

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 854**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 21/27** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2010 E 17184354 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3299800**

54 Título: **Dispositivo microfluídico**

30 Prioridad:

**16.03.2009 US 160506 P**

**17.07.2009 US 226360 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.08.2020**

73 Titular/es:

**ABBOTT RAPID DIAGNOSTICS JENA GMBH**

**(100.0%)**

**Orlaweg 1**

**07743 Jena, DE**

72 Inventor/es:

**ERMANTRAUT, EUGEN;**

**KAISER, THOMAS;**

**TUCHSCHEERER, JENS;**

**BEIER, VICO;**

**SCHULZ, TORSTEN y**

**WOESTEMEYER, ANKE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 779 854 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Dispositivo microfluídico

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a dispositivos para detectar un analito en una muestra.

**ANTECEDENTES**

10

Se pueden realizar ensayos para determinar la presencia de uno o más analitos en una muestra. Las matrices se pueden usar para realizar múltiples ensayos (por ejemplo, para cada uno de múltiples analitos diferentes) en una muestra. Las matrices típicas incluyen un sustrato que tiene múltiples zonas de prueba separadas que tiene cada una un compuesto de sonda diferente tal como un polinucleótido, anticuerpo o proteína. En uso, la matriz se pone en contacto con una muestra, que a continuación interactúa con los sitios de la matriz. Para cada sitio, la interacción puede incluir, por ejemplo, la unión de un analito correspondiente a compuestos de sonda del sitio y/o una reacción química entre el analito correspondiente y los compuestos de sonda. La reacción da como resultado un producto detectable (por ejemplo, un precipitado). La presencia y el alcance de la interacción dependen de si un analito correspondiente está presente en la muestra.

15

20

25

30

Típicamente, la interacción se detecta ópticamente (por ejemplo, por fluorescencia). Por ejemplo, la detección óptica se puede realizar usando un sensor de formación de imágenes (por ejemplo, un CCD) que tiene múltiples elementos sensibles a la luz (por ejemplo, píxeles) separados entre sí en al menos una (por ejemplo, dos) dimensiones. Cada uno de los elementos sensibles a la luz se sitúan para recibir luz desde una localización espacial diferente del sustrato. Por tanto, la luz detectada simultáneamente por múltiples elementos sensibles a la luz se puede combinar para formar datos de imagen en al menos una (por ejemplo, dos) dimensiones del sustrato. Los datos de la imagen pueden evaluarse para determinar la presencia y/o alcance de la interacción en múltiples sitios de la matriz. Los documentos WO 2008/062048 y WO 2009/112594 divulgan dispositivos microfluídicos para la realización de procedimientos para analizar una muestra para cada uno de los múltiples analitos.

**SUMARIO**

35

La presente invención se refiere a dispositivos para detectar un analito en una muestra.

La invención se refiere en general a un dispositivo para detectar un analito en una muestra, que comprende:

un cartucho (2001) que tiene:

40

un canal microfluídico (2005) que comprende un primer extremo (2002a) y un segundo extremo (2002b) y entre el primer y el segundo extremo una región de entrada (2002), una región de detección en comunicación fluida con la región de entrada (2002), y una abertura (2006) configurada para ventilar el canal microfluídico (2002);

45

una vía de flujo microfluídica que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación fluida con la región de detección del canal (2005)

50

caracterizado por que la región de entrada (2002) es móvil con respecto a la abertura (2006) y la abertura (2006), en una primera posición relativa de la región de entrada (2002) dentro del canal microfluídico (2005), está en comunicación fluida con la región de entrada (2002) y, en una segunda posición relativa de la región de entrada (2002) dentro del canal microfluídico (2005), está cerrada.

En un modo de realización de la invención, la abertura (2006) está configurada para eliminar gas del canal microfluídico.

55

En otro modo de realización de la invención, la abertura (2006) es una abertura en una pared que rodea el canal microfluídico (2005).

60

En otro modo de realización de la invención, la abertura (2006) está en comunicación fluida con el fluido ambiental que rodea el canal microfluídico (2005).

En otro modo de realización de la invención, la abertura (2006) está en comunicación fluida con el fluido ambiental que rodea el cartucho (2001).

65

En otro modo de realización de la invención, la abertura (2006) está localizada entre la región de entrada (2002) y la región de detección.

En otro modo de realización de la invención, la abertura (2006) está configurada para eliminar gas de la región de entrada (2002) durante el llenado del dispositivo con la muestra.

5 En otro modo de realización de la invención, la región de entrada es móvil a lo largo de un eje longitudinal del canal microfluídico.

10 En un modo de realización, el dispositivo comprende además un tapón que tiene un miembro de sellado configurado para sellar con la región de entrada (2002), en el que el tapón está dispuesto de modo que el cierre del tapón mueve la región de entrada desde la primera posición relativa dentro del canal microfluídico (2005) a la segunda posición relativa dentro del canal microfluídico (2005) para formar un circuito cerrado de fluido que incluye la región de entrada (2002), la región de detección y la vía de flujo microfluídica.

15 En otro modo de realización de la invención, la abertura (2006) está configurada para introducir gas en el canal microfluídico (2005).

En otro modo de realización de la invención, la abertura (2006) está configurada además para eliminar líquido y/o introducir líquido en el canal microfluídico (2005).

20 En un aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende:

poner en contacto una matriz de zonas de prueba separadas con una muestra líquida, estando dispuestas las zonas de prueba entre una superficie interior de un primer sustrato y una superficie interior de un segundo sustrato de un dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo cada zona de prueba un compuesto de sonda configurado para participar en un ensayo para un analito diana,

25 reducir una distancia entre las superficies interiores del primer y segundo sustrato en localizaciones correspondientes a las zonas de prueba, y

30 determinar secuencial y ópticamente la presencia de una interacción en cada una de las múltiples zonas de prueba para las cuales se reduce la distancia entre las superficies interiores en la localización correspondiente, indicando la interacción en cada zona de prueba la presencia en la muestra de un analito diana.

35 El procedimiento puede comprender además, para cada una de las múltiples zonas de prueba, determinar la presencia de un analito respectivo en base a la interacción determinada ópticamente.

Para cada una de al menos algunas de las zonas de prueba, la interacción en cada una de las múltiples zonas de prueba puede ser una reacción de unión entre el analito y el compuesto de sonda de la zona de prueba.

40 La determinación óptica puede comprender la detección de luz de cada una de las zonas de prueba usando un sensor de orden cero-ésimo.

La detección de luz de cada una de las zonas de prueba usando un sensor de orden cero-ésimo puede consistir esencialmente en detectar luz con el sensor de orden cero-ésimo.

45 El procedimiento puede comprender además, para cada una de las múltiples localizaciones para las cuales se redujo la distancia entre las superficies interiores del primer y segundo sustrato, aumentar posteriormente la distancia entre las superficies interiores después de la etapa de determinación óptica en la zona de prueba.

50 La reducción de una distancia puede comprender la reducción secuencial de la distancia entre las superficies interiores del primer y segundo sustrato en localizaciones correspondientes a las zonas de prueba. El procedimiento puede comprender además, para cada una de las múltiples localizaciones para las cuales se redujo la distancia entre las superficies interiores del primer y segundo sustrato, aumentar posteriormente la distancia entre las superficies interiores después de la etapa de detectar ópticamente la unión en la zona de prueba.

55 La determinación óptica puede comprender detectar secuencialmente la interacción en cada una de las múltiples zonas de prueba para las cuales se reduce la distancia entre las superficies interiores en la localización correspondiente. En un aspecto de la divulgación, la detección óptica comprende detectar simultáneamente luz de no más de un número N de zonas de prueba, donde  $N \leq 5$  o  $N \leq 3$  o  $N = 1$ . De forma alternativa, la determinación óptica comprende detectar luz de cada una de las zonas de prueba usando un sensor de orden cero-ésimo. La detección de luz de cada una de las zonas de prueba usando un sensor de orden cero-ésimo puede consistir esencialmente en detectar luz con el sensor de orden cero-ésimo.

60 La detección óptica puede comprender trasladar el dispositivo microfluídico con respecto a una zona de detección óptica de un sensor óptico usado para realizar la determinación óptica.

65

La reducción de una distancia comprende trasladar el dispositivo microfluídico con respecto a un miembro que aplica una fuerza de compresión al dispositivo microfluídico. La traslación del dispositivo microfluídico con respecto al miembro puede comprender girar al menos una parte del miembro.

5 Cada zona de prueba puede ser alargada y definir un eje principal. Además, trasladar el dispositivo microfluídico puede comprender trasladar el dispositivo a lo largo de un eje de traslación en general perpendicular al eje principal de cada una de las múltiples zonas de prueba. Por ejemplo, el eje de traslación y el eje principal de múltiples de las zonas de prueba son perpendiculares a 10° o menos o incluso a 5° o menos.

10 Además, el eje de traslación y el eje principal de la mayoría o incluso de todas las zonas de prueba pueden ser en general perpendiculares.

El procedimiento puede comprender además, durante la etapa de traslación, leer información contenida en un código de referencia del dispositivo microfluídico, y determinar en base a la información leída una propiedad de cada una de las múltiples zonas de prueba.

15 La determinación puede comprender determinar, para cada una de las múltiples zonas de prueba, un valor indicativo de cuándo la zona de prueba está en una zona de detección de un sensor óptico usado para realizar la detección óptica. Además, la determinación puede comprender determinar una propiedad fisicoquímica de las zonas de prueba del dispositivo microfluídico. Por ejemplo, la propiedad fisicoquímica es indicativa de un analito que puede ser determinado por cada una de las múltiples zonas de prueba. Además, determinar puede comprender determinar una identidad de reactivos almacenados dentro del dispositivo microfluídico antes de su uso.

20 Una proporción de una longitud a lo largo del eje principal a una anchura a lo largo de una dimensión perpendicular de las zonas de prueba puede ser al menos 2,5 o incluso al menos 5.

La etapa de detección óptica se puede realizar sin poner en contacto primero las zonas de prueba con un líquido sin la muestra después de la etapa de puesta en contacto.

30 La determinación óptica puede comprender excitar y detectar fluorescencia de las zonas de prueba.

En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende:

35 poner en contacto una matriz de zonas de prueba separadas con una muestra, estando dispuestas las zonas de prueba entre la primera y segunda superficie, comprendiendo cada zona de prueba un compuesto de sonda configurado para participar en un ensayo para un analito respectivo,

40 reducir una distancia entre las superficies interiores en localizaciones correspondientes a las zonas de prueba, y determinar secuencial y ópticamente el resultado del ensayo en cada una de las múltiples zonas de prueba para las cuales se reduce la distancia entre las superficies interiores en la localización correspondiente.

45 El procedimiento puede comprender además, para cada una de las múltiples zonas de prueba, determinar la presencia de un analito respectivo en base al resultado del ensayo.

Para cada una de al menos algunas de las zonas de prueba, el resultado del ensayo puede ser indicativo de una reacción de unión entre el analito y el compuesto de sonda de la zona de prueba.

50 La determinación óptica puede comprender la detección de luz de cada una de las zonas de prueba usando un sensor de orden cero-ésimo.

La detección de luz de cada una de las zonas de prueba usando un sensor de orden cero-ésimo puede consistir esencialmente en detectar luz con el sensor de orden cero-ésimo.

55 El procedimiento puede comprender además, para cada una de las múltiples localizaciones para las cuales se redujo la distancia entre las superficies interiores, aumentar posteriormente la distancia entre las superficies interiores después de la etapa de determinación óptica en la zona de prueba.

60 La reducción de una distancia puede comprender la reducción secuencial de la distancia entre las superficies interiores en localizaciones correspondientes a las zonas de prueba.

En otro aspecto de la divulgación, un sistema comprende:

65 un lector de dispositivo microfluídico configurado para recibir un dispositivo microfluídico que comprende un conjunto de zonas de prueba separadas, estando dispuestas las zonas de prueba entre una superficie interior de

un primer sustrato y una superficie interior de un segundo sustrato del dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo cada zona de prueba un compuesto de sonda configurado para participar en un ensayo para un analito diana,

5 un sensor óptico configurado para detectar luz de al menos una de las zonas de prueba cuando la al menos una zona de prueba está en una zona de detección del dispositivo microfluídico,

un repetidor configurado para trasladar al menos uno del dispositivo microfluídico y la zona de detección del sensor óptico en relación con el otro,

10 un compresor configurado para reducir una distancia entre las superficies interiores del primer y segundo sustratos en localizaciones correspondientes a la zona de detección del dispositivo óptico,

15 un procesador configurado para recibir una señal del sensor óptico, la señal indicativa de luz detectada desde una zona de prueba.

El sistema se puede configurar para detectar simultáneamente luz óptica de no más de un número N de zonas de prueba, donde  $N \leq 5$  o  $N \leq 3$  o  $N = 1$ .

20 El sensor puede ser un sensor de fluorescencia.

En otro aspecto, un dispositivo de ensayo comprende un primer y segundo sustrato que definen un canal entre los mismos, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo el canal un conjunto de zonas de prueba separadas, comprendiendo cada zona de prueba un compuesto de sonda configurado para participar en un ensayo para un analito diana.

25 un ensayo para un analito diana.

En otro aspecto de la divulgación, un artículo de fabricación comprende:

un sustrato, y

30 múltiples zonas de prueba alargadas, comprendiendo cada zona de prueba un compuesto de sonda respectivo configurado para participar en un ensayo para un analito diana, definiendo cada zona de prueba un eje principal y una anchura perpendicular al mismo, y siendo los ejes principales de las zonas de prueba en general paralelos.

35 En otro aspecto de la divulgación, un dispositivo comprende un cartucho que tiene un canal microfluídico que incluye una entrada capilar que tiene una matriz; y una región de detección en comunicación fluida con la entrada capilar; y una vía de flujo microfluídica que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación fluida con la región de detección del canal.

40 El dispositivo puede comprender además un elemento de control.

El canal microfluídico puede comprender un primer extremo y un segundo extremo, en el que la entrada capilar, la región de detección y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico pueden estar dispuestas entre el primer y el segundo extremo.

45 En otro aspecto, un dispositivo comprende un cartucho que tiene un canal microfluídico que incluye una entrada y una región de detección en comunicación fluida con la entrada, una vía de flujo microfluídica que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación fluida con la región de detección del canal; y un elemento de control.

50 La entrada o región de entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

El canal microfluídico puede comprender un primer extremo y un segundo extremo, en el que la entrada capilar, la región de detección y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico pueden estar dispuestos entre el primer y el segundo extremo.

55

En otro aspecto, un dispositivo comprende un cartucho que incluye un canal microfluídico que comprende un primer extremo y un segundo extremo y entre el primer y el segundo extremo una región de entrada, una región de detección en comunicación fluida con la región de entrada, y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico; y una vía de flujo microfluídica que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación fluida con la región de detección del canal.

60

El dispositivo puede comprender además un elemento de control.

65 La entrada o región de entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

5 En otro aspecto de la divulgación, un sistema comprende un cartucho que tiene un canal microfluídico que incluye una entrada capilar que tiene una matriz y una región de detección en comunicación fluida con la entrada, una vía de flujo microfluídica que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación fluida con la región de detección del canal; y un sensor de fluorescencia que incluye una fuente de luz, una lente condensadora que obtiene un ángulo sólido de 10° o más, y una lente objetivo que obtiene un ángulo sólido de 10° o más.

El sistema puede comprender además un elemento de control.

10 El canal microfluídico puede comprender un primer extremo y un segundo extremo. La entrada capilar, la región de detección y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico pueden estar dispuestas entre el primer y el segundo extremo.

15 En otro aspecto de la divulgación, un sistema comprende un cartucho que tiene un canal microfluídico que incluye una entrada y una región de detección en comunicación fluida con la entrada, una vía de flujo microfluídica que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación fluida con la región de detección del canal; un elemento de control; y un sensor de fluorescencia que incluye una fuente de luz, una lente condensadora que obtiene un ángulo sólido de 10° o más, y una lente objetivo que obtiene un ángulo sólido de 10° o más.

20 La entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

25 El canal microfluídico puede comprender un primer extremo y un segundo extremo. La entrada capilar, la región de detección y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico pueden estar dispuestas entre el primer y el segundo extremo.

30 En otro aspecto de la divulgación, un sistema comprende un cartucho que tiene un canal microfluídico que comprende un primer extremo y un segundo extremo y entre el primer y el segundo extremo una región de entrada, una región de detección en comunicación fluida con la región de entrada, y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico; una vía de flujo microfluídica que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación fluida con la región de detección del canal; y un sensor de fluorescencia que incluye una fuente de luz, una lente condensadora que obtiene un ángulo sólido de 10° o más, y una lente objetivo que obtiene un ángulo sólido de 10° o más.

35 La entrada o región de entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

El sistema puede comprender además un elemento de control.

40 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en una entrada capilar de un canal microfluídico, en el que la entrada capilar tiene una matriz, formando de este modo una cápsula líquida contigua encapsulada por el canal y limitada en un primer extremo por un fluido de transporte; formar un circuito de fluido de modo que el fluido de transporte proporcione comunicación fluida entre el primer y el segundo extremo de la cápsula líquida; y aplicar una presión diferencial al primer y segundo extremo de la cápsula líquida por medio del fluido de transporte.

45 El canal microfluídico puede comprender y/o puede estar asociado con un elemento de control.

50 El canal microfluídico puede comprender un primer extremo y un segundo extremo. La entrada capilar, la región de detección y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico pueden estar dispuestas entre el primer y el segundo extremo.

55 El procedimiento puede comprender además marcar el analito con un primer anticuerpo fluorescente y un segundo anticuerpo fluorescente, en el que el primer y el segundo anticuerpo fluorescente tienen longitudes de onda de emisión distintas.

60 El procedimiento puede comprender además detectar el analito que incluye el registro de una primera imagen del analito en la longitud de onda de emisión del primer anticuerpo fluorescente; registrar una segunda imagen del analito en la longitud de onda de emisión del segundo anticuerpo fluorescente; y comparar la primera y segunda imagen.

65 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en un canal microfluídico que comprende y/o que se asocia con un elemento de control, formando de este modo una cápsula líquida contigua encapsulada por el canal y limitada en un primer extremo por un fluido de transporte, formando un circuito de fluido de modo que el fluido de transporte proporcione comunicación fluida entre el primer y el segundo extremo de la cápsula líquida; y aplicar una presión diferencial al primer y segundo extremo de la cápsula líquida por medio del fluido de transporte.

El canal microfluídico puede incluir una entrada. La entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

5 El canal microfluídico puede comprender un primer extremo y un segundo extremo. La entrada capilar, la región de detección y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico pueden estar dispuestas entre el primer y el segundo extremo.

10 El procedimiento puede comprender además marcar el analito con un primer anticuerpo fluorescente y un segundo anticuerpo fluorescente, en el que el primer y el segundo anticuerpo fluorescente tienen longitudes de onda de emisión distintas.

15 El procedimiento puede comprender además detectar el analito que incluye el registro de una primera imagen del analito en la longitud de onda de emisión del primer anticuerpo fluorescente; registrar una segunda imagen del analito en la longitud de onda de emisión del segundo anticuerpo fluorescente; y comparar la primera y segunda imagen.

20 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en un primer extremo de un canal microfluídico que comprende el primer extremo y un segundo extremo y entre el primer y el segundo extremo al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico, formando de este modo una cápsula líquida contigua encapsulada por el canal y limitada en un primer extremo por un fluido de transporte; formar un circuito de fluido de modo que la abertura esté cerrada y el fluido de transporte proporcione comunicación fluida entre el primer y el segundo extremo de la cápsula líquida; y aplicar una presión diferencial al primer y segundo extremo de la cápsula líquida por medio del fluido de transporte.

25 El canal microfluídico puede comprender y/o puede estar asociado con un elemento de control.

30 El canal microfluídico puede incluir además una entrada o región de entrada. La entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

35 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en un canal microfluídico que incluye una entrada capilar que tiene una matriz, formando de este modo una cápsula líquida contigua encapsulada por el canal y limitada en un primer extremo por un fluido de transporte, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas, formar un circuito de fluido de modo que el fluido de transporte proporcione comunicación fluida entre el primer y el segundo extremo de la cápsula líquida, formar una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una etiqueta óptica aplicando una presión diferencial al primer y segundo extremo de la cápsula líquida por medio del fluido de transporte, formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, y detectar complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.

40 El canal microfluídico puede comprender y/o puede estar asociado con un elemento de control.

45 El canal microfluídico puede comprender un primer extremo y un segundo extremo. La entrada capilar, la región de detección y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico pueden estar dispuestas entre el primer y el segundo extremo.

50 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en un canal microfluídico, formando de este modo una cápsula líquida contigua encapsulada por el canal y limitada en un primer extremo por un fluido de transporte, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas, en el que dicho canal microfluídico comprende y/o se asocia con un elemento de control; formar un circuito de fluido de modo que el fluido de transporte proporcione comunicación fluida entre el primer y el segundo extremo de la cápsula líquida, formar una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una etiqueta óptica aplicando una presión diferencial al primer y segundo extremo de la cápsula líquida por medio del fluido de transporte, formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, y detectar complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.

55 El canal microfluídico puede incluir una entrada. La entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

60 El canal microfluídico puede comprender un primer extremo y un segundo extremo, en el que la entrada capilar, la región de detección y al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico pueden estar dispuestas entre el primer y el segundo extremo.

65 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en un primer extremo de un canal microfluídico que comprende el primer extremo y un segundo extremo y entre el primer y el segundo extremo al menos una abertura configurada para ventilar el canal microfluídico, formando de este modo

- 5 una cápsula líquida contigua encapsulada por el canal y limitada en un primer extremo por un fluido de transporte; formar un circuito de fluido de modo que la abertura esté cerrada y el fluido de transporte proporcione comunicación fluida entre el primer y el segundo extremo de la cápsula líquida, formando una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una etiqueta óptica aplicando una presión diferencial al primer y segundo extremo de la cápsula líquida por medio del fluido de transporte, formando múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, y detectando complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.
- 10 El canal microfluídico puede comprender y/o puede estar asociado con un elemento de control.
- 15 El canal microfluídico puede incluir una entrada o región de entrada. La entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.
- 20 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en un orificio de un capilar; e introducir al menos una parte de la muestra líquida en una red microfluídica de un dispositivo microfluídico como se define anteriormente en el presente documento, reduciendo una presión que actúa sobre una interfaz de muestra líquida-gas de la muestra líquida.
- 25 El procedimiento puede comprender además, después de la etapa de introducir la muestra líquida en el orificio del capilar, la conexión del capilar al dispositivo microfluídico, permaneciendo la muestra líquida dentro del capilar.
- La reducción de la presión se puede realizar comprimiendo al menos una parte de la red microfluídica para desplazar el gas a partir de la misma y posteriormente descomprimiendo la al menos una parte de la red microfluídica.
- 30 La red microfluídica puede definirse al menos en parte por y entre el primer y el segundo sustrato en general plano, siendo deformable al menos uno de los sustratos tras la aplicación de presión externa para comprimir la al menos una parte de la red microfluídica y tendiendo el al menos un sustrato para retomar su posición previa tras la liberación de la presión externa para permitir la descompresión de la al menos una parte de la red microfluídica.
- 35 Además, la red microfluídica puede definirse al menos en parte por un canal microfluídico que incluye una entrada y una región de detección en comunicación fluida con la entrada, y una vía de flujo microfluídica en comunicación fluida con la región de detección, en la que la vía de flujo microfluídica tiene una pared que es al menos parcialmente deformable tras la aplicación de presión externa para comprimir la al menos una parte de la vía de flujo microfluídica, y la pared tiende a retomar su posición previa al liberar la presión externa para permitir la descompresión de la al menos una parte de la vía de flujo microfluídica.
- 40 El procedimiento puede comprender además combinar la muestra líquida con uno o más reactivos presentes dentro de la red microfluídica para formar una mezcla. La mezcla puede comprender al menos el 90 % de la muestra líquida que se introdujo en la red microfluídica.
- 45 El uno o más reactivos puede incluir una etiqueta detectable que reacciona con la muestra para formar un complejo que incluye la etiqueta y un analito presente en la muestra.
- La etiqueta detectable también puede reaccionar con analitos inmovilizados dentro del canal microfluídico.
- 50 El procedimiento puede comprender además detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto de la muestra líquida, estando presente el subconjunto dentro de una zona de detección del dispositivo microfluídico.
- 55 El procedimiento puede comprender adicionalmente desplazar el subconjunto de muestra líquida de la zona de detección e introducir un subconjunto diferente de la muestra líquida en la zona de detección y detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro del subconjunto diferente.
- 60 El procedimiento puede comprender además realizar la etapa de desplazar el subconjunto e introducir el subconjunto diferente comprimiendo al menos una parte de la red microfluídica, estando la parte comprimida desplazada al menos parcialmente a lo largo de la red desde la zona de detección. La compresión de la parte puede comprender comprimir una primera parte de la red microfluídica y, sin liberar completamente primero la compresión, mover un sitio de la compresión a lo largo de la red microfluídica en una cantidad suficiente para realizar las etapas de desplazamiento e introducción.
- 65 El procedimiento puede comprender además realizar la etapa de detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro del subconjunto diferente sin liberar primero completamente la compresión de la red microfluídica.

El procedimiento puede comprender además detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de microesferas ópticamente detectables que se inmovilizan dentro del canal microfluídico.

5 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en una entrada capilar de una red microfluídica en la que la entrada capilar tiene una matriz y la red microfluídica está dispuesta entre una superficie interior de un primer sustrato y una superficie interior de un segundo sustrato de un dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas, formando una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una  
10 etiqueta óptica reduciendo secuencialmente una distancia entre las superficies interiores del primer y segundo sustrato en múltiples posiciones dentro de la red microfluídica, formando múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, y detectando complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.

15 La red microfluídica puede comprender además y/o estar asociada con un elemento de control.

En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida a una red microfluídica dispuesta entre una superficie interior de un primer sustrato y una superficie interior de un segundo sustrato de un dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas, formando una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una  
20 etiqueta óptica reduciendo secuencialmente una distancia entre las superficies interiores del primer y segundo sustrato en múltiples posiciones dentro de la red microfluídica, formando múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, y detectando complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla, en el que la red microfluídica comprende o está asociada con  
25 un elemento de control.

La red microfluídica puede incluir una entrada. La entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

30 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir un volumen total V de una muestra líquida en una entrada capilar de una red microfluídica en el que la entrada capilar tiene una matriz y la red microfluídica está dispuesta entre una superficie interior de un primer sustrato y una superficie interior de un segundo sustrato de un dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas, formando una mezcla dentro de la red microfluídica, comprendiendo la  
35 mezcla al menos aproximadamente el 90 % del volumen V de muestra líquida y una etiqueta óptica, que forma múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, y detectando complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.

40 La red microfluídica puede comprender además y/o estar asociada con un elemento de control.

En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir un volumen total V de una muestra líquida a una red microfluídica dispuesta entre una superficie interior de un primer sustrato y una superficie interior de un segundo sustrato de un dispositivo microfluídico, siendo flexible al menos uno de los sustratos, comprendiendo la muestra líquida múltiples partículas, formando una mezcla dentro de la red microfluídica,  
45 comprendiendo la mezcla al menos aproximadamente el 90 % del volumen V de muestra líquida y una etiqueta óptica, formando múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, y detectando complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla, en el que la red microfluídica comprende o está asociada con un elemento de control.

50 La red microfluídica puede incluir una entrada. La entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

55 En otro aspecto, un dispositivo está configurado para realizar un procedimiento como se define anteriormente en el presente documento.

En otro aspecto, un capilar comprende una matriz, en el que dicha matriz comprende una etiqueta detectable que reacciona con un analito o muestra para formar un complejo que incluye la etiqueta.

60 Aún en otro aspecto más de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en una red microfluídica por medio de un canal capilar, comprendiendo el canal capilar una matriz, en el que dicha matriz comprende una etiqueta detectable que reacciona con un analito o muestra para formar un complejo que incluye la etiqueta.

65 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida en una red microfluídica, comprendiendo la muestra líquida un primer conjunto de múltiples partículas, en el que dicho canal microfluídico comprende y/o está asociado con un elemento de control que incluye un segundo conjunto de

partículas; formar una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una etiqueta óptica; formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo uno del primer conjunto de múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas; formar complejos múltiples, comprendiendo cada complejo uno del segundo conjunto de múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas; y detectar complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.

La red microfluídica puede incluir una entrada. La entrada puede ser una entrada capilar. La entrada capilar puede comprender una matriz.

En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento comprende introducir una muestra líquida que comprende múltiples partículas en una entrada capilar de una red microfluídica, comprendiendo la entrada capilar una matriz que comprende etiquetas ópticas; disolver al menos parcialmente la matriz en la muestra líquida formando de este modo una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y la etiqueta óptica; formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas; y detectar complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla.

La red microfluídica puede comprender además y/o estar asociada con un elemento de control.

A continuación, se explicarán otros modos de realización ejemplares de los dispositivos y los aspectos divulgados de los procedimientos (por ejemplo, de los dispositivos, sistemas, capilares y procedimientos para detectar un analito).

El dispositivo o sistema puede comprender además un tapón que tiene un miembro de sellado configurado para sellar con la entrada capilar y formar un circuito de fluido que incluye la entrada capilar, el canal microfluídico y la vía de flujo microfluídica.

El tapón y el cartucho pueden configurarse para cerrarse irreversiblemente después de formar el circuito de fluido.

De forma alternativa, el tapón puede estar unido de forma flexible al cartucho.

Además, el tapón y el cartucho pueden estar configurados para engancharse en una primera posición relativa de modo que el tapón pueda retirarse y para engancharse en una segunda posición relativa de modo que el tapón pueda cerrarse irreversiblemente después de formar el circuito de fluido.

Una abertura o abertura de ventilación configurada para ventilar el canal microfluídico puede localizarse entre una región de detección y una región de entrada.

La abertura puede proporcionar una conexión fluida de un extremo interior de la región de entrada con gas ambiente, por ejemplo, la atmósfera que rodea el canal microfluídico o el dispositivo o el sistema. El extremo interior de la región de entrada se opone a un extremo exterior de la región de entrada, la cual está adaptada para recibir la muestra. Por ejemplo, la abertura de ventilación puede estar en comunicación fluida con el fluido ambiente o el gas ambiente que rodea el canal microfluídico y/o el cartucho.

La abertura configurada para ventilar el canal microfluídico o la abertura de ventilación puede configurarse para eliminar el gas del canal microfluídico, por ejemplo, durante el llenado del dispositivo con la muestra.

Además, la abertura de ventilación puede ser una abertura en una pared que rodea el canal microfluídico. La abertura puede ser, por ejemplo, un agujero a través de una pared del canal microfluídico. Dicho agujero puede proporcionar una comunicación fluida del extremo interior de la región de entrada con el aire ambiente.

Además, la abertura de ventilación puede ser cerrable. En algunos modos de realización, la abertura se cerrará después de que la entrada capilar se llene con la muestra.

La región de entrada o entrada o entrada capilar puede ser móvil dentro del canal microfluídico, por ejemplo, con respecto a la abertura. Por ejemplo, la región de entrada puede ser móvil a lo largo de un eje longitudinal del canal microfluídico. En un modo de realización, la región de entrada adaptada para recibir la muestra puede estar dispuesta de tal manera que un movimiento de la región de entrada dentro del canal microfluídico permitirá cerrar la abertura de ventilación.

En algunos modos de realización, la abertura, en una primera posición relativa de la región de entrada dentro del canal microfluídico, está en comunicación fluida con la región de entrada, y, en una segunda posición relativa de la región de entrada dentro del canal microfluídico, está cerrada. Por ejemplo, el dispositivo puede comprender además un tapón que tiene un miembro de sellado configurado para sellar con la región de entrada, en el que el tapón está dispuesto de modo que el cierre del tapón mueve la región de entrada desde la primera posición relativa dentro del canal microfluídico a la segunda posición relativa dentro del canal microfluídico para formar un

circuito cerrado de fluido que incluye la región de entrada, la región de detección y la vía de flujo microfluídica.

En otros modos de realización, la abertura de ventilación puede configurarse para introducir gas en el canal microfluídico y/o para eliminar líquido y/o introducir líquido en el canal microfluídico.

5 La región de detección puede estar limitada por al menos una superficie del cartucho y al menos una superficie de una tapa. La tapa puede incluir una película transparente sobre la región de detección. Además, la tapa puede estar fijada adhesivamente al cartucho.

10 Una parte del circuito de fluido puede estar formada por una pared elásticamente deformable.

La aplicación de una presión diferencial a los extremos primero y segundo de la cápsula líquida puede incluir la compresión de la pared elásticamente deformable.

15 En algunos modos de realización, el canal microfluídico incluye una entrada capilar que tiene una matriz. La matriz puede incluir reactivos necesarios para procesar la muestra. Por ejemplo, la matriz puede ser un medio reactivo tridimensional o un medio reactivo sólido.

20 Por ejemplo, la matriz puede incluir reactivos seleccionados del grupo que consiste en una etiqueta detectable que puede reaccionar con el analito para formar un complejo que incluye la etiqueta, un inhibidor de coagulación y un agente estabilizante. Por ejemplo, la matriz puede incluir anticuerpos marcados con un tinte fluorescente y que tengan afinidad por los antígenos que se van a detectar dentro de la muestra.

25 Además, la matriz puede ser al menos parcialmente porosa y/o al menos parcialmente amorfa y/o al menos parcialmente permeable para fluidos y/o al menos parcialmente particulada. De forma adicional o alternativa, la matriz puede tener una estructura de tipo torta de filtración o torta de sustancia o tipo torta. La matriz también puede ser un medio de flujo continuo.

