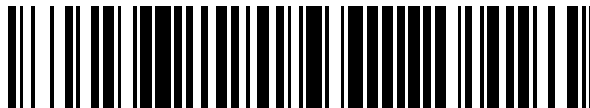


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 957**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/48** (2006.01)

**B01L 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2008 PCT/IN2008/000665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2009 WO09047804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2008 E 08838330 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2212692**

54 Título: **Microdispositivo de PCR portátil**

30 Prioridad:

**12.10.2007 IN CH23132007**

**12.10.2007 IN CH23122007**

**12.10.2007 IN CH23142007**

**12.10.2007 IN CH23112007**

**15.10.2007 IN CH23282007**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.10.2019**

73 Titular/es:

**BIGTEC PRIVATE LIMITED (100.0%)**  
**IInd Floor SID Entrepreneurship Building Indian**  
**Institute of Science Campus Bangalore**  
**Karnataka 560 012, IN**

72 Inventor/es:

**KUMAR, KISHORE KRISHNA;**  
**JAYARAMAN, RAVIPRAKASH;**  
**NARASIMHA, SANKARANAND KAIPA;**  
**RADHAKRISHNAN, RENJITH MAHILADEVI;**  
**VISWANATHAN, SATHYADEEP;**  
**NAIR, CHANDRASEKHAR BHASKARAN;**  
**SUBBARAO, PILLARISSETTI VENKATA;**  
**JAGANNATH, MANJULA;**  
**CHENNAKRISHNAIAH, SHILPA;**  
**MONDAL, SUDIP y**  
**VENKATARAMAN, VENKATAKRISHNAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 728 957 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

Microdispositivo de PCR portátil

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de PCR portátil en tiempo real con microchip de PCR de cerámicas cocidas conjuntamente a baja temperatura (LTCC) desechable. La invención describe además un método para controlar y monitorizar la micro-PCR y el aparato que participa en la PCR.

10

## Antecedentes de la invención

En los últimos cinco años, la investigación y el desarrollo de sistemas de diagnóstico clínico basados en tecnologías de *Lab on a chip* han aumentado enormemente. Dichos sistemas son muy prometedores para el diagnóstico clínico. Consumen material de muestra y reactivos solo en volúmenes extremadamente bajos. Los chip pequeños individuales pueden ser baratos y desechables. El tiempo desde el muestreo hasta el resultado tiende a ser muy corto. Los diseños de microchip más avanzados pueden realizar todas las funciones analíticas: muestreo, pretratamiento de muestras; etapas de separación, dilución y mezcla; reacciones químicas; y detección en un solo circuito microfluídico integrado. Los sistemas de *Lab o a chip* permiten a los diseñadores crear instrumentos de diagnóstico pequeños, portátiles, resistentes, de bajo coste y fáciles de usar que ofrecen altos niveles de capacidad y versatilidad. Los fluidos de microfluidos que fluyen en microcanales hacen posible el diseño de dispositivos analíticos y formatos de ensayo que no funcionarían a una escala mayor.

Las tecnologías *Lab o a chip* intentan emular los procedimientos de laboratorio que se realizarían en una muestra dentro de una estructura microfabricada. Los dispositivos de mayor éxito han sido aquellos que operan con muestras de fluidos. Se ha demostrado una gran cantidad de procedimientos de procesamiento químico, purificación y reacción en estos dispositivos. Se ha demostrado que cierto grado de integración monolítica de los procesos químicos produce dispositivos que realizan un procedimiento completo de medición química. Estos dispositivos se basan en procedimientos de análisis de laboratorio aceptados y, por lo tanto, pueden aceptar matrices de muestras más complejas que la detección química convencional.

Los avances recientes en biología molecular y celular se han producido en gran parte como resultado del desarrollo de técnicas analíticas rápidas y eficaces. Debido a la miniaturización y la multiplexación, técnicas como el chip de genes o el biochip permiten la caracterización de genomas completos en una sola configuración experimental. La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un método de biología molecular para la amplificación *in vivo* de moléculas de ácido nuclear. La técnica de PCR está reemplazando rápidamente a otras técnicas que consumen más tiempo y que son menos sensibles para la identificación de especies biológicas y patógenos en muestras forenses, ambientales, clínicas e industriales. Entre las biotecnologías, la PCR se ha convertido en la etapa analítica más importante de los laboratorios de ciencias de la vida para una gran cantidad de diagnósticos clínicos y moleculares. Los desarrollos importantes realizados en la tecnología de la PCR, como la PCR en tiempo real, han conducido a procesos de reacción rápidos en comparación con los métodos convencionales. Durante los últimos años, la tecnología de microfabricación se ha ampliado a la miniaturización del sistema de reacción y de análisis, tal como el análisis por PCR, con la intención de reducir aún más el tiempo de análisis y el consumo de reactivos.

En la mayoría de las PCR disponibles en la actualidad, los cambios de temperatura instantáneos no son posibles debido a la capacidad térmica de la muestra, del recipiente y del ciclador, y se producen tiempos de amplificación ampliados de 2 a 6 horas. Durante los periodos en los que la temperatura de la muestra está haciendo una transición de una temperatura a otra, se producen reacciones extrañas y no deseadas que consumen reactivos importantes y crean compuestos interferentes no deseados.

La LTCC se usa en la encapsulación de dispositivos semiconductores. Este sistema permite la integración de la función eléctrica y estructural. La secuencia de fabricación de capa por capa del proceso de fabricación de la LTCC permite la creación de estructuras tridimensionales con elementos eléctricos integrados con facilidad. Además, es más económico de procesar en comparación con el procesamiento de silicio. Un chip fabricado en un sustrato de cerámica como la LTCC (cerámicas cocidas conjuntamente a baja temperatura) permite la integración de elementos mecánicos y eléctricos de manera fácil y económica.

De Kricka, L. J. y Wilding, P., *Anal. Bioanal. Chem.* (2003) 377, páginas 820 a 825 se conocen diferentes tipos de diseños de microchip de PCR, métodos de fabricación y componentes de un dispositivo de PCR de microchip. En particular, el documento desvela una máquina de PCR en miniatura alimentada por batería, una fabricación mediante sinterización a baja temperatura de capas ensambladas de cinta cerámica, la presencia de una cámara de reacción, un calentador, un sensor térmico que proporciona retroalimentación a un controlador de temperatura y una monitorización de la fluorescencia a través de una cubierta de vidrio transparente, así como un cálculo de un resultado y una comunicación del resultado a una pantalla o a un sistema de información.

65

El documento WO 01/41931 A2 se refiere a métodos y aparatos para realizar análisis, en particular, dispositivos microfluídicos. Los dispositivos pueden fabricarse usando tecnología de múltiples capas de cerámica para formar dispositivos en los que se pueden realizar reacciones moleculares paralelas, controladas independientemente, tales como reacciones de amplificación de ácido nucleico que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa.

El uso de una plataforma de computación portátil como la PDA le otorga al sistema suficiente poder de cómputo para controlar la electrónica y proporcionar una interfaz de usuario rica pero simple para mostrar los datos. También hace que todo el sistema sea modular y, por lo tanto, permite una actualización fácil del sistema con un coste mínimo para el usuario.

#### OBJETOS DE LA INVENCIÓN

El objeto principal de la presente invención es desarrollar un microdispositivo de PCR portátil.

Otro objeto más de la presente invención es desarrollar un método para monitorizar y controlar un microdispositivo de PCR portátil.

#### DECLARACIÓN DE LA INVENCIÓN

Por consiguiente, la invención proporciona un microdispositivo de PCR portátil según lo descrito en la reivindicación 1; y también proporciona un método para monitorizar y controlar la micro-PCR portátil según lo descrito en la reivindicación 11.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ADJUNTOS

La invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos:

La Figura 1 muestra un esquema de una realización del microdispositivo de PCR de LTCC de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 muestra una vista ortográfica de una realización del microchip de PCR de LTCC.

La Figura 3 muestra una sección transversal de una realización del microchip de PCR de LTCC.

La Figura 4 muestra un diseño de capa por capa de una realización del microchip de PCR de LTCC.

La Figura 5 muestra un modelo del diseño de la cámara de reacción del chip fabricado.

La Figura 6 muestra un sistema de detección óptica bifurcado que usa fibra óptica bifurcada.

La Figura 7 muestra un diagrama de bloques del circuito que controla el calentador y el sensor de temperatura.

La Figura 8 muestra la fusión del fragmento de ADN lambda-636 en un chip usando el calentador/termistor integrado, controlado por la unidad portátil.

La Figura 9 muestra la amplificación por PCR del fragmento de ADN lambda-311 en el chip. (a) Señal de fluorescencia en tiempo real del chip; (b) Imagen del gel que confirma el producto de amplificación.

La Figura 10 muestra una imagen del gel de la amplificación de la PCR procesada en sangre y plasma para la unidad ribosomal 16S de *Salmonella*.

La Figura 11 muestra una imagen del gel de la amplificación de la PCR directa en sangre para la unidad ribosomal 16S de *Salmonella*.

La Figura 12 muestra una imagen del gel de la amplificación de la PCR directa en plasma para la unidad ribosomal 16S de *Salmonella*.

La Figura 13 muestra la amplificación por PCR del gen de *Salmonella* usando microchip. (a) Señal de fluorescencia en tiempo real del chip; (b) Imagen del gel que confirma el producto de amplificación.

La Figura 14 muestra el tiempo que se tarda en amplificar el ADN vírico de la Hepatitis B usando el chip de LTCC.

La Figura 15 muestra una descripción general de la aplicación del asistente digital personal (PDA) que se comunica con la unidad portátil.

La Figura 16 muestra una curva de fusión obtenida usando un chip de LTCC para un derivado de la señal de fluorescencia para la fusión del ADN de  $\lambda$ -311.

La Figura 17 muestra un diagrama de flujo para el programa de ciclos térmicos que se ejecuta en la PDA.

La Figura 18 muestra la señal de fluorescencia en tiempo real del ADN del VHB amplificado usando un microchip.

La Figura 19 muestra un sistema de detección óptica de divisor de haz que usa divisor de haz.

La Figura 20 muestra un sistema de detección óptica híbrido.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un microdispositivo de PCR portátil que comprende:

a) un microchip de PCR de LTCC que comprende un calentador, una cámara de reacción para cargar una muestra; b) un control del calentador para regular el calentador basándose en la entrada recibida de un sensor de temperatura;

c) un sistema de detección óptica para detectar una señal de fluorescencia de la muestra; y

d) al menos una interfaz de comunicación para interactuar con otros dispositivos.

En una realización de la presente invención, se proporciona al menos una capa conductora entre el calentador y la cámara de reacción.

5 En una realización de la presente invención, la cámara de reacción está rodeada por anillos conductores.

En una realización de la presente invención, los anillos conductores están conectados a la capa conductora con postes.

10 En una realización de la presente invención, el conductor está hecho de un material seleccionado del grupo que comprende oro, plata, platino y paladio o aleaciones de los mismos.

En una realización de la presente invención, el sensor de temperatura se coloca fuera del chip para medir la temperatura del chip.

15 En una realización de la presente invención, el sensor de temperatura está integrado en al menos una capa del chip.

En una realización de la presente invención, el sensor de temperatura es un termistor.

