

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 770**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2014 E 16197422 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3144067**

54 Título: **Sistema y procedimiento de tratamiento de fluido en un cartucho fluido**

30 Prioridad:

29.07.2013 GB 201313524

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

05.12.2018

73 Titular/es:

**ATLAS GENETICS LIMITED (100.0%)
Derby Court Epsom Square, White Horse
Business Park
Trowbridge, Wiltshire BA14 0XG, GB**

72 Inventor/es:

**TAYLOR, JAY KENDALL y
ARLETT, BEN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 692 770 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

Sistema y procedimiento de tratamiento de fluido en un cartucho fluido

5 **Campo**

10 [0001] La presente invención se refiere a sistemas de válvulas y los métodos correspondientes para el procesamiento de una muestra de líquido en un cartucho fluido. Más específicamente, la presente invención se refiere a un sistema de medición para suministrar un volumen de muestra de líquido y a un sistema para expulsar una muestra de líquido en exceso.

Antecedentes

15 [0002] La preparación y el análisis de la muestra presenta muchos problemas logísticos. Convencionalmente, muchas muestras médicas (como sangre, saliva, orina y elución de hisopo) se proporcionan a un médico, por ejemplo, un médico generalista (GP) o un médico de atención principal (PCP), en una cirugía local sin el equipo necesario para analizar la muestra. Por lo tanto, la muestra debe enviarse a un laboratorio donde se analiza la muestra. Los resultados de la prueba se deben cotejar y devolver al médico de cabecera para analizar los resultados y hacer un diagnóstico. Este enfoque es inadecuado. En primer lugar, existe un riesgo significativo de que una muestra se pierda en tránsito o se asigne con el paciente equivocado. Por otra parte, si bien los avances recientes en la tecnología han reducido el tiempo total empleado para llevar a cabo la prueba, la demora en el envío de la muestra a un laboratorio no es satisfactoria.

20 [0003] Sin embargo, los sistemas de análisis de la clase que se encuentran en los laboratorios son complejos y a menudo es difícil proporcionar cantidades suficientes de objetivos puros a partir de muestras de código para llevar a cabo de forma fiable ensayos analíticos aguas abajo. Por lo general, esto prohíbe que las cirugías locales de médicos de cabecera puedan llevar a cabo dichas pruebas en el sitio.

25 [0004] Sin embargo, en los últimos años se han hecho esfuerzos para reducir la escala de los sistemas de análisis para hacer pruebas más rápido y más fácil de ejecutar, y requieren menores cantidades de muestra. Por ejemplo, los dispositivos "laboratorio en un chip" (LOC) (un subconjunto de dispositivos microfluídicos) integran casi todas las pruebas médicas o operaciones de diagnóstico realizadas en un hospital en un único chip microfluídico. Los canales que forman tales dispositivos microfluídicos manejan pequeños volúmenes de fluido y se conectan entre sí para lograr una función deseada, como mezclar una muestra, mover la muestra a través del dispositivo, hacer reaccionar la muestra con diferentes reactivos, y así sucesivamente. Estos chips pueden insertarse en máquinas para controlar el rendimiento de una prueba y medir los resultados.

30 [0005] Sin embargo, se ha encontrado que el manejo de una muestra en un dispositivo de microfluidos puede ser muy difícil. En canales tan pequeños como los que se encuentran en un LOC convencional, es difícil aplicar fuerzas externas para mover la muestra de un sitio a otro para realizar diferentes acciones en la muestra. También existe un límite para la complejidad de un dispositivo LOC que opera puramente con acción capilar. Además, debido a los pequeños tamaños de muestra de LOC, los dispositivos tienen sensibilidad reducida y se reduce así la probabilidad de que una diana esté presente en la muestra.

35 [0006] Un enfoque alternativo consiste en utilizar un cartucho fluido. La escala de los componentes de un cartucho fluido es mayor que la de un dispositivo microfluídico, por lo que es posible mover una muestra a través de diferentes sitios para realizar diferentes acciones sobre ella. Esto permite realizar pruebas más complejas que las que se pueden realizar con los dispositivos LOC habituales, al tiempo que proporciona un sistema analítico de uso potencial en una cirugía de GP local.

40 [0007] Los ensayos científicos útiles en diagnósticos médicos han implicado cada vez más procedimientos bioquímicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). El ensayo de PCR ha proporcionado un método poderoso para analizar la presencia de segmentos definidos de ácidos nucleicos. Por lo tanto, es deseable realizar un ensayo de PCR en un cartucho fluido.

45 [0008] La reducción de la PCR al nivel de microchip es importante para tecnologías de detección portátiles y sistemas analíticos de alto rendimiento. El método puede usarse para analizar fluidos corporales en busca de la presencia de ácido nucleico específico para patógenos particulares, como la bacteria Chlamydia trachomatis, el VIH o cualquier otro microorganismo patógeno.

50 [0009] La introducción de ensayos de amplificación de ADN automatizados disponibles comercialmente ha permitido que más laboratorios introduzcan estas tecnologías para el ensayo rutinario de especímenes. Sin embargo, existe la necesidad de mejorar los dispositivos fluidos utilizados para este fin.

55 [0010] Un requisito de dispositivos que emplean la tecnología de PCR en el análisis y el procesamiento de muestras de fluidos es que un volumen bien definido de fluido procesado se pueda suministrar a las cámaras de detección

para el análisis de la muestra. Es particularmente importante en los cartuchos de tipo LOC donde se realizan múltiples pasos de preparación de muestras de fluidos dentro del cartucho para evitar que las tolerancias del canal y las cámaras en la región de procesamiento de muestras se acumulen antes del procesamiento y el análisis del fluido ya que esto puede conducir a errores bastante grandes en la cantidad calculada de fluido requerida para llenar la cámara de PCR y, posteriormente, entregarse a las cámaras de detección.

[0011] En ciertos cartuchos de tipo LOC, los reactivos se pueden secar hacia abajo en la cámara de PCR. Esto significa que llenar en exceso la cámara de PCR y permitir que una cantidad excesiva de muestra de fluido fluya más allá de la región de procesamiento de la muestra puede conducir a la falta de reactivos restantes en la cámara de PCR. El llenado insuficiente de la cámara de PCR incluso con una pequeña cantidad puede conducir a bolsas de aire en la cámara de PCR, lo que a su vez puede provocar un termociclado inestable. Para garantizar que la cámara de PCR esté completamente llena, se puede desear un ligero sobrellenado de la cámara. Sin embargo, incluso un ligero sobrellenado de la cámara de PCR conduce a un fluido no procesado aguas abajo de la cámara de PCR que puede luego diluir la muestra de fluido procesado a medida que se mueve desde la cámara de PCR a las cámaras de detección.

[0012] El documento WO2009108260 divulga un método para administrar un volumen fijo de fluido a un dispositivo microfluídico que comprende la configuración de un dispositivo con un circuito de muestra que comprende un volumen deseado, en el que el bucle de muestra es removible, usando una o más válvulas accionadas neumáticamente en un dispositivo microfluídico para llenar el bucle de muestra con el volumen fijo del fluido y suministrar el fluido al dispositivo microfluídico. Por lo tanto, se puede inyectar un volumen específico de fluido en el circuito de muestra en el canal principal cerrando la válvula intermedia, abriendo el flujo a través de las válvulas (606 y 608) y aplicando presión al canal principal. El bucle de muestra y un canal microfluídico pasante están conectados de forma fluida en una primera unión y una segunda unión, y en donde al menos una unión comprende una válvula en T.

[0013] El documento GB200711618 divulga un proceso para determinar la concentración de ácidos nucleicos en una muestra en un dispositivo microfluídico. El proceso incluye la introducción de una muestra en una primera cámara, llevando a cabo una serie de ciclos de una reacción de amplificación que se llevarán a cabo en ciclos para amplificar ácidos nucleicos, transfiriendo un volumen definido que es una fracción del volumen de la primera cámara, y que tiene ácidos nucleicos amplificados en una segunda cámara y reemplaza el volumen definido transferido con reactivos nuevos para las reacciones de amplificación. Los medios de transferencia de volumen pueden ser una bomba dosificadora controlable, una bomba recíproca o un medio similar que se puede usar para mover un volumen definido desde la primera cámara a la segunda cámara.

[0014] Los documentos US4624928 y US2003/0008308 A1 describen redes fluidicas que comprenden canales y válvulas, entre otros, para medir los volúmenes de líquido. El documento US2007/0280859 A1 da a conocer muelles de gas formados en cámaras de un disco centrífugo para cambiar la dirección de flujo de un líquido dependiendo de la fuerza centrífuga aplicada.

Sumario de la invención

[0015] La presente invención se refiere a un sistema de válvula de acuerdo con la reivindicación 1. De acuerdo con la presente invención, se proporciona un sistema de válvula en un cartucho de fluido para expulsar la muestra de líquido de una región de procesamiento de la muestra, que comprende el aparato: una vía de fluido para el paso de una muestra de líquido a su través desde un extremo aguas arriba hasta un extremo aguas abajo; una válvula de salida dentro de la ruta del fluido, la válvula de salida configurada para moverse entre una posición cerrada en la que impide que la muestra líquida pase a través de la válvula de salida y una posición abierta en la que permite que la muestra líquida pase a través de la válvula de salida; una región de procesamiento de muestra aguas abajo dentro de la ruta de fluido aguas abajo de la válvula de salida; un canal de derivación acoplado a la vía de fluido en una unión entre la válvula de salida y la región de procesamiento de muestra aguas abajo, el sistema de válvula configurado de modo que la muestra líquida aguas abajo de la válvula de salida pueda expulsarse a través del canal de derivación cuando la válvula de salida esté en la posición cerrada; y al menos un elemento compresible aguas abajo de la región de procesamiento de muestra aguas abajo, al menos un elemento compresible configurado para volverse cada vez más polarizado contra el flujo aguas arriba del elemento compresible cuando la muestra líquida pasa a través de la válvula de salida abierta, la muestra líquida aguas abajo de la válvula de descarga puede ser expulsada de la vía de fluido y dentro del canal de derivación por al menos un elemento compresible cuando la válvula de salida está cerrada. El elemento compresible utiliza la presión creada a medida que se avanza el fluido a lo largo de la ruta del fluido para expulsar el exceso de fluido en el canal de derivación, eliminando la necesidad de componentes adicionales en el cartucho de fluido con el fin de expulsar el fluido superfluo.

[0016] El sistema de válvula puede comprender además una cámara de procesamiento de la muestra aguas arriba dentro de la vía de fluido y aguas arriba de la válvula de salida.

[0017] Al menos un elemento compresible es un resorte de gas que comprende un orificio ciego lleno de un fluido compresible. Al proporcionar un resorte de gas que comprende un orificio ciego, puede proporcionarse un elemento

compresible sin complicar significativamente el proceso de fabricación o aumentar los costes.

[0018] El sistema de válvula comprende una válvula de derivación ubicado dentro del canal o cada canal de derivación,

5 la válvula de derivación puede configurarse para moverse entre una posición cerrada en la que impide que la muestra de líquido pase a través de la válvula de derivación y una posición abierta en la que permite que la muestra de líquido pase a través de la válvula de derivación. Esto permite controlar cuándo se elimina el fluido del canal de derivación.

10 **[0019]** Al menos una de las válvulas en el sistema de válvula puede ser una válvula accionada neumáticamente.

[0020] La al menos una válvula de accionamiento neumático puede comprender una cámara de válvula que tiene unas aberturas primera y segunda conectadas a la vía o canal, respectivamente; y una membrana flexible movable entre una posición cerrada, en la que la membrana flexible sella contra las aberturas primera y segunda para evitar que el fluido fluya a través de la ruta o canal, y una posición abierta, en la que la membrana flexible está separada de las aberturas primera y segunda para permitir que el fluido fluya a través de la vía o canal.

15 **[0021]** El sistema de válvula puede comprender además una interfaz neumática para la conexión a una fuente de presión de gas positiva y/o calibre, comprendiendo la interfaz neumática una pluralidad de puertos.

20 **[0022]** El o cada válvula puede comprender además un paso de fluido que tiene una abertura en la cámara de válvula, la abertura separada de las aberturas primera y segunda por la membrana flexible, en donde el paso de fluido está acoplado a un puerto en el interfaz neumático para aplicar una presión de gas positiva o negativa en la cámara de la válvula para mover la membrana flexible entre las posiciones abierta y cerrada. Preferiblemente, la membrana de la válvula está desviada en la posición cerrada y se aplica una presión negativa o manométrica para mover la membrana de la válvula de la posición cerrada a la posición abierta. Al proporcionar válvulas que están desviadas en la posición cerrada, las válvulas están predispuestas contra fugas y evitan fugas durante la pérdida de potencia temporal.

25 **[0023]** Las válvulas de entrada y de salida pueden estar configuradas para ser actuadas simultáneamente. Esto evita la presurización inadvertida de la cámara de procesamiento de muestra a medida que las válvulas de entrada y salida se cierran y se abren.

30 **[0024]** El o cada canal de derivación puede estar conectado a la vía de fluido inmediatamente aguas abajo de la válvula de salida para reducir al mínimo o erradicar un tramo muerto entre la válvula de salida y el canal de derivación. Esto es ventajoso porque minimiza o erradica el excedente aguas abajo de la cámara de procesamiento de muestra que puede diluir la muestra procesada a medida que se mueve a lo largo de la ruta del fluido.

35 **[0025]** La cámara de procesamiento de la muestra puede ser una cámara de amplificación de ácido nucleico; en donde la región de procesamiento de la muestra aguas abajo es una cámara de detección; y en donde la relación de cámaras de detección a cámaras de amplificación de ácido nucleico es 2:1. Proporcionar una relación 2:1 facilita la amplificación dúplex de la muestra.

40 **[0026]** Cada región de procesamiento de muestras aguas abajo puede estar acoplada a un único elemento compresible. Por lo tanto, cada camino de fluido está provisto de medios para expulsar el exceso de fluido del canal de derivación.

45 **[0027]** La cámara de válvula puede estar formada en una primera capa polimérica, preferiblemente una capa de neumático del cartucho fluido. La interfaz neumática puede formarse en la primera capa de polímero. La ruta del fluido puede formarse en una segunda capa de polímero, preferiblemente una capa fluida del cartucho de fluido. El canal de derivación puede formarse en la segunda capa de polímero. La membrana de válvula puede comprender un elastómero termoplástico. La primera capa de polímero puede comprender polipropileno. La segunda capa de polímero puede comprender polipropileno. El polipropileno es un material inerte que no reaccionará con una muestra de fluido. También se puede unir fácilmente a otras capas para facilitar la fabricación.

50 **[0028]** También se proporciona un método de expulsión de muestra líquida excedente desde un cartucho fluido de acuerdo con la reivindicación 16. En este aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de expulsión de muestra líquida excedente desde un cartucho fluido que comprende una vía de fluido que tiene una región de procesamiento de muestra aguas abajo, una válvula de salida aguas arriba de la región de procesamiento de muestra aguas abajo, un canal de derivación acoplado a la ruta de fluido en una unión entre la válvula de salida y la región de procesamiento de muestra aguas abajo, y un elemento compresible aguas abajo de la región de procesamiento de muestra aguas abajo; comprendiendo el método: pasar una muestra de líquido a través de la válvula de salida, comprimiendo de ese modo el elemento compresible a medida que la muestra de líquido pasa aguas abajo de la válvula de salida; y cerrar la válvula de salida y evacuar la muestra de líquido sobrante aguas abajo de la válvula de salida a través del canal de derivación mediante el elemento compresible que ejerce una fuerza contra la muestra de líquido sobrante para expulsarlo de la vía de fluido y hacia el canal de derivación.

[0029] El cartucho de fluido comprende una válvula de derivación en el canal de derivación, y en el que el método comprende: el cierre de la válvula de derivación antes de la etapa de hacer pasar una muestra líquida a través de la válvula de salida; y en donde la etapa de evacuar la muestra de excedente de líquido aguas abajo de la válvula de salida comprende además la apertura de la válvula de derivación.

- 5
- Breve descripción de las figuras**
- [0030]**
- 10 La Figura 1 es un diagrama esquemático de un cartucho fluido ejemplar en el que se puede proporcionar la invención.
- La Figura 2 es una vista superior de un cartucho fluido a modo de ejemplo en el que se puede proporcionar la invención.
- 15 La Figura 3 es una vista en despiece ordenado del cartucho fluido a modo de ejemplo de la Figura 2.
- La Figura 4 es una vista en perspectiva de la carcasa del cartucho fluido a modo de ejemplo de la Figura 2.
- 20 La Figura 5 es una vista en perspectiva de la subunidad de ampolla del ejemplo de cartucho fluido de la figura.
- La Figura 6A es una vista desde arriba de la capa neumática del cartucho fluido a modo de ejemplo de la Figura 2.
- La Figura 6B es una vista inferior de la capa neumática del cartucho fluido a modo de ejemplo de la Figura 2.
- 25 La Figura 7 es una vista superior de la lámina neumática del cartucho fluido a modo de ejemplo de la Figura 2.
- La Figura 8A es una vista desde arriba de la capa fluida del cartucho fluido ilustrativo de la Figura 2.
- 30 La Figura 8B es una vista inferior de la capa fluida del cartucho fluido a modo de ejemplo de la Figura 2.
- La Figura 9 es una vista superior de la lámina fluida del cartucho fluido ejemplar de la Figura 2.
- La Figura 10 es una vista superior de la capa de electrodo del cartucho fluido a modo de ejemplo de la Figura 2.
- 35 La Figura 11 es una vista en sección de una disposición de válvula ventajosa que puede formar un aspecto inventivo aislado.
- La Figura 12 es una vista en sección de otra disposición de válvula ventajosa que puede formar un aspecto inventivo aislado.
- 40 La Figura 13a es una vista en sección de una disposición ventajosa de orificios de entrada que puede formar un aspecto inventivo aislado.
- 45 La Figura 13b es una vista en sección en perspectiva de la disposición de puerto de entrada de la Figura 13a.
- La Figura 14a es una vista en sección de una disposición de columna de captura ventajosa que puede formar un aspecto de la invención aislado.
- 50 La Figura 14b es una vista en sección en perspectiva de una parte de la disposición de columna de captura de la Figura 14a.
- La Figura 15a es una vista en sección de una disposición de cámara de residuos ventajosa que puede formar un aspecto inventivo aislado.
- 55 La Figura 15b es una vista en sección en perspectiva de la disposición de la cámara de desechos de la Figura 15a.
- La Figura 16 es un esquema de un sistema de válvula de acuerdo con una primera realización de la presente invención.
- 60 La Figura 17a es una sección transversal de una válvula adecuada para el sistema de válvula de la Figura 11 en una posición cerrada.
- La Figura 17b es una sección transversal de la válvula de la Figura 17a en una posición abierta.
- 65 La Figura 18 es un esquema del extremo posterior del cartucho ejemplar que incluye una segunda realización de un

sistema de válvula de la presente invención.

La Figura 19 es un diagrama de flujo de un método de acuerdo con la presente invención.

5 La Figura 20 es un esquema de un sistema de válvula de acuerdo con una primera realización de la presente invención.

La Figura 21 es una vista en sección de una válvula ejemplar.

10 La Figura 22 es una vista en sección de otra válvula ejemplar en una posición abierta.

La Figura 23 es una vista en sección de la válvula de la Figura 22 en una posición intermedia.

15 La Figura 24 es una vista en sección de la válvula de la Figura 22 en una posición cerrada.

La Figura 25 es un diagrama esquemático de un sistema de válvula ejemplar.

Descripción detallada

20 **[0033]** Las realizaciones de la invención se describirán ahora en el contexto de un cartucho de fluido ejemplar en el que se implementa la invención. Aunque no es necesario para comprender la presente invención, es beneficioso proporcionar una descripción general de los principios de la estructura, fabricación, función y uso del cartucho fluido y los métodos asociados para realizar una prueba.

25 **[0032]** El cartucho de fluido a modo de ejemplo y métodos asociados elegidos para ilustrar la presente invención son para la detección de la bacteria *Chlamydia trachomatis* usando la amplificación por PCR y la detección electroquímica. Sin embargo, la persona experta entenderá que la invención no se limita al cartucho fluido ejemplar y los métodos asociados, y es adecuada para su uso con diversos cartuchos diferentes para una amplia variedad de técnicas de análisis de muestras o ensayos biológicos; por ejemplo, ensayos de secuencias de ácido nucleico diana en una muestra líquida.

30 **[0033]** Los expertos en la técnica comprenderán que los dispositivos y métodos de la invención aquí descrita e ilustrada en los dibujos adjuntos son ejemplos de realización no limitativos y que el alcance de la presente invención se define únicamente por las reivindicaciones. Las características ilustradas o descritas en conexión con una realización ejemplar pueden combinarse con características de otras realizaciones. Tales modificaciones y variaciones están incluidas dentro del alcance de las presentes divulgaciones.

35 **[0034]** El cartucho ejemplar comprende: una porción de fluido a través del cual los flujos de muestra y en el que amplificación de ácido nucleico y detección tiene lugar; una porción neumática que controla el flujo a través de la porción fluida; y al menos dos electrodos que proporcionan una diferencia de potencial para la detección de un ácido nucleico amplificado de interés. La porción fluida y la porción neumática pueden estar construidas con una capa fluida, una lámina fluida, una capa neumática y una lámina neumática tal como las descritas en relación con el siguiente cartucho ilustrativo. Sin embargo, la porción fluida no consiste necesariamente en una capa fluida y una lámina fluida y la parte neumática no consiste necesariamente en una capa neumática y una lámina neumática. Por el contrario, las capas pueden interactuar para producir la parte fluida y la porción neumática de manera que partes de todas o algunas de las capas forman cada porción. En lugar de referirse a las capas particulares del cartucho, la parte fluida se refiere a las áreas particulares del cartucho que proporcionan la función de permitir el flujo controlado de la muestra, y la porción neumática se refiere a las áreas particulares del cartucho que proporcionan la función de controlar el flujo a través de la porción fluida.

40 **[0035]** La carcasa, la porción de fluido y la porción de neumático están hechas de plástico. Por plástico se entiende un material orgánico sintético o natural que puede ser modelado cuando está blando y luego endurecido, incluyendo resinas, resinoides, polímeros, derivados de celulosa, materiales de caseína y plásticos proteicos. Ejemplos de plásticos a partir de los cuales se puede construir el cartucho incluyen, pero no se limitan a termoplásticos, por ejemplo, policarbonato, tereftalato de polietileno, copolímeros de olefina cíclica tales como topaz, acrilonitrilo butadieno estireno y elastómeros termoplásticos, por ejemplo polipropileno. Las carcasas de plástico, partes fluidas y porciones neumáticas pueden incluir componentes que no están hechos de plástico (por ejemplo, ampollas hechas de lámina de metal, insertos metálicos en la entrada de muestra), pero están formados principalmente de plástico. El uso de materiales plásticos facilita la fabricación económica de los cartuchos.

45 **[0036]** Mientras que las láminas de neumáticos y de fluidos pueden estar hechas de una lámina de metal, los materiales preferidos son de plástico, incluyendo los mencionados anteriormente. En particular, se prefiere que las láminas sean un compuesto de tereftalato de polietileno/polipropileno.

50 **[0037]** La secuencia de ácido nucleico diana es cualquier ácido nucleico a detectar en una muestra. El (los) ácido(s) nucleico(s) diana para ser amplificado(s) y detectado(s) en el cartucho por lo general será ADN, pero también es

posible amplificar y detectar ARN.

[0038] En algunas formas de realización de un cartucho puede permitir amplificación y/o la detección de ambas dianas de ADN y ARN.

[0039] La muestra líquida es la composición que se introduce en el cartucho para determinar si el ácido o ácidos nucleicos diana de interés está/están presentes. La muestra puede ser una composición en la que se sospecha que está presente el ácido nucleico a detectar (por ejemplo, para el diagnóstico clínico), o puede ser una composición en la que el ácido nucleico a detectar está potencialmente presente (p. ej. para pruebas de contaminación).

[0039] La muestra líquida puede tener varias fuentes. Por ejemplo, puede ser material obtenido de un animal o de la planta (p. ej., para el diagnóstico de infecciones o para el genotipado). Tales muestras se pueden obtener con mínima invasividad o de forma no invasiva, p.ej., por ejemplo, la muestra puede obtenerse de un animal usando un hisopo, o puede ser un fluido corporal. Como alternativa, la muestra puede ser material obtenido de alimento o agua (p. ej., para las pruebas de contaminación). La muestra generalmente incluirá células, y el ácido nucleico objetivo (si está presente) se puede extraer de estas células dentro del cartucho. Un experto en la técnica apreciará que las muestras pueden diluirse o tratarse de otro modo antes de ser introducidas en el cartucho, pero se prefiere que el cartucho pueda manipular material que no ha sido pretratado de esta manera.

[0040] Un animal del que se obtiene la muestra puede ser un animal vertebrado o no vertebrado. Los animales vertebrados pueden ser mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, cerdo, perro, gato, conejo, primates o similares. El animal puede ser un primate y es preferiblemente un humano. Así, el cartucho puede ser utilizado para el diagnóstico clínico de muestras humanas.

[0041] Además de analizar una muestra, el cartucho puede analizar un control positivo y/o negativo para proporcionar la confirmación de que el cartucho está funcionando como se esperaba. El (los) control(es) se puede(n) introducir en el cartucho por un usuario, o puede ser incluido dentro de un cartucho antes de su uso.

[0042] La inclusión de un ácido nucleico de control positivo interno permite a un usuario identificar si se ha obtenido un resultado negativo para la muestra debido a que la amplificación de ácido nucleico no ha tenido éxito (negativa falsa). Si el ácido nucleico de control positivo no se detecta en la cámara de detección, a pesar de su presencia en una cámara de amplificación, el usuario podrá identificar la prueba como un posible resultado falso negativo, y puede realizar otra prueba.

[0043] La inclusión de un control negativo mínimo interno permite al usuario identificar si un resultado positivo ha sido falsamente obtenido debido a la presencia de contaminación. Un control negativo puede implicar la realización de PCR en una cámara en la que no se proporciona ácido nucleico, o en la que una muestra experimenta una reacción de amplificación sin componentes necesarios, por ejemplo, PCR sin cebadores. Sin embargo, si se detecta ácido nucleico en la cámara de detección, a pesar de su ausencia prevista en una cámara de amplificación, el usuario podrá identificar la prueba como un posible resultado falso positivo, y puede realizar otra prueba.

[0044] Un ácido nucleico de control positivo puede ser cualquier ácido nucleico que no se encuentra en una muestra utilizada en el cartucho. El ADN de control interno puede tomarse de una bacteria que no es patógena para los animales y que contiene un ácido nucleico que es altamente específico para la bacteria. Un ejemplo de una posible bacteria a partir de la cual puede tomarse el ácido nucleico de control para una muestra animal es *Pectobacterium atrosepticum*, aunque puede usarse cualquier ácido nucleico de control que no esté presente en una muestra.

[0045] La porción fluidica del cartucho comprende canales y las cámaras a través de las cuales fluye la muestra. El flujo de muestra a través del cartucho se controla de dos maneras. En primer lugar, la parte fluidica tiene una entrada de gas. La entrada de gas está conectada a un suministro de gas, y la inyección de gas en la parte fluidica a través de esta entrada permite que la muestra sea empujada aguas abajo a través del cartucho, hacia la cámara de detección. El suministro de gas puede ser proporcionado por el lector. Como alternativa, el suministro de gas puede ser un suministro de gas a bordo. Preferiblemente, el suministro de gas es proporcionado por una fuente externa y la entrada de gas está conectada a un circuito neumático de manera que el suministro de gas se proporciona a través de una entrada neumática en el cartucho. En segundo lugar, al menos una válvula controlada neumáticamente controla el movimiento local de la muestra a través de la porción fluidica. La(s) válvula(s) controlada(s) neumáticamente puede(n) controlarse independientemente de otras válvulas controladas neumáticamente y pueden controlarse independientemente del suministro de gas que generalmente provoca el movimiento aguas abajo de la muestra a través de la entrada de gas. La entrada de gas y la(s) válvula(s) controlada(s) neumáticamente también permiten que la muestra se vacíe a través de la porción fluida p.ej., para excluir el exceso de volúmenes de material. La porción de fluido también tiene un escape que permite que el aire y el material de desecho salgan de los canales y las cámaras de la porción de fluido sin que se produzca una acumulación de presión en el cartucho. Preferiblemente, el escape comprende una cámara de desechos y/o un respiradero de desechos.

[0046] La porción de fluido del cartucho incluye reactivos y/o componentes físicos para la lisis celular y de separación de ácido nucleico. Estos pueden ser cualquier reactivo o componente físico que sea capaz de lisar las

células y separar los ácidos nucleicos de los desechos celulares y otros componentes celulares. Por ejemplo, pueden comprender (i) un tampón de lisis que es capaz de provocar la lisis de células diana que pueden estar presentes en la muestra, por ejemplo, tampones que incluyen un detergente como nonilfenoxipolietoxietanol (disponible como NP-40) o t-octilfenoxipolietoxietanol (disponible como Triton X 100), o que incluye tiocianato de guanidina, y/o (ii) un soporte de captura o columna que se une específicamente a ácidos nucleicos pero que no se une a otros componentes celulares indeseados (por ejemplo, proteínas y lípidos). La columna de captura comprende un filtro de captura y puede comprender adicionalmente un filtro de profundidad. Los filtros pueden estar hechos de fibras de vidrio (disponibles como filtros Whatman), o pueden estar hechos de sílice, aunque puede usarse cualquier columna o soporte que sea capaz de separar ácidos nucleicos de otros componentes celulares. La elución usando un tampón de lavado para eliminar restos celulares y otros componentes celulares, seguido de elución usando un tampón de elución para eluir los ácidos nucleicos separados del soporte del captador o columna puede realizarse de forma que la columna de captura pueda separar los ácidos nucleicos de degradación celular y otros componentes celulares.