30 La matriz puede ser al menos parcialmente soluble en la muestra. Por ejemplo, la matriz puede incluir uno o más reactivos que son al menos parcialmente o incluso completamente solubles en una muestra líquida tal como sangre. Por ejemplo, la etiqueta detectable, el inhibidor de coagulación y/o el agente estabilizante pueden ser al menos parcialmente solubles en la muestra.

35 De forma adicional o alternativa, la matriz puede comprender reactivos liofilizados. En otras palabras, la matriz puede ser un liofilizado que contiene uno o más reactivos, tales como los reactivos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los reactivos liofilizados pueden ser al menos parcialmente o incluso completamente solubles en una muestra líquida tal como sangre. Además, el marcador detectable, el inhibidor de coagulación y/o el agente estabilizante pueden liofilizarse.

40 De forma adicional o alternativa, la matriz puede extenderse esencialmente sobre toda el área de la sección transversal de la entrada capilar. Por ejemplo, la matriz entra en contacto al menos parcialmente con una superficie interior de la entrada capilar sobre toda el área de la sección transversal del capilar.

45 De forma adicional o alternativa, la matriz puede no extenderse a lo largo de toda la entrada capilar. La longitud del capilar se determina en el eje perpendicular al eje de la sección transversal del capilar.

50 La muestra se puede seleccionar según lo deseado en base a los analitos que se van a determinar. Las muestras ejemplares incluyen muestras líquidas tales como agua, soluciones acuosas, soluciones orgánicas, soluciones inorgánicas, fluidos corporales de seres humanos y otros animales, por ejemplo, orina, esputo, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre completa (por ejemplo, sangre entera venosa) y materiales hemoderivados tales como plasma y sueros. En un modo de realización, la muestra líquida puede ser sangre.

55 Los analitos que se van a determinar pueden seleccionarse según se desee. Por ejemplo, los analitos pueden relacionarse con la medicina (por ejemplo, diagnósticos), investigación (por ejemplo, descubrimiento de fármacos), industria (por ejemplo, control de calidad del agua o los alimentos) o análisis forense. Los analitos ejemplares que se van a determinar incluyen marcadores (por ejemplo, marcadores de diagnóstico o marcadores predictivos) de afecciones fisiológicas tales como enfermedad. Dichos marcadores incluyen marcadores cardíacos (por ejemplo, péptidos natriuréticos y miembros de la familia de la troponina), marcadores de cáncer (por ejemplo, proteínas de matriz nuclear), marcadores genéticos (por ejemplo, polinucleótidos), marcadores de sepsis, marcadores neurológicos y marcadores indicativos de afecciones patógenas. Los analitos pueden ser indicativos de la presencia de patógenos (por ejemplo, bacterias, virus u hongos).

60 En un modo de realización típica, uno o más de los analitos comprenden partículas tales como virus, bacterias, células, hongos o esporas. Por ejemplo, se puede detectar cualquiera de las partículas descritas en la solicitud de patente internacional PCT/EP2006/068153. Los ejemplos de partículas de origen natural incluyen, entre otros, células procariotas (por ejemplo, células bacterianas tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*), células

5 eucariotas (por ejemplo, células de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*, células de insectos tales como células Sf9 o High 5, líneas celulares inmortalizadas tales como células HeLa o Cos, y células primarias tales como células sanguíneas de mamíferos) o virus (por ejemplo, partículas de fago tales como fago M13 o T7). En un modo de realización, las partículas pueden ser células tales como células T auxiliares, por ejemplo, células CD3+ y/o células CD4+.

10 Las etiquetas o compuestos de sonda o moléculas o restos de captura se pueden seleccionar según se desee en base a los analitos que se van a determinar. Las etiquetas o compuestos de sonda adecuados para determinar la presencia de un analito se describen en la solicitud provisional de EE. UU. 60/826.678 presentada el 22 de septiembre de 2006. Se entiende que una etiqueta o una molécula de captura o una sonda o una molécula de sonda o una sonda molecular indican una molécula o un complejo, que se usa para la detección de otras moléculas debido a un comportamiento de unión característico particular o una reactividad particular. Los ejemplos de compuestos de sonda incluyen biopolímeros tales como péptidos, proteínas, antígenos, anticuerpos, carbohidratos, ácidos nucleicos y/o análogos de los mismos y/o polímeros mixtos de los biopolímeros mencionados anteriormente.

15 Los marcadores o etiquetas o restos detectables que se pueden usar incluyen cualquier compuesto, que genera directa o indirectamente un compuesto o señal detectable en una reacción química, física o enzimática. Preferentemente, las etiquetas pueden seleccionarse entre otros, de etiquetas enzimáticas, etiquetas ópticas, etiquetas coloreadas, etiquetas fluorescentes, etiquetas cromogénicas, etiquetas luminiscentes, etiquetas radioactivas, haptenos, biotina, complejos metálicos, metales y oro coloidal, siendo particularmente preferentes las etiquetas fluorescentes. Todos estos tipos de etiquetas están bien establecidos en la técnica. Un ejemplo de una reacción física que está mediada por dichas etiquetas es la emisión de fluorescencia. Por lo tanto, las etiquetas ópticas pueden ser etiquetas fluorescentes.

20 Los procedimientos pueden comprender además marcar el analito con una primera etiqueta óptica y un segundo anticuerpo de etiqueta óptica, en los que la primera y la segunda etiqueta óptica son diferentes. La primera y segunda etiqueta óptica pueden ser la primera y segunda etiqueta fluorescente que tienen longitudes de onda de emisión distintas. La etiqueta puede ser un anticuerpo. Por ejemplo, el procedimiento puede comprender además marcar el analito con un primer anticuerpo fluorescente y un segundo anticuerpo fluorescente de etiqueta óptica, en el que el primer y el segundo anticuerpo fluorescente tienen longitudes de onda de emisión distintas.

25 Por ejemplo, para detectar el número de células T auxiliares en una muestra líquida, la matriz puede incluir un anticuerpo anti-CD4+ marcado con un primer tinte fluorescente (tal como la ficoeritrina) y un anticuerpo anti-CD3+ marcado con un segundo tinte fluorescente tal como (ficoeritrina-Cy5), sales y reactivos estabilizantes, etc.

30 Detectar el analito puede incluir registrar una primera imagen del analito en la longitud de onda de emisión del primer anticuerpo fluorescente; registrar una segunda imagen del analito en la longitud de onda de emisión del segundo anticuerpo fluorescente; y comparar la primera y segunda imagen.

35 Los sistemas pueden incluir un sensor de fluorescencia, por ejemplo, una cámara. De forma adicional o alternativa, el sensor de fluorescencia puede incluir uno o más filtros de emisión seleccionables.

40 En algunos modos de realización, se usan uno o más elementos de control en la detección de un analito en una muestra. Por ejemplo, un elemento de control que puede ser un elemento de los dispositivos o sistemas descritos en el presente documento puede ser al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en (i) un analito que se inmoviliza dentro del canal microfluídico, (ii) una microesfera ópticamente detectable que se inmoviliza dentro del canal microfluídico, (iii) un medio para determinar el volumen del canal microfluídico, (iv) un medio para determinar un fondo de fluorescencia en el canal microfluídico y (v) un medio para detectar el llenado del canal microfluídico.

45 Por ejemplo, un analito y/o una microesfera ópticamente detectable pueden inmovilizarse dentro de la región de detección.

50 Los analitos que se inmovilizan dentro del canal microfluídico pueden actuar como controles positivos de los analitos que se van a detectar. En otras palabras, un analito que se inmoviliza dentro del canal microfluídico puede corresponder a un analito que se espera que se va a detectar en el ensayo.

55 El analito que se inmoviliza dentro del canal microfluídico puede ser una partícula, por ejemplo, una célula. Las células ejemplares son células T auxiliares tales como CD3+ y/o CD4+.

60 Los procedimientos pueden comprender además la formación de complejos que comprenden uno de los analitos que se inmovilizan dentro del canal microfluídico y al menos una de las etiquetas ópticas.

65 Las microesferas ópticamente detectables que se inmovilizan dentro del canal microfluídico pueden ser ópticamente detectables sin estar marcadas con una etiqueta o resto detectable. Por ejemplo, las microesferas

ópticamente detectables que se inmovilizan dentro del canal microfluídico pueden ser microesferas fluorescentes.

5 Los procedimientos pueden comprender además detectar complejos presentes dentro de cada uno de múltiples subconjuntos diferentes de la mezcla. Por ejemplo, dentro de cada mezcla del dispositivo microfluídico, las partículas, si están presentes, pueden combinarse con una etiqueta detectable para formar complejos. Después de un período de incubación adecuado para permitir la formación de complejos, se detecta la presencia de complejos. En la solicitud de patente internacional PCT/ EP2006/068153 se describen ejemplos para la detección de complejos.

10 Un volumen total de los múltiples subconjuntos diferentes puede ser al menos el 90 % de un volumen de la muestra líquida introducida en el dispositivo microfluídico.

15 Los procedimientos pueden comprender además introducir un volumen total V de muestra líquida en el dispositivo microfluídico en el que el volumen total de la mezcla puede ser al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % del volumen total V.

20 Los procedimientos pueden comprender además la detección de complejos presentes dentro de al menos el 10 % del volumen total de la mezcla, por ejemplo, dentro del 10 % al 90 %, del 15 % al 50 % o del 20 % al 30 % del volumen total de la mezcla.

El canal microfluídico puede incluir una entrada y una región de detección en comunicación fluida con la entrada. Además, el canal microfluídico puede ser un canal microfluídico de un dispositivo microfluídico.

25 Los procedimientos pueden comprender además, antes de introducir una muestra líquida en un canal microfluídico, introducir una muestra líquida en un orificio de un capilar o una entrada capilar.

30 El capilar es típicamente un capilar estándar (por ejemplo, un capilar de extremo a extremo, tal como un capilar de plástico). Un capilar de extremo a extremo incluye un orificio interno y una primera y segunda abertura, una en cada extremo del orificio. El orificio capilar puede comprender un inhibidor de coagulación tal como la heparina. Por ejemplo, el capilar puede estar recubierto con anticoagulante, tal como con heparina. En general, el orificio capilar está configurado para contener un volumen total V de muestra líquida. El volumen V es típicamente de aproximadamente  $25 \cdot l$  o menos (por ejemplo, aproximadamente  $20 \cdot l$  o menos, aproximadamente  $15 \cdot l$  o menos, aproximadamente  $10 \cdot l$  o menos, aproximadamente  $5 \cdot l$  o menos). En general, el volumen V es de aproximadamente  $1 \cdot l$  o más (por ejemplo, aproximadamente 3 o 5 o  $7,5 \cdot l$  o más). En algunos modos de realización, el capilar puede ser un capilar de extremo a extremo que comprende un primer y segundo extremo abiertos que comprenden un volumen total V, y la etapa de introducir al menos una parte de la muestra líquida puede comprender introducir al menos el 90 % de la muestra líquida en el canal microfluídico.

40 Los procedimientos pueden comprender, además, mediar las etapas de introducir la muestra líquida en la entrada capilar e introducir la muestra líquida en el canal microfluídico, conectando el capilar al dispositivo microfluídico, permaneciendo la muestra líquida dentro del capilar.

45 Los procedimientos pueden comprender además detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto de la muestra líquida, estando presente el subconjunto dentro de una zona de detección o región de detección del dispositivo microfluídico.

50 Un ensayo ejemplar para detectar partículas tales como células en una muestra líquida se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/051861. Como se describe en el documento WO 2007/051861, la detección puede tener lugar en el canal microfluídico. Por tanto, el canal microfluídico es al menos parcialmente ópticamente transparente. Por ejemplo, el canal microfluídico puede estar cubierto por una capa al menos parcialmente transmisible ópticamente.

55 La introducción de la muestra líquida se puede realizar comprimiendo la pared elásticamente deformable. Comprimir la pared elásticamente deformable puede comprender comprimir una primera parte del circuito de fluido y, sin liberar completamente primero la compresión, mover un sitio de la compresión a lo largo del circuito de fluido en una cantidad suficiente para realizar las etapas de desplazamiento e introducción.

60 Los procedimientos pueden comprender además realizar la etapa de detectar ópticamente una señal indicativa de una cantidad de complejo presente dentro del subconjunto diferente con la primera liberación completa de la compresión.

65 Los procedimientos pueden comprender además mediar las etapas de introducir la muestra líquida en el orificio del capilar e introducir al menos la parte de la muestra líquida en el canal microfluídico, evitando que la muestra líquida salga del capilar.

En algunos modos de realización, una región de detección del canal microfluídico no soporta el flujo capilar de la muestra líquida.

Además, al menos una parte de una superficie interior del canal microfluídico puede ser hidrófoba.

5

Los procedimientos pueden comprender además mover al menos uno del dispositivo microfluídico y un sensor óptico con respecto a otro y posteriormente detectar una señal óptica indicativa de una cantidad de complejo presente dentro de un subconjunto diferente de la muestra líquida.

10

En algunos aspectos de la divulgación, el procedimiento comprende: verificar el enfoque de una unidad de detección de un sistema o asociado con un dispositivo, en el que dicho sistema o dispositivo comprende una o más partículas ópticamente detectables que se inmovilizan dentro de un canal microfluídico, y ajustar el enfoque si es necesario; ajustar el tiempo de exposición para la unidad de detección; detectar ópticamente la una o más partículas en un área predefinida del canal microfluídico; determinar un primer valor indicativo del número de partículas en dicha área; y determinar un segundo valor indicativo de la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a una comparación del primer valor con un valor umbral.

15

20

El segundo valor indicativo de la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con dicho dispositivo o sistema puede ser una desviación de no más de aproximadamente el 40 %, de no más de aproximadamente el 30 %, de no más de aproximadamente el 20 % o de no más de aproximadamente el 10 % entre dicho primer valor y dicho valor umbral. La obtención de dicha desviación puede dar lugar a una continuación del uso de dicho dispositivo o sistema y/o una confirmación de los resultados obtenidos con dicho dispositivo o sistema.

25

30

De forma alternativa, una desviación de más de aproximadamente el 10 %, de más de aproximadamente el 20 %, de más de aproximadamente el 30 % o de más de aproximadamente el 40 % entre dicho primer valor y dicho valor umbral, puede indicar la falta de funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema. La obtención de dicha desviación puede dar lugar a la interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o al incumplimiento de los resultados obtenidos con dicho dispositivo o sistema.

La partícula que se va a usar puede ser una microesfera.

35

40

45

En algunos aspectos de la divulgación, el procedimiento comprende: colocar una lente a una primera distancia y en una primera posición con respecto a un canal microfluídico de un dispositivo o sistema que comprende una muestra líquida y una o más partículas ópticamente detectables inmovilizadas dentro de un canal microfluídico, tomar una primera imagen de al menos un subconjunto de dichas partículas inmovilizadas, analizar al menos un parámetro de dicha primera imagen, basado en dicho al menos un parámetro, colocar la lente a una segunda distancia y en la primera posición con respecto al canal microfluídico, tomar una imagen adicional de dicho subconjunto de partículas inmovilizadas, determinar un primer valor indicativo del número de partículas en dicha segunda imagen, determinar un segundo valor indicativo de la diferencia entre dicho primer valor y un valor umbral, y, dependiendo de dicho segundo valor, tomar a la segunda distancia una imagen de al menos una segunda posición del canal microfluídico o crear un mensaje de error. La creación de un mensaje de error puede dar lugar a la interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o al incumplimiento de los resultados obtenidos con dicho dispositivo o sistema.

Dicha primera y segunda distancia pueden ser esencialmente las mismas.

50

Sin embargo, la primera y la segunda distancia también pueden diferir entre sí, por ejemplo, en una distancia igual o superior a 0.1 • m, 0.5 • m, 1 • m, 1.5 • m o una distancia inferior a 10 • m, por ejemplo 2 • m, 3 • m, 5 • m, 7 • m.

55

60

El procedimiento puede comprender además: marcar partículas inmovilizadas en el canal microfluídico de un dispositivo o sistema con etiqueta óptica o reactivo de etiquetado; obtener una primera imagen que comprende al menos un subconjunto de las partículas inmovilizadas; determinar un primer valor indicativo del número de partículas en la primera imagen; obtener una imagen adicional del subconjunto de partículas inmovilizadas después de un período intermedio; determinar un valor adicional indicativo del número de partículas en la imagen adicional; determinar un tercer valor indicativo de la actividad y/o calidad de la etiqueta óptica o reactivo de etiquetado y/o la calidad de una interacción entre una partícula y un reactivo de etiquetado y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, basado en una comparación del primer valor y el valor adicional.

65

La etapa de obtener una imagen adicional y determinar un valor adicional puede repetirse al menos 2, 3, 5, 10 o n veces y la determinación del tercer valor puede basarse en una comparación del primer valor y el (los) valor(es) adicional(es).

- 5 El tercer valor indicativo de la calidad del reactivo de etiquetado y/o la calidad de una interacción entre una partícula y un reactivo de etiquetado y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema puede ser un aumento del valor adicional con respecto al primer valor en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 % o en al menos aproximadamente el 30 %. La obtención de dicho aumento puede dar lugar a una continuación del uso de dicho dispositivo o sistema y/o una confirmación de los resultados obtenidos con dicho dispositivo o sistema.
- 10 El tercer valor puede compararse con un valor umbral. En base a esta comparación, puede producirse una acción. Esta acción puede ser uno o más de un grupo que comprende mostrar un mensaje de error, mostrar un mensaje de estado, mover un componente en relación con otro componente, realizar un algoritmo, abortar o continuar un ensayo, procedimiento, algoritmo, etc.
- 15 De forma alternativa, un aumento del valor adicional con respecto al primer valor o un valor umbral de más de aproximadamente menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 20 % o menos de aproximadamente el 30 % puede indicar la falta de funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema. La obtención de dicho aumento puede dar lugar a una interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o a ignorar los resultados obtenidos con dicho dispositivo o sistema.
- 20 Una partícula inmovilizada en el canal microfluídico puede ser una sustancia inorgánica, una célula eucariota, una bacteria o un virus. El reactivo de etiquetado que se va a usar puede ser un tinte, un ligando o un anticuerpo. Además, el tinte, ligando o anticuerpo puede ser fluorescente o conjugarse con un elemento fluorescente.
- 25 El intervalo entre una primera y una imagen adicional puede estar entre aproximadamente 10 segundos y 30 minutos, entre aproximadamente 1 minuto y 15 minutos, entre aproximadamente 5 minutos y 10 minutos o aproximadamente 7 minutos.
- 30 El procedimiento puede comprender además: obtener una imagen de al menos una posición de un canal microfluídico comprendido en un dispositivo o sistema; introducir una muestra en el canal microfluídico; obtener una imagen adicional de la al menos una posición de un canal microfluídico; analizar uno o más parámetros de las imágenes; calcular un valor indicativo de la presencia de una muestra en el canal microfluídico y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a los parámetros analizados.
- 35 El parámetro de la imagen que se va a usar puede ser un valor de gris en cada imagen.
- 40 El valor indicativo de la presencia de una muestra en el canal microfluídico y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema puede ser un aumento del valor de gris en más de aproximadamente un 50 % entre el valor de gris en dicha imagen y el valor de gris en dicha imagen adicional. La obtención de dicho valor puede dar lugar a una continuación del uso de dicho dispositivo o sistema y/o una confirmación de los resultados obtenidos con dicho dispositivo o sistema.
- 45 De forma alternativa, un aumento de dichos valores de gris en menos de aproximadamente un 50 % entre dicha imagen y dicha imagen adicional puede indicar la no presencia de una muestra en el canal microfluídico y/o la falta de funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema. La obtención de dicho aumento puede dar lugar a una interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o a ignorar los resultados obtenidos con dicho dispositivo o sistema.
- 50 El parámetro de la imagen que se va a usar puede ser del 50.º al 95.º percentil o el 90.º percentil de los valores de gris de cada imagen.
- 55 En otro aspecto de la divulgación, el procedimiento comprende: verificar el enfoque de una unidad de detección de un sistema o asociado con un dispositivo, en el que dicho sistema o dispositivo comprende una o más partículas ópticamente detectables que se inmovilizan dentro de un canal microfluídico, y ajustar el enfoque si es necesario; ajustar el tiempo de exposición para la unidad de detección; detectar ópticamente la una o más partículas en un área predefinida del canal microfluídico; determinar un primer valor indicativo del número de partículas en dicha área; y determinar un segundo valor indicativo de la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a una comparación del primer valor con un valor umbral;
- 60 o el procedimiento que comprende: colocar una lente a una primera distancia y en una primera posición con respecto a un canal microfluídico de un dispositivo o sistema que comprende una muestra líquida y una o más partículas ópticamente detectables inmovilizadas dentro de un canal microfluídico, tomar una primera imagen de
- 65

al menos un subconjunto de dichas partículas inmovilizadas, analizar al menos un parámetro de dicha primera imagen, basado en dicho al menos un parámetro, colocar la lente a una segunda distancia y en la primera posición con respecto al canal microfluídico, tomar una imagen adicional de al menos un subconjunto de dichas partículas inmovilizadas, determinar un primer valor indicativo del número de partículas en dicha segunda imagen, determinar un segundo valor indicativo de la diferencia entre dicho primer valor y un valor umbral, y, dependiendo de dicho segundo valor, tomar a la segunda distancia una imagen de al menos una segunda posición del canal microfluídico o crear un mensaje de error,

puede realizarse en combinación con un procedimiento que comprende: etiquetar partículas inmovilizadas en el canal microfluídico de un dispositivo o sistema con una etiqueta óptica o un reactivo de etiquetado; obtener una primera imagen que comprende al menos un subconjunto de las partículas inmovilizadas; determinar un primer valor indicativo del número de partículas en la primera imagen; obtener una imagen adicional del subconjunto de partículas inmovilizadas después de un intervalo; determinar un valor adicional indicativo del número de partículas en la imagen adicional; determinar un tercer valor indicativo de la actividad y/o calidad de la etiqueta óptica o el reactivo de etiquetado y/o la calidad de una interacción entre una partícula y un reactivo de etiquetado y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a una comparación del primer valor y el valor adicional, y/o en combinación con un procedimiento que comprende: obtener una imagen de al menos una posición de un canal microfluídico comprendido en un dispositivo o sistema; introducir una muestra en el canal microfluídico; obtener una imagen adicional de la al menos una posición de un canal microfluídico; analizar uno o más parámetros de las imágenes; calcular un valor indicativo de la presencia de una muestra en el canal microfluídico y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a los parámetros analizados.

En otro aspecto de la divulgación, el procedimiento comprende: etiquetar partículas inmovilizadas en el canal microfluídico de un dispositivo o sistema con una etiqueta óptica o reactivo de etiquetado; obtener una primera imagen que comprende al menos un subconjunto de las partículas inmovilizadas; determinar un primer valor indicativo del número de partículas en la primera imagen; obtener una imagen adicional del subconjunto de partículas inmovilizadas después de un intervalo; determinar un valor adicional indicativo del número de partículas en la imagen adicional; determinar un tercer valor indicativo de la actividad y/o calidad de la etiqueta óptica o el reactivo de etiquetado y/o la calidad de una interacción entre una partícula y un reactivo de etiquetado y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a una comparación del primer valor y el valor adicional, puede realizarse en combinación con un procedimiento que comprende: obtener una imagen de al menos una posición de un canal microfluídico comprendido en un dispositivo o sistema; introducir una muestra en el canal microfluídico; obtener una imagen adicional de la al menos una posición de un canal microfluídico; analizar uno o más parámetros de las imágenes; calcular un valor indicativo de la presencia de una muestra en el canal microfluídico y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base al parámetro analizado.

En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento de control o prueba como se menciona anteriormente en el presente documento puede comprender además al menos una de las siguientes etapas: controlar la presencia de un dispositivo dentro o con respecto a una unidad de detección de un sistema; determinar un fondo de fluorescencia en el canal microfluídico del dispositivo o sistema; determinar una plausibilidad de conteo diana por medio de la detección de ciertas partículas diana en el dispositivo o sistema; controlar la movilidad del dispositivo dentro de la unidad de detección del sistema; controlar la carga de la batería, la plausibilidad de la fecha y/o la temperatura en el dispositivo o sistema; y controlar los parámetros del programa informático del sistema.

En otro aspecto de la divulgación, el procedimiento comprende: introducir una muestra líquida en un canal microfluídico dispuesto dentro de una red, dispositivo o sistema microfluídico, en el que el canal microfluídico comprende la muestra líquida que comprende múltiples partículas, y en el que dicho canal microfluídico comprende y/o está asociado con un elemento de control; formar una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una etiqueta óptica; formando múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas; detectar complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla; realizar un procedimiento de control que comprende determinar un valor basado en el elemento de control y comparar el valor con un valor predefinido; en el que una coincidencia de ambos valores o una desviación entre ambos valores de menos de aproximadamente el 30 % indica la funcionalidad del canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, lo que conduce a una continuación del uso de dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o una confirmación de los resultados obtenidos con dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, y en el que una desviación entre ambos valores de más de aproximadamente el 30 % indica la falta de funcionalidad del canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o de cualquier proceso o procedimiento llevado a cabo con o en dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o da lugar a la interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o a ignorar los resultados obtenidos con dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico.

El procedimiento de control puede ser cualquier procedimiento de control o prueba como se menciona en el presente documento. Un dispositivo como se menciona en cualquiera de los procedimientos de control o prueba mencionados anteriormente puede ser un dispositivo como se define en el presente documento.

5 En otro aspecto de la divulgación, un sistema como se menciona en cualquiera de los procedimientos de control o prueba mencionados anteriormente puede ser un sistema como se define en el presente documento.

10 En otro aspecto de la divulgación, cualquiera de los procedimientos de control o prueba mencionados anteriormente puede comprender una etapa de detección de complejos que permite la detección y/o diagnóstico de una infección retroviral y/o una conclusión sobre el estado de una infección retroviral. La infección retroviral puede ser una infección con VIH.

15 En algún aspecto de la divulgación, un dispositivo o sistema como se describe en el presente documento, cualquiera de los procedimientos como se describe en el presente documento, incluyendo los procedimientos de control o prueba mencionados anteriormente o el capilar como se describe en el presente documento, pueden usarse para la detección, diagnóstico o monitorización de una infección retroviral. La infección retroviral puede ser una infección con VIH.

20 En otro aspecto de la divulgación, el procedimiento comprende: poner en contacto partículas inmovilizadas dentro de un canal microfluídico de una red, dispositivo o sistema microfluídico con una etiqueta óptica configurada para unir las partículas; formar complejos, comprendiendo cada uno de los complejos una etiqueta óptica y una partícula inmovilizada dentro del canal microfluídico; obtener una primera imagen que comprende al menos un subconjunto de los complejos inmovilizados; determinar un primer valor indicativo del número de complejos en la primera imagen; obtener una imagen adicional del subconjunto de complejos inmovilizados  
25 después de un intervalo; determinar un valor adicional indicativo del número de complejos en la imagen adicional; y determinar un tercer valor indicativo de la actividad y/o calidad del reactivo de etiquetado y/o la calidad de una interacción entre una partícula y un reactivo de etiquetado y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a una comparación del primer valor y el valor adicional. La etapa de obtener una imagen adicional y  
30 determinar un valor adicional se puede repetir al menos 2, 3, 5, 10 o n veces y en la que la determinación del tercer valor se basa en una comparación del primero y los valores adicionales.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La FIG. 1 ilustra un dispositivo microfluídico.

La FIG. 2 es una vista lateral del dispositivo microfluídico de la FIG. 1.

40 La FIG. 3a muestra vistas superiores de dos zonas de prueba del dispositivo microfluídico de la FIG. 1.

Las FIGS. 3b a 3g ilustran un procedimiento para formar la zona de prueba de la FIG. 3a.

45 Las FIGS. 4 y 5 son vistas laterales de un sistema configurado para operar el dispositivo microfluídico de la FIG. 1; la FIG. 5 es solo una vista lateral parcial.

La FIG. 6 ilustra datos de intensidad de fluorescencia en función de la posición a lo largo de un canal del dispositivo microfluídico de la FIG. 1.

50 La FIG. 7 ilustra un dispositivo microfluídico.

Las FIGS. 8a y 8b son cada una vistas superiores de dos zonas de prueba del dispositivo microfluídico de la FIG. 7.

55 La FIG. 9 ilustra un dispositivo microfluídico.

La FIG. 10a es una vista lateral en sección transversal del dispositivo microfluídico de la FIG. 9 y también ilustra un tubo capilar que contiene material de muestra líquida.

60 La FIG. 10b ilustra el dispositivo microfluídico de la FIG. 10a con el tubo capilar conectado con una entrada del dispositivo microfluídico, no habiendo entrado la muestra líquida en una red microfluídica del dispositivo microfluídico.

La FIG. 10c ilustra el dispositivo microfluídico de la FIG. 10c con una parte de la muestra líquida que se ha extraído del capilar de muestra a la red microfluídica del dispositivo microfluídico.

65 La FIG. 10d ilustra el dispositivo microfluídico de la FIG. 10c con la etapa de extraer la muestra líquida del capilar

de muestra en la red microfluídica del dispositivo microfluídico que se ha completado.

La FIG. 10e ilustra el dispositivo microfluídico de la FIG. 10d con una parte de la muestra líquida que se mueve una distancia  $\Delta l$  a lo largo de una longitud de la red microfluídica.

5 La FIG. 10f ilustra el dispositivo microfluídico de la FIG. 10e y la detección de un analito presente dentro de una parte de la muestra líquida.

10 La FIG. 11 ilustra un sistema operativo para operar el dispositivo microfluídico de cualquiera de las FIGS. 1, 7 y 9. El sistema operativo puede incluir cualquiera o todas las características del sistema operativo de las FIGS. 4 y 5.

Las FIGS. 12A-12D muestran una representación esquemática de un circuito de fluido.

15 Las FIGS. 13A-13B muestran vistas en corte de un cartucho que tiene un circuito de fluido.

Las FIGS. 14A-14B muestran vistas en corte de un sensor de fluorescencia.

20 La FIG. 15 muestra un esquema de vía óptica de un sensor.

Las FIGS. 16A-16B muestran representaciones de un ensayo de conteo celular usando un sensor de fluorescencia.

25 La FIG. 17 muestra una superposición de dos imágenes derivadas de un ensayo de conteo celular usando un sensor de fluorescencia.

Las FIGS. 18A-18C ilustran una matriz incluida en un capilar (A) y la etapa de disolver al menos parcialmente la matriz después de ponerla en contacto con una gota de líquido (B y C).

30 La FIG. 19 ilustra el llenado de un dispositivo de conteo de células (etapas 1 a 7). Los elementos de control ejemplares comprendidos en el canal microfluídico se representan como círculos abiertos.

35 Las FIGS. 20 y 21 muestran modos de realización ejemplares de un dispositivo que tiene un canal microfluídico con una abertura de ventilación en estado abierto (FIG. 20) y cerrado (FIG. 21).

Las FIGS. 22 a 24 muestran otros modos de realización ejemplares de un dispositivo que tiene un canal microfluídico con una abertura de ventilación. La FIG. 22 muestra la abertura de ventilación en un estado abierto y la FIG. 23 en un estado cerrado. La FIG. 24 es una vista superior en un primer extremo de una entrada capilar.

#### 40 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Un procedimiento para analizar una muestra para determinar la presencia (por ejemplo, cualitativa y/o cuantitativamente) de múltiples analitos incluye introducir la muestra en un canal de un dispositivo microfluídico. El dispositivo microfluídico puede tener un solo canal o múltiples canales, dependiendo del diseño y la complejidad del ensayo. En algunos modos de realización, el canal se puede definir entre superficies interiores opuestas del primer y segundo sustrato del dispositivo.

50 En general, un dispositivo para realizar ensayos puede incluir una vía de flujo microfluídica que está limitada por al menos una superficie deformable. Por ejemplo, cuando la vía de flujo microfluídica se define entre superficies interiores opuestas del primer y segundo sustrato del dispositivo, el segundo sustrato puede ser relativamente flexible en comparación con el primer sustrato. En otro ejemplo, una parte de la vía de flujo microfluídica puede incluir una zona compresible. La zona de compresión puede ser una longitud del circuito de fluido a lo largo de la cual al menos una pared del circuito es compresible o deformable. Cuando se aplica una fuerza de compresión localizada a la superficie deformable, la superficie se deforma. Bajo una fuerza suficiente, la superficie deformable puede comprimirse en un grado que interrumpe la vía de flujo microfluídica. Mover la localización de la deformación superficial en relación con la vía de flujo microfluídica puede mover líquido dentro de la vía de flujo microfluídica, particularmente cuando la superficie deformable se comprime en un grado que interrumpe la vía de flujo microfluídica.

60 En algunos modos de realización, el segundo sustrato puede ser relativamente flexible en comparación con el primer sustrato. Se pueden espaciar múltiples zonas de prueba a lo largo del canal. Cada zona de prueba incluye un compuesto de sonda inmovilizado configurado para participar en un ensayo para un analito respectivo. Típicamente, cada ensayo incluye la interacción de un compuesto de sonda con el analito respectivo o con un complejo respectivo que incluye el analito y un reactivo (por ejemplo, una etiqueta óptica).

65 Para determinar el resultado del ensayo para cada zona de prueba, la superficie exterior del segundo sustrato

puede someterse a una fuerza de compresión localizada. La fuerza de compresión provoca una reducción localizada de la distancia que separa las superficies interiores del primer y segundo sustrato. La localización de la reducción de distancia localizada se superpone a una zona de detección óptica definida dentro del canal. A medida que se reduce la distancia, el material móvil (por ejemplo, muestra, sondas ópticas no unidas y/o reactivos) se desplaza entre los sustratos en la zona de detección. El dispositivo microfluídico se traslada de modo que las zonas de prueba pasen secuencialmente a través de la zona de detección. Para cada zona de prueba, el resultado del ensayo se determina ópticamente (por ejemplo, por fluorescencia) a medida que la zona de prueba pasa a través de la zona de detección. La presencia de cada analito se determina (por ejemplo, cuantitativa y/o cualitativamente) en base al resultado del ensayo.