20 En una realización de la presente invención, el sensor de temperatura está conectado como un brazo de un circuito de puente.

En una realización de la presente invención, la salida del circuito de puente se amplifica antes de alimentarla al control del calentador para regular el calentador.

25 En una realización de la presente invención, el chip comprende una tapa de sellado transparente para cubrir la cámara de reacción.

En una realización de la presente invención, el chip es desechable.

30 En una realización de la presente invención, el sistema de detección óptica se selecciona del grupo que comprende un sistema de detección óptica de divisor de haz, un sistema de detección óptica híbrido y un sistema de detección óptica bifurcado.

35 En una realización de la presente invención, el sistema óptico comprende una fuente de luz y un fotodetector para detectar una señal de fluorescencia de la muestra.

En una realización de la presente invención, un amplificador de bloqueo amplifica la señal detectada.

40 En una realización de la presente invención, el sistema óptico bifurcado usa una fibra óptica bifurcada con la fuente de luz colocada en un extremo bifurcado (605a) y el fotodetector colocado en otro extremo bifurcado (605a) de la fibra óptica.

45 En una realización de la presente invención, el extremo común (605b) de la fibra óptica bifurcada apunta hacia la muestra.

En una realización de la presente invención, el sistema de detección óptica híbrido usa fibra óptica para dirigir la luz hacia la muestra.

50 En una realización de la presente invención, el sistema de detección óptica híbrido usa lentes para enfocar el haz emitido desde la muestra.

En una realización de la presente invención, la interfaz de comunicación se selecciona del grupo que comprende puerto serie, USB, Bluetooth o combinaciones de los mismos.

55 En una realización de la presente invención, el otro dispositivo recoge la temperatura del chip y la señal amplificada del dispositivo portátil.

El otro dispositivo se selecciona del grupo que comprende teléfono inteligente, PDA y dispositivo programable.

60 La presente invención también se refiere a un método para monitorizar y controlar un microdispositivo de PCR portátil, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) establecer una comunicación entre el microdispositivo de PCR portátil y otro dispositivo a través de una interfaz de comunicación;

65 b) iniciar un proceso de ciclos térmicos basado en los valores de perfil térmico recibidos del otro dispositivo para controlar un microchip de PCR de LTCC; y

c) enviar una señal óptica detectada por el sistema óptico al otro dispositivo.

En una realización de la presente invención, un usuario suministra los valores del perfil térmico al otro dispositivo a través de la interfaz de usuario.

5 En una realización de la presente invención, se crean se modifican o se eliminan los perfiles térmicos a través de la interfaz de usuario.

En una realización de la presente invención, el otro dispositivo proporciona la autenticación del usuario.

10 En una realización de la presente invención, el otro dispositivo almacena una pluralidad de perfiles térmicos.

En una realización de la presente invención, el perfil térmico proporciona el valor de punto de ajuste y el número de ciclos.

15 En una realización de la presente invención, se mantiene el chip a una temperatura y durante un tiempo determinado por el valor del punto de ajuste.

En una realización de la presente invención, se lleva la temperatura del microchip de PCR a temperatura ambiente deteniendo el proceso de ciclado térmico.

20 En una realización de la presente invención, se mantiene constante la temperatura del microchip de PCR cuando se detiene el ciclo térmico.

25 En una realización de la presente invención, se comunica con el otro dispositivo usando una pila de perfil puerto serie Bluetooth móvil.

En una realización de la presente invención, se representan los datos térmicos y ópticos en una unidad de visualización del otro dispositivo.

30 Otro dispositivo (101) son aquellos que pueden interactuar con el dispositivo portátil a través de cualquier interfaz de comunicación convencional (107) como, por ejemplo, de cable (puerto serie RS232, USB) o inalámbrica (Bluetooth implementando un perfil puerto serie) etc.

35 El microchip de PCR de LTCC es un chip de PCR hecho de capas de LTCC. Este chip se puede colocar o quitar fácilmente de la unidad portátil.

El perfil térmico tiene la temperatura y el tiempo, que son los valores de punto de ajuste, así como el recuento de los ciclos numéricos para completar un proceso de ciclo térmico.

40 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica descubierta para sintetizar múltiples copias de un fragmento específico de ADN a partir de un molde. El proceso de PCR original se basa en la enzima ADN polimerasa estable al calor de *Thermus aquaticus* (Taq), que puede sintetizar una cadena complementaria a una cadena de ADN dada en una mezcla que contiene cuatro bases de ADN y dos fragmentos de ADN de cebador que flanquean la secuencia diana. La mezcla se calienta para separar las cadenas de ADN de doble hélice que contiene la secuencia diana y luego se enfría para permitir que los cebadores encuentren y se unan a sus secuencias complementarias en las cadenas separadas y la polimerasa de Taq para extender los cebadores a nuevas cadenas complementarias. Los ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento multiplican el ADN diana de manera exponencial, ya que cada nueva cadena doble se separa para convertirse en dos molde para una síntesis adicional.

50 Un perfil típico de temperatura para la reacción en cadena de la polimerasa es el siguiente:

1. Desnaturalización a 93 °C durante de 15 a 30 segundos

2. Hibridación de cebador a 55 °C durante de 15 a 30 segundos

3. Extensión de cebadores a 72 °C durante de 30 a 60 segundos

60 Como ejemplo, en la primera etapa, la solución se calienta hasta 90-95 °C, de modo que el molde de cadena doble se funde ("se desnaturaliza") para formar dos cadenas individuales. En la siguiente etapa, se enfría hasta 50-55 °, de modo que los fragmentos cortos de ADN especialmente sintetizados ("cebadores") se unen a la sección complementaria apropiada del molde ("hibridación"). Finalmente, la solución se calienta hasta 72 °C cuando una enzima específica ("ADN polimerasa") extiende los cebadores al unir bases complementarias de la solución. Por lo tanto, dos cadenas dobles idénticas se sintetizan a partir de una sola cadena doble.

65 La etapa de extensión del cebador debe aumentarse en aproximadamente 60 s/kbase para generar productos más largos que unos cuantos cientos de bases. Los anteriores son tiempos de instrumentos típicos; de hecho, las etapas

de desnaturalización e hibridación ocurren casi instantáneamente, pero las tasas de temperatura en los instrumentos comerciales, en general, son inferiores a 1 °C/seg cuando se usan bloques de metal o agua para el equilibrio térmico y las muestras están contenidas en tubos de microcentrífuga de plástico.

5 Mediante la micromaquinaria de cámaras de PCR de baja masa térmicamente aisladas; es posible producir en masa un instrumento de PCR mucho más rápido, más eficiente energéticamente y más específico. Es más, las rápidas transiciones de una temperatura a otra garantizan que la muestra pase una cantidad mínima de tiempo a temperaturas intermedias no deseadas, de modo que el ADN amplificado tenga una fidelidad y una pureza óptimas.

10 Las cerámicas cocidas conjuntamente a baja temperatura (LTCC) constituyen la versión moderna de la tecnología de película gruesa que se usa en la encapsulación de componentes electrónicos para la industria automotriz, de defensa, aeroespacial y de telecomunicaciones. Es un material cerámico vítreo a base de alúmina que es químicamente inerte, biocompatible, térmicamente estable (> 600 °C), tiene una baja conductividad térmica (<3 W/mK), buena resistencia mecánica y proporciona buena hermeticidad. Se usa convencionalmente en la encapsulación de dispositivos  
15 electrónicos de nivel de chip donde cumplen funciones tanto estructurales como eléctricas. Los presentes inventores han reconocido la idoneidad de la utilización de la LTCC para aplicaciones en microchip de PCR, y, según el saber de los inventores, la LTCC no se ha usado antes para dicho fin. Los sustratos básicos en la tecnología LTCC son, preferentemente, capas no sinterizadas (verdes) de material cerámico vítreo con un aglutinante polimérico. Las características estructurales se forman cortando/perforando/taladrando estas capas y apilando varias capas. El  
20 proceso de capa por capa permite crear características tridimensionales esenciales para los MEMS (microsistemas electromecánicos). Se pueden aplicar fácilmente características de hasta 50 micrómetros a la LTCC. Los circuitos eléctricos se fabrican mediante la serigrafía de pasta conductora y resistiva en cada capa. Se interconectan múltiples capas mediante vías de punzonado y rellenándolas con pasta conductora. Estas capas son apiladas, comprimidas y sinterizadas. En la literatura, se ha informado de un procesamiento de pilas de hasta 80 capas. El material sinterizado  
25 es denso y tiene buena resistencia mecánica.

La Figura 1 muestra un esquema de una realización del microdispositivo de PCR que indica diversos componentes y sus funciones. El dispositivo consta de un microchip de PCR (103) de LTCC desechable, que tiene una cámara de  
30 reacción para contener la muestra con un calentador integrado y un sensor de temperatura integrado para los ciclos térmicos. El sensor de temperatura es un termistor. El sensor de temperatura también puede colocarse fuera del chip en lugar de estar integrado dentro del chip. El sensor de temperatura podría ser cualquier sensor capaz de medir la temperatura. El microchip de PCR (103) de LTCC está interconectado a una unidad electrónica portátil (109) que comprende los circuitos de control (102) que tienen un control del calentador y un circuito controlador, que controla el calentador en función del valor del sensor de temperatura. El valor del sensor de temperatura se suministra al control  
35 del calentador a través de un circuito de detección de la temperatura (107). El control del calentador establece la temperatura del chip y mantiene la temperatura durante un tiempo proporcionado por un microcontrolador (106) como los valores de punto de ajuste. Todos los componentes de la unidad portátil (109) están alimentados por una batería (108).

40 El dispositivo portátil (109) también alberga un sistema óptico (104) para la detección de señales de fluorescencia del microchip de PCR (103). Esto incluye una fuente de luz, un circuito para controlar la fuente de luz, un detector para detectar la luz emitida por la muestra, un circuito para amplificar la señal (de la muestra). El dispositivo portátil (109) se conectará con otro dispositivo de procesamiento (101) como USB/Bluetooth a un teléfono inteligente/PDA o cualquier dispositivo de procesamiento para la adquisición y el control de datos.

45 La batería puede ser una batería accesible que tenga un puerto provisto para recargarse desde fuentes externas. Por ejemplo, la batería puede ser de tipo níquel-cadmio, ion de litio o polímero, que pueden suministrar una corriente máxima superior a 1 A.

50 El dispositivo portátil también comprende al menos una interfaz de comunicación (107) para comunicarse con los otros dispositivos (101). La interfaz de comunicación (107) puede ser por cable (puerto serie RS232, USB) o inalámbrica (Bluetooth implementando un perfil puerto serie). Por lo general, el perfil puerto serie se usa para la comunicación debido a su velocidad y facilidad de implementación. La interfaz transfiere datos e instrucciones entre el otro dispositivo (101) y el microcontrolador (106).

