

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 407**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 35/08 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2014 PCT/US2014/011163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14110456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2014 E 14738226 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2943788**

54 Título: **Dispositivo de ensayo de punto de cuidado de bajo coste**

30 Prioridad:

11.01.2013 US 201361751679 P

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

03.12.2018

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**SUGARMAN, JEFFREY;
HUANG, WEI y
MORTON, JUSTIN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 692 407 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 de ensayo de punto de cuidado de bajo coste

Introducción

5 La diagnosis en punto de cuidado (lugar de atención) se refiere al proceso de obtener una muestra biológica de un sujeto, probar en la muestra la presencia de uno o más analitos de interés para obtener un resultado y entonces proporcionar una diagnosis al sujeto basada en los resultados de análisis de muestra, todo en la misma ubicación. La diagnosis de punto de cuidado ofrece beneficios significativos desde el punto de vista de ahorro en coste y satisfacción del paciente, dado que los diagnósticos a menudo se pueden hacer más rápidamente y por menos coste que procedimientos de pruebas de diagnóstico más tradicionales, p. ej., cuando se obtiene una muestra en una primera ubicación y entonces se envía para realizar pruebas a una segunda ubicación.

10 La mayoría de los ensayos actuales en punto de cuidado para enfermedades infecciosas ofrecen únicamente una única diagnosis por prueba. Una diagnosis rápida de múltiples enfermedades infecciosas con una única gota de sangre de pinchazo de dedo usando una tecnología barata y fácil disponible en la ubicación de punto de cuidado mejoraría enormemente los resultados sanitarios globales. Los inmunoensayos de micropartículas basados en citometría de flujo proporcionan excelente precisión y multiplexión, pero son inapropiados para ambientes de punto de cuidado debido a una preparación engorrosa de muestras e instrumentación cara.

15 Sistemas y métodos para detección de múltiples analitos que incluyen un sistema para la distribución de una muestra biológica que incluye un sustrato, en donde el sustrato incluye una pluralidad de cámaras de muestra, un canal de introducción de muestra para cada cámara de muestra, y un canal de respiro para cada cámara de muestra se describen en el documento WO 2006/116616 A2.

Compendio

La presente invención está relacionada con un microdispositivo fluídico según las reivindicaciones 1-6, 12.

La invención también está relacionada con un método para realizar un ensayo de una muestra líquida según las reivindicaciones 7-10.

25 La invención también está relacionada con un método para formar un microdispositivo fluídico como se describe en la reivindicación 11.

Además la invención está relacionada con un sistema según la reivindicación 13 y un kit según la reivindicación 14.

30 Se describe un método para producir un cartucho de ensayo que incluye formar un lugar de aplicación de muestra y un canal capilar en comunicación de fluidos entre sí. El dispositivo puede incluir un canal capilar y un canal de respiro. Los canales se pueden formar formando un camino surcado en un material plástico (p. ej., polímero de cicloolefina) y tratando el camino surcado con plasma a fin de aumentar la hidrofiliidad del área tratada. Una parte del área superficial del camino surcado puede recibir el contacto de un solvente orgánico no polar (p. ej., hexano, heptano, pentano, cloroformo cualquier combinación de los mismos) en donde el tratamiento reduce la hidrofiliidad del área superficial. El camino surcado puede ser sellado para formar un canal capilar y un empalme hidrófobo.

35 Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona una ilustración esquemática de un dispositivo de ensayo de una realización de esta invención.

Las figuras 2A y 2B proporcionan ilustraciones de dispositivos de ensayo según realizaciones de esta invención.

Descripción detallada

40 La presente descripción proporciona métodos y sistemas para analizar una muestra líquida. Se describe un microdispositivo fluídico para realizar un ensayo de una muestra líquida que incluye un lugar de aplicación de muestra y una salida de respiradero en comunicación de fluidos con el canal capilar. Se proporciona un capuchón que se configura para sellar tanto la salida de respiradero como el lugar de aplicación de muestra en un volumen compartido y separado de un ambiente exterior.

45 Antes de que se describa la presente invención en mayor detalle, se tiene que entender que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que estas pueden variar. También se tiene que entender que la terminología usada en esta memoria tiene la finalidad de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitativa, dado que el alcance de la presente invención será limitado únicamente por las reivindicaciones anexas.

50 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o interviniente en ese intervalo indicado, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en los intervalos

más pequeños y también están abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

5 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el sentido que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria en la práctica o al probar la presente invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

10 Cabe señalar que, como se emplea en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo dictamine claramente de otro modo. Cabe señalar además que las reivindicaciones pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base precedente para el uso de tal terminología exclusiva como “únicamente”, “solo” y similares, en conexión con la relación de los elementos de reivindicación, o del uso de una limitación “negativa”.

15 La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), biología celular, tecnología de inmunoensayos, microscopía, análisis de imágenes, y química analítica, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas convencionales incluyen, pero no se limitan a ellos, detección de señales fluorescentes, análisis de imágenes, selección de fuentes de iluminación y componentes de detección de señales ópticas, etiquetado de células biológicas, y similares. Tales técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en manuales estándares de laboratorio tales como Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV), Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cells: A Laboratory Manual, PCR Primer: A Laboratory Manual, and Molecular Cloning: A Laboratory Manual (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press); Murphy, Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging (Wiley-Liss, 2001); Shapiro, Practical Flow Cytometry, Fourth Edition (Wiley-Liss, 2003); Herman et al, Fluorescence Microscopy, 2nd Edition (Springer, 1998).

25 Al describir aún más diversos aspectos de la invención, primero se revisan en mayor detalle realizaciones de microdispositivos fluidicos de la invención, seguido por una revisión de diversas realizaciones de los métodos para hacer y usar los dispositivos, así como realizaciones de kits que incluyen los dispositivos.

Dispositivos

30 Se describe un microdispositivo fluidoico que incluye un canal capilar en comunicación con un lugar de aplicación de muestra y una salida de respiradero. Por microdispositivo fluidoico se entiende un dispositivo que se configura para controlar y manipular fluidos geoméricamente restringidos a una pequeña escala (p. ej., submilímetro). Además del lugar de aplicación de muestra, canal capilar y salida de respiradero, aspectos de los dispositivos incluyen un capuchón que se configura para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra dentro del mismo volumen y separar los dos componentes de un ambiente exterior.

35 Como los dispositivos incluyen un canal capilar, incluyen una estructura alargada que se configura para permitir flujo capilar del líquido a través de la misma. El dispositivo puede utilizar cualquier fuerza tal como gravedad o fuerza centrífuga además de fuerza capilar para proporcionar movimiento de la muestra a través del canal capilar. Como el canal capilar tiene una estructura alargada, tiene una longitud que es más larga que su anchura. Si bien la relación de longitud a anchura puede variar, en algunos casos la relación de longitud a anchura va de 2 a 5000, tal como de 5 a 500 e incluye de 15 a 20. En algunos casos, la longitud del canal va de 10 a 500, tal como de 20 a 250 e incluye de 40 50 a 75 mm. En algunos casos, los canales tienen una dimensión de sección transversal más larga dimensionadas en micrómetros, p. ej., una dimensión en sección transversal más larga (p. ej., diámetro en caso del canal tubular) que va de 0,1 a 20, tal como de 1 a 10 e incluyendo de 3 a 5 mm. En algunos casos la anchura del canal va de 0,1 a 20, tal como de 1 a 10 e incluyendo de 3 a 5 mm. En algunos casos la altura del canal va de 5 a 500, tal como de 10 a 150 e incluyendo de 20 a 70 micrómetros. Si bien la forma en sección transversal de los canales capilares puede variar, en algunos casos, formas en sección transversal de canales de interés incluyen, pero no se limitan a ellas: formas en sección transversal rectilínea, p. ej., cuadrados, rectángulos, trapecios, triángulos, hexágonos, etc., formas en sección transversal curvilínea, p. ej., círculos, óvalos, etc., así como formas irregulares, p. ej., una parte inferior parabólica acoplada a una parte superior plana, etc.

50 Posicionado en un extremo del canal capilar (es decir, el extremo proximal) hay un lugar de aplicación de muestra. El lugar de aplicación de muestra es un lugar o ubicación configurado para recibir un volumen de muestra, p. ej., una muestra biológica, que se va a analizar. En algunos casos, el lugar de aplicación de muestra es una estructura configurada para recibir una muestra que tiene un volumen que va de 5 a 100, tal como de 10 a 50 e incluyendo de 20 a 30 microlitros. El lugar de aplicación de muestra puede tener cualquier forma conveniente, siempre que permita acceso de fluido, ya sea directamente o a través de un componente(s) intermedio(s) que permite comunicación fluidoica, al canal capilar.

55 También presente en el microdispositivos fluidoicos hay una salida de respiradero. Las salidas de respiradero se configuran para permitir comunicación fluidoica, p. ej., para gas, desde el extremo distal del canal capilar a la superficie exterior del dispositivo. Si bien la forma en sección transversal de la salida de respiradero puede variar, en algunos

casos, formas en sección transversal de salidas de respiradero de interés incluyen, pero no se limitan a ellas: formas en sección transversal rectilínea, p. ej., cuadrados, rectángulos, trapecios, triángulos, hexágonos, etc., formas en sección transversal curvilínea, p. ej., círculos, óvalos, etc., así como formas irregulares, p. ej., una parte inferior parabólica acoplada a una parte superior plana, etc. La longitud de la dimensión en sección transversal más larga (p. ej., diámetro en caso de un respiradero en forma circular) de la salida de respiradero también puede variar, yendo en algunos casos de 0,2 a 2, tal como de 0,5 a 1,5 e incluyendo 0,8 a 1,2. El respiradero de salida se posiciona en el dispositivo en una ubicación que es proximal o cercana al lugar de aplicación de muestra. Si bien la distancia más corta entre el lugar de aplicación de muestra y el respiradero de salida puede variar, en algunos casos la distancia más corta entre estos dos componentes del dispositivo va de 1 a 20, tal como de 5 a 15 e incluyendo de 8 a 10 mm.