Los resultados del ensayo típicamente se pueden determinar sin poner en contacto primero las zonas de prueba con una solución de lavado después de poner en contacto las zonas de prueba con la muestra.

Los analitos que se van a determinar pueden seleccionarse según se desee. Por ejemplo, los analitos pueden relacionarse con la medicina (por ejemplo, diagnósticos), investigación (por ejemplo, descubrimiento de fármacos), industria (por ejemplo, control de calidad del agua o los alimentos) o análisis forense. Los analitos ejemplares que se van a determinar incluyen marcadores (por ejemplo, marcadores de diagnóstico o marcadores predictivos) de afecciones fisiológicas tales como enfermedad. Dichos marcadores incluyen marcadores cardíacos (por ejemplo, péptidos natriuréticos y miembros de la familia de la troponina), marcadores de cáncer (por ejemplo, proteínas de matriz nuclear), marcadores genéticos (por ejemplo, polinucleótidos), marcadores de sepsis, marcadores neurológicos y marcadores indicativos de afecciones patógenas. Los analitos pueden ser indicativos de la presencia de patógenos (por ejemplo, bacterias, virus u hongos).

Los compuestos de sonda de las zonas de prueba se pueden seleccionar según se desee en base a los analitos que se van a determinar. Los compuestos de sonda ejemplares incluyen polinucleótidos, anticuerpos y proteínas.

La muestra líquida se puede seleccionar según lo deseado en base a los analitos que se van a determinar. Las muestras ejemplares incluyen agua, soluciones acuosas, soluciones orgánicas, soluciones inorgánicas, fluidos corporales de humanos y otros animales, por ejemplo, orina, esputo, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre completa y materiales hemoderivados tales como plasma y sueros.

En referencia a las FIGS. 1, 2 y 4, un dispositivo microfluídico 100 y un sistema operativo 500 pueden usarse para analizar una muestra para determinar la presencia (por ejemplo, cualitativa y/o cuantitativamente) de múltiples analitos. El dispositivo microfluídico 100 incluye un primer y segundo sustrato 102,104 que definen una red microfluídica 107 que incluye una entrada 106 y, en comunicación con el mismo, un canal 110 y un depósito 108. Múltiples zonas de prueba separadas 112i están dispuestas dentro del canal 110. Cada zona de prueba 112i incluye uno o más reactivos (por ejemplo, compuestos de sonda) configurados para participar en un ensayo para un analito. El canal 110 también incluye una zona de referencia 117. El dispositivo 100 también incluye un patrón de referencia 114 que incluye múltiples indicios 116j. El patrón de referencia 114 proporciona información relacionada con las propiedades espaciales de las zonas de prueba 112i.

El sistema operativo 500 incluye una carcasa 502, un sensor 504, un lector de patrones de referencia 506 y un procesador en comunicación con el detector 504 y el lector de patrones 508. El sensor 504 es un sensor óptico de fluorescencia que detecta la interacción entre una muestra y las zonas de prueba 112i. El sensor 504 incluye una fuente de luz 550 (por ejemplo, un diodo emisor de luz o un diodo láser) y un sensor sensible a la luz de orden cero-ésimo 552 (por ejemplo, un tubo fotomultiplicador o un fotodiodo, tal como un fotodiodo de avalancha). El lector de patrones de referencia 506 lee el patrón de referencia 114 del dispositivo 100 durante el funcionamiento del sistema 500.

Ahora se analizará el dispositivo microfluídico 100 y el sistema 500 con mayor detalle.

El primer sustrato 102 es típicamente transmisor ópticamente (por ejemplo, transparente) con respecto a una longitud de onda de luz útil para excitar y detectar fluorescencia a partir de etiquetas fluorescentes. Por ejemplo, el primer sustrato 102 puede transmitir al menos aproximadamente el 75 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %) de la luz incidente en al menos un intervalo de longitud de onda entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 800 nm. El primer sustrato 102 puede estar formado por, por ejemplo, un polímero, vidrio o sílice. El segundo sustrato 104 está formado típicamente de un material maleable o flexible (por ejemplo, un polímero elastomérico). El primer sustrato 102 puede ser menos flexible que el segundo sustrato 104. Por ejemplo, el primer sustrato 102 puede ser sustancialmente rígido (por ejemplo, suficientemente rígido para facilitar el manejo del dispositivo 100).

El canal 110 es un canal capilar. Una muestra 113 aplicada a la entrada 106 migra a lo largo del canal 110 por fuerza capilar. El canal 110 está orientado a lo largo de un eje principal a1. El depósito 108 incluye una ventilación 111 para evitar la acumulación de gas por delante de la muestra.

Cada zona de prueba 112i típicamente incluye un reactivo (por ejemplo, un compuesto de sonda) configurado

para proporcionar una interacción detectable en presencia de un analito. La interacción puede incluir, por ejemplo, la unión de un analito correspondiente a un compuesto de sonda del sitio de prueba y/o una reacción química entre el analito correspondiente y el compuesto de sonda. La reacción da como resultado un producto detectable (por ejemplo, un precipitado). Los compuestos de sonda ejemplares incluyen proteínas, anticuerpos y polinucleótidos. Los compuestos de sonda adecuados para determinar la presencia de un analito se describen en la solicitud provisional de EE. UU. 60/826.678 presentada el 22 de septiembre de 2006.

En referencia también a la FIG. 3a, cada zona de prueba 112i es alargada y tiene un eje principal a2 orientado en general perpendicular al eje principal a1 del canal 110. Típicamente, una proporción de una longitud a lo largo del eje principal a2 a una anchura w a lo largo de una dimensión perpendicular de las zonas de prueba 112 es al menos 2,5 (por ejemplo, al menos 5). La longitud a lo largo del eje a2 es típicamente de al menos aproximadamente 200 • m (por ejemplo, al menos aproximadamente 350 micras) y típicamente de aproximadamente 2000 • m o menos (por ejemplo, aproximadamente 1000 • m o menos, aproximadamente 750 • m o menos). La anchura w es típicamente de al menos aproximadamente 25 • m (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 micras) y típicamente de aproximadamente 500 • m o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 • m o menos, aproximadamente 150 • m o menos). Las zonas de prueba 112 tienen aproximadamente 500 • m de largo y aproximadamente 100 • m de ancho.

Como se ve en la FIG. 2, las zonas de prueba 112i están separadas de las zonas de prueba adyacentes por una distancia d7 a lo largo del canal 110. La distancia d7 entre las zonas de prueba 112i se analiza con más detalle a continuación en relación con una zona de detección del sensor 504.

Las zonas de prueba 112i se pueden formar como se desee. En general, los reactivos se ponen en contacto con el primer sustrato. A continuación, los reactivos y el sustrato se trasladan relativamente lateralmente para formar una zona de prueba alargada.

En referencia a las FIGS. 3b-3g, un procedimiento para formar zonas de prueba 112i incluye administrar reactivos desde un observador capilar 400 sobre el primer sustrato 102. En la FIG. 3b, se introduce una cantidad (por ejemplo, entre aproximadamente 2 y 8 nl, entre aproximadamente 3 y 5 nl) de solución de reactivo 402 que contiene uno o más compuestos de sonda en una punta distal 404 de un capilar de un observador capilar. La punta distal 404 típicamente tiene un diámetro de entre aproximadamente 80 y 120 • m (por ejemplo, aproximadamente 100 • m). La solución de reactivo 402 y el sustrato 102 están inicialmente separados (por ejemplo, no en contacto) por una distancia d1. Típicamente, d1 es al menos aproximadamente 250 • m (por ejemplo, aproximadamente 500 • m).

En la FIG. 3c, la punta 404 y el sustrato 102 se llevan a una separación más pequeña d2 de modo que la solución de reactivo 402 entre en contacto con una localización del sustrato 102. En la separación más pequeña d2, la punta distal 404 es adyacente a la localización del sustrato 102 (por ejemplo, haciendo contacto de modo que d2 sea cero). La punta distal 404 y el sustrato 102 se mantienen durante un tiempo (por ejemplo, aproximadamente 1 segundo o menos, aproximadamente 0,5 segundos o menos, aproximadamente 0,25 segundos o menos) en la separación d2 en la posición adyacente (por ejemplo, haciendo contacto). En algunos aspectos de la divulgación, el tiempo durante el cual la punta distal 402 se mantiene en la posición adyacente (por ejemplo, haciendo contacto) no se puede distinguir de cero.

En la FIG. 3d, la punta distal 404 y el sustrato 102 se mueven a una separación intermedia d3 en la cual la punta distal 404 y el sustrato permanecen conectados por la solución de reactivo 402 de la punta distal 404. Típicamente, la separación intermedia d3 es al menos aproximadamente 5 • m (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 • m) y aproximadamente 30 • m o menos, aproximadamente 25 • m o menos). En un ejemplo, la separación intermedia d3 es de aproximadamente 20 • m.

En la FIG. 3e, la punta distal 404 y el sustrato 102 se mantienen a una separación intermedia d3 durante un tiempo de incubación de modo que al menos algo (por ejemplo, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 40 %) de solución de reactivo 402 en la punta distal se evapora de modo que solo quede una parte restante 402' de la solución de reactivo 402. Típicamente, solo aproximadamente el 75 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 50 % o menos) de la solución de reactivo 402 se evapora para dejar la solución 402' restante. El tiempo de incubación depende de la naturaleza de la solución 402 (por ejemplo, la concentración del compuesto de sonda y la presión de vapor del disolvente) y el entorno de la punta distal 404 (por ejemplo, la humedad relativa y la temperatura). Los tiempos de incubación típicos son más largos (por ejemplo, al menos 5 veces más largos, al menos 10 veces más largos, al menos 20 veces más largos, al menos aproximadamente 35 veces más largos) que el período de tiempo durante el cual la punta y el sustrato están la posición adyacente d2. Los tiempos de incubación ejemplares son de al menos aproximadamente 5 segundos (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 segundos, al menos aproximadamente 20 segundos, al menos aproximadamente 25 segundos).

En la FIG. 3f, después del tiempo de incubación en la separación intermedia d3, al menos uno de la punta distal 404 y el sustrato 102 se mueven lateralmente en relación con el otro para distribuir la solución de reactivo 402' a

lo largo de un eje principal a2. En la FIG. 3g, al finalizar el movimiento lateral, la punta distal 402 y el sustrato 102 se separan de modo que ya no estén conectados por la solución de reactivo. Por ejemplo, la punta distal 404 y el sustrato 102 pueden regresar a la separación inicial d1. El procedimiento puede repetirse (por ejemplo, usando una solución de reactivo diferente) para dispensar zonas de prueba alargadas en cada una de las múltiples localizaciones del sustrato.

En general, la separación vertical de la punta distal y el sustrato se cambia moviendo la punta distal en relación con el sustrato. En general, la traslación lateral de la punta distal y el sustrato se realiza trasladando el sustrato en relación con la punta distal. Soluciones de reactivos, compuestos de sonda y dispositivos dispensadores ejemplares se describen en la solicitud provisional de EE. UU. 60/826.678 presentada el 22 de septiembre de 2006.

Como se ve en la FIG. 3a y en referencia también con las FIGS. 8a y 8b, el procedimiento para producir zonas de prueba alargadas 112i proporciona una distribución más homogénea de compuestos de sonda que un procedimiento de dispensación que omite la etapa de mover lateralmente la punta distal y el sustrato. Las zonas de prueba 112i incluyen una primera porción 119 y una segunda porción 121. La distribución de compuestos de sonda en la primera porción 119 es más homogénea que en la segunda porción 121 o en las zonas de prueba 312i, que se prepararon sin la etapa de movimiento lateral.

Volviendo a la FIG. 1, la zona de referencia 117 produce una respuesta detectable por el sensor 504 independiente de la presencia de cualquier analito en una muestra. La zona de referencia 117 típicamente incluye un medio fluorescente (por ejemplo, un polímero o una molécula fluorescente inmovilizada). La zona de referencia 117 se analiza con más detalle a continuación con respecto al funcionamiento del sistema 500.

Los indicios 116j del patrón de referencia 114 están configurados para ser leídos por el lector de patrones de referencia 506 del sistema 500. Los indicios 116j están compuestos de material magnético (por ejemplo, tinta magnética). El lector de patrones 506 puede detectar la presencia de indicios 116j. El patrón de referencia 114 se analiza con más detalle a continuación con respecto al funcionamiento del sistema 500.

Volviendo a la FIG. 4, la carcasa 502 del sistema operativo 500 incluye una abertura 510 para recibir el dispositivo 100, un sistema de compresión que incluye un rodillo de compresión 516 y rodillos de soporte 518, 520, y un actuador de traslación 512 que incluye un resorte amortiguado 514. Cuando el dispositivo 100 se recibe dentro de la carcasa 500, el sensor 504 define una zona de detección óptica 524 dentro del canal 110. En uso, el dispositivo 100 se traslada con respecto a la zona de detección 524. Las zonas de prueba 112i pasan secuencialmente dentro y fuera de la zona de detección. El sensor 504 detecta secuencialmente la interacción entre una muestra y las zonas de prueba sucesivas 112i. El sensor 504 también detecta la zona de referencia 117.

En referencia a la FIG. 6, el sensor 504 emite una señal 600 en función de la distancia (relativa o absoluta) a la que se traslada el dispositivo 100. La señal 600 incluye un pico 617 indicativo de la zona de referencia 117 y los picos 612i indicativos de la interacción en cada zona 112i. Simultáneamente, el lector de patrones 506 emite una señal 602 indicativa de indicios 116i en función de la distancia a la que se traslada el dispositivo 100. Debido a que los indicios 116i están relacionados espacialmente con las zonas de prueba 112i, el procesador 508 puede determinar cuándo la zona de detección 524 coincide con una zona de prueba particular, incluso si esa zona de prueba no presenta ninguna señal (por ejemplo, en el caso de la zona de prueba 112a que presenta una señal 612a que no se puede distinguir de cero). La zona de referencia 117 y la señal correspondiente 617 se pueden usar de forma alternativa o en combinación con la señal 602 para determinar qué regiones de la señal 600 corresponden a zonas de prueba particulares.

A continuación, se analizará el sistema de compresión. En uso, el sistema de compresión comprime el dispositivo 100 para reducir la distancia entre los sustratos 102,104 dentro del canal 110. Cuando el dispositivo 100 se recibe dentro de la carcasa 502, una superficie exterior 132 del primer sustrato 102 está orientada hacia los rodillos de soporte 518, 520 y una superficie exterior 134 del segundo sustrato 104 está orientada hacia el rodillo de compresión 516. Una distancia d4 entre los rodillos de soporte 518, 520 y el rodillo de compresión 516 es menor que un espesor t1 (FIG. 5) del dispositivo 100. Debido a que el segundo sustrato 104 es relativamente flexible en comparación con el primer sustrato 102, el rodillo de compresión 516 comprime el segundo sustrato 104 provocando una reducción local en la distancia d6 entre la superficie interior 103 del segundo sustrato 104 y la superficie interior 105 del primer sustrato 102.

En el estado relajado (por ejemplo, estado no comprimido) (FIG. 2), la distancia d6 es típicamente de al menos aproximadamente 25 • m (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 • m, al menos aproximadamente 75 • m). En el estado no comprimido, la distancia d6 es típicamente de aproximadamente 500 • m o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 • m o menos). En el estado de distancia reducida localmente (por ejemplo, estado comprimido localmente) (zona de prueba 112e en la FIG. 4), la distancia d6 es típicamente de aproximadamente 15 • m o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 • m o menos, aproximadamente 5 • m o menos, por ejemplo, aproximadamente 2,5 • m o menos). En la continuación de la solicitud de patente internacional de EE. UU.

PCT/EP2005/004923 se describen ejemplos de detección de fluorescencia realizada entre superficies separadas por un estado de distancia reducida.

5 Como se ve en las FIGS. 4 y 5, el sistema de compresión redujo la distancia d8 dentro del canal 110 sobre solo una porción de la longitud del canal 110. Típicamente, la distancia d8 es aproximadamente 5 veces la longitud o menos (por ejemplo, aproximadamente 3 veces la longitud o menos, aproximadamente 2 veces la longitud o menos, aproximadamente igual) que la distancia d7 que separa las zonas de prueba 112i.

10 Típicamente, la distancia d7 es lo suficientemente grande como para que la zona de detección óptica 524 definida por el sensor 504 englobe menos que todas (por ejemplo, 5 o menos, 3 o menos, 2 o menos) las zonas de prueba 112i dentro del canal 110. En un ejemplo, d7 es lo suficientemente grande como para que una anchura de la zona de detección 524 a lo largo del eje principal a1 del canal 110 no se ponga en contacto simultáneamente con más de 3 (por ejemplo, no más de dos, no más de una) zona de prueba 112i. Una anchura de zona de detección 524 perpendicular al eje principal a1 del canal 110 es típicamente aproximadamente igual o menor que (por ejemplo, no más del 75 %, no más del 50 %, no más del 30 % de) la longitud de zonas de prueba 112i a lo largo del eje a2 del mismo.

20 En uso, el líquido de muestra se aplica a la entrada 106. La fuerza capilar extrae la muestra a lo largo del canal 110 hacia el depósito 108. El líquido de muestra se pone en contacto con las zonas de prueba 112i a lo largo del canal 110. Los analitos dentro de la muestra interactúan con compuestos de sonda de las zonas de prueba. Después de un tiempo de incubación adecuado, el dispositivo 100 se inserta en la carcasa 500 para comprimir el resorte 514 del actuador de traslación 512. Durante la inserción del dispositivo 100, el rodillo de compresión 516 y los rodillos de soporte 520 están separados de modo que el dispositivo 100 no se comprima. Una vez que el dispositivo 100 está completamente insertado, la zona de detección 524 se sitúa aproximadamente superponiendo la zona de referencia 117. El rodillo de compresión 516 comprime localmente el canal 110 (FIG. 5).

30 Cuando las interacciones entre los analitos de la muestra y las zonas de prueba 112i están listas para determinarse (por ejemplo, después de un período de incubación), el actuador de traslación 512 traslada el dispositivo 100 con respecto a la zona de detección 524 del sensor 504 (FIG. 4). Las zonas de prueba 112i pasan secuencialmente a través de la zona de detección 524 y se iluminan con luz de la fuente de luz. El rodillo de compresión 516 está dispuesto de modo que la reducción localizada de la distancia d6 corresponda espacialmente a la zona de detección 524. En consecuencia, el sensor de luz detecta secuencialmente la luz de las zonas de prueba 112i mientras cada una está en el estado de distancia reducida localmente (por ejemplo, estado comprimido localmente) (zona de prueba 112e en la FIG. 4). La fluorescencia que surge de cada zona de prueba es recogida por la lente y detectada por el sensor de luz. La reducción secuencial localizada de la distancia d6 y la determinación óptica continúan hasta que cada zona de prueba se haya trasladado a través de la zona de detección 524.

40 Además de los compuestos de sonda de cada zona de prueba y los analitos, hay otros materiales presentes en el canal 110 entre la superficie interior 103 del segundo sustrato 104 y la superficie interior 105 del primer sustrato 102. Los ejemplos de dichos materiales incluyen concomitantes y reactivos de muestra (por ejemplo, sondas ópticas no unidas o sin reaccionar). Estos materiales típicamente producen una emisión de fondo (por ejemplo, fluorescencia o luz dispersa) que no está asociada con la interacción de la muestra con las zonas de prueba 112i. La intensidad de la emisión de fondo es en general proporcional a la cantidad de dichos materiales que permanecen entre las superficies interiores en la localización correspondiente a la zona de detección 524. Sin embargo, la intensidad de la señal óptica que es indicativa de la interacción en cada zona de prueba está localizada espacialmente en la vecindad de esa zona de prueba. El sensor de luz recibe y detecta tanto la fluorescencia indicativa de la interacción como la emisión de fondo.

50 En referencia a las FIGS. 9, 10a y 11, un dispositivo microfluidico 700 y un sistema operativo 500' pueden usarse para analizar una muestra para determinar la presencia (por ejemplo, cualitativa y/o cuantitativamente) de uno o más analitos. En un modo de realización típica, uno o más de los analitos comprenden partículas tales como virus, bacterias, células, hongos o esporas. Por ejemplo, se puede detectar cualquiera de las partículas descritas en la solicitud de patente internacional PCT/EP2006/068153.

60 El dispositivo microfluidico 700 incluye un primer y segundo sustrato 702, 704 que definen una red microfluidica 707 que incluye una entrada 706 y, en comunicación con el mismo, múltiples canales 710a, 710b, 710c que tienen cada uno un depósito respectivo 708a, 708b, 708c. Cada depósito incluye un material reactivo 709a, 709b, 709c (por ejemplo, un compuesto de sonda) configurado para participar en un ensayo para un analito. El dispositivo 700 puede incluir un patrón de referencia 114 que incluye múltiples indicios 116j (no mostrado en las FIGS. 9, 10a, 11), que puede ser el mismo que el analizado anteriormente.

65 El sistema operativo 500' incluye una carcasa 502', un sensor 504', un lector de patrones de referencia (no mostrados) y un procesador en comunicación con el sensor 504' y el lector de patrones. El sensor 504 es un sensor óptico de fluorescencia que detecta complejos que comprenden un analito (por ejemplo, una partícula) y

una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta óptica). En la solicitud de patente internacional PCT / EP2006 / 068153 se describen ejemplos de etiquetas adecuadas. El sensor 504' incluye una fuente de luz 550' (por ejemplo, un diodo emisor de luz o un diodo láser) y un sensor óptico 552' (por ejemplo, un sensor de primer orden tal como una matriz de diodos o un sensor multidimensional (por ejemplo, un sensor de formación de imágenes tal como un sensor de carga acoplado)). El sensor óptico típicamente y espacialmente detecta selectivamente la luz de una zona de detección respectiva definida dentro de cada canal del dispositivo microfluídico.

Ahora se analizará el dispositivo microfluídico 700 y el sistema 500' con mayor detalle.

El primer sustrato 702 es típicamente transmisor ópticamente (por ejemplo, transparente) con respecto a una longitud de onda de luz útil para excitar y detectar fluorescencia a partir de etiquetas fluorescentes. Por ejemplo, el primer sustrato 702 puede transmitir al menos aproximadamente el 75 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %) de la luz incidente en al menos un intervalo de longitud de onda entre aproximadamente 350 nm y aproximadamente 800 nm. El primer sustrato 702 puede estar formado por, por ejemplo, un polímero, vidrio o sílice. El segundo sustrato 704 está formado típicamente de un material maleable o flexible (por ejemplo, un polímero elastomérico). El primer sustrato 702 puede ser menos flexible que el segundo sustrato 704. Por ejemplo, el primer sustrato 702 puede ser sustancialmente rígido (por ejemplo, suficientemente rígido para facilitar el manejo del dispositivo 700).

Los canales 710a-710c típicamente soportan el movimiento de la muestra líquida en los mismos, pero típicamente no son canales capilares (es decir, el líquido típicamente no se mueve dentro de los canales del dispositivo 700 por acción capilar). Por ejemplo, una o más superficies interiores de los canales pueden ser hidrófobas para inhibir el movimiento capilar de la muestra líquida. De forma alternativa, o en combinación, las dimensiones internas de los canales pueden ser demasiado grandes para permitir que las fuerzas capilares conduzcan un movimiento sustancial de la muestra en los mismos. Por supuesto, los canales pueden ser canales capilares.

El dispositivo 700 se muestra con 3 canales y el depósito correspondiente, pero en general tiene un número N de canales y depósitos correspondientes donde N es al menos 1 y es típicamente inferior a 20.

Cada depósito 708i típicamente incluye un reactivo 735i (por ejemplo, una etiqueta detectable tal como una etiqueta óptica) configurada para proporcionar una interacción detectable en presencia de un analito. La interacción puede incluir, por ejemplo, la unión de un analito correspondiente a una etiqueta para formar un complejo que comprende el analito y una o más de las etiquetas. En la solicitud de patente internacional PCT/EP2006/068153 se describen ejemplos de dichos complejos. Cada reactivo se configura típicamente para permitir la detección de un analito diferente.

En referencia a las FIGS. 10b-10f, el dispositivo 700 puede funcionar como sigue. Se introduce una cantidad de muestra líquida 738 (por ejemplo, un líquido biológico tal como sangre, saliva u orina) en un capilar 736. El capilar 737 es típicamente un capilar estándar (por ejemplo, un capilar de extremo a extremo, tal como un capilar de plástico). Un capilar de extremo a extremo incluye un orificio interno y una primera y segunda abertura, una en cada extremo del orificio. El capilar puede estar recubierto con anticoagulante, tal como con heparina. Los ejemplos de capilares adecuados incluyen 20 • l de capilares recubiertos con heparina disponibles de Kabe Labortechnik (Nürnberg-Elsenroth, Alemania; [http://www.kabe-labortechnik.de/index.php?sprache=de&akt\\_seite=startseite\\_produkte.php](http://www.kabe-labortechnik.de/index.php?sprache=de&akt_seite=startseite_produkte.php)). En general, el orificio capilar está configurado para contener un volumen total V de muestra líquida. El volumen V es típicamente de aproximadamente 25 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 20 microlitros o menos, aproximadamente 15 microlitros o menos, aproximadamente 10 microlitros o menos). En general, el volumen V es de aproximadamente 5 microlitros o más (por ejemplo, aproximadamente 7,5 microlitros o más).

Como se ve en la FIG. 10b, la entrada 706 del dispositivo 700 está configurada para acomodar el capilar 736. La muestra 737 típicamente permanece dentro del capilar 736 y no ingresa al dispositivo microfluídico hasta que se somete a una fuerza de introducción.

Como se ve en la FIG. 10c, se puede aplicar una fuerza de introducción a la muestra 737 reduciendo una distancia entre las superficies internas de los sustratos 702, 704 para reducir un volumen dentro de la red microfluídica. Por ejemplo, la FIG. 10c ilustra un rodillo que se mueve a lo largo de una parte de la red microfluídica. Típicamente, la compresión hace que las superficies internas opuestas se pongan en contacto entre sí. A medida que el volumen dentro del canal aumenta después de la descompresión de una región dada del canal, una reducción en la presión de gas que actúa sobre una superficie interna 739 de la muestra líquida 737 hace que la muestra sea impulsada a la red microfluídica. La compresión y descompresión se pueden realizar en un solo movimiento continuo del rodillo 716 a lo largo de la red microfluídica o se pueden realizar secuencialmente en múltiples etapas como de manera peristáltica.

Como se ve en la FIG. 10d, sustancialmente todo (por ejemplo, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %) de la muestra líquida 738 puede ser impulsada a la red microfluídica.

al menos 95 %, esencialmente todo) el volumen V de la muestra líquida 737 se extrae en la red microfluídica. En un ejemplo, al menos el 90 % del volumen V se extrae en la red.

La muestra líquida dentro de la red microfluídica ingresa a cada uno de los canales 710i y los depósitos 708i y moviliza los reactivos dentro de cada depósito para formar una mezcla. Típicamente, la formación de la mezcla es asistida causando un movimiento masivo de la muestra líquida dentro de la red microfluídica. Dicho movimiento masivo es causado típicamente por la compresión y descompresión del dispositivo microfluídico para reducir una distancia interna entre los sustratos 702, 704. La compresión y descompresión se pueden realizar de manera peristáltica mediante movimientos repetidos de al menos uno del rodillo 716 y el dispositivo microfluídico 700 con respecto al otro.

En general, el volumen total de las mezclas formadas por la combinación de reactivos 735i en los canales N del dispositivo 700 incluye al menos aproximadamente el 70 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, esencialmente todo) de la cantidad de muestra líquida introducida en el dispositivo 700. En un ejemplo, el volumen total de las mezclas formadas por la combinación de reactivos 735i en los canales N del dispositivo 700 incluye al menos aproximadamente el 90 % de la cantidad de muestra líquida introducida en el dispositivo 700.

Dentro de cada mezcla del dispositivo microfluídico, las partículas, si están presentes, se combinan con una etiqueta detectable para formar complejos. Después de un período de incubación adecuado para permitir la formación de complejos, se detecta la presencia de complejos. Cada reactivo 735i está configurado típicamente para permitir la detección de un analito diferente. En la solicitud de patente internacional PCT/EP2006/068153 se describen ejemplos de detección de complejos.

En referencia a la FIG. 10f, la detección típicamente tiene lugar dentro de un subconjunto de cada mezcla dentro del dispositivo. En general, la detección se puede realizar dentro de múltiples subconjuntos diferentes de cada mezcla. Por ejemplo, diferentes subconjuntos de cada mezcla se pueden mover a través de la zona de detección moviendo el rodillo 716 en un estado comprimido para mover una nueva parte de la mezcla a cada zona de detección. Esto se puede realizar varias veces de modo que sustancialmente todo (por ejemplo, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95%, esencialmente todo) de cada mezcla pueda ser sometido a detección. La detección se puede realizar con el rodillo 716 en un estado comprimido. La mezcla que ya ha sido objeto de detección ingresa al capilar 736, que actúa como recipiente de residuos.

En algunos aspectos de la divulgación, la detección se realiza escaneando el dispositivo 700 con respecto al sensor óptico de modo que cada detección comprende secuencialmente un subconjunto diferente de la solución. Esto se puede realizar varias veces de modo que sustancialmente todo (por ejemplo, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95%, esencialmente todo) de cada mezcla pueda ser sometido a detección. La detección se puede realizar con el rodillo 716 en un estado no comprimido.

En algunos modos de realización, una estructura, por ejemplo, un canal microfluídico, de los dispositivos o sistemas descritos en el presente documento puede incluir un capilar que comprende una matriz. En consecuencia, los procedimientos descritos en el presente documento se puede basar en el uso de estructuras, por ejemplo, canales microfluídicos, que incluyen un capilar que comprende una matriz.

El término "matriz", como se usa en el presente documento, se refiere a un material de relleno o andamio que puede estar dentro de estructuras capilares tales como la entrada capilar. La matriz puede ser un sustrato tridimensional o una composición de sustratos o medio reactivo. Además, la matriz puede tener una estructura sólida y/o al menos parcialmente amorfa y/o al menos parcialmente particulada y/o de tipo tejido y/o de tipo textura y/o de tipo esponja, por ejemplo, que incluye uno o más materiales reticulados o poliméricos. El término "material reticulado o polimérico", como se usa en el presente documento, puede ser cualquier material que tenga una estructura de tipo tejido y/o de tipo textura y/o de tipo esponja que se pueda usar para la fabricación de una matriz. Por ejemplo, la matriz puede ser o incluir un gránulo y/o una torta de filtro y/o una torta de sustancia y/o una torta en la que el gránulo y/o torta de filtro y/o torta de sustancia y/o torta incluye reactivos como se describe en el presente documento. Sin embargo, el término "matriz" como se usa en el presente documento no se refiere a un recubrimiento de una estructura capilar tal como una entrada capilar.

El término "medio reactivo de matriz o tridimensional o medios reactivos sólidos o medio de relleno o material de andamio" como se usa en el presente documento indica un medio o material que está fijado en un capilar y/o puede distribuirse sobre partes significativas de la estructura capilar. Estas partes típicamente incluyen todas las áreas de una sección transversal, por ejemplo, no solo pueden estar confinadas a secciones parietales exteriores de la estructura capilar, sino que también pueden incluir áreas centrales y cercanas al centro de una sección transversal a través de una estructura capilar. La matriz puede englobar entre aproximadamente el 10 % y el 95 %, entre aproximadamente el 20 % y el 75 % o aproximadamente el 50 % del volumen interior de una estructura capilar.

La matriz puede extenderse sobre toda el área de la sección transversal de la estructura capilar. Además, la

matriz puede no extenderse a lo largo de toda la estructura capilar. En consecuencia, la matriz puede englobar entre el 5 % y el 75 %, entre aproximadamente el 15 % y el 60 % o entre aproximadamente el 35 % y el 50 % de la longitud total de la estructura capilar. En los casos en que no toda la longitud de la estructura capilar se llena con la matriz, la matriz puede extenderse sobre toda el área de la sección transversal de la estructura capilar o comprender solo una subsección del área de la sección transversal de la estructura capilar, por ejemplo, entre aproximadamente el 5 y el 95 %, el 10 y el 80 %, el 25 y el 60 % o el 50 % del área de la sección transversal de la estructura capilar.

El término "fijador" se refiere a cualquier unión química entre el material de la matriz y la superficie capilar, por ejemplo, una unión química covalente o una interacción iónica o electrostática. De forma alternativa o adicional, una fijación también puede ser una unión física o mecánica causada, por ejemplo, por la presencia de unidades de enclavamiento en el material de la matriz y la estructura capilar.

Una matriz como se describe en el presente documento puede tener varias propiedades que permiten una interacción eficiente con líquidos, en particular líquidos de muestras biológicas como sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido linfático, saliva o líquido cefalorraquídeo, suspensiones celulares, etc.

Típicamente, la matriz es humectable. El término "humectable" se refiere a la posibilidad de que la matriz permita una penetración con moléculas líquidas, típicamente con moléculas de agua o muestras biológicas tales como muestras de sangre.

Adicionalmente, la matriz puede permitir el flujo continuo de líquido, en particular de líquidos acuosos o líquidos de muestras biológicas. El término "flujo continuo" indica un movimiento de partículas líquidas o de muestra desde una abertura de una estructura similar a un capilar o tubo a la otra abertura. El tiempo necesario para un flujo continuo puede depender de la porosidad, el tamaño individual de los poros o la densidad o la estructura tipo torta o amorfa o particulada del material de la matriz. Típicamente, la matriz o medio de flujo continuo permite un flujo continuo de líquidos en un período de tiempo que se incrementa entre 1 a 1000 %, 5 a 500 %, 10 a 100 %, 20 a 75 % o 30 % en comparación con el tiempo requerido para un flujo continuo del mismo líquido en la misma estructura capilar o estructura similar a un tubo que no comprende matriz.