55 En el presente documento, otros dispositivos (101) son aquellos capaces de controlar y monitorizar el dispositivo portátil. Por ejemplo, el otro dispositivo podría ser una PDA, un teléfono inteligente, un ordenador, un microcontrolador o cualquier dispositivo de procesamiento capaz de comunicarse con el dispositivo portátil. El otro dispositivo también proporciona una interfaz de usuario para que el usuario pueda introducir y ver los datos. El otro dispositivo al que se hace referencia en el presente documento tiene la capacidad de ejecutar el software pertinente para comunicar,  
60 controlar y monitorizar el dispositivo portátil (109).

Un microcontrolador (106) controla la electrónica del dispositivo portátil (109) y se comunica con el otro dispositivo (101) a través de una interfaz. El microcontrolador tiene un convertidor de datos analógicos a digitales y de digitales a  
65 analógicos para interactuar con el circuito analógico, es decir, el circuito de control (102), el circuito de detección de la temperatura (107) y el circuito óptico (105). El microcontrolador (106) recopila los valores de punto de ajuste del otro

dispositivo y los proporciona al circuito de control (102). El microcontrolador también proporciona la temperatura detectada por el circuito de detección de la temperatura (107) y los datos ópticos proporcionados por el circuito óptico (105) al otro dispositivo. En el presente documento, los datos ópticos son la señal detectada por el sistema óptico (105).

La Figura 2 muestra una vista ortográfica de una realización del microchip de PCR que indica la cámara de reacción (201) o el pocillo. La figura indica el ensamblaje del calentador (201) y un termistor (203) del sensor de temperatura dentro del microchip de PCR de LTCC. También se indican las líneas conductoras (205) del calentador y las líneas conductoras (204) del termistor. Estas líneas conductoras ayudarán a proporcionar conexión al calentador y al termistor integrados en los circuitos externos.

Con referencia a la Figura 3 que muestra una vista en sección transversal de una realización del microchip de PCR de LTCC en el que (206a y 206b) indican las almohadillas de contacto para el calentador (202), y (207a y 207b) indican la almohadilla de contacto para el termistor (203).

Haciendo referencia a la Figura 4, que muestra un diseño de capa por capa de una realización del microchip de PCR de LTCC en el que el chip, comprende 12 capas de cintas de LTCC. Hay dos capas base (401), tres capas intermedias que tienen la capa del calentador (402), una capa conductora (403) y una capa que tiene termistor (404), mientras que (405) forma la capa de interfaz con la cámara de reacción (201). Las capas (406) de la cámara de reacción consisten en seis capas como se muestra. La capa conductora (403) también se proporciona entre las capas del calentador y las capas del termistor. También se indican la línea conductora (205) del calentador y las líneas conductoras (204) del termistor. En la Figura, se muestran las líneas conductoras (204) ubicadas a ambos lados de la capa (404) del termistor. El diseño del calentador puede ser de cualquier forma como "escalera", "serpentin", "línea", "placa", etc., con tamaños que varían de 0,2 mm x 3 mm a 2 mm x 2 mm. El tamaño y la forma del calentador se pueden seleccionar según los requisitos. Los requisitos podrían depender del tamaño de la cámara de reacción o la muestra ensayada o el material usado como capa conductora.

El chip de LTCC tiene un volumen de pocillo de 1 a 25  $\mu$ l. El calentador se basa en un elemento resistivo de película gruesa, que se emplea en paquetes de LTCC convencionales. El sistema de termistor con alúmina se usa para la fabricación de sensores de temperatura integrados. El TCR medido del chip estaba entre 1 y 2  $\omega$ /°C. El chip fue fabricado en el sistema verde DuPont 951. La capa de termistor puede colocarse en cualquier parte del chip, o se puede colocar un sensor de temperatura fuera del chip en lugar de un termistor dentro del chip.

Tras determinar la uniformidad del perfil de temperatura en el chip, se llevaron a cabo reacciones de PCR en estos chips. Se han amplificado con éxito fragmentos de ADN Lambda, ADN de *Salmonella* y ADN de la hepatitis B usando estos chips. La Figura 5 muestra el microchip en vistas tridimensionales que muestran sus diversas conexiones con el calentador, los anillos conductores, el termistor y los anillos de conducción (502). También muestra los postes (501) que conectan los anillos conductores (502) a la placa conductora (403).

El calentador integrado está hecho de pasta de resistencia como la serie CF de DuPont compatible con la LTCC. Se puede usar cualquier sistema de cinta de cerámica verde tal como DuPont 95, ESL (serie 41XXX), Ferro (sistema A6) o Haraeus. Dicho sensor de temperatura integrado es un termistor fabricado usando una pasta de termistor de resistencia de PTC (coeficiente de temperatura positivo) (por ejemplo, 509X D, son ESL 2612 de ESL Electroscience) para sustratos de alúmina. NTC: también se puede usar el coeficiente de temperatura negativo de la pasta de resistencia como NTC 4993 de EMCA Remex.

La tapa de sellado transparente (de 300 a 1.000 nm de longitud de onda) es para evitar la evaporación de la muestra de dicha cámara de reacción, y está hecha de material polimérico.

Sistema de detección óptica (104, 105)

El sistema de detección óptica (fluorescencia) comprende una fuente de iluminación, normalmente, un LED, filtros para la selección de la luz de longitud de onda apropiada, óptica para suministrar y recoger la luz de la muestra, y sensor de luz (fotodiodo, tubo fotomultiplicador, fototransistor, sensor de imagen, etc.). También se compone de circuitos (105) para controlar la fuente de luz, para detectar la señal del sensor de luz. En aplicaciones portátiles, se prefiere un fotodiodo o fototransistor o sensor de imagen debido a su bajo consumo de energía (<1 miliW). La detección en tiempo real de productos de PCR emplea una técnica de fluorescencia, en la que, en un colorante fotosensible (fluoróforo como SYBR Green) presente en la mezcla de PCR, absorbe la luz de cierta longitud de onda y emite a una longitud de onda mayor (470 nm y 520 nm para SYBR Green). Por lo general, la intensidad de la luz del emisor aumenta o disminuye progresivamente con el progreso satisfactorio de la PCR. La monitorización del cambio en la intensidad emitida confiere capacidad de detección en tiempo real para el dispositivo de PCR. El acoplamiento y la recogida de luz de la muestra de PCR se pueden lograr de múltiples maneras. En el sistema, se pueden emplear los siguientes métodos:

- Sistema de detección óptica bifurcado que usa fibra óptica bifurcada (605) (plástico multimodo, o fibra o haces de fibras de sílice) que tiene un extremo bifurcado (605a) y un extremo común (605b). Uno de los extremos bifurcados

(605a) es para la incidencia de la luz desde el LED (601) en la muestra y el otro extremo a la luz incidente en un fotodetector (602). El extremo común (605b) dirige la luz hacia la muestra. Este método emplea ópticas para acoplar la luz a la fibra y desde la fibra, además de filtros para la selectividad de la longitud de onda.

- Un sistema de detección óptica de divisor de haz que usa divisores de haz, lentes y filtros para enfocar la luz a la muestra y la detección. Figura 19
- Sistema de detección óptica híbrido que emplea fibra óptica para iluminación y detección directa usando lentes de enfoque, filtro y detector. Figura 20

La Figura 6 muestra una realización del sistema óptico que se prefiere para un dispositivo de PCR de acuerdo con la presente invención. La Figura muestra la configuración con fibra óptica bifurcada (605) que comprende una fuente de excitación de un LED (601) en un extremo del extremo bifurcado (605a) y la fluorescencia detectada por un fotodetector (602) en otro extremo bifurcado (605a). El LED (601) y el fotodetector (602) están acoplados al extremo bifurcado (605a) de la fibra óptica y al extremo común (605b) mirando hacia la cámara de reacción (201) del chip (200) de LTCC. La figura también muestra un filtro (604a) acoplado al LED (601) y un filtro (604b) acoplado al fotodetector (602) mediante acopladores (603a y 603b) respectivamente.

La señal de salida del detector (602) se amplifica (*in situ* en un tubo fotomultiplicador, fotodiodo de avalancha) usando un circuito amplificador (701) como en la Figura 7 antes de enviarse al controlador del calentador. Un ejemplo de circuito amplificador es el circuito de bucle enganchado en fase (PLL) (amplificador de bloqueo). En este circuito, la iluminación se pulsa a una frecuencia predefinida (normalmente, en un intervalo de 10 Hz a 500 kHz). El circuito de procesamiento de la señal de salida (señal de fluorescencia) se bloquea en la misma frecuencia y genera una corriente continua proporcional (CC) que se amplifica, se convierte a una tensión y se amplifica aún más al microcontrolador (106). Este circuito mejora la relación señal a ruido de la señal y elimina el ruido relacionado con la frecuencia en la señal. El circuito de bloqueo se basa en un modulador/desmodulador equilibrado (como AD 630 JN de Analog Devices).

La Figura 7 muestra un diagrama de bloques del circuito que controla el calentador y el termistor, en el que el termistor del microchip de PCR (200) de LTCC actúa como uno de los brazos del circuito puente (706). Incluso cuando el sensor de temperatura se coloca fuera del chip, se puede conectar a uno de los brazos del circuito puente. La salida amplificada del puente desde el amplificador puente (701) se proporciona como una entrada al controlador (703) de la PID, en el que se digitaliza y el algoritmo de PID proporciona un resultado digital controlado. El resultado se vuelve a convertir de nuevo en tensión analógica, y esto acciona el calentador usando un transistor de potencia presente en el controlador (704) del calentador.

El circuito analógico implementado para el control (703) del calentador emplea una P o PI o PD o PID (derivada proporcional integral) o puede ser un simple control de encendido/apagado basado en el resultado del termistor. El sensor de temperatura es una parte de un circuito que detecta el cambio de temperatura. En esta figura, se considera un ejemplo de termistor para el sensor de temperatura en el que se fabrica parte del circuito puente de wheatstone (706). El cambio en la resistencia del termistor debido al calentamiento o enfriamiento da como resultado una tensión de salida finita del circuito. Esta tensión está relacionada con la temperatura del pocillo en el chip de LTCC. La tensión medida se usa para determinar si el calentador debe encenderse o apagarse. El calentador se suministra con una potencia predefinida determinada por la temperatura máxima que se alcanzará en el pocillo (en el chip de LTCC). Para tener en cuenta la variación de resistencia en el calentador y el termistor (~20 % para el chip optimizado), se ha desarrollado un circuito de autocalibración que se está implementando en el portátil. El circuito compensa los cambios en las resistencias usando un termistor comercial (PT100) expuesto al medio ambiente.

El circuito de control del calentador es manejado por un microcontrolador. El microcontrolador está programado para ejecutar el perfil térmico deseado a través de la interfaz de comunicación. El programa controla el circuito de control (102) del calentador para ejecutar el perfil deseado en el chip de LTCC. Se ha probado una interfaz de Bluetooth para controlar el microcontrolador mediante un software que se ejecuta en una PDA (iPaq con WincowsCE). El desarrollo del software para la comunicación por Bluetooth y el desarrollo de GUI (interfaz gráfica de usuario) se están implementando en el dispositivo portátil (109). El método para controlar el calentador y leer el valor del sensor de temperatura desvelado en el presente documento es solo un ejemplo. Esto no debe considerarse como la única forma de controlador ni como una limitación. Otros medios y métodos para controlar el calentador y leer el valor del termistor son aplicables a la presente divulgación.