Como se resume anteriormente, además de lugar de aplicación de muestra, canal capilar y salida de respiradero, aspectos de los dispositivos incluyen un capuchón que se configura para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra dentro del mismo volumen y separar los dos componentes de un ambiente exterior. El capuchón es un componente que se cubre para cubrir tanto la aplicación de muestra como el respiradero de salida de una manera sellada, p. ej., como se describe en mayor detalle más adelante. Si bien las dimensiones del capuchón pueden variar, en algunos casos, el capuchón se dimensiona para cubrir un área superficial que va de 10 a 1000, tal como de 50 a 500 e incluyendo 100 a 300 mm². En algunos casos, el capuchón se conecta de manera móvil a otra ubicación del dispositivo, p. ej., como se describe en mayor detalle más adelante.

En algunos aspectos el capuchón sella sobre el lugar de aplicación de muestra que se conecta a un canal capilar en el dispositivo a fin de contener biomuestra peligrosa dentro del dispositivo y/o para impedir la evaporación. El canal capilar que llena desde el lugar de aplicación con muestra líquida se puede conectar a través de un canal de respiro a una salida de respiradero que termina dentro del mismo volumen que puede ser cubierto por el capuchón. El mismo capuchón puede impedir que salga biomaterial peligroso por la salida de respiradero o el lugar de aplicación de muestra y al mismo tiempo asegura que haya igualdad de presión en la parte delantera y la posterior de la columna de líquido en el canal capilar. En algunas realizaciones el capuchón puede ser cerrado tan pronto como se aplica líquido al dispositivo, sin impacto en la tasa con la que se llena el dispositivo. Si falla una barrera de líquido (p. ej., empalme hidrófobo) dentro del dispositivo, el líquido todavía está contenido dentro del dispositivo porque ninguna parte del lugar de aplicación o la salida de respiradero está abierta al ambiente exterior después de que el capuchón haya sido cerrado.

Además de canal capilar, lugar de aplicación de muestra, salida de respiradero y capuchón (p. ej., como se ha descrito anteriormente) el dispositivo para realizar el ensayo puede incluir cualquier número de características para realizar un ensayo deseado, dichas características incluyen, pero no se limitan a ellas, una cámara de mezcla (es decir, combinación muestra/reactivo), un canal de reacción, un dominio de captura específico de analito, un empalme hidrófobo, un canal de respiro, etc., o cualquier combinación de los mismos.

En algunos casos, posicionada en el camino fluido entre el lugar de aplicación de muestra y el canal capilar hay una cámara de mezcla. Por cámara de mezcla se entiende un área o ubicación en el camino fluido que se configura para combinar muestra que ha sido aplicada a la aplicación de muestra y está fluyendo al canal capilar con uno o más reactivos. La cámara de mezcla puede incluir o no componentes de mezcla activos, p. ej., barras para remover, etc. En algunos casos, la cámara de mezcla incluye una estructura que permite alta área superficial sobre la que se puede posicionar uno o más reactivos, donde la estructura de alta área superficial puede configurarse o no para filtrar uno o más componentes de la muestra que fluye a través de la misma. En algunos casos, la estructura de alta área superficial puede ser una que se configura para no filtrar uno o más componentes de la muestra que fluyen a través de la misma. Por ejemplo, cuando la muestra es una muestra de sangre completa, la estructura de alta área superficial puede ser una que se configura para no impedir el flujo de ninguno de los componentes de sangre completa, p. ej., glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas, etc., a través de la estructura de alta área superficial. En tales casos, la estructura de alta área superficial puede tener una porosidad que va de 20 a 80, tal como de 30 a 70 e incluyendo de 40 a 60. La estructura de alta área superficial, cuando está presente, se puede fabricar de material adecuado, p. ej., materiales poliméricos, materiales vítreos, materiales cerámicos, materiales metálicos, etc. Materiales específicos de interés incluyen, pero no se limitan a ellos: polietileno, polipropileno, poli(fluoruro de vinilideno), y similares.

Presente en la cámara de mezcla hay uno o más reactivos, dichos reactivos pueden estar presentes en una superficie de una estructura de alta área superficial cuando está presente. Una variedad de diferentes reactivos pueden estar presentes en la cámara de mezcla o dominio del dispositivo, dependiendo del ensayo particular para el que se configura el dispositivo. Reactivos de interés incluyen miembros de unión específica etiquetada, enzimas, sustratos, oxidantes, etc., entre otros.

En algunas realizaciones, el reactivo(s) de la cámara de mezcla incluye un miembro de unión específico etiquetado. Un miembro de unión específica etiquetada puede incluir un dominio de unión específico y un dominio de etiqueta. Los términos "unión específica", "se une específicamente" y similares, se refieren a la unión preferencial de un dominio (p. ej., un miembro de pareja de unión al otro miembro de pareja de unión de la misma pareja de unión) respecto a otras moléculas o fracciones en una solución o mezcla de reacción. El dominio de unión específico puede unirse (p. ej., covalentemente o no covalentemente) a un epítipo específico de un analito de interés. En ciertos aspectos, el dominio de unión específico se une no covalentemente a un objetivo. En tales casos, la asociación de dominio de unión específico con el objetivo de unión (p. ej., marcador superficial celular) se puede caracterizar por un KD

(constante de disociación) de 10^{-5} M o menos, 10^{-6} M o menos, tal como 10^{-7} M o menos, que incluye 10^{-8} M o menos, p. ej., 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos, 10^{-14} M o menos, 10^{-15} M o menos, que incluye 10^{-16} M o menos.

5 Como ligandos de captura se puede emplear una variedad de diferentes tipos de dominios de unión específicos. Dominios de unión específicos de interés incluyen, pero no se limitan a ellos, agentes de unión a anticuerpos, proteínas, péptidos, haptenos, ácidos nucleicos, etc. El expresión "agente de unión a anticuerpo" como se emplea en esta memoria incluye anticuerpos o fragmentos policlónicos o monoclonales que son suficientes para unirse a un analito de interés. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser, por ejemplo, fragmentos Fab monoméricos, fragmentos Fab' monoméricos, o fragmentos F(ab)'2 dimericos. También dentro del alcance de la expresión "agente de unión a anticuerpo" están moléculas producidas por ingeniería de anticuerpos, tales como moléculas de anticuerpo de única cadena (scFv) o anticuerpos humanizados o quiméricos producidos de anticuerpos monoclonales por sustitución de las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras para producir anticuerpos quiméricos o sustitución de las regiones constantes y las partes de estructura de las regiones variables para producir anticuerpos humanizados.

15 El dominio de etiqueta puede ser detectable sobre la base de, por ejemplo, máxima emisión de fluorescencia, polarización de fluorescencia, tiempo de vida de fluorescencia, dispersión de luz, masa, masa molecular, o combinaciones de los mismos. En ciertos aspectos, el dominio de etiqueta puede ser un fluoroforo (es decir, una etiqueta fluorescente, tinte fluorescente, etc.). Se pueden seleccionar fluoroforos de cualquiera de los muchos tintes adecuados para uso en aplicaciones analíticas (p. ej., flujo citometría, obtención de imágenes, etc.). Un gran número de tintes están disponibles comercialmente de una variedad de fuentes, tales como, por ejemplo, Molecular Probes (Eugene, O) y Exciton (Dayton, OH). Ejemplos de fluoroforos que se pueden incorporar en las micropartículas incluyen, pero no se limitan a ellos, ácido disulfónico de 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'; acridina y derivados tales como acridina, acridina naranja, acridina amarilla, acridina roja, y isotiocianato de acridina; 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-ácido sulfónico (EDANS); 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato (Lucifer Yellow VS); N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; Brilliant Yellow; coumarina y derivados tales como coumarina, 7-amino-4-metilcoumarina (AMC, Coumarin 120), 7-amino-4-trifluorometilcoumarin (Coumaran 151); cianina y derivados tales como cianosina, Cy3, Cy5, Cy5.5, y Cy7; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5', 5"-dibromopirogallol-sulfoneftaleina (Bromopyrogallol Red); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina; dietilaminocoumarina; dietilenetriamina pentaacetato; 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-ácido disulfónico; 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-ácido disulfónico; 5-[dimetilamino]naftaleno-1-cloruro de sulfonilo (DNS, dansil cloruro); ácido benzoico 4-(4'-dimetilaminofenilazo) (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina y isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B y isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), clorotriazinil de fluoresceína, naftofluoresceína, y QFITC (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; Green Fluorescent Protein (GFP); Reef Coral Fluorescent Protein (RCFP); Lissamine™; Lissamine rodamina, Lucifer yellow; Malachite Green isotiocianato; 4-metilumbelliferona; orto cresolfaleina; nitrorosina; pararosanilina; Nile Red; Oregon Green; Phenol Red; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehido; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y succinimidil 1-pireno butirato; Reactive Red 4 (Cibacron™ Brilliant Red 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), 4,7-diclororodamina lissamina, rodamina B cloruro de sulfonilo, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforodamina B, sulforodamina 101, cloruro de sulfonilo derivado de sulforodamina 101 (Texas Red), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), tetrametil rodamina, y tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC); riboflavin; ácido rosólico y derivados de quelato de terbio; xanteno; o combinaciones de los mismos. También se pueden usar otros fluoroforos o combinaciones de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo los disponibles de Molecular Probes (Eugene, O) y Exciton (Dayton, OH). La etiqueta fluorescente puede ser distinguible sobre la base de máxima emisión de fluorescencia, y opcionalmente además sobre la base de dispersión o extinción de luz.

