabras, pueden usarse diferentes cantidades de la región sinuosa como ruta de detección óptica. Por ejemplo, el detector puede detectar una señal dentro de al menos el 15 % de la zona de detección, al menos el 20 % de la zona de detección, al menos el 25 % de la zona de detección, dentro de al menos el 50 % de la zona de detección o dentro de al menos el 75 % de la zona de detección (pero menos del 100 % de la zona de detección). En algunos casos, se usa el 100 % de la zona de detección para la detección por un detector (por ejemplo, detección en un canal transparente a simple vista). El área en la que la zona de detección se usa como una ruta de detección óptica también puede depender de, por ejemplo, la opacidad del material en el que se fabrica el canal (por ejemplo, si todo, o una porción, del canal es transparente), la cantidad de un material no transparente que puede cubrir una porción del canal (por ejemplo, por medio del uso de una cubierta protectora) y/o el tamaño del detector y la zona de detección.

En una realización, una señal producida por la reacción es homogénea a lo largo de toda la zona de detección (por ejemplo, a lo largo de toda la región de canal sinuoso). Es decir, la zona de detección (por ejemplo, región de canal sinuoso) puede permitir la producción y/o detección de una única señal homogénea en dicha región tras llevar a cabo una reacción química y/o biológica (por ejemplo, y tras la detección por un detector). Antes de llevar a cabo una reacción en la región de canal sinuoso, el canal sinuoso puede incluir, por ejemplo, una única especie (y concentración de especies) que va a detectarse/determinarse. La especie puede adsorberse a una superficie del canal sinuoso. En otra realización, la señal puede ser homogénea a lo largo de solo porciones de la región sinuosa, y uno o más detectores pueden detectar diferentes señales dentro de cada una de las porciones. En determinados casos, más de una zona de detección puede conectarse en serie y cada zona de detección puede usarse para detectar/determinar una especie diferente.

En algunas realizaciones, una reacción química y/o biológica implica unión. Diferentes tipos de unión pueden tener lugar en los dispositivos descritos en el presente documento. El término "unión" se refiere a la interacción entre un par correspondiente de moléculas que presentan capacidad de unión o afinidad mutua, normalmente interacción o unión específica o no específica, incluyendo interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o farmacéuticas. La unión biológica define un tipo de interacción que se produce entre pares de moléculas incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas, hidratos de carbono, hormonas y similares. Los ejemplos específicos incluyen anticuerpo/antígeno, anticuerpo/hapteno, enzima/sustrato, enzima/inhibidor, enzima/cofactor, proteína de unión/sustrato, proteína portadora/sustrato, lectina/hidrato de carbono, receptor/hormona, receptor/efector, hebras complementarias de ácido nucleico, proteína/represor/inductor de ácido nucleico, ligando/receptor de superficie celular, virus/ligando, etc.

En algunos casos, puede tener lugar una reacción heterogénea (o ensayo) en un canal; por ejemplo, una pareja de unión puede estar asociada con una superficie de un canal, y la pareja de unión complementaria puede estar presente en la fase fluida. El término "pareja de unión" se refiere a una molécula que puede experimentar unión con una molécula particular. Parejas de unión biológica son ejemplos; por ejemplo, la proteína A es la pareja de unión de la molécula biológica IgG, y viceversa. Asimismo, un anticuerpo es una pareja de unión a su antígeno, y viceversa. En otros casos, puede producirse una reacción homogénea en el canal. Por ejemplo, ambas parejas de unión pueden estar presentes en la fase fluida (por ejemplo, en sistema de flujo laminar de dos fluidos). Los ejemplos no limitativos de reacciones típicas que pueden realizarse en un sistema de canales sinuosos incluyen reacciones químicas, reacciones enzimáticas, reacciones basadas en inmunología (por ejemplo, antígeno-anticuerpo) y reacciones basadas en células.

En otra realización de la invención, un dispositivo microfluídico desarrollado para realizar una prueba clínica específica se marca con información específica para la prueba (por ejemplo, nombre de la prueba, datos específicos del lote y fecha de caducidad). Uno o más componentes del sistema, tal como el componente de introducción de muestras, pueden estar diseñados de manera que están marcados con información específica del paciente (por ejemplo, física o electrónicamente). Tras la unión del componente de introducción de muestra a un dispositivo microfluídico (por ejemplo, un sustrato microfluídico, opcionalmente en relación con otros componentes (por ejemplo, electrónicos)), la información del paciente puede quedar vinculada al dispositivo y la prueba particular realizada en el dispositivo. En algunos casos, por ejemplo, para determinadas realizaciones que implican una unión permanente del componente de introducción de muestras en un dispositivo microfluídico desechable (por ejemplo, mediante un cierre de cremallera o mecanismo de ajuste a presión tal como se describió anteriormente), los dos conjuntos de información (uno del componente de introducción de muestras y uno del dispositivo microfluídico) no pueden separarse. Esto puede proporcionar un método seguro para añadir la información del paciente sobre el dispositivo microfluídico. Por ejemplo, en una realización, un dispositivo microfluídico se marca con información específica de la prueba (por ejemplo, nombre de la prueba, datos para la calibración de la prueba, nombre y número de lote), y el componente de introducción de muestras incluye una superficie que puede alojar una pegatina de tamaño convencional que contiene un código que se refiere a la identidad del paciente (por ejemplo, un código de barras).

Aunque los sistemas de la invención son microfluídicos, en determinadas realizaciones de la presente divulgación, la invención no se limita a sistemas microfluídicos y puede referirse a otros tipos de sistemas fluidicos. "Microfluídico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un dispositivo, aparato o sistema que incluye al menos un canal de fluido que tiene una dimensión de sección transversal de menos de 1 mm, y una razón de longitud con respecto a la dimensión de sección transversal mayor de al menos 3:1. Un "canal microfluídico", tal como se usa en el presente documento, es un canal que cumple estos criterios.

La "dimensión de sección transversal" (por ejemplo, un diámetro) del canal se mide perpendicular a la dirección de flujo de fluido. La mayoría de los canales de fluido en los componentes de la invención tienen dimensiones de sección transversal máxima menores de 2 mm, y en algunos casos, menores de 1 mm. En un conjunto de realizaciones, todos los canales de fluido que contienen realizaciones de la invención son microfluídicos o tienen una dimensión de sección transversal mayor de no más de 2 mm o 1 mm. En otro conjunto de realizaciones, la dimensión de sección transversal máxima del/de los canal(es) que contiene(n) realizaciones de la invención son menores de 500 micrómetros, menores de 200 micrómetros, menores de 100 micrómetros, menores de 50 micrómetros o menores de 25 micrómetros. En algunos casos las dimensiones del canal pueden elegirse de manera que el fluido puede fluir libremente a través del artículo o sustrato. Las dimensiones del canal también pueden elegirse, por ejemplo, para permitir una determinada velocidad de flujo volumétrica o lineal en el canal. Por supuesto, el número de canales y la conformación de los canales pueden variarse mediante cualquier método conocido por los expertos habituales en la técnica. En algunos casos, puede usarse más de un canal o capilar.

Un "canal", tal como se usa en el presente documento, significa una característica sobre o en un artículo (sustrato) que dirige al menos parcialmente el flujo de un fluido. El canal puede tener cualquier conformación de sección transversal (circular, oval, triangular, irregular, cuadrada o rectangular, o similar) y puede estar cubierto o descubierto. En realizaciones en las que está completamente cubierto, al menos una porción del canal puede tener una sección transversal que está completamente encerrada, o todo el canal puede estar completamente encerrado a lo largo de toda su longitud con la excepción de su(s) entrada(s) y salida(s). Un canal puede tener también una razón de aspecto (longitud con respecto a dimensión de sección transversal promedio) de al menos 2:1, más normalmente al menos 3:1, 5:1 o 10:1 o más. Un canal abierto incluirá generalmente características que facilitan el control sobre el transporte de fluido, por ejemplo, características estructurales (una indentación alargada) y/o características físicas o químicas (hidrofobicidad frente a hidrofiliidad) u otras características que pueden ejercer una fuerza (por ejemplo, una fuerza de contención) sobre un fluido. El fluido dentro del canal puede llenar parcial o completamente el canal. En algunos casos en los que se usa un canal abierto, el fluido puede mantenerse dentro del canal, por ejemplo, usando tensión superficial (por ejemplo, un menisco cóncavo o convexo).

Puede fabricarse un sustrato microfluídico de cualquier material adecuado para formar un microcanal. Los ejemplos no limitativos de materiales incluyen polímeros (por ejemplo, polietileno, poliestireno, policarbonato, poli(dimetilsiloxano) y un copolímero de cicloolefina (COC)), vidrio, cuarzo y silicio. Los expertos habituales en la técnica pueden seleccionar fácilmente un material adecuado basándose en, por ejemplo, su rigidez, su capacidad de ser inerte para (por ejemplo, libre de degradación por) un fluido que va a pasar a su través, su robustez a una temperatura a la que va a usarse un dispositivo particular y/o su transparencia/opacidad a la luz (por ejemplo, en las regiones de ultravioleta y visible). En algunas realizaciones, el material y las dimensiones (por ejemplo, grosor) de un sustrato se eligen de manera que el sustrato es sustancialmente impermeable al vapor de agua.

En algunos casos, un sustrato microfluídico está compuesto por una combinación de dos o más materiales, tales como los enumerados anteriormente. Por ejemplo, los canales del dispositivo puede estar formados por un primer material (por ejemplo, poli(dimetilsiloxano)), y puede usarse una cubierta que está formada por un segundo material (por ejemplo, poliestireno) para sellar los canales. En otra realización, los canales del dispositivo pueden estar formados por poliestireno u otros polímeros (por ejemplo, mediante moldeo por inyección) y puede usarse cinta biocompatible para sellar los canales. Puede usarse una variedad de métodos para sellar un canal microfluídico o

porciones de un canal, incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de adhesivos, pegamento, uniones o por medios mecánicos (por ejemplo, fijación).

5 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar determinadas realizaciones de la presente invención, pero no ejemplifican el alcance completo de la invención.