[0047] Un canal a través del cual la muestra de fluido conecta fluidamente la entrada de la muestra a al menos una cámara de amplificación donde puede tener lugar la amplificación de ácido nucleico. El objetivo de la(s) cámara(s) de amplificación es permitir la amplificación de cualquier ácido nucleico diana de interés que esté presente en la muestra (y, cuando esté presente, cualquier ácido nucleico de control positivo). Puede usarse cualquier método de amplificación de ácido nucleico y estos se describen con más detalle a continuación en relación con un cartucho ejemplar. Los diferentes reactivos de amplificación de ácido nucleico que se requieren para diferentes métodos de amplificación de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica. Estos reactivos se proporcionan en o arriba de la(s) cámara(s) de amplificación de manera que la muestra (y cualquier control positivo) incluye todos los agentes reactivos necesarios para la amplificación de ácido nucleico una vez que alcanza la cámara de amplificación. La adaptación de un método de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con el ácido nucleico diana a detectar también se conoce bien en la técnica (por ejemplo, diseño de cebadores). El experto en la materia podría, por lo tanto, adaptar los reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos de forma correspondiente. El término "cámara" no denota ningún tamaño o geometría particular, sino que en su lugar significa una región dentro de la porción fluidica que está diseñada para permitir que se produzca la amplificación de ácido nucleico. Así, por ejemplo, podría ser una región en la que la muestra se puede aislar de manera fluida (p. ej. a través del uso de válvulas de control neumático), mientras que los pasos necesarios para la amplificación de ácido nucleico (p. ej. ciclo térmico, etc.) ocurren, y puede estar situado dentro del cartucho de modo que está en la proximidad de cualesquiera recursos externos que sean necesarios (p. ej. junto a una fuente de calor dentro de un lector de cartucho, permitiendo de esta manera que se produzca el ciclo térmico).

[0048] Múltiples canales y/o cámaras de amplificación de prueba pueden ser incluidos en el cartucho. Los diferentes canales y/o cámaras de amplificación de prueba pueden incluir reactivos requeridos para amplificar diferentes ácidos nucleicos de interés. Por lo tanto, el uso de múltiples canales de prueba de amplificación y/o cámaras permite que se realicen múltiples pruebas en un solo cartucho, simultáneamente (incluyendo cualquier control). Como alternativa, los reactivos para la amplificación de múltiples ácidos nucleicos diferentes pueden estar presentes en una sola cámara de amplificación, y los diferentes ácidos nucleicos (ya sean múltiples ácidos nucleicos diana, o un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control) pueden amplificarse simultáneamente en la misma cámara de amplificación.

[0049] Un canal adicional a través del cual fluye la muestra después de la amplificación de ácido nucleico de forma fluida conecta al menos una cámara de amplificación a al menos una cámara de detección donde se pueden detectar los resultados de la amplificación de ácido nucleico. En o aguas arriba de la cámara de detección hay reactivos para la detección de ácidos nucleicos de manera que la muestra incluye todos los reactivos necesarios para la detección una vez que alcanza la cámara de detección. Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos pueden ser específicos para el ácido nucleico diana particular, es decir, pueden permitir la detección de la presencia de la secuencia específica de ácido nucleico. Como alternativa, los reactivos para la detección de ácidos nucleicos pueden ser reactivos genéricos para detectar la presencia de cualquier ácido nucleico. Dichos reactivos genéricos pueden usarse si todos los ácidos nucleicos distintos del ácido nucleico diana se eliminan antes de la detección. Por ejemplo, esto puede lograrse proporcionando una nucleasa que sea capaz de hidrolizar todos los ácidos nucleicos presentes en la muestra distintos del nucleico diana. El ácido nucleico diana amplificado se puede proteger de la hidrólisis, por ejemplo, mediante la inclusión de modificaciones químicas en los cebadores que se incorporan en el producto amplificado y que no se pueden hidrolizar. Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos se describen a continuación en relación con un cartucho ilustrativo, pero habitualmente comprenden una sonda que incluye una etiqueta. La sonda es capaz de hibridarse con el ácido nucleico amplificado que se ha amplificado en la(s) cámara(s) de amplificación. Después de la hibridación de la sonda con el ácido nucleico amplificado, la detección del ácido nucleico puede producirse a través de un cambio detectable en la señal de la etiqueta. En algunas realizaciones, el cambio puede ser causado por la hidrólisis de la sonda. Cuando la sonda se hidroliza, la hidrólisis generalmente se logra usando una nucleasa específica de doble cadena, que puede ser una exonucleasa o una endonucleasa. Preferiblemente, la nucleasa es endonucleasa T7. La señal de la etiqueta es capaz de experimentar un cambio después de la hidrólisis de la sonda. Esto se debe a un cambio en el entorno de la etiqueta cuando pasa de estar unido al resto de la sonda a estar libre del resto de la sonda o unido a un solo nucleótido o una parte corta de la sonda. Se pueden encontrar más detalles de los tipos de sondas y los métodos de detección que se pueden usar en

Hillier et al. Bioelectrochemistry, 63 (2004), 307-310. Como alternativa, se pueden usar métodos para provocar un cambio detectable en la señal de la etiqueta que no se basa en la hidrólisis de la sonda, por ejemplo, véase Ihara et al. Nucleic Acids Research, 1996, vol. 24, No. 21 4273-4280. Este cambio en el entorno de la etiqueta conduce a un cambio en la señal de la etiqueta. El cambio en la señal de la etiqueta puede detectarse para detectar la presencia del ácido nucleico de interés.

[0050] Cuando se usa un ácido nucleico de control positivo, los reactivos para la detección de ácido nucleico también pueden incluir una sonda de control positivo que incluye una etiqueta. La sonda de control positivo es capaz de hibridarse con el ácido nucleico de control modificado. La señal proporcionada por las etiquetas del control positivo y las sondas diana puede ser igual, pero presente en cámaras de detección separadas de modo que se puedan distinguir las señales correspondientes a los ácidos nucleicos de control y prueba. Como alternativa, la señal proporcionada por las etiquetas de las sondas de control y objetivo puede ser diferente, de modo que las señales son distinguibles entre sí, incluso si las sondas están presentes en la misma cámara de detección.

[0051] Canales de detección de ensayo múltiple y/o fibras de cubetas pueden incluirse en el cartucho. Los diferentes canales y/o cámaras de detección de prueba pueden incluir reactivos requeridos para detectar diferentes ácidos nucleicos de interés. Por lo tanto, el uso de múltiples canales de prueba de detección y/o cámaras permite que se realicen múltiples pruebas en un solo cartucho, simultáneamente. Como alternativa, los reactivos para la detección de múltiples ácidos nucleicos diferentes pueden estar presentes en una única cámara de detección, y los diferentes ácidos nucleicos (ya sean ácidos nucleicos diana o un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control) pueden detectarse simultáneamente en la misma cámara de detección.

[0052] La etiqueta es detectable mediante el uso de electrodos del cartucho, y así la etiqueta será normalmente una etiqueta electroquímica, tal como un ferroceno. Los ejemplos de etiquetas que pueden usarse pueden encontrarse en los documentos WO03/074731, WO2012/085591 y PCT/GB2013/051643. La señal emitida por la etiqueta puede detectarse mediante un lector de cartucho.

[0053] La porción de neumático del cartucho comprende al menos un circuito neumático, controlando cada uno al menos una válvula controlada neumáticamente. La porción neumática controla el flujo de muestra a través del cartucho mediante la apertura y el cierre de las válvulas controladas neumáticamente. La apertura y el cierre de las válvulas se controlan mediante cambios en la presión neumática en el circuito neumático que se aplica a través de una entrada de presión neumática. Usualmente, el cartucho contiene muchas válvulas neumáticamente controladas. Las válvulas controladas neumáticamente pueden controlarse por entradas de presión neumáticas separadas. Estas válvulas pueden usarse para evitar el movimiento aguas abajo de la muestra a través de la porción fluidica hasta que se hayan realizado los pasos necesarios y/o para prevenir el movimiento inverso no deseado de la muestra aguas arriba. Por ejemplo, puede proporcionarse una válvula aguas arriba de al menos una cámara de amplificación para evitar el movimiento aguas abajo en al menos una cámara de amplificación hasta que tenga lugar la lisis celular y la separación de ácidos nucleicos. Después de la lisis celular y la separación de ácidos nucleicos, la válvula aguas arriba de al menos una cámara de amplificación puede abrirse para permitir el flujo descendente. Luego puede cerrarse de nuevo para evitar el reflujo fuera de la cámara hacia la entrada de muestra.

[0054] El cartucho comprende al menos dos electrodos que pueden proporcionar una diferencia de potencial a través de al menos una cámara de detección. La diferencia de potencial hace que la corriente fluya a través de al menos una cámara de detección, permitiendo de ese modo la detección de señal desde etiquetas electroquímicamente activas.

[0055] Un cartucho ejemplar que opera de acuerdo con la descripción anterior se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos.

1. El cartucho ejemplar

1.1 Descripción general

[0056] El cartucho ejemplar descrito a continuación pretende ser de un solo uso, el cartucho desechable para realizar una prueba en una muestra introducida en el cartucho. El cartucho ejemplar es un cartucho fluidico con canales de una escala apropiada (como se detalla a continuación). Sin embargo, la invención puede realizarse en un dispositivo microfluidico o un LOC. Una vez que se ha ejecutado la prueba, se recomienda desechar el cartucho. Sin embargo, si se desea, el cartucho puede enviarse para volver a procesarlo para permitir que se vuelva a utilizar.

[0057] Se prefiere que el cartucho comprende todos los agentes biológicos necesarios para la realización de la prueba de elección. Por ejemplo, el cartucho ejemplar se usa para detectar la presencia, ausencia o cantidad de un patógeno de interés. Cualquier patógeno puede ser detectado. Los ejemplos de patógenos que pueden detectarse mediante el cartucho son *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma genitalium* y *Staphylococcus aureus* resistente a la *meticilina*. Para ese fin, el cartucho comprende reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos. La amplificación de ácidos nucleicos puede realizarse usando cualquier método de amplificación de ácidos nucleicos. El método de amplificación de ácido nucleico puede ser un método de

termociclado en el que la temperatura a la que se realiza el método varía de manera que diferentes etapas de la amplificación pueden tener lugar a diferentes temperaturas dentro del ciclo. Por ejemplo, la fusión, el recocido de los cebadores y la extensión se pueden realizar a diferentes temperaturas. Al recorrer las temperaturas, se puede controlar el tiempo de cada uno de los pasos del método. Como alternativa, la amplificación de ácidos nucleicos puede ser un método iso-térmico en el cual la temperatura se mantiene constante. Tanto en el termociclado como en los métodos de amplificación de ácido nucleico isotérmico, la temperatura se controla durante la amplificación de ácido nucleico.

[0058] Los ejemplos de métodos de amplificación de ácidos nucleicos son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación dependiente de la helicasa y amplificación isotérmica mediada por bucle. Los reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos variarán dependiendo del método de amplificación de ácidos nucleicos utilizados, pero incluyen una polimerasa y trifosfatos de nucleótidos.

[0059] Como se explica a continuación, el cartucho también comprende reactivos de detección que son capaces de detectar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos amplificados que son el producto del método de amplificación de ácido nucleico. Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos comprenden una sonda que es capaz de hibridarse con el ácido nucleico amplificado. La sonda incluye una etiqueta de ferroceno. Después de la hibridación de la sonda al ácido nucleico amplificado, la detección del ácido nucleico se produce a través de un cambio detectable en la señal de la etiqueta. El cambio es causado por la hidrólisis de la sonda, que se logra usando una nucleasa específica de doble cadena. La nucleasa es una endonucleasa T7. El ferroceno da diferentes señales electroquímicas cuando forma parte de una sonda o cuando está unido solo a un solo nucleótido, por lo que la hidrólisis se detecta fácilmente. Por lo tanto, el cambio en la señal de la etiqueta permite la detección de la presencia del ácido nucleico de interés.

[0060] Los electrodos permiten que se detecte el cambio detectable en la señal de la etiqueta, que se produce en presencia del ácido nucleico diana.

[0061] El cartucho está configurado para uso con un lector de cartucho (no mostrado). El cartucho comprende una serie de interfaces neumáticas, mecánicas, térmicas y eléctricas (descritas con más detalle a continuación) a través de las cuales el lector interactúa con el cartucho para realizar la prueba. Por lo tanto, en uso, el cartucho se insertaría en el lector, y el lector se activaría para comenzar a interactuar con el cartucho a través de las interfaces para realizar la prueba. Para los fines de comprender la presente invención, no es necesario describir exactamente cómo interactúa el cartucho con el lector para realizar una prueba particular y proporcionar los resultados de la prueba, pero a continuación se proporciona una descripción general de una operación ejemplar de un cartucho.

1.2 Diagrama esquemático del cartucho ejemplar

[0062] Antes de explicar la estructura y disposición de los componentes de un cartucho de fluido a modo de ejemplo en detalle, es útil describir el diseño del cartucho ejemplar en un nivel alto con referencia al esquema mostrado en la Figura 1.

[0063] Es conveniente considerar el diseño general del cartucho en términos del flujo de líquidos, incluyendo la muestra líquida, a través del cartucho. A menos que se especifique lo contrario a continuación, el paso de líquidos que incluye la muestra líquida y los tampones líquidos se denomina la "vía del fluido" que tiene un extremo aguas arriba y un extremo aguas abajo. A menos que se especifique lo contrario en lo sucesivo, "aguas abajo" generalmente se refiere a la dirección del flujo de los líquidos y "aguas arriba" se refiere a la dirección opuesta a la dirección del flujo. La ruta del fluido en el cartucho ejemplar puede tener diferentes ramificaciones (y así formar diferentes vías de fluido), pero todas las vías tienen una dirección de flujo reconocible que permite a una persona experta identificar las direcciones aguas arriba y aguas abajo. Sin embargo, hay una excepción a esta definición general, que es cuando la muestra de líquido se bombea entre la cámara de mezclado 10 y el fuelle 20. En este caso, el fluido se bombea intermitentemente aguas arriba en la dirección opuesta a su dirección de flujo general del flujo de fluido, que está aguas abajo. Esta mezcla sirve para mezclar la lisis y la muestra y rehidratar el control interno.

[0064] La muestra líquida se introduce en el cartucho a una muestra de la cámara de mezcla 10 a través de un puerto de entrada. Una disposición particular de un puerto de entrada preferido puede en sí misma formar un aspecto inventivo aislado del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación. Un indicador de muestra 12 está acoplado de forma fluida a la cámara de mezcla de muestra 10 de modo que una muestra introducida en la cámara de mezcla de muestra 10 es visible en el indicador de muestra 12. También está conectada a la cámara de mezcla de muestra 10 una ampolla 14 que contiene un tampón de lisis. El tampón de lisis comprende tiocianato de guanidina. Una vez que la muestra se ha introducido en la cámara de mezcla de muestra 10, y se inicia una prueba, la ampolla de lisis 14 se colapsa para expulsar el tampón de lisis a la cámara de mezcla de muestra 10 donde se mezcla con la muestra de líquido introducida en la misma.

[0065] Aguas abajo de la cámara de mezcla de muestra 10, a lo largo de un canal principal 16, hay un filtro grueso 18. El filtro grueso 18 filtra cualquier residuo grande en la muestra líquida, como la piel o el vello corporal, cuando la muestra líquida pasa a través del canal principal 16.

5 **[0066]** Aguas abajo del filtro grueso 18, a lo largo del canal principal 16, hay un fuelle 20 que tiene una válvula de fuelle aguas arriba 22a y una válvula de fuelle aguas abajo 22b. Como se describe con más detalle a continuación, el fuelle 20, junto con sus válvulas aguas arriba y aguas abajo 22a-b, es capaz de bombear la muestra líquida desde el extremo aguas arriba de la vía de fluido (es decir, desde la cámara de mezcla de muestras 10) al extremo de aguas abajo. En resumen, esto se logra gracias a membranas flexibles dentro del fuelle 20 y las válvulas 22a-b de aguas arriba y aguas abajo que actúan para crear diferenciales de presión locales para, por un lado, extraer la muestra líquida de la mezcla de muestra. la cámara 10 en el fuelle 20 y, por otro lado, desde el fuelle 20 más hacia abajo a través del canal principal 16. Esto se consigue mediante un accionamiento neumático cuidadosamente coreografiado de las membranas flexibles en las válvulas. Las disposiciones particulares de una válvula preferida pueden formar ellas mismas aspectos inventivos aislados del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación.

10 **[0067]** Aguas abajo de los fuelles a lo largo del canal principal 16 hay una columna de captura 24. El objetivo de la columna de captura 24 es separar los ácidos nucleicos de los restos celulares y otros componentes celulares. La columna de captura comprende un filtro de captura y un filtro de profundidad ambos hechos de fibras de vidrio. Una disposición particular de una columna de captura preferida puede en sí misma formar un aspecto inventivo aislado del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación.

15 **[0068]** Dos canales de derivación 26, 28 se unen al canal principal 16 entre la válvula de fuelle aguas abajo 22b y la columna de la captura 24. El propósito de los canales de derivación consiste en introducir tampones líquidos necesarios para realizar la prueba deseada. Por ejemplo, con la prueba realizada por el cartucho ejemplar, es necesario introducir un tampón de elución y un tampón de lavado en el canal principal una vez que ha pasado la muestra. El tampón de lavado está contenido en una ampolla 30 de tampón de lavado y el tampón de elución está contenido en una ampolla 32 de tampón de elución. La introducción del tampón de lavado y el tampón de elución en el canal principal 16 está controlado por la válvula 34 de tampón de lavado y la válvula 36 de tampón de elución, respectivamente. En el punto apropiado en la prueba, las ampollas de tampón de lavado y elución 30, 32 se colapsan para expulsar los tampones de lavado y elución a los canales de ramificación 26, 28 y desde allí al canal principal 16 a través del lavado y válvulas de tampón de elución 34, 36.

20 **[0069]** Aguas abajo de la columna de captura 24, a lo largo de una bifurcación residual 16a del canal principal 16, hay una cámara de residuos 38. Una disposición particular de una cámara de residuos preferida puede formar un aspecto inventivo aislado del cartucho, como se describe más adelante en la sección 3, a continuación. El objetivo de la cámara de residuos 38 es recoger los residuos celulares y los componentes celulares distintos de los ácidos nucleicos y contenerlos, impidiendo así que entren en el canal de prueba 54a o en el canal de control 54b. La cámara de desechos 38 se ventila a la atmósfera a través de un respiradero de desechos 40, y se proporciona un impactador de aerosol 42 entre la cámara de desechos 38 y el respiradero de desechos 40 para evitar que la materia particulada se escape de la cámara de desechos 38 a la atmósfera. Una válvula de cámara de desechos 44 en la ramificación de desechos del canal principal 16a del canal principal 16 permite e impide que los fluidos pasen a la cámara de desechos 38 en puntos apropiados durante la prueba.

25 **[0070]** Aguas abajo de la columna de captura 24, a lo largo de una rama de elución 16b del canal principal 16, hay una cámara de elución 46. El objetivo de la cámara de elución 46 consiste en permitir que la preparación de muestra se asiente y que las burbujas se dispersen antes de que la muestra entre en las cámaras de amplificación. Una válvula de cámara de elución 48 en la derivación de elución 16b del canal principal 16 permite e impide que los fluidos pasen a la cámara de elución 46 en puntos apropiados durante la prueba.

30 **[0071]** Aguas abajo de la cámara de elución 46 es un canal de mezclado introncado 52. Aquí, la muestra preparada se mezcla antes de pasar por la válvula de aislamiento 50.

35 **[0072]** En la presente solicitud, los componentes aguas arriba de la válvula de aislamiento 50 se mencionan como comprendidos en el "extremo frontal" del cartucho, mientras que los componentes aguas abajo de la válvula de aislamiento 50 se mencionan como comprendidos en el "extremo posterior" del cartucho. En términos generales, la muestra de líquido está preparada para analizar en el extremo frontal del cartucho, y el análisis se lleva a cabo en la muestra en el extremo posterior del cartucho.

40 **[0073]** La válvula de aislamiento 50 está abierta para permitir que la muestra de líquido preparada pase desde el extremo anterior hasta el extremo posterior del cartucho. En un punto apropiado de la prueba, después de que la muestra líquida se ha preparado y está dentro del extremo posterior del cartucho para su análisis, la válvula de aislamiento 50 se cierra para evitar que cualquiera de las muestras vuelva a entrar en el extremo delantero. Una vez que la válvula de aislamiento 50 está cerrada, no puede abrirse nuevamente. La válvula de aislamiento 50 también actúa como una protección en caso de una falla de energía, en donde el lector cierra la válvula de aislamiento 50 para evitar fugas.

[0074] Aguas abajo de la válvula de aislamiento 50, la vía de fluido se divide en un canal de prueba de amplificación 54a y un canal de control de amplificación 54b. Cada uno de los canales de amplificación 54a-b comprende una cámara de amplificación 56a-b que tiene una válvula de entrada de la cámara de amplificación 58a-b y una válvula de salida de la cámara de amplificación 60a-b. Cualquier método de amplificación de ácido nucleico puede realizarse en la cámara de amplificación de ácido nucleico. Si se usa PCR, las cámaras de amplificación de ácido nucleico contienen una polimerasa de ADN termoestable, dNTPs, un par de cebadores que son capaces de hibridarse con el ácido nucleico a amplificar. Opcionalmente, las cámaras de amplificación de ácido nucleico pueden contener adicionalmente sales de tampón, MgCl₂, agentes de pasivación, N-glicosilasa de uracilo y dUTP. Un ejemplo de una polimerasa de ADN termoestable que se puede usar es la polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*.

[0075] Cada una de las cámaras de amplificación de ácidos nucleicos en el cartucho ejemplar comprende características de contención de reactivos en forma de pozos poco profundos primero y segundo formadps en la capa de fluido. Los reactivos que se utilizarán en el cartucho se detectan en los pocillos. En el cartucho ejemplar, los reactivos específicos de la prueba y los reactivos genéricos se aíslan uno del otro al detectar cada uno en un pozo diferente. Por lo tanto, los reactivos específicos de la prueba se detectan en un primer pozo en la cámara y los reactivos genéricos se detectan en un segundo pozo en la cámara. Al detectar los reactivos por separado, es más fácil intercambiar los reactivos específicos de la prueba durante la fabricación por un conjunto diferente de reactivos específicos para la prueba, a fin de realizar una prueba diferente, mientras se mantienen los reactivos genéricos tal como están.

[0076] En el cartucho de ejemplo, la relación de cámaras de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de las cámaras es de 1:2. La muestra preparada entra en el extremo posterior del cartucho en la válvula de aislamiento 50 y se divide en dos cámaras de amplificación de ácido nucleico. Después del procesamiento, cada una de las dos medidas procesadas de muestra de la cámara de amplificación de ácido nucleico se divide en dos cámaras de detección. Por lo tanto, para cada muestra introducida en el cartucho ejemplar, se pueden llenar cuatro cámaras de detección desde dos cámaras de amplificación de ácido nucleico, facilitando así la amplificación dúplex y la detección de 4-plex.

[0077] Sin embargo, se apreciará que una o tres o más cámaras de amplificación de ácidos nucleicos se pueden proporcionar para proporcionar cualquier nivel de multiplexación deseado, y que el número de las cámaras de detección proporcionadas puede ser ajustado en consecuencia para mantener una relación 1:2 de cámaras de amplificación de ácido nucleico a cámaras de detección.

[0078] La relación de 1:2 es preferido para el cartucho ejemplar porque una tal relación permite que dos veces el número de ácidos nucleicos diana se ensayen en comparación con el número de diferentes etiquetas requeridas para la detección en las cámaras de detección. Sin embargo, se apreciará que la relación puede cambiar dependiendo del número de etiquetas y los objetivos de PCR para la muestra líquida. Por ejemplo, la relación puede ser 1:1, 1:3 o 1:n, de modo que hay n cámaras de detección que se ramifican desde el canal principal de cada vía de fluido cuando hay n veces tantos objetivos de PCR multiplexados para el número de etiquetas.

[0079] Los cebadores de PCR específicos para *Chlamydia trachomatis* se secan en la cámara de amplificación en el canal de prueba de amplificación junto con los otros reactivos requeridos para la amplificación de ácido nucleico. Cebadores de PCR específicos para un ácido nucleico de control positivo se secan en la cámara de amplificación en el canal de control de amplificación junto con los otros reactivos requeridos para la amplificación de ácido nucleico. También se proporciona un ácido nucleico de control positivo en la cámara de amplificación en el canal de control de amplificación, tomado de *Pectobacterium atrosepticum*. Los reactivos desecados se reconstituyen cuando la muestra líquida los alcanza.

[0080] Abajo de las válvulas de salida de la cámara de amplificación 60a-b, cada uno de los canales de amplificación 54a-b se divide en dos canales de detección adicionales, que conducen a dos cámaras de detección para cada cámara de amplificación, dando un total de cuatro cámaras de detección 62a-d en total. Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos, que incluyen la sonda diana, se secan en las cámaras de detección 62a-d aguas abajo de la cámara de amplificación de prueba 56a o 56b. Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos que incluyen la sonda de control se secan en las cámaras de detección aguas abajo de la cámara de amplificación de control 56a o 56b (cualquiera que no sea la cámara de prueba mencionada anteriormente). Cada cámara de detección 62a-d está provista de su propio resorte de gas 64a-d que forma un extremo muerto en el extremo aguas abajo de la ruta de fluido.

[0081] Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos se proporcionan en cámaras de detección. Los reactivos para la detección de ácidos nucleicos incluyen sondas que tienen un marcador de ferroceno. Estas sondas son capaces de hibridarse con los ácidos nucleicos amplificados. Después de la hibridación de las sondas con los ácidos nucleicos amplificados, las sondas se hidrolizan mediante una nucleasa específica de doble cadena que hace que la etiqueta se libere del resto de la sonda. Como se explicó anteriormente, la liberación de la etiqueta del resto de la sonda provoca un cambio detectable en la señal de la etiqueta. La sonda de control se proporciona en cámaras de detección separadas a la sonda diana y la detección del ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control tienen lugar en diferentes cámaras de detección, de modo que las señales se pueden distinguir entre sí.

[0082] Aguas abajo de las válvulas de salida de amplificación 60a-b, pero aguas arriba de las horquillas creando los cuatro canales de detección, dos canales de derivación 66a-b unen respectivamente los dos canales de amplificación 54a-b. El propósito de los canales de derivación 66a-b es eliminar el exceso de muestra de líquido dentro de los canales de amplificación 54a-b antes de que la muestra de líquido entre en las cámaras de detección 62a-d. Los canales de derivación 66a-b se conectan a una válvula de derivación 68, que también está acoplada de forma fluida a la rama de la cámara de elución 16b del canal principal 16, aguas abajo de la válvula de aislamiento 50, antes de que el canal se divida en los canales de amplificación 54a y 54b.

[0083] Una disposición particular de una cámara preferida en el cartucho, tales como las cámaras de amplificación primera y segunda o la primera a la cuarta cámara de detección, puede en sí formar un aspecto de la invención aislado del cartucho, como se describe adicionalmente en la sección 3, a continuación.

[0084] Se apreciará que el número de cámaras de amplificación, y el número de cámaras de detección en el cartucho ejemplar pueden variar dependiendo de la implementación preferida. Además, otras configuraciones de canales, cámaras, válvulas, etc. son posibles sin apartarse del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones.

[0085] La estructura física y la operación de los varios componentes del cartucho ejemplar introducido anteriormente se explicará ahora con referencia a las Figuras 2 a 10.

1.3 Estructura física de un cartucho ejemplar

1.3.1 Visión general y características externas del cartucho ejemplar

[0086] Un cartucho de ejemplo se muestra en la Figura 2. Como se describió anteriormente, el lector interactúa con el cartucho a través de una pluralidad de interfaces. Las interfaces mostradas en el cartucho ejemplar 100 son: una interfaz neumática 101; una interfaz eléctrica 102; una interfaz de válvula de derivación 103; y una interfaz de válvula de aislamiento 104. Cada una de estas interfaces se describe con más detalle a continuación. Se apreciará que se podrían proporcionar más o menos interfaces, dependiendo de la implementación preferida.

[0087] También se proporciona en el cartucho, pero no se muestra, es una interfaz térmica. La interfaz térmica permite que la temperatura de las cámaras de amplificación se regule para permitir que tenga lugar la amplificación de ácidos nucleicos.

[0088] El cartucho ejemplar 100 mostrado en la Figura 2 comprende un extremo de inserción 105 para la inserción en el lector, y un extremo no de inserción 106. Cerca del extremo de no inserción 106 es una entrada de muestra 107 para introducir una muestra en la cámara de mezcla de muestra 10. En el cartucho de ejemplo, la muestra generalmente incluirá células, y el ácido nucleico diana (si está presente) se puede extraer de estas células, pero otras muestras de fluidos como elución de un hisopo, orina, semen, la sangre, la saliva, el sudor de las heces y las lágrimas podrían usarse en otras implementaciones. La muestra puede introducirse en la cámara de mezcla de muestra 10 a través de la entrada de muestra 107 usando una pipeta, por ejemplo.

[0089] El cartucho ejemplar 100 y el lector están configurados de manera que, cuando se inserta el cartucho en el lector, todas las interfaces mencionadas sean accionables por el lector. Por otro lado, la entrada de muestra 107 permanece externa al lector de modo que se puede introducir una muestra en la cámara de mezcla de muestra 10 mientras que el cartucho se inserta en el lector.

[0090] El cartucho ejemplar 100 mostrado en la Figura 2 comprende además una ventana del indicador de muestra 109, a través del cual el indicador de muestra 12 es visible para determinar si una muestra se ha introducido en la cámara 10 de mezclado de la muestra.

[0091] Todo el neumático, las interfaces mecánicas y eléctricas en el cartucho ejemplar 100 están situadas en la misma cara del cartucho, en este caso se proporciona en la cara superior 110. La interfaz térmica (no mostrada) se proporciona en la cara inferior del cartucho. Esto simplifica el diseño del lector, que puede proporcionar las partes neumáticas, mecánicas y eléctricas asociadas que interactúan con esas interfaces en la misma región del lector, aprovechando así mejor el espacio. También permite que la parte térmica del lector se proporcione lejos de las partes neumáticas, mecánicas y eléctricas.

1.3.2 Componentes internos del cartucho

[0092] El cartucho ejemplar 100 mostrado en la Figura 2 se forma a partir de diversos componentes que se describirán ahora. La Figura 3 muestra una vista en despiece ordenado del cartucho de ejemplo 100 de la Figura 2. El cartucho 100 comprende, de arriba a abajo, una carcasa 111, un subconjunto de ampollas 112, una lámina neumática 113, una capa neumática 114, una capa fluida 115 y una lámina fluida 116. También se muestra en la Figura 3 una capa de electrodo 117, dos filtros 118 y una pluralidad de almohadillas absorbentes 119, que se describirán con más detalle a continuación.

[0093] La carcasa 111 se fabrica a partir de estireno de butadieno de acrilonitrilo. Las láminas neumáticas y fluidicas 113, 116 están fabricadas a partir de un material compuesto de tereftalato/polipropileno de polietileno. Las capas 114, 115 neumáticas y fluidicas se fabrican a partir de polipropileno.