La cantidad de reactivo(s) presente(s) en la cámara de mezcla o dominio puede variar, p. ej., dependiendo del tipo particular de ensayo para el que se configura el dispositivo. En algunos casos, la cantidad de un reactivo es suficiente para permitir una concentración de reactivo en la muestra que sigue el flujo a través de la cámara de mezcla que va de 0,002 a 100, tal como de 0,02 a 10 e incluyendo de 0,2 a 1 microgramos/mL. Si bien el peso en seco de un reactivo presente en la cámara de mezcla puede variar, en algunos casos el peso en seco va de 0,01 a 500, tal como de 0,3 a 120 e incluyendo 3 a 12 ng.

En algunas realizaciones el microdispositivo fluido incluye un canal capilar separado de un canal de respiro por un empalme hidrófobo. Cuando está presente, el canal de respiro puede tener una variedad de configuraciones diferentes y se configura para acoplar la salida de respiradero con el extremo del canal capilar más lejos del lugar de aplicación de muestra en comunicación fluidica. El canal de respiro puede ser una estructura alargada, de manera que tiene una longitud que es más larga que su anchura. Si bien la relación de longitud a anchura puede variar, en algunos casos la relación de longitud a anchura va de 5 a 2000, tal como de 10 a 200 e incluye de 50 a 60. En algunos casos, la longitud del canal de respiro va de 5 a 200, tal como de 10 a 100 e incluye de 50 a 75 mm. En algunos casos, los canales de respiro tienen una dimensión de sección transversal más larga dimensionada en micrómetros, p. ej., una dimensión en sección transversal más larga (p. ej., diámetro en caso del canal tubular) que va de 0,1 a 10, tal como 0.5 a 5 e incluyendo 1 a 2 mm. En algunos casos la anchura del canal de respiro va de 0,1 a 10, tal como de 0,5 a 5 e incluyendo de 1 a 2 mm. En algunos casos la altura del canal va de 0,5 a 5, tal como de 0,2 a 2 e incluyendo de 0,5 a 1 mm. Si

bien la forma en sección transversal de los canales de respiro puede variar, en algunos casos, formas en sección transversal de los canales de respiro de interés incluyen, pero no se limitan a ellas: formas en sección transversal rectilínea, p. ej., cuadrados, rectángulos, trapecios, triángulos, hexágonos, etc., formas en sección transversal curvilínea, p. ej., círculos, óvalos, etc., así como formas irregulares, p. ej., una parte inferior parabólica acoplada a una parte superior plana, etc.

Como se ha revisado anteriormente, el canal capilar puede estar separado del canal de respiro por una región hidrófoba. Por región hidrófoba se entiende una región o dominio que es resistente a ser humedecida por agua, p. ej., repele medios acuosos. La región hidrófoba puede ser una que tenga energía superficial que sea menor que la energía superficial de las superficies del canal capilar. La magnitud de diferencia en energías de superficie puede variar, yendo en algunos casos de 5 a 500, tal como de 10 a 30 dinas/cm. La energía superficial del dominio hidrófobo también puede variar, yendo en algunos casos de 20 a 60, tal como de 30 a 45 dinas/cm, p. ej., medido usando el protocolo descrito en la norma ASTM D2578. Las dimensiones de la región hidrófoba se configuran para impedir al menos parcialmente si no completamente el flujo de líquido de la muestra que pasa la región hidrófoba. Si bien las dimensiones de la región pueden variar, en algunos casos la región hidrófoba tiene un área superficial que va de 0,5 a 50, tal como de 2 a 20 e incluyendo de 7 a 15 mm². La región hidrófoba se puede proporcionar usando cualquier planteamiento conveniente, p. ej., fabricando el dispositivo de un material hidrófobo adecuado en la región hidrófoba, tratando una superficie del dispositivo con un material hidrófobo, etc., p. ej., como se describe en mayor detalle más adelante.

En algunos casos, el dispositivo puede incluir un dominio de captura específico de analito. Un dominio de captura específico de analito es un dominio o región del canal capilar del que se puede leer un resultado durante el uso del dispositivo. El dominio de captura específico de analito se posiciona a alguna distancia aguas abajo del lugar de aplicación de muestra del dispositivo. Por "aguas abajo" se entiende la dirección en la que la muestra fluye por acción capilar, es decir, la dirección de flujo de fluido desde el lugar de aplicación de muestra. La distancia total que fluye el fluido entre la región de recepción de muestra y la región de detección puede variar, yendo en algunos casos de 2 a 500 cm, tal como de 10 a 100 cm e incluyendo de 20 a 50 cm.

El dominio de captura específico de analito es una región que incluye una cantidad de una sonda de captura, a la que también se le hace referencia en esta memoria como "sonda de captura de detección". Una sonda de captura de detección se inmoviliza en el dominio de captura específico de analito y específicamente se une a molécula objetivo de interés, p. ej., un analito, una molécula de control, etc. El tamaño de la región de sonda de captura de detección puede variar, y en algunos casos la región de sonda de captura puede tener un área que va de 0,01 a 0,5 cm², tales como 0,05 a 0,1 cm² e incluyendo 0,1 a 0,2 cm². Un dominio de captura específico de analito puede tener una variedad de configuraciones diferentes, donde la configuración puede ser aleatoria o la configuración puede tener una forma específica tal como una línea, círculo, cuadrado, o forma más compleja, tal como un "+", según se desee. Un dominio dado de captura específico de analito puede incluir una única sonda de captura o dos o más sondas de captura diferentes, donde cada una de las dos o más sondas de captura diferentes, donde cuando la región de detección incluye dos o más sondas de captura, las sondas de captura pueden ser distintas entre sí (es decir, unirse a moléculas objetivo diferentes), según se desee.

En algunas realizaciones se puede proporcionar un dominio de captura específico de analito que incluye partículas que muestran un miembro(s) de unión específico para una molécula(s) objetivo, p. ej., un analito(s) de interés, una molécula de control o referencia, etc. Por ejemplo, en algunas realizaciones el dispositivo puede incluir un dominio de captura específico de analito que comprende cuencas de captura inmovilizadas sobre una superficie conveniente, p. ej., la superficie superior, de un dominio del canal capilar, p. ej., una cámara capilar en el canal capilar, p. ej., como se describe en la solicitud PCT n.º de serie PCT/US2012/065683 presentada el 16 de noviembre de 2012. Las cuencas de captura pueden ser recubiertas con un reactivo de unión que se une específicamente a los analitos de interés. En algunas realizaciones, las cuencas de captura se recubren con un antígeno al que se une específicamente el anticuerpo de interés. En tales casos, se puede añadir un reactivo etiquetado fluorescentemente para detección que se une específicamente al analito, permitiendo la detección por sus emisiones de fluorescencia del analito capturado. Las cuencas de captura pueden ser inmovilizadas a un punto en la superficie superior de la cámara capilar a través de cualesquiera medios adecuados. En algunos casos, cuencas quedan localizadas en el punto por interacciones pasivas entre las cuencas y la superficie de cámara capilar, pero se puede usar unión covalente, según se desee.

Cuencas de captura recubiertas con diferentes antígenos se pueden localizar en diferentes puntos dentro de la cámara capilar para permitir la detección multiplexada de múltiples analitos. Como alternativa, cuencas de captura recubiertas con diferentes antígenos se pueden etiquetar distinguiblemente usando tintes fluorescentes que son distinguibles entre sí y de los reactivos de detección etiquetados con tinte que se usan para medir los analitos capturados. De esta manera, las cuencas pueden ser inmovilizadas en el mismo punto, pero distinguidas por sus emisiones fluorescentes. En otras realizaciones, se pueden disponer reactivos de etiquetado en un dominio de captura específico de analito dispuesto en el lugar de aplicación de muestra y puede fluir muestra etiquetada a una cámara de reacción en el canal capilar para detección.

En algunos casos, el dispositivo puede incluir un dominio de control de calidad en el canal capilar, p. ej., posicionado cerca del extremo del canal más alejado del lugar de aplicación de muestra. El canal de control de calidad puede variar, y, por ejemplo, puede incluir un miembro de captura, p. ej., anticuerpo, específico para un reactivo etiquetado,

etc., tal como se describe en mayor detalle más adelante, p. ej., para proporcionar una confirmación de que fluye muestra a través del dispositivo durante un ensayo dado.

5 En algunos casos, el dispositivo puede incluir uno o más identificadores, dichos identificadores pueden proporcionar información acerca del dispositivo, p. ej., el ensayo particular para el que está configurado, número de lote de fabricación, etc., dichos identificadores pueden ser identificadores únicos. Los identificadores pueden ser legibles por humano y/o por máquina, p. ej., pueden ser texto o un código de barras, según se desee.