EJEMPLO 1

Fabricación de canales microfluídicos en un sustrato

10 Se describe un método para fabricar un sistema de canales microfluídicos.

15 Los trazados del sistema de canales se diseñaron con un programa de diseño asistido por ordenador (CAD) y se ilustran en las figuras 3 y 4. Los dispositivos microfluídicos se formaron en poli(dimetilsiloxano) Silgard 184 (PDMS, Dow Corning, Distrelec, Suiza) mediante prototipado rápido usando matrices hechas en SU8 fotorresistente (MicroChem, Newton, MA). Se produjeron las matrices sobre una oblea de silicio y se usaron para replicar el patrón negativo en PDMS. Las matrices contenían dos niveles de SU8, un nivel con un grosor (altura) de ~50 µm que define los canales en el área de inmunoensayo, y un segundo grosor (altura) de ~250 µm que define las áreas de desecho y almacenamiento de reactivos. Se silanizó la matriz con (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrooctil)triclorsilano (ABC-R, Alemania). Se mezcló PDMS según las instrucciones del fabricante y se vertió sobre la matriz. Tras la polimerización (4 horas, 65 °C), se desprendió la réplica de PDMS de la matriz y se puncionaron los orificios de acceso del PDMS usando tubos de latón con bordes afilados (1,5 mm de diámetro). Para completar la red fluidica, se usó un sustrato plano tal como un portaobjetos de vidrio, oblea de silicio, superficie de poliestireno, losa plana de PDMS o una cinta adhesiva como cubierta y se colocó contra la superficie de PDMS. Se mantuvo la cubierta en su sitio o bien mediante fuerzas de van der Waals, o bien se fijó al PDMS usando un adhesivo.

25 En otras realizaciones, los canales microfluídicos se fabricaron en poliestireno mediante moldeo por inyección. Este método lo conocen los expertos habituales en la técnica.

EJEMPLO 2

Almacenamiento de reactivos en un sistema microfluídico

35 Este ejemplo describe un método para almacenar reactivos líquidos y secos en un sistema microfluídico.

40 Se almacenaron reactivos húmedos y secos en los sistemas microfluídicos mostrados en las figuras 3-5 y 14. Para almacenar reactivos secos, se colocaron gotas de biomoléculas sobre las zonas de detección del sustrato. Tras 30 min, se retiró la disolución y se enjuagó con tampón la superficie del sustrato modificado con proteínas. Se secó la superficie con nitrógeno comprimido durante 20 s, y luego se selló el sustrato contra una cubierta. La cubierta era o bien una placa de poliestireno (en el caso de sustratos de PDMS) (NUNC Omnitray, VWR, Suiza) o bien un adhesivo biocompatible (en el caso de sustratos de poliestireno). Cuando se usó un adhesivo biocompatible, se perforó el sustrato de poliestireno para obtener agujeros de acceso antes de la aplicación de la cubierta. En un enfoque diferente, se formaron los agujeros en el termoplástico durante el proceso de moldeo por inyección usando pilares dentro de la cavidad de la máquina de moldeo por inyección. Todos los microcanales, incluyendo los de las áreas de almacenamiento de reactivos e inmunoensayo, se llenaron con tampón de bloqueo (Tween 20 y/o BSA en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) para hacer que las superficies de los canales microfluídicos sean hidrófilas y para bloquear las superficies para evitar la adsorción no específica de proteína sobre las paredes de los microcanales. Se retiró la disolución de bloqueo mediante succión y se secó el dispositivo a temperatura ambiente al vacío.

50 Para almacenar reactivos húmedos en el sistema microfluídico, se prepararon en primer lugar disoluciones de reactivo para un inmunoensayo en recipientes diferenciados (por ejemplo, pocillos de una placa de 96 pocillos, o tubos de centrifuga). Se aspiraron secuencialmente los reactivos como tampones líquidos, seguidos por espaciadores de aire entre tampones líquidos sucesivos, al interior de tubos secundarios (polietileno con un diámetro interno de 0,2 mm) con una jeringa operada manualmente conectada a la parte posterior de los tubos.

55 Se almacenaron los reactivos en canales de un área de almacenamiento de reactivos del sistema microfluídico (fabricado mediante el método descrito en el ejemplo 1) conectando un orificio de salida de los tubos a una entrada del canal. Los fluidos fluyeron desde los tubos hasta el canal o bien mediante fuerzas capilares, aplicando presión negativa (por ejemplo, un vacío) a la salida del canal, o bien aplicando presión positiva a la entrada de los tubos (usando un émbolo de jeringa). Los reactivos residían en el área de almacenamiento de reactivos del canal.

60 Entonces se sellaron las entradas y salidas de los canales colocando un adhesivo biocompatible sobre las entradas y salidas. En el caso de un sustrato de poliestireno, se aplicó esta segunda cinta sobre la superficie opuesta a la superficie modificada con la cubierta. Este sellante protegió los reactivos almacenados de la degradación/desnaturalización debida a las condiciones atmosféricas.

65

Se almacenaron los reactivos en los canales microfluídicos durante tres meses sin degradación/desnaturalización, tal como se sometió a prueba mediante el uso de los reactivos en inmunoensayos cuantitativos. Este ejemplo muestra que pueden almacenarse tanto reactivos líquidos como secos (incluyendo proteínas) durante periodos de tiempo prolongados en canales microfluídicos.

EJEMPLO 3

Realización de un inmunoensayo cargando una muestra usando un tubo capilar de extremos abiertos

Este ejemplo no forma parte de la invención y se proporciona para fines de información solo. Muestra que puede realizarse un inmunoensayo cargando una muestra usando un tubo capilar de extremos abiertos y usando reactivos almacenados en un sustrato microfluídico.

El sistema microfluídico de la figura 7 se fabricó usando el método descrito en el ejemplo 1. Este sistema incluía cuatro secciones: un área de almacenamiento de reactivos, un área de carga de muestra, un área de inmunoensayo y un área de desechos. El área de almacenamiento de reactivos se llenó previamente con reactivos requeridos para realizar un inmunoensayo para la detección de IgG humana total en sangre completa: disoluciones de anticuerpo, tampones de lavado y reactivos de amplificación (o bien sustratos enzimáticos o bien reactivos de amplificación de plata) usando el método descrito en el ejemplo 2. Estos reactivos se presentaron como disoluciones acuosas listas para usar cargadas como una secuencia de tapones líquidos, separados entre sí por huecos de aire.

Se obtuvo una muestra de sangre de un donante y se cargó la muestra en un tubo capilar (por ejemplo, tal como se muestra en la figura 8A) mediante fuerzas capilares (o, en otros experimentos, aspirando la muestra en el tubo capilar usando una presión negativa aplicada al otro extremo del tubo). Se ajustó la salida del tubo capilar al orificio de carga de muestra del sustrato y se introdujo la muestra en el sistema microfluídico moviendo la frita dentro del tubo hacia el extremo del tubo capilar con un émbolo. Debido a que la entrada de reactivos del sustrato microfluídico se había sellado previamente, el flujo de muestra se dirigió automáticamente dentro del canal microfluídico hacia la salida del dispositivo, que se ventiló. Se dejó el capilar en su sitio, y la frita (ahora humedecida con la muestra) actuó como sello estanco.

Tras introducir la muestra en el sustrato, se retiró el sello sobre los orificios de entrada y salida. La aplicación de vacío a la salida del sistema dio como resultado el suministro de la muestra y los reactivos al área de inmunoensayo según la secuencia predefinida por el orden de reactivos alineados dentro del área de almacenamiento de reactivos. Todos los fluidos que salían del área de inmunoensayo quedaron atrapados finalmente dentro del área de desechos. Tras la finalización del ensayo, pudo observarse una señal específica para el analito diana en el área de inmunoensayos.

EJEMPLO 4

Realización de un inmunoensayo cargando una muestra usando un conector fluídico

Este ejemplo muestra que puede realizarse un inmunoensayo cargando una muestra usando un conector fluídico y usando reactivos almacenados en un sustrato microfluídico.

El sistema microfluídico de la figura 5 se fabricó usando el método descrito en el ejemplo 1. El dispositivo 300 incluye secciones 302 que contienen reactivos almacenados húmedos y la sección 350 que contiene reactivos secos almacenados. Se prefabricó el área de inmunoensayo 360 con moléculas sometidas a fisisorción usando el método descrito en el ejemplo 2. El área de inmunoensayo incluía una primera zona de detección 362 estampada con Tween (usando una disolución de Tween en PBS), zonas de detección segunda y tercera 364 y 366 estampadas con anticuerpo anti-IgG humana (usando una disolución de anticuerpo anti-IgG humana en PBS), y una cuarta zona de detección 368 incluía IgG humana estampada (usando una disolución de IgG humana en PBS).

Se llenó previamente el área de almacenamiento de reactivos 304 (usando el método descrito en el ejemplo 2) con reactivos requeridos para realizar un inmunoensayo para la detección de IgG humana total en sangre completa. Se llenaron los reactivos en forma de una secuencia de tapones líquidos, cada uno de los tapones líquidos separados por espaciadores gaseosos. Los reactivos en la porción inferior 306 del área de almacenamiento de reactivos fueron (en orden de introducción en el área de inmunoensayo): tres lavados con tampón, un tapón de anticuerpo anti-IgG humana marcado con coloide de oro, tres lavados con tampón y seis lavados con agua. La porción superior 305 del área de almacenamiento de reactivos contenía disoluciones para la deposición de plata sin electricidad usadas como disoluciones de amplificación. Estas disoluciones incluían sal de plata, almacenada en el canal 308, e hidroquinona, almacenada en el canal 309. Se mantuvieron estas disoluciones separadas antes de su uso. En la figura 5A, la entrada 354 y la salida 318, que se habían sellado previamente, estaban sin sellar en esta fase.

Se obtuvo una muestra de sangre venosa de un donante sano y se cargó la muestra en un conector fluídico mediante fuerzas capilares (o, en otros experimentos, aspirando la muestra en el tubo capilar usando una presión