La matriz puede ser al menos parcialmente soluble en un líquido, por ejemplo, en una muestra biológica líquida tal como sangre. El término "soluble" indica la propiedad de la matriz de que toda la matriz o subpartes, por lo tanto, pueda ser arrastrada o eliminada después de haber estado en contacto con un líquido. El término "eliminar" se refiere no solo a la ruptura de elementos más grandes de la matriz, sino también a la liberación de componentes de matriz pequeños, individuales, de tamaño de molécula o de tamaño de átomo en el líquido.

La disolución de la matriz como se describe en el presente documento puede ser completa o solo parcial, por ejemplo, solo del 1 % al 99 %, del 5 % al 90 %, del 10 % al 75 %, del 20 % al 60 % o del 30 % al 50 % de la matriz puede disolverse.

La velocidad de disolución de la matriz puede depender de la velocidad de flujo o caudal del líquido, las propiedades de flujo capilar, el carácter de tipo torta o amorfo o particulado de la matriz, la porosidad de la matriz, el tamaño de poro, la constitución química del líquido, por ejemplo, el pH o la concentración iónica/salina en el líquido, la temperatura ambiente y similares. Además, la velocidad de disolución puede estar influenciada por turbulencias y/o fuerzas de corte y/o remolinos en la matriz. Todos estos parámetros pueden ajustarse adecuadamente, por ejemplo, por el diseño, la forma, la porosidad, la densidad, la estructura tipo torta, amorfa, particulada, etc. de la matriz, como lo conocería el experto en la técnica, para optimizar el comportamiento de disolución.

Además, la disolución de la matriz también puede estar influenciada por procesos de difusión. Dichos procesos pueden controlarse ajustando la velocidad de difusión dentro del líquido o muestra.

La matriz también puede usarse en tubos no capilares. En dicho escenario, la disolución del material de la matriz puede mejorarse mediante el uso de bombas o similares.

La matriz puede comprender uno o más reactivos o componentes necesarios para el procesamiento y/o análisis de muestras o analitos. El uno o más reactivos pueden ser al menos parcialmente solubles en un líquido, por ejemplo, en una muestra biológica líquida tal como sangre. Típicamente, una matriz, por ejemplo, una matriz sólida o material de relleno sólido, comprende un medio o reactivo para la detección de analitos o ingredientes de muestra y/o un medio o reactivo para la estabilización de analitos, ingredientes de muestra o componentes de la matriz y/o un medio o reactivo para mejorar los procesos de disolución y/o un medio o reactivo para la inhibición del deterioro de analitos o ingredientes de muestra y/o un medio o reactivo para lisar células.

La matriz puede no ser soluble en un líquido. Dicha matriz no soluble también puede comprender uno o más reactivos o componentes como se describe anteriormente, necesarios para el procesamiento y/o análisis de muestras o analitos. El uno o más reactivos pueden ser al menos parcialmente solubles en un líquido, por

ejemplo, en una muestra biológica líquida tal como sangre.

Un "medio o reactivo para la detección de analitos o ingredientes de muestra", como se usa en el presente documento, puede ser una etiqueta detectable que reacciona con el analito para formar un complejo que incluye la etiqueta, por ejemplo, un anticuerpo, ligando o interactor marcado para el analito. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo anti-CD4 y/o anti-CD3. En los modos de realización donde se usa más de un reactivo para la detección de analitos, los reactivos pueden estar provistos de etiquetas distintas, por ejemplo, etiquetas que tienen longitudes de onda de emisión distintas. Una "etiqueta" puede ser cualquier etiqueta adecuada conocida por el experto en la técnica, por ejemplo, una etiqueta fluorescente como ficoeritrina, Cy3 o Cy5, etc. Pueden derivarse ejemplos de etiquetas de Slavik J. y col. (1994), "Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology", CRC Publ. o de Horobin R. y Kiernan J. (2002), "Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine", Taylor y Francis. En algunos modos de realización, una etiqueta puede ser un tinte, una partícula, un catalizador tal como una enzima o similares.

Un "medio o reactivo para la estabilización de analitos, ingredientes de muestra o componentes de la matriz" puede ser, por ejemplo, una proteína que tiene capacidades de bloqueo como BSA o HSA o una fracción de polipéptido de alérgeno purificado de piel porcina (véase P.J. Gaffney y col., J. Pharm. Pharmacol 1996, 48: 896-898), por ejemplo, Prionex (obtenible de Polysciences, Eppelheim, Alemania), trehalosa o similares y, por tanto, contribuye a una reducción de los procesos de descomposición. Además, puede mantener la actividad de analitos o componentes de la matriz durante etapas de procesamiento como, por ejemplo, desnaturalización por calor, liofilización o en situaciones de almacenamiento a largo plazo.

Un "medio o reactivo para la mejora de los procesos de disolución", como se usa en el presente documento, indica medios químicos como detergentes, formadores de micelas o tampones que pueden potenciar la separación de los componentes de la muestra o su procesamiento y pueden contribuir a prevenir la unión de los componentes de la muestra como proteínas a la superficie de las estructuras capilares. Por ejemplo, los detergentes de polisorbato como Tween 20 se pueden usar como detergente.

El término "medio o reactivo para la inhibición del deterioro de analitos o ingredientes de muestra" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que inhiben procesos como, por ejemplo, la coagulación de analitos biológicos o procesos de degradación. Típicamente, una matriz puede comprender anticoagulantes como Hirudina y/o Ticlopidina y/o inhibidores de DNasa y/o inhibidores de RNasa adecuados conocidos por el experto en la técnica.

Un "medio para lisar células", como se usa en el presente documento, indica reactivos que liberan activamente o lisan células. Los medios ejemplares para lisar células son agentes químicos como NaOH, NH<sub>4</sub>Cl o similares, detergentes como saponinas, Triton X114, sacarosamonolaureato, dodecilsulfato de sodio poliacrilamida (SDS), sales de N-laureil-sacrosina-sodio o similares; y enzimas tales como estreptolisina, hemolisina o similares. Por ejemplo, se pueden usar agentes de lisis como las saponinas que pueden ser más eficientes en la lisis de los glóbulos rojos que de los glóbulos blancos.

El resultado de la disolución al menos parcial de la matriz como se describe anteriormente en el presente documento puede ser una mezcla completa o al menos parcial de analitos o ingredientes de muestra con componentes de la matriz. Dicha mezcla puede estar lista para una evaluación posterior, por ejemplo, en un canal microfluídico o región de detección que está asociada con o en contacto con la estructura capilar o la estructura en forma de tubo que comprende la matriz como se define anteriormente en el presente documento. La mezcla puede formarse mediante fuerzas de flujo capilar presentes en la estructura capilar, o de forma alternativa o además, formarse mediante el uso de bombas o instalaciones similares en un dispositivo como se describe en el presente documento.

La matriz puede comprender componentes liofilizados, por ejemplo, puede ser un liofilizado de reactivos como se describe en el presente documento. El término "liofilizado" se refiere al producto final de un proceso de liofilización que se lleva a cabo a bajas temperaturas. Típicamente, la liofilización funciona congelando el material y a continuación, reduciendo la presión circundante y agregando suficiente calor para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente de la fase sólida al gas. El proceso de liofilización puede estar respaldado por la adición de lioprotectores que protegen la conservación de componentes de la matriz como, por ejemplo, proteínas, etiquetas, etc. Típicamente, se pueden usar lioprotectores como los compuestos polihidroxílicos tales como los azúcares (mono, di y polisacáridos), polialcoholes, y sus derivados, trehalosa o sacarosa. Durante el proceso de liofilización, se pueden usar otros compuestos que, por ejemplo, dan lugar a una congelación amorfa de los componentes de la matriz. Típicamente, una ciclodextrina o un derivado de la misma tal como hidroxipropil-gamma-ciclodextrina, por ejemplo, Cavasol W8-HP de Wacker Chemie (Alemania) se puede usar para dicho propósito.

El proceso de liofilización puede llevarse a cabo con un tubo o estructura capilar que comprende los componentes de la matriz. Por ejemplo, los componentes de la matriz pueden estar presentes como solución líquida o casi líquida antes de que comience el proceso de liofilización. Los parámetros usados para el proceso

de liofilización pueden influir en el carácter de tipo torta o amorfo o particulado de la matriz, la porosidad de la matriz, es decir, el tamaño de poro y/o la densidad de la matriz. Estos parámetros pueden ajustarse adecuadamente. Los detalles deberían ser conocidos por el experto en la técnica o pueden derivarse de Kennedy y Cabral (1993), "Recovery Processes for Biological Materials", John Wiley & Sons Ltd.

Además, la matriz puede ser al menos parcialmente porosa. El término "poroso" indica un material que comprende en su interior y/o en su superficie uno o más poros y/o aberturas. El uno o más poros internos y/o aberturas pueden estar interconectados. La porosidad de un material se define típicamente como un porcentaje del volumen total de sus huecos, es decir, los poros internos y las aberturas, disponibles para la transmisión de fluidos a su volumen total general.

El material poroso o matriz porosa puede tener un tamaño de poro, medido como el diámetro de poro. El tamaño de poro define la capacidad de las moléculas de analito para penetrar dentro de la matriz e interactuar con su superficie interior. La proporción de la superficie exterior de un material poroso en relación con su interior es típicamente, por ejemplo, aproximadamente 1:1000. Las interacciones moleculares superficiales se producen principalmente en la superficie interior de los materiales de la matriz.

Los procedimientos para evaluar el tamaño de poro son conocidos por un experto en la técnica.

Por ejemplo, una forma conveniente de evaluar los espacios internos de los poros en un material es el "procedimiento de saturación de agua". En resumen, un volumen conocido del material poroso que se va a analizar se incuba con un volumen conocido de agua durante un período de tiempo definido, por ejemplo, durante unas pocas horas, para garantizar que el material esté completamente saturado con agua. A continuación, se elimina el exceso de agua (es decir, "insaturada") y se mide su volumen. El volumen del espacio poroso puede calcularse posteriormente restando el volumen del exceso de agua del volumen total de agua usado originalmente para el análisis. La porosidad de la matriz se puede determinar calculando la proporción del volumen del espacio poroso, como se mide anteriormente, y el volumen total de la matriz y multiplicando el resultado obtenido por el 100 %.

De forma alternativa, la porosidad de un material se puede determinar mediante mediciones de adsorción de gas (volumen estático). El principio de este procedimiento se basa en la introducción de cantidades conocidas consecutivas de un adsorbato (es decir, un gas adsorbible) en el material de muestra a partir de alto vacío e incrementando etapa por etapa la presión hasta la presión de saturación del adsorbato. La adsorción del gas inyectado por la muestra hace que la presión disminuya lentamente hasta que se establezca una presión de equilibrio. La absorción de gas se puede calcular directamente a partir de los valores de presión de equilibrio, pero se debe realizar una calibración de volumen muerto antes o después de la medición mediante una "prueba en blanco" (es decir, un análisis que usa un gas inerte no adsorbido en la muestra en las condiciones analíticas, el más usado comúnmente es el helio). El procedimiento se detalla más, por ejemplo, en Groen, J. C. y col. (2003) Micropor. Mesopor. Mater. 60, 1-10.

Se puede emplear otro procedimiento conocido como "porometría de flujo capilar" para evaluar la porosidad de un material. El procedimiento se basa en un relleno espontáneo de material poroso con líquidos humectantes. Posteriormente, el gas presurizado se usa para eliminar líquidos de los poros para permitir el flujo de gas. Las tasas de presión y flujo a través de muestras húmedas y secas se pueden usar posteriormente para calcular las propiedades del material analizado.

Una matriz porosa como se describe en el presente documento puede tener una porosidad de al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 %.

Los poros de una matriz porosa como se describe en el presente documento pueden tener un diámetro de poro de aproximadamente 0,001 • m a aproximadamente 40 • m, de aproximadamente 0,01 • m a aproximadamente 10 • m o de aproximadamente 0,1 • m a 5 • m.

La estructura amorfa y/o particulada y/o tipo torta y/o la porosidad y/o el tamaño de poro de la matriz porosa, por ejemplo, se pueden ajustar de acuerdo con la naturaleza y los ingredientes de la muestra que se va a analizar en un dispositivo. Por ejemplo, la porosidad de una torta de sustancia puede incrementarse al incrementar la viscosidad de la muestra. Si se va a analizar, por ejemplo, una muestra que comprende células eucariotas completas, el tamaño de poro de una matriz se puede ajustar a un tamaño que tenga al menos el tamaño de una célula eucariota. Si se va a analizar, por otro lado, una muestra que comprende fagos o partículas virales, el tamaño de poro se puede ajustar al tamaño de los fagos o partículas virales, etc.

Como propiedad complementaria de la porosidad, una matriz porosa puede tener una densidad. Típicamente, la densidad general del material disminuye al incrementar la porosidad. Por ejemplo, una matriz porosa puede tener una densidad que se reduce en aproximadamente el 40 % al 70 % en comparación con la densidad del mismo material o un material similar que no tiene poros o aberturas.

La matriz se puede preparar liofilizando una solución que comprende dos tipos de anticuerpos marcados con diferentes etiquetas y que además comprende sustancias que aseguran la estabilidad de los anticuerpos. En un aspecto de la divulgación, una receta típica para dicha solución es:

Sustancia	Volumen/ • l
Anticuerpo anti-CD4 (por ejemplo, de Beckton Dickinson, EE. UU.), marcado con Ficoeritrina	0,075
Anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, de Beckton Dickinson, EE. UU.), marcado con Ficoeritrina-Cy5	0,10
Prionex (Polysciences, Eppelheim, Alemania)	0,25
Cavazol W8-HP, 40 % (Wacker Chemie GmbH, Alemania)	0,25
Tween 20, 1 % (Merck, Alemania)	0,05
Hirudina, 50 • g/ml (Sigma Aldrich, Alemania)	0,10
Ticlopidina, 5 mM (Sigma Aldrich, Alemania)	0,10

5

La solución puede filtrarse por centrifugación a través de poros de 0.2 • m durante 2 minutos para eliminar las partículas. Puede seguir una etapa de desgasificación de 1 minuto. Después de esto, la solución está lista para llenarse en un capilar o entrada capilar o región de entrada, por ejemplo, mediante pipeteo.

10 El llenado de un capilar o entrada capilar con una solución se puede hacer como sigue. La solución, por ejemplo, en una cantidad de p.e. 0,925 • l, se puede pipetear manualmente en un capilar de plástico que se puede recubrir con EDTA. Inmediatamente después, el capilar puede insertarse en nitrógeno líquido (por ejemplo, en un recipiente de espuma de plástico) para congelar el contenido rápidamente. El capilar puede mantenerse bajo nitrógeno líquido hasta que se pueda insertar en el liofilizador.

15

La liofilización de una entrada capilar o capilar para proporcionar la matriz se puede hacer como sigue. El capilar puede transferirse con el nitrógeno líquido a los canales de aluminio, y estos pueden colocarse en el liofilizador. Un ciclo de secado ejemplar comienza con 2 horas a -40 °C y una presión de 0,011 mbar. A continuación, puede seguir una etapa de secado adicional durante 1 hora a 20 °C y una presión de 0,001 mbar.

20

Al final del proceso de liofilización, los capilares pueden colocarse en capas sobre un medio de secado (por ejemplo, gel de sílice) y a continuación, distribuirse en pequeños recipientes para almacenamiento (por ejemplo, tubos de PCR o parte superior o inferior de una placa de Petri). Estos pueden guardarse en bolsas de aluminio selladas bajo protección de argón hasta su montaje en los cartuchos.

25

En otro aspecto de la divulgación, una receta típica para una solución que se puede liofilizar para preparar una matriz en una entrada capilar es:

Sustancia	Volumen/ • l
Anticuerpo anti-CD4 (por ejemplo, de Beckton Dickinson, EE. UU.), marcado con Ficoeritrina	0,056
Anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, de Beckton Dickinson, EE. UU.), marcado con Ficoeritrina-Cy5	0,075
Saponina, 15 g/100 ml (Sigma Aldrich, Alemania)	0,25
Trehalosa, 1 M (Sigma Aldrich, Alemania)	0,10
H <sub>2</sub> O	0,419

30 La solución puede filtrarse por centrifugación a través de poros de 0,45 um durante 2 minutos para eliminar las partículas. Después de esto, la solución está lista para llenarse en una entrada capilar, por ejemplo, mediante pipeteo. El llenado de los capilares y la liofilización de la solución para preparar la matriz se pueden realizar como se describe anteriormente.

35 Los procedimientos dirigidos a la introducción de muestras o analitos en canales microfluídicos y al análisis de la muestra o analitos, por ejemplo, mediante la formación de mezclas y/o complejos como se describe anteriormente o a continuación en el presente documento, pueden comprender interacciones de analitos con la matriz. La interacción puede ser, por ejemplo, parte de procedimientos llevados a cabo en dispositivos o sistemas de circuito abierto o cerrado. Dichos procedimientos pueden incluir todas las interacciones mencionadas anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, el analito o la muestra pueden disolver al menos parcialmente la matriz.

40

En otro aspecto, se proporcionan dispositivos o sistemas que comprenden o están asociados con elementos de control. Además, se proporcionan procedimientos usando dichos elementos de control o usando dispositivos o sistemas que comprenden o están asociados con dichos elementos de control.

45

El término "elemento de control" o "característica de control" se refiere a una unidad o factor o medio que permite probar, comprobar, examinar, escanear, revisar o inspeccionar un dispositivo o sistema o subunidad del dispositivo o sistema como se describe en el presente documento o de un resultado de prueba o un resultado del análisis y también a la posibilidad de comparar, verificar y contrastar los resultados obtenidos durante y/o después del uso de un dispositivo o sistema o durante y/o después de realizar los procedimientos descritos en el presente documento. El término también indica el desempeño de dichas actividades de control dentro de los procedimientos como se definen anteriormente o a continuación en el presente documento.

En consecuencia, el término "actividad de control" puede relacionarse con el empleo de pruebas internas o elementos o factores de control, que pueden estar presentes dentro del dispositivo o sistema y/o no deben agregarse externamente. En particular, dichos elementos de control internos pueden permitir una comprobación en tiempo real y/o *in situ* de parámetros sin necesidad de recurrir a controles externos, separados y/o con retardo de tiempo.

En un modo de realización, un dispositivo o sistema puede comprender analitos o análogos de analitos que se inmovilizan dentro del canal microfluídico. El término "análogos de analito" como se usa en el presente documento indica una entidad o compuesto o sustancia que tiene el mismo o esencialmente el mismo comportamiento de unión o reactividad, por ejemplo, afinidad de unión, que el analito que se va a examinar con respecto a una etiqueta o compuesto de sonda o molécula de captura que se usa para la detección del analito que se va a examinar. Los analitos o análogos de analitos que se inmovilizan dentro del canal microfluídico pueden ser partículas. El término "partícula" se refiere a una entidad física, química o biológica, que puede ser idéntica o similar a un analito que se va a examinar. Una partícula puede ser cualquier sustancia o material adecuado, por ejemplo, una sustancia inorgánica, una célula eucariota, una bacteria, un virus, una partícula similar a un virus o cualquier derivado de la misma. Por ejemplo, una partícula puede ser una célula, por ejemplo, una célula que muestra un antígeno específico, por ejemplo, el mismo antígeno que el analito que se va a examinar. Un análogo de analito puede ser una microesfera que muestra un antígeno específico, por ejemplo, el mismo antígeno que el analito que se va a examinar. El término "inmovilización" significa que la partícula se fija en el canal microfluídico, por ejemplo, por medios químicos o mecánicos de manera que al menos la estructura superficial, en particular la conformación e identidad de las proteínas superficiales, no se modifica o al menos todavía permite una interacción específica con restos de detección de unión como anticuerpos o ligandos. Dicha partícula inmovilizada, por ejemplo, una célula eucariota inmovilizada, célula T o monocito puede estar presente en el canal microfluídico en una cantidad o concentración predefinida y/o conocida y/o en una posición predefinida o conocida. La cantidad de dichas partículas, en particular células, puede ser mucho mayor que la cantidad de analitos comparables en la muestra que se va a examinar. Además, las partículas pueden concentrarse en un determinado punto o posición predefinida o conocida del canal microfluídico, lo que permite una verificación rápida y fácil de la interacción con los correspondientes interactuadores marcados. Las partículas se pueden usar posteriormente para una prueba de control con el objetivo de verificar los procesos de etiquetado como se define a continuación en el presente documento.

El término "actividad de control" también puede referirse a la prueba práctica del dispositivo o sistema, por ejemplo, en términos de mal funcionamiento de todo el dispositivo o sistema o subpartes o elementos del mismo. Por ejemplo, diversos elementos de control del dispositivo del sistema se pueden abordar y verificar por separado.

En un aspecto de la divulgación, dicho control puede implicar la prueba de reacciones de etiquetado y/o la presencia de células en una muestra que se va a analizar con la ayuda de partículas inmovilizadas, por ejemplo, células inmovilizadas, como se define anteriormente en el presente documento. Las partículas pueden marcarse o tratarse con etiquetas similares o idénticas a los analitos que se van a detectar o examinar. Debido a la posición conocida y al número de partículas inmovilizadas, se puede verificar si la reacción de etiquetado fue exitosa. La presencia de una etiqueta puede probarse con la ayuda de instrumentos o sensores de medición químicos, ópticos o electrónicos apropiados, como es conocido por el experto en la técnica.

Si la prueba da como resultado una falta de, por ejemplo, emisiones de fluorescencia o una reducción del valor de emisión en comparación con un valor conocido predefinido después de una obtención apropiada, se puede concluir que el proceso de etiquetado no fue exitoso. En consecuencia, el dispositivo se puede detener y/o la(s) prueba(s) y/o la(s) imagen o imágenes se pueden marcar como no válidas.

Si, por otra parte, el resultado de la prueba es una señal detectable, en particular, válida de las partículas inmovilizadas, mientras que el analito y/o la muestra tratados conjuntamente no proporcionan ninguna señal, se puede concluir que el analito y/o la muestra no comprende estructuras que hubieran permitido una interacción con la etiqueta, por ejemplo, un anticuerpo marcado. Por ejemplo, si se usa un anticuerpo marcado anti-CD4 o anti-CD3, la falta de señal de emisión de la muestra, aunque las partículas inmovilizadas, por ejemplo, las células T inmovilizadas, proporcionen una señal, puede verse como una indicación del hecho de que no hay células o componentes que contengan CD4 y/o CD3 presentes en la muestra que se va a examinar.

En algunos aspectos de las divulgaciones, las partículas inmovilizadas se pueden concentrar en un determinado punto o posición predefinida o conocida del canal microfluídico. Dicha concentración de las partículas puede dar lugar a una señal de emisión fuertemente aumentada. Debido al aumento de la intensidad de la señal y su concentración en comparación con una señal derivable de un analito individual, por ejemplo, una célula, no habrá superposición de las señales derivables de las partículas inmovilizadas y los analitos examinados.

En algunos aspectos de la divulgación, un procedimiento comprende etiquetar partículas inmovilizadas en el canal microfluídico de un dispositivo o sistema con una etiqueta óptica o reactivo de etiquetado; obtener una primera imagen que comprende al menos un subconjunto de las partículas inmovilizadas; determinar un primer valor indicativo del número de partículas, por ejemplo, las partículas marcadas ópticamente, en la primera imagen; obtener una imagen adicional del subconjunto de partículas inmovilizadas después de un intervalo; determinar un valor adicional indicativo del número de partículas, por ejemplo, las partículas marcadas ópticamente, en la imagen adicional; y determinar un tercer valor indicativo de la actividad y/o calidad de la etiqueta óptica o reactivo de etiquetado y/o la calidad de una interacción entre una partícula y un reactivo de etiquetado y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función, prueba o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema y/o la precisión de un resultado de prueba obtenido mediante el uso de dicho dispositivo o sistema, en base a una comparación del primer valor y el valor adicional. Dicho procedimiento se puede usar como un control positivo para un dispositivo o sistema, proporcionando información sobre la calidad de las sustancias reactivas y permitiendo una conclusión sobre la exactitud y la calidad de los resultados del ensayo obtenidos con las sustancias reactivas, como se menciona anteriormente o a continuación en el presente documento.

En algunos aspectos de la divulgación, un procedimiento comprende poner en contacto partículas inmovilizadas dentro de un canal microfluídico de una red, dispositivo o sistema microfluídico con una etiqueta óptica configurada para unir las partículas; formar complejos, comprendiendo cada uno de los complejos una etiqueta óptica y una partícula inmovilizada dentro del canal microfluídico; obtener una primera imagen que comprende al menos un subconjunto de los complejos inmovilizados; determinar un primer valor indicativo del número de complejos en la primera imagen; obtener una imagen adicional del subconjunto de complejos inmovilizados después de un intervalo; determinar un valor adicional indicativo del número de complejos en la imagen adicional; y determinar un tercer valor indicativo de la actividad y/o calidad del reactivo de etiquetado y/o la calidad de una interacción entre una partícula y un reactivo de etiquetado y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función, prueba o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema y/o la exactitud de un resultado de prueba obtenido usando dicho dispositivo o sistema, en base a una comparación del primer valor y el valor adicional.

En aspectos específicos de la divulgación, las partículas que se van a usar en estos procedimientos se han definido anteriormente en el presente documento. Estas partículas pueden marcarse o tratarse con etiquetas similares o idénticas a los analitos que pueden detectarse o examinarse como se describe anteriormente o a continuación en el presente documento, por ejemplo, con reactivos de etiquetado que comprenden o consisten en tintes, ligandos, anticuerpos o cualquier otra entidad adecuada conocida por el experto en la técnica. En consecuencia, los ligandos o anticuerpos pueden marcarse con tintes, por ejemplo, tintes fluorescentes o conjugarse con etiquetas fluorescentes o tintes como se menciona anteriormente en el presente documento o es conocido por el experto en la técnica. Las partículas pueden inmovilizarse de acuerdo con los protocolos como se menciona anteriormente en el presente documento. Se puede llevar a cabo una reacción de marcado en partículas inmovilizadas o se pueden inmovilizar partículas ya marcadas en un canal microfluídico.

En aspectos específicos de la divulgación, se determina un primer valor y un valor adicional indicativo del número de partículas detectadas en el punto o posición predefinidos. Para esto, se puede obtener una primera imagen que comprende al menos un subconjunto de las partículas inmovilizadas en un período de tiempo de entre aproximadamente 0,01 segundos a 10 minutos después de que se inicia la reacción de etiquetado, por ejemplo, después de 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 1 minuto o 1,5 minutos. El período de tiempo entre el inicio de la reacción de etiquetado y la obtención de una primera imagen puede depender de parámetros conocidos por el experto en la técnica, tales como la naturaleza de la reacción de etiquetado, por ejemplo, la química involucrada en el etiquetado, las etiquetas usadas, la velocidad de la reacción de etiquetado, etc. La obtención de una primera imagen también se puede combinar, en otros aspectos de la divulgación, con los procedimientos definidos en el presente documento que implican la determinación de parámetros ópticos como el enfoque, el área de la imagen, el tiempo de exposición, etc. Típicamente, dicho procedimiento que implica la determinación de parámetros ópticos se puede llevar a cabo antes de obtener una primera imagen. Los parámetros como la distancia, el enfoque, el área predefinida, el tiempo de exposición, etc., que se definieron y ajustaron de acuerdo con un procedimiento como se describe en el presente documento, pueden mantenerse una vez que se obtiene una primera imagen. Un "subconjunto de las partículas inmovilizadas" puede ser cualquier subconjunto adecuado de partículas inmovilizadas, por ejemplo, más del 0,01 %, más del 0,1 %, más del 1 %, más del 2, 3, 5, 10, 20, 50 % o una proporción del 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 7 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o esencialmente todas las partículas inmovilizadas en un canal microfluídico de un dispositivo o sistema. De forma adicional o alternativa, el procedimiento puede combinarse con un procedimiento que permita decidir sobre el estado de llenado de un

canal microfluídico como se describe en el presente documento.

Después de un intervalo, se puede obtener una imagen adicional del subconjunto de partículas inmovilizadas. El término "intervalo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier período de tiempo adecuado, por ejemplo, un período de tiempo de entre aproximadamente 1 segundo y 5 horas, 5 segundos y 3 horas, 7 segundos y 1 hora, 10 segundos y 30 minutos, 20 segundos y 20 minutos, 1 minuto y 15 minutos, 5 minutos y 10 minutos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 minutos. El intervalo que se va a usar puede depender de la prueba, dispositivo o sistema usado, la naturaleza y la forma del canal microfluídico, la naturaleza de la reacción de etiquetado, la temperatura ambiente, el pH en el canal microfluídico, la naturaleza y la forma de la partícula. etc. Dependiendo de estos parámetros, el intervalo se puede ajustar o cambiar si es necesario.

En base a la imagen adicional del subconjunto de partículas inmovilizadas, se puede determinar un valor adicional indicativo del número de partículas en la imagen adicional. La etapa de obtener una imagen adicional y de determinar el número de partículas en dicha imagen adicional se puede repetir varias veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 15, 20 o n veces, en la que n es cualquier número entero > 2. Si se obtiene más de una imagen adicional y, en consecuencia, se determina más de un valor adicional indicativo del número de partículas en la imagen adicional, se puede emplear cualquiera o cualquier subgrupo o combinación de imágenes o valores adicionales indicativos del número de partículas para análisis adicionales. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una evaluación estadística de estos valores o se puede calcular un valor promedio.

En una etapa adicional, se puede determinar un tercer valor indicativo de la actividad de la etiqueta óptica o reactivos de etiquetado y/o la calidad de la etiqueta óptica o del reactivo de etiquetado y/o la calidad de una interacción entre una partícula y un reactivo de etiquetado y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema. Esta determinación se basa en una comparación del primer valor indicativo del número de partículas obtenidas después de la finalización de la reacción de etiquetado y uno o más valores adicionales indicativos del número de partículas en la una o más imágenes adicionales obtenidas. Esta comparación permite usar, en particular, el etiquetado o la cinética de tinción de las partículas para acceder a información sobre la actividad y/o la calidad del (de los) reactivo(s) de etiquetado y/o la calidad de la interacción entre una partícula y el (los) reactivo(s) de etiquetado(s), es decir, el funcionamiento de la reacción de etiquetado en general y, por tanto, la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema. Debido al aumento en el tiempo de incubación en el intervalo entre la primera imagen y la una o más imágenes adicionales, se puede suponer que hay más partículas marcadas o detectables que antes.

Como umbral de calidad para llevar a cabo reacciones de etiquetado, por ejemplo, el etiquetado de células con marcadores de fluorescencia o tintes, el tercer valor puede ser un aumento del valor adicional con respecto al primer valor en al menos aproximadamente el 10 %, en al menos aproximadamente el 20 %, en al menos aproximadamente el 25 %, en al menos aproximadamente el 30 %, en al menos aproximadamente el 35 %, en al menos aproximadamente el 40 % o en al menos aproximadamente el 50 %. Por tanto, si el tercer valor puede estar dentro del intervalo indicado, se puede considerar que el dispositivo o sistema se puede usar y/o se puede confirmar cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en el dispositivo o sistema. Si se lleva a cabo un ensayo concomitante, los resultados correspondientes pueden registrarse y/o procesarse además de acuerdo con los detalles de los ensayos como se describe anteriormente o a continuación en el presente documento.

Por el contrario, si el tercer valor es un aumento del valor adicional con respecto al primer valor de menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 25 %, menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 35 %, menos de aproximadamente el 40 % o menos de aproximadamente el 50 %, la prueba puede considerarse inexacta.

Solo la información relacionada con el número de células detectadas en la primera imagen y las imágenes adicionales se almacena o procesa para su posterior análisis.

Las células  $T_H$  inmovilizadas (es decir, células T auxiliares) se pueden usar como controles positivos para evaluar la función de los diferentes reactivos usados en el ensayo. Las células  $T_H$  inmovilizadas se pueden incluir en una fracción de células mononucleares (CMN) inmovilizadas. Dichas células mononucleares se pueden obtener, por ejemplo, de una muestra de sangre completa usando una etapa de centrifugación por gradiente de densidad. Las células  $T_H$  para inmovilización se pueden obtener, por ejemplo, de un cultivo celular *in vitro*.

A continuación, se describe un protocolo típico para preparar células  $T_H$  de una muestra de sangre completa.

Se pueden llenar cuatro mililitros de Histopaque-1077 (Sigma Aldrich) en tubos de centrifugación, calentar a 18-20 °C y cubrir con 4 ml de una muestra de sangre completa con EDTA. Los tubos de centrifugación se pueden colocar en una centrífuga y centrifugar 30 minutos a 400 g a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, la capa superior puede descartarse y la fracción que contiene las células mononucleares puede transferirse a un nuevo tubo de reacción. Para el lavado, las células se pueden volver a suspender en PBS,

seguido de una etapa de centrifugación durante 10 minutos a 250 g. El sobrenadante se puede eliminar y el sedimento se puede volver a suspender en PBS. El lavado puede repetirse una o varias veces.

5 El número de células en la solución puede ajustarse para el siguiente procedimiento de observación. Para este propósito, se puede realizar un procedimiento típico de recuento de células, usando, por ejemplo, un Beckton Dickinson FACSCalibur, de acuerdo con las instrucciones del fabricante del dispositivo. Para inmovilizar las celdas, el número de celdas se puede ajustar a un número de 2.000/• l a 20.000/• l, de 5.000/• l a 15.000/• l o de 7.500/• l a 12.500/• l o aproximadamente 10.000/• l.

10 La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se puede usar para ajustar el número de células al valor deseado.

15 Las células pueden inmovilizarse por medio del manchado en la superficie. Dicha solución de manchado puede prepararse volviendo a suspender células en PBS, por ejemplo, en una concentración de alrededor de 10.000 células por • l.