10 Habiéndose descrito ahora generalmente aspectos de los dispositivos, ahora se revisan en gran detalle ciertas realizaciones de los dispositivos desde el punto de vista de las figuras. Haciendo referencia a la figura 1, se describe un dispositivo para realizar un ensayo de una muestra líquida. El dispositivo 100 puede comprender un canal capilar 10 formado de cualquier material rígido o semirrígido (p. ej. vidrio, polímero, cerámica, etc.). Se ilustra un capuchón 20 separado del dispositivo pero puede ser conectado por cualquier mecanismo tal como una bisagra o articulación. El capuchón 20 puede sellar un área 30 contra el ambiente en el que se ubica un lugar de aplicación de muestra 40. En algunos casos, el material de dispositivo y/o capuchón es flexible de modo entre el capuchón 20 y el material subyacente se puede formar una buena junta de sellado. Por supuesto, para el capuchón 20 puede ser posible usar un material rígido o semirrígido. Por ejemplo, para formar el capuchón 20 se puede usar vidrio o plástico. Opcionalmente se puede utilizar una empaquetadura u otra ayuda de sellado (no se muestra).

15 El lugar de aplicación de muestra 40 está en comunicación de fluidos con el canal capilar 10. El lugar de aplicación de muestra 40 puede comprender reactivos secados para etiquetar o reaccionar con la muestra conforme fluye a través del lugar de aplicación de muestra, que se puede asociar o no con una estructura de alta área superficial, p. ej., como se describe en mayor detalle anteriormente. Un canal de respiro 14 se puede conectar al canal capilar en cualquier punto a lo largo del canal capilar (p. ej., respiro extremo o respiro lateral). En algunas realizaciones el canal capilar 10 puede estar separado del canal de respiro 14 por una región de empalme hidrófobo 15. El empalme hidrófobo puede ser un área predeterminada de hidrofiliidad reducida respecto a la hidrofiliidad del canal capilar, p. ej., como se ha descrito anteriormente.

25 La hidrofiliidad del canal capilar y el empalme hidrófobo se pueden ajustar por medio de tratamiento con plasma de una primera área predeterminada del microdispositivo fluídico. El área predeterminada puede ser un área de surco o canal en un material plástico tal como un polímero de cicloolefina. Todo o parte del material o área de canal puede ser tratado con un campo de plasma para aumentar la hidrofiliidad del área tratada. Una región hidrófoba puede ser preparada por cualesquiera medios usados para disminuir la hidrofiliidad de una segunda área predeterminada del material de microdispositivo fluídico respecto al área de canal. La primera y segunda áreas predeterminadas se pueden superponer.

30 En algunos casos, la región hidrófoba se produce por medio de aplicación de un solvente adecuado. Por ejemplo, la región hidrófoba se puede formar por aplicación de cualquier solvente que pueda provocar licuefacción o hinchamiento temporales del material de microdispositivo fluídico. La región hidrófoba se forma por aplicación de solución que comprende un solvente orgánico no polar, tal como hexano, heptano, pentano y cloroformo, o cualquier combinación de dos o más de tales solventes, a una segunda área predeterminada del material plástico (p. ej., polímero de cicloolefina) durante un periodo de tiempo suficiente para producir la hidrofobicidad deseada en la región. Se puede usar un solvente polar para reducir la hidrofiliidad de una segunda área predeterminada del microdispositivo fluídico. La segunda área predeterminada se puede superponer a la primera área predeterminada. El solvente posteriormente se puede evaporar del área, dejando una región de hidrofiliidad reducida. El canal capilar y el empalme hidrófobo pueden ser creados aplicando una cubierta sellada al surco o área de canal. El empalme hidrófobo puede proporcionar un impedimento al flujo de líquido en el canal capilar entre el canal capilar y la salida de respiradero o canal de respiro.

35 Como se ha revisado anteriormente, en algunas realizaciones el microdispositivo fluídico puede comprender reactivos para reacción con la muestra. Esos reactivos se pueden ubicar en áreas predeterminadas del dispositivo, este tipo de cámara de mezcla (no se muestra) o el lugar de aplicación de muestra 40 o a lo largo del canal capilar 10. El canal capilar 10 puede comprender una pared ópticamente trasmisora 13 o pared(es) (p. ej., parte superior y parte inferior) para la detección de (y/o irradiación de) analitos en una muestra. El canal capilar se puede conectar a un canal de respiro 14 o salida de respiradero 60 ubicada en el área 40 que está cubierta por el capuchón 30. El lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero pueden ser cubiertos por el capuchón y por lo tanto aislarse del ambiente en un espacio compartido. El espacio compartido puede permitir un volumen aislado compartido con la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra. Las dos aberturas pueden protegerse contra comunicación de líquido entre sí por cualesquiera medios, tales como un canto elevado 70 o fosa (no se muestra) que separan el lugar de aplicación de muestra de la salida de respiradero. Si se proporciona un canto elevado, la altura que puede subir puede variar, en algunos casos yendo de 0,2 a 5, tal como de 0,5 a 1,5 mm. Si se proporciona una fosa o depresión, la profundidad de dicha estructura puede variar, en algunos casos yendo de 0,2 a 5, tal como de 0,5 a 1,5 mm.

45 El capuchón sella el lugar de aplicación y la salida de respiradero contra el ambiente exterior dentro de un espacio de aire compartido, al tiempo que no impacta negativamente al flujo adentro del canal capilar. El capuchón puede tener juntas de sellado u otras partes flexibles que pueden provocar que se cambie el volumen y presión del aire dentro del capuchón y canal de respiro. Cambios en la presión de aire dentro del espacio de aire compartido debidos a cambios de temperatura durante la incubación y detección del dispositivo se aplican igualmente a la parte delantera y posterior

de la columna de líquido en el microdispositivo fluídico y por lo tanto no dan como resultado sustancial movimiento de fluido. Una vez saturado con vapor de agua de la muestra, el volumen de espacio de aire compartido no permite más evaporación derivada ya sea del lugar de aplicación de muestra o la salida de respiradero.

5 Microdispositivos fluídicos de biodiagnóstico que se llenan a través de acción capilar lo hacen porque las superficies de flujo son hidrófilas, y el humedecimiento de las superficies es energéticamente favorable. Tales dispositivos se pueden configurar para que la muestra que viene desplace el gas, p. ej., aire, residente en el dispositivo. Es deseable que tanto la muestra aplicada así como el aire respirado sean contenidos dentro del cartucho a fin de proteger a los usuarios de material potencialmente biopeligroso. También es deseable que la muestra dentro del dispositivo no se evapore apreciablemente, lo que puede cambiar el ratio de componentes de muestra. Se puede usar un capuchón para sellar el material de muestra dentro del dispositivo después de que se haya suministrado la muestra. Como algunos dispositivos se pueden llenar en un periodo de minutos, también es deseable que el usuario pueda asegurar el capuchón sobre el dispositivo después de que la muestra haya sido aplicada pero antes de que la muestra haya rellenado completamente el canal capilar. Si no se proporcionan medios para impedirlo de otro modo, se impedirá el flujo de líquido por vacío creado en el lugar de aplicación tapado conforme el líquido entra al capilar, pero el capuchón impide que entre aire al lugar de aplicación. La solución se encuentra terminando la salida de respiradero del microcanal fluídico en un espacio de aire que está tanto sellado del exterior como compartido con el área de aplicación de muestra. De esta manera, independientemente de si el capuchón se coloca antes o después de que el flujo de líquido esté completo, la presión de aire es la misma delante y detrás de la columna de líquido en el canal capilar. El volumen de aire desplazado a través de la salida de respiradero por el líquido que llena el canal sustituye el volumen de líquido que deja el lugar de aplicación de muestra. Incluso si el aire dentro del capuchón se presuriza ligeramente durante la compresión de la empaquetadura de capuchón sobre su superficie de sellado, el aumento en la presión delante y detrás de la columna de líquido permanece constante por lo que no se impacta en la fuerza de impulsión para el flujo al canal capilar. Adicionalmente, en cualquier punto durante la incubación (minutos a horas) o lectura del dispositivo, si cambia la temperatura del dispositivo, la presión dentro del capuchón puede cambiar, pero tales cambios no provocarán movimiento del fluido en el canal dado que la presión es la misma en ambas partes delantera y posterior de la columna de líquido.

En el dispositivo se puede utilizar cualquier combinación de las siguientes características. Por ejemplo el canal capilar o el lugar de aplicación de muestra pueden incluir una cámara de mezcla donde se pueden ubicar reactivos secos, p. ej., conservados. Las dimensiones del canal capilar pueden impactar en la obtención de imágenes y el flujo de muestra en el canal. El canal puede ser entre 2 y 10 mm de ancho, tal como entre 3 y 5 mm o entre 3 y 4 mm de ancho. El canal capilar puede tener entre 1 y 1000 micrómetros de profundo, tal como entre 20 y 60 micrómetros de profundo o entre 40 y 60 micrómetros de profundo. Profundidades menores de 60 micrómetros de profundo pueden permitir beneficiosamente la obtención de imágenes de glóbulos blancos en una muestra de sangre completa al minimizar los efectos de obstaculización de los glóbulos rojos. El canal capilar puede ser de cualquier longitud que permita flujo capilar a lo largo de un canal. El canal capilar puede tener entre 10 y 100 mm de largo.