- negativa aplicada al otro extremo del tubo). Se llenó el conector fluidoico con un volumen conocido, predeterminado de muestra (15 μ l) eligiendo una longitud apropiada del capilar (y conociendo el volumen interno del capilar). (Este volumen de muestra era suficiente para mantener la incubación de la muestra durante 10 minutos tras fijarse la fuente de vacío a -15 kPa). Se dobló el conector fluidoico de modo que un extremo del conector fluidoico se ajustó en una salida 318 del área de almacenamiento de reactivos, y el otro extremo se ajustó en una entrada 354 que conduce al área de inmunoensayo (véase la figura 5B). El conector fluidoico permitió la conexión fluidoica entre las secciones 302 y 350. En la figura 5A, las entradas 316 y 317 y la salida 356, que se habían sellado previamente, estaban sin sellar en esta fase.
- 5
- 10 La aplicación de una fuente de vacío 390 (-15 kPa) a la salida 356 del sistema inició el ensayo. La muestra entró en el área de inmunoensayo, incluyendo las zonas de detección 362, 364, 366 y 368 (figura 5C), seguida por los reactivos almacenados de la sección 302 (figura 5D). Los reactivos almacenados de la sección 302 incluían varios reactivos de enjuague (por ejemplo, tampón), que eliminaron por lavado cualquier muestra residual no unida en el área de reacción (figura 5D), así como disoluciones de anticuerpo y reactivos de amplificación.
- 15
- 20 Tras la finalización del ensayo, pudo observarse una señal óptica (una película grisácea de plata metálica) específica para el analito de interés en las zonas de detección 364, 366 y 368 del área de inmunoensayo (figura 5E). Usando la serie de moléculas sometidas a fisisorción en las zonas de detección tal como se describió anteriormente, se observaron los siguientes resultados al final del ensayo: 1) ausencia de señal en la zona de detección modificada con Tween (un detergente que se sabe que impide la adhesión de proteínas), ya que esta zona de detección actúa como referencia negativa interna (zona de detección 362); 2) una señal dependiente de la concentración en las zonas de detección modificadas con anticuerpo anti-IgG humana, que refleja la unión de IgG humana de la muestra (zonas de detección 364 y 366); y 3) una señal constante en la zona de detección modificada con IgG humana, que actúa como una referencia positiva interna (zona de detección 368). Se esperaban estas observaciones.
- 25
- 30 Tal como se muestra en la figura 5F, tras la retirada del conector fluidoico y la fuente de vacío, la señal permanecía unida permanentemente en el área de inmunoensayo del dispositivo, y pudo observarse y usarse directamente para el almacenamiento de datos.
- Este ejemplo demuestra que un sistema microfluídico que tiene reactivos almacenados contenidos en el mismo, conectado mediante un conector fluidoico que contiene una muestra, puede usarse para detectar IgG humana total en una muestra de sangre completa.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (100) para realizar análisis en un sistema microfluídico que comprende:
- 5 un sistema microfluídico (22) formado en un sustrato (20) que comprende un primer canal microfluídico (34, 112) que incluye al menos una entrada (36, 116) y una salida (38, 118) y un segundo canal microfluídico (24, 158) que incluye al menos una entrada (26, 154) y una salida, (28, 156), un área de reacción (160) que permite la detección de una reacción química y/o biológica en el área de reacción, en el que el segundo canal microfluídico (24, 158) está en comunicación de fluido con el área de reacción; un conector fluídico (40, 178) que puede conectarse con el sustrato, comprendiendo el conector fluídico una trayectoria de fluido (42) que incluye una entrada de trayectoria de fluido (46) y una salida de trayectoria de fluido (44), en el que tras la conexión, la entrada de trayectoria de fluido se conecta con la salida del primer canal microfluídico para permitir la comunicación de fluido entre la trayectoria de fluido y el primer canal microfluídico, y la salida de trayectoria de fluido se conecta con la entrada del segundo canal microfluídico para permitir la comunicación de fluido entre la trayectoria de fluido y el segundo canal microfluídico,
- 10 en el que la trayectoria de fluido contiene una muestra (180) dispuesta en la misma antes de la conexión del conector fluídico con el sustrato en el que el primer canal microfluídico comprende un primer reactivo (122) dispuesto en el mismo antes de la conexión del conector fluídico con el sustrato,
- 15 en el que el segundo canal microfluídico comprende un segundo reactivo dispuesto en el mismo antes de la conexión del conector fluídico con el sustrato, y
- 20 en el que los canales microfluídicos primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso, en el que el dispositivo es adecuado para hacer fluir la muestra desde el conector fluídico hasta el área de reacción para interactuar con el segundo reactivo antes de que el primer reactivo fluya al área de reacción por medio de la trayectoria de fluido.
- 25
2. Dispositivo como en la reivindicación 1, en el que:
- 30 a) el primer canal microfluídico comprende además un segundo reactivo dispuesto en el mismo antes de la conexión del conector fluídico con el sustrato; o
- 35 b) el reactivo en el segundo canal microfluídico comprende un anticuerpo; o
- c) la al menos una entrada y una salida del segundo canal microfluídico se sellan antes del primer uso para almacenar el reactivo en el segundo canal microfluídico; o
- 40 d) el dispositivo comprende además una cubierta (734) situada adyacente al sustrato para encerrar los canales microfluídicos primero y segundo, opcionalmente, en el que la cubierta es una cinta adhesiva.
3. Dispositivo como en la reivindicación 2, en el que:
- 45 a) los reactivos primero y segundo (122, 126) en el primer canal microfluídico (112) son reactivos fluidos separados por un fluido inmiscible (130) con dichos reactivos primero y segundo;
- b) los reactivos primero y segundo en el primer canal microfluídico son reactivos fluidos separados por un fluido inmiscible con dichos reactivos primero y segundo, en el que los reactivos primero y segundo son reactivos líquidos y el fluido inmiscible con dichos reactivos primero y segundo es un gas; o
- 50 c) o bien el reactivo en el segundo canal microfluídico se seca antes del primer uso o bien el reactivo en el segundo canal microfluídico se adsorbe a una superficie del segundo canal microfluídico.
4. Dispositivo como en la reivindicación 1, en el que:
- 55 a) el área de reacción comprende al menos una región de canal sinuoso; o
- b) el área de reacción comprende al menos dos regiones de canal sinuoso conectadas en serie; o
- 60 c) el área de reacción comprende un canal, en el que la dimensión de sección transversal máxima del canal es de menos de 100 micrómetros.
5. Dispositivo como en la reivindicación 4:
- 65 a) en el que cada una de las al menos dos regiones de canal sinuoso comprende una especie química y/o biológica que puede experimentar una reacción química y/o biológica; o

- 5 b) en el que cada una de las al menos dos regiones de canal sinuoso permite la detección de una única señal homogénea en cada una de dichas regiones tras llevar a cabo una reacción química y/o biológica en dichas regiones; o
- 6 c) que comprende además un primer detector alineado con la primera región de canal sinuoso, que comprende además opcionalmente un segundo detector alineado con la segunda región de canal sinuoso.
- 10 6. Dispositivo como en la reivindicación 1:
- a) en el que el sistema microfluídico incluye menos de 2 intersecciones de canales; o
- b) en el que el sistema microfluídico no incluye ninguna intersección de canal; o
- 15 c) que comprende además una fuente de vacío que puede conectarse a una salida; o
- d) en el que el sustrato comprende una única capa de sustrato; o
- 20 e) en el que el sustrato comprende más de una capa de sustrato.
7. Dispositivo como en la reivindicación 1, en el que:
- el primer canal microfluídico tiene una longitud con respecto a la dimensión de sección transversal promedio de al menos 10:1.
- 25 8. Dispositivo como en la reivindicación 1, en el que:
- a) la trayectoria de fluido tiene un primer volumen y comprende además un elemento de control del volumen que permite la introducción de un volumen controlado de fluido en la trayectoria de fluido antes de la conexión del conector fluídico al sistema microfluídico; o
- 30 b) el conector fluídico comprende además un elemento de muestreo que puede recibir una muestra de fluido de una entidad biológica, opcionalmente, en el que el conector fluídico puede permitir la transferencia de fluido desde la entidad biológica hasta la trayectoria de fluido.
- 35 9. Método para realizar análisis en un sistema microfluídico que comprende:
- conectar un conector fluídico (40, 178) a un sustrato (20), en el que el sustrato comprende un primer canal microfluídico (34, 112) que incluye al menos una entrada (36, 116) y una salida (38, 118) y un segundo canal microfluídico (24, 158) que incluye al menos una entrada (26, 154) y una salida (28, 156), el segundo canal microfluídico en comunicación de fluido con un área de reacción (160) que permite la detección de una reacción química y/o biológica en el área de reacción,
- 40 en el que la etapa de conectar comprende provocar que los canales microfluídicos primero y segundo estén en comunicación de fluido entre sí conectando el conector fluídico con el sustrato, en el que el conector fluídico comprende una trayectoria de fluido (42) que incluye una entrada de trayectoria de fluido (46) y una salida de trayectoria de fluido (44),
- 45 en el que, tras la conexión, la entrada de trayectoria de fluido se conecta con la salida del primer canal microfluídico para permitir la comunicación de fluido entre la trayectoria de fluido y el primer canal microfluídico, y la salida de trayectoria de fluido se conecta con la entrada del segundo canal microfluídico para permitir la comunicación de fluido entre la trayectoria de fluido y el segundo canal microfluídico,
- 50 en el que la trayectoria de fluido contiene una muestra (180) dispuesta en la misma antes de la conexión del conector fluídico con el sustrato,
- 55 en el que el primer canal microfluídico comprende un primer reactivo (122) dispuesto en el mismo antes de la conexión del conector fluídico con el sustrato,
- 60 en el que el segundo canal microfluídico comprende un segundo reactivo dispuesto en el mismo antes de la conexión del conector fluídico con el sustrato,
- 65 en el que los canales microfluídicos primero y segundo no están en comunicación de fluido entre sí antes del primer uso, y en el primer uso, los canales microfluídicos primero y segundo se ponen en comunicación de fluido entre sí,

en el que el método comprende hacer fluir la muestra desde el conector fluídico hasta el área de reacción para interactuar con el segundo reactivo antes de hacer fluir el primer reactivo hasta el área de reacción por medio de la trayectoria de fluido.

5 10. Método como en la reivindicación 9, que comprende aplicar un vacío a una salida del sistema microfluídico para provocar que el fluido fluya en el sistema microfluídico.

11. Método como en la reivindicación 9, en el que:

10 a) el primer canal microfluídico (112) comprende un segundo reactivo (126) almacenado en el mismo, en el que los reactivos primero y segundo (122, 126) son reactivos fluidos separados por un fluido (130) inmiscible con dichos reactivos primero y segundo; o

15 b) el primer canal microfluídico comprende un segundo reactivo almacenado en el mismo, en el que el segundo reactivo es un reactivo líquido y el fluido inmiscible con dicho segundo reactivo es un gas, comprendiendo el método hacer fluir el primer reactivo, el fluido inmiscible y el segundo reactivo en serie desde el primer canal microfluídico hasta el segundo canal microfluídico por medio del conector fluídico.