El otro dispositivo permite a los usuarios crear perfiles térmicos para la PCR a través de una GUI (interfaz gráfica de usuario). Los perfiles térmicos se transfieren al microcontrolador a través de la interfaz de comunicación (107). El perfil térmico comprende valores de puntos de ajuste (temperatura y tiempo) y el número de ciclos. Los datos del sensor de temperatura y los datos de detección óptica del microcontrolador se envían al otro dispositivo y se muestran en el mismo. El ordenador también evaluará los datos y mostrará el resultado de la reacción. El ordenador portátil se ejecuta en un sistema operativo como Windows CE/móvil, Palm OS, Symbian, Linux. En otra realización más, es posible que solo se envíen los valores de punto de ajuste al dispositivo portátil, y que el número de ciclos sea monitorizado por el otro dispositivo. El microcontrolador logra los valores de punto de ajuste enviados desde un perfil térmico por el otro dispositivo.



Por lo general, el producto de PCR se analiza usando electroforesis en gel. En esta técnica, los fragmentos de ADN después de la PCR se separan en un campo eléctrico y se observan mediante tinción con un colorante fluorescente. Un esquema más adecuado es usar un colorante fluorescente que se une específicamente al ADN de doble cadena para monitorizar la reacción de manera continua (PCR en tiempo real). Un ejemplo de dicho colorante es SYBR GREEN, que se excita con 490 nm de luz azul y emite a 520 nm de luz verde cuando se une al ADN. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN del producto de doble cadena formado durante la PCR y, por consiguiente, aumenta con el número de ciclos.

Un ejemplo presentado a continuación explica las diferentes posibilidades que se pueden lograr usando el dispositivo portátil (109) con otro dispositivo. El otro dispositivo considerado en dicho ejemplo es una PDA/teléfono inteligente.

La aplicación de PDA/teléfono inteligente diseñada se ejecuta en una plataforma Windows 5 móvil. Usa la pila del perfil puerto serie (SPP) Bluetooth móvil para Windows para comunicarse con la unidad portátil. La unidad portátil se compone de un módulo bluetooth, que se conecta con el microcontrolador a través del puerto UART (recepción y transmisión asíncronas universales) para la comunicación de datos. La funcionalidad principal de la aplicación es controlar y monitorizar el proceso de ciclado térmico de la unidad portátil a través de varios perfiles térmicos almacenados. También tiene funcionalidades como control de acceso de dos niveles; representación de datos, creación de perfiles térmicos, etc. La Figura 15 ilustra el método de comunicación entre la aplicación y la unidad portátil.

#### 20 *Aplicación PDA*

El programa de aplicación PDA acepta los datos de entrada que incluyen valores de puntos de ajuste (temperatura y tiempo) y el número de ciclos. Los valores de puntos de ajuste son transferidos a la unidad portátil a través de una conexión Bluetooth y esperan la respuesta de la unidad portátil. Al alcanzar el valor de punto de ajuste, la unidad portátil se comunica de la misma manera con la PDA que envía el siguiente conjunto de instrucciones (Figura 17). La PDA también recibe datos del dispositivo portátil (datos de temperatura y ópticos) y los muestra. Para comunicar y ejecutar las instrucciones enviadas por la PDA, el dispositivo portátil tiene un microcontrolador con programa integrado que permite la comunicación y el control de circuitos analógicos mediante Bluetooth. Además, el programa del microcontrolador envía continuamente datos de temperatura y ópticos a la PDA.

La aplicación PDA tiene 4 módulos:

1. Control de acceso
2. GUI
3. Procesamiento de datos y comunicación

#### Control de acceso

1. Este módulo permite a los usuarios iniciar sesión en la aplicación.
2. Tiene una pantalla de inicio de sesión con nombre de usuario y contraseña.
3. Hay dos niveles de controles de acceso a. Administrativo b. Usuario
4. El administrador tiene los siguientes poderes:
  - a. Crear usuarios y carpetas de usuario
  - b. Crear perfiles térmicos
  - c. Conectar/Cambiar dispositivo portátil (109)
5. Una vez que los usuarios inician sesión con sus Nombres de usuario y Contraseñas, tienen el poder de ejecutar la aplicación, ver y almacenar los datos correspondientes a su sesión.

#### GUI

1. El módulo GUI ofrece pantallas para:
  - a. Que los administradores puedan introducir diferentes puntos de ajuste (temperatura y tiempo) y crear/eliminar/modificar perfiles térmicos.
  - b. Crear/borrar usuarios y carpetas de usuarios.
  - c. Cambiar de dispositivo portátil.
    - i. La aplicación usa la pila Bluetooth para detectar dispositivos Bluetooth dentro de su alcance. Tras la detección, muestra todos los dispositivos disponibles dentro de su alcance. El administrador seleccionará el dispositivo portátil, y la aplicación solicitará que la pila de bluetooth se vincule con el dispositivo portátil (109). Tras la vinculación, almacenará la información del dispositivo vinculado para un uso futuro.
  - d. Iniciar, detener, reiniciar y pausar la aplicación.
  - e. Una ventana de registro, que muestra los datos transmitidos y recibidos por la aplicación.

2. El módulo GUI tiene una pantalla para representar los datos térmicos y ópticos recopilados de la unidad portátil.

Módulo de procesamiento de datos

5

El módulo de procesamiento de datos tiene la siguiente funcionalidad:

1. Conversión de datos
2. Algoritmo de comunicación.

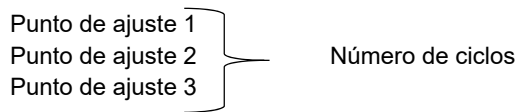
10

Conversión de datos:

1. Los datos se recopilan de un perfil térmico seleccionado por el usuario.
2. El siguiente es un perfil térmico típico:

15

Punto de ajuste inicial



Punto de ajuste final.

3. Como punto de ajuste contiene de temperatura y tiempo, los valores de temperatura se convierten en valores de tensión mediante una fórmula:

20

$$V = \frac{t - x}{y}$$

en la que V es la tensión y t es la temperatura. x e y son constantes predefinidas.

4. Los valores de tensión así obtenidos se convertirán en valores hexadecimales (base-16) de 10 bits mediante la fórmula:

25

$$\frac{V}{V_{\text{suministro}}} * 1023$$

en la que V es la tensión.

5. Los valores de tiempo (en segundos) se convierten en valor hexadecimal (hex).

30

6. Los datos térmicos recopilados de la unidad portátil se convertirán de valor hexadecimal a tensión para la representación usando la fórmula:

$$\frac{Hex}{1023} * V_{\text{suministro}}$$

35

7. La tensión se vuelve a convertir a temperatura:

$$t = V * y + x$$

40

8. Los datos ópticos recopilados se convertirán en tensión y se enviarán directamente a la representación,

Comunicación de datos:

El módulo de comunicación de datos se comunica con la pila bluetooth móvil para Windows. Durante la comunicación, se siguen los siguientes protocolos.

45

Inicio:

El botón de inicio proporcionado por el programa de aplicación inicia el proceso de ciclos térmicos. La aplicación solicita la pila bluetooth para establecer una conexión de puerto serie inalámbrica con la unidad portátil. Tras recibir el acuse de recibo, la PDA comienza a comunicarse con la unidad portátil.

50

Parar/Pausar/Continuar

55

El comando Detener detendrá los ciclos térmicos e indicará a la unidad portátil bajar la temperatura del chip hasta la temperatura ambiente; este proceso no se puede reiniciar. La pausa mantendrá la temperatura del chip a la temperatura de funcionamiento actual. Esto puede ser revocado por el comando de continuar.

El uso de una plataforma de computación portátil como la PDA le otorga al sistema suficiente poder de cómputo para controlar la electrónica y proporcionar una interfaz de usuario rica pero simple para mostrar los datos. También hace que todo el sistema sea modular y, por lo tanto, permite una actualización fácil del sistema con un coste mínimo para el usuario.

5 La invención proporciona un dispositivo de PCR portátil comercializable para una aplicación de diagnóstico específica. El programa que se ejecuta en el otro dispositivo proporciona un sistema de PCR portátil completo con detección en tiempo real y control de software.

10 Al reducir la masa térmica y las velocidades de calentamiento/enfriamiento mejoradas usando el dispositivo, el tiempo necesario de 2 a 3 horas para finalizar una reacción de 30 a 40 ciclos, incluso para un volumen de muestra moderado de 5-25  $\mu$ l, se redujo a menos de 30 minutos. La Figura 14 muestra el tiempo necesario para amplificar el ADN viral de la hepatitis B usando el chip de LTCC de la presente invención. La PCR se ejecutó durante 45 ciclos y fue posible lograr la amplificación dentro de los 45 minutos indicados como (1) en la Figura 14. Asimismo, se observó la amplificación cuando la PCR se realizó durante 45 ciclos en 20 minutos (2) y 15 minutos (3) también. La duración de la PCR convencional para el VHB (45 ciclos) sería de aproximadamente 2 horas.

15 La miniaturización permite lecturas precisas con tamaños de muestra más pequeños y el consumo de volúmenes más pequeños de reactivos costosos. Las pequeñas masas térmicas de los microsistemas y los pequeños tamaños de muestra permiten un rápido ciclado térmico de baja potencia, lo que aumenta la velocidad de muchos procesos, tales como la replicación del ADN a través de la micro-PCR. Además, los procesos químicos que dependen de la química de la superficie se ven mejorados en gran medida por el aumento de la relación superficie/volumen disponible en la microescala. Las ventajas de los microfluidos han impulsado el desarrollo de un microsistema integrado para el análisis químico.

20 El microchip traducido a un dispositivo portátil (109), elimina la máquina de PCR de un laboratorio sofisticado, aumentando así el alcance de esta técnica sumamente poderosa, ya sea para diagnóstico clínico, análisis de alimentos, análisis de sangre en bancos de sangre o una gran cantidad de otras áreas de aplicación.

25 Los instrumentos de PCR existentes con múltiples cámaras de reacción proporcionan múltiples sitios de experimentos de ADN que ejecutan el mismo protocolo térmico y, por lo tanto, no son eficientes en el tiempo. Surge la necesidad de minimizar el tiempo de reacción y el volumen de la muestra introducida.

30 La PCR instantánea prevista para el futuro podría tener una serie de dispositivos con respuesta térmica muy rápida y altamente aislada de los chips de PCR adyacentes para poder ejecutar eficazmente múltiples reacciones de manera independiente con diferentes protocolos térmicos con una interferencia mínima.

35 El análisis o la cuantificación de los productos de PCR se realiza mediante la integración práctica de un sistema de detección de fluorescencia en tiempo real. Este sistema también podría integrarse con los sistemas de cuantificación y detección para detectar enfermedades como la hepatitis B (Figura 12), el SIDA, la tuberculosis, etc. Otros mercados incluyen el control de alimentos, el análisis de ADN, la ciencia forense y la monitorización ambiental.

40 La Figura 8 muestra un gráfico comparativo de la fusión del fragmento de ADN  $\lambda$ -636 en un chip usando el calentador integrado y el termistor.