El dispositivo es adecuado para que ensayos detecten analitos, tales como anticuerpos, en una muestra que comprende un fluido biológico, tales como orina, saliva, sangre, p. ej., sangre completa. El dispositivo puede comprender un dominio de captura específico de analito que comprende cuencas de captura inmovilizadas en la superficie superior de una cámara capilar en el canal capilar, p. ej., como se describe en la solicitud PCT n.º de serie PCT/US2012/065683 presentada el 16 de noviembre de 2012. Las cuencas de captura pueden ser recubiertas con un reactivo de unión que se une específicamente a los analitos de interés. Las cuencas de captura pueden ser recubiertas con un antígeno al que se une específicamente el anticuerpo de interés. Se añade un reactivo etiquetado fluorescentemente para detección que se une específicamente al analito, permitiendo la detección por sus emisiones de fluorescencia del analito capturado. Las cuencas de captura pueden ser inmovilizadas a un punto en la superficie superior de la cámara capilar a través de cualesquiera medios adecuados. En algunos casos, cuencas quedan localizadas en el punto por interacciones pasivas entre las cuencas y la superficie de cámara capilar, pero se puede usar unión covalente.

Cuencas de captura recubiertas con diferentes antígenos se pueden localizar en diferentes puntos dentro de la cámara capilar para permitir la detección multiplexada de múltiples analitos. Como alternativa, cuencas de captura recubiertas con diferentes antígenos se pueden etiquetar distinguiblemente usando tintes fluorescentes que son distinguibles entre sí y de los reactivos de detección etiquetados con tinte que se usan para medir los analitos capturados. De esta manera, las cuencas pueden ser inmovilizadas en el mismo punto, pero distinguidas por sus emisiones fluorescentes. Se pueden disponer reactivos de etiquetado en un dominio de captura específico de analito dispuesto en el lugar de aplicación de muestra y puede fluir muestra etiquetada a una cámara de reacción en el canal capilar para detección.

55 La fluorescencia de los analitos capturados se puede medir usando un sistema barato digital de obtención de imágenes/procesamiento de imágenes. Sistemas y métodos adecuados para obtención de imágenes de muestras en canales capilares se describen la patente de EE. UU. 8.248.597 expedida el 21 de agosto de 2012 y la solicitud de patente de EE. UU. 13/590.114 presentada el 20 de agosto de 2012. Convertidores de imágenes adecuados se describen en las patentes de EE. UU. 7.927.561, y 7.738.094.

60 Las micropartículas se pueden disponer en la superficie superior del canal capilar. Durante el tiempo de incubación típico para inmunoensayos (p. ej. entre 2 y 60 minutos tales como entre 10 y 30 minutos), glóbulos rojos en sangre

completa se posarán en la parte inferior, dejando un plasma más claro en la parte superior. Al colocar las micropartículas en la superficie superior del canal, se elimina la potencial interferencia de la detección de fluorescencia de glóbulos rojos, permitiendo un simple ensayo para sangre completa sin separación.

5 La presente invención se usa para detectar concentraciones serológicas de anticuerpos humanos en volúmenes de pinchazo de dedo (5-50 pL) de sangre completa en un formato no lavado, p. ej., como se describe más adelante en el sección Experimental.

Métodos

10 Aspectos de los métodos incluyen aplicar una muestra a un lugar de aplicación y permitir que la muestra (p. ej., una muestra biológica, tal como sangre o producto sanguíneo que comprende un analito) fluya a través de un canal capilar, seguido por detección de uno o más analitos objetivo en la muestra.

15 Como tal, los métodos pueden incluir proporcionar un lugar de aplicación de muestra que contactado por la muestra de un dispositivo de prueba de la invención. Un "lugar de aplicación de muestra contactado por muestra" es un lugar de aplicación de muestra que ha recibido el contacto de una muestra. Al poner en práctica métodos de la invención, se proporciona un lugar de aplicación de muestra contactado por muestra aplicando una muestra al lugar de aplicación de muestra del dispositivo. La cantidad de muestra que se aplica al lugar de aplicación de muestra puede variar, siempre que sea suficiente para permitir el flujo capilar deseado y la funcionalidad del ensayo. La muestra puede ser aplicada al lugar de aplicación de muestra usando cualquier protocolo conveniente, p. ej., por medio de cuentagotas, pipeta, jeringa y similares. Además de proporcionar un lugar de aplicación de muestra contactado por muestra, los métodos pueden incluir además aplicar una cantidad de un líquido adecuado, p. ej., tampón, para permitir flujo de fluido adecuado a través del miembro esponjoso. Se puede emplear cualquier líquido adecuado, incluidos pero sin limitación tampones, medios de cultivo celular (p. ej., DMEM), etc. Tampones incluyen, pero no se limitan a ellos: tris, tricina, MOPS, HEPES, PIPES, MES, PBS, TBS, y similares. Cuando se desee, puede haber presentes detergentes en el líquido, p. ej., detergentes NP-40, TWEEN™ o TritonX100.

25 El lugar de aplicación de muestra contactado por muestra se puede proporcionar combinando la muestra con uno o más componentes de ensayo (p. ej., un reactivo, un tampón, y similares) antes de aplicar la muestra que tiene el componente(s) de ensayo al lugar de aplicación de muestra. Cuando la muestra se combina con uno o más componentes de ensayo antes de la aplicación de la muestra que tiene el componente(s) de ensayo al lugar de aplicación de muestra, la combinación se puede lograr usando cualquier protocolo conveniente. La cantidad de un componente(s) de ensayo, cuando se combina con la muestra, puede variar según se desee. El lugar de aplicación de muestra contactado por muestra se puede proporcionar aplicando uno o más componentes de ensayo (p. ej., como se ha descrito anteriormente) al lugar de aplicación de recepción de muestra antes de aplicar la muestra al lugar de aplicación de muestra. El lugar de aplicación de muestra contactado por muestra se puede proporcionar aplicando la muestra al lugar de aplicación de muestra antes de aplicar uno o más componentes de ensayo (p. ej., como se ha descrito anteriormente) al lugar de aplicación de muestra. Como se ha mencionado anteriormente, el dispositivo puede incluir uno o más componentes de ensayo (p. ej., reactivo, tales como se ha descrito anteriormente). En tales casos, el lugar de aplicación de muestra contactado por muestra se proporciona aplicando la muestra al lugar de aplicación de muestra, p. ej., sin combinación previa con uno o más componentes de ensayo.

40 Tras la aplicación de muestra, se permite que la muestra fluya a través del canal capilar, y entonces se lee o evalúa una o más partes del canal, p. ej., la región de detección, que incluye el canal entero, para determinar si el analito(s) de interés está presente en la muestra. El canal o una o más partes del mismo puede ser leído tras un periodo de tiempo predeterminado tras la aplicación de muestra, donde este periodo de tiempo puede ir de 10 s. a 1 hora, tales como de 30 s. a 30 min., p. ej., de 30 s. a 10 min., incluido de 30 s. a 1 min.

45 El canal capilar o una o más partes del mismo puede ser leído usando un protocolo que depende de la naturaleza del ensayo y analito a detectar. Por ejemplo, se pueden detectar radioetiquetas usando película fotográfica o contadores de destellos, se pueden detectar marcadores fluorescentes usando uno o más iluminadores, p. ej., láseres, ledes, y uno o más fotodetectores, p. ej., PMT, CCD, para detectar luz emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan típicamente proporcionando la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima en el sustrato, las etiquetas metálicas se pueden detectar simplemente visualizando la etiqueta coloreada o se pueden detectar usando equipos de laboratorio que puedan detectar metal, y las etiquetas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada. En consecuencia, en esos casos donde la etiqueta empleada es una etiqueta fluorescente, el método puede incluir irradiar la muestra en el canal capilar o una parte del mismo con luz de una longitud de onda adecuada para excitar la etiqueta y entonces detectar luz emitida desde la etiqueta fluorescente, p. ej., a través de la ventana de visualización de un alojamiento del dispositivo. Como tal, una etapa subsiguiente en métodos de la invención puede incluir leer una región de detección del canal capilar del dispositivo para determinar si el analito está presente en la muestra.

55 Como se ha indicado anteriormente, métodos de la invención pueden incluir una etapa de colocar el dispositivo cargado con muestra en un lector adecuado y obtener un resultado de ensayo del lector. Por ejemplo, la fluorescencia de los analitos capturados se puede medir usando un sistema barato digital de obtención de imágenes/procesamiento de imágenes. Sistemas y métodos adecuados para obtención de imágenes de muestras en canales capilares se

describen la patente de EE. UU. 8.248.597 expedida el 21 de agosto de 2012 y la solicitud de patente de EE. UU. 13/590.114 presentada el 20 de agosto de 2012. Convertidores de imágenes adecuados se describen en las patentes de EE. UU. 7.927.561, y 7.738.094.

5 El método puede determinar si un analito está presente en la muestra en una cantidad que cumple o supera un umbral predeterminado. Como tal, cuando la cantidad de analitos de interés en la muestra sobrepasa un umbral particular (también se le hace referencia como un "umbral predeterminado"), la señal en la región de detección (resultante de la unión del competidor para capturar sonda en la región de detección) es detectable. El umbral o umbral predeterminado puede ser determinado por múltiples factores ponderados diferencialmente (p. ej., el número de sondas de captura en la región de recepción de muestra que se unen al analito, la afinidad de unión del sonda de captura para el analito, y
10 similares).