5 **[0094]** Con la excepción de la carcasa 111, los filtros 118 y las almohadillas 119, cada uno de los componentes mencionados en el párrafo anterior se adhiere a su componente o componentes adyacentes. Por lo tanto, el subconjunto de ampollas 112 se adhiere a la lámina neumática 113, que está adherida a la capa neumática 114, que está adherida a la capa fluidica 115, que está adherida a la lámina fluidica 116. La capa de electrodo 117 está adherida a la capa fluidica 115 también.

10 **[0095]** La adhesión de las capas entre sí proporciona una serie de canales de fluido estancos en el cartucho, junto con cámaras asociadas, válvulas, bombas, los fuelles y otros componentes. Los canales que pasan una muestra de líquido a su través son estancos a los líquidos y los canales que pasan un gas a su través son herméticos a los gases. Opcionalmente, todos los componentes son estancos a los líquidos y estancos a los gases. Por ejemplo, los huecos y aberturas formadas en uno o ambos lados de las capas neumáticas y fluidicas crean, cuando se juntan y se adhieren a las láminas neumáticas y fluidicas, respectivamente, las formas necesarias para proporcionar los canales antes mencionados, cámaras, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes.

20 **[0096]** Cada uno de los componentes mencionados anteriormente en la Figura 3 se describirá ahora en más detalle.

1.3.3 Carcasa 111

25 **[0097]** La Figura 4 muestra la carcasa 111 con más detalle. Como se muestra, la carcasa 111 comprende una superficie superior 120 generalmente rectangular y paredes 121 que dependen de la misma en los cuatro lados (dos de los cuales son visibles en la Figura 4). Un propósito principal de la carcasa 111 es proteger ciertos componentes del cartucho, más notablemente el subconjunto de ampolla 112 y la interfaz 104 de la válvula de aislamiento. Por lo tanto, se observará que la carcasa 111 es más corta que las capas 114, 115 neumáticas y fluidicas, de modo que solo recubre una parte de esas capas cuando el cartucho 100 está ensamblado. En el cartucho ejemplar 100, la interfaz neumática 101, la interfaz electrónica 102 y la interfaz de la válvula de derivación 103 no están cubiertas por la carcasa 111 para proporcionar un fácil acceso al lector.

35 **[0098]** La superficie superior 120 de la carcasa 111 tiene tres aberturas 122a-c en la misma, teniendo cada una paredes dependiendo de las periferias de las aberturas para formar tres rebajes, cuando el cartucho está montado. El propósito de los rebajes es alojar las ampollas del subconjunto de ampolla 112 de manera que el lector pueda acceder y comprimir las ampollas, pero de lo contrario están protegidas contra impactos accidentales. Naturalmente, dado que el cartucho ilustrativo comprende tres ampollas, la carcasa 111 comprende tres aberturas correspondientes 122a-c que forman tres rebajes correspondientes. Se apreciará que se pueden proporcionar más o menos ampollas, aberturas y rebajes, dependiendo de la implementación preferida. Alternativamente, la carcasa 111 podría comprender una única abertura que forma un único rebaje que aloja todas las ampollas disponibles.

40 **[0099]** Las paredes laterales 121 de la carcasa 111 que se extienden a lo largo de la longitud de la carcasa 111 entre el extremo de inserción 105 y el extremo no de inserción 106 del cartucho 100 comprenden bridas 123 a lo largo de al menos una porción de sus bordes inferiores. El propósito de las bridas 123 es doble. En primer lugar, comprenden una o más ventanas 124a-b para recibir un número correspondiente de lengüetas formadas en la capa neumática 114 para mantener unido el cartucho 100. En segundo lugar, las bridas 123 están dimensionadas para sobresalir más allá de la superficie inferior de la lámina fluidica 116 cuando el cartucho está montado, de modo que la lámina fluidica 116 se suspende por encima de una superficie plana sobre la que se coloca el cartucho 100. Esto evita daños accidentales a la lámina fluidica 116 que podría resultar de lo contrario.

50 **[0100]** A pesar de que en el cartucho ejemplar representado en la Figura 4 las bridas 123 se proporcionan a lo largo de sustancialmente la longitud de dos lados opuestos del cartucho, se apreciará que las bridas se pueden proporcionar a lo largo de tres o cuatro bordes del cartucho y todavía suspender la lámina sobre una superficie plana sobre la cual se coloca el cartucho. De manera similar, aunque el cartucho representado en la Figura 4 muestra bridas 123 que se extienden sustancialmente a lo largo de todo el borde, se puede proporcionar una brida que se extiende solo parcialmente a lo largo de un borde, o se pueden proporcionar múltiples bridas a lo largo de cada borde.

60 **[0101]** La carcasa 111 comprende además, en el extremo 106 de no inserción, una empuñadura 125 para facilitar la inserción del cartucho y la extracción del cartucho 100 del lector a mano. La empuñadura 125 comprende una serie de crestas y surcos formados en la carcasa 111, pero también son posibles estructuras alternativas para aumentar la fricción, tales como moletas.

65 **[0102]** La carcasa 111 comprende además una abertura de entrada de muestra 126 a través de la cual una muestra se puede introducir en la cámara 10 de mezclado del cartucho 100 con una pipeta, por ejemplo de muestra. Alrededor de la abertura de entrada 126 para un diámetro dado está una depresión 127 empotrada en la superficie superior 120 de la carcasa 111 para acomodar una cierta cantidad de derrame de la muestra de líquido. Aunque la

5 cubeta 127 de la realización a modo de ejemplo es sustancialmente plana, puede estar inclinada hacia la abertura de entrada 126, de manera que cualquier derrame drena a través de la abertura de entrada 126.

5 **[0103]** La carcasa ejemplar 111 comprende además una pluralidad de escotaduras: un primer corte de salida 128 que forma la ventana de muestra 109, y un segundo recorte 129 para proporcionar acceso a la interfaz válvula de aislamiento 104. Como con los rebajes que protegen las ampollas, al proporcionar acceso a la interfaz 104 de la válvula de aislamiento solamente a través de un corte 129 en la carcasa 111, la interfaz 104 de la válvula de aislamiento está protegida en cierta medida del impacto accidental, que podría accionar la válvula de aislamiento y cartucho inoperable.

10 **1.3.4 Subconjunto de ampolla 112**

15 **[0104]** La Figura 5 muestra el subconjunto de ampollas 112 en más detalle. El subconjunto de ampollas 112 se puede fabricar por separado, durante el cual las ampollas se llenan previamente con los reactivos líquidos necesarios para realizar la prueba preferida, y se adhieren subsiguientemente a la lámina neumática 113.

20 **[0105]** Los subconjuntos de ampolla (o "ampollas") son familiares para una persona experta. Una ampolla es una cámara plegable para contener un líquido, que puede expulsarse de la ampolla al presionar la ampolla y, por lo tanto, colapsarla. En las ampollas típicas, la cámara de una ampolla se sella con una lámina u otra capa frangible que se rompe una vez que la presión dentro de la cámara alcanza una magnitud particular a medida que se colapsa la ampolla.

25 **[0106]** En el cartucho ilustrativo, el subconjunto de ampollas 112 comprende tres ampollas 130a-c. Éstas contienen, respectivamente, el tampón de lisis que comprende reactivos capaces de realizar la lisis celular, el tampón de lavado y el tampón de elución.

30 **[0107]** Los ejemplos de subconjunto de ampollas 112 comprende un sustrato 131 sobre el cual las ampollas antes mencionadas 130a-c están formadas por una capa polimérica deformable que está conformada para proporcionar las cámaras. Tres aberturas 132a-c, que corresponden a las tres ampollas 130a-c, pasan a través del sustrato 132. Cada una de las aberturas está cubierta por la capa polimérica deformable que forma la cámara, que de este modo conecta la abertura con la cámara pero para un sello 133a-c entre las respectivas aberturas 132a-c y cámaras. Tras la aplicación de una presión adecuada sobre la ampolla 130a-c, el sello 133a-c se rompe, provocando que los contenidos líquidos de la ampolla sean expulsados de la ampolla y fluyan a través de la abertura 132a-c en el sustrato 131 hacia fuera del subconjunto de ampolla.

35 **[0108]** Como se muestra, los sellos 133a-c, al menos parcialmente rodean la periferia de las cámaras, donde se reúnen el sustrato 131. En el punto en cada sello 133a-c que está diseñado para romper (formando de este modo el paso de líquido entre la abertura 132a-c y la cámara), la junta 133a-c puede ser más débil que el resto de la periferia. Esto asegura que la parte correcta del sello 133a-c se rompe cuando se aplica la presión adecuada.

40 **[0109]** Las ampollas pueden colapsarse por el lector cuando el cartucho se inserta en el mismo. El lector puede aplicar uno o más actuadores mecánicos (como un pie) en el rebaje para colapsar la ampolla.

45 **[0110]** El subconjunto de ampolla 112 comprende además dos agujeros de referencia 134a-b configurados para permitir que un aparato de montaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento del conjunto durante la fabricación.

1.3.5 Capa neumática 114

50 **[0111]** Las Figuras 6A y 6B muestran la capa neumática 114 con más detalle. La Figura 6A es una vista superior de la capa neumática y la Figura 6B es una vista inferior. La capa neumática 114 está compuesta por una capa de plástico rígido 135 que, en ciertos lugares, se sobremoldea con una pluralidad de membranas flexibles para formar ciertos componentes cuando se ensambla el cartucho. Las membranas flexibles se fabrican a partir de un elastómero termoplástico.

55 **[0112]** La capa de plástico rígido 135 tiene una pluralidad de huecos en forma diferente y aberturas a su través. En combinación con la capa fluidica 115, ciertos rebajes dentro de y/o aberturas a través de la capa plástica rígida 135 forman una serie de componentes, que incluyen: la cámara de mezcla de muestra 136; la cámara de desechos 137; la columna de captura 138; la cámara de elución 139; la primera y la segunda cámaras de amplificación 140a-b; y las cámaras de detección primera a cuarta 141a-d. También se proporciona una abertura 142 para dar acceso a la capa de electrodo 117.

60 **[0113]** En combinación con las membranas flexibles sobremoldeadas y la lámina neumática 113, algunas otras realizaciones a través de la capa de plástico rígido forman una serie de otros componentes, que incluyen: la válvula de fuelle aguas arriba 142; el fuelle 143; una interfaz neumática 144; la válvula de fuelle aguas abajo 145; la válvula de entrada del tampón de lavado 146; la válvula de entrada de aire del regulador de lavado 146a; la válvula de

5 entrada del tampón de elución 147; la válvula de entrada de aire de tampón de elución 147a; la válvula de la cámara de desechos 148; la válvula 149 de la cámara de elución; la válvula de aislamiento 150; las válvulas de entrada primera y segunda de la cámara de amplificación 151a-b; y las válvulas de salida primera y segunda de la cámara de amplificación 152a-b. Una abertura adicional, en combinación con una membrana flexible sobremoldeada (pero no la lámina neumática) forma una válvula de derivación 153.

10 **[0114]** Con la excepción de la válvula de aislamiento 150 y la válvula de derivación 153, las válvulas formadas en la capa neumática son válvulas accionables neumáticamente. Es decir, cada válvula es operable para abrir y cerrar un canal de fluido en el que se encuentra la válvula, y esta válvula está accionada aplicando una presión particular a una línea de control neumático acoplada a la válvula. Las líneas de control neumáticas están acopladas a la interfaz neumática 144, a la que tiene acceso el lector cuando el cartucho 100 se inserta en el mismo. Por lo tanto, para accionar una válvula neumática dada, el lector simplemente aplica una presión apropiada a la línea de control neumático asociada con esa válvula para abrir o cerrar la válvula.

15 **[0115]** La válvula de aislamiento 150 y la válvula de derivación 153 también son accionadas por el lector, pero mecánicamente. De nuevo, cada válvula es operable para abrir y cerrar un canal de fluido en el que se encuentra la válvula, pero la válvula se acciona mediante la aplicación de uno o más actuadores mecánicos (como un pie) a la válvula.

20 **[0116]** La capa de neumático comprende además dos agujeros de referencia 154a-b configurados para permitir que un aparato de montaje para proporcionar una referencia para facilitar el posicionamiento de la capa durante la fabricación. Cuando el cartucho está ensamblado, los agujeros de referencia 154a-b en la capa neumática se alinean con los agujeros de referencia 134a-b en el subconjunto de ampolla.

25 **[0117]** La capa neumática comprende además aberturas 155a-c que, cuando el cartucho está montado, se alinean con las aberturas 132a-c que pasan a través del sustrato 131 del subconjunto de ampolla (a través de la lámina neumática, como se describe abajo).

30 1.3.6 Lámina neumática 113

[0118] La Figura 7 muestra la lámina neumática 113 con más detalle. Como se ha explicado anteriormente, la lámina neumática 113 se adhiere a la superficie superior de la capa neumática 114, sellando así fluidamente canales, cámaras, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes formados en la misma. Por lo tanto, en su mayor parte, la lámina neumática 113 es una hoja de lámina generalmente plana y rectangular para proporcionar un cierre eficaz. Beneficiosamente, la lámina neumática 113 es inerte, de modo que no reacciona con los reactivos que se mueven a través de la capa neumática 114.

40 **[0119]** Sin embargo, la lámina neumática 113 no se superpone a toda la capa de neumático 114. En particular, la lámina neumática 113 no recubre la cámara de mezcla de muestra 136 o la cámara de residuos 137 en el extremo no de inserción 106 del cartucho 100, o la válvula de derivación 153 en el extremo de inserción 105. Además, la lámina neumática 113 comprende recortes 156, 157, de manera que no se superpone a la válvula de aislamiento 150 o la interfaz neumática 144, respectivamente.

45 **[0120]** La lámina neumática 113 comprende además tres aberturas 158a-c que, cuando el cartucho 100 se ensambla, se alinean con las aberturas 132a-c que pasan a través del sustrato 131 del subconjunto de ampolla y 155a- c que pasa por la capa neumática 114. Las aberturas 158a-c permiten que los reactivos líquidos dentro de las ampollas pasen a la capa neumática 114, y de allí a la capa fluidica 115 a través de las aberturas 155a-c.

50 **[0121]** La lámina neumática 113 comprende dos agujeros de referencia 159a-b configurados para permitir que un elemento de ensamblaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento de la capa durante la fabricación. Cuando el cartucho está ensamblado, los agujeros de referencia 159a-b en la lámina neumática se alinean con los agujeros de referencia en las otras capas.

55 **[0122]** La lámina neumática es una lámina compuesta fabricada a partir de una capa de tereftalato de polietileno, para proporcionar resistencia, con una capa de polipropileno en la parte superior para proporcionar un material inerte para contactar la muestra líquida y los tampones, y también para permitir que la lámina sea sellada térmicamente a la capa neumática (también fabricada de polipropileno).

60 1.3.7 Capa fluidica 115

65 **[0123]** Las Figuras 8A y 8B muestran la capa de fluido 115 en más detalle. La Figura 8A es una vista superior de la capa neumática y la Figura 8B es una vista inferior. La capa fluidica 115 está compuesta de una capa rígida de plástico 160. Como se explicó anteriormente, el lado superior de la capa fluidica 115 (no mostrada) está adherido al lado inferior de la capa neumática 113 (véase la Figura 5B) de manera que los diversos canales, las cámaras, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes formados por una combinación de las capas neumática y fluidica están alineados.

5 **[0124]** Al igual que con la capa de plástico rígido 135 de la capa neumática 113, la capa de plástico rígido 160 de la capa de fluido 115 tiene una pluralidad de cavidades de diferentes formas en la misma y las aberturas a través de la misma. En combinación con la capa neumática 113 y la lámina fluida 116, ciertos rebajes dentro y/o aberturas a través de la capa rígida de plástico 160 forman ciertos componentes, que incluyen: la cámara de entrada de muestra
10 la cámara de captura 138; la cámara de elución 139; las cámaras de amplificación primera y segunda 140a-b; y las cámaras de detección primera a cuarta 141a-d. la válvula de fuelle aguas arriba 142; el fuelle 143; la interfaz neumática 144; la válvula de fuelle aguas abajo 145; la válvula de entrada del tampón de lavado 146; la válvula de entrada de aire del regulador de lavado 146a; la válvula de entrada del tampón de elución 147; la válvula de entrada de aire de tampón de elución 147a; la válvula de la cámara de desechos 148; la válvula de la cámara de elución 149; la válvula de aislamiento 150; las válvulas de entrada primera y la segunda de la cámara de amplificación 151a-b; y válvulas de salida primera y segunda de la cámara de amplificación 152a-b. Una abertura 161 también se proporciona para dar acceso a la capa de electrodo 117.

15 **[0125]** Por otra parte, en combinación con la lámina de fluido 116 (pero no la capa de neumático 114), rebajes en la capa de fluido 115 también proporciona el filtro grueso 162, el canal de mezclado intrincado 163, y una pluralidad de canales que, cuando se ensambla el cartucho, conectan los componentes mencionados anteriormente para permitir el paso de la muestra líquida y reactivos líquidos a través del cartucho, y facilitar el accionamiento neumático de las válvulas, bombas, fuelles y otros componentes.

20 **[0126]** La capa de fluido comprende dos agujeros de referencia 164a-b configurados para permitir que un aparato de montaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento de la capa durante la fabricación. Cuando el cartucho está montado, los agujeros de referencia 164a-b en la capa fluidica se alinean con los agujeros de referencia en las otras capas.

25 **[0127]** Como se menciona anteriormente, los canales se forman entre la interfaz neumática y las diversas válvulas y fuelles descritos anteriormente. En el cartucho ejemplar, la interfaz neumática comprende 11 puertos que están conectados a los diversos componentes de la siguiente manera.

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

45 **[0128]** Se entenderá que, si bien los diversos aspectos inventivos del cartucho ejemplar pueden implementarse utilizando los específicos de las conexiones mencionadas anteriormente (en particular, la entrada de cámara de amplificación primera y segunda y válvulas de salida estando conectadas a un solo puerto; y las entradas de aire de tampón de lavado y elución están conectadas a un solo puerto); la configuración precisa enumerada anteriormente no es esencial.

50 1.3.8 Lámina Fluidica

55 **[0129]** La Figura 9 muestra la lámina fluidica 116 con más detalle. Como se ha explicado anteriormente, la lámina fluidica 116 se adhiere a la superficie inferior de la capa fluidica 115, cerrando de ese modo los canales, cámaras, válvulas, bombas, fuelles y otros componentes formados de manera fluida en los mismos. Por lo tanto, en su mayor parte, la lámina fluidica 116 es una hoja de lámina generalmente rectangular y plana para proporcionar un sellado eficaz. Beneficiosamente, la lámina 116 es inerte de manera que no reacciona con los reactivos que se mueven en la capa neumática.

60 **[0130]** Sin embargo, la lámina fluidica 116 no cubre toda la capa fluidica 115. En particular, la lámina fluidica 116 no se superpone a las cámaras de detección 141a-d en el extremo de inserción 105.

65 **[0131]** La lámina de fluido 116 comprende dos agujeros de referencia 165a-b configurado para permitir que un aparato de montaje proporcione una referencia para facilitar el posicionamiento de la capa durante la fabricación. Cuando el cartucho está montado, los agujeros de referencia 165a-b en la lámina fluidica se alinean con los agujeros de referencia en las otras capas.

[0132] La lámina fluidica es una lámina compuesta fabricada a partir de una capa de tereftalato de polietileno, para proporcionar resistencia, con una capa de polipropileno en la parte superior para proporcionar un material inerte para contactar la muestra líquida y los tampones, y también para activar la lámina para ser termosellado a la capa fluidica (también fabricada de polipropileno).

5

1.3.9 Capa de electrodo 117

[0133] Finalmente, la Figura 10 muestra la capa de electrodo 117 con más detalle. Como se explicó anteriormente, la capa de electrodo 117 se adhiere a la capa fluidica 115. La capa de electrodo 117 comprende cuatro conjuntos de electrodos de detección 166a-d. Cada conjunto de electrodos de detección 166a-d comprende primeros a terceros contactos eléctricos 168a-d que se complementan con contactos eléctricos correspondientes en el lector cuando el cartucho se inserta en el mismo. Preferiblemente, los contactos eléctricos están hechos de plata para optimizar la conexión eléctrica. Preferentemente, los electrodos que están plateados con cloruro de plata se utilizan para garantizar un comportamiento galvánico óptimo.

15

[0134] Cada conjunto de electrodos de detección 166a-d comprende un electrodo de trabajo 169a-d; un contraelectrodo 170a-d y un electrodo de referencia 171a-d. Cada uno de los electrodos está acoplado a un contacto eléctrico respectivo. Cada conjunto de electrodos de detección 166a-d también comprende un dieléctrico 172a-d que cubre la interfaz entre los electrodos y los respectivos contactos eléctricos.

20

[0135] Una persona experta entiende que la señalización electroquímica puede usarse para indicar la presencia de dianas genéticas o inmunológicas. En el cartucho ejemplar, este proceso se realiza en la primera a la cuarta cámaras de detección 141a-d que están optimizadas para proporcionar la interfaz de prueba electroquímica.

25

[0136] Los electrodos 166a-d están dispuestos de tal manera que una muestra de líquido dentro de las cámaras de detección primera a cuarta 141a-d se pone en contacto con los conjuntos de electrodos primer a cuarto 166a-d. En las cámaras de detección, algunos compuestos en la muestra de fluido (denominados "electrolito") tienen una tendencia natural a migrar a electrodos e intercambiar electrones. Este efecto galvánico es cómo funcionan las baterías.

30

[0137] Todas las combinaciones de compuestos solubles tienen alguna actividad electroquímica, y la velocidad a la que se produce esta actividad (es decir, la cantidad de carga intercambiada) se determina exactamente por lo que son esos compuestos. Por lo tanto, es posible medir la presencia de diferentes analitos en la muestra líquida, buscando las características características de su electroquímica redox.

35

[0138] En el cartucho ilustrativo, la corriente requerida para mantener un estado redox dado en las cámaras de detección 141a-d se controla en diferentes estados redox. La corriente se suministra a través del electrolito desde los electrodos de trabajo 169a-d a los contraelectrodos 170a-d.

40

[0139] Los electrodos de referencia 171a-d también entran en contacto con el electrolito. Los voltajes se declaran con respecto a este electrodo de referencia porque su voltaje es en gran medida independiente de las condiciones redox y, por lo tanto, esto significa que solo se está midiendo el estado redox de la química en el electrodo de control.

45

[0140] Se aplica un barrido de tensión entre los electrodos de trabajo 169a-d y los contraelectrodos 170a-d por el lector, lo que genera el rango característico de condiciones redox. La corriente que pasa entre los electrodos de trabajo 169a-d y los contraelectrodos 170a-d luego se midió para obtener los resultados de la prueba. El barrido de tensión es un conjunto de tensiones que se incrementa lentamente y se aplica entre los electrodos. Preferiblemente, el barrido es de aproximadamente -0,7 voltios a aproximadamente +1 voltios con respecto al electrodo de referencia. El voltaje se aplica en impulsos incrementales consecutivos que tienen una amplitud de modulación de pulso de entre 30 y 80 milivoltios (preferiblemente entre 40 y 60 milivoltios, más preferiblemente 50 milivoltios). Preferiblemente, el incremento del paso de un pulso al siguiente está entre 1 y 5 milivoltios (preferiblemente entre 2 y 4 milivoltios, más preferiblemente 3 milivoltios). Al aplicar estos voltajes a través de los electrodos, se pueden obtener mediciones de corriente en la escala de 100s de nano amperios.

50

[0141] La disposición particular de los electrodos de detección ilustrados en la Figura 10 puede en sí misma formar un aspecto inventivo aislado del cartucho. Convencionalmente, el contraelectrodo en un potencióstato es más grande que el electrodo de trabajo para proporcionar un amplio suministro de electrones sobrantes. Sin embargo, se ha encontrado que invertir esta convención sorprendentemente ofrece mejores resultados para el cartucho ejemplar. Para la electroquímica realizada en la muestra líquida descrita anteriormente en el cartucho ejemplar, se encuentra que tener un electrodo de trabajo que es más grande que el contraelectrodo proporciona señales más grandes y mejores resultados por medio de una sensibilidad incrementada. En otras palabras, tener un flujo de corriente desde un electrodo de trabajo relativamente grande hasta un contraelectrodo relativamente pequeño ofrece mejoras con respecto a la disposición convencional.

55

[0142] Preferiblemente, cada electrodo de trabajo 169a-d se forma en una forma de U y cada electrodo contador

170a-d se forma en una forma alargada recta entre los dos dientes del respectivo electrodo de trabajo en forma de U.

5 **[0143]** Ahora se explicará brevemente el funcionamiento del método del cartucho ejemplar presentado anteriormente.

1.4 Método de operación del cartucho ejemplar

1.4.1 El extremo delantero

10 **[0144]** Como se describió anteriormente, una muestra de fluido (tal como una muestra de orina) se introduce en la cámara de mezcla de muestra 10 utilizando una pipeta de muestra. Una porción de la muestra pasa al indicador de muestra 12 para mostrar que hay una muestra presente en la cámara de mezcla de muestra.

15 **[0145]** Una vez que el cartucho 100 con una muestra en la cámara de mezcla 10 se inserta en un lector, y el lector se activa, la prueba puede comenzar. En primer lugar, el lector aplicará un accionador mecánico (tal como un pie) para colapsar la ampolla 14 de tampón de lisis. Al hacerlo, el tampón de lisis será expulsado a la cámara 10 de mezcla de muestras donde se mezclará con la muestra.

20 **[0146]** El fuelle 20 y sus válvulas 22a-b mueven entonces el tampón de muestra y la lisis de líquido hacia atrás y adelante en la muestra de la cámara de mezcla 10 a fin de mezclar la lisis y la muestra y para rehidratar el control interno. Después de la etapa de mezcla, se produce la incubación de la muestra y el tampón de lisis para permitir que tenga lugar la lisis celular.

25 **[0147]** El fuelle 20 y sus válvulas 22a-b entonces empezarán la operación para bombear la muestra desde la cámara 10 de mezcla de muestras, al canal 16 principal, a través del filtro grueso 18 y hacia la columna de captura 24. Dentro de la columna de captura 24, ácidos nucleicos están específicamente unidos a un filtro en la columna de captura en función de su tamaño y carga. La muestra de líquido no deseado pasa a la cámara de residuos 38.

30 **[0148]** Una vez que la muestra de líquido no deseado ha pasado a la cámara de residuos 38, dejando los ácidos nucleicos unidos a la columna de captura 24, el lector aplica un accionador mecánico (tal como un pie) para contraer la ampolla de tampón de lavado 30. Al hacerlo, el tampón de lavado será expulsado al primer canal de ramificación 26, y desde allí al canal principal 16. De nuevo, el fuelle 20 y sus válvulas 22a-b comenzarán a funcionar para bombear el tampón de lavado a través del canal principal 16 y a través de la columna de captura 24 para lavar restos celulares no deseados restantes y otros componentes celulares fuera de la columna de captura con el tampón de lavado a través de la cámara de residuos 38, o bien el tampón de lavado se descargará a las cámaras de residuos utilizando aire del lavado y/o entradas de aire de tampón de elución.

35 **[0149]** Una vez que la muestra de lavado ha pasado a la cámara de residuos 38, dejando sólo los ácidos nucleicos unidos y purificados en la columna de la captura 24, el lector aplica un accionador mecánico (tal como un pie) para contraer la ampolla de tampón de elución 32. Al hacerlo, el tampón de elución se expulsará al segundo canal de bifurcación 28, y desde allí al canal principal 16. De nuevo, el fuelle 20 y sus válvulas 22a-b comenzarán a funcionar para bombear el tampón de elución a través del canal principal 16 y a través de la columna de captura 24 para eluir los ácidos nucleicos de la columna de captura, o bien el tampón de elución se enjuagará en la columna de captura usando aire de las entradas de aire del tampón de lavado y/o elución. La muestra líquida preparada pasa luego a la cámara de elución 46; de nuevo, ya sea por bombeo o enjuague como se describe anteriormente.

40 **[0150]** La muestra se instala en la cámara de elución 46 permitiendo que las burbujas se dispersen antes de entrar en las cámaras de amplificación.

1.4.2 El extremo trasero

45 **[0151]** El fuelle 20 y sus válvulas 22a-b comenzarán entonces la operación de bombear la muestra de líquido de la cámara de elución 46, a través de la válvula de aislamiento 59, a través del canal de mezcla 52 y en las cámaras de amplificación 56a-b, o bien la muestra se descargará a las cámaras de amplificación utilizando aire de las entradas de aire del tampón de lavado y/o elución. En las cámaras de amplificación de ácido nucleico 56a-d, el ácido nucleico de interés, si está presente, se amplifica de modo que está presente a un nivel detectable. El ácido nucleico de control también se amplifica de modo que está presente a un nivel detectable. Como se menciona anteriormente, se puede usar cualquier método de amplificación de ácido nucleico. Cuando se usa PCR, los cebadores hibridan específicamente con el ácido nucleico de interés y se extienden mediante una polimerasa termoestable tal como la polimerasa Taq mediante la adición de dNTPs al extremo 3' de cada uno de los cebadores. Cualquier muestra de líquido en exceso puede ser eliminado de la vía de fluido a través de los canales de derivación 68.

50 **[0152]** El fuelle 20 y sus válvulas 22a-b comenzarán entonces la operación de bombear la muestra de líquido desde las cámaras de amplificación 56a-b y en las cámaras de detección 62a-d, o de lo contrario la muestra se enjuagará en las cámaras de detección usando aire de las entradas de aire del tampón de lavado y/o elución. En las cámaras

de detección, la sonda diana se hibrida específicamente con el ácido nucleico amplificado diana de interés y la sonda de control hibrida específicamente con el ácido nucleico de control amplificado. La nucleasa hidroliza las sondas diana y de control después de la hibridación de las sondas con el ácido nucleico amplificado. La hidrólisis de las sondas de control y objetivo libera las etiquetas de las sondas provocando un cambio detectable en la señal de las etiquetas.

[0153] Una vez que la muestra de líquido ocupa las cámaras de detección, el lector aplica un accionador mecánico a la válvula de aislamiento 50 para cerrar la válvula y aislar la muestra de líquido en el extremo posterior del dispositivo.

[0154] Los electrodos proporcionan una diferencia de potencial a través de al menos una cámara de detección. Dependiendo del estado de la etiqueta (es decir, si está unida a la sonda de longitud completa o si la sonda se hidrolizó y está libre o unida a un solo nucleótido o una parte corta de la sonda), la corriente que puede fluir a través de ella la cámara de detección será diferente. Por lo tanto, los electrodos permiten la detección por el lector del cambio en la señal de la etiqueta que resulta de la hidrólisis de la sonda hibridada.