20 Una o más gotas de la solución de manchado pueden transferirse a una superficie, por ejemplo, en el fondo de la región de detección de un dispositivo como se describe en el presente documento. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 o más puntos se observan en la superficie. Se pueden transferir a la superficie 1, 2 o 3 gotas de una suspensión celular de 100 ml. Además, las gotas pueden observarse directamente adyacentes entre sí, por ejemplo, de tal manera que fluyan juntas después de la detección.

25 La superficie para detectar controles positivos como las células T auxiliares se puede tratar antes de la detección. Por ejemplo, el tratamiento con plasma de la superficie puede afectar la hidrofobicidad de la superficie. Se puede usar una superficie hidrófila para la detección.

El secado de las células detectadas puede tener lugar en condiciones ambientales.

30 De forma adicional o alternativa, se pueden usar otros procedimientos para inmovilizar células como los descritos en el documento US 6.008.052. Por ejemplo, una célula de mamífero seca se puede usar como partícula de referencia en un inmunoensayo cuyas propiedades de dispersión de luz no se alteran sustancialmente con la rehidratación y cuya autofluorescencia no aumenta con el tiempo en el que la célula se ha fijado con un fijador, se ha reducido con un agente reductor de base de Schiff y a continuación se ha secado en presencia de un compuesto estabilizador de proteínas.

35 Un control adicional puede implicar la verificación de la detección, por ejemplo, la plausibilidad del recuento celular en el dispositivo o sistema de evaluación. La prueba puede basarse en la detección de la presencia de determinados analitos diana, por ejemplo, linfocitos T. Por ejemplo, se puede verificar si el número de células T es mayor que el número de monocitos (es decir, la cantidad de marcadores detectables CD3+ CD4+ y CD3+ CD4- debe ser elevada en comparación con CD3-CD4+). La prueba se puede realizar preferentemente después de que se haya completado con éxito una verificación de la reacción de etiquetado como se define anteriormente en el presente documento. La verificación se puede llevar a cabo, por ejemplo, con la ayuda de reactivos de marcadores o etiquetas químicos o bioquímicos apropiados y sensores ópticos y/o electrónicos, así como aplicaciones de programas informáticos adecuados conocidas por el experto en la técnica. La prueba se puede realizar después de que se haya llevado a cabo una reacción de etiqueta como se describe anteriormente o a continuación en el presente documento. Si el resultado de la prueba es un número impreciso o no válido de analitos diana, por ejemplo, linfocitos T, el uso del dispositivo se puede detener y / o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas.

50 Un dispositivo o sistema como se describe en el presente documento puede incluir además diversos elementos o componentes o módulos técnicos tal como motores, fuentes de luz como LED, interfaces, procesadores, unidades de almacenamiento de datos, sistemas ópticos, lectores de códigos de barras o de matrices de datos, fuentes de alimentación internas o externas, bombas, actuadores, componentes electrónicos, etc. Los controles pueden estar dirigidos a la prueba de los diversos elementos o módulos técnicos.

55 Un control puede dirigirse a la prueba del dispositivo con respecto a un sistema, una unidad de escaneo o una unidad de detección, es decir, verificar si el dispositivo está insertado apropiadamente o dentro de un sistema o asociado apropiadamente con una unidad de escaneo o detección. Esta etapa de control puede llevarse a cabo antes y/o durante un ensayo. Por ejemplo, si la etapa de control se lleva a cabo antes de que comience el ensayo y se detecta un dispositivo en el sistema o se asocia con una unidad de escaneo o detección, se puede iniciar un rechazo del dispositivo. Si, por otra parte, la etapa de control se lleva a cabo después de que haya comenzado el ensayo y no se detecta ningún dispositivo en el sistema o se asocia con el escáner, se le puede solicitar al usuario que inserte el dispositivo.

65 Se puede dirigir un control a la prueba de un motor del sistema o asociarse con el dispositivo como se describe en el presente documento. Se puede llevar a cabo una verificación del motor. En este contexto, se puede

- 5 verificar una posición de referencia probando el movimiento de los interruptores finales a las posiciones de referencia del eje. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores mecánicos, ópticos o eléctricos/electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica, lo cual permite medir los movimientos. Si la prueba da como resultado un posicionamiento inexacto, se puede detener el uso del dispositivo.
- 10 Además, se puede llevar a cabo un control de movimiento del motor probando el buen funcionamiento de todos los ejes del dispositivo o sistema. En particular, se puede controlar el buen funcionamiento de la bandeja y la bobina. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores mecánicos, ópticos o eléctricos/electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica, lo cual permite medir los movimientos y/o la velocidad de los elementos del sistema, en particular de la bandeja y la bobina. Si la prueba da como resultado un comportamiento de movimiento inexacto o una velocidad inexacta de estos elementos, se puede detener el uso del dispositivo.
- 15 Un control adicional puede implicar la verificación de la sobrecarga eléctrica del motor. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado conocido por el experto en la técnica. La sobrecarga eléctrica del motor también se puede verificar por medio de la funcionalidad de un fusible del motor. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado conocido por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una carga o sobrecarga
- 20 inexacta, se puede detener el uso del dispositivo.
- 25 Un control adicional puede implicar la verificación de las corrientes de LED. En particular, puede controlarse la intensidad de luz emitida. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de sensores mecánicos, ópticos o eléctricos/electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica, lo cual permite medir la corriente de LED. Los valores medidos pueden compararse con valores de referencia predefinidos. Si la prueba da como resultado corrientes de LED inexactas o intensidades de luz incorrectas, se puede detener el uso del dispositivo.
- 30 Un control adicional puede implicar la verificación de las posiciones y la capacidad de cambio del elemento de filtro evaluando el centrado de los elementos de filtro a lo largo del eje óptico. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de sensores mecánicos, ópticos o eléctricos/electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado un posicionamiento o capacidad de cambio del filtro inexacto, se puede detener el uso del dispositivo.
- 35 Un control adicional puede implicar la verificación de elementos de hardware y/o el dispositivo mediante la evaluación de los bits de inicio y parada. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado conocido por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una presencia inexacta de bits de inicio o parada, se puede detener el uso del dispositivo.
- 40 Un control adicional puede implicar la verificación de códigos de barras en un dispositivo mediante la evaluación de los valores de paridad. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con sensores ópticos y/o eléctricos/electrónicos apropiados tal como los conoce el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una paridad inexacta, el dispositivo no se puede leer y se puede detener.
- 45 Un control adicional puede implicar la verificación del voltaje de la fuente de alimentación. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de sensores eléctricos o electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una fuente de alimentación inexacta, el sistema no puede iniciarse y el uso del dispositivo puede detenerse.
- 50 Un control adicional puede implicar la verificación de la carga de la batería o el acumulador, en particular la carga mínima de la batería o el acumulador. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de sensores eléctricos o electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una carga de batería o acumulador inexacta, el sistema o dispositivo no puede iniciarse con una batería y el uso del dispositivo puede detenerse. De forma alternativa, se le puede solicitar al usuario que recargue la batería o el acumulador o que los reemplace.
- 55 Un control adicional puede implicar la verificación del llenado de extremo a extremo de un capilar, por ejemplo, un control para determinar si se llena al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de un capilar. Se puede probar el llenado con 5 • l de sangre. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores ópticos, eléctricos o electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica. La prueba puede llevarse a cabo usando una barrera de luz o similares. Si la prueba da como resultado un estado de llenado inexacto, el dispositivo no se puede usar y puede aparecer un mensaje de error.
- 60 Un control adicional puede implicar el establecimiento de la conexión de la base de datos del sistema. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas electrónicas o de software apropiadas, tal como las conoce el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una conexión de base de datos inexacta o defectuosa, el
- 65

sistema no se puede iniciar y/o el dispositivo no se puede usar y puede aparecer un mensaje de error.

5 Un control adicional puede implicar la prueba del estado de la conexión. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas electrónicas o de software apropiadas como las conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado un estado de conexión inexacto o defectuoso, el sistema no se puede iniciar y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

10 Un control adicional puede implicar la prueba del estado de conexión de un módulo de detección. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas electrónicas o de software apropiadas como las conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado un estado de conexión de módulo generador de imágenes inexacto, el sistema no se puede iniciar y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

15 Un control adicional puede implicar la prueba de un movimiento de la bandeja a la posición de carga. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores eléctricos, ópticos o electrónicos apropiados conocidos por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado un movimiento inexacto o una localización imprecisa de la bandeja con respecto a la posición de carga, el sistema no puede iniciarse y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

20 Un control adicional puede implicar la prueba del rendimiento de visualización. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas electrónicas o de software apropiadas como las conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado un error de visualización, el sistema no se puede iniciar y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

25 Un control adicional puede implicar la prueba de comunicación entre la aplicación del sistema y una cámara. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas electrónicas o de software apropiadas como las conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una conexión incorrecta o defectuosa entre la aplicación del sistema y la cámara, el sistema no se puede iniciar y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

30 Un control adicional puede implicar la prueba de la funcionalidad de los botones de entrada del sistema. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores eléctricos, electrónicos u ópticos apropiados conocidos por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una función de botón de entrada incorrecta, el sistema no se puede iniciar y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

35 Un control adicional puede implicar la prueba de la funcionalidad de la configuración de guardado. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas de software apropiadas conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado un guardado imposible de la configuración, el sistema puede iniciarse y/o el rendimiento de un ensayo puede continuar y/o puede aparecer un mensaje de error.

40 Un control adicional puede implicar la prueba de la visualización de los resultados disponibles. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas de software apropiadas conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado problemas para mostrar un resultado de análisis, el sistema puede iniciarse y/o el rendimiento de un ensayo puede continuar y/o puede aparecer un mensaje de error.

45 Un control adicional puede implicar la prueba de la visualización de los resultados disponibles. La prueba puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas de software apropiadas conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado problemas para la visualización de resultados, el sistema puede iniciarse y/o el rendimiento de un ensayo puede continuar y/o puede aparecer un mensaje de error.

50 Un control adicional puede implicar la verificación de la eliminación de datos. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas de software apropiadas conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado problemas con la eliminación de datos, el sistema puede iniciarse y/o el rendimiento de un ensayo puede continuar y/o puede aparecer un mensaje de error.

55 Un control adicional puede implicar la verificación de la edición de datos. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas de software apropiadas conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado problemas con la edición de datos, el sistema puede iniciarse y/o el rendimiento de un ensayo puede continuar y/o puede aparecer un mensaje de error.

60 Un control adicional puede implicar la verificación del tipo y/o versión del dispositivo y/o su compatibilidad con el sistema. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores electrónicos u ópticos o herramientas de software apropiados conocidos por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una incompatibilidad, en particular la imposibilidad de analizar el dispositivo con el software instalado, el sistema no puede iniciarse y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

65

5 Un control adicional puede implicar la verificación de los datos de caducidad codificados, por ejemplo, en el código de barras del dispositivo con respecto a los datos proporcionados en el sistema. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores electrónicos u ópticas o herramientas de software apropiados conocidos por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado la caducidad del dispositivo, el sistema no se puede iniciar y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

10 Un control adicional puede implicar la verificación del uso repetido del dispositivo. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores electrónicos u ópticas o herramientas de software apropiados conocidos por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado un uso previo del dispositivo, el sistema no se puede iniciar y/o el dispositivo no se puede usar y/o puede aparecer un mensaje de error.

15 Un control adicional puede implicar la verificación de la comunicación o conexión entre la aplicación del sistema y una placa controladora. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas electrónicas o de software apropiadas conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado en una comunicación o conexión inexacta entre la aplicación del sistema y una placa controladora, el sistema no puede iniciarse y/o el dispositivo no puede usarse y/o puede aparecer un mensaje de error.

20 Un control adicional puede implicar la verificación de la capacidad de almacenamiento, en particular la capacidad de almacenamiento mínima en el sistema de evaluación del dispositivo. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado conocido por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una capacidad de almacenamiento inexacta o insuficiente, se le puede solicitar al usuario que elimine los archivos del sistema y/o puede detenerse el dispositivo.

25 Un control adicional puede implicar la verificación de la plausibilidad de la fecha en el sistema de evaluación del dispositivo. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado conocido por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una fecha inexacta o una fecha anterior a la fecha de la última actualización de software, se le puede solicitar al usuario que verifique el sistema y/o que ingrese la fecha y hora actuales y/o se puede detener el dispositivo.

30 Un control adicional puede implicar la verificación de la temperatura del dispositivo. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de instrumentos de medición de temperatura físicos o electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una temperatura inexacta, se le puede solicitar al usuario que apague el dispositivo o puede detenerse el dispositivo.

35 Un control adicional puede implicar la verificación del contacto de una bomba de tubo de presión ajustando el rodillo de la bomba de tubo para asegurar que el tubo se aprieta con una fuerza definida. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de sensores mecánicos, ópticos o eléctricos/electrónicos apropiados, tal como los conoce el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado una función inexacta de la bomba de tubo de presión, el dispositivo se puede detener y/o la(s) prueba(s) se puede(n) marcar como no válida(s).

40 Un control adicional puede implicar la validación de la homogeneidad de la imagen en una posición de control de exposición. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas estadísticas o de software apropiadas conocidas por el experto en la técnica en base a un análisis de un histograma o una limitación de la anchura del histograma. Si la prueba da como resultado una homogeneidad inexacta de la imagen en una posición de control de exposición, los resultados del ensayo pueden indicarse como no válidos y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

45 Un control adicional puede implicar la validación de la localización y/o estabilidad del eje óptico y/o correspondencias rojo-verde. La validación puede llevarse a cabo comparando correspondencias en imágenes de microesferas como se describe anteriormente en el presente documento con correspondencias calibradas. La localización y/o la estabilidad del eje óptico y/o las correspondencias rojo-verde pueden considerarse válidas si la comparación produce un desplazamiento de entre aproximadamente 0 y 20 píxeles, por ejemplo, 10 o 5 píxeles. Si la validación da como resultado una localización y/o estabilidad no válidas del eje óptico y/o correspondencias rojo-verdes no válidas, los resultados del ensayo pueden indicarse como no válidos y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

50 Un control adicional puede implicar la prueba del movimiento de partículas en un canal microfluídico, por ejemplo, el movimiento de células tales como glóbulos sanguíneos en el canal microfluídico. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de sensores eléctricos, electrónicos u ópticos apropiados conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, para realizar el control, se puede tomar una primera imagen y, después de un intervalo predefinido, se puede tomar una imagen adicional, estando el intervalo entre aproximadamente 0,1 segundos y 2 minutos, por ejemplo, 0,3 segundos. Ambas imágenes pueden compararse posteriormente y el movimiento de partículas puede determinarse en píxeles o píxeles por unidad de tiempo, por ejemplo, píxeles por segundo. Un movimiento de partículas en el canal microfluídico puede considerarse aceptable si la comparación produce un desplazamiento de no más de 20 píxeles por segundo, por ejemplo, 20 píxeles por segundo, 15 píxeles por segundo, 10 píxeles por segundo, 5 píxeles por segundo, 3 píxeles por segundo para la misma

partícula en ambas imágenes. Si la comparación da como resultado un movimiento celular más allá de los valores umbral, los resultados del ensayo pueden indicarse como no válidos y/o puede iniciarse una repetición del ensayo. Un control puede implicar la verificación del enfoque de la unidad de escaneo de un dispositivo o sistema como se describe en el presente documento mediante la detección de microesferas ópticamente distinguibles presentes en el canal microfluídico.

El término "microesfera" indica una entidad física química o biológica. Las microesferas típicas pueden ser microesferas de látex o poliestireno. Dicha microesfera puede, por ejemplo, comprender un antígeno específico, típicamente en su superficie. La microesfera puede etiquetarse además como se describe anteriormente en el presente documento, por ejemplo, con etiquetas de fluorescencia. Una microesfera ópticamente detectable es una microesfera que se distingue de su entorno. La microesfera puede, por ejemplo, etiquetarse, por ejemplo, con un tinte, un tinte acoplado o cualquier otra entidad distintiva apropiada o comprender otras características distintivas ópticas, por ejemplo, un comportamiento diferente de reflexión, absorción, excitación o fluorescencia, etc.

Las microesferas pueden inmovilizarse en el canal microfluídico mediante unión química o mecánica a la superficie del canal. Por ejemplo, las microesferas pueden unirse mediante unión química covalente a la superficie del canal o mediante el uso de interacción mecánica debido a unidades de enclavamiento. Las microesferas pueden no ser móviles o extraíbles por el flujo de líquido a través del canal. Las microesferas pueden etiquetarse con una etiqueta fluorescente como se define anteriormente en el presente documento. Las microesferas pueden tener cualquier forma adecuada o ser de cualquier tipo adecuado conocido por el experto en la técnica. Ejemplos de dichas microesferas son microesferas de látex etiquetadas con un tinte fluorescente. La etiqueta usada para el etiquetado de las microesferas puede ser la misma etiqueta usada para el etiquetado de compuestos que pueden unirse a analitos o muestras como se describe en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos o ligandos, etc., como se define anteriormente en el presente documento, o de forma alternativa una etiqueta diferente. La longitud de onda emitida después de la excitación puede ser idéntica o diferente en comparación con la longitud de onda emitida por etiquetas asociadas o vinculantes a los analitos o muestras que se van a examinar. La luz emitida puede ser más fuerte que la luz emitida por las etiquetas asociadas o unidas a analitos o muestras que se van a examinar. La luz emitida puede detectarse en consecuencia en base a un tiempo de exposición más corto. El número y la localización de las microesferas y la intensidad de emisión de luz de las microesferas pueden ser conocidos y/o predefinidos. Al comparar estos parámetros o al comparar estos parámetros con un valor predefinido o umbral después de que se haya completado un proceso de enfoque automático, se puede verificar si la unidad de escaneo está enfocada. Si la prueba da como resultado un enfoque inexacto de la unidad de escaneo, el dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

En algunos aspectos de la divulgación, el procedimiento comprende verificar el enfoque de una unidad de detección de un sistema o asociado con un dispositivo, en el que dicho sistema o dispositivo comprende una o más partículas ópticamente detectables o microesferas que se inmovilizan dentro de un canal microfluídico, y ajustar el enfoque si es necesario; ajustar el tiempo de exposición para la unidad de detección; detectar ópticamente la una o más partículas o microesferas en un área predefinida del canal microfluídico; determinar un primer valor indicativo del número de partículas en dicha área; y determinar un segundo valor indicativo de la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a una comparación del primer valor con un valor umbral.

La verificación del enfoque de una unidad de detección es típicamente una comparación de uno o más parámetros con un umbral adecuado o valores predefinidos. Dichos parámetros son la conversión de luz desde puntos de objeto. Dicha conversión puede, por ejemplo, determinarse por criterios de círculo de confusión conocidos por el experto en la técnica. En consecuencia, un punto de objeto o de imagen puede considerarse enfocado si la luz converge casi tanto como sea posible en base a los criterios del círculo de confusión. Si no se cumplen estos criterios, se puede ajustar el enfoque. Esto puede hacerse automáticamente, por ejemplo, con la ayuda de dispositivos electrónicos o mecánicos, típicamente en forma de enfoque automático en un objeto. Las técnicas, dispositivos o procedimientos de cálculo adecuados, etc., son conocidos por el experto en la técnica. De forma alternativa, el enfoque puede ajustarse manualmente. Una unidad de detección puede estar comprendida en un sistema, por ejemplo, un sistema para realizar ensayos tales como ensayos biológicos, médicos, químicos, bioquímicos, recuento celular, etc., o puede estar asociado con un dispositivo en el que los ensayos pueden realizarse tales como ensayos biológicos médicos, químicos, bioquímicos, recuento celular, etc. La unidad de detección puede estar comprendida en un sistema como se menciona anteriormente en el presente documento. Además, la unidad de detección puede estar asociada con un dispositivo como se menciona anteriormente en el presente documento.

El tiempo de exposición para la unidad de detección puede ajustarse de acuerdo con la cantidad e intensidad de luz que llega a la unidad de detección, por ejemplo, en reacción a la profundidad del campo de imagen, el intervalo de distancia sobre el cual los objetos son aceptablemente nítidos o enfocados o cualquier otro parámetro adecuado conocido por el experto en la técnica. El ajuste puede llevarse a cabo automáticamente, por ejemplo, con la ayuda de dispositivos electrónicos o mecánicos, típicamente en forma de una comparación

automática con una tabla de búsqueda. El experto en la técnica conoce técnicas, dispositivos, tablas de búsqueda para valores de umbral adecuados, etc. De forma alternativa, el tiempo de exposición puede ajustarse manualmente.

5 En algunos aspectos de la divulgación, un valor indicativo del número de partículas o microesferas puede compararse con un valor umbral o tabla de búsqueda. Si, por ejemplo, el número indicativo de microesferas o partículas es cero, es decir, no se detecta ninguna microesfera o partícula, el dispositivo o sistema y/o cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho sistema de dispositivo puede considerarse como no funcional. De forma alternativa, si, por ejemplo, el valor indicativo del número de microesferas o partículas es  
10 mucho mayor que el valor predefinido o el valor umbral, por ejemplo, mayor que 100.000, es decir, hay muchas microesferas o partículas detectables, el dispositivo o sistema y/o cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho sistema de dispositivo también puede considerarse como no funcional. De lo contrario, es decir, si el valor está dentro de un intervalo de umbral, por ejemplo, como se indica anteriormente, el dispositivo o sistema y/o cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho sistema de dispositivo también puede considerarse como funcional y/o confirmarse.

Si se advierte una situación de no funcionalidad en este contexto, el uso del dispositivo o sistema puede interrumpirse y/o cualquier resultado obtenido puede descartarse. La información correspondiente puede registrarse electrónicamente o codificarse en un código de barras o cualquier otro material de codificación  
20 adecuado. Dicho código de barras puede, por ejemplo, estar unido a un dispositivo o canal microfluídico.

De forma adicional o alternativa, advertir una situación de no funcionalidad puede dar lugar a una o más reacciones de ajuste. Las reacciones de ajuste pueden determinarse en reacción al valor numérico indicativo del número de partículas. Si, por ejemplo, no se detectan microesferas o partículas, el enfoque del sistema de  
25 detección puede ajustarse o ajustarse aún más si ya se ajustó antes. El ajuste se puede lograr mediante una variación de la distancia entre el sistema de detección y el canal microfluídico que comprende las partículas, por ejemplo, usando incrementos de 0,01, 0,05, 0,5, 0,75, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50 o 100 • m o cualquier otro incremento adecuado que pueda depender de la naturaleza, el tamaño y la forma de la unidad de detección usada. Dicha modificación puede reiterarse una o varias veces, seguida o precedida por las etapas de procedimiento como se describe en el presente documento. Además, el tiempo de exposición puede ajustarse o  
30 ajustarse aún más si ya se ajustó antes. El tiempo de exposición puede, por ejemplo, incrementarse o disminuirse en aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500, 1000 o 10.000 %. Dicha modificación puede reiterarse una o varias veces, seguida o precedida por las etapas de procedimiento como se describe en el presente documento.

Se puede llevar a cabo una reiteración de ajustes adicionales del enfoque, área predefinida y/o tiempo de exposición para cada uno de los parámetros de enfoque, área predefinida y tiempo de exposición independientemente o para una combinación de parámetros. Dicha reiteración puede llevarse a cabo de 1 a  
40 aproximadamente 20 veces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces.

Si, después de una reiteración de ajustes adicionales, prevalece una situación de no funcionalidad, el uso del dispositivo o sistema puede interrumpirse y/o puede descartarse cualquier resultado obtenido.

Si, por otra parte, una comparación de un valor indicativo de la funcionalidad del dispositivo o sistema está dentro de un intervalo predefinido, el dispositivo o sistema puede continuar usándose y/o pueden confirmarse los resultados obtenidos o que se van a obtener con dicho dispositivo o sistema.

En consecuencia, los procedimientos pueden llevarse a cabo antes o después de llevar a cabo un ensayo como se describe en el presente documento. De forma alternativa, el procedimiento puede llevarse a cabo durante la  
50 realización de un ensayo como se describe en el presente documento.

En otros aspectos de la divulgación, las etapas del procedimiento mencionado anteriormente se pueden llevar a cabo en un orden diferente, por ejemplo, primero se puede determinar un valor indicativo para el número de partículas en un área, posteriormente se puede determinar un valor indicativo para la funcionalidad. Si en esta fase se advierte una situación de no funcionalidad, el enfoque puede verificarse y/o ajustarse y/o el tiempo de exposición puede ajustarse y/o el área de detección óptica puede ajustarse como se describe anteriormente en el presente documento.

El valor umbral para controlar la posición de enfoque puede ser, por ejemplo, la detección de un número mínimo de 3 partículas como límite inferior y aproximadamente 10.000 partículas como límite superior, por ejemplo 5, 10, 50, 100 o 500 partículas o microesferas. Si el segundo valor indicativo de la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en el dispositivo o sistema es una desviación de no más del 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % entre el primer valor, es decir, el valor indicativo del número de microesferas o partículas en un área predefinida del canal microfluídico y el valor umbral de 3 partículas o aproximadamente 10.000 partículas, la prueba puede considerarse como funcional y/o puede confirmarse cualquier proceso,

función o procedimiento llevado a cabo con o en el dispositivo o sistema. Si se lleva a cabo un ensayo concomitante, pueden tomarse y/o registrarse y/o procesarse además imágenes correspondientes de acuerdo con los detalles de los ensayos como se describe anteriormente o a continuación en el presente documento.

5 Si el segundo valor indicativo de la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en el dispositivo o sistema es una desviación de más de aproximadamente el 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % entre el primer valor, es decir, el valor Indicativo del número de partículas en un área predefinida del canal microfluidico y el valor umbral de 3 partículas o aproximadamente 10.000 partículas, la prueba puede considerarse como no  
10 utilizable. El dispositivo o sistema puede considerarse no utilizable y/o cualquier proceso, función, prueba o procedimiento llevado a cabo con o en el dispositivo o sistema puede considerarse inexacto. En consecuencia, la prueba o el uso del dispositivo o sistema pueden suspenderse y/o los resultados obtenidos pueden ignorarse.

15 En otro modo de realización, un elemento de control incluye un medio para determinar un fondo de fluorescencia en el canal microfluidico. El término "medios para determinar un fondo de fluorescencia" se refiere a sensores ópticos y/o electrónicos o sistemas de medición, así como a un software de análisis de imagen apropiado que permite la detección de señales de fluorescencia en zonas o áreas del canal microfluidico, en el que no hay emisión asociada al analito o a las partículas detectable. Las reacciones de etiquetado, etc., se han descrito en el contexto de la prueba de las reacciones de etiquetado anteriormente mencionadas en el presente documento.

20 Cualquier valor obtenido se puede usar posteriormente para restar la fluorescencia de fondo de las emisiones asociadas al analito medidas para permitir una normalización de las señales y mejorar la exactitud de la medición.

25 Un control adicional puede implicar la verificación del intervalo de enfoque de la unidad de escaneo de un dispositivo o sistema como se describe en el presente documento mediante la detección de microesferas ópticamente distinguibles presentes en el canal microfluidico como se define anteriormente en el presente documento. La verificación puede llevarse a cabo determinando si la posición de enfoque está en los límites del intervalo operativo del servo de enfoque automático. Si la prueba da como resultado un intervalo de enfoque  
30 inexacto de la unidad de escaneo, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

35 Un control adicional puede implicar la verificación del tiempo de exposición para la detección de emisión de luz. La prueba puede llevarse a cabo verificando si los tiempos de exposición adaptados automáticamente dan lugar a tiempos de exposición que están dentro de un intervalo predefinido. Si la prueba da como resultado un tiempo de exposición inexacto, el dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

40 Un control adicional puede implicar la verificación de la homogeneidad de la imagen, por ejemplo, de imágenes tomadas durante ensayos o ejecuciones de control. La verificación puede llevarse a cabo generando histogramas basados en datos de imagen, un análisis de los histogramas y una comparación de los valores de análisis obtenidos con una tabla de referencia o de consulta. Si la prueba da como resultado una homogeneidad de imagen inexacta, es decir, una fuerte homogeneidad de imagen, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

45 Un control adicional puede implicar la verificación de gradientes de intensidad de canal. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas ópticas, electrónicas o de software adecuadas conocidas por el experto en la técnica. Si la prueba da como resultado un gradiente de intensidad inexacto dentro del dispositivo, es decir, un fuerte gradiente de intensidad dentro del dispositivo, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

50 Un control adicional puede implicar la verificación del mecanismo de activación. La verificación puede llevarse a cabo con la ayuda de herramientas ópticas, electrónicas o de software adecuadas conocidas por el experto en la técnica para realizar un mecanismo de activación dinámico. Si la prueba da como resultado un mecanismo de activación inexacto, es decir, una distribución solo de positivo falso y no positivo verdadero, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

55 En otro modo de realización, se proporciona un medio para detectar el llenado del canal microfluidico. Típicamente, dichos medios son sensores ópticos o electrónicos, por ejemplo, una cámara de CCD, una barrera de luz y similares, conectados a un sistema informático adecuado y un software de procesamiento de imágenes conocidos por el experto en la técnica que permite monitorear las aberturas de canal. Se puede llevar a cabo un control correspondiente validando el agujero de escape de un canal microfluidico por medio de la comparación de las propiedades de las imágenes del agujero de escape. Estas propiedades pueden cambiar cuando se llena  
60 el agujero en comparación con un agujero vacío. Si la prueba da como resultado un llenado inexacto del canal microfluidico, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o

puede iniciarse una repetición del ensayo.

Un control adicional puede implicar la prueba del llenado de los compartimentos o subunidades del dispositivo con la ayuda de sensores ópticos o electrónicos, por ejemplo, una cámara de CCD y similares, conectados a un sistema informático adecuado y software de procesamiento de imágenes conocido por el experto en la técnica que permite monitorear las aberturas de canales. Se puede llevar a cabo un control correspondiente validando el nivel de líquido de los compartimentos o subunidades del dispositivo por el medio de la comparación de las propiedades de las imágenes obtenidas de los compartimentos o subunidades del dispositivo. Estas propiedades pueden cambiar cuando el compartimento o subunidad del dispositivo se llena en comparación con el compartimento o subunidad del dispositivo no lleno o no completamente lleno. Si la prueba da como resultado un llenado inexacto del compartimento o subunidad del dispositivo, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

Un control adicional puede implicar un análisis atípico de imágenes obtenidas usando el uso del dispositivo o sistema como se describe en el presente documento. El control puede basarse en la evaluación de todas o la mayoría de las imágenes obtenidas durante uno o más ciclos de uso para imágenes atípicas. La evaluación puede basarse en rangos intercuartílicos con los siguientes parámetros:  $(Q1-1,5 \cdot IQR) < \text{valor característico} < (Q3+1,5 \cdot IQR)$ . Si el análisis da como resultado un valor de análisis atípico inexacto, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) y/o la(s) imagen o imágenes puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

Un control adicional puede implicar la prueba de intensidades de imagen evaluando la intensidad mínima de los canales de color rojo y verde. La verificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda de sensores ópticos y/o electrónicos apropiados o instrumentos de medición conocidos por el experto en la técnica. Si el análisis da como resultado intensidades de imagen inexacto en el canal rojo y/o verde, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) y/o la(s) imagen o imágenes puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

Un control adicional puede implicar la prueba del volumen presente en el canal microfluídico usando el uso de sensores ópticos, mecánicos y/o eléctricos/electrónicos apropiados o instrumentos de medición conocidos por el experto en la técnica. El volumen debe estar en un intervalo de  $0,1$  a  $5 \cdot I$ ,  $0,5$  a  $3 \cdot I$ ,  $1$  a  $2 \cdot I$  o superior a  $1,25 \cdot I$ . El líquido que se va a medir puede ser sangre. Si el análisis da como resultado un volumen inexacto presente en el canal microfluídico, el uso del dispositivo puede detenerse y/o la(s) prueba(s) puede(n) marcarse como no válidas y/o puede iniciarse una repetición del ensayo.

En otro modo de realización, el volumen probado o verificado como se describe anteriormente puede calcularse transversalmente con la ayuda de un medio para determinar el volumen del canal de detección. Dicho medio puede ser, por ejemplo, un código de barras u otra marca de información legible digitalizada presente en un dispositivo o sistema, que indica un factor de volumen o una desviación de un volumen predefinido para el canal microfluídico. Si, por ejemplo, el volumen real del canal microfluídico es diferente del volumen típico predefinido para un canal microfluídico, esta información puede derivarse de un código de barras o marca de información legible digitalizada presente en un dispositivo o sistema y usarse para una evaluación ajustada de los valores de volumen obtenidos mediante un procedimiento de prueba como se describe anteriormente en el presente documento. Además, la información sobre el volumen exacto de los canales microfluídicos individuales puede usarse para una determinación muy exacta de la concentración de analito en la muestra que se va a examinar, ya que no se usarán valores de volumen promedio, sino valores determinados individualmente. De este modo, la exactitud y fidelidad del procedimiento de determinación puede incrementarse significativamente.

El término "inexacto", como se usa en el presente documento, significa que el valor medido para movimientos, posiciones, presencia de elementos o señales, etc., se desvía de un valor predefinido o conocido o intervalo de valores o un valor o intervalo de valores indicado anteriormente en el presente documento como permisible por al menos 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, entre otros, dependiendo del tipo de control. Por ejemplo, un valor para la fecha de caducidad se considera inexacto si la desviación es superior al 0 %.

Cualquiera de las actividades de control mencionadas anteriormente o los usos de los elementos de control pueden incluirse en las etapas de procedimiento como se define anteriormente o a continuación en el presente documento. Por ejemplo, un procedimiento de detección como se define en el presente documento o en las reivindicaciones puede comprender adicionalmente cualquiera de las etapas de control mencionadas anteriormente.