45 La Figura 9 muestra el aumento en la señal de fluorescencia asociada con la amplificación del ADN  $\lambda$ -311. El perfil térmico se controló con la unidad portátil y la reacción se realizó en un chip (3  $\mu$ l de mezcla de reacción y 6  $\mu$ l de aceite). La fluorescencia se monitorizó usando un amplificador de bloqueo convencional.

50 La presente invención también proporciona un sistema de diagnóstico. El procedimiento adoptado para desarrollar el sistema de diagnóstico ha sido estandarizar inicialmente los protocolos térmicos para un par de problemas y luego funcionalizarlos en el chip. Los cebadores diseñados para el ADN ribosomal 16S amplificaron el fragmento de ~300 a 400 pb de *E. coli* y *Salmonella*, mientras que los cebadores para el gen *stn* amplificaron el fragmento de ~200 pb de *Salmonella typhi*. Los productos obtenidos se confirmaron mediante detección de fluorescencia verde SYBR y electroforesis en gel de agarosa. Las Figuras 9 y 13 muestran la imagen en gel del ADN  $\lambda$ -311 y del gen de *Salmonella* amplificados usando un microchip.

55 Perfil térmico para la amplificación del ADN  $\lambda$ -311:

60 Desnaturalización: 94 °C (90 s)  
94 °C (30 s) - 50 °C (30 s) - 72 °C (45 s)  
Extensión: 72 °C (120 s)

65 Perfil térmico para la amplificación del gen de *Salmonella*:

Desnaturalización: 94 °C (90 s)

94 °C (30 s) - 55 °C (30 s) - 72 °C (30 s)

Extensión: 72 °C (300 s)

PCR con sangre y plasma procesados

5 La sangre o el plasma se trataron con un agente precipitante que pudiera precipitar las principales sustancias inhibitoras de la PCR de estas muestras. Se usó el sobrenadante claro como molde. Usando este protocolo, se obtuvieron amplificaciones para un fragmento de ~200 pb de *Salmonella typhi* (Figura 10). En la Figura 10, la imagen de electroforesis en gel muestra

- 10
1. reacción de control,
  2. producto de PCR - sangre sin procesar,
  3. producto de PCR - sangre procesada
  4. producto de PCR - plasma procesado

15 Tampón de PCR directo de sangre

Se ha formulado un tampón único para la PCR directa con muestras de sangre o plasma. Usando este sistema de tampón único, se ha logrado la amplificación por PCR directa con sangre y plasma. Con este sistema tampón, se ha obtenido la amplificación hasta un 50 % para la sangre y un 40 % para el plasma (véanse las Figuras 11 y 12) usando el chip de LTCC de la presente invención. En la Figura 11, la imagen de electroforesis en gel muestra

- 20
1. Producto de PCR: 20 % de sangre,
  2. Producto de PCR: 30 % de sangre,
  3. Producto de PCR: 40 % de sangre,
  - 25 4. Producto de PCR: 50 % de sangre; y

en la Figura 12, la imagen de electroforesis en gel muestra,

- 30
1. Producto de PCR: 20 % de plasma,
  2. Producto de PCR: 30 % de plasma,
  3. Producto de PCR: 40 % de plasma,
  4. Producto de PCR: 50 % de plasma,
  5. reacción de control

35 El tampón único comprende una sal tampón, un cloruro o un sulfato que contiene un ión bivalente, un detergente no iónico, un estabilizador y un alcohol de azúcar.

La Figura 16 muestra la curva de fusión de un chip de LTCC para un derivado de la señal de fluorescencia para la fusión del ADN de  $\lambda$ -311. La figura también proporciona una comparación entre la presente invención (161) y el dispositivo de PCR convencional (162).

Máximo más nítido: valor/ancho del máximo (eje x) a la mitad del valor del máximo = 1,2/43

Máximo menos nítido: valor/ancho del máximo (eje x) a la mitad del valor del máximo = 0,7/63

45 Una relación más alta indica un máximo más nítido. También en la gráfica, el eje y es la derivada (pendiente de la curva de fusión), una pendiente más alta indica una fusión más nítida.

La Figura 19 muestra la descripción de una realización del sistema óptico con divisor de haz que podría adoptarse en el dispositivo portátil. El sistema de detección de fluorescencia comprende una fuente de luz LED (193), una lente (196) para enfocar la luz, un filtro de paso de banda (195) para seleccionar la longitud de onda específica de la luz, un divisor de haz (191), una lente (198) para enfocar el haz incidente y la señal de la muestra cargada en el chip (200), un filtro de paso de banda (194) para seleccionar la longitud de onda específica de la luz, una lente de enfoque (197) y un fotodetector (192).

55 La Figura 20 muestra la descripción de una realización del sistema óptico híbrido que lleva incorporadas fibra óptica y lentes. Este sistema de detección de la fluorescencia comprende una fuente de luz LED que no se muestra en la figura con un filtro de paso de banda para seleccionar la longitud de onda específica de la luz acoplada a una fibra óptica (213). La fibra óptica dirige la luz hacia la muestra. Opcionalmente, se puede usar una lente adecuada para enfocar la luz que sale de la fibra óptica sobre la muestra. Las lentes (212) se usan para calumbar el haz emitido de la muestra cargada en el chip (200). Un filtro de paso de banda (214) para seleccionar la longitud de onda específica de la luz emitida y la lente de enfoque (212) para enfocarla en un fotodetector.

60

**REIVINDICACIONES**

1. Un microdispositivo de reacción en cadena de la polimerasa portátil (109), que comprende:

5 un microchip (103) de reacción en cadena de la polimerasa de cerámicas cocidas conjuntamente a baja temperatura que comprende un calentador (202), una cámara de reacción (201) para cargar una muestra, un control (102) del calentador para regular el calentador (202) basándose en la entrada recibida de un sensor de temperatura (203),  
 10 un sistema de detección óptica (105) para detectar una señal de fluorescencia de la muestra, y al menos una interfaz de comunicación (107) para interactuar con uno o más otros dispositivos (101) seleccionados de un grupo que comprende un teléfono inteligente, una PDA y un dispositivo programable; caracterizado por que un microcontrolador (106) está interconectado con la al menos una interfaz de comunicación (107),  
 15 microcontrolador (106) que comprende un convertidor de analógico a digital y de digital a analógico, microcontrolador que está configurado:

para recoger los perfiles térmicos, incluyendo la temperatura y el tiempo como valores de puntos de ajuste y el número de ciclos del uno o más otros dispositivos (101) a través de la interfaz de comunicación (107),  
 20 para proporcionar perfiles térmicos al circuito de control (102) que tiene un control del calentador y un circuito controlador que controla el calentador, y para proporcionar la temperatura detectada por un circuito de detección de la temperatura (107) y la señal detectada por el sistema de detección óptica (105) a uno o más otros dispositivos (101) a través de la interfaz de comunicación (107).

25 2. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que al menos una capa conductora (403) está dispuesta entre el calentador (202) y la cámara de reacción (201).

30 3. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que la cámara de reacción (201) está rodeada por anillos conductores (502).

4. El dispositivo según la reivindicación 3, el que los anillos conductores (502) están conectados a la capa conductora a través de postes (501).

35 5. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el sensor de temperatura (203) está colocado fuera del chip (103) o integrado en al menos una capa del chip (103) para medir la temperatura del chip (103).

40 6. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el sensor de temperatura (203) está conectado como un brazo de un circuito puente (706), dicha salida del circuito puente (706) se amplifica antes de cargarla en el control (102) del calentador para regular el calentador (202).

7. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el chip (103) comprende una tapa de sellado transparente para cubrir la cámara de reacción (201).

45 8. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el sistema óptico (105) comprende una fuente de luz (193) y un fotodetector, dicho sistema de detección óptica se selecciona del grupo que comprende un sistema de detección óptica de divisor de haz, un sistema de detección óptica híbrido y un sistema de detección óptica bifurcado.

50 9. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que la al menos una interfaz de comunicación (107) se selecciona del grupo que comprende la interfaz en serie, la interfaz USB, Bluetooth o combinaciones de los mismos.

10. El dispositivo según la reivindicación 1, en el que el uno o más otros dispositivos (101) se seleccionan de un grupo que comprende teléfono inteligente, PDA y dispositivo programable que recoge la temperatura del chip (103) y la señal amplificada del dispositivo portátil (109).

55 11. Un método para monitorizar y controlar un microdispositivo de reacción en cadena de la polimerasa (109), caracterizado por que el dispositivo de reacción en cadena de la polimerasa (109) es el dispositivo de reacción en cadena de la polimerasa (109) según la reivindicación 1, comprendiendo dicho método las etapas de:

60 establecer una comunicación entre el microdispositivo de reacción en cadena de la polimerasa portátil (109) y el uno o más otros dispositivos a través de la interfaz de comunicación (107), iniciar un proceso de ciclado térmico basado en los valores de perfil térmico recibidos de los uno o más otros dispositivos para controlar el microchip de reacción en cadena de la polimerasa (103) de cerámicas cocidas conjuntamente a baja temperatura y  
 65 enviar una señal óptica detectada por el sistema de detección óptica (105) y los datos del sensor de temperatura (203) a los uno o más otros dispositivos (101).

12. El método según la reivindicación 11, en el que el suministro de los valores del perfil térmico a los uno o más otros dispositivos (101), creando, modificando o eliminando los perfiles térmicos, se produce a través de una interfaz de usuario.
- 5 13. El método según la reivindicación 11, en el que el uno o más otros dispositivos (101) proporcionan la autenticación del usuario, y dicho uno o más otros dispositivos (101) almacenan varios perfiles térmicos.
14. El método según la reivindicación 11, en el que el perfil térmico proporciona el valor del punto de ajuste y el número de ciclos en los que se mantiene el chip (103) a una temperatura y durante un tiempo determinados por el valor del punto de ajuste.
- 10
15. El método según la reivindicación 11, en el que se lleva la temperatura del microchip de PCR (103) a la temperatura ambiente mediante la detención del proceso de ciclos térmicos y el mantenimiento de la temperatura del microchip de PCR constante cuando el ciclo térmico está en pausa.
- 15
16. El método según la reivindicación 11, en el que se representan los datos térmicos y ópticos en una unidad de visualización de uno o más otros dispositivos (101).