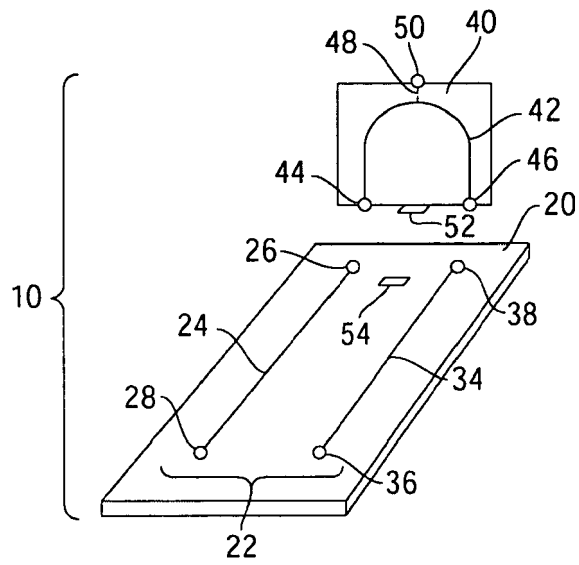


Fig. 1A

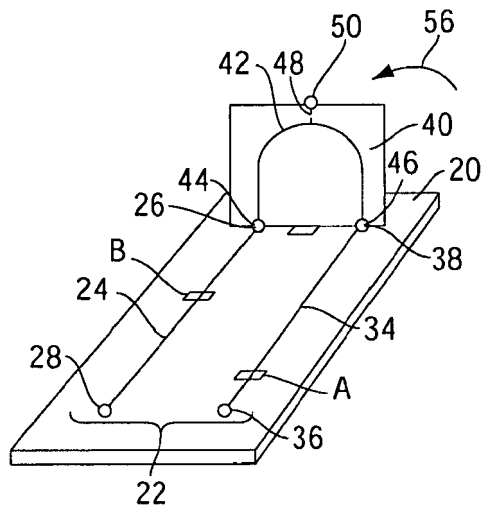


Fig. 1B

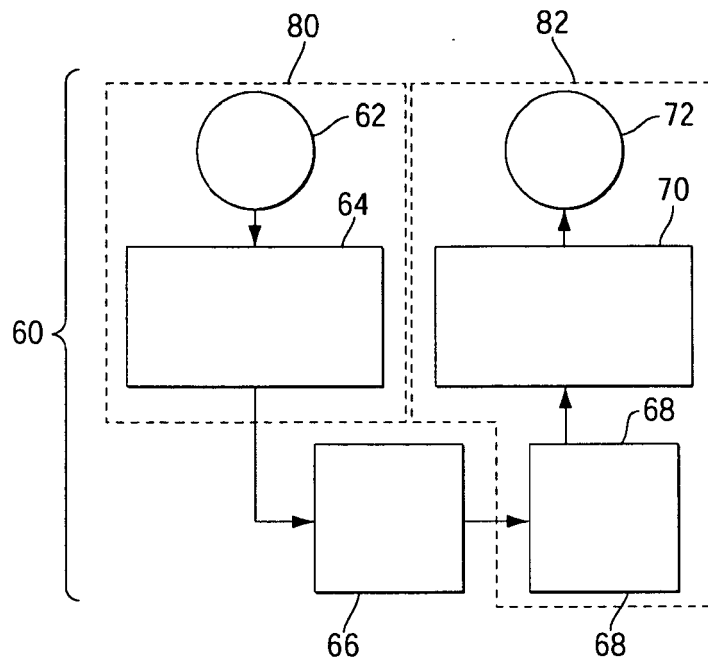


Fig. 2

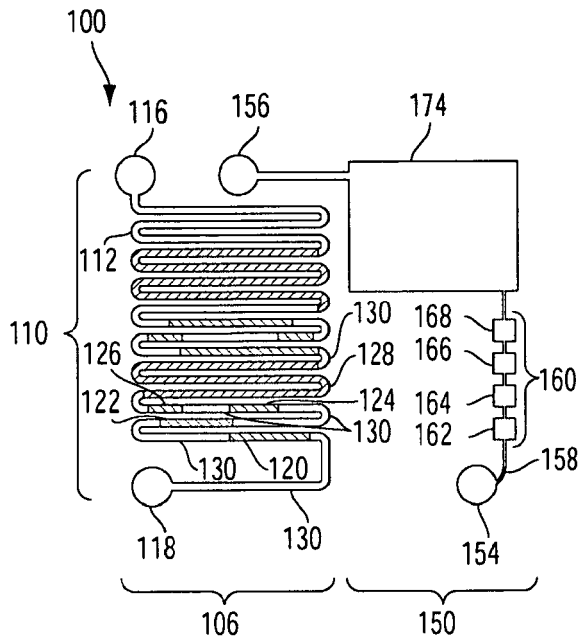


Fig. 3A

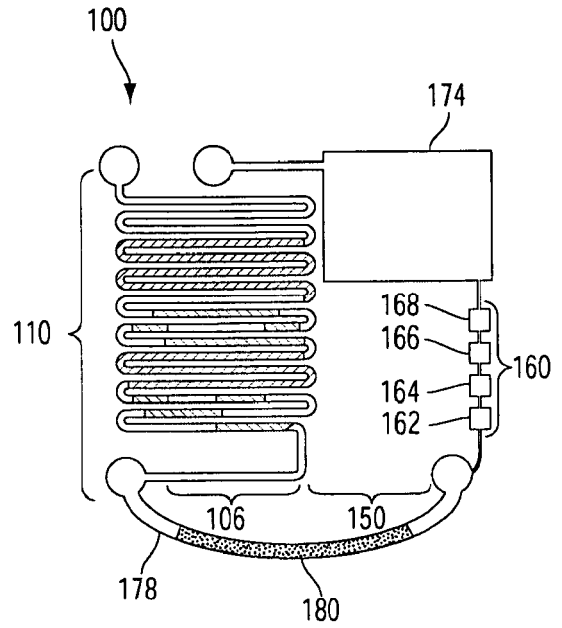


Fig. 3B

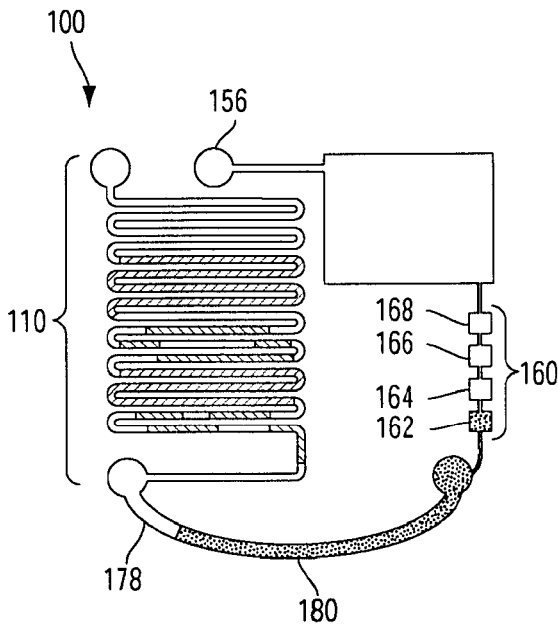


Fig. 3C

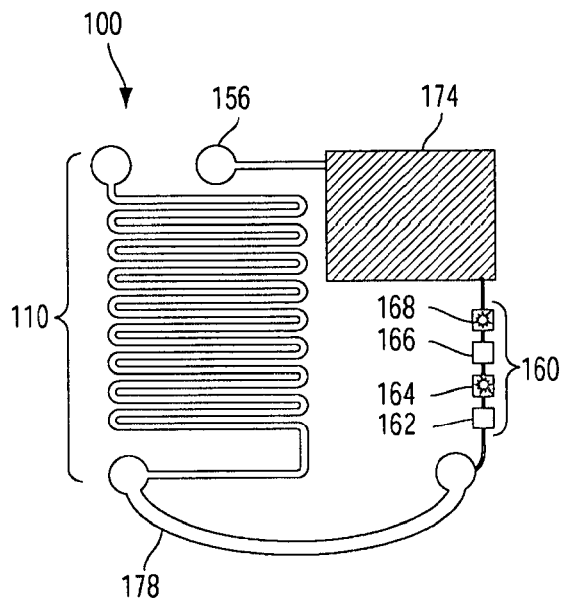


Fig. 3D

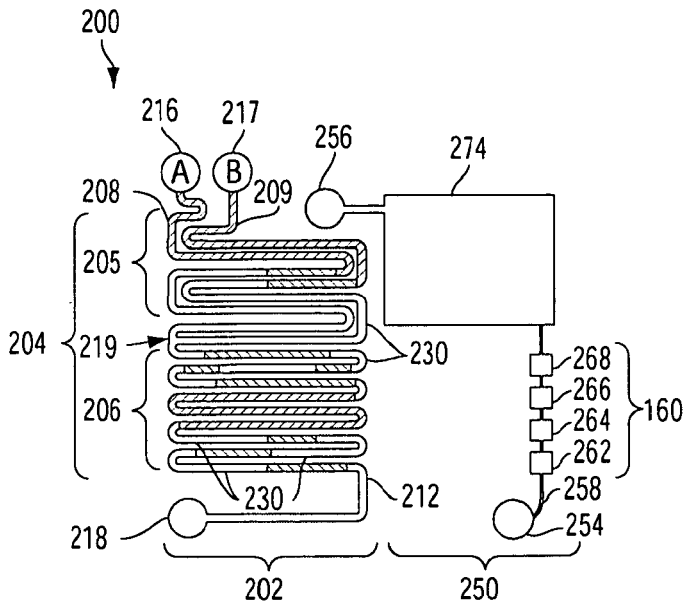


Fig. 4A

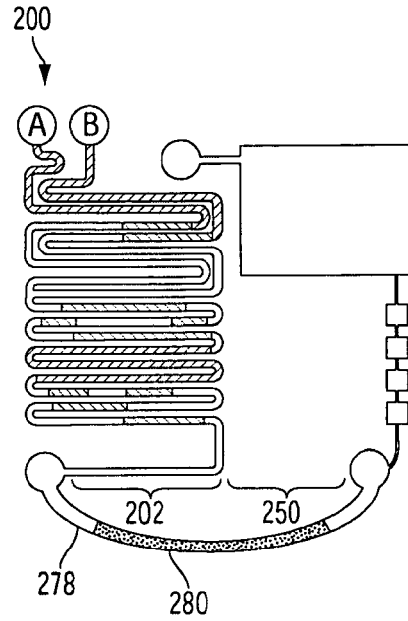


Fig. 4B

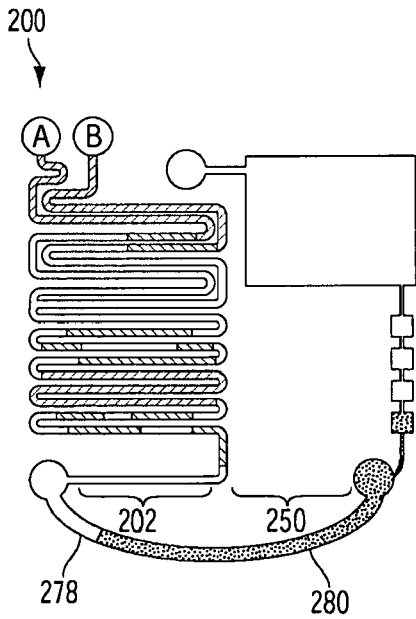


Fig. 4C