Utilidad

Los métodos, dispositivos, y kits de la invención encontrarán uso en una variedad de diferentes aplicaciones y se pueden usar para determinar si un analito está presente en una multitud de diferentes tipos de muestra de una multitud de fuentes posibles. Dependiendo de la aplicación y el resultado deseado de los métodos descritos en esta memoria, un analito puede ser detectado de una manera cualitativa ("presente" vs "ausente"; "sí, por encima de un umbral predeterminado" vs "no, no por encima de un umbral predeterminado"; etc.) o una manera cuantitativa, p. ej., como
15 cantidad en una muestra (tal como concentración en la muestra). Muchos tipos diferentes de analito pueden ser analitos de interés, incluidos pero sin limitación: proteínas (incluidos ambos proteínas libres y proteínas unidas a la superficie de una estructura, tal como un celda), ácidos nucleicos, partículas virales, y similares. Además, las muestras pueden ser fuentes in vitro o in vivo, y las muestras pueden ser muestras de diagnóstico.

Al poner en práctica métodos de la invención, las muestras se pueden obtener de fuentes in vitro (p. ej., extraer de un cultivo celular que crece en laboratorio) o de fuentes in vivo (p. ej., un sujeto mamífero, un sujeto humano, un animal en investigación, etc.). La muestra se puede obtener de una fuente in vitro. Fuentes in vitro incluyen, pero no se limitan a ellas, cultivos celulares procariotes (p. ej., bacteriano), cultivos celulares eucariotes (p. ej., mamífero, fúngico) (p. ej., cultivos de líneas celulares establecidas, cultivos de líneas celulares conocidas o adquiridas, cultivos de líneas celulares inmortalizadas, cultivos de células primarias, cultivos de levadura de laboratorio, etc.), cultivos de tejido, eluyentes de cromatografía en columna, lisados/extractos celulares (p. ej., lisados/extractos que contienen proteínas, lisados/extractos que contienen ácido nucleico, etc.), sobrenadantes de paquete viral, y similares. La muestra se puede obtener de una fuente in vivo. Fuentes in vivo incluyen organismos multicelulares vivos y pueden producir muestras de diagnóstico.
25
30

El analito puede ser un analito de diagnóstico. Un "analito de diagnóstico" es un analito de una muestra que ha sido obtenido o derivado de un organismo multicelular vivo, p. ej., mamífero, a fin de hacer una diagnosis. En otras palabras, la muestra ha sido obtenida para determinar la presencia de uno o más analitos de enfermedad a fin de diagnosticar una enfermedad o condición. En consecuencia, los métodos son métodos de diagnóstico. Como los métodos son "métodos de diagnóstico", son métodos que diagnostican (es decir, determinan la presencia o ausencia) una enfermedad (p. ej., náusea, diabetes, etc.) o condición (p. ej., embarazo) en un organismo vivo, tal como un mamífero (p. ej., un humano). Como tal, ciertas realizaciones de la presente descripción son métodos que se emplean para determinar si un sujeto vivo tiene una enfermedad o condición dadas (p. ej., diabetes). Los "Métodos de diagnóstico" también incluyen métodos que determinan la gravedad o estado de una enfermedad o condición dadas.
35

Los métodos están relacionados con métodos para determinar si un analito está presente en una muestra de diagnóstico, y como tal están relacionados con métodos que son métodos para evaluar una muestra en la que los analitos de interés pueden estar presentes o no. En algunos casos, se desconoce si el analito está presente en la muestra antes de realizar el ensayo. En otros casos, antes de realizar el ensayo, se desconoce si el analito está presente en la muestra en una cantidad que es mayor que (supera) una cantidad de umbral predeterminado. En tales casos, los métodos son métodos para evaluar una muestra en la que los analitos de interés pueden estar presentes o no en una cantidad que es mayor que (supera) un umbral predeterminado.
40
45

Muestras de diagnóstico incluyen las obtenidas de fuentes in vivo (p. ej., un sujeto mamífero, un sujeto humano, y similares.) y pueden incluir muestras obtenidas de tejidos o células de un sujeto (p. ej., biopsias, muestras de tejido, sangre completa, sangre fraccionada, pelo, piel, y similares). En algunos casos, células, fluidos, o tejidos derivados de un sujeto se cultivan, almacenan o manipulan antes de la evaluación y este tipo de muestra se puede considerar una muestra de diagnóstico si los resultados se usan para determinar la presencia, ausencia, estado o gravedad de una enfermedad (p. ej., náusea, diabetes, etc.) o condición (p. ej., embarazo) en un organismo vivo.
50

En algunos casos, una muestra de diagnóstico es una muestra de tejido (p. ej., sangre completa, sangre fraccionada, plasma, suero, saliva, y similares) o se obtiene de una muestra de tejido (p. ej., sangre completa, sangre fraccionada, plasma, suero, saliva, piel, pelo, y similares). Un ejemplo de una muestra de diagnóstico incluye, aunque sin limitarse a estos cultivos celulares y tisulares derivados de un sujeto (y derivados del mismo, tales como sobrenadantes, lisados, y similares); muestras de tejidos y fluidos corporales; muestras no celulares (p. ej., eluyentes de columna; biomoléculas acelulares tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos; mezclas de reacción de síntesis; mezclas de reacción de amplificación de ácido nucleico; soluciones de ensayo o reacciones enzimáticas y bioquímicas in vitro; o
55

productos de otras reacciones in vitro e in vivo, etc.); etc.

5 Los métodos de asunto se pueden emplear con muestras de una variedad de tipos diferentes de sujetos. En algunas realizaciones, una muestra es de un sujeto dentro de la clase mamíferos, incluidos p. ej., el orden carnívoro (p. ej. perros y gatos), roedores (p. ej., ratón, cerdos guineanos y ratas), lagomorfos (p. ej., conejos) y primates (p. ej., humanos, chimpancés y monos), y similares. En ciertas realizaciones, los animales o anfitriones, es decir, sujetos, son humanos.

Kits

10 Aspectos de la invención incluyen además kits, donde los kits incluyen uno o más dispositivos de ensayo, p. ej., como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, los kits pueden incluir uno o más componentes de ensayo (p. ej., reactivos etiquetados, tampones, etc., tales como se ha descrito anteriormente). En algunos casos, los kits pueden incluir además un dispositivo de recogida de muestras, p. ej., una lanza o aguja configuradas para pinchar la piel para obtener una muestra de sangre completa, una pipeta, etc., según se desee.

15 Los diversos componentes de ensayo de los kits pueden estar presentes en recipientes separados, o algunos o todos ellos pueden ser precombinados en una mezcla de reactivo. Por ejemplo, en algunos casos, uno o más componentes del kit, p. ej., el dispositivo, están presentes en un saquito sellado, p. ej., un saquito o sobre de lámina estéril.

20 Además de los componentes anteriores, los kits de asunto pueden incluir además (en ciertas realizaciones) instrucciones para practicar los métodos de asunto. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits de asunto en una variedad de formas, una o más de las cuales puede estar presente en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., un pedazo o pedazos de papel en lo que se imprime el información, en el paquete del kit, en un inserto de envase, y similares. Incluso otra forma de estas instrucciones es un medio legible por ordenador, p. ej., disquete, disco compacto (CD), unidad flash portátil, y similares, en los que se ha grabado la información. Incluso otra forma de estas instrucciones que puede estar presente es una dirección de página web que puede ser usada por medio de internet para acceder a la información en un lugar retirado.

25 Lo siguiente se ofrece a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Experimental

I. Ensayo de superficie celular CD4/Hb

30 La figura 2A proporciona una representación de un dispositivo según una realización de la invención que se configura para realizar un ensayo de CD4 y hemoglobina (Hb). El ensayo se realiza esencialmente de la siguiente manera. Una cantidad de pinchado en dedo (5-50 pL) de sangre completa se carga en un lugar de aplicación de muestra de un dispositivo capilar de esta invención (mostrado en la figura 2A) donde se mezcla con anti-CD4 humano precargado, conservado seco, etiquetado con una etiqueta fluorescente adecuada, tal como alofocianina o ficoeritrina, y posteriormente fluye a un canal capilar. Una vez cargado, se coloca un capuchón sobre el lugar de aplicación de muestra, sellando el lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero del canal capilar. El flujo capilar procede a lo largo del canal, sin impedimento del capuchón que sella el capilar contra el ambiente exterior. El flujo termina en un empalme hidrófobo. El anti-CD4 etiquetado se une a células que tienen CD4 superficial. Se realiza detección usando un led apropiado para iluminar el cartucho en una o más ubicaciones a lo largo del canal, y se mide la fluorescencia por obtención de imágenes a través de la parte superior del cartucho usando un dispositivo adecuado de obtención de imágenes, tal como un microscopio de baja potencia con un detector de cámara CCD y un filtro apropiado a través del pared ópticamente transmisora del canal capilar. La intensidad de fluorescencia de células en el canal puede ser cuantificada tras procesamiento y análisis de imágenes, según se desee.

45 Para el ensayo de hemoglobina, se puede realizar cualquier protocolo conveniente, incluido un protocolo libre de reactivo, p. ej., como se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs. 8.483.789; 7.952.692; 7.319.894; 7.303.922; 7.271.912; 7.096.124; 7.075.628; 6.862.534; 6.831.733; y 5.773.301; y similares. También puede haber presente una región en el extremo del microcanal para cuencas de reactivo inmovilizadas de control de calidad (QC), que se recubren con una cantidad conocida de CD4 que se une con el reactivo de anticuerpo etiquetado. Una señal positiva detectada en esta región confirma que reactivo y muestra fluyeron a través del canal capilar al empalme hidrófobo, y por lo tanto que el ensayo se comportó apropiadamente.