[0155] La presente invención se describirá ahora con referencia a las Figuras 16 a 20.

2. Manejo de la muestra líquida en el extremo trasero

[0156] La siguiente sección describe la presente invención con más detalle con referencia a las Figuras 16 a 20. La invención puede ser implementada en el cartucho fluido ejemplar descrita anteriormente, específicamente en el extremo posterior del cartucho, aguas abajo de la válvula de aislamiento. Sin embargo, se apreciará que la presente invención tiene una serie de ventajas que pueden ser aplicables en circunstancias distintas del cartucho de fluidos a modo de ejemplo descrito anteriormente.

2.1 Medición de la muestra líquida

[0157] La Figura 16 muestra una primera realización de un sistema de válvula según la invención para dosificar una muestra líquida. El sistema de válvula C100 comprende una vía de fluido C110 para pasar fluido desde un extremo aguas arriba a un extremo aguas abajo, una cámara de procesamiento de muestras C102 dentro de la vía de fluido, que tiene una válvula de entrada C101 aguas arriba de la cámara de procesamiento de muestras C102 y una válvula de salida C103 aguas abajo de la cámara de procesamiento de muestras C102. La cámara de procesamiento de muestras puede ser, por ejemplo, una cámara de amplificación de ácidos nucleicos 58a-b descrita anteriormente con respecto al cartucho ejemplar, aunque también son posibles otras cámaras. Puede proporcionarse una región de procesamiento de muestra aguas abajo en el extremo aguas abajo de la ruta de fluido. En el cartucho ejemplar, la región de procesamiento de muestra aguas abajo puede ser la cámara diana C104, que está situada a lo largo de la vía de fluido aguas abajo de la válvula de salida C103. De nuevo, la cámara diana puede ser, por ejemplo, una cámara de detección 64a-d descrita anteriormente con respecto al cartucho ejemplar, aunque también son posibles otras cámaras. Independientemente de los fines para los que se colocan la cámara de procesamiento de muestra y la cámara diana, la cámara diana es una cámara a la que se debe suministrar el volumen de una muestra líquida, una vez que la muestra ha pasado a través de la cámara de procesamiento.

[0158] Un canal de derivación C105 está acoplado a la ruta del fluido en una unión entre la válvula de salida C103 y la cámara diana C104. El objetivo del canal de derivación C105 consiste en permitir que el exceso de muestra de líquido, que se debe evitar que entre en la cámara diana, se elimine de la vía de fluido, como se describe con más detalle a continuación.

[0159] La válvula de entrada C101 y la válvula de salida C103 pueden ser válvulas accionadas neumáticamente formadas en las capas neumáticas y fluidicas del cartucho ejemplar, por ejemplo. En la Figura 17 se muestra un diagrama de una válvula ejemplar accionada neumáticamente. Se puede formar una cavidad de válvula C201 en una sola capa de polímero o en una pluralidad de capas, tales como la capa de carcasa 111, la capa neumática 114 y la capa fluidica 115 del cartucho ilustrativo descrito anteriormente. Se forma una membrana de válvula flexible C202 dentro de la cavidad de válvula C201 para definir una cámara de válvula C203 entre la membrana de válvula C202 y la cavidad de válvula C201. La membrana puede sobremoldearse sobre la capa neumática, como se explicó anteriormente.

[0160] La cámara de válvula C203 tiene una primera abertura C204 y una segunda abertura C205, cada una conectada a un canal; bien el canal de derivación C105, un canal que forma parte de la vía principal C110, o cualquier otro canal. La membrana flexible C202 es movable entre una posición cerrada (Figura 17a), en la que la membrana flexible C202 sella contra las aberturas primera y segunda C204, C205 para evitar el flujo de fluido a través del canal o camino, y una posición abierta (Figura 17b), en donde la membrana flexible C202 está separada de las aberturas primera y segunda C204, C205 para permitir que el fluido fluya a través del canal o vía.

[0161] La válvula C200 comprende además un paso C206 que tiene una abertura en la cavidad de la válvula C201. La abertura del pasaje C206 está separada de las aberturas primera y segunda C204, C205 por la membrana

flexible C202. El pasaje C206 sirve como un canal de actuación para mover la membrana flexible entre sus posiciones abierta y cerrada para accionar la válvula. Preferiblemente, a presión atmosférica, la membrana de válvula C202 está sellada contra las aberturas primera y segunda C204, C205 y la válvula está cerrada. Por el contrario, cuando se aplica una presión de vacío o manométrica a través del paso de fluido C206, la presión dentro de la cavidad de la válvula C201 se reduce por debajo de la del canal de la vía de fluido C110 y la membrana flexible C202 se lleva a la posición abierta. El paso de actuación C206 se puede conectar a un puerto en la interfaz neumática a través del cual se puede aplicar la presión del vacío o del manómetro.

[0162] Con referencia a la Figura 16, se entenderá que las válvulas de entrada y salida C101, C103 pueden configurarse cada una de acuerdo con la válvula mostrada en las Figuras 17a-b. Preferiblemente, los pasos de actuación de las válvulas de entrada y de salida C101, C103 están acoplados a un único puerto en la interfaz neumática para permitir el accionamiento sustancialmente simultáneo de las válvulas de entrada y salida C101, C103. Para mejorar la precisión de la actuación simultánea, los pasos de actuación de la válvula a la interfaz neumática pueden tener la misma longitud y el volumen total de los pasos y las cavidades de la válvula son iguales. Esto asegura que al aplicar una presión manométrica a los pasos de actuación a través del puerto en la interfaz neumática (no mostrada), las válvulas de entrada y salida C101, C103 se abrirán y cerrarán simultáneamente. Para mejorar la velocidad de actuación, la válvula de entrada y las válvulas de salida C101, C103 pueden estar provistas de topes, como se describe con más detalle a continuación.

[0163] La disposición descrita anteriormente permite un volumen preciso de la muestra de líquido que se suministra desde el cámara de procesamiento de muestra C102 a la cámara diana C104, como se explicará ahora. Primero se introduce una muestra de líquido a través de la vía de fluido C110. La muestra pasa aguas abajo, a través de la válvula de entrada abierta C101 y hacia la cámara de procesamiento de muestras C102. Cuando la cámara de procesamiento de muestras está llena, la muestra líquida pasa más aguas abajo, a través de la válvula de salida abierta C103 de manera que al menos una porción de la muestra de líquido está aguas abajo de la válvula de salida C103.

[0164] En este punto, al menos la válvula de salida C103 (pero preferiblemente tanto la válvula de entrada C101 como la válvula de salida C103) está cerrada. Esto asegura que un volumen fijo y predeterminado de muestra de líquido está contenido entre la válvula de entrada C101 y la válvula de salida C103.

[0165] Una vez que la válvula de salida C103 (o la válvula de entrada C101 y la válvula de salida C103) está cerrada, el exceso de muestra de líquido aguas abajo de la válvula de salida puede ser retirado de la vía de fluido a través del canal de derivación C105. A continuación se describe una disposición preferida para eliminar el exceso de muestra de líquido, pero cualquier medio servirá para describir la presente realización de la invención. Por ejemplo, se puede aplicar un vacío al canal de derivación C105 para eliminar la muestra de líquido y un sistema de re-pressurización apropiado provisto para asegurar que la ruta del fluido vuelva a su presión operativa normal.

[0166] Una vez que la muestra excedente líquida se ha retirado de la vía de fluido aguas abajo de la Válvula de salida C103 a través del canal de derivación C105, existe un volumen fijo y predeterminado de la muestra de líquido entre la válvula de entrada C101 y la cámara diana C104. Por lo tanto, el volumen fijo y predeterminado de muestra líquida puede ser administrado a la cámara diana C104 simplemente abriendo la válvula de salida C103 y pasando el líquido desde la cámara de procesamiento de muestra a la cámara diana por cualquier proceso conveniente, tal como se describe anteriormente.

[0167] Como se explicará ahora, cuando se utiliza el sistema de válvula descrito anteriormente en relación con la Figura 16 en el cartucho fluídico ejemplar, se establece un sistema de medición C300 para la entrega de un volumen bien definido de muestra procesada a las cámaras de detección C306.

[0168] Con referencia ahora a la Figura 18, en el cartucho ejemplar descrito anteriormente, se proporcionan dos vías de fluido. Por supuesto, se pueden proporcionar más o menos vías dependiendo de la implementación preferida.

[0169] La primera vía de fluido C310a comprende una primera cámara de procesamiento de muestras C302a, una primera válvula de entrada C301a aguas arriba de la primera cámara de procesamiento de muestras C302a, una primera válvula de salida C303a aguas abajo de la primera cámara de procesamiento de muestras C302a y cámaras de detección primera y segunda C304a1, C304a2 que se ramifican desde el canal principal de la primera vía de fluido, aguas abajo de la primera válvula de salida C303a. Nuevamente, se pueden proporcionar más o menos cámaras de detección por vía de fluido, dependiendo de la implementación preferida.

[0170] Del mismo modo, la segunda vía de fluido C310b comprende una segunda cámara de procesamiento de la muestra C302b, una segunda válvula de entrada C301b aguas arriba de la segunda cámara de procesamiento de la muestra C302b, una segunda válvula de salida C303b aguas abajo de la segunda cámara de procesamiento de la muestra C302b y cámaras de detección tercera y cuarta C304b1, C304b2, que se ramifican desde el canal principal de la segunda vía de fluido C310b, aguas abajo de la segunda válvula de salida C303b.

[0171] Los canales de derivación primero y segundo C305a C305b están acoplados a las vías de fluido primera y

segunda C310a, C310b respectivamente entre las válvulas de salida C303 y las cámaras de detección C304. Si se proporcionaron más o menos vías de fluido, se apreciará que un número correspondiente de canales de derivación se puede conectar a ellas en un número correspondiente de uniones.

5 **[0172]** Aunque en la realización ilustrada en la Figura 18, la relación entre las cámaras de procesamiento de muestra y las cámaras diana es 1:2, se apreciará que la relación puede ser 1:1, 1:3 o 1:n tal que hay n cámaras diana que se ramifican desde el canal principal de cada vía de fluido.

10 **[0173]** Con referencia a la Figura 18, en una realización ejemplar del sistema de válvula de la presente invención, se proporciona además una válvula de control (o válvula de derivación) C315 a la que están acoplados los canales de derivación primero y segundo, las vías de fluido primera y segunda que provienen de la válvula de aislamiento 50, y los resortes de gas primero, segundo, tercero y cuarto C306, aguas abajo de las cámaras diana primera, segunda, tercera y cuarta C304, respectivamente. La válvula de derivación C315 es una válvula que se usa para controlar el movimiento de una muestra de líquido dentro del extremo posterior, como se describe con más detalle a
15 continuación. La muestra de líquido entra en el extremo posterior del cartucho de fluido a través de la válvula de aislamiento 50 y luego entra en las cámaras de amplificación C302a, C302b. Los muelles de gas 306a1-2 y 306b1-2 son orificios ciegos (es decir, extremos muertos en los canales) que contienen un gas comprimible. El gas comprimible se comprime cuando se introduce un fluido en el canal en el que se encuentra el resorte de gas, y el gas comprimible ejerce así una fuerza contra el fluido en el canal en una dirección opuesta a la del lugar desde
20 donde se introduce.

[0174] Una implementación del sistema de válvula C300 se explicará ahora con referencia a las Figuras 18 y 19. Una muestra líquida se introduce en el extremo posterior del cartucho ejemplar a través de la válvula de aislamiento 50 como se describe anteriormente. A medida que se introduce la muestra de líquido, las válvulas de entrada primera y segunda C301a-b y las válvulas de salida primera y segunda C303a-b están abiertas, y la válvula de derivación C305 está cerrada. A medida que la muestra de líquido pasa a lo largo de las vías de fluido primera y segunda C310a-b, se reduce el volumen entre el punto muerto de los resortes de gas C306a1-2, C306b1-2 y la muestra de fluido en las vías de fluido. Cuando la válvula de derivación C315 está cerrada, no puede escapar aire
25 aguas abajo de la muestra de fluido que avanza, y los resortes de gas C306a1-2, C306b1-2 se presurizan. La muestra de líquido continúa avanzando a lo largo de las vías de fluido primera y segunda C310a-b hasta que pasa por las válvulas de salida C303a-b, momento en el cual se sabe que se ha entregado un excedente de fluido a las cámaras de procesamiento de muestras C302a-b. Una vez que se ha entregado un excedente de muestra líquida y las cámaras de procesamiento de muestra C302a-b están llenas, las válvulas de entrada y salida C301a-b y C302a-b están cerradas.
35

[0175] Una vez que las válvulas de entrada y salida C301a-b y C302a-b están cerradas, la muestra se procesa en las cámaras de procesamiento de muestra C302a-b. En el cartucho ejemplar descrito anteriormente, se prevé que la amplificación por PCR se realizará en la muestra. Una vez que las válvulas de entrada y salida C301a-b y C302a-b están cerradas, y mientras que se procesa la muestra líquida en las cámaras de procesamiento de muestras C302a-b, se abre la válvula de derivación C315, mientras que las válvulas primera y segunda de entrada y salida C301a-b y C302a-b permanecen cerradas. La válvula de derivación se puede abrir mientras se está procesando la muestra de líquido, o después o antes de procesar la muestra de líquido. Cuando se abre la válvula de derivación C315, se permite que los canales de derivación primero y segundo C305a-b vuelvan a la presión atmosférica debido a que la
40 válvula de derivación se ventila a la atmósfera de cualquier manera conveniente. Dado que la presión en los canales de derivación C305a-b es ahora menor que la presión en los resortes de gas presurizados C306a1-2, C306b1-2, el exceso de fluido en las vías de fluido C310a-b es forzado a salir de las vías y hacia los canales de derivación C305a-b por la fuerza ejercida desde los resortes de gas C306a1-2, C306b1-2. Para garantizar que sustancialmente toda la muestra de líquido sobrante se fuerce fuera de las vías, los canales de derivación C305a-b se ubican inmediatamente por debajo de las válvulas de salida 303a-b para evitar que se formen patas muertas entre las
45 válvulas de salida 303a-b y las uniones en las que los canales de derivación 306a-b se unen a las vías de fluido.
50

[0176] Una vez que la muestra de fluido sobrante ha sido llevada a los canales de derivación C305a-b, las válvulas primera y segunda de entrada y de salida C301a-b y C302a-b se abren y la muestra procesada se hace avanzar a lo largo de las vías de fluido primera y segunda y se lleva a las cámaras de detección C304a1-2, C304b1-2.
55

[0177] Los pasos del método descrito anteriormente se establecen en la Figura 19.

2.2. Evacuación del exceso de muestra líquida

60 **[0178]** En la discusión anterior de un sistema de válvula para dosificar una muestra de líquido en una cámara de muestra, se dio un ejemplo de un mecanismo para expulsar una muestra de líquido sobrante usando muelles de gas. Este nuevo mecanismo para expulsar una muestra líquida sobrante no solo debe usarse junto con una cámara de procesamiento de muestras limitada por válvulas de entrada y salida, sino que podría usarse para expulsar una muestra de líquido sobrante de una vía de fluido principal aguas abajo de una válvula de salida de cualquier subsistema o región de procesamiento de muestra en un cartucho fluido, para garantizar que solo los contenidos que quedan aguas arriba de la válvula de salida pasen a la cámara diana.
65

[0179] Por lo tanto, la Figura 20 muestra una segunda realización de un sistema de válvula de acuerdo con la invención para expulsar una muestra de líquido del subsistema, tal como una región de procesamiento de muestra (no mostrada). El sistema de válvula C500 comprende una vía de fluido C510 para pasar fluido desde un extremo aguas arriba hasta un extremo aguas abajo, una válvula de salida C503 aguas abajo de la región de procesamiento de muestra (no mostrada) y una cámara diana C504 ubicada a lo largo de la vía de fluido aguas abajo de la válvula de salida C503. La cámara diana puede ser, por ejemplo, una cámara de detección 64a-d descrita anteriormente con respecto al cartucho ejemplar, aunque también son posibles otras cámaras, dependiendo de la región de procesamiento de muestra particular. Independientemente de la finalidad para la cual se coloca la cámara diana, la cámara diana es una cámara a la que se debe suministrar el volumen de una muestra líquida, una vez que la muestra ha salido de la región de procesamiento de la muestra.

[0180] Un canal de derivación C505 está acoplado a la ruta de fluido entre la válvula de salida C503 y la cámara diana C504. El objetivo del canal de derivación C505 es permitir que el exceso de muestra de líquido, que se debe evitar que entre en la cámara diana C504, se retire de la vía del fluido, como se describe con más detalle a continuación.

[0181] Un muelle de gas C506 se proporciona aguas abajo de la cámara diana C504. Como se explicó anteriormente, el muelle de gas C506 es un orificio ciego (es decir, un paso sin salida en el canal) que contiene un gas compresible. El gas compresible se comprime cuando se introduce un fluido en el canal en el que se encuentra el resorte de gas, y el gas compresible ejerce así una fuerza contra el fluido en el canal. Una válvula de derivación C515 también se proporciona dentro del canal de derivación. La válvula de derivación es una válvula que se usa para controlar el movimiento de una muestra líquida, como se describe a continuación.

[0182] Una muestra líquida pasa desde la región de procesamiento de muestra (no mostrada) y aguas abajo de la válvula de salida abierta C503. A medida que el líquido sale de la región de procesamiento de muestras, la válvula de salida C503 está abierta y la válvula de derivación C515 está cerrada. A medida que la muestra de líquido pasa a lo largo de la vía del fluido C510, se reduce el volumen entre el extremo sin salida del resorte de gas C506 y la muestra de fluido. Al estar la válvula de derivación C515 cerrada, no puede escapar aire aguas abajo de la muestra de fluido que avanza, y se presuriza el resorte de gas C506. La muestra de líquido continúa avanzando a lo largo de la vía de fluido C510 hasta que pasa por la válvula de salida C503. Una vez que esto sucede, está cerrada la válvula de salida C503.

[0183] Una vez que se cierra la válvula de salida, se abre la válvula de derivación C515, mientras que la válvula de salida permanece cerrada. Cuando se abre la válvula de derivación C515, se permite que el canal de derivación C505 regrese a la presión atmosférica, nuevamente en virtud de que la válvula de derivación se ventila a la atmósfera de cualquier manera conveniente. Dado que la presión en el canal de derivación C505 es ahora menor que la presión en los resortes de gas presurizados, el fluido sobrante en la ruta de fluido se fuerza fuera del camino y hacia el canal de derivación C505 por la fuerza ejercida desde el muelle de gas 506. Para asegurar que sustancialmente toda la muestra de líquido sobrante se expulse, el canal de derivación se ubica inmediatamente adyacente a la válvula de salida C503 para evitar que se forme un tramo muerto entre la válvula de salida 503 y la unión a la que se une el canal de derivación C506 se une al camino del fluido.

[0184] Una vez que la muestra de fluido excedente ha sido expulsada en el canal de derivación C505, C503 la válvula de salida se abre y se muestra procesada se hace avanzar a lo largo de la vía de fluido y se administra a la cámara de detección C504.

[0185] Se reconocerá que la forma de realización discutida en conexión con la Figura 20 puede implementarse con cualquier número de vías de fluido, cualquier número de cámaras diana, y cualquier número de resortes de gas. También se reconocerá que la realización discutida en la Figura 20 puede implementarse en el cartucho fluido ejemplar de la manera descrita anteriormente en conexión con las Figuras 18 y 19.

[0186] Una vez que la muestra de líquido en exceso se ha retirado de la ruta del fluido y se ha pasado a la válvula de derivación, se puede evitar que regrese a la vía del fluido por cualquier medio conveniente. Por ejemplo, en el cartucho de fluido ejemplar, la válvula de aislamiento y la válvula de derivación pueden configurarse para reducir la presión en el extremo posterior del cartucho, y preferiblemente desarrollar una presión negativa de fluido en el extremo posterior del cartucho, por lo tanto succionando el exceso de muestra de líquido hacia la válvula de derivación y evitando que regrese hacia la vía del fluido.

[0187] El uso de resortes de gas en las realizaciones descritas anteriormente en relación con las Figuras 18 a 20 es particularmente ventajoso porque permite que cantidades iguales de muestra procesada se administren a las cámaras diana incluso cuando los desequilibrios locales en presiones (tales como los causados por ciclos térmicos en un proceso de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo) pueden hacer que la administración exacta sea difícil. Al ventilar los resortes de gas C306 y las cámaras diana C304 a través de los canales de derivación C305 cuando la válvula de derivación está abierta y permitir que las cámaras diana se igualen, la presión dentro de las cámaras diana puede permanecer igual y garantizar la administración de cantidades iguales de muestra líquida.

[0188] Con referencia a la implementación de los sistemas de válvula de la presente invención en el cartucho ilustrativo (véanse las Figuras 18 y 19), se prefiere que el volumen combinado de la pluralidad de cámaras de detección que se ramifican desde cada cámara de procesamiento de muestras sea aproximadamente la mitad del volumen de la propia cámara de procesamiento de muestras. Esto es porque a medida que se avanza la muestra procesada desde la cámara de procesamiento de muestra C302, la muestra no procesada aguas arriba de la cámara de procesamiento de muestra también pasa a lo largo de cada vía de fluido C310 y se mezcla con el fluido procesado aguas abajo de la cámara de procesamiento de muestra C302. Al asegurar que hay disponible el doble de fluido procesado que la capacidad combinada de la pluralidad de cámaras de detección, solo el fluido procesado no diluido avanzará a las cámaras de detección C306. Por supuesto, esta relación es meramente preferida, y en realidad funcionaría cualquier relación en la que el volumen de la cámara de procesamiento de muestras sea mayor que los volúmenes combinados de las cámaras diana.

2.3 La válvula de derivación y el sistema de válvulas

[0189] La presente invención puede ser implementada junto con una válvula de derivación preferido, que se describirá a continuación, para conseguir una región de extremo mejorado de nuevo en un cartucho fluido, tal como el cartucho fluido ejemplar descrito anteriormente. La válvula de derivación puede ser la válvula de derivación 68 del cartucho fluido ejemplar descrito anteriormente. Sin embargo, se apreciará que la válvula de la presente invención tiene varias ventajas, que pueden ser aplicables en circunstancias distintas al cartucho fluido ilustrativo.

[0190] La Figura 21 muestra una primera realización de una válvula D100. La válvula D100 comprende una cavidad de válvula D101 y una membrana de válvula flexible D105 provista dentro de la cavidad de válvula D101. La cavidad de válvula D101 puede estar formada en una única capa de polímero o puede estar compuesta por una pluralidad de capas, tales como la carcasa 111, la capa neumática 114 y la capa fluidica 115 del cartucho ejemplar 100. La membrana de la válvula D105 está formada dentro de la cavidad de la válvula D101 y puede sobremoldearse sobre la capa neumática, como se explicó anteriormente.

[0191] La cavidad de válvula D101 tiene paredes laterales D130, un suelo D132 y está abierta en la parte superior. La cavidad D101 de la válvula comprende aberturas primera y segunda D102, D103 en el suelo D132 conectadas a los pasos primero y segundo, D112, D113 formados en la capa fluidica 115. Las aberturas primera y segunda D102, D103 pueden estar ubicadas en las porciones elevadas primera y segunda de la cavidad de la válvula D101 para formar los asientos de válvula primero y segundo.

[0192] Entre la membrana flexible D105 y el suelo D132 de la cavidad de la válvula D101, está definida una cámara de válvula D115. Por lo tanto, la cámara de válvula está conectada de forma fluida a las aberturas primera y segunda D102, D103.

[0193] La membrana de válvula D105 comprende una primera porción de membrana de válvula D122 y una segunda porción de membrana de válvula D123.

[0194] La primera parte de la membrana de válvula D122 se puede mover entre una posición abierta, en la que está separada de la primera apertura D102 y permite que el fluido fluya entre la primera vía de paso D112 y la cámara de válvula D115, y una posición cerrada, en la que sella contra la primera apertura D102 e impide cualquier flujo de fluido entre el primer conducto D112 y la cámara de válvula D115.

[0195] Del mismo modo, la segunda porción de membrana de la válvula D123 es móvil entre una posición abierta en la que está separada de la segunda apertura D103 y permite que el fluido fluya entre la segunda vía de paso D113 y la cámara de la válvula D115, y una posición cerrada, en que sella contra la segunda apertura D102 e impide cualquier flujo de fluido entre el segundo conducto D113 y la cámara de válvula D115.

[0196] Por lo tanto, se apreciará que la cámara de válvula D115 tiene un primer volumen, **V1**, cuando las porciones de válvula primera y segunda están en sus posiciones abiertas; un segundo volumen, **V2**, cuando una de las porciones de válvula primera y segunda está en su posición abierta y la otra está en su posición cerrada; y un tercer volumen, **V3**, cuando llas posiciones de válvula primera y segunda están en sus posiciones cerradas. Se apreciará que **V1 > V2 > V3**. El volumen **V3** es idealmente lo más pequeño posible, y puede ser sustancialmente cero.

[0197] Las porciones de membrana de válvula primera y segunda D122, D123 son accionables independientemente una de otra. Por ejemplo, cuando la válvula se usa en el cartucho ejemplar y cuando el cartucho se inserta en un lector, el lector puede aplicar actuadores mecánicos primero y segundo, tales como pies, para accionar las porciones de membrana de válvula primera y segunda D122 y D123 independientemente. Esto es ventajoso en un sistema sellado, tal como el extremo posterior del cartucho ejemplar en el que hay una presión crítica que debe mantenerse en un lado de la válvula. En este caso, el asiento de válvula correspondiente a los canales primero y segundo puede accionarse primero mientras que se mantiene la cámara de válvula abierta al canal de derivación, para evitar la presurización de los canales primero y segundo o el desplazamiento del líquido en los mismos.

[0198] Con referencia ahora a la Figura 22, se ilustra una segunda realización de una válvula D200. La segunda realización es idéntica a la primera (y los números de referencia similares se refieren a características similares), excepto que se proporciona una tercera abertura D204 en el suelo de la cavidad de la válvula además de las aberturas primera y segunda D202, D203. La tercera abertura D204 está conectada a un tercer paso D214 y está adaptada para ser sellada por la segunda porción de membrana de válvula D223, para evitar que el fluido se mueva entre el tercer paso D214 y la cámara de válvula D250.

[0199] En la realización mostrada en la Figura 22, las aberturas segunda y tercera D203, D204 están ubicadas en las partes elevadas segunda y tercera D243, D244. Sin embargo, se apreciará que las aberturas segunda y tercera pueden ubicarse en una sola porción elevada D343 como se muestra en la Figura 23, o que pueden estar ubicadas en una región sustancialmente al ras con el resto del suelo de la cavidad de la válvula.

[0200] Como se muestra, las aberturas segunda y tercera D203, D204 están separadas por la distancia b. La primera abertura D202 está separada de la segunda abertura D203 por la distancia a. La distancia a entre las aberturas primera y segunda D202, D203 es mayor que la distancia b entre las aberturas segunda y tercera D203, D204. Esto es conveniente para permitir que las aberturas segunda y tercera D203, D204 sean selladas por la segunda porción de membrana D223 y la primera abertura D202 a sellar por la primera porción de membrana D222.

[0201] Aunque en las realizaciones primera y segunda ilustradas en las Figuras 21 y 22, se muestra que la válvula tiene dos o tres aberturas, se apreciará que pueden proporcionarse cuatro o más aberturas. Las aberturas pueden agruparse de cualquier manera para ser selladas por la primera porción de membrana o la segunda porción de membrana, dependiendo de la implementación preferida. También se apreciará que, aunque en las realizaciones mostradas en los dibujos, se muestra que la membrana de válvula tiene partes de membrana de válvula primera y segunda, es posible que la membrana de válvula tenga tres o más porciones, cada una adaptada para sellar una o más aberturas y cada una adaptada para ser accionable independientemente.

[0202] Como se describió anteriormente, la primera porción de membrana de válvula D222 y la segunda porción de membrana de válvula D223 pueden ser accionadas mecánicamente por actuadores mecánicos primero y segundo D232, D233, que podrían, por ejemplo, ser proporcionados en un lector (no mostrado). El primer actuador mecánico D232 está configurado para moverse desde una primera posición en la que está separada de la primera porción de membrana de válvula D222 y una segunda posición en la que presiona la primera porción de membrana de válvula contra la abertura D202, sellando así la abertura. De manera similar, el segundo accionador mecánico D232 está configurado para moverse desde una primera posición en la que está separado de la segunda porción de membrana de válvula D223, a una segunda posición en la que presiona la segunda porción de membrana de válvula D233 contra la segunda abertura y la tercera apertura D203, D204.

[0203] La válvula puede configurarse de forma que los actuadores mecánicos D232 y D233 puedan contactar sustancialmente con toda la membrana de válvula D205. Alternativamente, la válvula puede configurarse de manera que los actuadores mecánicos D232 y D233 solo puedan contactar una parte de la membrana de válvula D105.

[0204] Con referencia ahora a las Figuras 23 y 24, se puede ver que al colocar las aberturas segunda y tercera relativamente juntas, la segunda porción de membrana de válvula D223 puede accionarse para sellar eficazmente las aberturas segunda y tercera D203, D204 sin requerir una gran área de superficie para contactar la membrana de la válvula D205. Por el contrario, la distancia relativamente grande entre las aberturas segunda y primera D202, D203 permite que la segunda porción de la membrana de válvula D223 sea presionada por el segundo medio de desviación sin presionar significativamente la primera porción de membrana de válvula D222.

[0205] Preferiblemente, la membrana de válvula D205 está formada por un polímero elásticamente deformable de manera que la válvula se bifurca en la primera posición. Preferiblemente, la membrana de válvula D205 tiene un espesor de al menos 0,25 mm, más preferiblemente un espesor de alrededor de 1 mm. Esto asegura que la membrana de la válvula sea lo suficientemente gruesa para proporcionar la competencia de un sello efectivo sobre las aberturas. Moviendo los medios de desviación D232, D233 desde la segunda posición a la primera posición, los medios de desviación D232, D233 ya no presionan la membrana de válvula D105 contra las aberturas D202, D203, D204 y la válvula vuelve a la posición abierta.

[0206] Se explicará una implementación de la válvula D200 con referencia a la Figura 25. En particular, la válvula D200 se usa como una válvula de derivación 68 en el extremo posterior del cartucho fluido ejemplar 100 discutido anteriormente.