Los elementos de control y/o actividades de control también se pueden usar dentro o para la prueba de capilares o estructuras capilares como se define anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, la carga y la estructura de la matriz en el capilar se pueden probar de acuerdo con un esquema de prueba para el llenado de los compartimentos del dispositivo como se define anteriormente en el presente documento.

Un dispositivo o sistema como se describe en el presente documento, por ejemplo un cartucho de prueba, puede ser asimétrico, por ejemplo, al tener estructuras de alineación específicas como agujeros asimétricos, ángulos cortados, preferentemente uno, dos o tres ángulos cortados. La asimetría del dispositivo se puede usar para eliminar el mal uso o mal posicionamiento del dispositivo con respecto, por ejemplo, a un sistema de escaneo.

5 Típicamente, el dispositivo solo se puede ingresar al sistema de escaneo si está colocado apropiadamente, es decir, si el dispositivo de escaneo detecta la asimetría. Los elementos asimétricos del dispositivo pueden adaptarse a la forma y formato de los dispositivos de escaneo conocidos por el experto en la técnica.

10 Se puede obtener una muestra que se va a analizar, por ejemplo de sangre, de un paciente a través de una punción digital estándar o extracción de sangre venosa. La sangre de punción digital se puede aplicar directamente a un dispositivo o se puede aplicar a una entrada o estructura capilar, que se puede conectar posteriormente con el dispositivo o sistema como se describe en el presente documento. Se prefiere un pequeño volumen de muestra para el uso de la punción digital, ya que puede evitar la posibilidad de llenar por defecto la estructura del receptáculo, por ejemplo, un capilar en el puerto de muestra. El exceso de líquido no debe eliminarse necesariamente del capilar. De forma alternativa, se puede aplicar sangre venosa al dispositivo usando una pipeta. Preferentemente, las muestras de punción digital se aplican inmediatamente al cartucho. Al obtener una muestra, por ejemplo, de sangre, la primera muestra, por ejemplo, una gota de sangre puede eliminarse y la segunda muestra, por ejemplo, una gota de sangre puede obtenerse sin exprimir.

20 Después de aplicar la muestra, el tapón se puede encajar en su lugar, para eliminar la posibilidad de que la muestra se derrame o se contamine el instrumento.

25 En algunos aspectos de las divulgaciones, un procedimiento comprende colocar lentes, por ejemplo, una lente óptica, a una primera distancia y en una primera posición con respecto a un canal microfluídico, que puede disponerse en un dispositivo o sistema o ser un canal microfluídico de un dispositivo o sistema, en el que el canal microfluídico comprende una muestra líquida y una o más microesferas ópticamente detectables o partículas inmovilizadas dentro de un canal microfluídico; tomar una primera imagen de al menos un subconjunto de dichas microesferas o partículas inmovilizadas; analizar al menos un parámetro de dicha primera imagen; basado en dicho al menos un parámetro, colocando la lente a una segunda distancia y en la primera posición con respecto al canal microfluídico; tomar una imagen adicional de al menos un subconjunto de dichas microesferas o partículas inmovilizadas; determinar un primer valor indicativo del número de microesferas o partículas en dicha segunda imagen; determinar un segundo valor indicativo de la diferencia entre dicho primer valor y un valor umbral, y, dependiendo de dicho segundo valor, tomar a la segunda distancia una imagen de al menos una segunda posición del canal microfluídico o crear un mensaje de error. La creación de un mensaje de error puede dar lugar a la interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o a ignorar los resultados obtenidos con dicho dispositivo o sistema. Una "distancia" como se usa en el presente documento se refiere a una distancia predefinida entre la lente y el objeto que se va a detectar, por ejemplo, una distancia predeterminada típica para un sistema óptico. Dicha distancia predeterminada puede ser, por ejemplo, la distancia máxima entre la lente y el objeto, lo cual es técnicamente posible. De forma alternativa, la distancia predeterminada puede ser la distancia mínima entre la lente y el objeto, lo cual es técnicamente posible. Un "parámetro" como se menciona en el contexto del procedimiento puede ser, por ejemplo, contraste, intensidad, contraste de borde máximo, el número de elementos brillantes rodeados de campo oscuro o el número de elementos oscuros rodeados de campos brillantes, la presencia de bordes o fisuras o fracciones ópticas, la presencia de entidades redondas u ovaladas, la nitidez de la imagen o cualquier otro parámetro adecuado conocido por el experto en la técnica. Los parámetros pueden analizarse solos, o puede analizarse cualquier agrupación o combinación de parámetros. Si, por ejemplo, el contraste de borde máximo de la imagen se analiza como parámetro, el resultado del análisis obtenido puede usarse para decidir una variación de la distancia de la lente con respecto a la partícula o canal microfluídico que comprende la partícula. La distancia puede aumentarse o disminuirse, dependiendo, por ejemplo, de la distancia predeterminada usada en la etapa de colocación previa. El aumento o disminución de la distancia se puede hacer en incrementos del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de la distancia predeterminada, o en incrementos de 0,01, 0,05, 0,5, 0,75, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50 o 100 • m o cualquier otro incremento adecuado que pueda depender de la naturaleza, tamaño y forma de la lente o unidad de detección usada. Los incrementos pueden variar durante rondas repetitivas de ajuste. Por ejemplo, los incrementos pueden reducirse durante cada ronda de reiteración o durante cada 2.<sup>a</sup>, 3.<sup>a</sup>, 4.<sup>a</sup>, 5.<sup>a</sup>, etc. ronda de reiteración.

55 Además, el parámetro analizado puede compararse con una tabla de consulta o una base de datos de referencia. En base a esta comparación, se puede tomar una decisión sobre el aumento o la disminución y/o se puede tomar una decisión sobre la cantidad de aumento o disminución. Las etapas mencionadas anteriormente se pueden reiterar una o varias veces, por ejemplo, hasta 20 veces. Además, durante las reiteraciones, una o más imágenes se pueden tomar, guardar y/o analizar o procesar posteriormente. Tras una o más variaciones de la distancia, se puede tomar una imagen adicional de partículas inmovilizadas y se puede determinar un primer valor indicativo del número de microesferas o partículas en la imagen. El valor indicativo para el número puede determinarse, por ejemplo, para un área predeterminada como se define anteriormente en el presente documento. Se puede comparar un valor indicativo del número de partículas con un valor umbral o una tabla de consulta, lo que da como resultado un segundo valor indicativo de la diferencia entre el primer valor y el valor umbral, por ejemplo, como se describe anteriormente en el presente documento. Si un valor indicativo del

número de partículas está fuera de un intervalo de valores umbral como se define anteriormente en el presente documento, el dispositivo o sistema y/o cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho sistema de dispositivo puede considerarse no utilizable. Si un valor indicativo del número de partículas está dentro de un intervalo de valores umbral como se define anteriormente en el presente documento, se puede tomar, guardar y/o procesar posteriormente una imagen a la segunda distancia o distancia adicional que dio como resultado dicha coincidencia de los valores umbral, por ejemplo, si se llevan a cabo etapas de ensayo adicionales, por ejemplo, los mencionados anteriormente y a continuación en el presente documento.

La primera y la segunda distancia pueden ser esencialmente iguales, es decir, la primera y la segunda imagen pueden tomarse a la misma distancia entre la lente y el canal microfluídico. En lugar de la variación de la distancia, el tiempo de exposición para la detección puede variar o puede modificarse un área predefinida que se va a analizar. Un área predefinida del canal microfluídico puede tener, por ejemplo, el tamaño de aproximadamente 0,001 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % del canal microfluídico. Se puede ampliar o reducir y/o ajustar de acuerdo con el tipo, tamaño, densidad óptica, fluorescencia, etiquetado, etc. de la partícula que se va a detectar. Por ejemplo, el área predefinida se puede ampliar y/o reducir en aproximadamente el 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500, 1000 o 10.000 %.

En algunos aspectos de la divulgación, el procedimiento puede comprender además: obtener una imagen de al menos una posición de un canal microfluídico comprendido en un dispositivo o sistema; introducir una muestra en el canal microfluídico; obtener una imagen adicional de la al menos una posición de un canal microfluídico; analizar uno o más parámetros de las imágenes; y calcular un valor indicativo de la presencia de una muestra en el canal microfluídico y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base a los parámetros analizados. La posición puede ser variable o móvil, dependiendo de, por ejemplo, la unidad o sistema de detección o escaneo empleada. Típicamente, se puede seleccionar una posición en el lado opuesto del sitio donde se introduce la muestra, por ejemplo, en el agujero de salida o de escape. Una muestra que se va a introducir puede ser cualquier muestra adecuada, típicamente una muestra líquida que comprende partículas o analitos que se va a examinar. La muestra se puede introducir en forma de un volumen predefinido, por ejemplo, 5 • l, 10 • l, 15 • l, 20 • l, etc., o se puede introducir en correspondencia con el estado de llenado del canal microfluídico, por ejemplo, para llenar completamente el canal microfluídico, para llenarlo en un 75 %, 50 %, 30 %, etc. El estado de llenado puede correlacionarse y/o controlarse por medio de un ciclo de retroalimentación con las etapas de análisis adicionales como se describe a continuación en el presente documento: después de la introducción de una muestra se obtiene una imagen adicional. Posteriormente, ambas imágenes, una tomada antes de la introducción de una muestra y otra tomada después de la introducción de una muestra, pueden analizarse y compararse con respecto a parámetros como el contraste de la imagen, el brillo de la imagen, la distribución del brillo sobre la imagen. Típicamente, los valores de gris en la imagen se determinan y comparan entre las imágenes tomadas. Posteriormente, puede determinarse un valor indicativo de la presencia de una muestra en el canal microfluídico y/o la funcionalidad del dispositivo o sistema y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho dispositivo o sistema, en base al parámetro analizado, por ejemplo, los valores de gris.

Como un umbral para decidir si una muestra está presente en un canal microfluídico y/o si el dispositivo o sistema es utilizable y/o si algún proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en el dispositivo o sistema es válido, el parámetro analizado puede incrementarse en más de aproximadamente un 5 %, por ejemplo, en aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % o más del 100 % entre la imagen tomada antes de la introducción de la muestra y la imagen adicional tomada después de la introducción de la muestra. La imagen después de la introducción de la muestra puede ser más brillante que la imagen tomada antes de la introducción de la muestra. El parámetro analizado puede calcularse, por ejemplo, como valor promedio sobre todos los píxeles de una imagen. En esta situación, el uso del dispositivo o sistema se puede continuar y/o los resultados obtenidos con el dispositivo o sistema se pueden confirmar.

Por el contrario, si el parámetro analizado puede incrementarse en menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 30 % o menos de aproximadamente el 50 % entre la imagen tomada antes de la introducción de la muestra y la imagen adicional tomada después de la introducción de la muestra puede considerarse que no hay muestra presente en el canal microfluídico y/o que el dispositivo o sistema no es utilizable y/o que cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en el dispositivo o sistema no es válido. En esta situación, el uso del dispositivo o sistema puede interrumpirse y/o los resultados obtenidos con el dispositivo o sistema pueden ignorarse.

El parámetro que se va a analizar es el valor de gris, por ejemplo, el 50.º al 95.º percentil de los valores de gris. El 90.º percentil de los valores de gris puede usarse como parámetro que se va a analizar. El término "valor de gris", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medición adecuada de intensidades de píxeles, por ejemplo, a un intervalo de 256 valores de gris, por ejemplo, de acuerdo con una definición de gráficos de color verdadero.

Los procedimientos pueden llevarse a cabo en paralelo a los ensayos y procedimientos como se describe anteriormente o a continuación en el presente documento. De este modo, se hace posible un proceso de revisión concomitante de la calidad de los resultados del ensayo obtenidos por medio de controles internos.

5 Cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente que permiten el control de parámetros ópticos, el control del estado de llenado de un canal microfluídico o la prueba de la calidad del reactivo de etiquetado y la interacción entre el reactivo y la partícula pueden combinarse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, primero se puede verificar el estado de llenado, seguido del control de los parámetros ópticos y finalmente  
10 seguido del empleo de un control de calidad para el reactivo de etiquetado. Además, también se prevé cualquier otra combinación de procedimientos.

Además, los procedimientos se pueden combinar con procedimientos de control adicionales, etapas de procedimiento, etapas de verificación, etapas de prueba, etapas de validación o similares, por ejemplo, para el hardware del sistema o dispositivo, componentes de software conectados al sistema o asociados con el dispositivo o parámetros adicionales asociados con etapas de ensayo o características del dispositivo o sistema, por ejemplo, procedimientos de control, etapas de procedimiento, etapas de verificación, etapas de prueba, etapas de validación, etc., como se define anteriormente en el presente documento.

20 Por ejemplo, al menos uno de los siguientes procedimientos de control, controles, etapas de control, etapas de verificación, etapas o procedimientos de prueba o cualquier combinación o subgrupo de los mismos se puede llevar a cabo en combinación con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente:

un control que implica la prueba de reacciones de etiquetado y/o la presencia de células en una muestra que se va a analizar con la ayuda de partículas inmovilizadas, por ejemplo, células inmovilizadas, como se describe anteriormente en el presente documento;

un control puede implicar la verificación de la detección, por ejemplo, la plausibilidad del recuento celular en el dispositivo o sistema de evaluación como se define anteriormente en el presente documento;

un control dirigido a la prueba del dispositivo con respecto a una unidad de escaneo o detección, es decir, verificar si el dispositivo está insertado o dentro de un sistema o si está asociado apropiadamente con una unidad de escaneo o detección como se describe anteriormente en el presente documento;

35 un control dirigido a la prueba de un motor del sistema o asociado con el dispositivo como se describe anteriormente en el presente documento;

un control de movimiento del motor que puede llevarse a cabo probando el buen funcionamiento de todos los ejes del dispositivo o sistema, en particular, el buen funcionamiento de las bandejas y rodillos como se describe anteriormente en el presente documento;

un control que implica la verificación de la sobrecarga de corriente del motor como se describe anteriormente en el presente documento;

45 un control que implica la verificación de corrientes de LED, en particular la prueba de intensidad de luz emitida como se describe anteriormente en el presente documento;

un control que implica la verificación de las posiciones y la capacidad de cambio de los elementos de filtro evaluando el centrado de los elementos de filtro a lo largo del eje óptico como se describe anteriormente en el presente documento;

un control que implica la verificación de elementos de hardware y/o dispositivo mediante la evaluación de bits de inicio y parada como se describe anteriormente en el presente documento;

55 un control que implica la verificación de códigos de barras en un dispositivo mediante la evaluación de valores de paridad como se describe anteriormente en el presente documento;

un control que implica la verificación del voltaje de la fuente de alimentación como se describe anteriormente en el presente documento;

60 un control que implica la verificación de la carga de la batería o el acumulador, en particular la carga mínima de la batería o el acumulador, como se describe anteriormente en el presente documento;

un control que implica la verificación del llenado de extremo a extremo de un capilar, por ejemplo, un control para determinar si se llena al menos el 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de un capilar, como se describe anteriormente en el presente documento;

- un control que implica el establecimiento de una conexión de base de datos del sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 5 un control que implica la prueba del estado de la conexión durante el inicio del sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la prueba del estado de conexión de un módulo generador de imágenes durante el inicio del sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 10 un control que implica la prueba de un movimiento de la bandeja a la posición de carga durante el inicio del sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la prueba del rendimiento de visualización durante el inicio del sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 15 un control que implica la prueba de comunicación entre la aplicación del sistema y una cámara, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la prueba de la funcionalidad de los botones de entrada del sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 20 un control que implica la prueba de la funcionalidad de ajustes de guardado, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 25 un control que implica la prueba de la visualización de los resultados disponibles, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la prueba de la visualización de los resultados disponibles, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 30 un control que implica la verificación de la eliminación de datos, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la verificación de la edición de datos, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 35 un control que implica la verificación del tipo y/o versión del dispositivo y/o su compatibilidad con el sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 40 un control que implica la verificación de los datos de caducidad del código de barras del dispositivo con respecto a los datos proporcionados en el sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la verificación del uso repetido del dispositivo, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 45 un control que implica la verificación de la comunicación o conexión entre la aplicación del sistema y una placa controladora, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la verificación de la capacidad de almacenamiento, en particular la capacidad mínima de almacenamiento en el sistema de evaluación del dispositivo, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 50 un control que implica la verificación de la plausibilidad de la fecha en el sistema de evaluación del dispositivo como se describe anteriormente en el presente documento;
- 55 un control que implica la verificación de la temperatura del dispositivo, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la verificación del contacto de una bomba de tubo de presión ajustando el rodillo de la bomba de tubo para asegurar que el tubo se aprieta con una fuerza definida, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 60 un control que implica la validación de la homogeneidad de la imagen en una posición de control de exposición, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 65

- un control que implica la validación de la localización y/o estabilidad del eje óptico y/o correspondencias rojo-verde, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 5 un control que implica la prueba del movimiento de partículas en un canal microfluídico, por ejemplo, el movimiento de células tales como glóbulos sanguíneos en el canal microfluídico, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 10 un control que implica la verificación del enfoque de la unidad de escaneo de un dispositivo o sistema mediante la detección de microesferas ópticamente distinguibles presentes en el canal microfluídico como se describe anteriormente en el presente documento;
- 15 un control que implica la determinación de un fondo de fluorescencia en el canal microfluídico como se describe anteriormente en el presente documento;
- 20 un control que implica la verificación del intervalo de enfoque de la unidad de escaneo de un dispositivo o sistema mediante la detección de microesferas ópticamente distinguibles presentes en el canal microfluídico como se define anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la verificación del tiempo de exposición para la detección de emisión de luz;
- 20 un control que implica la verificación de la homogeneidad de la imagen, por ejemplo, de imágenes tomadas durante ensayos o tomas de control, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 25 un control que implica la verificación de gradientes de intensidad de canal, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la verificación del mecanismo de activación, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 30 un control que implica la detección del llenado del canal microfluídico como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la prueba del llenado de compartimentos o subunidades del dispositivo, como se describe anteriormente en el presente documento;
- 35 un control que implica un análisis atípico de imágenes obtenidas usando el dispositivo o sistema, como se describe anteriormente en el presente documento;
- un control que implica la prueba de intensidades de imagen evaluando la intensidad mínima de los canales de color rojo y verde, como se describe anteriormente en el presente documento; y/o
- 40 un control que implica la prueba del volumen presente en el canal microfluídico, como se describe anteriormente en el presente documento. El procedimiento como se define en el presente documento puede comprender al menos una de las siguientes etapas: controlar la presencia de un dispositivo dentro o con respecto a una unidad de detección de un sistema; determinar un fondo de fluorescencia en el canal microfluídico del dispositivo o sistema; determinar una plausibilidad de conteo diana por medio de la detección de ciertas partículas diana en el dispositivo o sistema; controlar la movilidad del dispositivo dentro de la unidad de detección del sistema; controlar la carga del acumulador, la plausibilidad de la fecha y/o la temperatura en el dispositivo o sistema; y/o controlar los parámetros del programa informático del sistema. Los procedimientos correspondientes, las pruebas, las etapas de validación, etc., se describen anteriormente en el presente documento.
- 45 un control que implica la prueba del volumen presente en el canal microfluídico, como se describe anteriormente en el presente documento. El procedimiento como se define en el presente documento puede comprender al menos una de las siguientes etapas: controlar la presencia de un dispositivo dentro o con respecto a una unidad de detección de un sistema; determinar un fondo de fluorescencia en el canal microfluídico del dispositivo o sistema; determinar una plausibilidad de conteo diana por medio de la detección de ciertas partículas diana en el dispositivo o sistema; controlar la movilidad del dispositivo dentro de la unidad de detección del sistema; controlar la carga del acumulador, la plausibilidad de la fecha y/o la temperatura en el dispositivo o sistema; y/o controlar los parámetros del programa informático del sistema. Los procedimientos correspondientes, las pruebas, las etapas de validación, etc., se describen anteriormente en el presente documento.
- 50 El procedimiento puede comprender introducir una muestra líquida en un canal microfluídico, por ejemplo, dispuesto en un dispositivo o sistema, en el que el canal microfluídico comprende la muestra líquida que comprende múltiples partículas, y en el que dicho canal microfluídico comprende y/o está asociado con un elemento de control; formar una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una etiqueta óptica; formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, detectando complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla, realizando un procedimiento de control que comprende determinar un valor basado en el elemento de control y comparar el valor con un valor predefinido, en el que una coincidencia de ambos valores o una desviación entre ambos valores de menos de aproximadamente el 30 % indica la funcionalidad del canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, lo que da lugar a una continuación del uso de dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, y en el que una desviación entre ambos valores de más de aproximadamente el 30 % indica la falta de funcionalidad del canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o de cualquier proceso o procedimiento llevado a cabo con o en dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, dando lugar a la interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o la omisión de los resultados obtenidos con dicho canal, dispositivo o sistema
- 55 un control que implica la prueba del volumen presente en el canal microfluídico, como se describe anteriormente en el presente documento. El procedimiento como se define en el presente documento puede comprender al menos una de las siguientes etapas: controlar la presencia de un dispositivo dentro o con respecto a una unidad de detección de un sistema; determinar un fondo de fluorescencia en el canal microfluídico del dispositivo o sistema; determinar una plausibilidad de conteo diana por medio de la detección de ciertas partículas diana en el dispositivo o sistema; controlar la movilidad del dispositivo dentro de la unidad de detección del sistema; controlar la carga del acumulador, la plausibilidad de la fecha y/o la temperatura en el dispositivo o sistema; y/o controlar los parámetros del programa informático del sistema. Los procedimientos correspondientes, las pruebas, las etapas de validación, etc., se describen anteriormente en el presente documento.
- 60 El procedimiento puede comprender introducir una muestra líquida en un canal microfluídico, por ejemplo, dispuesto en un dispositivo o sistema, en el que el canal microfluídico comprende la muestra líquida que comprende múltiples partículas, y en el que dicho canal microfluídico comprende y/o está asociado con un elemento de control; formar una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una etiqueta óptica; formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, detectando complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla, realizando un procedimiento de control que comprende determinar un valor basado en el elemento de control y comparar el valor con un valor predefinido, en el que una coincidencia de ambos valores o una desviación entre ambos valores de menos de aproximadamente el 30 % indica la funcionalidad del canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, lo que da lugar a una continuación del uso de dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, y en el que una desviación entre ambos valores de más de aproximadamente el 30 % indica la falta de funcionalidad del canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o de cualquier proceso o procedimiento llevado a cabo con o en dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, dando lugar a la interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o la omisión de los resultados obtenidos con dicho canal, dispositivo o sistema
- 65 El procedimiento puede comprender introducir una muestra líquida en un canal microfluídico, por ejemplo, dispuesto en un dispositivo o sistema, en el que el canal microfluídico comprende la muestra líquida que comprende múltiples partículas, y en el que dicho canal microfluídico comprende y/o está asociado con un elemento de control; formar una mezcla que comprende al menos una parte de la muestra líquida y una etiqueta óptica; formar múltiples complejos, comprendiendo cada complejo una de las múltiples partículas y al menos una de las etiquetas ópticas, detectando complejos presentes dentro de un subconjunto de la mezcla, realizando un procedimiento de control que comprende determinar un valor basado en el elemento de control y comparar el valor con un valor predefinido, en el que una coincidencia de ambos valores o una desviación entre ambos valores de menos de aproximadamente el 30 % indica la funcionalidad del canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o de cualquier proceso, función o procedimiento llevado a cabo con o en dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, lo que da lugar a una continuación del uso de dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, y en el que una desviación entre ambos valores de más de aproximadamente el 30 % indica la falta de funcionalidad del canal, dispositivo o sistema microfluídico y/o de cualquier proceso o procedimiento llevado a cabo con o en dicho canal, dispositivo o sistema microfluídico, dando lugar a la interrupción del uso de dicho dispositivo o sistema y/o la omisión de los resultados obtenidos con dicho canal, dispositivo o sistema

microfluídico. El término "elemento de control" se refiere a elementos de control como se describe en el presente documento.

5 La realización de un procedimiento de control que comprende determinar un valor basado en el elemento de control y comparar el valor con un valor predefinido incluye realizar uno o más procedimientos de control, verificaciones, validaciones, etc., como se describe en el presente documento. Estas verificaciones pueden llevarse a cabo de acuerdo con los parámetros como se describe en el presente documento. La comparación con un valor predefinido se refiere a una comparación con uno o más valores de referencia como se indica en el presente documento, en particular a la definición de resultados inexactos proporcionados en el presente documento. Las reacciones del sistema o dispositivo a la indicación de mensajes, etc. pueden estar de acuerdo con las indicaciones específicas de los procedimientos de control descritos en el presente documento. Las comprobaciones pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado o en cualquier marco temporal adecuado, por ejemplo, antes, durante o después de que se analice un ensayo en un sistema o dispositivo. Las comprobaciones también pueden superponerse oportunamente o realizarse en una secuencia no superpuesta. 10 Comprobaciones similares también se pueden realizar juntas. Si el resultado de una verificación es necesario para la realización de una verificación posterior, se debe mantener el orden correspondiente. 15

En algunos aspectos de la divulgación, un proceso de control es un procedimiento de control como se menciona en el presente documento, por ejemplo, un procedimiento que permite el control de parámetros ópticos, el control del estado de llenado de un canal microfluídico o la prueba de la calidad y/o actividad del reactivo de etiquetado y la interacción entre el reactivo y la partícula. Estos procedimientos también se pueden combinar de cualquier manera adecuada con las comprobaciones mencionadas anteriormente. 20

Un dispositivo como se menciona en los procedimientos que permiten el control de los parámetros del dispositivo, el software y/o el ensayo, tales como por ejemplo, de los parámetros ópticos, el control del estado de llenado de un canal microfluídico o la prueba de la calidad del reactivo de etiquetado y la interacción entre el reactivo y la partícula es un dispositivo como se describe en el presente documento, por ejemplo, un dispositivo que tiene una o más de las características definidas en el presente documento. 25

En algunos aspectos adicionales de la divulgación, un sistema como se menciona en los procedimientos descritos anteriormente que permiten el control de los parámetros del dispositivo, el software y/o el ensayo, tales como por ejemplo, de parámetros ópticos, el control del estado de llenado de un canal microfluídico o la prueba de la calidad del reactivo de etiquetado y la interacción entre el reactivo y la partícula es un sistema como se describe en el presente documento, por ejemplo, un sistema que tiene una o más de las características definidas en el presente documento. 30 35

En algunos aspectos adicionales de la divulgación, cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente que permiten el control de los parámetros del dispositivo, el software y/o el ensayo, tales como, por ejemplo, de parámetros ópticos, el control del estado de llenado de un canal microfluídico o la prueba de la calidad del reactivo de etiquetado y la interacción entre el reactivo y la partícula, o el procedimiento que permite la realización de ensayos en combinación con procedimientos de control, puede comprender una etapa de detección de complejos que permita llegar a una conclusión sobre una infección viral o el estado de una infección viral. Una infección vírica puede ser la presencia de uno o más virus en un organismo, por ejemplo, un mamífero, un ser humano, etc. Una infección vírica puede ser una infección con cualquiera de los virus conocidos, por ejemplo, una infección con un retrovirus, tal como por ejemplo un virus del género alpharetrovirus; por ejemplo, el virus de la leucosis aviar o el virus del sarcoma de Rous, el género betaretrovirus, por ejemplo, el virus del tumor mamario de ratón, el género gammaretrovirus, por ejemplo, el virus de la leucemia murina o el virus de la leucemia felina, el género deltaretrovirus, por ejemplo, el virus de la leucemia bovina o el virus linfotrópico T humano, el género epsilonretrovirus, por ejemplo, el virus del sarcoma dérmico de leucomas, el género Lentivirus, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los virus de inmunodeficiencia simia o felina o el género spumavirus, por ejemplo, el virus espumoso del simio. El término "VIH" incluye cualquier especie de virus de la inmunodeficiencia humana conocida o aún por identificar, por ejemplo, VIH-1 o VIH-2. 40 45 50

En algunos aspectos adicionales de la divulgación, los dispositivos como se describe en el presente documento, los sistemas como se describe en el presente documento, los procedimientos como se describe en el presente documento y/o el capilar como se describe en el presente documento pueden usarse para la detección, diagnóstico o monitorización de una infección vírica, por ejemplo, una infección retroviral. Los dispositivos, sistemas o capilares pueden, por ejemplo, estar provistos de reactivos que se unen a partículas que permiten una conclusión sobre la infección de un organismo, por ejemplo, un mamífero o un ser humano con un virus, por ejemplo, un retrovirus como se define anteriormente en el presente documento, en particular VIH. Dichos reactivos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a las células T como se describe en el presente documento. En consecuencia, los procedimientos pueden modificarse o implementarse, es decir, pueden usarse reactivos correspondientes, etc. 55 60

La detección puede llevarse a cabo determinando el número y/o naturaleza y/o forma, etc. de células indicativas tales como las células T. Un diagnóstico puede incluir procedimientos o procesos adicionales como una 65

5 detección por PCR de genes víricos o fragmentos de genes, por ejemplo, genes de VIH, una prueba  
 inmunológica de presencia viral en el organismo o cualquier otro procedimiento adecuado conocido por el  
 experto en la técnica. La monitorización del estado de una enfermedad o una infección puede incluir una  
 repetición de una etapa de detección como se define en el presente documento, por ejemplo, durante un período  
 10 de tiempo definido, por ejemplo, de uno a varios días, de una a varias semanas, por ejemplo, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9,  
 10 semanas, de uno a varios meses, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 meses, de uno a varios años, por  
 ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años. La monitorización puede llevarse a cabo durante un  
 procedimiento de tratamiento, por ejemplo, una terapia antiviral, por ejemplo, una terapia anti-VIH. Los  
 procedimientos pueden incluir procedimientos de adquisición de datos, sin la etapa de conclusión sobre la  
 presencia de una infección o enfermedad.

15 Cualquiera de estos procedimientos o procesos pueden llevarse a cabo in vivo, es decir, en o dentro del cuerpo  
 humano o animal, o ex vivo, es decir, in vitro, por ejemplo, usando muestras, por ejemplo, muestras de sangre  
 obtenidas de un paciente. Dichas muestras se pueden obtener de acuerdo con cualquier procedimiento  
 adecuado conocido por el experto en la técnica.

Se han descrito procedimientos y dispositivos para realizar ensayos. A continuación se analizan ejemplos de  
 otros aspectos de la divulgación.

20 Si bien la entrada 106 en las figuras 1 y 2 se ha descrito como una abertura sin obstrucciones, son posibles otras  
 configuraciones. Por ejemplo, una entrada puede configurarse con un accesorio de jeringa (por ejemplo, un  
 accesorio hermético a gases) para recibir una jeringa. De forma alternativa, una entrada puede configurarse  
 como una junta a través de la cual se puede introducir una muestra con una aguja. Como otra alternativa, la  
 25 entrada puede estar equipada con una válvula unidireccional que permite que la muestra sea introducida pero  
 que no salga. Como otra alternativa, la entrada puede configurarse para recibir un capilar estándar (por ejemplo,  
 un capilar de extremo a extremo, tal como un capilar de plástico). El capilar puede estar recubierto con  
 anticoagulante, tal como con heparina. Los ejemplos de capilares adecuados incluyen 20 • l de capilares  
 recubiertos con heparina disponibles de Kabe Labortechnik (Nurnbrecht-Elsenroth, Alemania; [http://www.kabe-  
 labortechnik.de/index.php? sprache=de&akt\\_ seite=startseite\\_ produkte.php](http://www.kabe-labortechnik.de/index.php?sprache=de&akt_seite=startseite_produkte.php)).

30 Si bien se ha descrito un dispositivo microfluídico que se llena por acción capilar, se pueden usar otros modos de  
 realización. Por ejemplo, el sistema 500 puede diseñarse para reducir un volumen interno de la red microfluídica  
 antes de la aplicación de la muestra a la entrada. Cuando se aplica la muestra, se aumenta el volumen interno  
 extrayendo de este modo la muestra. Dicha disminución del volumen se puede lograr, por ejemplo, con el rodillo  
 35 de compresión 516. Por ejemplo, el dispositivo microfluídico puede recibirse dentro de la carcasa 500 de modo  
 que el resorte amortiguado 514 del actuador de traslación 512 esté en un estado comprimido. El rodillo de  
 compresión 516 se sitúa para comprimir el dispositivo 100 en una localización correspondiente al depósito 108.  
 Esta compresión reduce un volumen interno del depósito 108. La reducción de volumen es aproximadamente tan  
 grande como (por ejemplo, al menos aproximadamente un 25 % mayor que, al menos un 50 % mayor que) el  
 40 volumen de muestra que se va a recibir dentro del dispositivo 100. Con el depósito 108 en el estado comprimido,  
 se aplica un volumen de muestra a la entrada 106 del dispositivo 100. El rodillo de compresión 516 se retira de la  
 entrada 106 hacia un extremo opuesto 137 del dispositivo 100. A medida que el rodillo 516 se aleja del depósito  
 108, el depósito se descomprime, incrementando de este modo el volumen interno de la red microfluídica. El  
 aumento de volumen crea un vacío que aspira la muestra en el dispositivo.