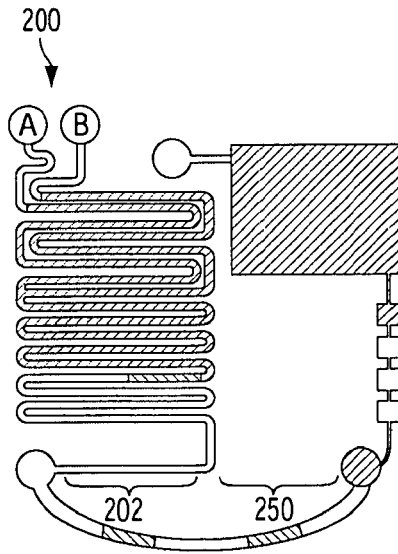


Fig. 4D

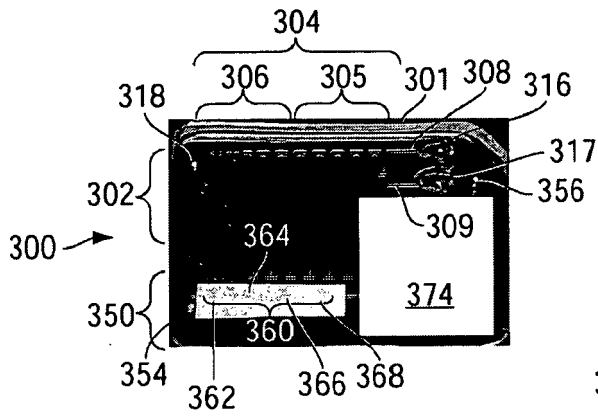


Fig. 5A

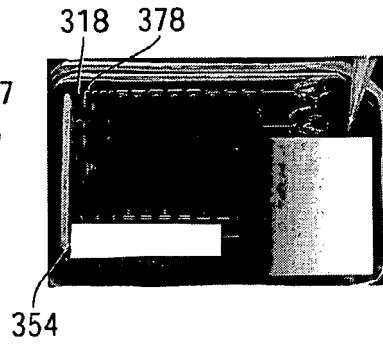


Fig. 5B

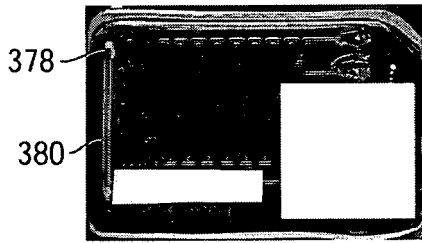


Fig. 5C

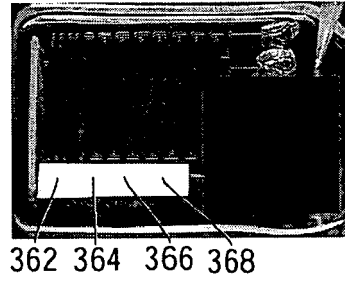


Fig. 5D

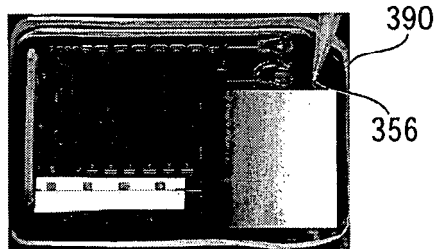


Fig. 5E

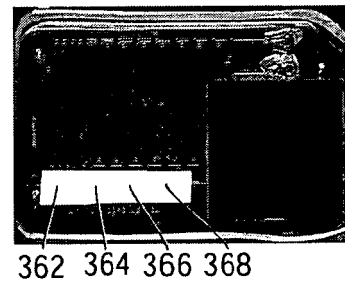


Fig. 5F

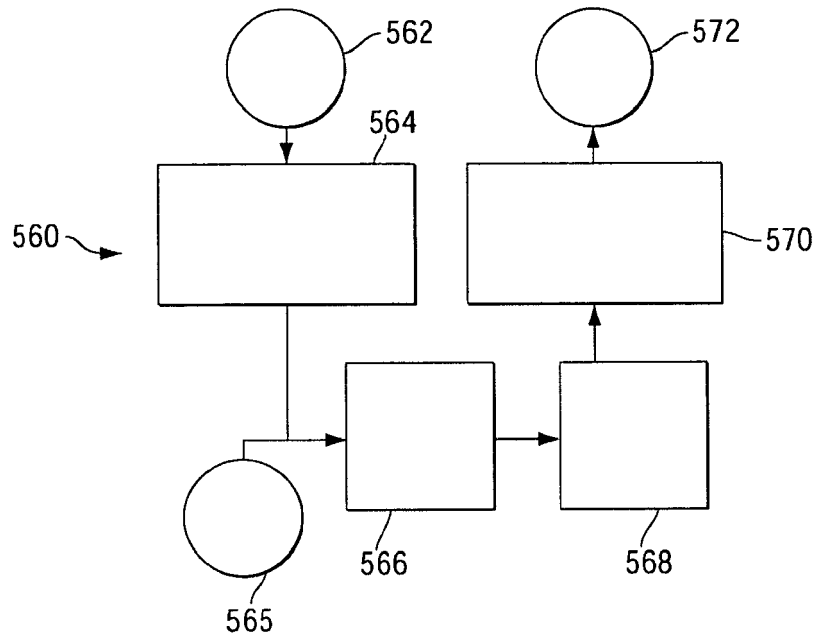


Fig. 6

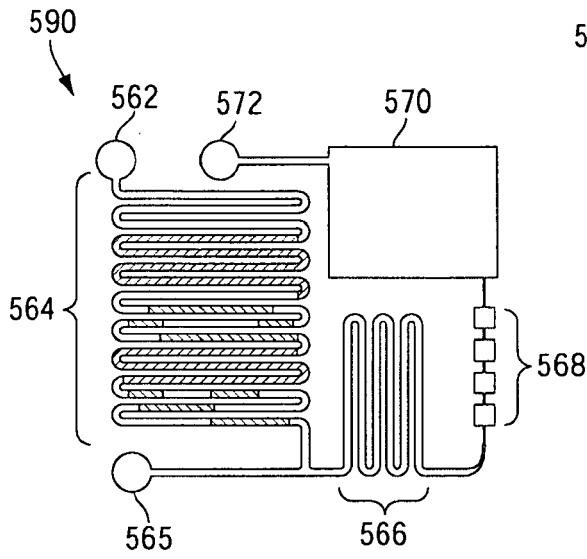


Fig. 7A

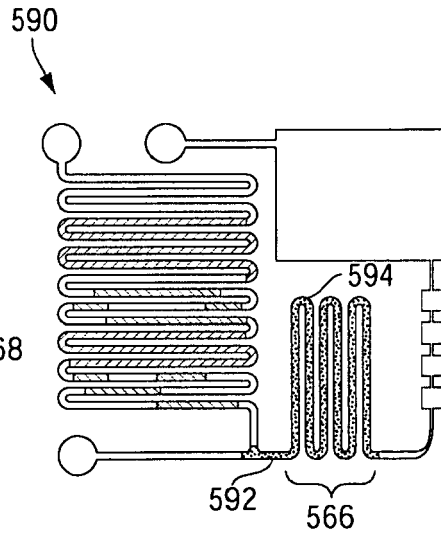


Fig. 7B

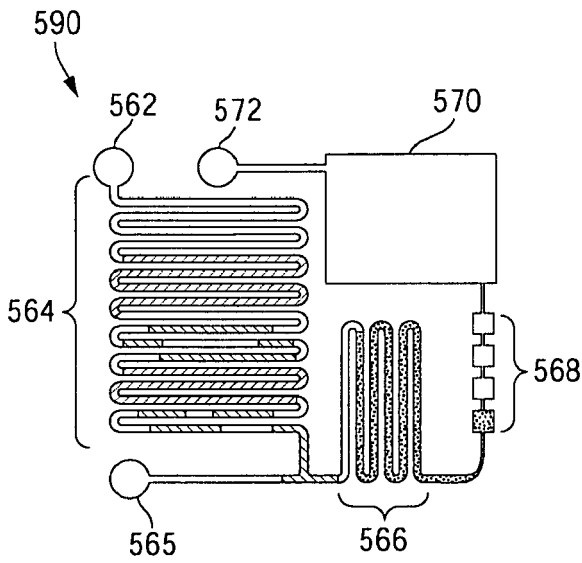