[0207] La Figura 25 muestra las siguientes características del cartucho ejemplar 100: la ramificación de elución 16b del canal principal 16; la válvula de aislamiento 50; el canal de mezcla 52; los canales de PCR primero y segundo 54a, 54b y los canales de derivación primero y segundo 66a, 66b. Ciertas características presentes en el cartucho ejemplar 100 se omiten en la Figura 15 para mayor claridad.

[0208] La red de canales y válvulas a la que se hace referencia en el párrafo anterior forma un sistema de válvula D500; a saber, parte del extremo posterior del dispositivo fluido ejemplar. Se apreciará que la invención se puede

implementar en otros sistemas de válvulas y con otras redes de canales, dependiendo de la implementación preferida. En particular, se apreciará que el sistema en la Figura 25 se puede combinar con las características descritas en las secciones 2.1 y 2.2 anteriores.

5 **[0209]** Como se ilustra en la Figura 25, los canales de derivación primero y segundo 66a, 66b están conectados respectivamente a las aberturas segunda y tercera D203, D204 de la válvula de derivación D200. La primera abertura 202 y el primer paso D212 están acoplados a la rama de elución 16b del canal principal 16 aguas abajo de la válvula de aislamiento.

10 **[0210]** Como se describió anteriormente, el extremo posterior del cartucho de líquido ejemplar forma un sistema cerrado cuando está cerrada la válvula de aislamiento 50. Por lo tanto, una primera ventaja del uso de la válvula de derivación D200 en el sistema de válvula D500 que se muestra en la Figura 20 es que se puede usar para despresurizar el extremo posterior una vez que se completa la prueba. Esto puede ocurrir de la siguiente manera. Una vez que la muestra de líquido ha sido bombeada a las cámaras de detección (no mostradas) del cartucho
15 ejemplar 100, la válvula de aislamiento puede cerrarse para formar un sistema cerrado en el extremo posterior. Sin embargo, en un punto adecuado antes de que se cierre la válvula de aislamiento 50, la primera, y preferiblemente la segunda porción de membrana flexible D222, D223 pueden ser empujadas por actuadores mecánicos en sus posiciones cerradas, disminuyendo de este modo el volumen dentro de la cámara de válvula D250.

20 **[0211]** Cuando el volumen de la cámara de válvula D250 está por debajo de su máximo (por ejemplo, cuando una o ambas porciones de membrana flexibles D222, D223 está en su posición cerrada), la válvula de aislamiento puede cerrarse, formando así un sistema de sellado en el extremo trasero. Una vez que se cierra la válvula de aislamiento, las partes de membrana flexibles D222, D223 pueden retornar a sus posiciones abiertas, aumentando así el volumen de la cámara de válvula D250 a su máximo.

25 **[0212]** En un ejemplo, cuando la válvula D200 está en la posición abierta y la membrana de válvula D205 está separada de las aberturas D203, D204, como se muestra en la Figura 22, el volumen de la cámara de la válvula D250 es $V_{\text{cámara (abierto)}}$. Cuando la válvula D200 está en la posición cerrada, como se muestra en la Figura 24, el volumen de la cámara de la válvula D250 puede ser de aproximadamente 69 μl , pero podría ser de otros volúmenes,
30 incluido sustancialmente cero.

[0213] Por lo tanto, cuando la válvula D200 es la posición abierta, el volumen del sistema de válvula D500 es:

$$V_{\text{abierto}} = V_{\text{cámara (abierto)}} + V_{\text{red.}}$$

35 **[0214]** Cuando la válvula D200 está en la posición cerrada, el volumen del sistema de válvula D500 es:

$$V_{\text{cerrado}} = V_{\text{cámara (cerrado)}} + V_{\text{red.}}$$

40 **[0215]** Se apreciará que cuando el volumen cerrado de la cámara de válvula es sustancialmente cero:

$$V_{\text{cerrado}} = V_{\text{red.}}$$

45 **[0216]** Siempre que la válvula de aislamiento esté abierta cuando está cerrada la válvula D200, una cantidad de fluido igual a $V_{\text{cámara (abierto)}} - V_{\text{cámara (cerrado)}}$ será desplazado fuera de la red de canales (aguas arriba de la válvula de aislamiento) y habrá una cantidad de fluido igual a $V_{\text{red.}} + V_{\text{cámara (cerrado)}}$ en la red de canales (aguas abajo de la válvula de aislamiento).

50 **[0217]** Cuando se cierra la válvula de aislamiento 50, el sistema se convierte en un sistema cerrado y la cantidad de fluido en ese sistema es fija. Cuando la válvula D200 se vuelve a abrir después de que se ha cerrado la válvula de aislamiento, el volumen del sistema vuelve a abrirse. Ya que $V_{\text{abierto}} > V_{\text{cerrado}}$, se reduce la presión en el sistema y, preferiblemente, se crea una presión negativa en el sistema. Esta reducción de la presión reduce el riesgo de fugas del cartucho. Se apreciará que si esta reducción de presión es lo suficientemente grande, es posible crear una presión negativa en un sistema, incluso cuando el sistema está inicialmente ligeramente presurizado.

55 **[0218]** Al cerrar la válvula D200 para reducir el volumen del sistema, cerrando la válvula de aislamiento para cerrar el sistema y luego abrir la válvula D200 para aumentar el volumen del sistema, es posible reducir la presión en el sistema, y preferiblemente alcanzar una presión negativa dentro del extremo posterior del cartucho ejemplar. Preferiblemente, el cambio en el volumen de la cámara de válvula D250 es lo suficientemente grande como para
60 efectuar un cambio de presión significativo en la red fluidica. Aunque en las realizaciones mostradas en los dibujos, se muestra que la cámara de la válvula tiene dos o tres aberturas, se apreciará que este método de despresurización de un sistema funcionará con cualquier número de aberturas.

65 **[0219]** Como se describió anteriormente, los canales de derivación primero y segundo 66a, 66b se pueden usar para eliminar la muestra de fluido en exceso de las vías de fluido primera y segunda a través de los canales primero y segundo de PCR 54a, 54b. Por lo tanto, el primer canal de derivación 66a está acoplado a la primera vía de fluido en

el primer canal de PCR 54a y el segundo canal de derivación 66b está acoplado a la segunda vía de fluido en el segundo canal de PCR 54b.

[0220] En un momento apropiado en la prueba, es necesario cerrar la válvula de derivación D200. Sin embargo, cuando se cierra la válvula de derivación, existe el riesgo de que el cambio de presión causado por el sellado de la membrana contra las aberturas segunda y tercera D203, D204 empuje el fluido en los canales de derivación 66a, 66b hacia los canales de PCR 66a, 66b, particularmente si el fluido no puede escapar a otra parte del sistema. Esto es indeseable. Por lo tanto, una segunda ventaja del uso de la válvula de derivación D200 en el sistema de válvula D500 que se muestra en la Figura 25 es que el cambio de presión que causa dicho reflujo puede mitigarse.

[0221] Al usar una válvula D200, se puede llevar a cabo una primera etapa de aplicar una fuerza a la segunda porción de membrana de válvula para sellar la segunda porción de membrana de válvula contra las aberturas segunda y tercera de la cámara de válvula. La Figura 23 muestra la válvula D200 en una posición intermedia en la que las aberturas segundas y terceras están selladas por la segunda porción de membrana de válvula D223 mientras que la primera abertura D202 permanece abierta. Entonces se realiza una segunda etapa que comprende aplicar una fuerza a la primera porción de membrana de válvula D222 para sellar la primera porción de membrana de válvula D222 contra la primera abertura D202 en la cámara de válvula D250.

[0222] Cerrando las aberturas segunda y tercera antes de cerrar la primera abertura en la cámara de válvula, es posible evitar la presurización excesiva de los pasos segundo y tercero, y de hecho minimizar el flujo de retorno hacia los canales de derivación primero y segundo.

[0223] Aunque el método descrito anteriormente se refiere a una válvula que tiene aberturas primera, segunda y tercera, se apreciará que este método puede adaptarse para válvulas que tienen dos o cuatro o más válvulas dispuestas en dos grupos, donde el primer grupo de válvulas está sellado por la primera porción de membrana de válvula, y el segundo grupo de válvulas puede ser sellado por la segunda porción de membrana de válvula. En este contexto, se pretende que un grupo se refiera a una o más válvulas.

[0224] Preferiblemente, en realizaciones que tienen cuatro o más aberturas, la primera porción de membrana de válvula está configurada para sellar la primera abertura y la segunda parte de membrana de válvula está adaptada para sellar cualquier abertura posterior. Además, la abertura de la cámara de válvula puede estar situada en una parte elevada de la cámara de válvula para crear un asiento de válvula elevado. Cada parte elevada puede comprender múltiples aberturas, o cada abertura puede estar provista de su propia porción elevada. Alternativamente, algunas o todas las aberturas pueden no ubicarse en una parte elevada.

[0225] Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se ilustran en las figuras, se debe entender que varias alternativas a las realizaciones de la invención descritas en este documento se pueden emplear en la práctica de la invención.

3. Aspectos inventivos aislados adicionales

[0226] La siguiente es una lista no exhaustiva de aspectos aislados del cartucho ejemplar descrito anteriormente que puede reivindicarse. Estos aspectos se describen con referencia a las Figuras 11 a 15. La inclusión de esta sección no excluye que haya otros aspectos del cartucho ejemplar descrito anteriormente que también pueden reivindicarse.

3.1 Válvulas para minimizar el volumen muerto

[0227] A continuación se describirá una disposición ventajosa para una válvula en un cartucho fluídico, que puede formar un aspecto de la invención aislado.

[0228] Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona una válvula para un cartucho fluídico, comprendiendo la válvula:

- una cavidad de válvula que tiene aberturas primera y segunda conectadas a los pasos primero y segundo, respectivamente; y
- una membrana flexible que se puede mover entre una posición cerrada, en la que la membrana flexible sella contra las aberturas primera y segunda para evitar el flujo de fluido entre los pasos primero y segundo, y una posición abierta, en la que la membrana flexible está separada de las aberturas primera y segunda para permitir que el fluido fluya entre los pasos primero y segundo;
- en donde la cavidad de una válvula comprende un techo y un suelo, comprendiendo el suelo dichas aberturas primera y segunda; y que comprende además:
 - un tope entre la membrana flexible y el techo de la cavidad de la válvula, de manera que el tope restringe el movimiento de la membrana en su posición abierta.

[0229] Preferiblemente, el tope se proporciona en la membrana flexible, y comprende uno o más de una protuberancia, una jaula, un labio o una estructura transversal.

[0230] A veces es ventajoso limitar el grado en que la membrana flexible en una válvula descrita aquí puede viajar en su posición abierta. Es decir, es deseable minimizar la distancia que la membrana de la válvula se mueve hacia su apertura, y así minimizar la distancia que debe viajar para cerrarse. Al minimizar esta distancia, se reduce el volumen muerto dentro de la cavidad de la válvula, mejorando la reactividad de la válvula.

[0231] Por lo tanto, como se muestra con más detalle en la Figura 11, las realizaciones preferidas de una válvula 300 comprenden además un tope 302. El tope del examen ilustrado es una estructura transversal, pero en diferentes realizaciones puede ser una protuberancia, jaula, labio o similar, unida a la superficie superior de la membrana flexible 304 para contactar el techo 306 de la cavidad de la válvula y así limitar el movimiento de la membrana en su posición abierta.

[0232] Se debe apreciar que los canales y aberturas de la válvula no se muestran en la Figura 11.

[0233] El tope es particularmente ventajoso cuando se llenan las cámaras de amplificación del cartucho ejemplar, ya que reduce el volumen muerto en la cavidad de válvula y, por lo tanto, limita la distancia entre la superficie inferior de la membrana flexible y las aberturas en la cavidad de la válvula, permitiendo de este modo que se dosifique un volumen de fluido más preciso en las cámaras de amplificación.

3.2 Presión de ruptura en las válvulas

[0234] A continuación se describirá una disposición ventajosa para una válvula en un cartucho fluídico, que puede formar un aspecto de la invención aislado.

[0235] Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona una válvula para un cartucho fluídico, comprendiendo la válvula:

una cavidad de válvula que tiene aberturas primera y segunda conectadas a los pasos primero y segundo, respectivamente;
una membrana flexible dentro de la cavidad de la válvula móvil entre una posición cerrada, en la que la membrana flexible sella contra las aberturas primera y segunda para evitar el flujo de fluido entre los pasos primero y segundo, y una posición abierta, en la que la membrana flexible está espaciada aparte de las aberturas primera y segunda para permitir que el fluido fluya entre los pasos primero y segundo; en donde la válvula está configurada de modo que la presión requerida en el primer paso mueva la membrana flexible desde la posición cerrada a la posición abierta es mayor que la presión requerida en el segundo paso para mover la membrana flexible desde la posición cerrada a la posición abierta.

[0236] Se apreciará que dentro de la cavidad de la válvula hay una parte (conocida como la cámara de la válvula) entre la membrana flexible y el suelo. También hay una parte dentro de la cavidad de la válvula en el otro lado de la membrana flexible hacia la cámara de la válvula. Esta parte tendrá un volumen. La presión dentro de ese volumen puede cambiarse aplicando una presión positiva o manométrica al volumen a través de un canal de actuación, por ejemplo. El canal de actuación se puede conectar a una fuente de presión positiva o manométrica a través de una interfaz neumática, por ejemplo. La presión dentro del volumen se conoce como la presión de acción. Esta operación se describe más detalladamente arriba.

[0237] En una disposición preferida, las aberturas primera y segunda pueden estar dispuestas de manera que el fluido en el primer paso actúa sobre la membrana flexible solo sobre un área de sección transversal relativamente pequeña, mientras que el fluido en el segundo conducto actúa sobre la membrana flexible sobre un área de sección transversal más grande, preferiblemente sustancialmente toda la membrana.

[0238] El efecto de esto es que la válvula es capaz de soportar una presión mucho mayor en el primer conducto que en el segundo conducto.

[0239] Preferiblemente, la cavidad de la válvula tiene un suelo que comprende las aberturas primera y segunda y una o más paredes entre las cuales se extiende la membrana flexible; y en donde la segunda abertura está acoplada a un rebaje en el suelo entre la abertura y la membrana flexible, teniendo el rebaje un área en sección transversal mayor que la abertura.

[0240] Preferiblemente, la primera abertura está ubicada centralmente dentro del suelo y el rebaje se extiende alrededor de la primera abertura, de manera que la segunda abertura se ubica entre la primera abertura y una pared de la cavidad de la válvula. En una disposición particularmente preferida, la cavidad de la válvula tiene una sección transversal circular, y el rebaje es un rebaje anular que rodea la primera abertura.

[0241] Preferiblemente, la abertura del segundo conducto de fluido está situada adyacente al perímetro de la cámara de válvula. Preferiblemente, la cámara de válvula tiene un diámetro de entre 2 y 10 mm, preferiblemente entre 3 y 7 mm y más preferiblemente de 4 y 6 mm. Más preferiblemente, la segunda abertura está separada por 2 mm desde la primera abertura.

[0242] Una válvula ejemplar se muestra en la Figura 12 en su posición cerrada. La válvula 310 se puede usar en lugar de cualquiera de las válvulas del cartucho fluido ejemplar mostrado anteriormente. La válvula comprende una cavidad de válvula 312 que tiene una membrana flexible 314 que recubre un suelo de cavidad 316 en el que se proporcionan las primeras aberturas 318 y segundas primeras 320, que conducen a los pasos de fluido primero 322 y segundo 324, respectivamente.

[0243] La cavidad 312 se forma a partir de un vacío en una primera capa de polímero (preferiblemente la capa de fluido 114 del cartucho ejemplar) junto con una segunda capa de polímero (preferiblemente la segunda capa de fluido 115 del cartucho ejemplar).

[0244] La membrana flexible 314 se muestra tendida sobre el suelo 316 de la cavidad de manera que la válvula se muestra en su posición cerrada. La válvula se puede mover desde esta posición a una posición abierta (donde está separada del suelo 316 y las aberturas 322, 324 para formar una cámara de válvula), como se describe aquí.

[0245] La primera abertura 318 de la válvula está situada centralmente dentro del perímetro del vacío formado en la primera capa de polímero, y por lo tanto está situada en la cavidad de la válvula 312. La segunda abertura 324 de la válvula está desplazada desde la primera abertura 322. La segunda abertura está acoplada a un rebaje anular 326 en el suelo, y así el área de sección transversal sobre la cual el fluido en el segundo conducto 324 actúa sobre la membrana flexible 314 es mucho más grande que el área de sección transversal sobre la cual el fluido en el primer conducto 322 actúa sobre la membrana flexible.

[0246] La presión de un fluido en el primer paso actúa sobre la membrana flexible sólo sobre un área de sección transversal relativamente pequeña de la membrana flexible. Por lo tanto, debido a que la presión de un fluido en la cavidad de la válvula en el otro lado de la membrana flexible actúa sobre toda la membrana, puede ser más baja sin permitir que la membrana se mueva a su posición abierta.

[0247] En contraste, la presión de un fluido en el segundo conducto de paso actúa sobre la membrana flexible sobre un área de la sección transversal relativamente grande de la membrana flexible. Dado que las respectivas áreas de la sección transversal están más cerca, también lo está la presión en el segundo paso que la membrana flexible puede soportar frente a la presión en la cavidad de la válvula.

[0248] Preferiblemente, las respectivas secciones transversales desde las aberturas de los conductos de fluido permiten a la membrana resistir presiones alrededor de 2,5 veces la presión de acción en el primer conducto de fluido central, pero solo presiones iguales a la presión de actuación (es decir, la presión en la cavidad de la válvula) en la abertura del segundo paso de fluido compensado.

3.3 Diseño del puerto de entrada

[0249] Se describirá ahora una disposición ventajosa para un puerto de entrada en un cartucho fluido, que puede formar un aspecto aislado de la invención.

[0250] Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un cartucho fluido para procesar una muestra líquida, teniendo el cartucho una cámara de mezcla de muestra que comprende:

una abertura de entrada de muestra para introducir una muestra de líquido en la cámara de mezcla de muestra; una jaula que rodea la abertura de entrada y que se extiende dentro de la cámara de mezcla de muestra, comprendiendo además la jaula una o más protuberancias que se extienden radialmente hacia dentro para apoyarse contra un dispositivo de entrega de muestra introducido a través de la entrada de muestra.

[0251] El cuerpo de la jaula puede estar formado por una o más barras alargadas, o una o más paredes sólidas, dependiendo del techo de la cámara de mezcla de la muestra. Si se proporcionan paredes sólidas, preferiblemente hay una abertura en la parte inferior de las paredes a través de la cual puede pasar una muestra de líquido introducida por el dispositivo de entrega de muestra. Preferiblemente, las barras o la pared que forman el cuerpo se estrechan para ajustarse a la punta de un dispositivo de entrega de muestra convencional introducido a través de la entrada de muestra.

[0252] Las paredes sólidas tienen la ventaja adicional de que proporcionan una barrera para evitar que el fluido introducido en la cámara de mezcla se escape fuera de la abertura de entrada, que es particularmente útil si el cartucho se gira boca abajo durante el uso.

[0253] Si la jaula se forma a partir de paredes sólidas, la protusión puede ser una repisa que se extiende hacia dentro desde las paredes dejando una abertura. Preferiblemente, el saliente que se extiende desde los lados de la abertura de entrada está posicionado por encima del suelo de la cámara de mezcla de muestra; más preferiblemente por encima de un nivel de llenado de líquido de la cámara de mezcla de muestra. Esto evita que la muestra de líquido sea succionada nuevamente dentro del dispositivo de entrega de muestras una vez introducida en la cámara de mezclado.

[0254] Preferiblemente, se prevé una cámara de mezcla de muestra para permitir que el aire escape de la cámara durante la introducción de la muestra. Esto es particularmente útil cuando la abertura de entrada está sellada por el dispositivo de administración de la muestra.

5 **[0255]** Preferiblemente, se proporciona un canal de guía dentro de la cámara de mezcla de muestra (una parte de la cual está preferiblemente directamente debajo de la abertura de entrada) para dirigir la muestra introducida por un dispositivo de administración de muestra a una región de indicador visual. Un ejemplo de región de indicador visual se describe anteriormente en conexión con el cartucho ejemplar.

10 **[0256]** Preferiblemente, un cambio en el índice de refracción de la región indicadora visual descrita en el presente documento identifica cuándo se ha introducido una muestra. La región del indicador visual puede comprender un estrecho paso de fluido, que se llena con la muestra de fluido por acción capilar. El llenado del conducto de fluido estrecho cambia el índice de refracción de la región del indicador visual y un cambio de color identifica cuándo se ha introducido una muestra.

15 **[0257]** Ahora se describirá una realización preferida de este aspecto con referencia al cartucho fluídico ejemplar. La carcasa 111 (véase la Figura 4) comprende una abertura de entrada de muestra 126 a través de la cual puede introducirse una muestra en la cámara de mezcla de muestra 10 del cartucho 100 utilizando una pipeta, por ejemplo. Como se muestra con más detalle en la Figura 13a, la cámara de mezcla de muestra 10 está formada por la capa neumática 114, que tiene un techo adyacente a la carcasa 111 en la región de la abertura de entrada, y una abertura de entrada correspondiente a través de la cual puede introducirse una muestra en la cámara de mezcla de muestra 10.

20 **[0258]** El techo de la cámara de mezclado 10 comprende una estructura de jaula formada por las paredes 330 que rodean la abertura de entrada 126 que se extienden en la cámara de mezcla 10 desde el techo de la muestra, y una repisa 332 que se extiende radialmente hacia dentro desde las paredes 330. La forma de la estructura de la jaula permite ubicar un dispositivo de administración de muestras, tal como una pipeta, en la posición correcta en la cámara 10 de mezcla de muestras, y la repisa 332 impide que la pipeta entre en contacto con las superficies de la cámara 10 de mezcla de muestras, reduciendo así la riesgo de contaminación. Las paredes 330 pueden estrecharse para aumentar aún más el acoplamiento con la pipeta.

25 **[0259]** Una vez que el dispositivo de suministro de muestra se localiza a través de la abertura, el usuario puede dispensar la muestra. El reborde 332 está posicionado por encima de un nivel de llenado de líquido nominal (no mostrado) de la cámara de mezcla de muestra para evitar que el usuario succione accidentalmente la muestra hacia atrás después de dispensarla en la cámara.

30 **[0260]** Se proporciona un respiradero 334 en la cámara para permitir que escape el aire en el caso de que la abertura de entrada esté sellada por el dispositivo de administración de muestra.

40 **[0261]** Se proporciona una guía 336 dentro de la cámara de mezcla de muestra 10, una parte de la cual está directamente debajo de la abertura de entrada 126 para dirigir la muestra introducida por un dispositivo de administración de muestra a una región indicadora visual 338. Una región ilustrativa de indicador visual se describe anteriormente en conexión con el cartucho ejemplar.

45 **3.4 Bolsos de aislamiento térmico**

[0262] A continuación se describirá una disposición ventajosa para los bolsos de aislamiento térmico para una cámara de amplificación de ácido nucleico en un cartucho fluídico, que puede formar un aspecto de la invención aislado.

50 **[0263]** En la amplificación de ácido nucleico y la detección, es preferible aplicar el calor uniformemente en toda la muestra líquida. Si bien es posible hacerlo sin dificultad en un laboratorio colocando fuentes de calor de forma equidistante alrededor de la muestra, es mucho más difícil de lograr en un cartucho.

55 **[0264]** Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un cartucho fluídico para realizar amplificación de ácido nucleico en una muestra líquida, comprendiendo el cartucho al menos una cámara de procesamiento de muestra y una región térmicamente aislante adyacente a la cámara para evitar la pérdida de calor de la cámara a través de la región térmicamente aislante. Preferiblemente, al menos una cámara de procesamiento de muestra es una o ambas de una cámara de amplificación de ácido nucleico y una cámara de detección de ácido nucleico (de aquí en adelante la cámara de procesamiento').

60 **[0265]** Preferiblemente, la cámara de procesamiento de ácido nucleico es adyacente a una superficie (preferiblemente una superficie inferior) del cartucho para aceptar calor de una fuente externa, la cámara situada entre la región térmicamente aislante y la superficie de manera que el calor pase desde la fuente exterior a través de la superficie y desde allí la cámara no se pierde del otro lado de la cámara debido a la presencia de la región térmicamente aislante. Se encuentra que esta disposición hace que el cambio de temperatura dentro de la cámara

(por ejemplo, al encender y apagar la fuente de calor) sea lo más rápido posible, lo que es beneficioso para realizar una PCR rápida, por ejemplo.

5 **[0266]** Esto es particularmente ventajoso porque una única fuente de calor puede colocarse adyacente al cartucho para suministrar calor para el proceso de amplificación desde un lado (el lado calentado) y, sin embargo, la muestra dentro del cartucho se calentará sustancialmente y se minimizará en lo posible la cantidad de calor perdido a través del lado sin calefacción.

10 **[0267]** Preferiblemente, el cartucho está compuesto de al menos una capa fluidica y una capa neumática en disposición de contacto. La cámara de procesamiento de ácido nucleico se puede formar en la capa fluidica y la región térmicamente aislante se puede formar en la capa neumática. Preferiblemente, el cartucho fluidico comprende además una lámina fluidica debajo de la capa fluidica, formando la lámina la superficie antes mencionada para aceptar el calor. El uso de una lámina fina maximiza la transferencia de calor desde la fuente externa. El material de la lámina puede elegirse para optimizar la transferencia de calor. Por ejemplo, se puede usar una lámina de metal, pero se prefiere que se use un compuesto de tereftalato de polietileno/polipropileno debido a las ventajas de la facilidad de fabricación del cartucho, junto con la resistencia del material y las propiedades de transferencia de calor aceptables.

20 **[0268]** Preferiblemente, la región térmicamente aislante se forma a partir de uno o más pozos de aislamiento térmico sellados formados en la capa neumática y sellados por una lámina neumática. Los bolsos pueden llenarse con gas tal como aire o pueden ser evacuados durante el proceso de fabricación de manera que proporcionen un vacío.

25 **[0269]** Se describirá ahora una realización preferida de este aspecto con referencia al cartucho fluidico ejemplar. Como se muestra en la Figura 3, el cartucho ejemplar 100 comprende, de arriba a abajo, una carcasa 111, un subconjunto de ampollas 112, una lámina neumática 113, una capa neumática 114, una capa de fluido 115 y una lámina fluidica 116.

30 **[0270]** Con referencia a las Figuras 6A y 6B, que muestran la capa neumática, se proporcionan seis regiones térmicamente aislantes 140a-b, 141a-d. Las regiones aislantes 140a-b están situadas adyacentes a dos cámaras de amplificación correspondientes formadas en la capa fluidica 115, mientras que las regiones aislantes 141a-d están situadas adyacentes a cuatro cámaras de detección correspondientes formadas en la capa fluidica 115, cuando el cartucho está ensamblado. Como se muestra, las regiones aislantes 140a-b consisten en una pluralidad de bolsos de aislamiento térmico, mientras que las regiones aislantes 141a-d constan cada una de un bolso individual.

35 **[0271]** Durante la amplificación y detección del ácido nucleico, tiene lugar el termociclado de las cámaras de amplificación y detección. Las cámaras en la capa fluidica pueden calentarse aplicando calor al fondo del cartucho 100, adyacente a la capa fluidica 115. Los bolsos de aislamiento térmico retienen el calor dentro del cartucho, minimizando la pérdida de calor de la capa fluidica 115 en la capa neumática 114. Los bolsos de aislamiento térmico también eliminan la necesidad de calentar el cartucho de fluidos desde las superficies superior e inferior, por ejemplo, calentando tanto la capa de fluidos como la capa neumática, simplificando el diseño general del cartucho y el lector.

40 **[0272]** El bolso de aislamiento térmico puede comprender un bolso grande o múltiples bolsos más pequeños. La ventaja de usar múltiples bolsos más pequeños es que se reduce el riesgo de que se configuren las corrientes de convección, lo que proporciona un aislamiento térmico máximo.

3.5 Columna de captura

50 **[0273]** Se describirá ahora una disposición ventajosa para un dispositivo de filtración en un cartucho de fluidos (preferiblemente una columna de captura'), que puede formar un aspecto inventivo aislado.

55 **[0274]** Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un cartucho fluidico que comprende un canal a través del cual puede pasar una muestra líquida, teniendo el canal un filtro para capturar componentes biológicos y que además comprende:

una parte aguas arriba y una parte aguas abajo; y una parte de captura entre las porciones aguas arriba y aguas abajo en las que está dispuesto el filtro; en donde: el diámetro de la parte de captura es mayor que el diámetro de las porciones aguas arriba y aguas abajo.

60 **[0275]** Preferiblemente, la parte de captura es una cámara dentro del canal, teniendo la cámara una superficie de entrada que tiene una abertura acoplada a la parte aguas arriba del canal y una superficie de salida que tiene una abertura acoplada a la parte aguas abajo del canal.

65 **[0276]** Preferiblemente, el cartucho fluidico comprende al menos dos capas de polímero, donde la parte aguas arriba y una parte aguas arriba de la parte de captura del canal están formadas en una primera capa de polímero y la parte aguas abajo y una parte aguas abajo de la parte de captura del canal está formada en una segunda capa de

polímero; y en donde el filtro está sujeto entre las capas de polímero primera y segunda.

[0277] Preferiblemente, la superficie de entrada de la cámara comprende conductos de distribución que se dirigen radialmente hacia fuera desde la abertura para dirigir una muestra de líquido que pasa a través de la abertura en la superficie de entrada radialmente hacia fuera.

[0278] Preferiblemente, la superficie de salida de la cámara comprende conductos de distribución que conducen radialmente hacia dentro hacia la abertura para dirigir una muestra de líquido que ha pasado a través del filtro radialmente hacia dentro hacia la abertura en la superficie de salida.

[0279] Ahora se describirá una realización preferida de este aspecto con referencia al cartucho de líquido ejemplar. En el cartucho ejemplar descrito en este documento, se proporciona una columna de captura 24 a lo largo del canal principal (véase la Figura 1). Como se muestra en las Figuras 14a y 14b, la columna de captura 24 tiene un filtro 340 que se une al ADN del material lisado antes de liberarlo durante la elución. Como se muestra en la Figura 14a, la columna de captura 24 comprende un canal de entrada 342 que conduce a una cámara de captura 344 en un extremo aguas arriba 346, y un canal de salida 350 que sale de la cámara de captura 344 en un extremo aguas abajo 348.

[0280] Se proporciona un filtro 340 en la cámara 344, perpendicular a la dirección del flujo de fluido a través del canal principal, de manera que el fluido debe pasar a través del filtro 340 cuando pasa del extremo aguas arriba del canal principal 342 al extremo aguas abajo 350 del canal principal.