45 Si bien se han descrito dispositivos microfluídicos que tienen un canal capilar abierto, se pueden usar otros  
 modos de realización. Por ejemplo, el canal puede incluir un medio que ocupe al menos parte (por ejemplo, la  
 mayoría o la totalidad) de la sección transversal del canal a lo largo de al menos una parte de su longitud.  
 Típicamente, el medio es uno en el que múltiples compuestos de sonda se pueden inmovilizar para definir zonas  
 50 de prueba separadas (por ejemplo, volúmenes de captura), cada uno con sitios de captura dispuestos en tres  
 dimensiones. Los poros o huecos en el medio permiten que el líquido penetre a lo largo del canal (por ejemplo,  
 por acción capilar). El movimiento del líquido a lo largo del canal puede ser asistido o inducido, por ejemplo,  
 generando un vacío dentro del canal como se describe anteriormente. Típicamente, los compuestos de sonda se  
 inmovilizan con respecto al medio poroso para definir zonas de prueba separadas a lo largo del canal. La  
 55 interacción de analitos con compuestos de sonda de las zonas de prueba se puede determinar secuencialmente  
 como se describe para las zonas de prueba 112i del dispositivo 100. Como cada zona de prueba está dispuesta  
 en tres dimensiones, la reducción de la distancia entre las superficies interiores opuestas del canal disminuye el  
 volumen de captura ocupado por los compuestos de sonda inmovilizados de la zona de prueba. La detección  
 óptica se realiza con la zona de prueba en el estado de volumen reducido (es decir, distancia reducida).

60 Si bien las zonas de prueba 112i se han mostrado como alargadas, son posibles otras configuraciones. Por  
 ejemplo, en referencia a la FIG. 7, un dispositivo microfluídico 300 incluye múltiples zonas de prueba 312i, cada  
 una de las cuales tiene una configuración en general circular. Además de una diferencia de forma, las zonas de  
 prueba 312i pueden ser idénticas a las zonas de prueba 112i del dispositivo 100. Además de una diferencia en  
 65 las zonas de prueba, los dispositivos 100 y 300 pueden ser idénticos.

Mientras que un procedimiento para formar las zonas de prueba 112i se ha descrito como el movimiento de la punta distal 404 y el sustrato 102 desde una separación inicial d1 (FIG. 3b) a una separación adyacente d2 (FIG. 3c) y a una separación intermedia d3 (FIG. 3d) antes de iniciar el movimiento lateral de la punta distal 404 y el sustrato 102 (FIG. 3f), se pueden realizar otros modos de realización. Por ejemplo, la punta distal 404 y el sustrato 102 se pueden mover lateralmente con la punta 404 y el sustrato 102 en la separación adyacente d2. En este modo de realización, la separación d2 es típicamente mayor que cero.

Si bien se ha descrito que un procedimiento para formar las zonas de prueba 112i incluye una etapa para mantener la punta distal 404 y el sustrato 102 en una separación intermedia d3 durante un tiempo de incubación hasta que solo quede una porción restante 402' de la solución de reactivo 402, se pueden realizar otros modos de realización. Por ejemplo, el movimiento lateral de la punta distal 404 y el sustrato 102 puede comenzar inmediatamente cuando la punta distal 404 y el sustrato 102 se mueven desde la separación adyacente d2 (FIG. 3c) a la separación d3 (FIG. 3d). En otras palabras, el tiempo de incubación puede ser indistinguible de cero. Como otro ejemplo, durante la incubación, la solución de reactivo de evaporación puede reemplazarse por una solución de reactivo adicional introducida en la punta capilar. En consecuencia, la cantidad total de reactivo en la punta capilar aumenta durante la incubación.

Si bien se ha descrito que un procedimiento para formar las zonas de prueba 112i incluye un tiempo de incubación con la punta distal 404 y el sustrato 102 mantenido en una separación d3, se pueden realizar otros modos de realización. Por ejemplo, la separación d3 puede variar durante el tiempo de incubación. Por ejemplo, la punta 404 puede oscilar lateralmente y/o verticalmente con respecto al sustrato 102 durante el tiempo de incubación. De forma alternativa o en combinación, la punta 404 puede oscilar lateralmente y/o verticalmente con respecto al sustrato 102 durante el movimiento lateral. Dicha oscilación puede potenciar el transporte de las moléculas de sonda al primer sustrato durante la incubación o el movimiento lateral.

Si bien se ha descrito que un procedimiento para formar las zonas de prueba 112i usa un dispensador capilar, se pueden usar otros dispensadores. Por ejemplo, el material puede dispensarse desde un dispensador sólido (por ejemplo, una varilla sólida).

Si bien se ha descrito un procedimiento para formar las zonas de prueba 112i como la introducción de una cantidad de solución de reactivo en una punta distal de un capilar de un observador capilar (FIG. 3b) y llevar la punta y un sustrato a una separación más pequeña d2 de modo que la solución de reactivo 402 haga contacto con una localización del sustrato 102, se pueden realizar otros modos de realización. Por ejemplo, la solución de reactivo puede introducirse en la punta distal solo después de que la punta distal y el sustrato se lleven a una separación menor (por ejemplo, después de que la punta distal se ponga en contacto con el sustrato).

Si bien se ha descrito un procedimiento y un lector de dispositivo microfluídico para reducir secuencialmente una distancia entre las superficies interiores de un canal, son posibles otras configuraciones. Por ejemplo, un lector de dispositivo microfluídico puede configurarse para reducir simultáneamente una distancia entre las superficies interiores a lo largo de la mayor parte (por ejemplo, sustancialmente todo o todo) de un canal. Posteriormente, el lector traslada la zona de detección de un detector a lo largo del canal de modo que las diferentes zonas de prueba se lean secuencialmente.

Si bien se ha descrito un dispositivo microfluídico que tiene un primer sustrato relativamente rígido y un segundo sustrato relativamente flexible, se pueden usar otros modos de realización. Por ejemplo, los sustratos que definen ambas superficies interiores opuestas de un canal pueden ser flexibles. En dichos modos de realización, una parte del sensor óptico puede formar parte del sistema de compresión. Por ejemplo, el dispositivo microfluídico puede trasladarse entre un rodillo de compresión y un sensor óptico.

Si bien se ha descrito que un patrón de referencia proporciona información relacionada con las propiedades espaciales de las zonas de prueba de un dispositivo microfluídico, el patrón de referencia puede proporcionar información adicional o alternativa. Por ejemplo, un patrón de referencia puede proporcionar información relacionada con las propiedades fisicoquímicas de las zonas de prueba de un dispositivo microfluídico. Dichas propiedades incluyen analitos para los cuales las zonas de prueba están configuradas para el ensayo. Otras propiedades incluyen la identidad y las propiedades de los reactivos almacenados en el dispositivo y la información de la fecha (por ejemplo, la fecha de caducidad) del dispositivo.

Si bien se ha descrito un patrón de referencia que incluye indicios magnéticos, se pueden usar otros indicios. Por ejemplo, los indicios pueden estar formados por regiones que tienen diferente densidad óptica o reflectancia en comparación con el material circundante. El lector de patrones de referencia es un lector óptico típicamente configurado para leer los indicios por transmitancia o reflectancia.

En otros modos de realización, el primer sustrato puede incluir un canal formado, por ejemplo, mediante moldeo por inyección. El canal tiene una primera dimensión (longitud) sustancialmente mayor que su segunda y tercera dimensión (es decir, anchura y profundidad). El canal puede tener una sección transversal que sea rectangular, con forma de V (triangular), con forma de U u otra forma. En algunos modos de realización, la forma y/o

dimensiones de la sección transversal del canal pueden variar a lo largo de la longitud del canal. El segundo sustrato se puede fijar al primer sustrato mediante un adhesivo. El segundo sustrato puede estar formado, por ejemplo, por una cinta transparente. El segundo sustrato (por ejemplo, la cinta) puede tener una rigidez mecánica, de modo que el contacto mecánico con una superficie exterior del segundo sustrato (por ejemplo, la cinta) no deforma sustancialmente la superficie interior del segundo sustrato.

En determinados modos de realización, el canal puede definirse por la superficie interior de un tubo, una tubería, un capilar o similares. El canal puede tener una sección transversal que sea rectangular, con forma de V (triangular) u otra forma. En algunos modos de realización, la forma y/o dimensiones de la sección transversal del canal pueden variar a lo largo de la longitud del canal. Una parte del canal puede ser visualmente transparente.

En algunos modos de realización, el canal incluye una o más marcas de referencia y/o alineación, tales como estructuras definidas o moléculas inmovilizadas configuradas para ser detectables con el sistema de detección usado para el ensayo. Las marcas de alineación pueden incluir, por ejemplo, microesferas fluorescentes inmovilizadas, polímeros fluorescentes inmovilizados, proteínas, ácidos nucleicos y similares. Las marcas de alineación también pueden incluir estructuras físicas como microestructuras y similares.

El dispositivo se puede configurar para formar un circuito de fluido después de haber introducido la muestra en el canal. El circuito de fluido encierra la muestra de líquido en un bucle sin fin. Cuando la muestra líquida está encerrada en el circuito de fluido, y el volumen de la muestra de líquido es menor que el volumen total del circuito de fluido, el volumen restante en el circuito de fluido puede ser ocupado por un fluido de transporte. El fluido de transporte puede ser un líquido que es sustancialmente no miscible con el líquido de la muestra (por ejemplo, en virtud de la hidrofilia/hidrofobia o las diferencias de densidad). El fluido de transporte puede ser un gas, tal como, por ejemplo, aire. Típicamente, la muestra líquida estará presente en el circuito de fluido en una cápsula continua.

Una parte del circuito de fluido incluye una zona de compresión. La zona de compresión puede ser una longitud del circuito de fluido a lo largo de la cual al menos una pared del circuito es compresible o deformable. Cuando se aplica una fuerza de compresión localizada a la zona de compresión, la pared se deforma. Bajo una fuerza suficiente, la pared se puede comprimir en un grado que interrumpe el circuito de fluido. Más comúnmente, el circuito de fluido se interrumpirá en una localización predeterminada, donde el canal se llena con el fluido de transporte.

Una vez que se ha interrumpido el circuito de fluido, la localización de la muestra de fluido dentro del circuito de fluido se puede manipular moviendo la localización de la interrupción con respecto al resto del circuito de fluido. Mover la interrupción disminuye el volumen del fluido de transporte a un lado de la interrupción, con un aumento correspondiente en el volumen del fluido de transporte en el otro lado de la interrupción. Los cambios en el volumen dan como resultado una presión diferencial en los extremos de la muestra líquida (es decir, donde se encuentran la muestra líquida y el fluido de transporte). La muestra líquida responde moviéndose dentro del circuito de fluido para igualar las presiones.

Una o más zonas de prueba se pueden separar a lo largo del canal. Típicamente, cada ensayo incluye la interacción del compuesto de sonda con el analito respectivo o con un complejo respectivo que incluye el analito y un reactivo (por ejemplo, una etiqueta óptica).

La localización de la muestra dentro del canal puede controlarse mediante un actuador o rodillo configurado para someter una parte de la zona de compresión a una fuerza de compresión localizada. El dispositivo microfluidico se traslada en relación con el actuador o el rodillo de modo que la muestra viaje a una localización deseada dentro del canal. De forma alternativa, el rodillo se puede mover mientras el dispositivo permanece estacionario.

La FIG. 12A ilustra el circuito de fluido 10 en un estado cerrado. El circuito de fluido 10 incluye la primera zona 1, el canal microfluidico 2, la segunda zona 3 y la entrada 4. En algunos modos de realización, la primera zona 1 incluye una torta de matriz o sustancia. En el estado cerrado, la segunda zona 3 está estrechamente conectada a la entrada 4. La FIG. 12B muestra el circuito de fluido 10 en un estado abierto y listo para aceptar la muestra de líquido 5 en la entrada 4. Después de que la muestra líquida 5 se pone en contacto con la entrada 4, la acción capilar extrae la muestra líquida 5 a la primera zona 1. Las FIGS. 12C-12D muestran el circuito de fluido en un estado cerrado después de que se haya aplicado la muestra. El rodillo 6 se sitúa con respecto a la segunda zona 3 de modo que la segunda zona está en un estado no comprimido (como en la FIG. 12C) o en un estado comprimido (como en la FIG. 12D). La localización de la muestra líquida 5 dentro del circuito de fluido 10 se puede ajustar situando el rodillo 6 de modo que la segunda zona 3 esté en un estado comprimido, y mientras se mantiene el estado comprimido, mover el rodillo 6 en relación con la segunda zona 3 (ilustrado con flechas en la FIG. 12D). Debido a que el circuito de fluido está cerrado, el movimiento del rodillo 6 crea una presión diferencial a cada lado del rodillo; la presión diferencial induce el movimiento de la muestra líquida, restableciendo de este modo presiones iguales. El circuito de fluido se puede configurar para funcionar en un cartucho. En determinados ejemplos, el circuito de fluido puede tener una vía de flujo microfluidica capaz de comprimir a través de la deformación, un canal microfluidico que incluye una región de detección y un miembro de sellado que puede

formar un circuito de fluido cerrado de manera reversible o irreversible.

Las FIGS. 13A-13B muestran vistas en sección de un cartucho ejemplar 100. El cartucho 100 incluye el sustrato 101, el tapón 102 y un circuito de fluido que incluye la primera zona 103, los conductos 108, el canal 105, la segunda zona 104 y la conexión de entrada/estanqueidad 109. El canal 105 puede estar cubierto por una capa al menos parcialmente transmisible ópticamente. La primera zona 103 puede ser, por ejemplo, un capilar, seleccionado para contener un volumen de muestra deseado (por ejemplo,  $1 \cdot L$  a  $20 \cdot L$ ,  $2$  a  $10 \cdot L$  o aproximadamente  $5 \cdot L$ ). El capilar puede recubrirse con un anticoagulante en su superficie interior. La entrada 109 del capilar está configurada para recibir la muestra 106. En algunos modos de realización, la salida del capilar se abre a una cámara de reacción 110 con un volumen predeterminado de, por ejemplo, aproximadamente  $5 \cdot L$ ,  $10 \cdot L$  o  $20 \cdot L$ . En algunos modos de realización, la cámara de reacción 110 incluye un sedimento de reactivo 107. El sedimento de reactivo puede incluir anticuerpos marcados con un tinte fluorescente y que tengan afinidad por los antígenos que se van a detectar dentro de la muestra. Por ejemplo, para detectar el número de células T auxiliares en una muestra líquida, el sedimento de reactivo puede incluir un anticuerpo anti-CD4+ marcado con un primer tinte fluorescente (como la ficoeritrina) y un anticuerpo anti-CD3+ marcado con un segundo tinte fluorescente tal como (ficoeritrina-Cy5), sales y reactivos estabilizantes, etc. En algunos modos de realización, la superficie interior de la primera zona está cubierta con los reactivos necesarios para procesar la muestra. Un ensayo ejemplar para detectar partículas tales como células en una muestra líquida se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/051861, que se incorpora por referencia en su totalidad. El conducto 108 en comunicación fluida con la cámara de reacción 110 conecta la cámara de reacción con el primer extremo del canal 105. Como se describe en el documento WO 2007/051861, la detección puede tener lugar en el canal. Por tanto, el canal es al menos parcialmente ópticamente transparente. Por ejemplo, el canal 105 puede estar cubierto por una capa al menos parcialmente transmisible ópticamente. El segundo extremo del canal 105 está conectado a un primer extremo de la segunda zona 104 por medio del conducto 108. La segunda zona es al menos parcialmente flexible, de modo que el diámetro interior de la segunda zona se puede reducir a cero. Por ejemplo, la segunda zona puede ser un tubo elástico de silicona o similares. Un segundo extremo de la segunda zona está montado en una tapa 102 que está adaptada para aplicarse al sustrato y para soportar la segunda zona. Al abrir el tapón, se abre la conexión de estanqueidad 109 entre la primera y la segunda zona, al cerrar el tapón, se cierra la conexión de estanqueidad 109 entre la primera y la segunda zona.

En condiciones de envío, el dispositivo puede cerrarse, es decir, la segunda zona forma una conexión de estanqueidad con la primera zona en la conexión 109. De forma alternativa, el dispositivo puede enviarse en un estado abierto. En algunos modos de realización, el dispositivo incluye (por ejemplo, por motivos de seguridad) un mecanismo configurado para evitar que el cartucho se abra después de cerrarse por primera vez. La conexión 109 se cierra cuando un miembro de sellado en el tapón 102 forma una conexión de estanqueidad de fluido con el extremo del capilar 103. En funcionamiento, el usuario abre el tapón, abriendo de este modo la primera zona en su primer extremo. El usuario pone en contacto el extremo abierto de la primera zona con el líquido de muestra, por ejemplo, una gota de sangre tal como la producida por una punción dactilar. Por tanto, el capilar 103 se llena con la muestra. El usuario cierra el tapón, cerrando de este modo la conexión 109 entre la primera y la segunda zona. En este punto, el circuito de fluido incluye un volumen contiguo predeterminado de líquido de muestra, el sedimento de reactivo y un volumen contiguo de fluido de transporte (por ejemplo, aire) dentro de la cámara de reacción, los conductos, el canal y la segunda zona. El usuario coloca el dispositivo en la máquina diseñada para operar el dispositivo. La máquina incluye un actuador configurado para comprimir la segunda zona, un detector y un controlador. El actuador comprime la segunda zona, reduciendo su diámetro en el punto de compresión a cero. Cuando el dispositivo y el actuador se mueven uno con respecto al otro en un estado comprimido, la presión en el fluido de transporte aumentará en un extremo del volumen de la muestra, mientras que disminuirá en el otro extremo del volumen de la muestra. El volumen de muestra se moverá dentro del circuito de fluido hasta que la presión en cada extremo del volumen de muestra sea igual.

El canal 105 puede ser hidrófobo, de modo que la muestra no se moverá al canal 105 sin la aplicación de una fuerza externa. En algunos modos de realización, las paredes cercanas al sedimento de reactivo 107 también pueden ser hidrófobas. Cuando se usan materiales hidrófilos, la estabilidad a largo plazo del sedimento de reactivo puede ser peor en comparación con un material hidrófobo.

En un modo de realización, el actuador se fija dentro de la máquina y el dispositivo se mueve con respecto a los medios de compresión. Como se describe en el documento WO 2007/051861, el actuador es, por ejemplo, un rodillo.

El dispositivo se puede mover dentro de la máquina de modo que la muestra se mueva a la cámara de reacción disolviendo de este modo el sedimento de reactivo en esta cámara. Los anticuerpos se unirán a los antígenos respectivos presentes en la muestra. Dependiendo del tipo de muestra, los antígenos pueden localizarse en partículas suspendidas en el líquido de muestra (por ejemplo, en superficies celulares de una muestra de sangre). Debido a que los anticuerpos están marcados (por ejemplo, con un tinte fluorescente), una vez unidos a sus respectivos antígenos, los antígenos también se marcan. Véase, por ejemplo, el documento WO 2007/051861. Al mover aún más el dispositivo en relación con la máquina en la misma dirección, la muestra se mueve al canal. Una vez que se llena el canal, tiene lugar la detección.

Deseablemente, el sensor es pequeño, económico y versátil; es decir, es adaptable a otras aplicaciones que no sean únicamente el uso descrito aquí. El sensor puede ser un microscopio de fluorescencia, preferentemente uno que tenga dimensiones exteriores muy pequeñas y una altura pequeña con respecto al cartucho. El sensor puede ser capaz de obtener imágenes de objetos con un tamaño  $\geq 5 \cdot \mu\text{m}$  y está configurado para detectar señales de la longitud de onda que emiten los tintes fluorescentes usados en el ensayo. La fuente de luz puede ser un LED de alta potencia que emite luz en un espectro que es adecuado para excitar los tintes fluorescentes usados en el ensayo. Si se usan diferentes tintes, por ejemplo, al menos dos tintes diferentes que emiten luz a dos longitudes de onda diferentes, la detección debería ser posible en cada una de al menos dos longitudes de onda diferentes. El sensor puede incluir un mecanismo de enfoque y una cámara.

Deseablemente, una unidad de detección como se usa en el presente documento es cualquier sistema óptico, electrónico o mecánico, etc. capaz de detectar una forma, tamaño, brillo o cualquier otro parámetro de un objeto o una imagen. Una unidad de detección puede comprender o consistir, por ejemplo, en una unidad de escaneo o sistema de escaneo o una parte de la misma, por ejemplo, como se menciona anteriormente en el presente documento.

Normalmente, se usan fuentes de luz muy fuertes para la microscopía de fluorescencia, ya que para tener haces de luz casi paralelos, solo se usa una pequeña porción de la luz emitida (ángulo sólido  $\sim 2^\circ$ ). Al usar una lente condensadora y una lente de sensor que recolecta una mayor porción de luz emitida desde la fuente, se puede usar una fuente menos potente (por ejemplo, un LED). La microscopía de fluorescencia coloca tradicionalmente un valor muy alto en la fidelidad óptica; como tal, el campo enseñado desde ángulos sólidos altos para lentes de condensador. De hecho, el campo ha tendido a enseñar sistemas ópticos relativamente pesados, voluminosos y complejos para lograr una alta fidelidad óptica.

Con referencia a la FIG. 14, un sensor ejemplar 500 incluye un cuerpo principal 501 que incluye una primera vía óptica 502 y una segunda vía óptica 503. En determinados ejemplos, cada una de las vías ópticas, independientemente, pueden tener una forma en general cilíndrica u otra configuración adecuada. La primera vía óptica 502 representa la vía óptica de excitación; la segunda vía óptica 503 representa la vía óptica de detección.

La primera vía óptica 502 conecta la fuente de luz 505 con el cartucho 516. La fuente de luz 505 puede ser un LED de alta potencia (tal como un LED Platinum Dragon® (Osram)) con longitudes de onda de emisión de 455 nm, 470 nm y 528 nm y un ángulo de visión de  $120^\circ$  (emisor lambertiano). Cuando se usan tintes fluorescentes, la fuente de luz se selecciona de acuerdo con la longitud de onda de excitación de los tintes fluorescentes que se usan en el ensayo. Por ejemplo, cuando se usa ficoeritrina y ficoeritrina-Cy5, la fuente de luz se selecciona para emitir luz con una longitud de onda de alrededor de 520 nm, mientras que para el uso de ficoeritrina y PerCP la fuente de luz se selecciona para emitir luz de alrededor de 480 nm. La lente del condensador 506 (por ejemplo, hecha de topacio, índice de refracción 1.533) condensa la luz emitida por el LED en la primera ruta óptica 502. La abertura 502a está configurada para permitir un ángulo sólido máximo de  $13,5^\circ$  o menos para iluminar el espejo dicróico 504. La vía óptica 502 también incluye un filtro de paso de banda 507 (filtro de excitación), que permite el paso de luz con una longitud de onda de entre 505 nm y 530 nm. Por tanto, la longitud de onda de excitación restante sería de alrededor de 528 nm.

La vía óptica 503 conecta la cámara CMOS con el objeto 516 por medio del espejo dicróico 504 y está configurada en un ángulo (mostrado como  $90^\circ$  en la FIG. 14) con respecto a la vía óptica 502. La vía óptica 503 también incluye un primer filtro de emisión 510. En algunos modos de realización, el filtro 510 está montado en un cambiador de filtro 512. El cambiador de filtro 512 puede incluir filtros de emisión adicionales, por ejemplo, un filtro 513. Los filtros de emisión 510 y 513 se pueden seleccionar con respecto a un conjunto predeterminado de longitudes de onda de emisión, por ejemplo, las longitudes de onda de emisión del (de los) tinte(s) fluorescente(s) usado(s) para etiquetar los reactivos en el cartucho. Por ejemplo, los filtros 510 y 513 se pueden seleccionar para pasar luz con longitudes de onda de 590 nm y 685 nm, respectivamente, correspondientes a las longitudes de onda de emisión de ficoeritrina y ficoeritrina-Cy5. La vía óptica 503 incluye una abertura 503a configurada para permitir un ángulo sólido máximo de  $13,5^\circ$  en el espejo dicróico 504.

El espejo dicróico 504 está configurado para separar la vía óptica de detección 503 de la vía óptica de excitación 502. En algunos modos de realización, es un espejo dicróico de paso corto que permite que pase luz con una longitud de onda  $\leq 568$  nm mientras se refleja luz con una longitud de onda  $> 568$  nm. Por tanto, el espejo dicróico 504 permite que pase la luz de la vía óptica de excitación mientras que la luz del objeto 516 se refleja en la vía óptica de detección. Nuevamente, las propiedades físicas del espejo dicróico 504 se seleccionan de acuerdo con las etiquetas (por ejemplo, los tintes fluorescentes) que se usan en el ensayo.

En algunos modos de realización, el sensor incluye además un mecanismo de enfoque 514 que permite variar la distancia de la lente de detección 508 y el objeto continuamente en 5 mm o menos, por ejemplo, en 1 o 2 mm.

En algunos modos de realización, la lente de detección 508 está configurada para tener una abertura óptica de detección de 0,4 o menos, por ejemplo, 0,2 y una abertura óptica de excitación de 0,5 o menos, por ejemplo, 0,4.

El sensor también puede incluir un dispositivo de formación de imágenes digitales, tal como una cámara CMOS de 8 bits de valor de gris con una resolución de, por ejemplo, 640 x 480 píxeles. En otros modos de realización, el dispositivo de formación de imágenes digitales puede tener una resolución más alta y/o puede ser una cámara CMOS en color.

En algunos modos de realización, la escala de reproducción del sistema de detección está entre 1:1 y 1:10, por ejemplo, 1:3, 1:4 o 1:5.

En algunos modos de realización, la distancia entre el objeto 516 y la lente de detección 508 está entre 2 mm y 20 mm, por ejemplo, 8 mm, 9 mm o 10 mm.

Con referencia a la FIG. 15, en funcionamiento, la luz emitida desde la fuente de luz 505 se condensa por medio de la lente 506 y se filtra por medio del filtro de excitación 507. Pasa la abertura 502a, el espejo dichroico 504, la lente de detección 508, la abertura 509 y excita el objeto 601. En algunos modos de realización, el objeto 516 es el canal lleno con el líquido de la muestra, por ejemplo, sangre, incluyendo el líquido un número de partículas, por ejemplo, células T auxiliares que se van a detectar. Las partículas pueden marcarse con uno o más anticuerpos acoplados a tintes fluorescentes. En otros modos de realización, el objeto es un canal que incluye moléculas diana marcadas con uno o más tintes fluorescentes y unidas a moléculas de sonda o un conjunto de moléculas de sonda inmovilizadas en una de las superficies del canal. Los tintes son fluorescentes bajo la influencia de la luz de excitación del LED. La luz emitida por los tintes fluorescentes pasa por la abertura 509, la lente de detección 508 y se refleja por medio del espejo dichroico 504 en la vía óptica de detección 503. Allí pasa el filtro de detección 510 (o 513, dependiendo de la posición del cambiador de filtro 512) adaptado para permitir el paso de la luz de una longitud de onda de la luz emitida por el tinte fluorescente. Después de que la luz haya pasado el filtro, el chip CMOS de la cámara CMOS 511 adjunta lo recolecta.

Las FIGS. 16A-16B ilustran cómo se puede usar el sensor para detectar, por ejemplo, el número de células T auxiliares presentes en una muestra de sangre. Los detalles del dispositivo y la reacción se pueden encontrar anteriormente y en el documento WO 2007/051861 que se incorpora en el presente documento como referencia. En el ejemplo analizado, el cartucho se prepara con dos anticuerpos marcados: anticuerpos anti CD4 marcados con ficoeritrina y anticuerpos anti-CD3 marcados con ficoeritrina-Cy5. Como las células T auxiliares muestran ambos antígenos en su superficie, las células T auxiliares se marcarán con ambos tintes fluorescentes. Otras células, que muestran solo uno de los dos antígenos en sus superficies, también pueden estar presentes en la muestra. Estas células se marcarán solo con uno de los tintes fluorescentes correspondientes.

Después de la reacción con los respectivos anticuerpos marcados con tinte fluorescente, la muestra líquida que comprende células fluorescentes 712 se mueve al canal de detección 711. En una primera posición (FIG. 16A), el sensor 710 detecta una primera imagen 714 que representa una vista en una porción 713 del canal 711. La porción 713 representa un volumen predeterminado de la muestra, por ejemplo, 100 nL. La imagen 714 se toma con un primer filtro que está configurado para permitir la luz emitida por los anticuerpos anti CD4+ marcados con ficoeritrina presentes en la muestra y para bloquear la luz emitida por los anticuerpos ficoeritrina-Cy5-anti-CD3. Se toma una segunda imagen 715 de la misma posición usando un segundo filtro que está configurado para permitir anticuerpos ficoeritrina-Cy5-anti-CD3 y para bloquear la luz emitida por el anti-CD4+ marcado con ficoeritrina. Las imágenes 714 y 715 pueden mostrar un número diferente de señales dentro de la porción 713. Adicionalmente, debido a las anomalías en el sistema óptico, ambas imágenes 714 y 715 pueden estar desalineadas entre sí.

El software (por ejemplo, Iconoclust de Clondiag) se puede usar para alinear ambas imágenes 714 y 715, por ejemplo, usando marcas de alineación en el canal (no se muestra) o analizando las relaciones entre las señales que están presentes en ambas imágenes. Adicionalmente, el software identifica y marca las señales que se han detectado en ambas imágenes (716). En la FIG. 16A, se identificaron tres señales para estar presentes en ambas figuras. Esto significa que se encontraron 3 células con ambos antígenos en la porción 713. Los resultados pueden mostrarse, usarse para otros cálculos o estadísticas o pueden almacenarse para su posterior procesamiento.

El sensor 710 y el canal 711 se mueven uno con respecto al otro para ver otra porción 717 del canal 711 (FIG. 16B) y se repite el procedimiento de detección. Las imágenes 718 y 719 se registran, usando el primer y segundo filtro respectivamente. El software identifica y marca las señales que se han detectado en ambas imágenes (720).

La detección puede repetirse en las porciones adicionales del canal de detección, dando como resultado un conjunto de valores que representan el número de células en cada una de las porciones. El número de células presentes en la muestra, así como los parámetros estadísticos correspondientes se pueden calcular a partir de este conjunto de valores. Por ejemplo, un promedio de tres células por 100 nL corresponde a una cantidad total de 150 células en un volumen de muestra de 5 • L.

La FIG. 17 muestra una superposición de dos imágenes detectadas durante un experimento de recuento de células T usando sangre como muestra líquida. Ambas imágenes se detectan en la misma localización del canal (por ejemplo, como las imágenes 714 y 715 en la FIG. 5) usando dos filtros de detección diferentes. 801 y 802 representan una marca de alineación visualizada usando dos filtros de detección diferentes. La dislocación entre ambas imágenes se puede detectar y corregir claramente usando las marcas. 803 y 804 representan una sola célula que se disloca a la misma distancia como las marcas de alineación 801 y 802. Dado que esta célula está presente en ambas imágenes, se puede determinar que esta célula está marcada con ambos anticuerpos y, por tanto, es una célula T auxiliar. 805 representa una célula que solo es detectable en una de las dos imágenes de la superposición. Por tanto, se puede deducir que esta célula no muestra ambos antígenos en su superficie y, por lo tanto, no es una célula T auxiliar. También se pueden ver otros glóbulos sanguíneos en las imágenes. Como no están marcados con ningún anticuerpo fluorescente, solo pueden verse como una sombra (806).

La FIG. 18 muestra un capilar 1001 que incluye una torta de matriz o sustancia 1002, por ejemplo, un liofilizado. La matriz 1002 incluye diversas sustancias tales como inhibidores de coagulación, reactivos estabilizadores y anticuerpos marcados, etc. En algunos modos de realización, la matriz llena el diámetro completo del cartucho. En algunos modos de realización, la matriz llena solo una parte de la longitud del capilar. En algunos modos de realización, la estructura de la matriz permite que un líquido penetre en la matriz en forma de sedimento o torta.

Como se puede ver en la FIG. 18 B, cuando se aplica una muestra 1004 al capilar, se moverá hacia el mismo impulsada por fuerzas capilares. Cuando la muestra 1004 fluye a través de la matriz, la matriz puede disolverse (1002a) y los reactivos 1003 se disuelven dentro de la muestra. Disolver la matriz es compatible con la muestra en movimiento por sí misma; la muestra se empapa a través de la matriz hacia el capilar mediante fuerzas capilares creando de este modo un flujo de fluido que actúa sobre la matriz. Por tanto, la disolución del sedimento no solo se controla por difusión. Finalmente, cuando el capilar se llena con la muestra (véase la FIG. 18C), la matriz ya puede estar más o menos completamente disuelta. Pequeños restos del sedimento pueden disolverse ahora por procesos controlados por difusión.

La FIG. 19 muestra un modo de realización ejemplar para el flujo de trabajo en un dispositivo o cartucho. El cartucho puede contener un puerto de muestra con un capilar de extremo a extremo (para contener, por ejemplo, 5 • l de muestra) que contiene reactivos secos como se describe en el presente documento necesarios para realizar la prueba. La muestra se aplica primero al extremo capilar del cartucho (1). La muestra se extrae en el capilar de extremo a extremo por fuerza capilar (2). Los reactivos proporcionados en el capilar se vuelven a suspender en la muestra. El cartucho puede tener un tapón fijado a presión. Después de aplicar la muestra, el tapón se cierra y el cartucho se coloca en el sistema (3). Esto puede eliminar el remanente. El llenado completo del capilar de extremo a extremo se puede evaluar visualmente, a través de una pequeña ventana en el cartucho. Por tanto, el usuario puede evaluar si el capilar ha tomado una muestra suficiente antes de que el proceso de prueba se haya inicializado en el sistema. Después de cargar el cartucho de prueba en el sistema, el sistema verifica el llenado por medio de una ventana de medición de reflectancia. Un rodillo que forma parte del dispositivo o sistema se pone en contacto con el tubo del cartucho o el canal microfluídico (4). El cartucho se mueve a lo largo del rodillo. El canal microfluídico es parte de un círculo de fluido vía de flujo cerrado. Por tanto, el cartucho y el rodillo pueden formar una bomba peristáltica que se usa para mover activamente la muestra dentro del cartucho (5). La muestra se traslada primero a una contención de reacción y a continuación repetidamente de un lado a otro para apoyar la mezcla apropiada del reactivo y la unión de los anticuerpos a los antígenos respectivos. Después de un tiempo de incubación predefinido, la muestra teñida se traslada a la contención o región de detección y los analitos, por ejemplo, las células, se dejan sedimentar durante un período de tiempo definido (6). El canal de detección se escanea a lo largo de un módulo óptico de fluorescencia y las imágenes se recogen en dos longitudes de onda diferentes a lo largo del canal (7).