Fig. 7C

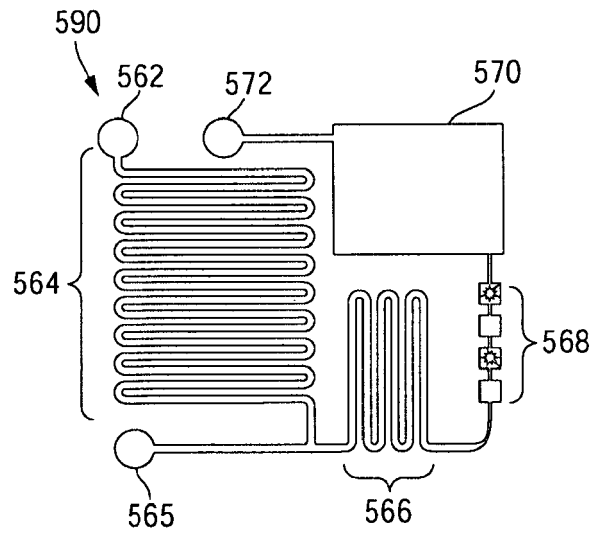


Fig. 7D

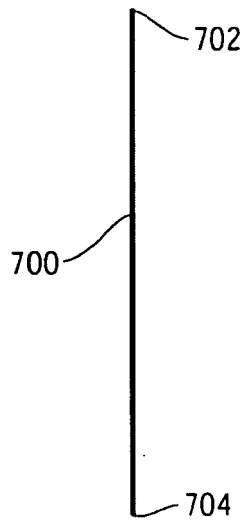


Fig. 8A

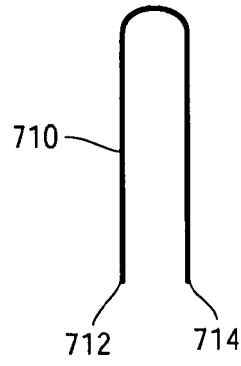


Fig. 8B

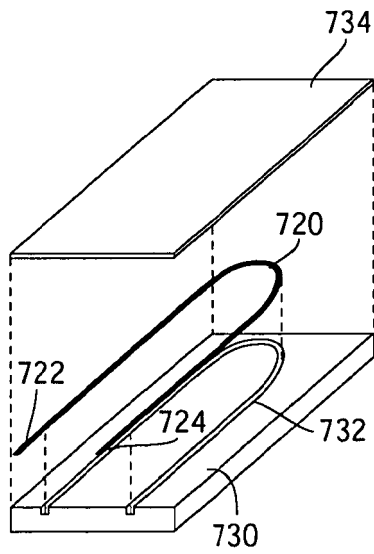


Fig. 8C

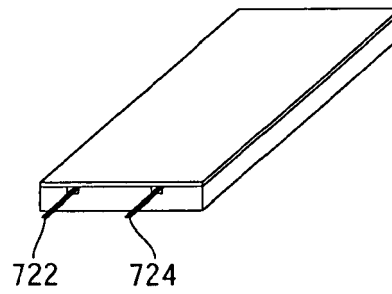


Fig. 8D

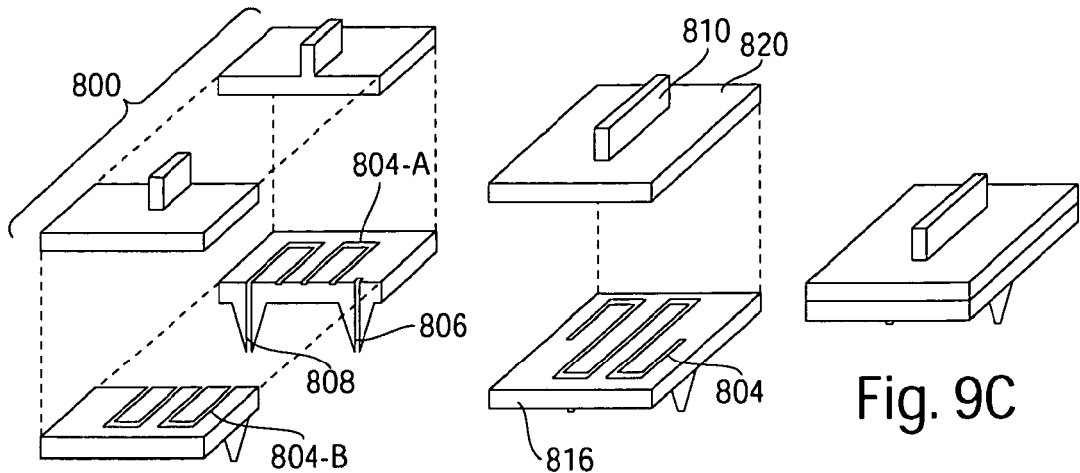


Fig. 9A

Fig. 9B

Fig. 9C

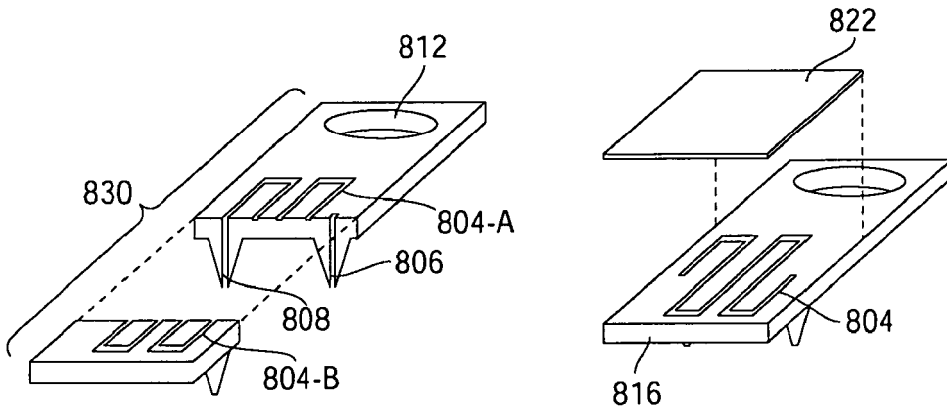


Fig. 9D

Fig. 9E

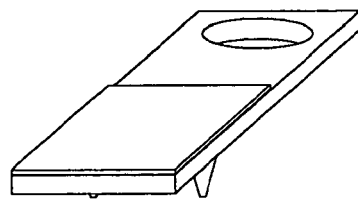


Fig. 9F

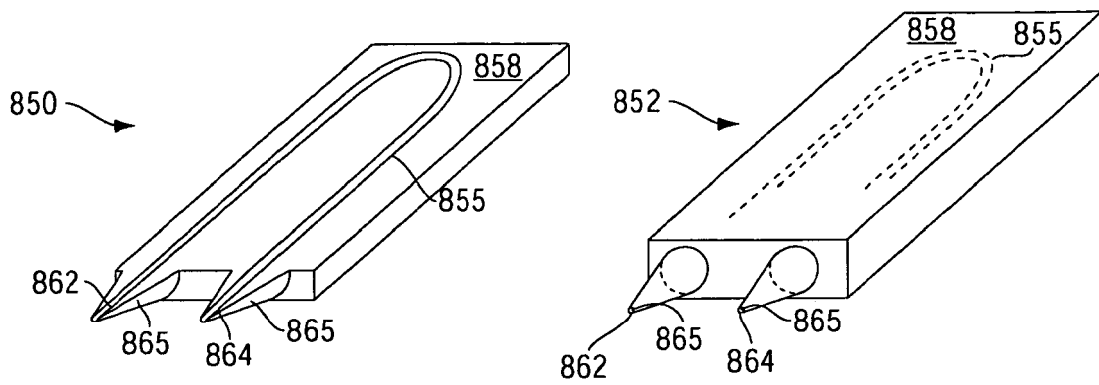


Fig 10A

Fig 10B