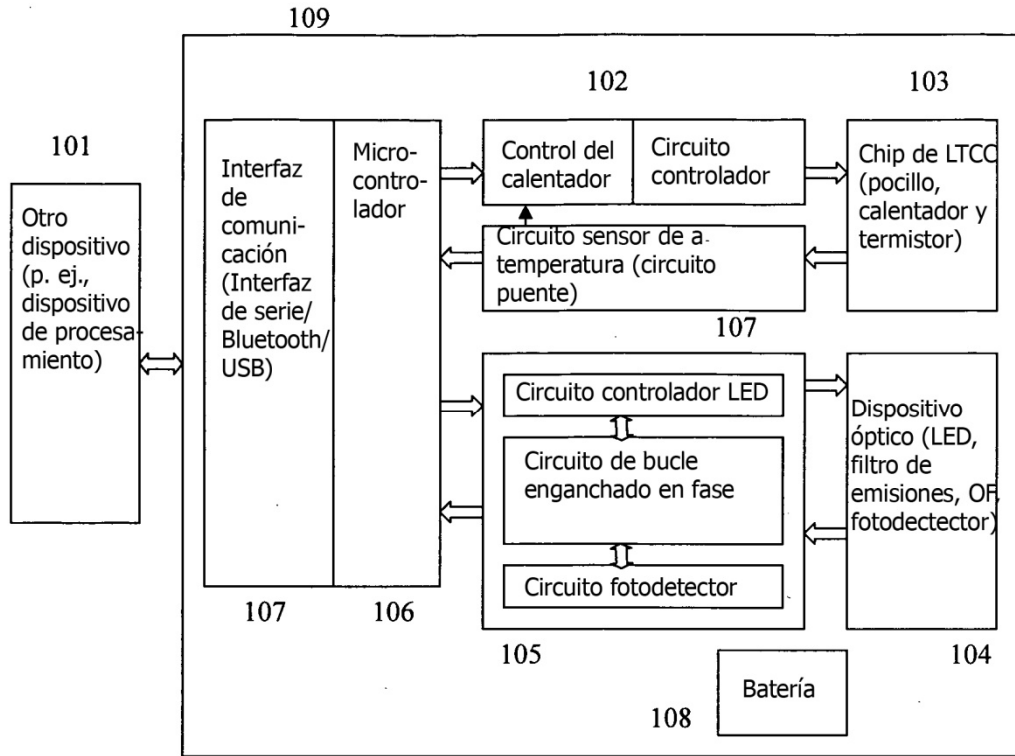
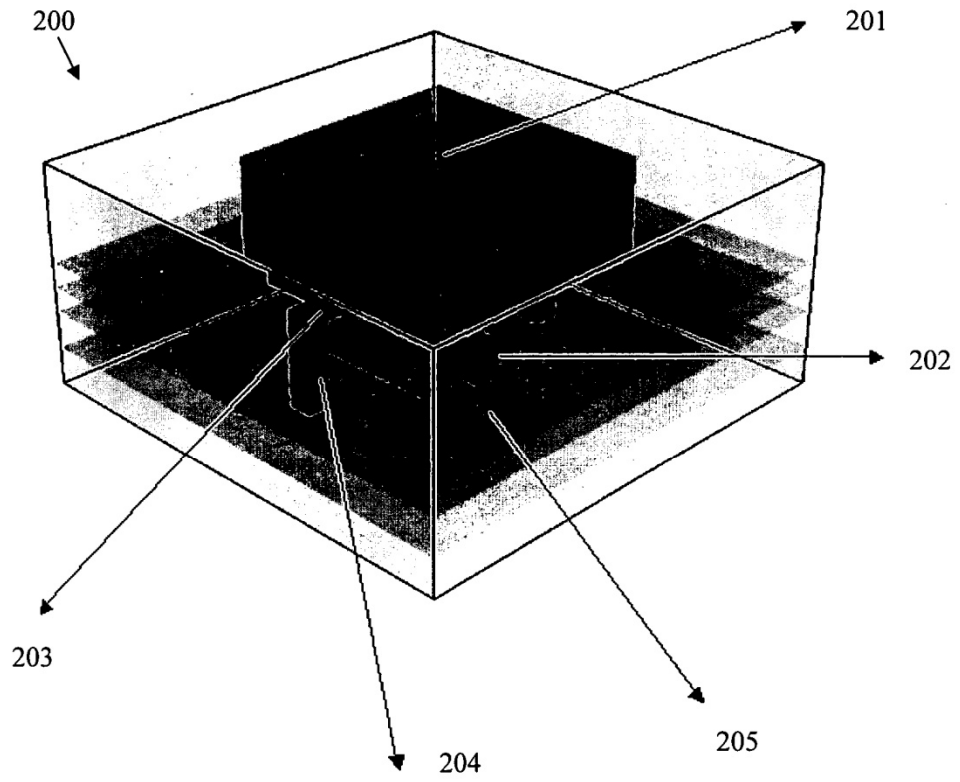
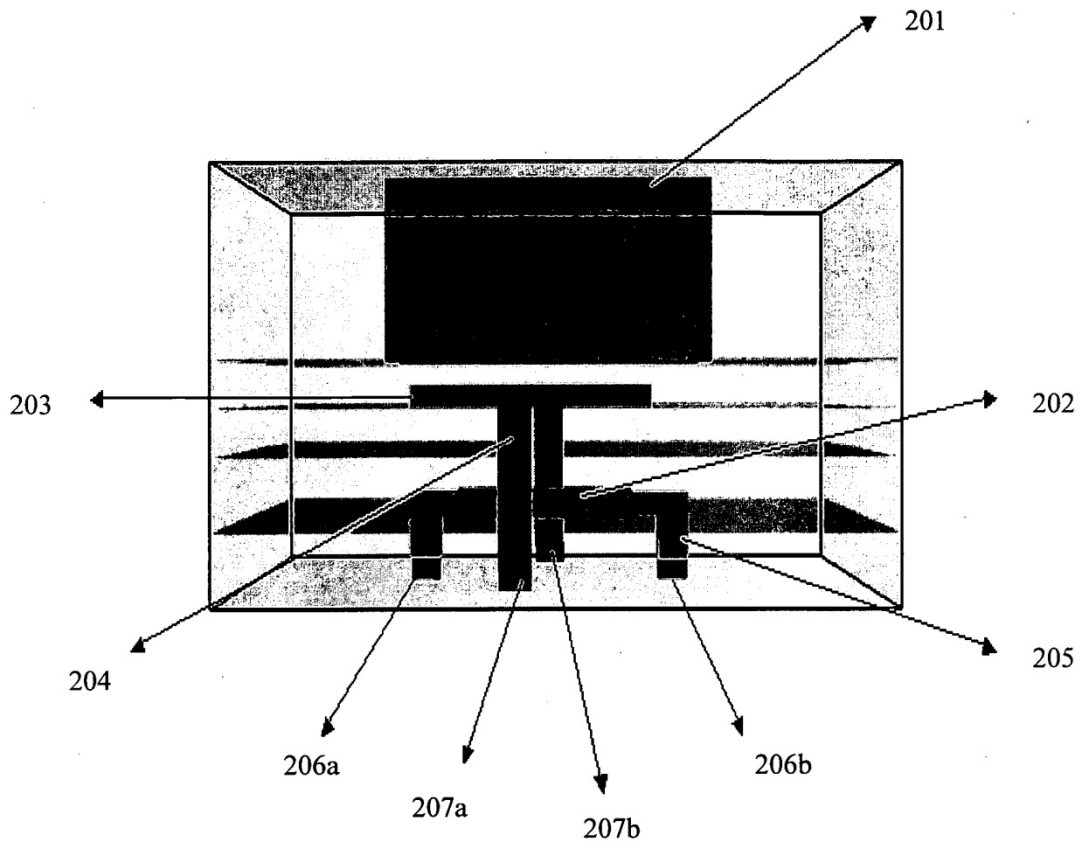


Figura 1



**Figura 2**





**Figura 3**

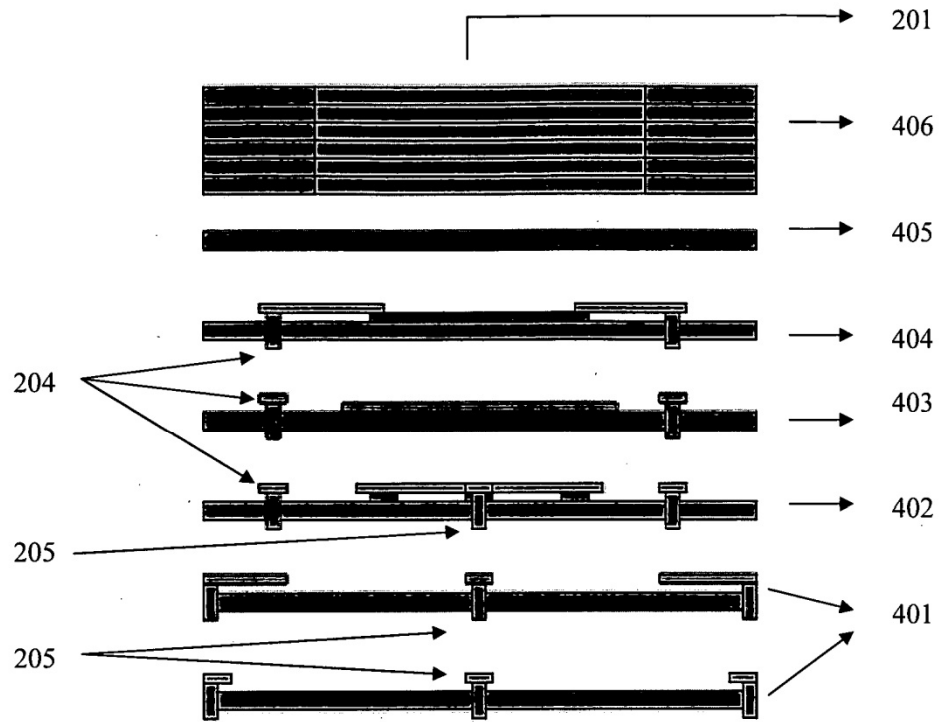
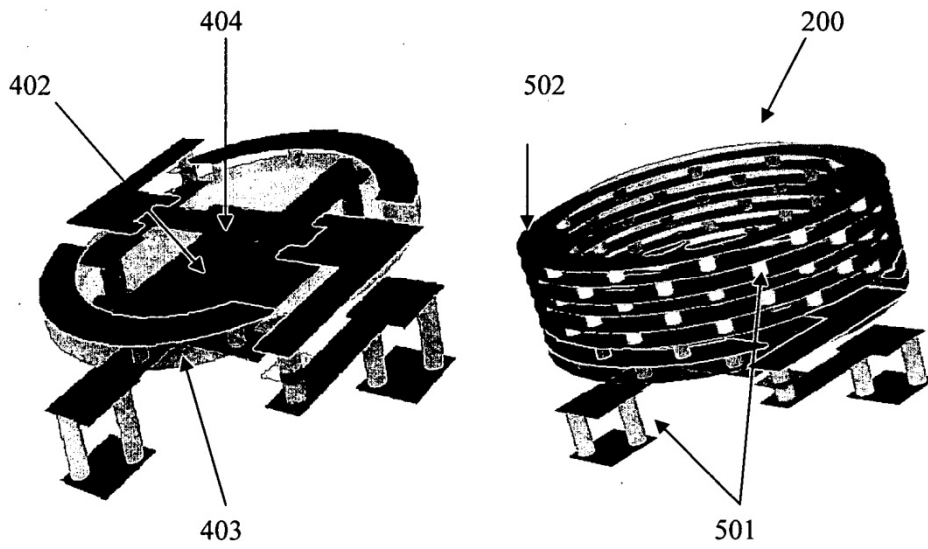