[0281] Haciendo referencia ahora a la Figura 14b, las paredes de entrada y salida (solo una se muestra) de la cámara comprenden conductos de distribución 352 configurados para dirigir el fluido radialmente hacia afuera en la cámara 344 cuando entra en la cámara, y radialmente hacia dentro hacia la abertura de salida después de que haya pasado a través del filtro 340.

3.6 Cámara de desechos

[0282] Se describirá ahora una disposición ventajosa para la cámara de desechos en un cartucho fluidico, que puede formar un aspecto aislado de la invención.

[0283] Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un cartucho fluidico que comprende un canal a través del cual puede pasar una muestra de líquido y una cámara de desechos para recibir fluido desde el canal, comprendiendo la cámara de desechos:

una tubería, acoplada al canal, que se extiende desde una superficie inferior de la cámara de desechos y que tiene una abertura elevada por encima de la superficie inferior para pasar fluido desde el canal a la cámara; y una ventilación dentro de la cámara de desechos configurada para ventilar la cámara de desechos a la atmósfera.

[0284] Preferiblemente, el respiradero comprende un segundo tubo, acoplado a un canal de ventilación dentro del cartucho, que se extiende desde la superficie inferior de la cámara de desechos y que tiene una abertura elevada por encima de la superficie inferior. Preferiblemente, el conducto de ventilación comprende al menos un impactador Anderson.

[0285] Preferiblemente, se proporciona al menos una almohadilla absorbente dentro de la cámara de desechos.

[0286] Ahora se describirá una realización preferida de este aspecto con referencia al cartucho de fluido ejemplar. En el cartucho ejemplar descrito en este documento, se proporciona una cámara de desechos para recoger y almacenar fluido residual que se produce durante el lavado, etc. La cámara de desechos 10 se muestra con más detalle en las Figuras 15a y 15b. La cámara de desechos 38 comprende un tubo 360 que se extiende sustancialmente verticalmente desde una superficie inferior 362 de la cámara de desechos 38. El tubo 38 define un canal que tiene un primer extremo 364 conectado a la superficie inferior de la cámara de desechos 38 y conectado de manera fluida al canal principal 16. Un segundo extremo 366 del tubo de fluido 360 está dispuesto dentro de la cámara de residuos 38, y tiene una abertura a través de la cual el fluido puede fluir dentro de la cámara de residuos.

[0287] Preferiblemente, el tubo 360 es sustancialmente vertical y perpendicular a la superficie inferior de la cámara de residuos 38. La abertura en el segundo extremo del tubo 360 está situada cerca de la parte superior de la cámara de residuos 38 como se muestra en la Figura 15b. Al proporcionar la primera abertura cerca de la parte superior de la cámara de desechos, el riesgo de fuga se reduce al mínimo si el cartucho se pone boca abajo.

[0288] Las almohadillas absorbentes 368 también se proporcionan en la cámara de desechos. Preferiblemente, la superficie superior de las almohadillas de absorción 368 también debería estar cerca de la parte superior de la cámara de desechos 38, incluso más preferiblemente, la parte superior de las almohadillas absorbentes 368 debería estar sustancialmente nivelada con la abertura en el segundo extremo 366.

[0289] En el cartucho ejemplar descrito en este documento, se proporciona una segunda abertura 370 en la cámara de desechos 38 como se muestra en la Figura 15b. La segunda abertura 370 está configurada para ventilar el canal principal 16 a través de la cámara de residuos 28 hasta la presión atmosférica. Esto evita aplicar una contrapresión a lo largo del canal principal a medida que el canal de desecho se llena de fluido. Preferiblemente, la segunda abertura 370 está provista en el extremo de una segunda tubería 372 que sobresale de la superficie inferior de la cámara de desechos 38. La segunda abertura 370 puede estar conectada de manera fluida a un paso de ventilación (no mostrado) que tiene una abertura exterior a la carcasa del cartucho para permitir que la cámara de residuos permanezca a presión atmosférica. Sin embargo, la ventilación de la cámara de desechos fuera del cartucho conlleva un pequeño riesgo de contaminación por aerosol. Para reducir esto, el camino de ventilación tiene trampas de impacto y respiraderos debajo de la cubierta del cartucho.

[0290] El experto en la materia será capaz de modificar el cartucho ejemplar para implementar los aspectos inventivos descritos en el presente documento de varias maneras dependiendo de las circunstancias. Se pretende que el alcance de la presente invención esté definido por las siguientes reivindicaciones.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un sistema de válvula en un cartucho fluidico para expulsar muestra líquida de una región de procesamiento de muestra, comprendiendo el aparato:
- una ruta de fluido (C310a) para hacer pasar una muestra de líquido a través de ella desde un extremo aguas arriba a un extremo aguas abajo;
- una válvula de salida (C303a) dentro de la vía de fluido, la válvula de salida configurada para moverse entre una posición cerrada en la que impide que la muestra líquida pase a través de la válvula de salida y una posición abierta en la que permite que la muestra pase por la válvula líquida;
- 10 una región de procesamiento de muestra aguas abajo (C304a) dentro de la ruta de fluido aguas abajo de la válvula de salida;
- un canal de derivación (C305) acoplado a la vía de fluido en una unión entre la válvula de salida y la región de procesamiento de muestra aguas abajo, el sistema de válvula configurado de tal manera que la muestra líquida aguas abajo de la válvula de salida pueda ser expulsada en su posición cerrada; y
- 15 al menos un elemento compresible (C306a) aguas abajo de la región de procesamiento de muestra aguas abajo, al menos un elemento compresible configurado para volverse cada vez más bloqueado contra el flujo aguas arriba del elemento compresible cuando la muestra líquida pase a través de la válvula de salida abierta, de modo que la muestra líquida aguas abajo de la válvula de salida pueda ser expulsada del conducto de fluido y dentro del canal de derivación por al menos un elemento compresible cuando la válvula de salida esté cerrada, donde al menos un elemento compresible (C306a) es un resorte de gas que comprende un orificio ciego lleno de un fluido compresible;
- 20 en donde el sistema de válvula comprende además una válvula de derivación (C315) ubicada dentro del canal de derivación (C305), la válvula de derivación configurada para moverse entre una posición cerrada en la que evita que la muestra líquida pase a través de la válvula de derivación y una posición abierta en la que permite que la muestra de líquido pase a través de la válvula de derivación.
- 25 **2.** El sistema de válvula de la reivindicación 1, que comprende además una cámara de procesamiento de muestra aguas arriba (C302a) dentro de la vía de fluido y aguas arriba de la válvula de salida.
- 30 **3.** El sistema de válvula de la reivindicación 2, que comprende además una válvula de entrada aguas arriba de la cámara de procesamiento de muestras aguas arriba.
- 4.** El sistema de válvula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos una de las válvulas en el sistema de válvula es una válvula accionada neumáticamente.
- 35 **5.** El sistema de válvula de la reivindicación 4, en el que al menos una válvula accionada neumáticamente comprende una cámara de válvula que tiene aberturas primera y segunda conectadas a la vía o canal, respectivamente; y
- 40 una membrana flexible que se puede mover entre una posición cerrada, en la que la membrana flexible sella contra las aberturas primera y segunda para evitar que el fluido fluya a través de la vía o canal, y una posición abierta, en la que la membrana flexible está separada de las aberturas primera y segunda para permitir que el fluido fluya a través del camino o canal.
- 45 **6.** El sistema de válvula de la reivindicación 5, que comprende además una interfaz neumática para conectarse a una fuente de presión de gas positiva y/o manométrica, comprendiendo la interfaz neumática una pluralidad de puertos.
- 50 **7.** El sistema de válvula de la reivindicación 6, donde la o cada válvula comprende además un paso de fluido que tiene una abertura en la cámara de válvula, la abertura está separada de las aberturas primera y segunda por la membrana flexible, en donde el conducto de fluido está acoplado a un puerto en la interfaz neumática para aplicar una presión de gas positiva o negativa en la cámara de la válvula para mover la membrana flexible entre las posiciones abierta y cerrada.
- 55 **8.** El sistema de válvula de cualquier reivindicación precedente, en el que el canal de derivación (c305a) está conectado a la vía de fluido inmediatamente aguas abajo de la válvula de salida para minimizar o erradicar una pérdida de carga entre la válvula de salida y el canal de derivación.
- 60 **9.** El sistema de válvula de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la cámara de procesamiento de muestra aguas arriba (C302a) es una cámara de amplificación de ácido nucleico en donde tiene lugar el proceso de amplificación de ácido nucleico en uso; en donde la región de procesamiento de muestra aguas abajo (C304a) es una cámara de detección en la que tiene lugar el proceso de detección de ácido nucleico en uso y la relación de cámaras de detección a cámaras de amplificación de ácido nucleico es 2:1.
- 65 **10.** El sistema de válvula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la región de procesamiento de muestra aguas abajo (C304a, C304b) está acoplada a un único elemento compresible (C306a, C306b).

11. El sistema de válvula de la reivindicación 5, en el que al menos una de la cámara de válvula y la interfaz neumática está formada en una primera capa de polímero, preferiblemente una capa neumática del cartucho de fluido, y/o en donde el miembro de válvula comprende un elastómero termoplástico.
- 5 12. El sistema de válvula de cualquier reivindicación precedente, en el que al menos uno de la vía de fluido (C310a, C310b) y el canal de derivación (C305a, C305b) está formado en una segunda capa de polímero, preferiblemente una capa fluídica del cartucho de fluido.
- 10 13. El sistema de válvula de la reivindicación 11 o 12, en el que al menos una de la primera capa de polímero y la segunda capa de polímero comprende polipropileno.
- 15 14. Un método para expulsar una muestra de líquido excedente de un cartucho fluídico que comprende una ruta de fluido (C110) que tiene una región de procesamiento de muestra aguas abajo (C104), una válvula de salida (C103) aguas arriba de la región de procesamiento de muestra aguas abajo, un canal de derivación (C105) acoplado a la vía de fluido en una unión entre la válvula de salida (C103) y la región de procesamiento de muestra aguas abajo (C104), una válvula de derivación ubicada en el canal de derivación y un elemento compresible aguas abajo de la región de procesamiento de muestra aguas abajo; comprendiendo el método:
- 20 cerrando la válvula de derivación;
pasando una muestra de líquido a través de la válvula de salida y hacia la región de procesamiento aguas abajo, comprimiendo de este modo el elemento compresible a medida que la muestra de líquido pasa aguas abajo de la válvula de salida; y
- 25 cerrando la válvula de salida; y
abriendo la válvula de derivación, evacuando la muestra de líquido superior aguas abajo de la válvula de salida a través del canal de derivación mediante el elemento compresible que ejerce una fuerza contra la muestra de líquido excedente para expulsarlo de la vía de fluido y hacia el canal de derivación.
- 30 15. El método según la reivindicación 14, en el que la vía de fluido comprende además una cámara de procesamiento de muestras aguas arriba (C102) de la válvula de salida y una válvula de entrada (C201) aguas arriba de la cámara de procesamiento de muestras aguas arriba, y en donde el método comprende:
pasar la muestra de líquido a través de la válvula de entrada y hacia la región de procesamiento de muestra aguas arriba.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

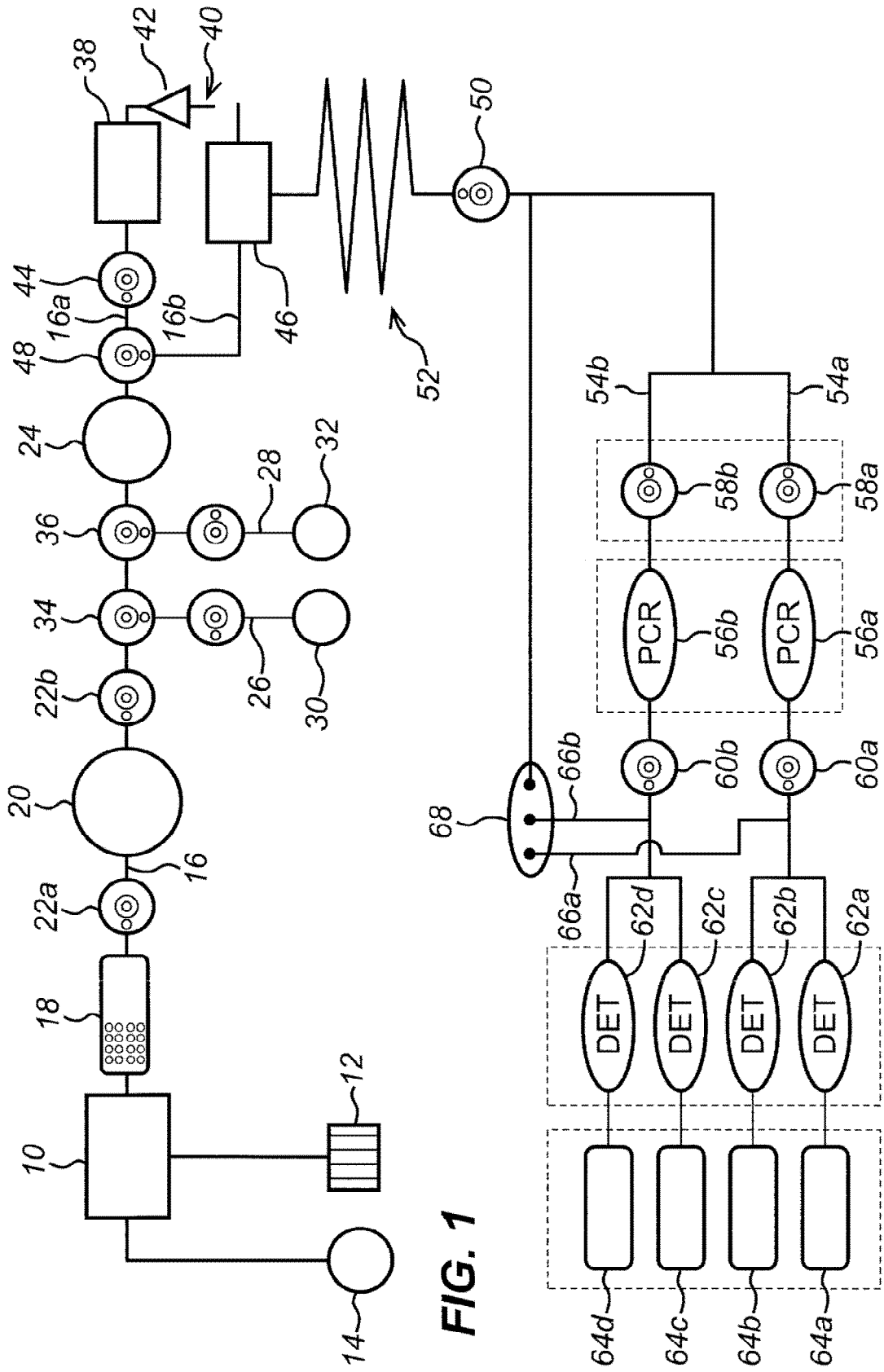


FIG. 1

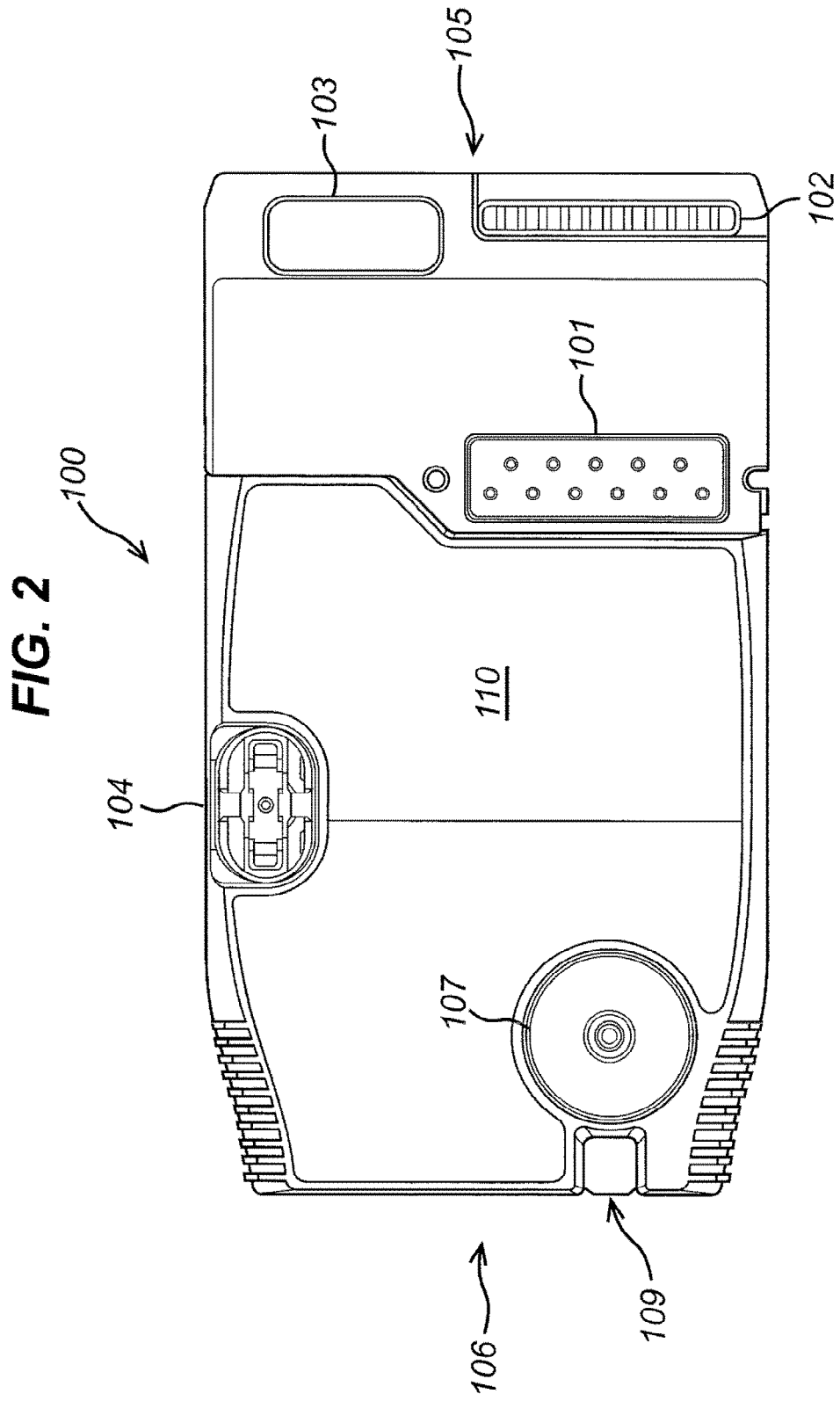
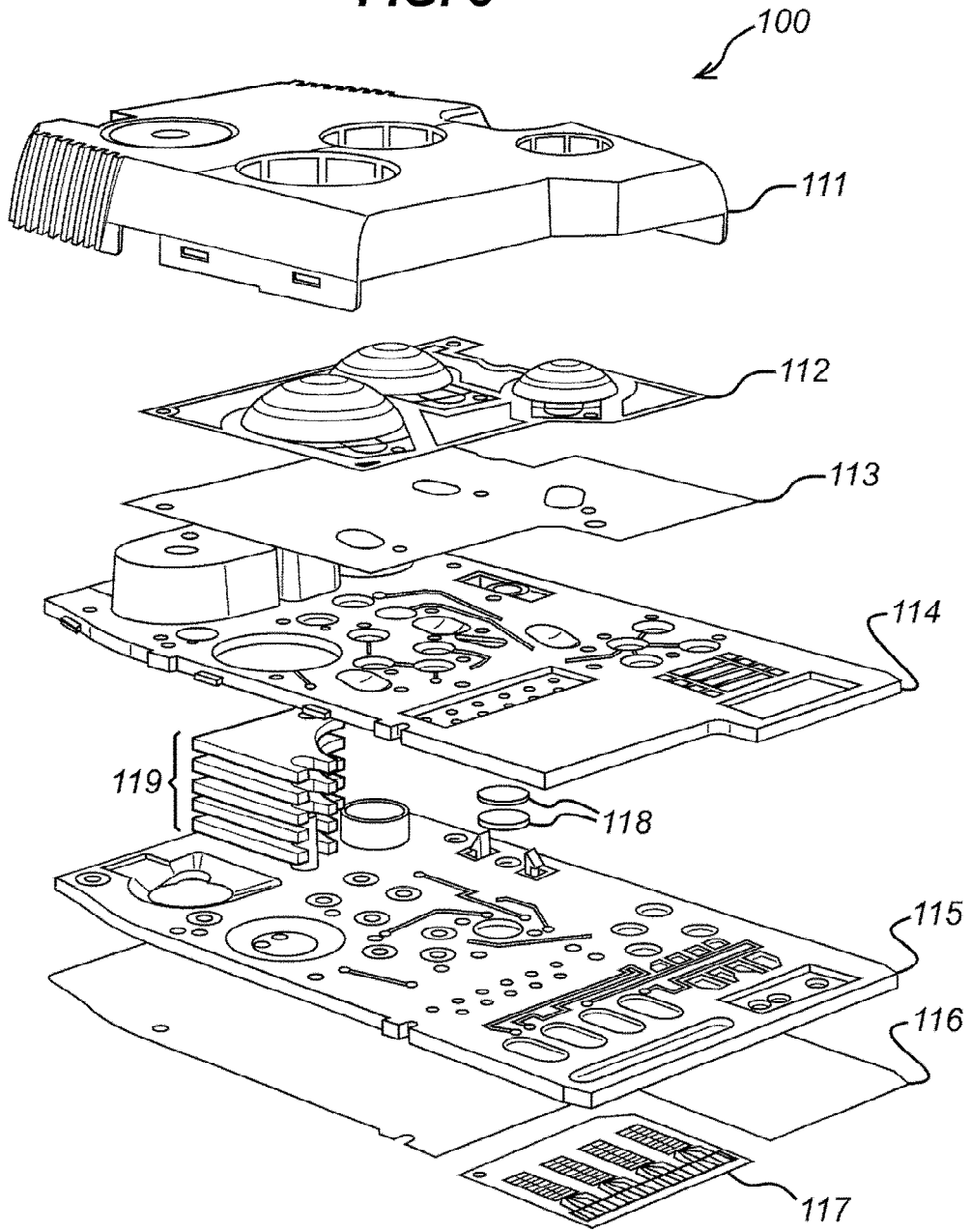


FIG. 3



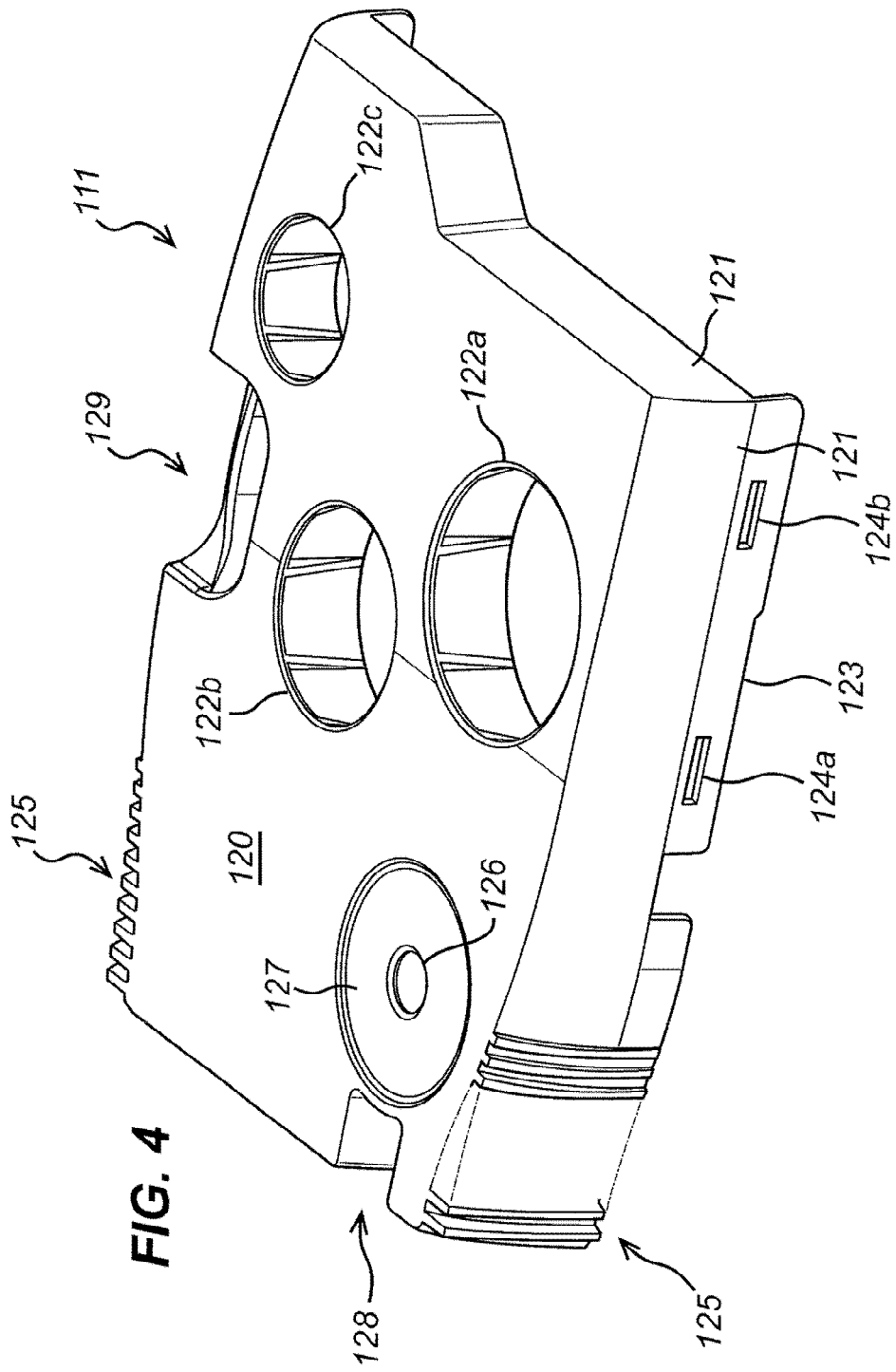
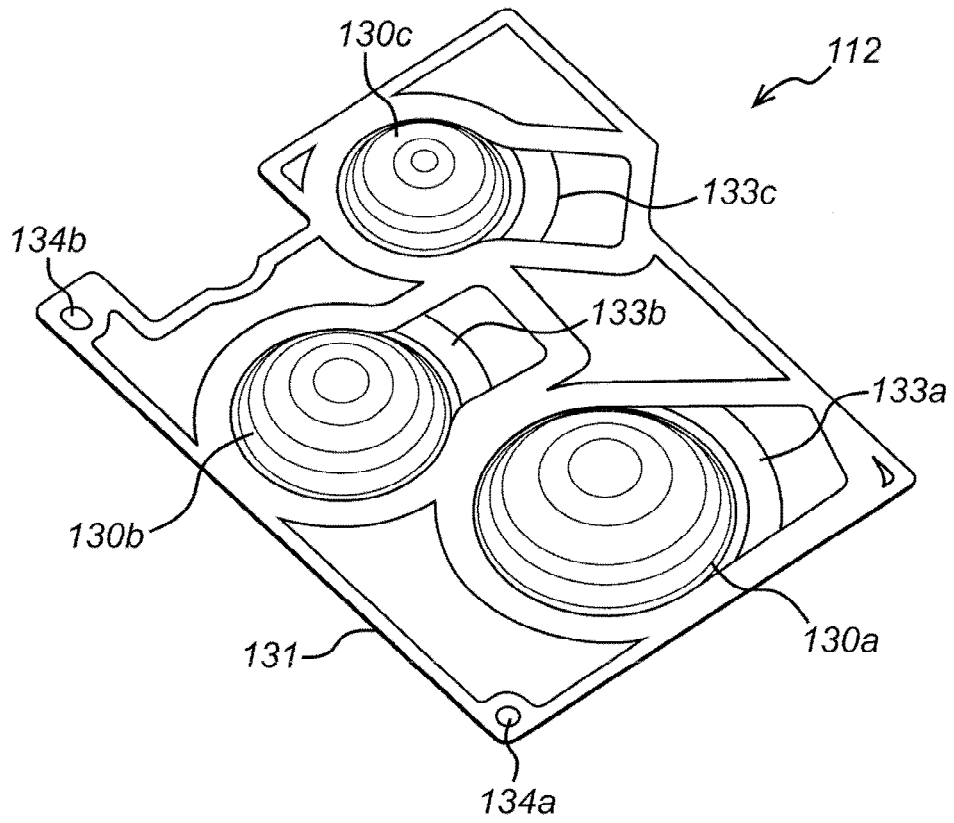