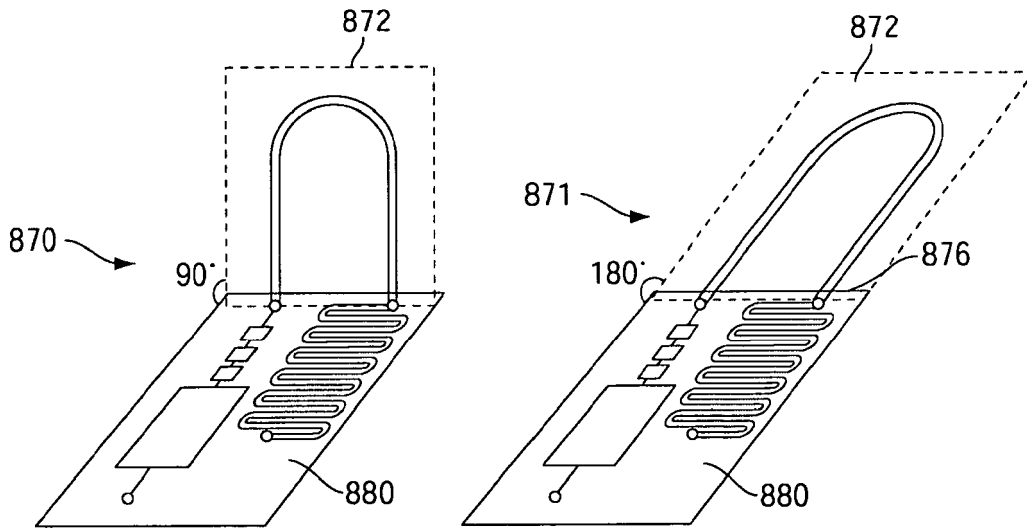


Fig 11A

Fig 11B

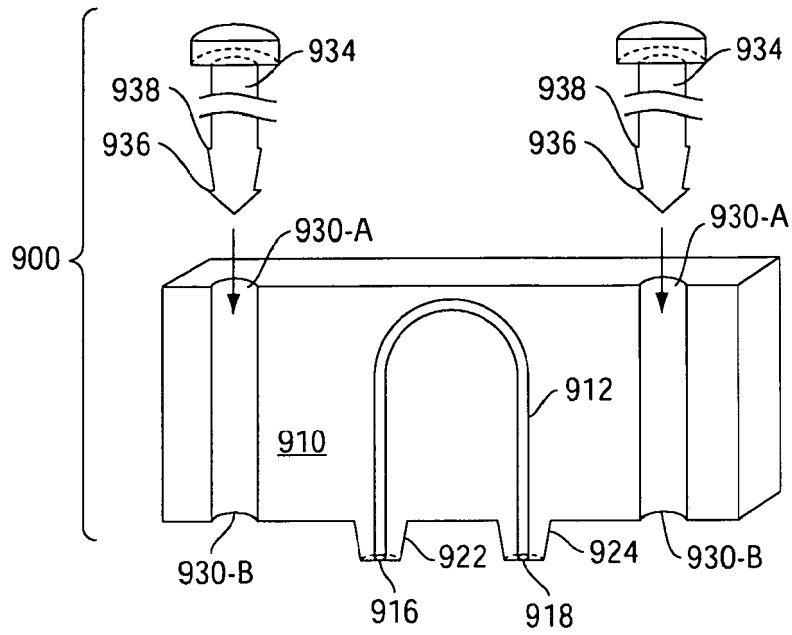


Fig. 12A

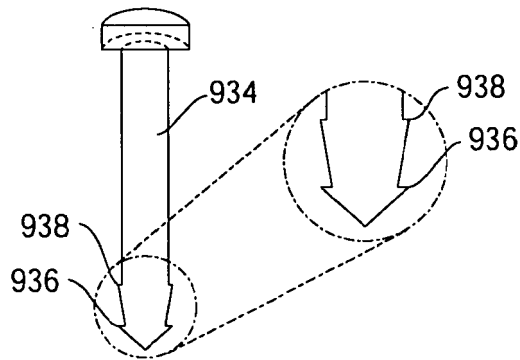


Fig. 12B

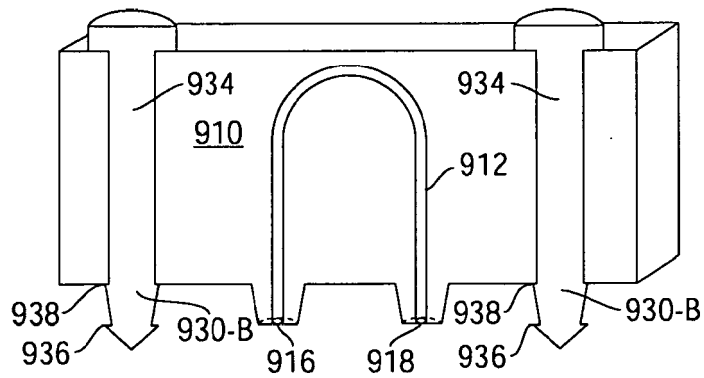


Fig. 12C

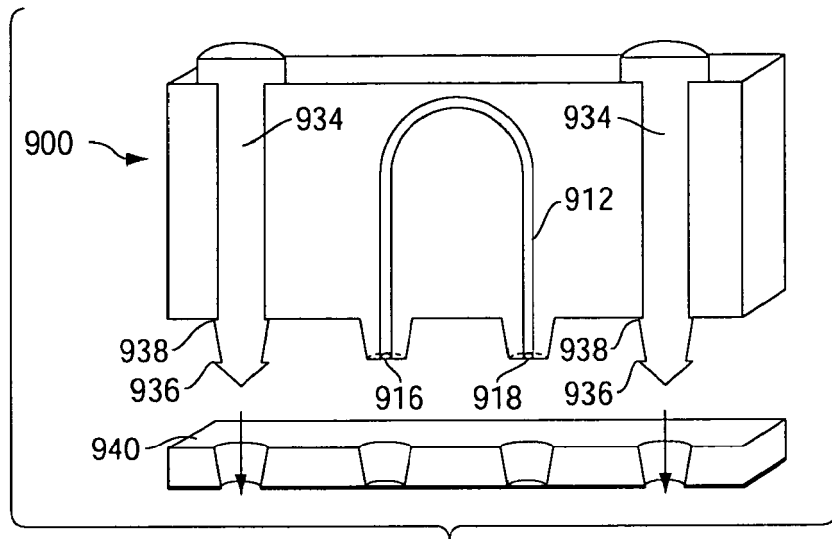


Fig. 12D

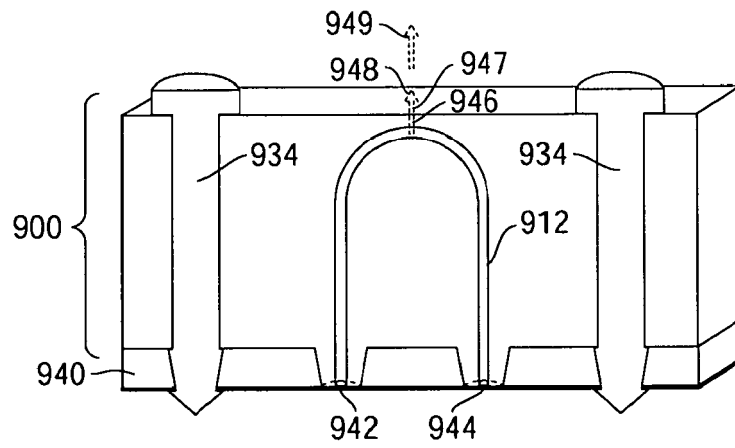


Fig. 12E

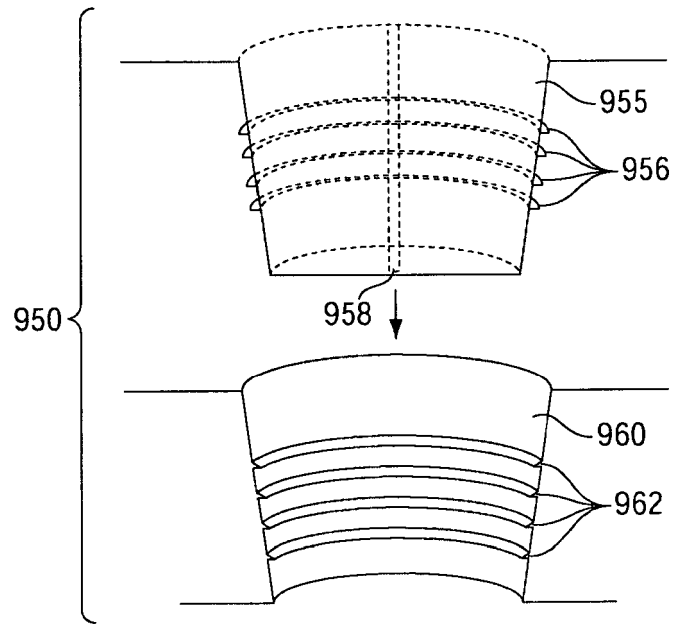


Fig. 13

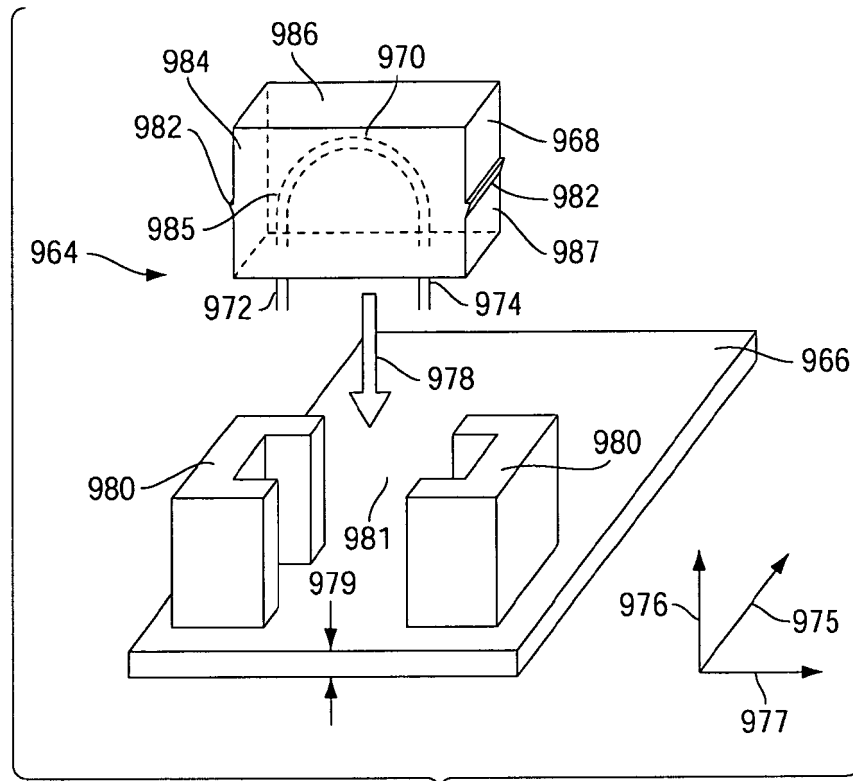


Fig. 14A

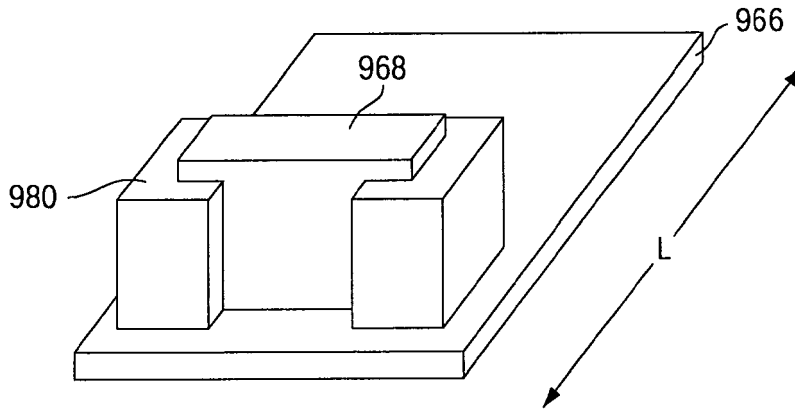


Fig. 14B

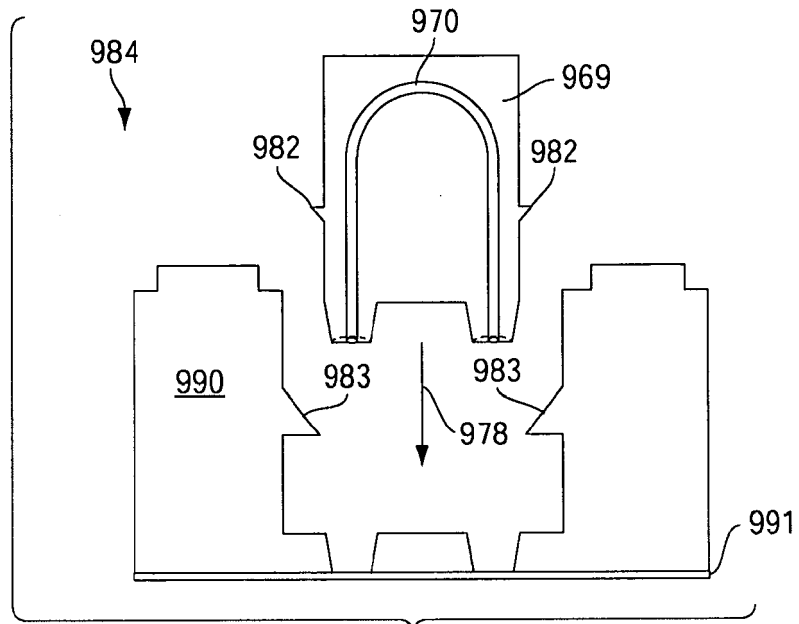