Figura 4



**Figura 5**

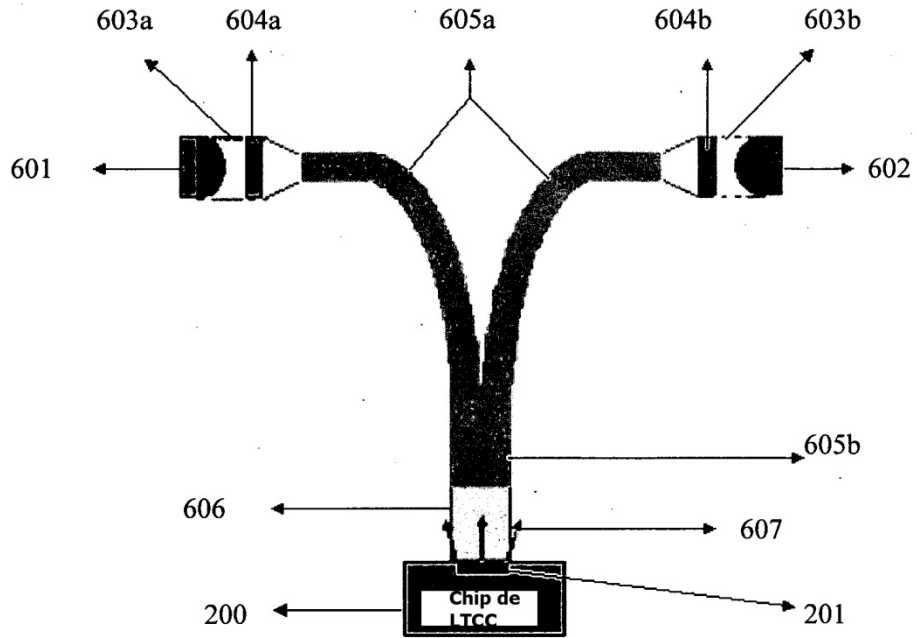


Figura 6

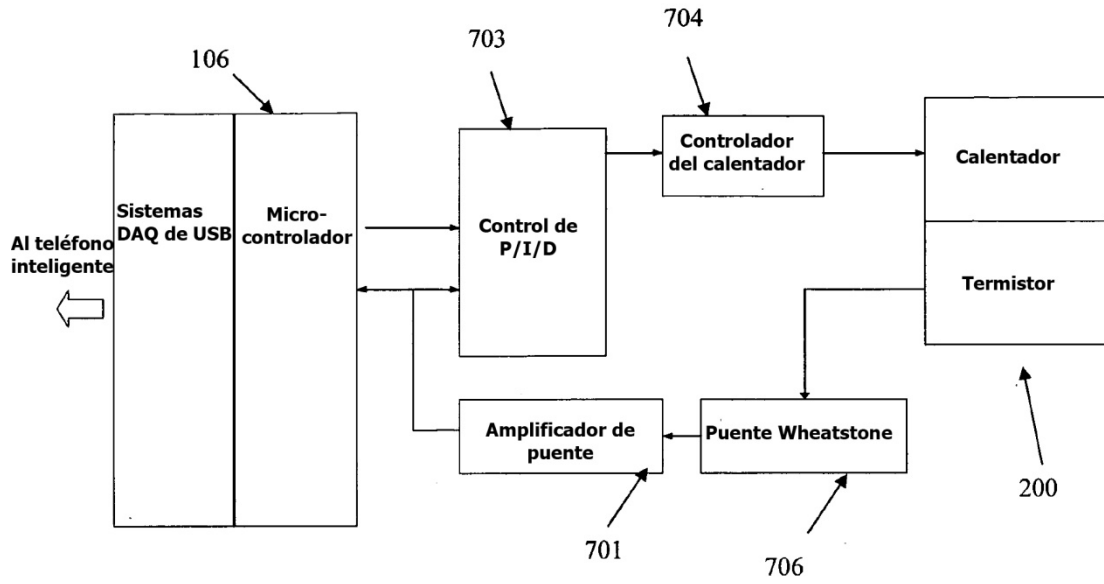


Figura 7

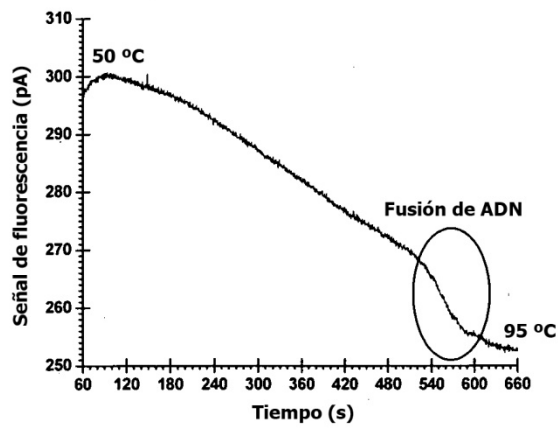
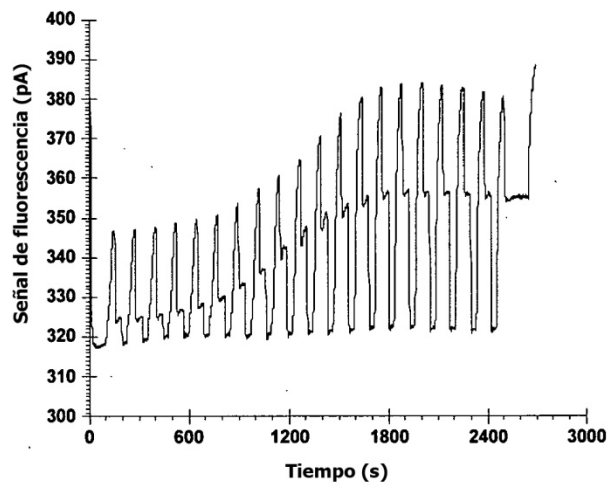
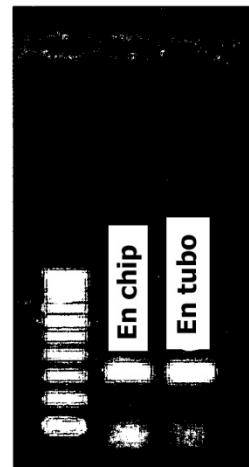


Figura 8

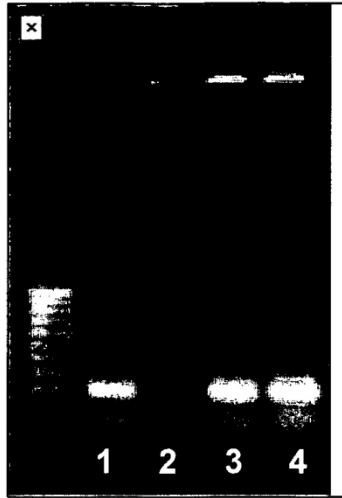


(a)

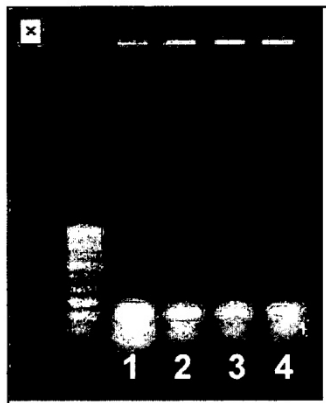


(b)

Figura 9



**Figura 10**



**Figura 11**

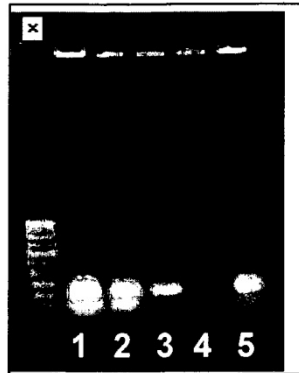


Figura 12

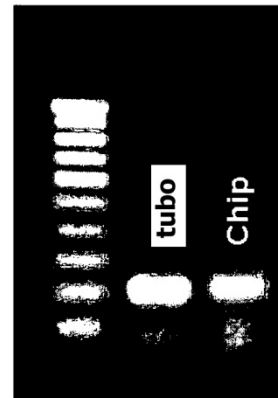
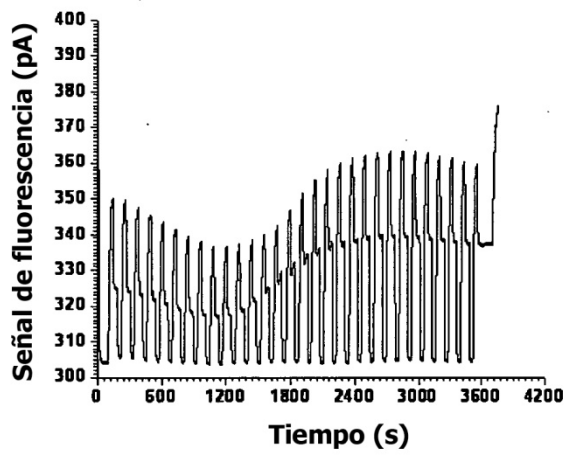