FIG. 5



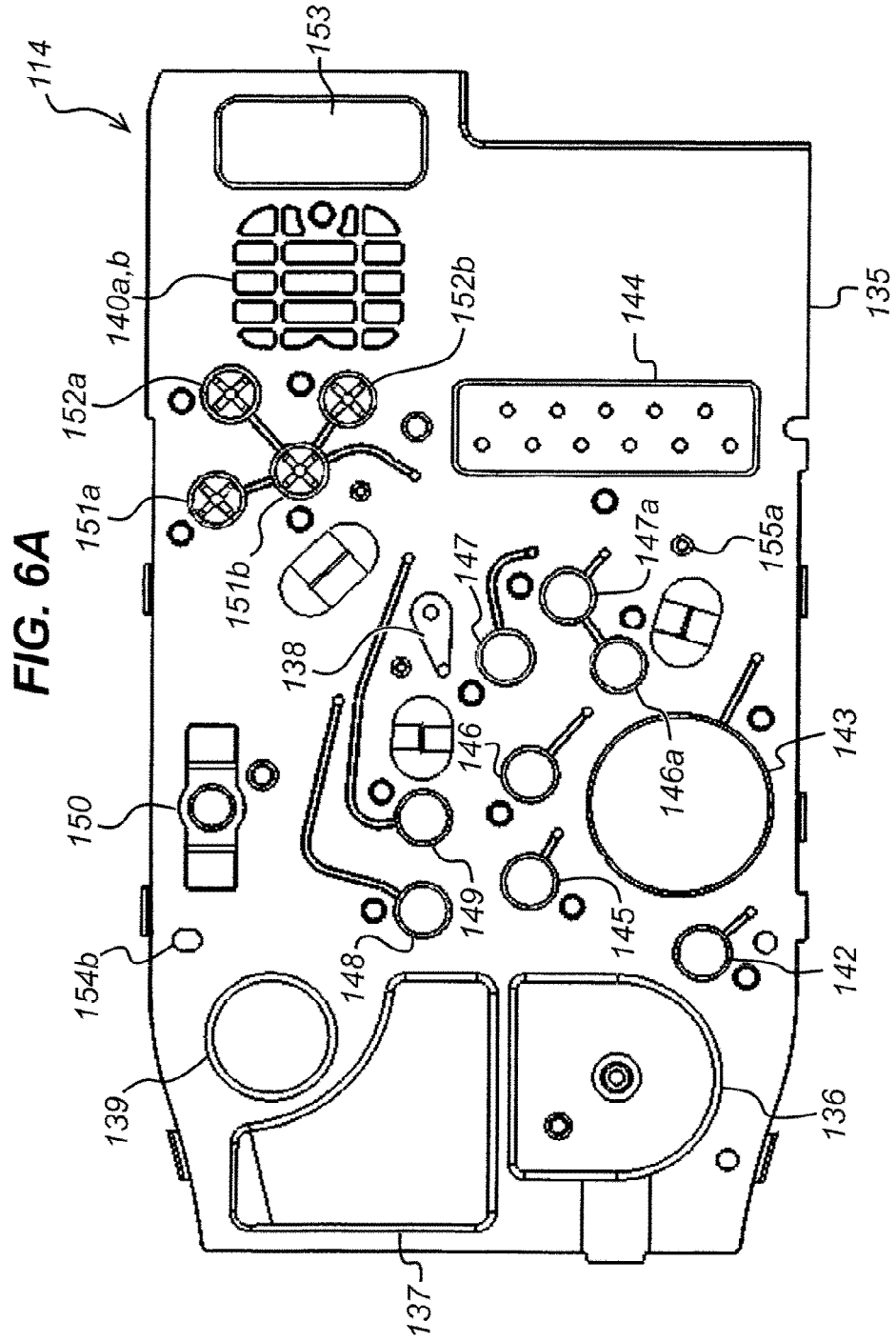
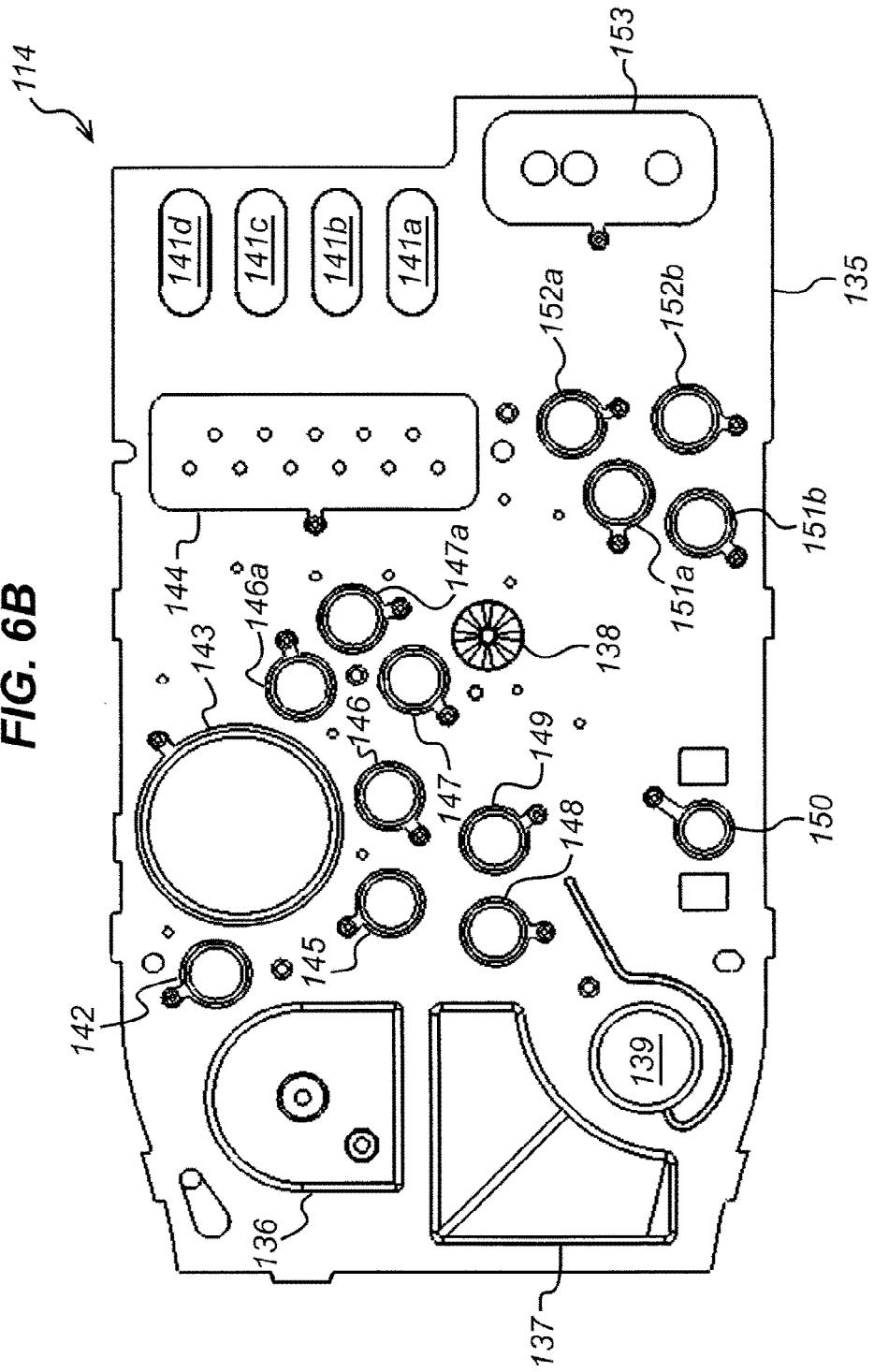


FIG. 6B



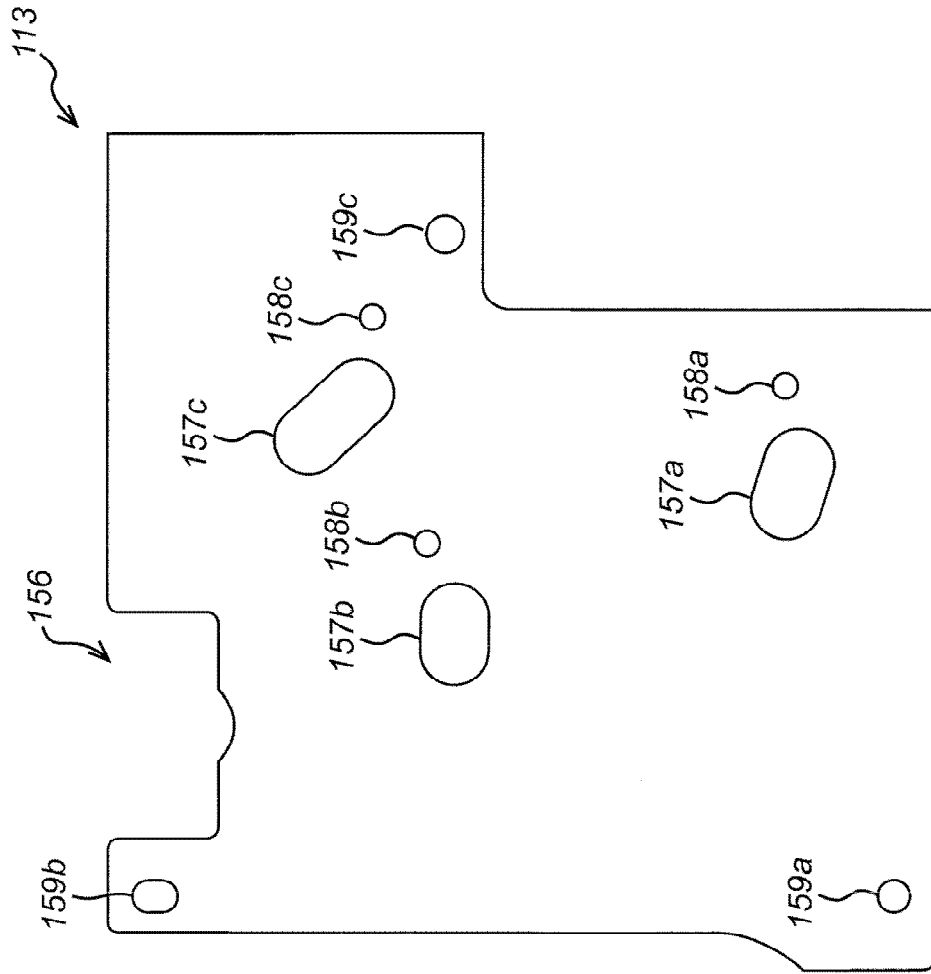


FIG. 7

FIG. 8A

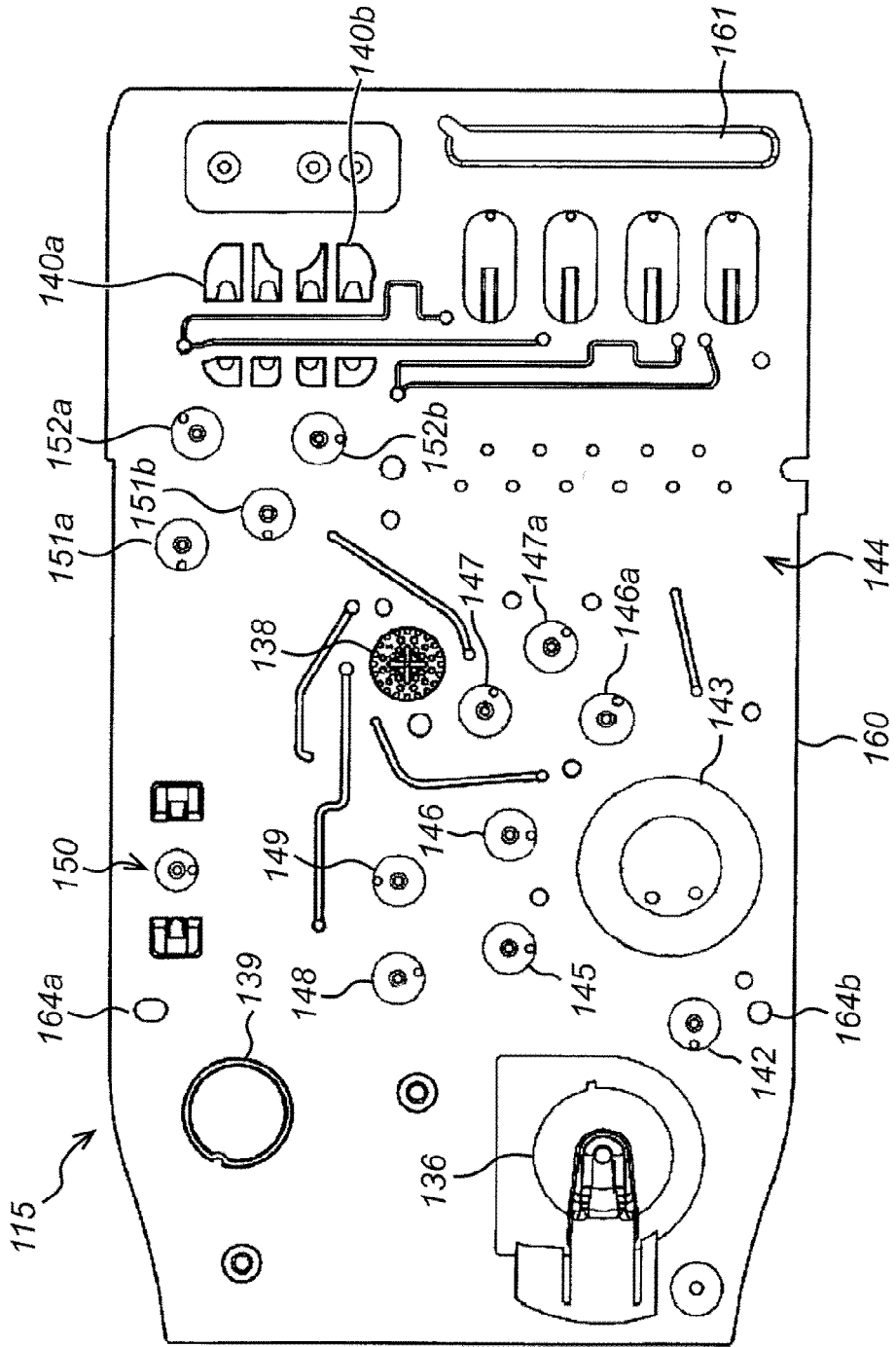


FIG. 8B

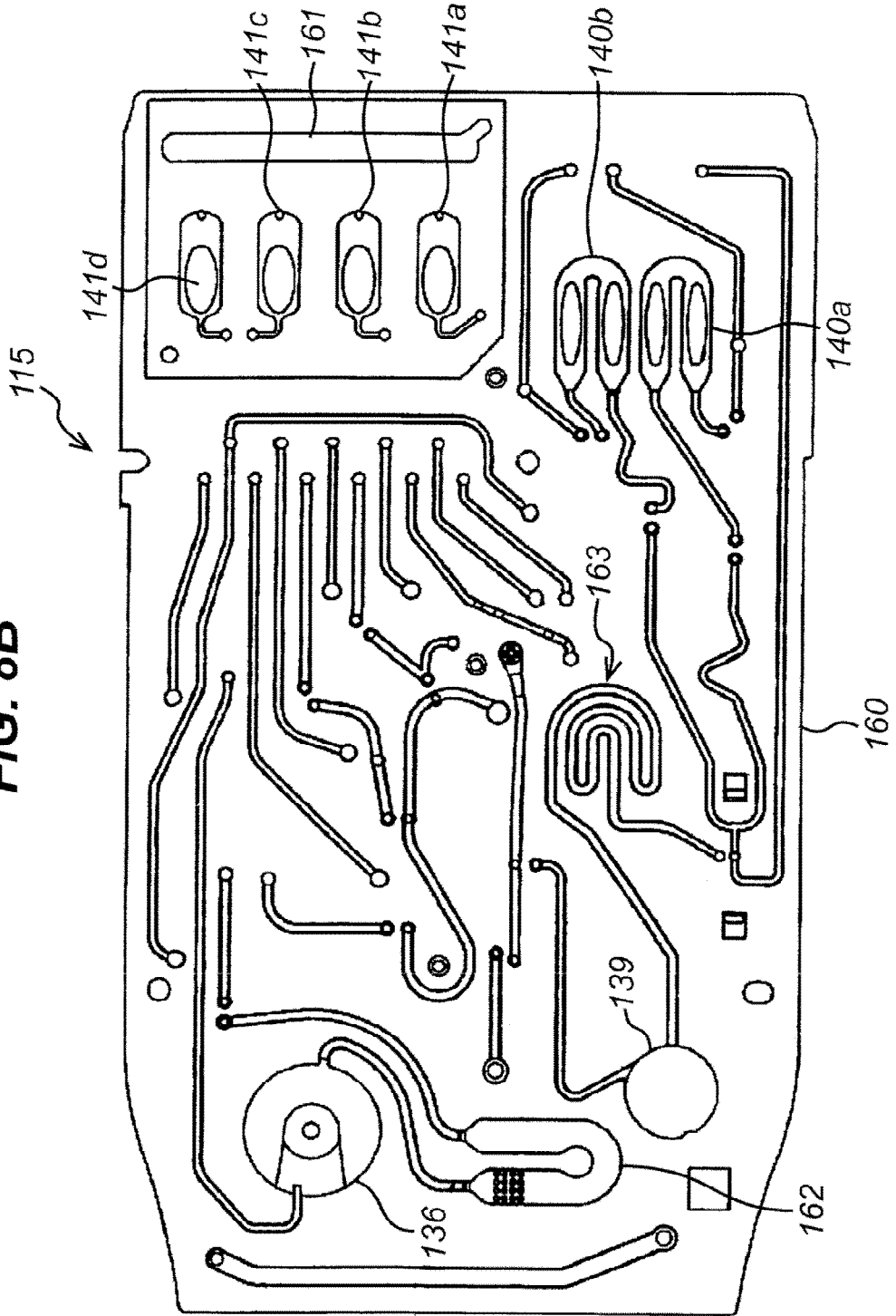
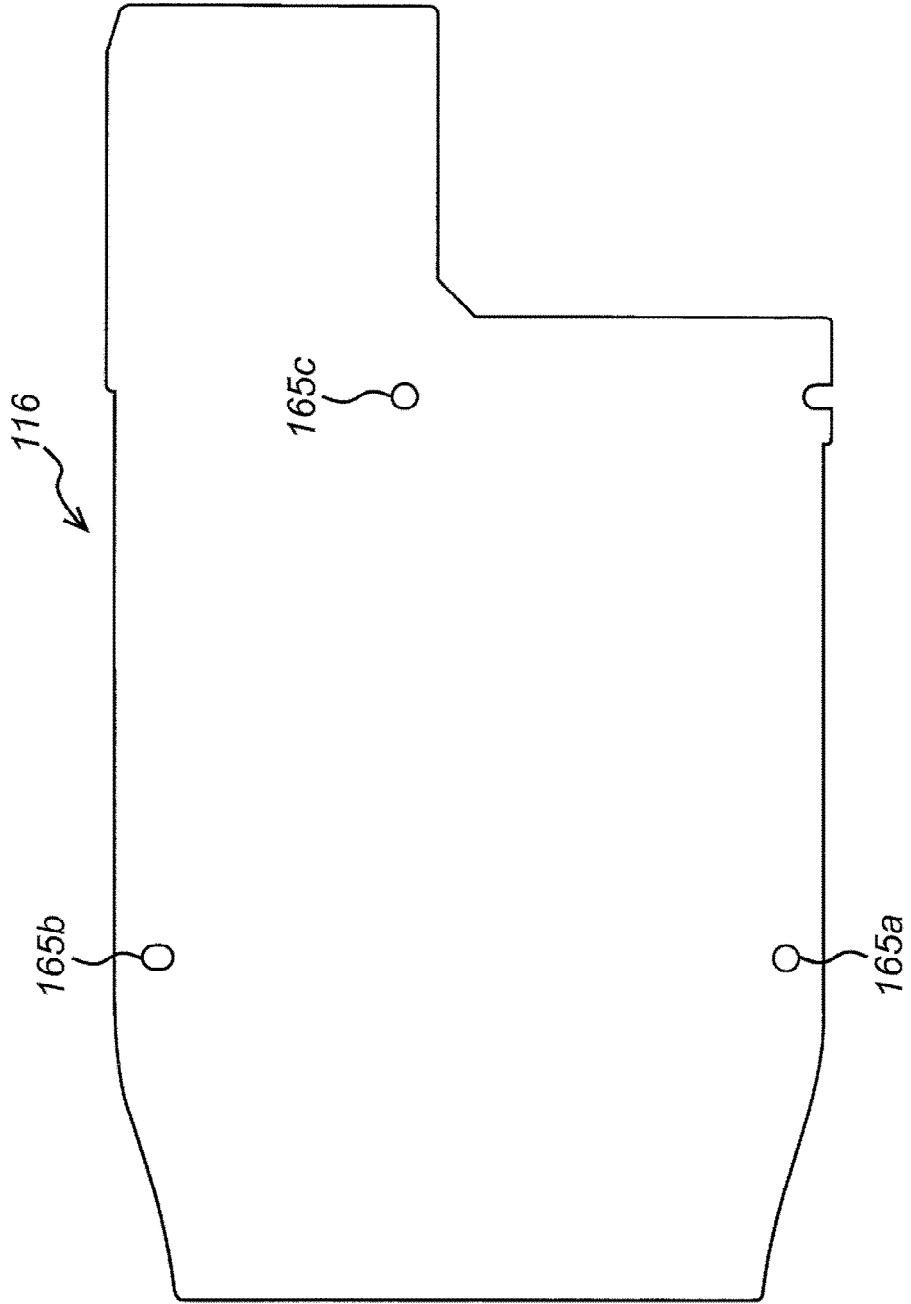