Fig. 15A

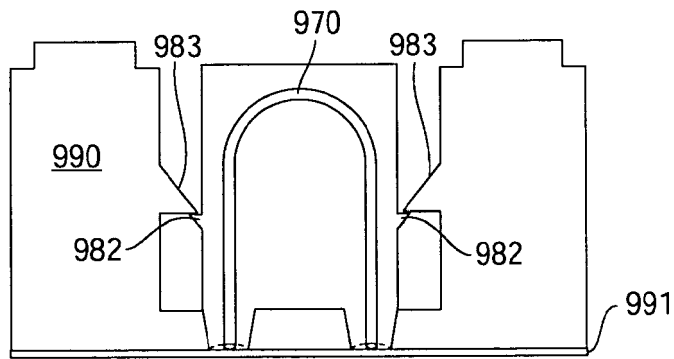


Fig. 15B

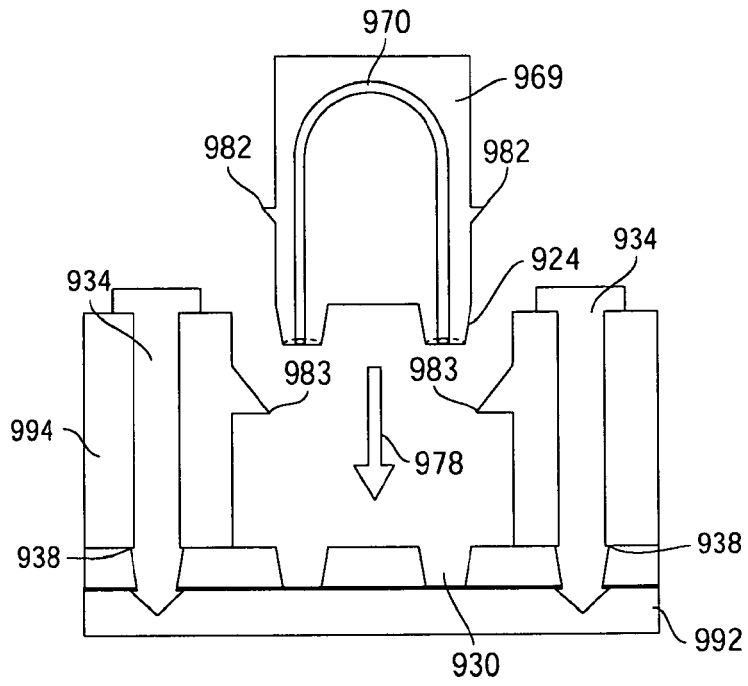


Fig. 16A

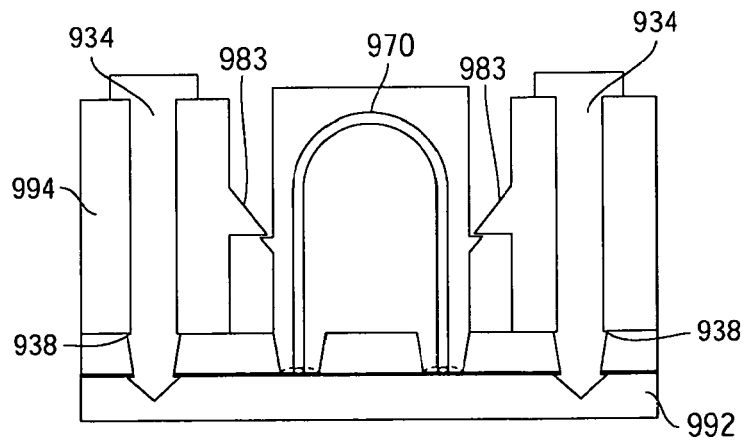


Fig. 16B

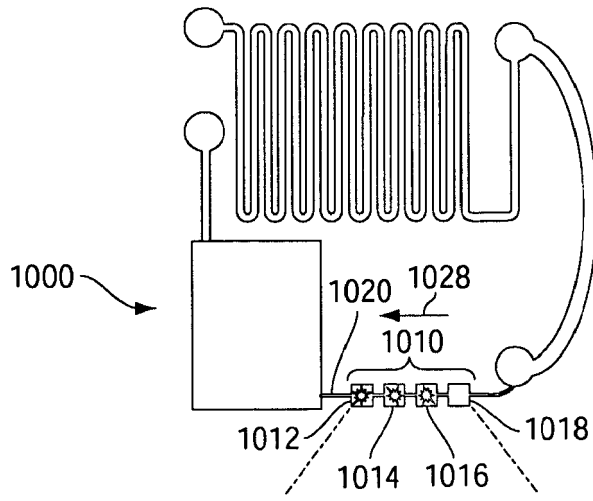


Fig. 17A

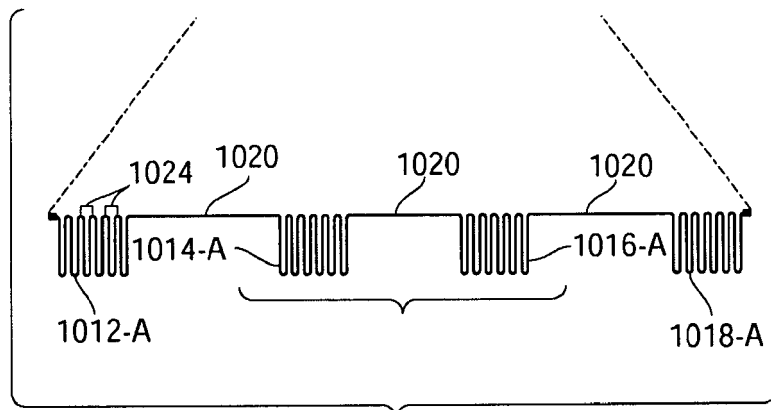


Fig. 17B

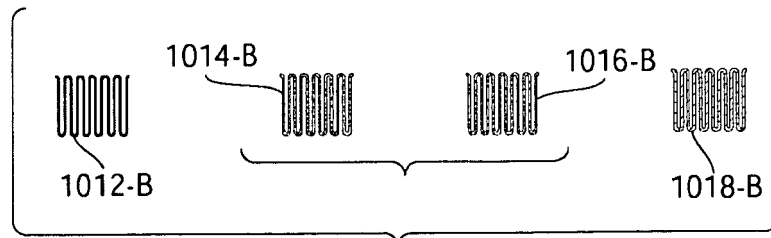


Fig. 17C

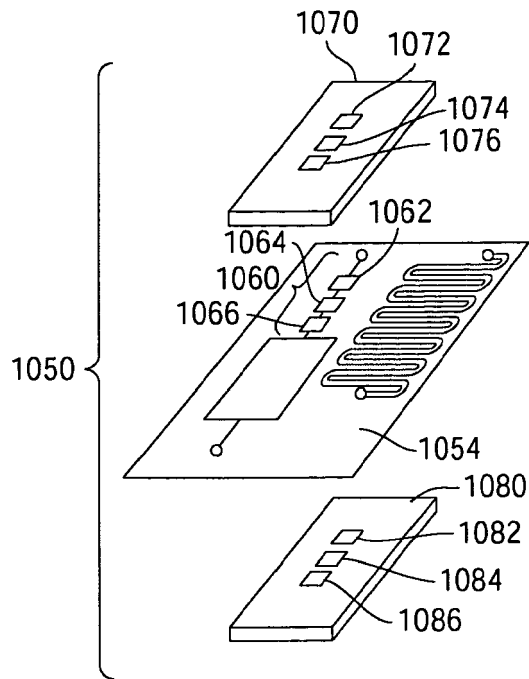


Fig. 18A

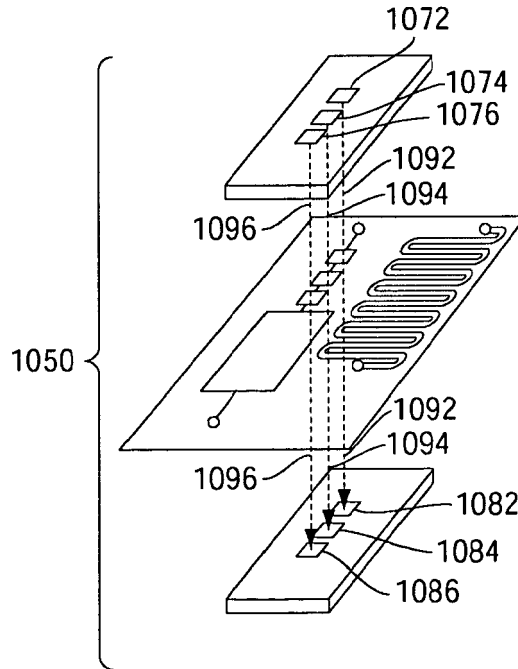


Fig. 18B

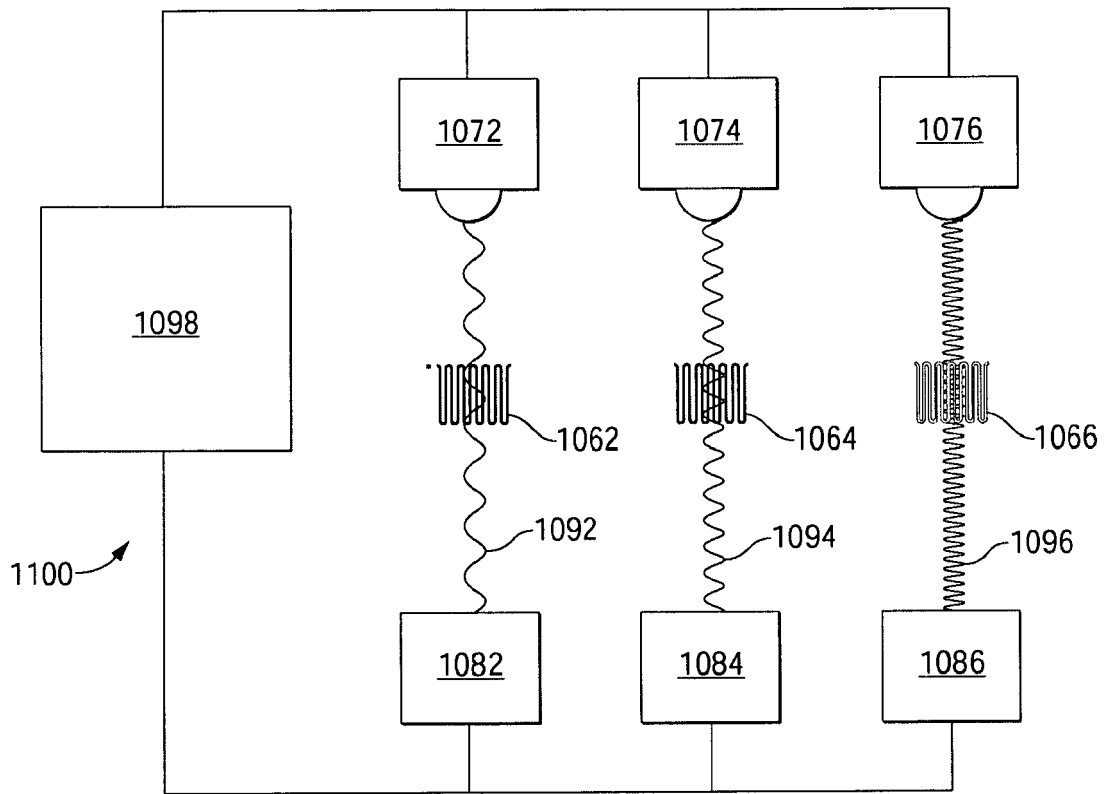


Fig. 19

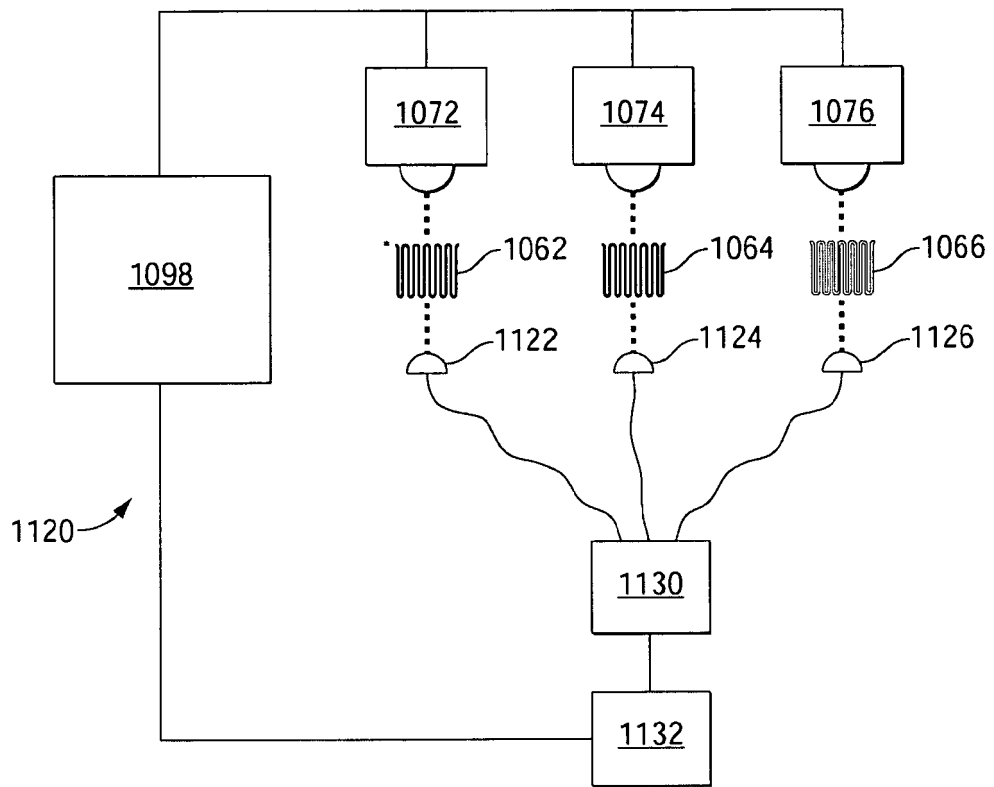


Fig. 20