Figura 13



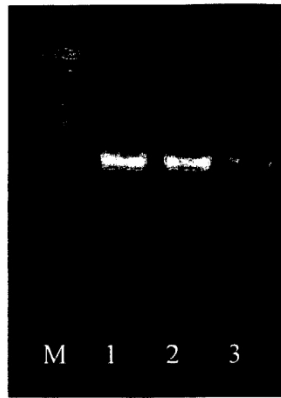


Figura 14

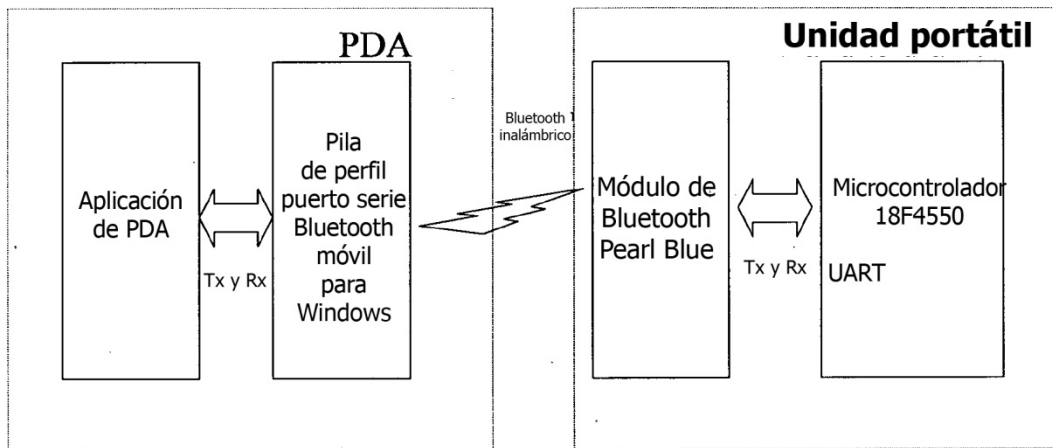


Figure 15

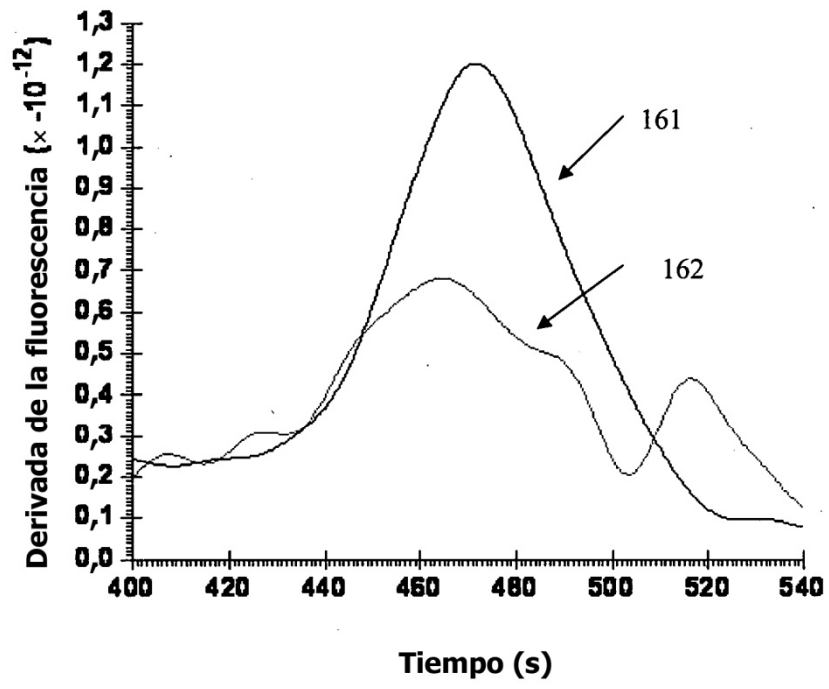


Figura 16

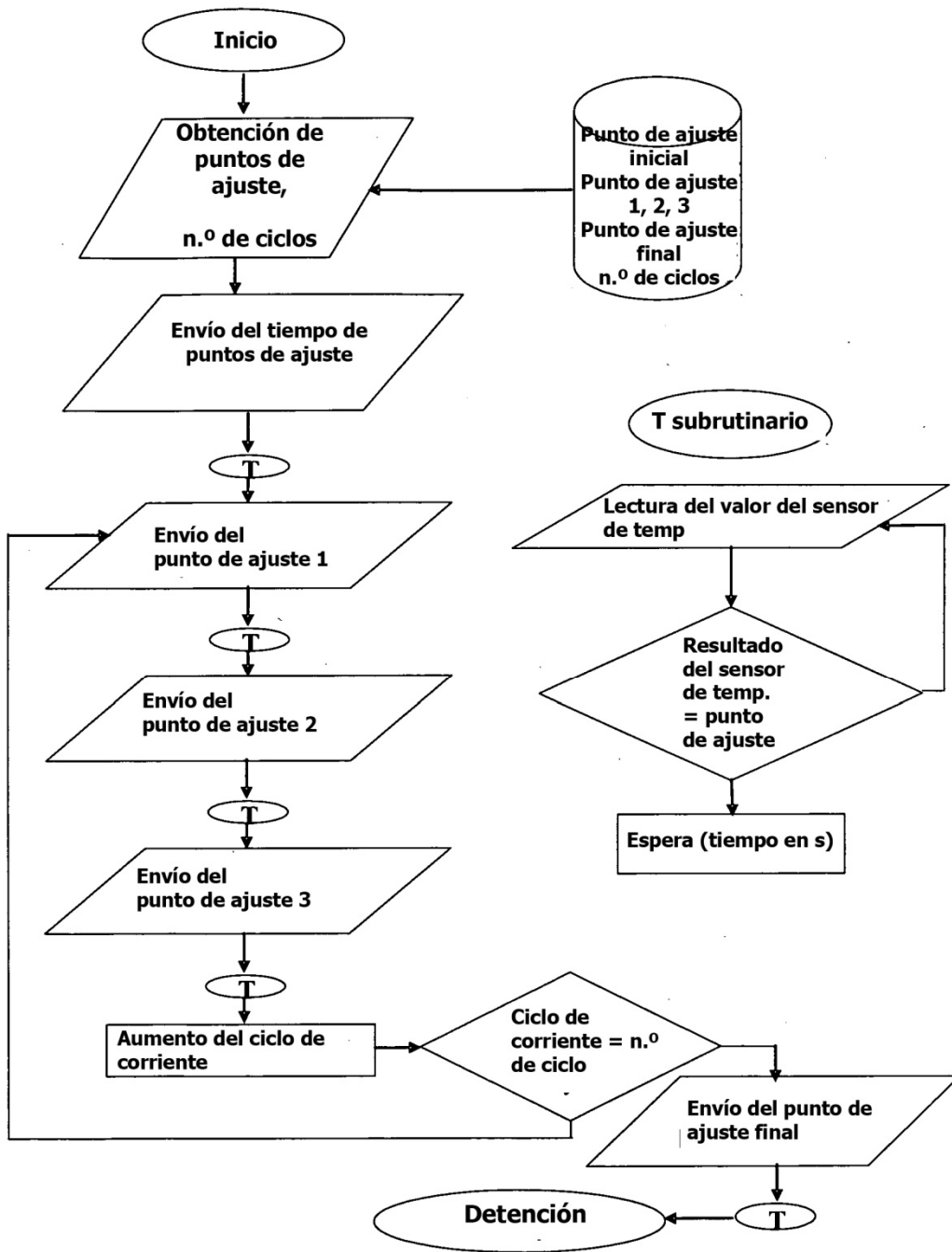


Figura 17

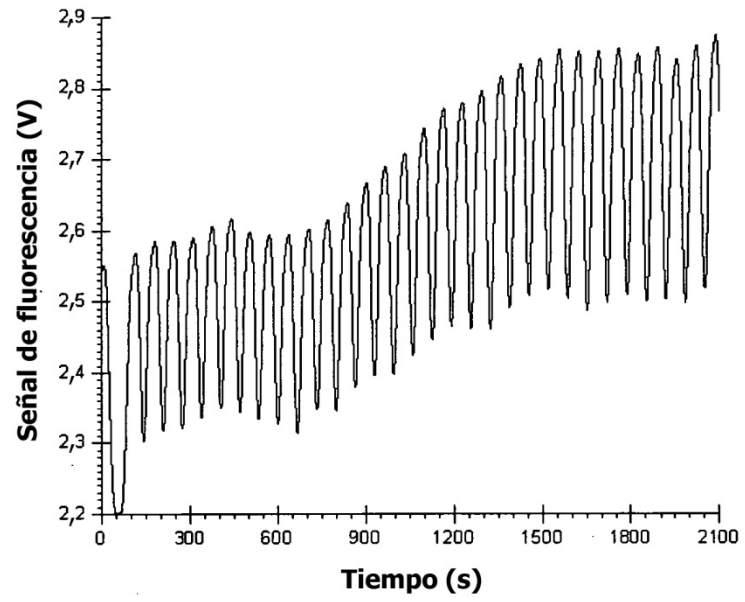
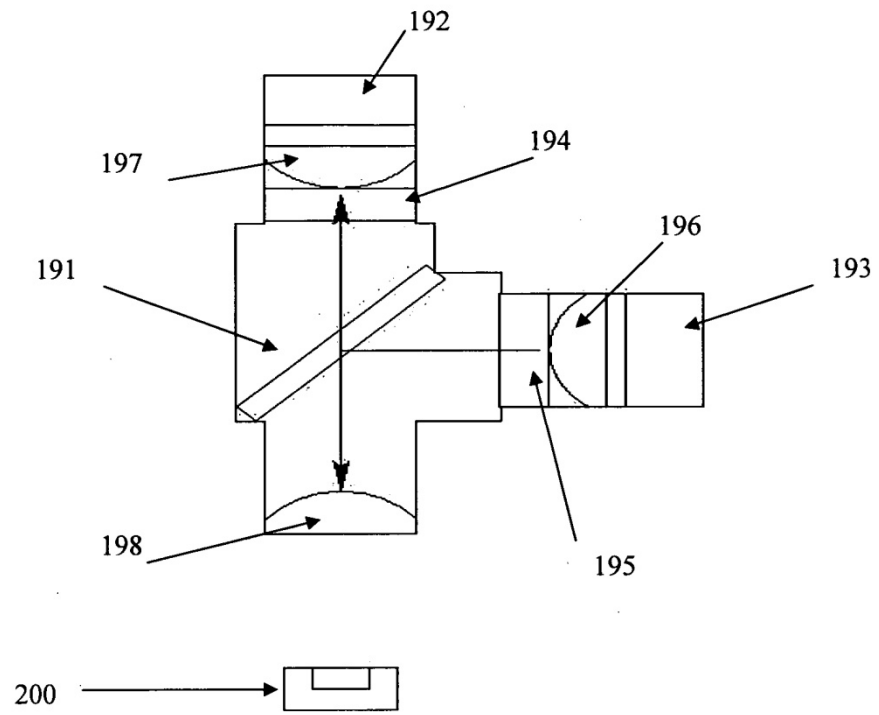
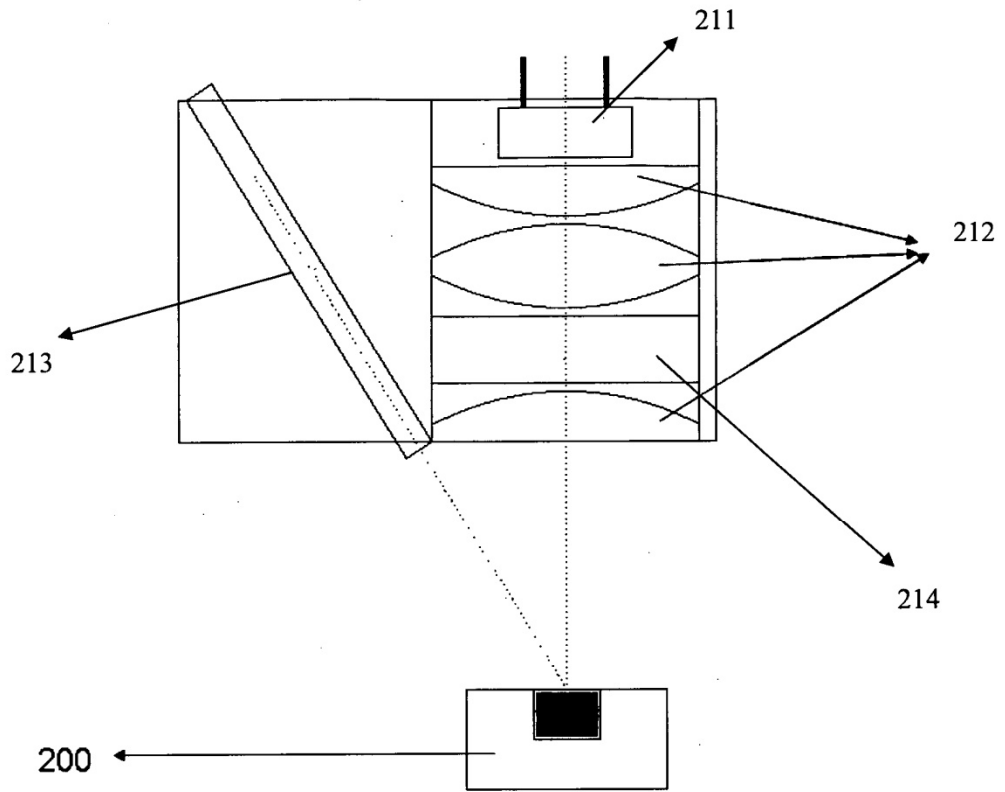


Figura 18



**Figura 19**



**Figura 20**