II. Ensayo Anti-gp41

50 El ensayo se realiza esencialmente de la siguiente manera. Una cantidad de pinchazo en dedo (5-50 pL) de sangre completa se carga en un lugar de aplicación de muestra de un dispositivo capilar de esta invención (mostrado en la figura 2B) donde se mezcla con anti-alofocianina (APC) humana de anticuerpo precargada, conservada en seco, y posteriormente fluye a un canal capilar, que contiene micropartículas recubiertas con antígeno gp41 (usando VIH como ejemplo) inmovilizadas sobre la superficie superior del canal. Una vez cargado, se coloca un capuchón sobre el lugar de aplicación de muestra, sellando el lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero del canal capilar. El flujo capilar procede a lo largo del canal, sin impedimento del capuchón que sella el capilar contra el ambiente exterior.

El flujo termina en un empalme hidrófobo. El anticuerpo anti-gp41 presente en la muestra se unirá a la micropartícula, dando como resultado la formación de complejos cuenca-gp41/anticuerpo/APC-anti-anticuerpo humano. Se realiza detección usando un led rojo para iluminar el cartucho donde se ubica el punto de las cuencas, y se mide la fluorescencia por obtención de imágenes a través de la parte superior del cartucho usando un microscopio de baja potencia con un detector de cámara CCD y un filtro apropiado a través del pared ópticamente transmisora del canal capilar. La intensidad de fluorescencia en las micropartículas se cuantifica tras procesamiento y análisis de imágenes. Para ensayos multiplexados, micropartículas recubiertas con diferentes antígenos asociados con enfermedad se fijan en ubicaciones únicas en el cartucho. También se muestra una región en el extremo del microcanal para cuencas de reactivo inmovilizadas de control de calidad (QC, del inglés *quality control*), que son recubiertas con anticuerpo humano que se unen con el APC-anti-reactivo de anticuerpo humano. Una señal positiva detectada en esta región confirma que reactivo y muestra fluyeron a través del canal capilar al empalme hidrófobo, y por lo tanto que el ensayo se comportó apropiadamente.

A pesar de las cláusulas adjuntas, la descripción también está definida por las siguientes cláusulas:

1. Un microdispositivo fluido configurado para realizar un ensayo de una muestra líquida, el dispositivo comprende:

un lugar de aplicación de muestra en comunicación con un canal capilar;

una salida de respiradero en comunicación con el canal capilar; y

un elemento de capuchón configurado para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra contra un ambiente exterior, en donde el elemento de capuchón permite un volumen sellado sobre el lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero separado del ambiente exterior.

2. El dispositivo según la cláusula 1, que comprende además un canal de respiro entre la salida de respiradero y el canal capilar.

3. El dispositivo según las cláusulas 1 o 2, que comprende además una barrera de líquido que rodea el lugar de aplicación, en donde la barrera de líquido se dispone entre el lugar de aplicación y la salida de respiradero.

4. El dispositivo según la cláusula 3, en donde la barrera de líquido comprende un canto elevado que rodea el lugar de aplicación.

5. El dispositivo según la cláusula 3, en donde la barrera de líquido comprende una depresión que rodea el lugar de aplicación.

6. El dispositivo según las cláusulas 1 a 5, en donde el elemento de capuchón comprende una empaquetadura.

7. El dispositivo según las cláusulas 1 a 6, en donde el canal capilar tiene entre 20 y 70 micrómetros de profundo.

8. Un microdispositivo fluido configurado para realizar un ensayo de una muestra líquida, el dispositivo comprende:

un lugar de aplicación de muestra y un empalme hidrófobo en comunicación con un canal capilar, en donde el empalme hidrófobo se configura para impedir flujo de líquido;

una salida de respiradero en comunicación con el empalme hidrófobo; y

un elemento de capuchón configurado para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra contra un ambiente exterior, en donde el elemento de capuchón cubre un volumen compartido alrededor del lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero.

9. El dispositivo según la cláusula 8, en donde el empalme hidrófobo comprende un área tratada con hexano del microdispositivo fluido.

10. Un método para realizar un ensayo de una muestra líquida, el método comprende:

aplicar una muestra líquida a un lugar de aplicación de muestra en comunicación de fluidos con un canal capilar en donde la muestra líquida fluye por medio de una fuerza de acción capilar a través del canal capilar;

proporcionar respiro para la fuerza de acción capilar a través de una salida de respiradero; y

sellar la muestra líquida contra el ambiente exterior con un elemento de capuchón, en donde el elemento de capuchón proporciona un volumen sellado compartido alrededor del lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero.

11. El método según la cláusula 10, en donde el dispositivo comprende además una barrera de líquido que rodea el lugar de aplicación y la barrera de líquido se dispone entre el lugar de aplicación y la salida de respiradero.

12. El método según la cláusula 11, en donde la barrera de líquido comprende un canto elevado que rodea el lugar de aplicación.
13. El método según la cláusula 11, en donde la barrera de líquido comprende una depresión que rodea el lugar de aplicación.
- 5 14. El método según las cláusulas 10 a 13, en donde el elemento de capuchón comprende una empaquetadura.
15. El método según las cláusulas 10 a 13, en donde la profundidad del canal capilar tiene entre 20 y 50 micrómetros de profundo.
16. El método según cualquiera de las cláusulas 10 a 15, en donde el método comprende además leer al menos una parte del canal capilar para obtener un resultado.
- 10 17. El método según la cláusula 16, en donde el método comprende además hacer una diagnosis basada en el resultado obtenido.
18. Un método para formar un microdispositivo fluídico, el método comprende:
- tratar una primera área predeterminada en un material plástico con plasma, en donde el tratamiento con plasma aumenta la hidrofiliidad de la primera área predeterminada;
- 15 contactar una segunda área predeterminada con un solvente orgánico no polar, en donde el tratamiento reduce la hidrofiliidad de la segunda área predeterminada y en donde la primera y segunda área predeterminada se pueden superponer; y
- formar un canal capilar y un empalme hidrófobo desde la primera y segunda área predeterminada.
19. El método según la cláusula 18, en donde el microdispositivo fluídico de plástico contiene un polímero de cicloolefina y el solvente orgánico comprende un solvente orgánico no polar.
- 20 20. El método de las cláusulas 18 o 19 en donde formar un canal capilar y un empalme hidrófobo comprende conectar una cubierta a la primera y segunda áreas predeterminadas para formar un canal capilar y un empalme hidrófobo.
21. El método según la cláusula 20, en donde el solvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en solventes orgánicos no polares que incluyen hexano, heptano, pentano y cloroformo y combinaciones de los mismos.
- 25 22. El método según la cláusula 21, en donde el solvente orgánico es hexano.
23. Un microdispositivo fluídico configurado para realizar un ensayo de una muestra líquida, el dispositivo comprende:
- un lugar de aplicación de muestra en comunicación con un canal capilar;
- una salida de respiradero en comunicación con el canal capilar;
- 30 un elemento de capuchón configurado para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra contra un ambiente exterior, en donde el elemento de capuchón permite un volumen sellado sobre el lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero separado del ambiente exterior; y
- una cantidad de una muestra biológica presente en el dispositivo.
24. El dispositivo según la cláusula 23, en donde la muestra biológica es sangre completa.
- 35 25. Un sistema que comprende:
- (a) un lector; y
- (b) un microdispositivo fluídico configurado para realizar un ensayo de una muestra líquida y cargado en el lector, el dispositivo comprende:
- un lugar de aplicación de muestra en comunicación con un canal capilar;
- 40 una salida de respiradero en comunicación con el canal capilar; y
- un elemento de capuchón configurado para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra contra un ambiente exterior, en donde el elemento de capuchón permite un volumen sellado sobre el lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero separado del ambiente exterior.
26. El sistema según la cláusula 25, en donde el lector comprende un iluminador y un detector.

27. Un kit que comprende:

(a) un microdispositivo fluidoico que comprende:

un lugar de aplicación de muestra en comunicación con un canal capilar;

una salida de respiradero en comunicación con el canal capilar; y

5 un elemento de capuchón configurado para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra contra un ambiente exterior, en donde el elemento de capuchón permite un volumen sellado sobre el lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero separado del ambiente exterior; y

(b) un recipiente que aloja el dispositivo.

28. El kit según la cláusula 27, en donde el recipiente comprende un saquito.

10 Aunque la invención precedente se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo por motivos de claridad y entendimiento, para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención será fácilmente evidente que a la misma se le pueden hacer ciertos cambios y modificaciones sin salir del espíritu y el alcance de las reivindicaciones anexas.