FIG. 9



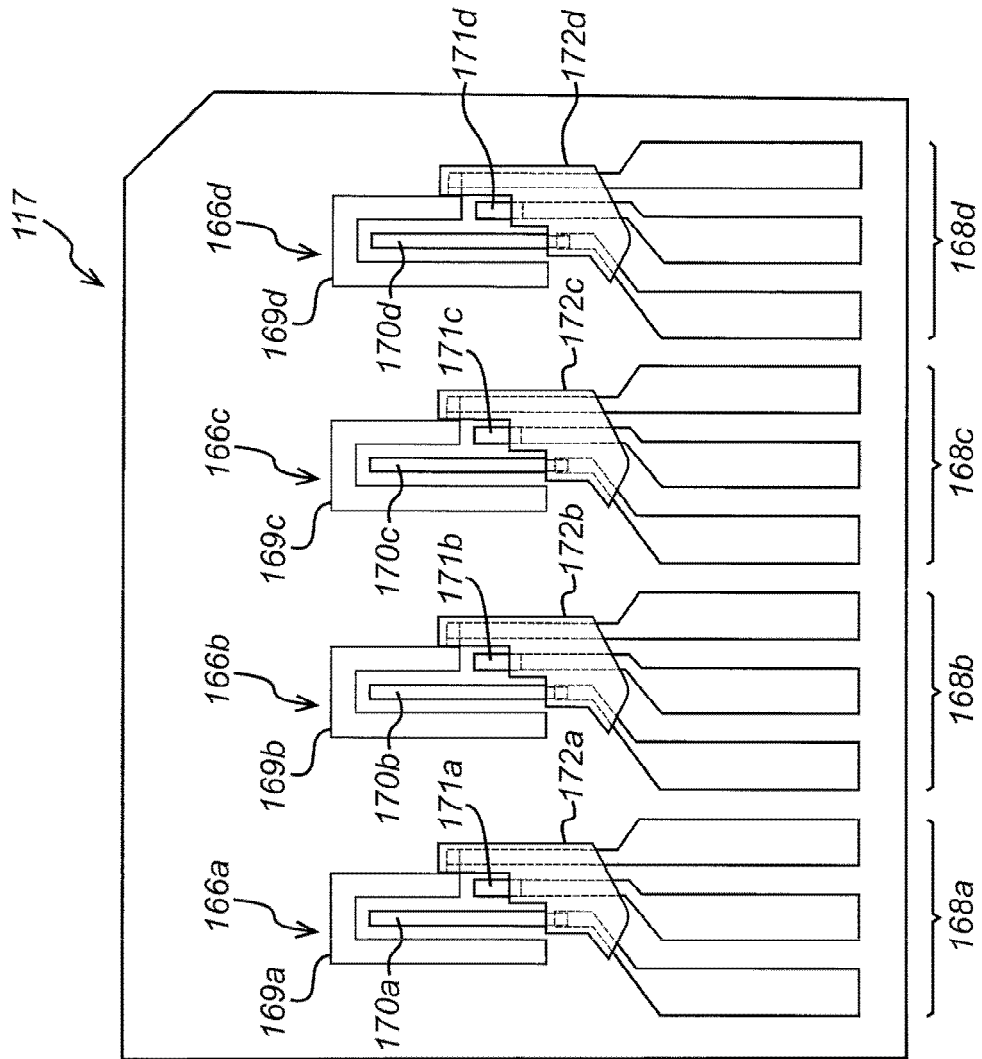


FIG. 10

FIG. 11

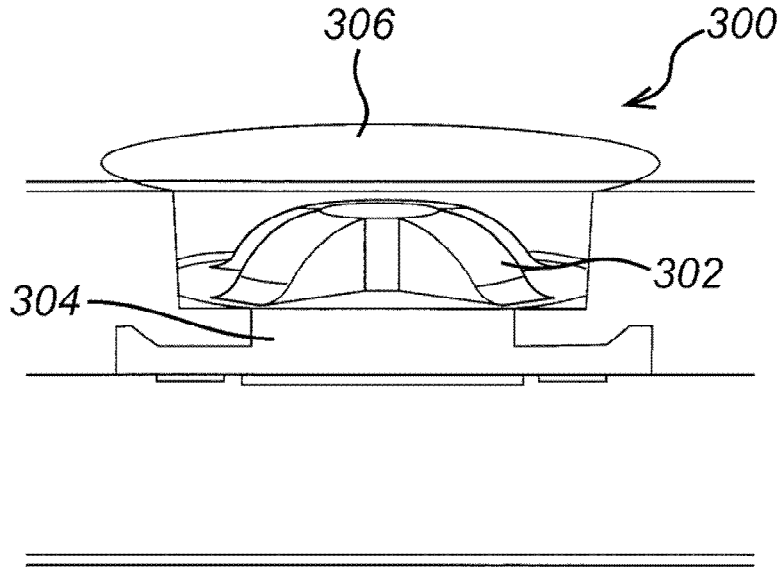


FIG. 12

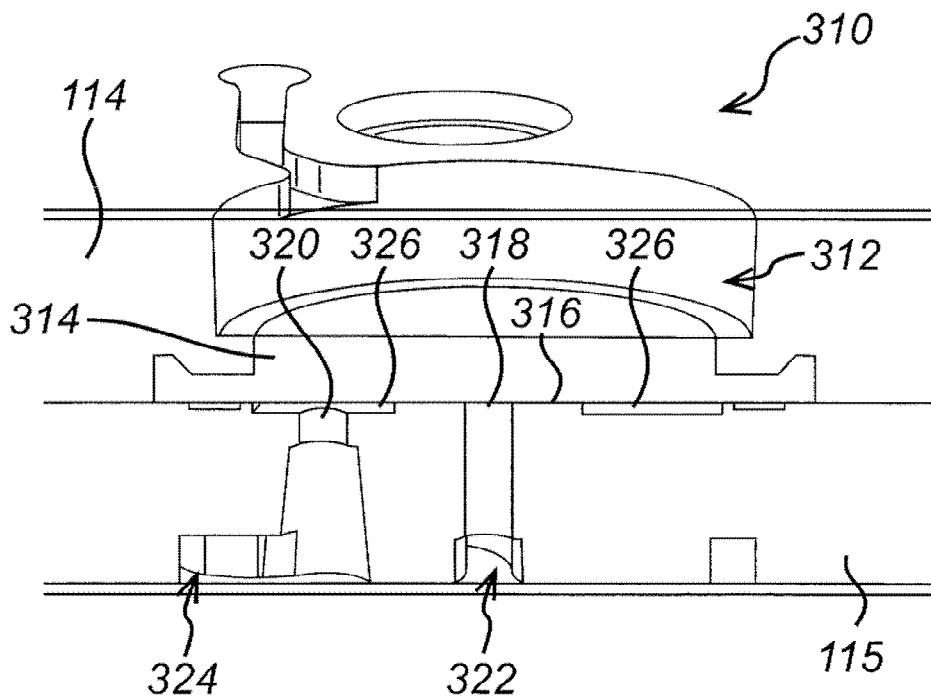


FIG. 13a

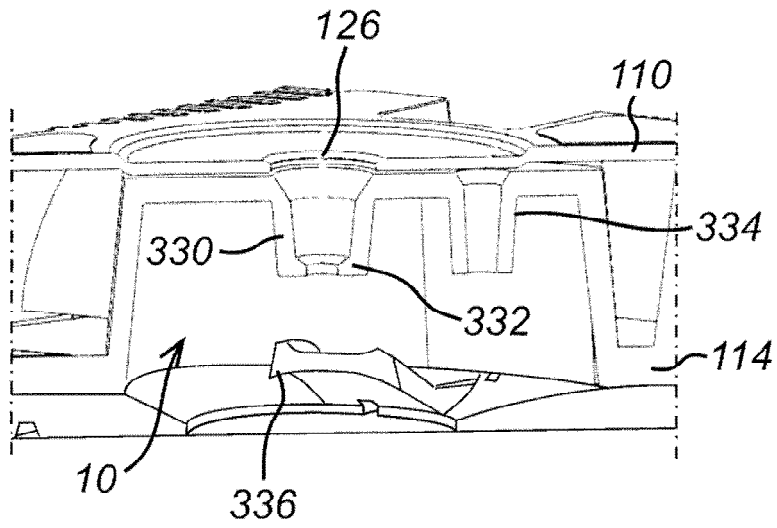


FIG. 13b

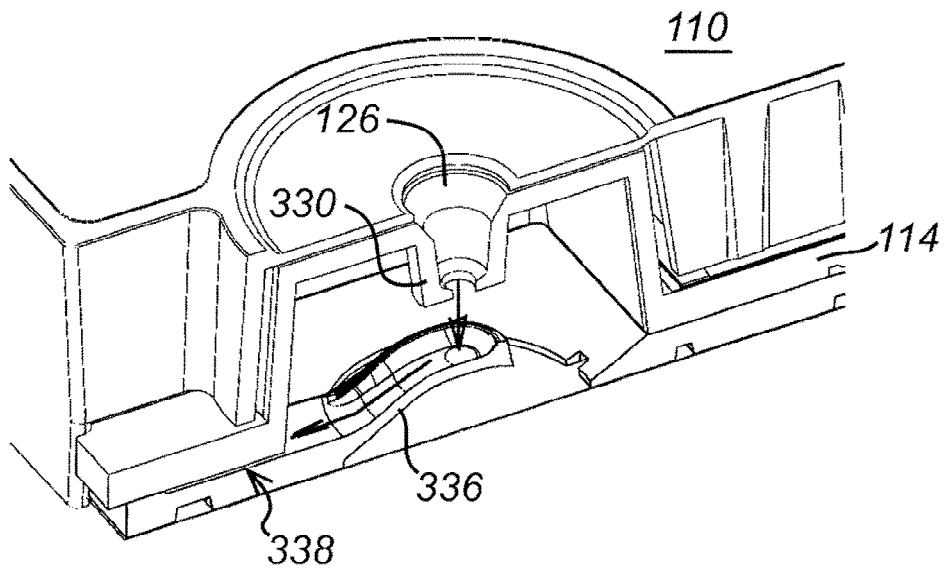


FIG. 14a

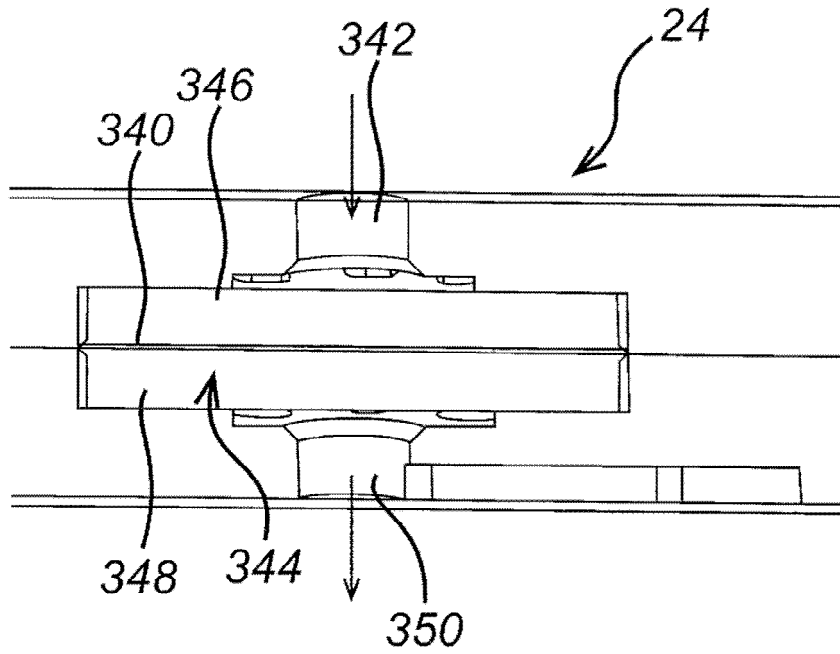


FIG. 14b

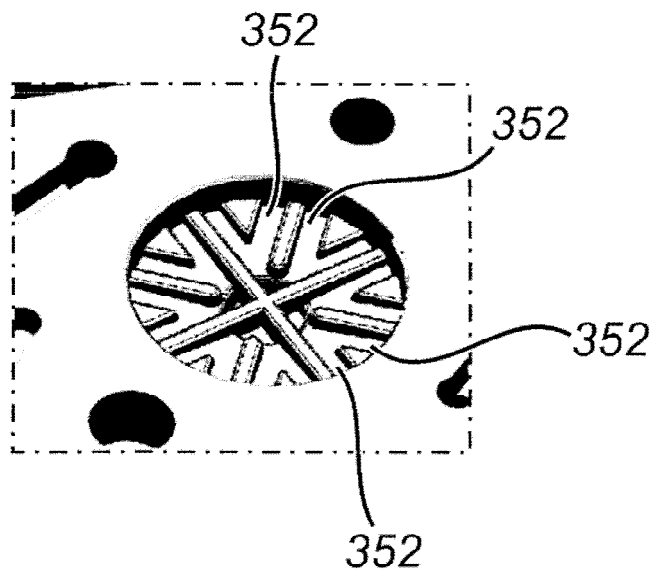


FIG. 15a

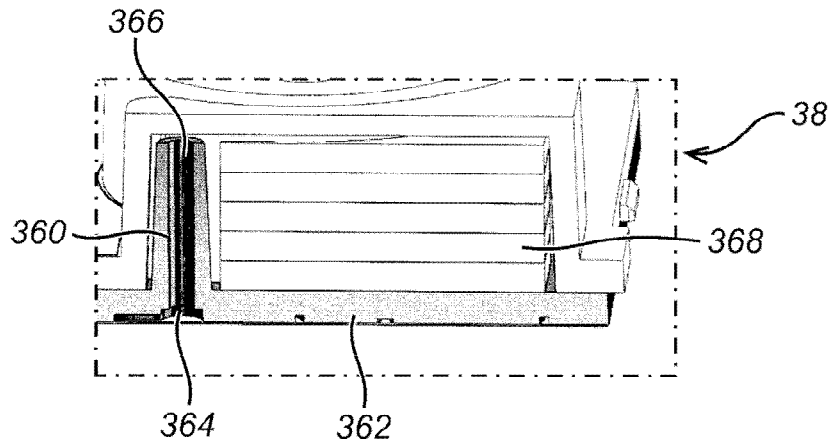


FIG. 15b

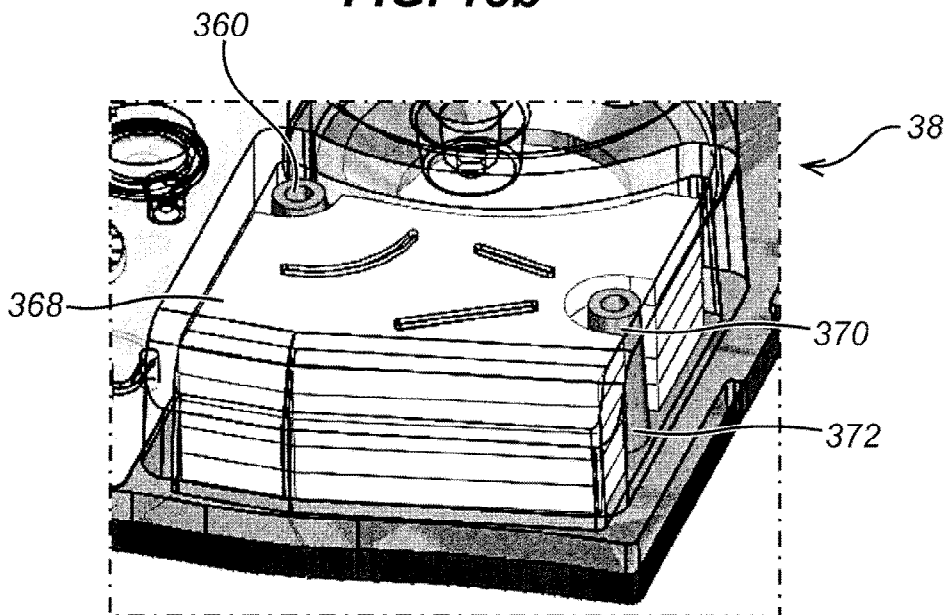


FIG. 16

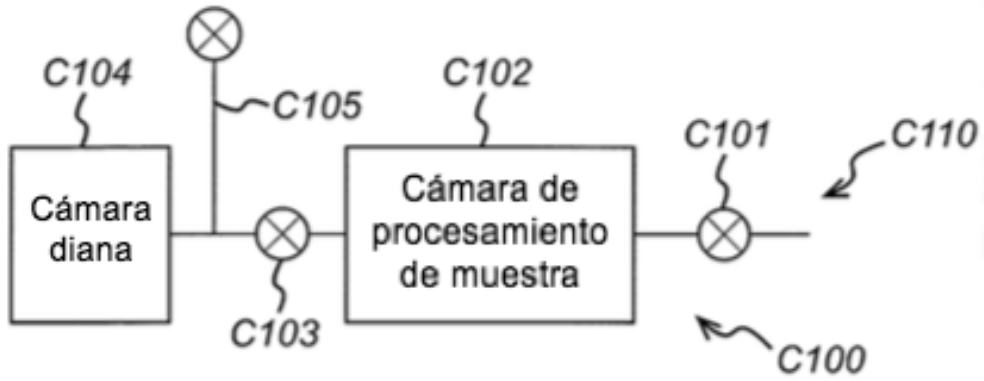


FIG. 17A

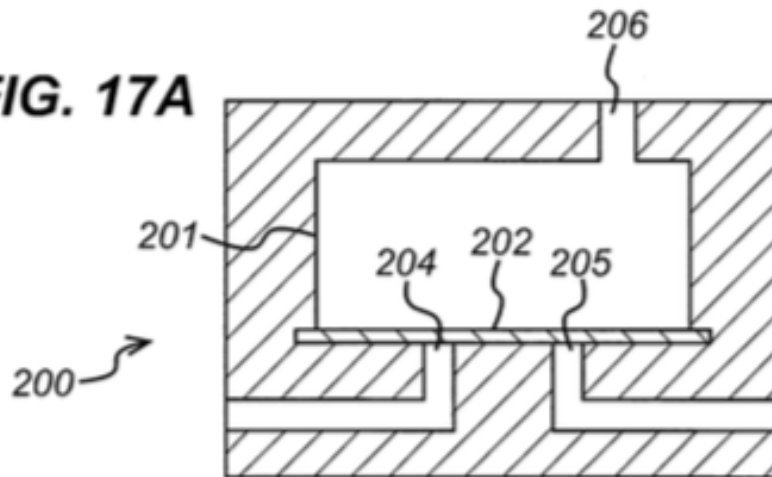
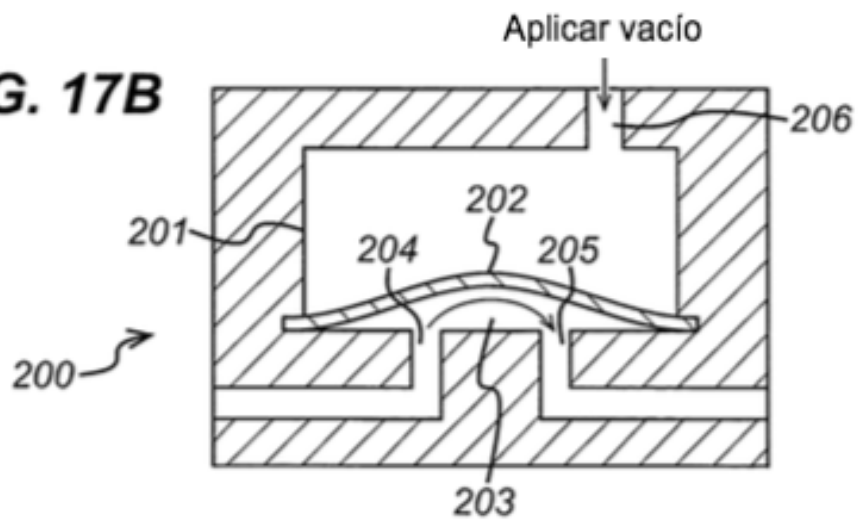


FIG. 17B



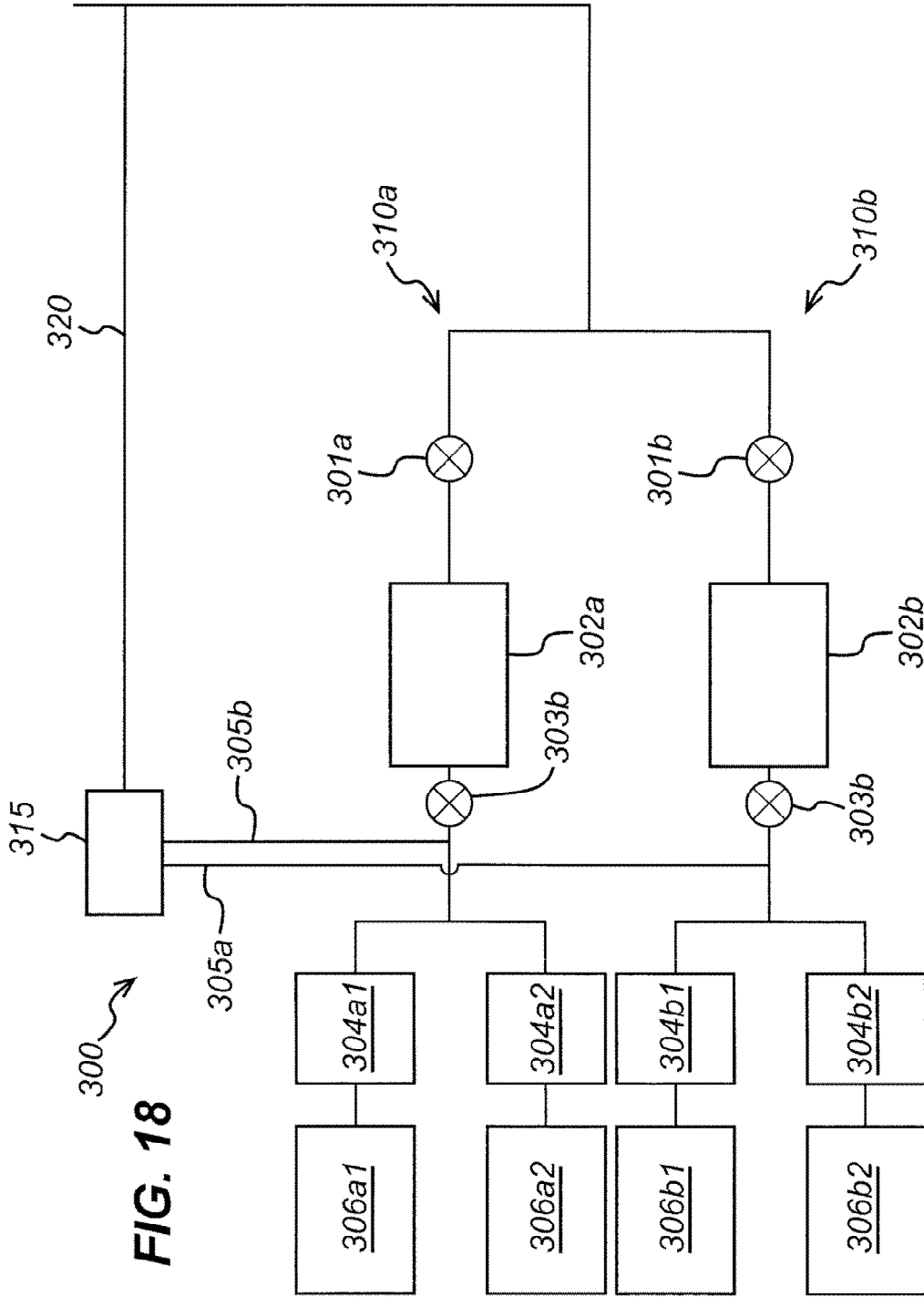


FIG. 18

FIG. 19

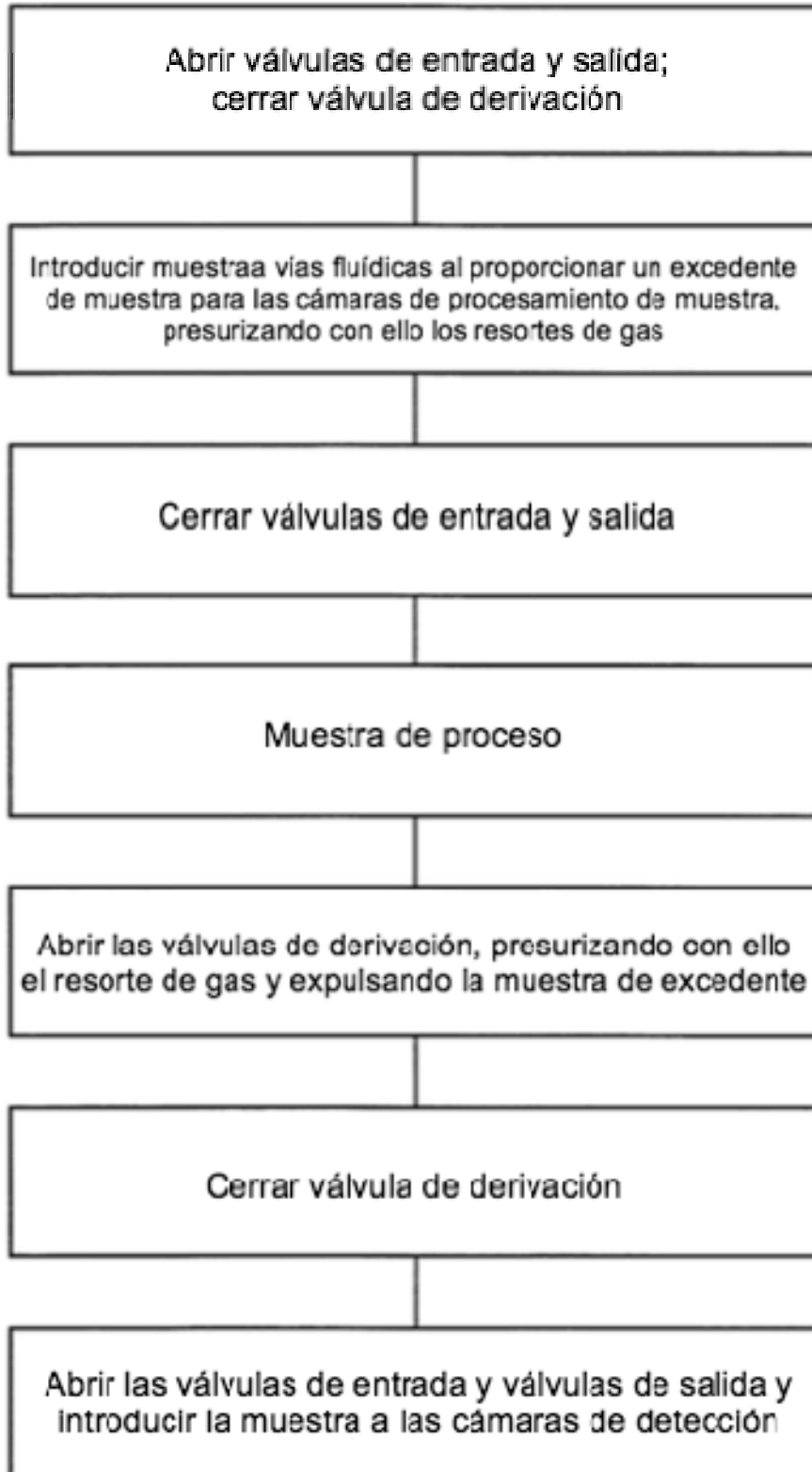


FIG. 20

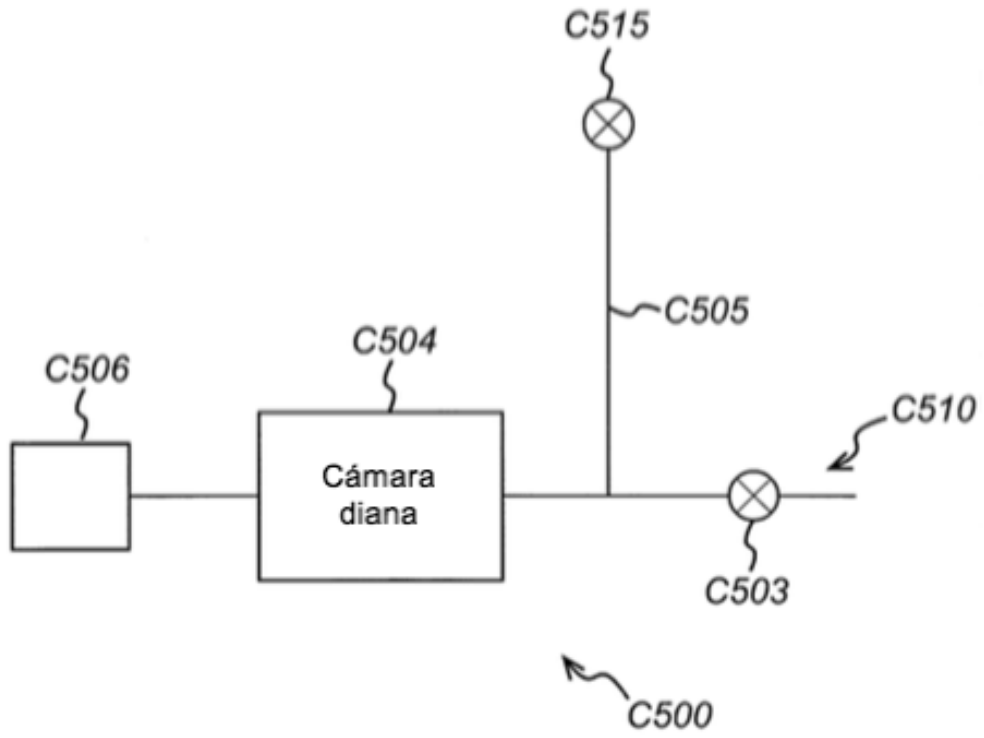


FIG. 21

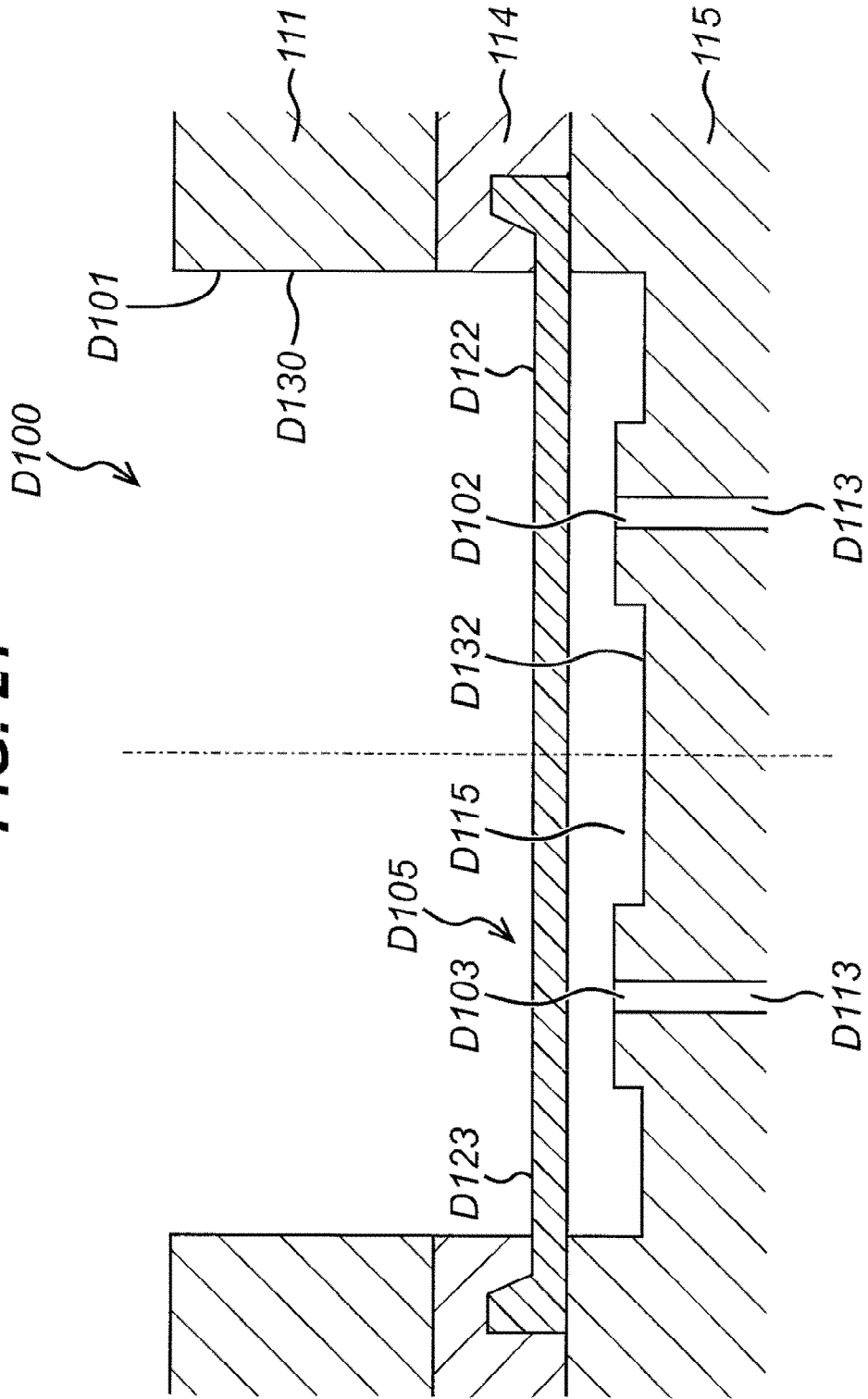


FIG. 22

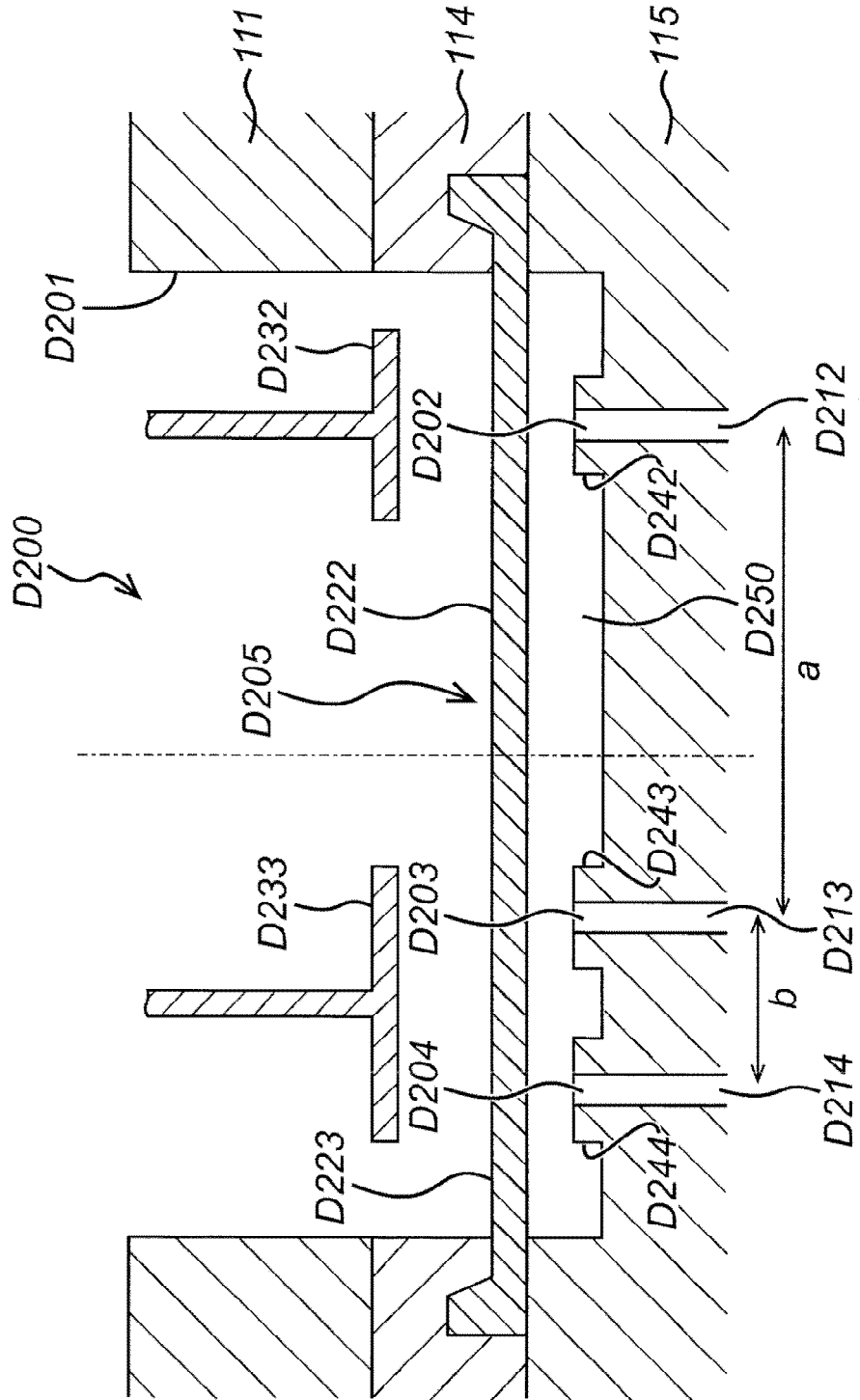


FIG. 24

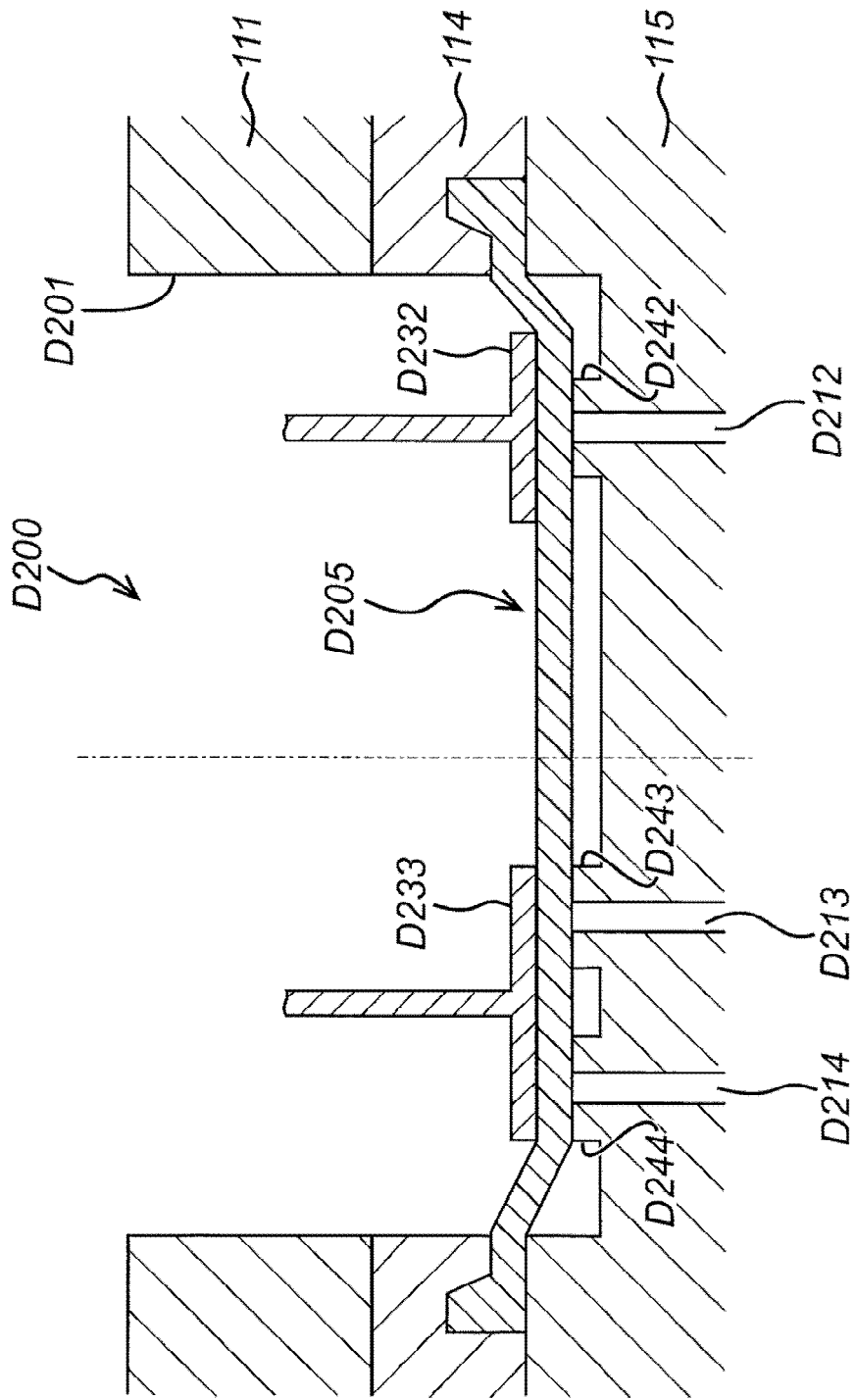


FIG. 25