15 Por consiguiente, lo anterior meramente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica podrán idear diversas disposiciones que, aunque no explícitamente descritas o mostradas en esta memoria, plasman los principios de la invención y se incluyen dentro de su espíritu y alcance. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional citado en esta memoria pretenden principalmente ayudar al lector a entender los principios de la invención y los conceptos contribuidos por los inventores para impulsar la técnica, y se han de interpretar como sin limitación a tales ejemplos y condiciones citados específicamente. Además, todas las declaraciones en esta memoria que
20 citan principios, aspectos, y realizaciones de la invención así como ejemplos específicos de la misma, pretenden abarcar equivalentes estructurales y funcionales de la misma. Adicionalmente, se pretende que tales equivalentes incluyan tanto equivalentes conocidos actualmente como equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, elementos desarrollados que realizan la misma función, independientemente de estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende estar limitado a las realizaciones ejemplares mostradas y descritas en esta memoria. En
25 cambio, el alcance de presente invención es plasmado por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un microdispositivo fluídico configurado para realizar un ensayo de una muestra líquida, el dispositivo comprende:
- un lugar de aplicación de muestra en comunicación con un canal capilar;
- 5 una salida de respiradero en comunicación con el canal capilar; y
- un elemento de capuchón configurado para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra contra un ambiente exterior, en donde el elemento de capuchón permite un volumen sellado sobre el lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero separado del ambiente exterior.
2. El dispositivo según la reivindicación 1, que comprende además un canal de respiro entre la salida de respiradero y el canal capilar.
- 10 3. El dispositivo según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además una barrera de líquido que rodea el lugar de aplicación, en donde la barrera de líquido se dispone entre el lugar de aplicación y la salida de respiradero.
4. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el elemento de capuchón comprende una empaquetadura.
- 15 5. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el canal capilar tiene entre 20 y 70 micrómetros de profundo.
6. Un microdispositivo fluídico configurado para realizar un ensayo de una muestra líquida, el dispositivo comprende:
- un lugar de aplicación de muestra y un empalme hidrófobo en comunicación con un canal capilar, en donde el empalme hidrófobo se configura para impedir flujo de líquido;
- 20 una salida de respiradero en comunicación con el empalme hidrófobo; y
- un elemento de capuchón configurado para sellar la salida de respiradero y el lugar de aplicación de muestra contra un ambiente exterior, en donde el elemento de capuchón cubre un volumen compartido alrededor del lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero.
- 25 7. Un método para realizar un ensayo de una muestra líquida, el método comprende:
- aplicar una muestra líquida a un lugar de aplicación de muestra en comunicación de fluidos con un canal capilar en donde la muestra líquida fluye por medio de una fuerza de acción capilar a través del canal capilar;
- proporcionar respiro para la fuerza de acción capilar a través de una salida de respiradero; y
- 30 sellar la muestra líquida contra el ambiente exterior con un elemento de capuchón, en donde el elemento de capuchón proporciona un volumen sellado compartido alrededor del lugar de aplicación de muestra y la salida de respiradero.
8. El método según la reivindicación 7, en donde el dispositivo es un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. El método según la reivindicación 7 u 8, en donde el método comprende además leer al menos una parte del canal capilar para obtener un resultado.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el método comprende además hacer una diagnosis basada en el resultado obtenido.
11. El microdispositivo fluídico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-6, que comprende además una cantidad de una muestra biológica presente en el dispositivo.
12. Un sistema que comprende:
- 40 (a) un lector; y
- (b) un microdispositivo fluídico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-6.
13. Un kit que comprende:
- (a) un microdispositivo fluídico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-6 y
- (b) un recipiente que aloja el dispositivo

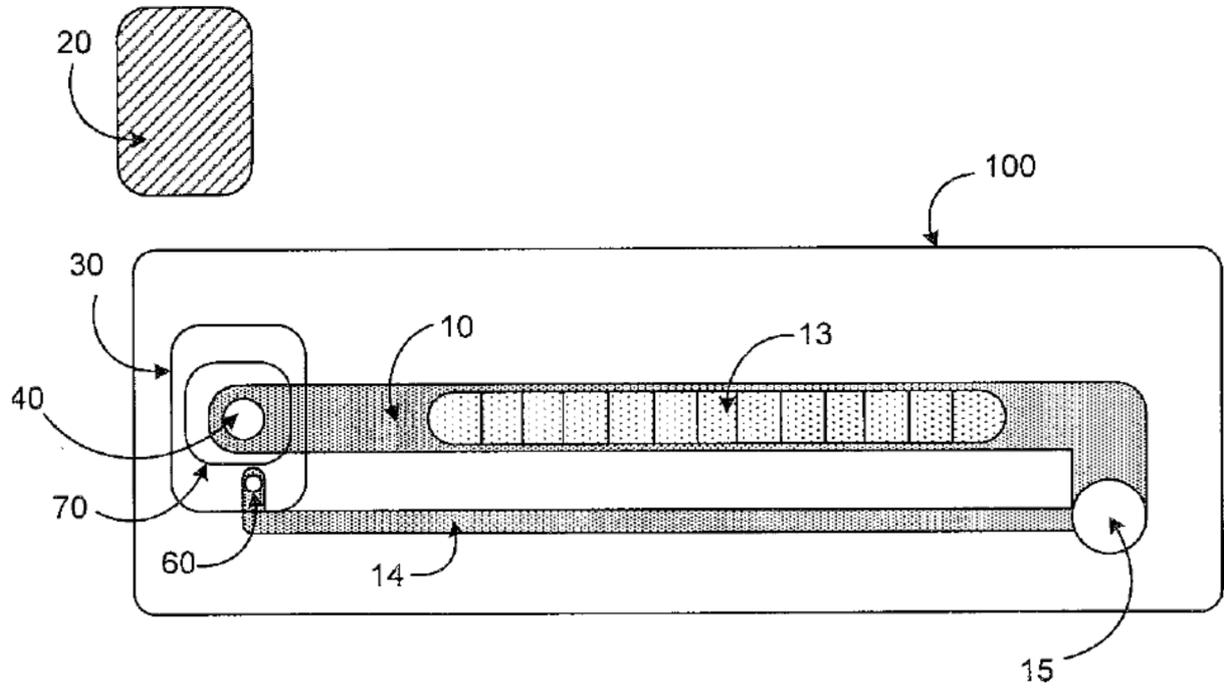


Figura 1

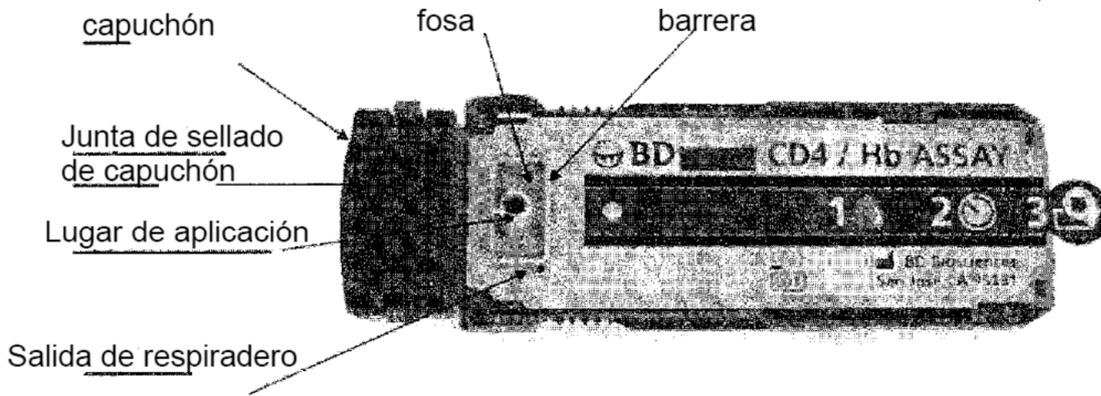


Figura 2A

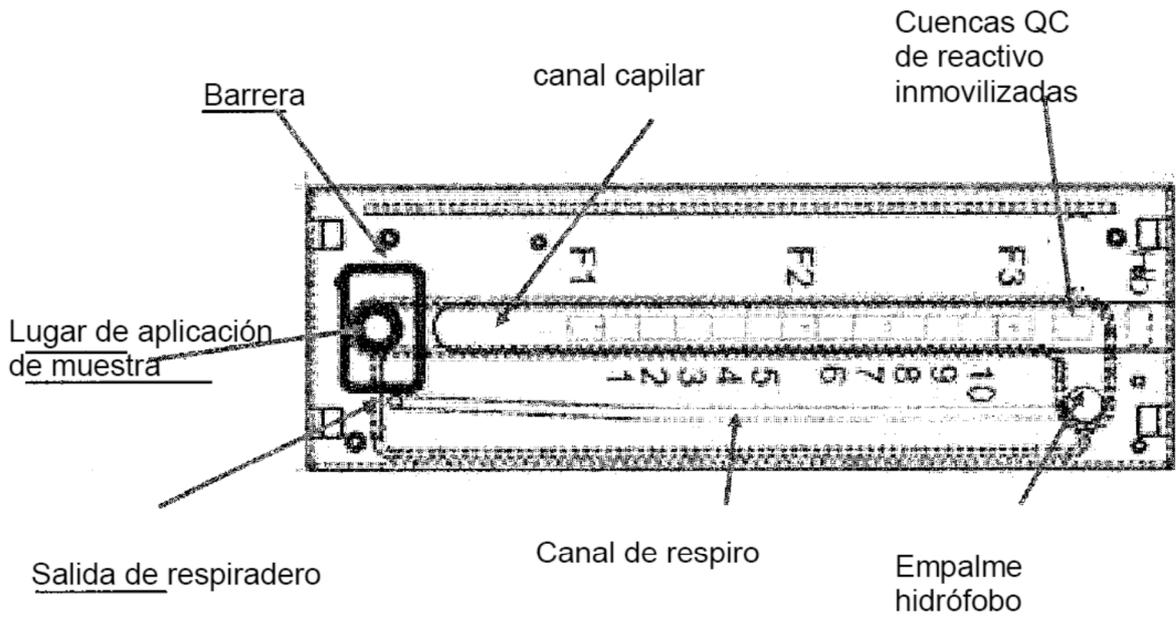


Figura 2B