En algunos modos de realización, un dispositivo o sistema como se describe anteriormente puede comprender una abertura de ventilación o abertura configurada para ventilar el canal microfluídico. Dicha abertura de ventilación puede localizarse entre la región de detección y un segundo extremo de la región de entrada, por ejemplo, una entrada capilar, que está adaptada para recibir la muestra. En dicha realización, el segundo extremo es el extremo opuesto a un primer extremo adaptado para recibir la muestra. La abertura puede proporcionar una conexión fluida del segundo extremo de la entrada capilar con el aire ambiente. Además, la entrada capilar adaptada para recibir la muestra puede estar dispuesta de tal manera que un movimiento de la entrada capilar dentro del canal microfluídico permitirá cerrar la abertura de ventilación. La abertura puede ser, por ejemplo, un agujero que atraviesa una pared del canal microfluídico y conecta el extremo interior del capilar adaptado para recibir la muestra con el aire ambiente.

Las FIGS. 20 y 21 muestran modos de realización ejemplares de la abertura de ventilación en estado abierto (FIG. 20) y cerrado (FIG. 21). Aquí, la entrada capilar 2002 está montada en el cartucho 2001 de modo que el primer extremo 2002a de la entrada capilar puede ponerse en contacto con una muestra (no mostrada) y el segundo extremo 2002b está en comunicación fluida con el aire ambiente que rodea el cartucho 2001 por medio de la abertura 2006 y con el canal 2005 por medio de la estructura 2004. La estructura 2004 puede adaptarse para formar una conexión de estanqueidad entre el segundo extremo 2002b de la entrada capilar 2002 y el canal 2005, lo que puede dar lugar a otros compartimentos del cartucho, tal como la región de detección. Después de

cargar la muestra en la entrada capilar, la entrada capilar 2002 se puede mover hasta que entre en contacto con la estructura 2004 (véase la FIG. 22). Con este movimiento, la abertura 2006 se cierra y la muestra puede fluir hacia el canal 2005.

5 Las FIGS. 22-24 muestran vistas detalladas de una entrada capilar ejemplar adaptada para recibir la muestra de un dispositivo como se describe anteriormente. En este modo de realización, el cartucho 2001 puede comprender uno o más, por ejemplo, tres medios 2003 para soportar la entrada capilar 2002. Dichos medios pueden estar montados en o pueden ser parte del cartucho 2001. Los medios 2003 para soportar la entrada capilar 2002 permiten un posicionamiento de la entrada capilar dentro del sustrato, así como un movimiento de la  
10 entrada capilar dentro del sustrato. Los medios 2003 para soportar la entrada capilar pueden guiar la entrada capilar sobre toda el área donde la entrada capilar está montada en el sustrato o soportar la entrada capilar solo puntualmente.

15 Como se ilustra en la FIG. 22, en un primer estado, la entrada capilar 2002 para recibir la muestra está en una primera posición y es soportada por los medios 2003 para soportar la entrada capilar dentro del sustrato 2001. Por ejemplo, los medios 2003 para soportar la entrada capilar son barras que permiten el posicionamiento y el movimiento de la entrada capilar 2002 dentro del sustrato 2001. Las barras 2003 pueden estar separadas entre sí por espacios o aberturas 2006 que se extienden a lo largo de las barras y conectan la estructura 2004 con el  
20 aire ambiente. La estructura 2004 permite formar una conexión estrecha con el segundo extremo 2002b de la entrada capilar 2002 y el canal 2005 que conduce a la región de detección del canal microfluídico.

En algunos modos de realización, la estructura 2004 puede ser un agujero que tiene un diámetro interior, en el que el diámetro interior es sustancialmente igual al diámetro exterior de la entrada capilar.

25 En otros modos de realización, la estructura 2004 puede ser un agujero cónico que tiene un primer y un segundo diámetro. El primer diámetro puede adaptarse para formar un embudo para el segundo extremo de la entrada capilar y puede ser sustancialmente igual o mayor que el diámetro exterior de la entrada capilar; el segundo diámetro puede adaptarse para formar una conexión estrecha con el canal 2005 y puede ser igual o menor que el diámetro exterior de la entrada capilar.  
30

En la primera posición, la entrada capilar 2002 no está en contacto con la estructura 2004. Por lo tanto, el aire puede desplazarse directamente desde la entrada capilar al aire ambiente por medio de los espacios o aberturas 2006 entre las barras 2003, por ejemplo, llenando la entrada capilar con la muestra.

35 En la FIG. 23, la entrada capilar 2002 para recibir la muestra está en una segunda posición. En este modo de realización, se forma una conexión estrecha entre la entrada capilar 2002 y el canal 2005 por medio de la estructura 2004. La conexión se puede cerrar, por ejemplo, moviendo la entrada capilar 2002 en las barras 2003 hacia el canal 2005. El movimiento puede iniciarse o causarse aplicando una fuerza externa en el primer extremo 2002a de la entrada capilar 2002. La fuerza externa se puede aplicar, por ejemplo, manualmente,  
40 automáticamente en un dispositivo que opera el cartucho o al cerrar un tapón del cartucho. La FIG. 24 es una vista superior en el primer extremo 2002a de la entrada capilar 2002. Además, se muestran los medios 2003 para soportar la entrada capilar 2002 y los espacios o aberturas 2006.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo para detectar un analito en una muestra, que comprende:

5 un cartucho (2001) que tiene:

un canal microfluídico (2005) que comprende un primer extremo (2002a) y un segundo extremo (2002b) y entre el primer y el segundo extremo una región de entrada (2002), una región de detección en comunicación fluida con la región de entrada (2002), y una abertura (2006) configurada para ventilar el canal microfluídico (2005);

una vía de flujo microfluídica que tiene una pared al menos parcialmente deformable y en comunicación fluida con la región de detección del canal (2005),

15 **caracterizado por que** la región de entrada (2002) es móvil con respecto a la abertura (2006) y la abertura (2006), en una primera posición relativa de la región de entrada (2002) dentro del canal microfluídico (2005), está en comunicación fluida con la región de entrada (2002) y, en una segunda posición relativa de la región de entrada (2002) dentro del canal microfluídico (2005), está cerrada.

20 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la abertura (2006) está configurada para eliminar gas del canal microfluídico.

3. El dispositivo de la reivindicación 1 o 2, en el que la abertura (2006) es una abertura en una pared que rodea el canal microfluídico (2005).

25 4. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la abertura (2006) está en comunicación fluida con el fluido ambiental que rodea el canal microfluídico (2005).

30 5. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la abertura (2006) está en comunicación fluida con el fluido ambiental que rodea el cartucho (2001).

6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la abertura (2006) está localizada entre la región de entrada (2002) y la región de detección.

35 7. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la abertura (2006) está configurada para eliminar gas de la región de entrada (2002) durante el llenado del dispositivo con la muestra.

8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la abertura (2006) se puede cerrar.

40 9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la región de entrada es móvil a lo largo de un eje longitudinal del canal microfluídico, además opcionalmente en el que dicho dispositivo comprende además un tapón que tiene un miembro de sellado configurado para sellar con la región de entrada (2002), en el que el tapón está dispuesto de modo que el cierre del tapón mueve la región de entrada desde la primera posición relativa dentro del canal microfluídico (2005) a la segunda posición relativa dentro del canal microfluídico (2005) para formar un circuito cerrado de fluido que incluye la región de entrada (2002), la región de detección y la vía de flujo microfluídica.

50 10. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la abertura (2006) está configurada para introducir gas en el canal microfluídico (2005).

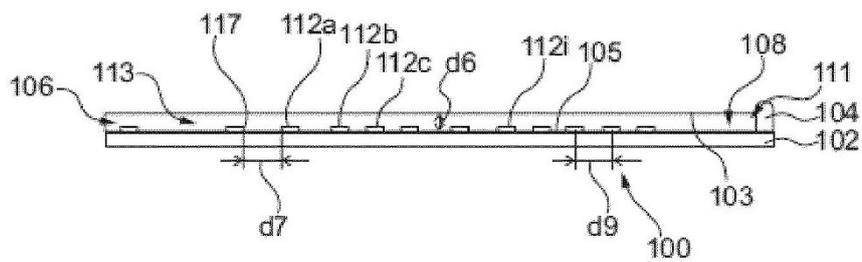
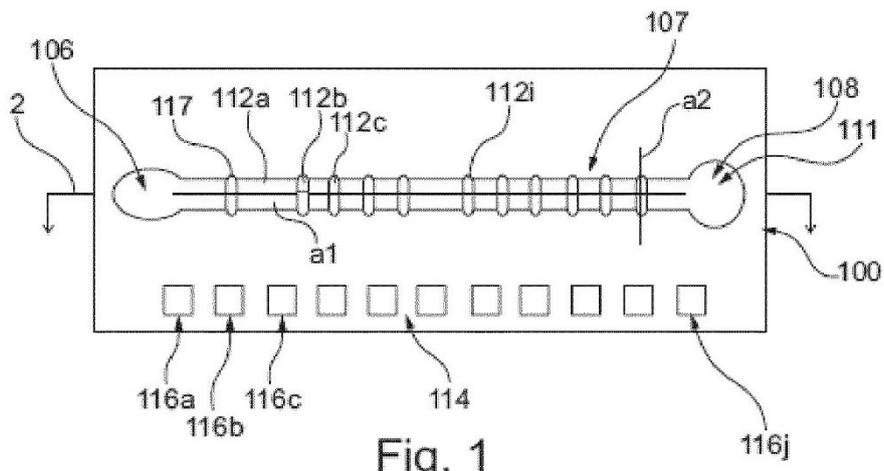
11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la abertura (2006) está configurada además para eliminar líquido y/o introducir líquido en el canal microfluídico (2005).

55 12. El dispositivo de la reivindicación 9, en el que el tapón y el cartucho (2001) están configurados para cerrarse irreversiblemente después de formar el circuito de fluido y/o en el que el tapón está unido de forma flexible al cartucho (2001).

60 13. El dispositivo de la reivindicación 12, en el que el tapón y el cartucho (2001) pueden estar configurados para engancharse en una primera posición relativa de modo que el tapón pueda retirarse y para engancharse en una segunda posición relativa de modo que el tapón pueda cerrarse irreversiblemente después de formar el circuito de fluido.

65 14. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la región de detección está limitada por al menos una superficie del cartucho (2001) y al menos una superficie de una tapa, opcionalmente en el que la tapa incluye una película transparente sobre la región de detección.

15. El dispositivo de la reivindicación 14, en el que la tapa está fijada adhesivamente al cartucho (2001).



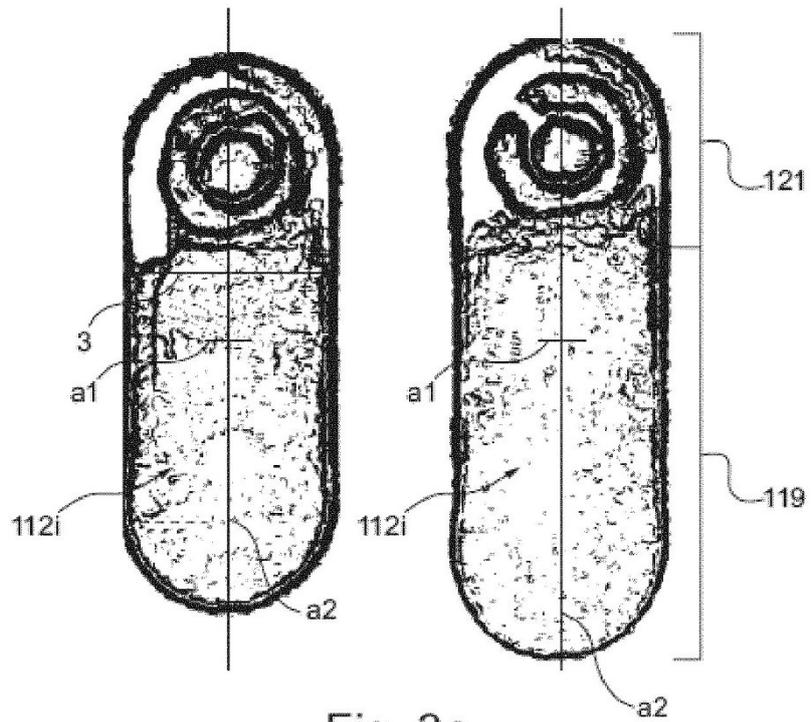
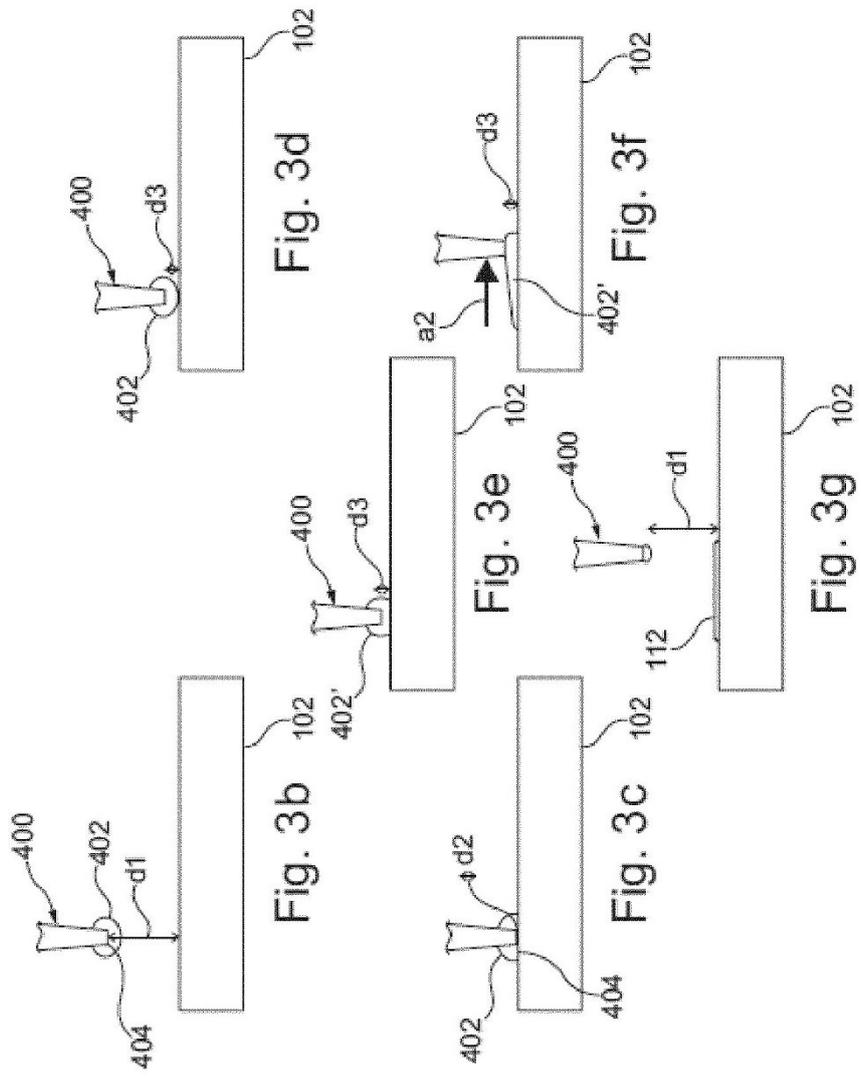


Fig. 3a



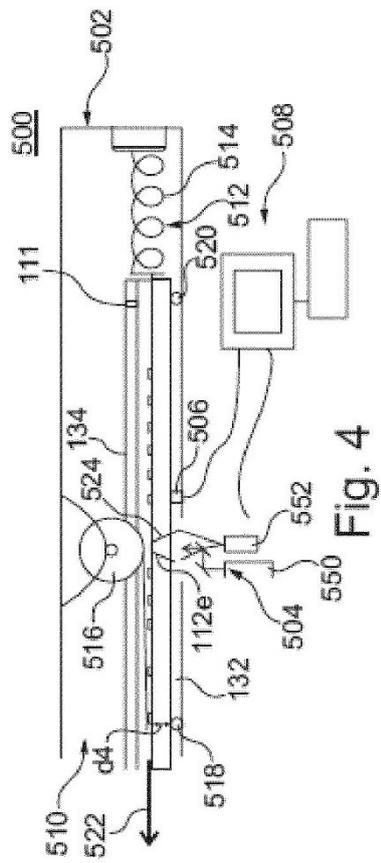


Fig. 4

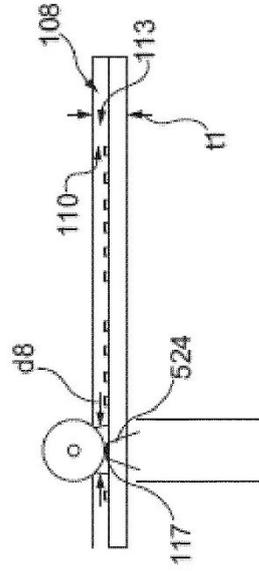


Fig. 5

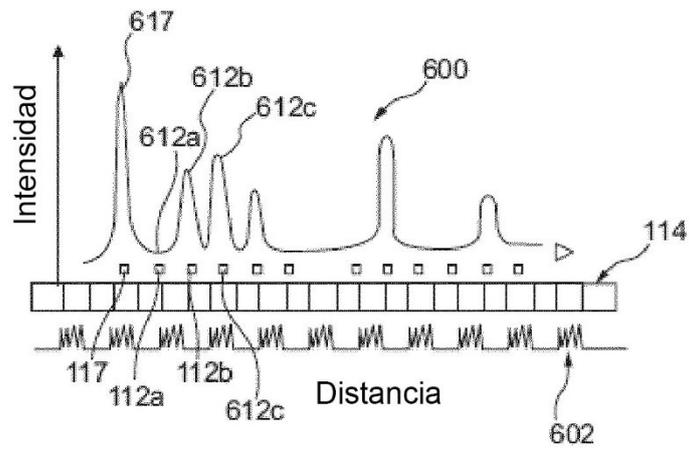


Fig. 6

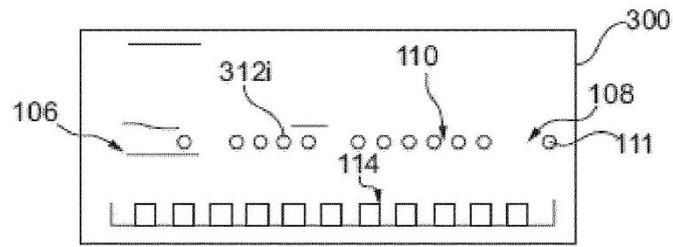


Fig. 7

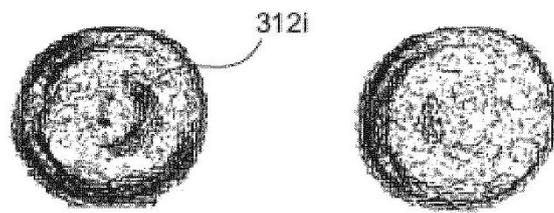


Fig. 8a

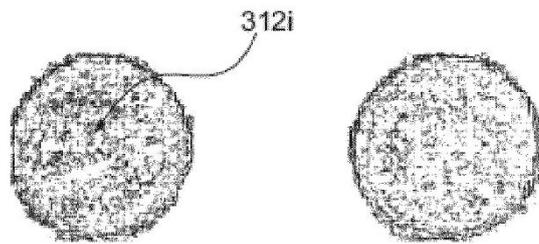


Fig. 8b

700

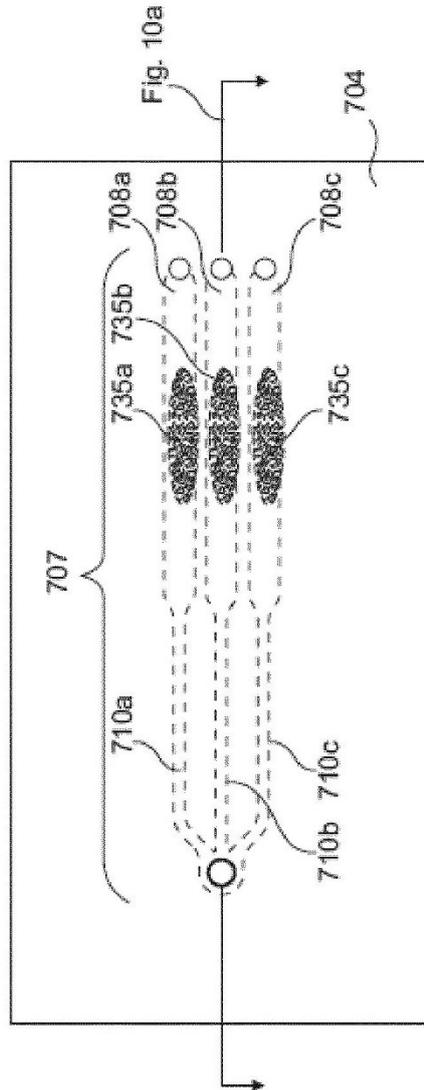


Fig. 9

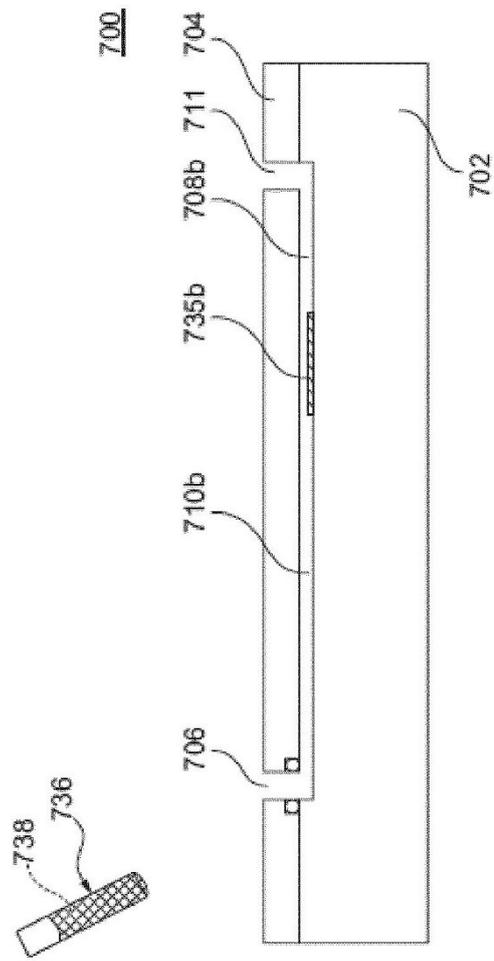


Fig. 10a

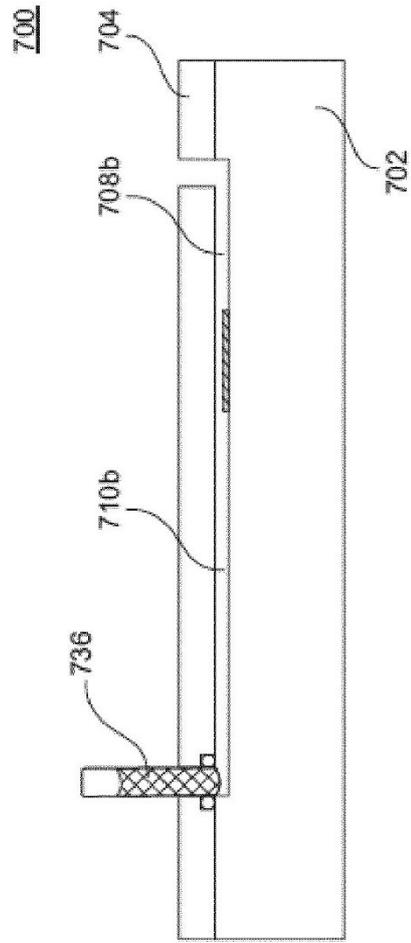


Fig. 10b

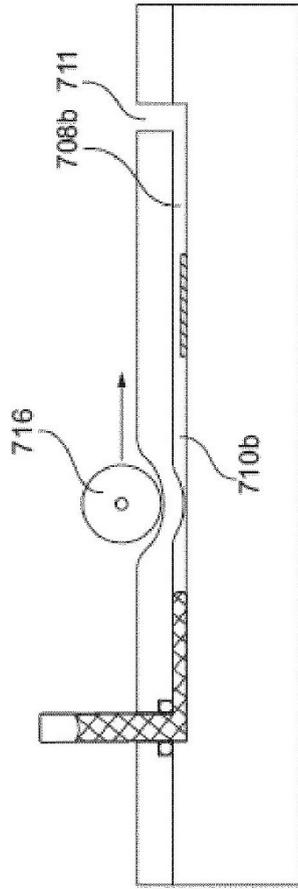


Fig. 10c

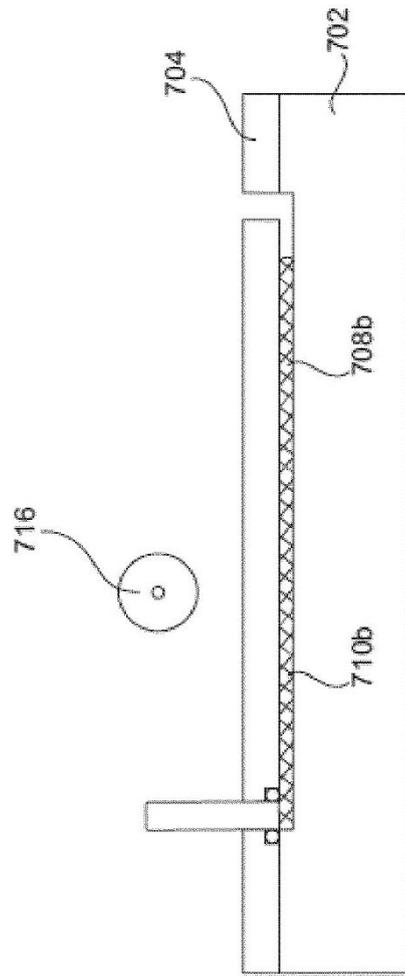


Fig. 10d

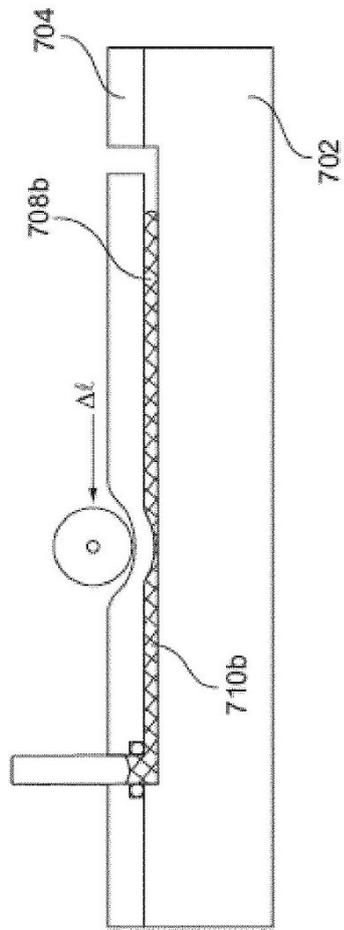


Fig. 10e

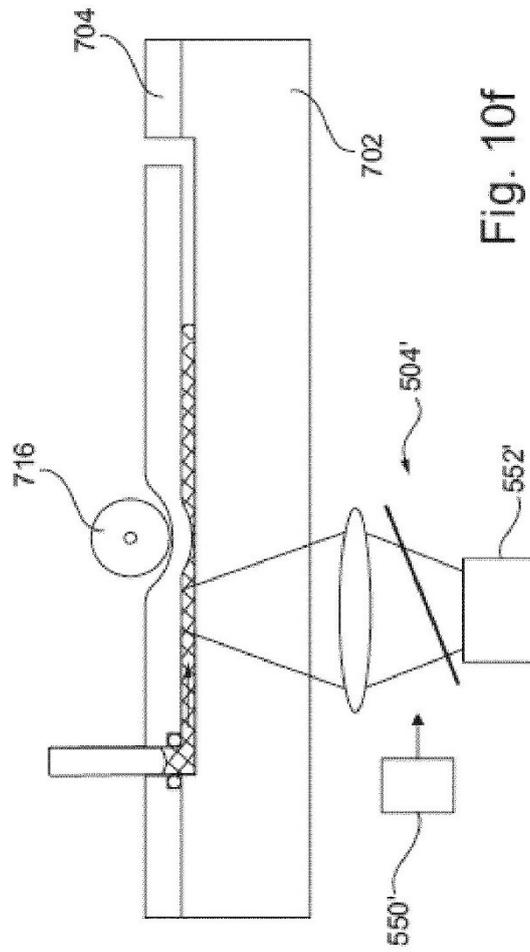


Fig. 10f

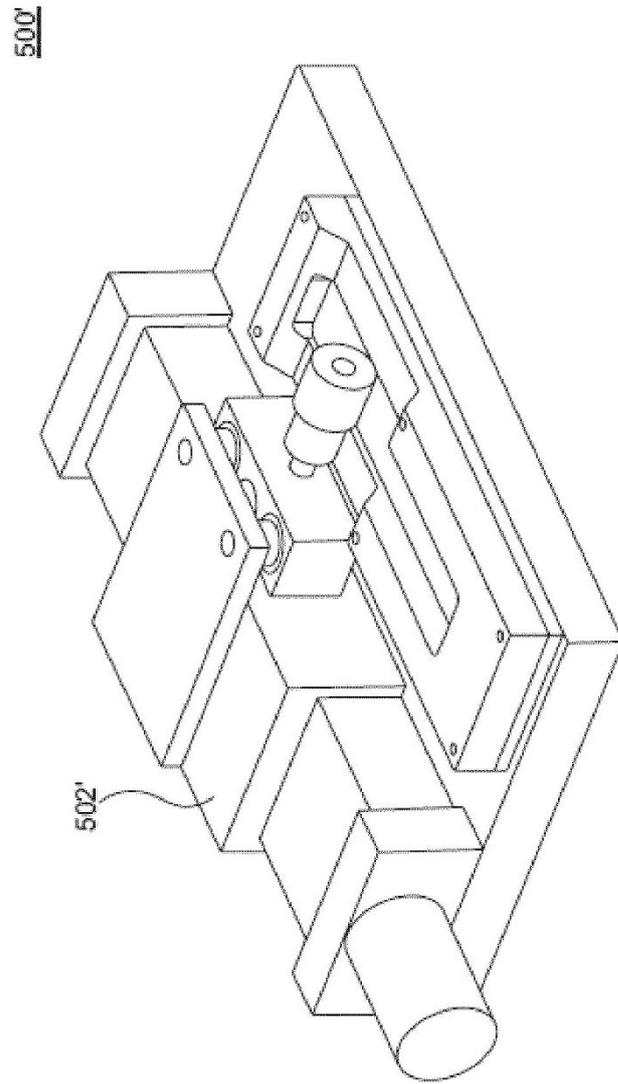


Fig. 11

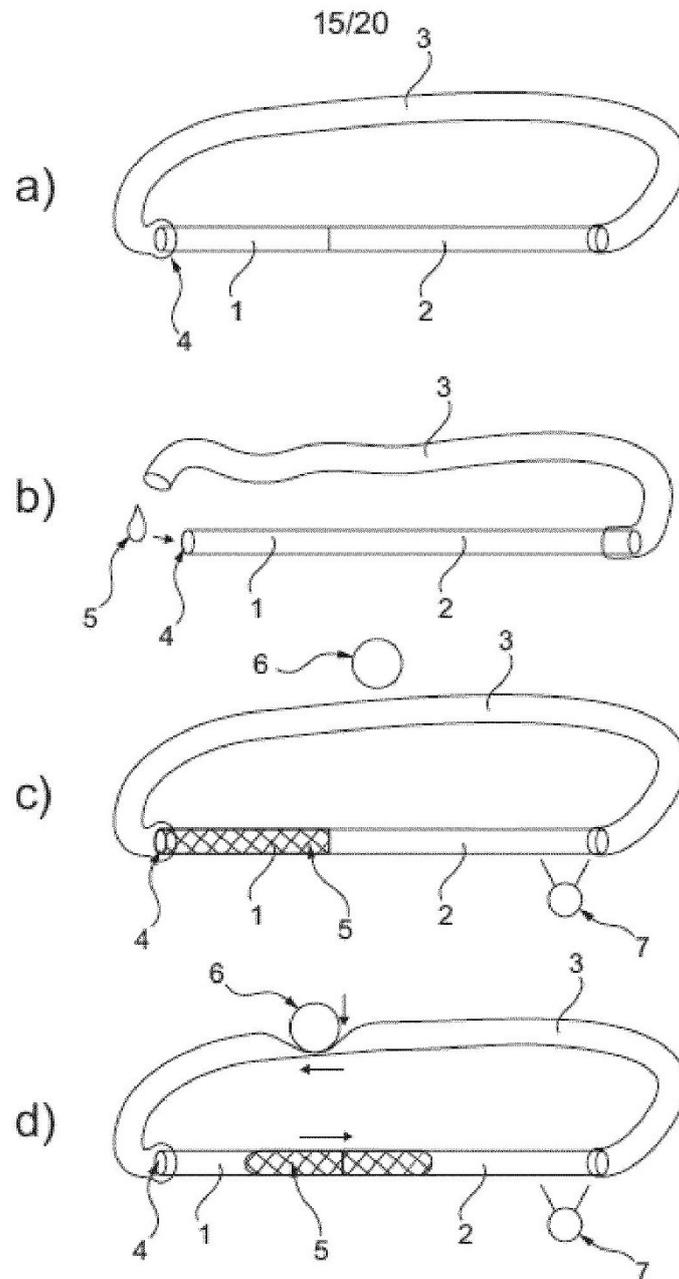


Fig. 12

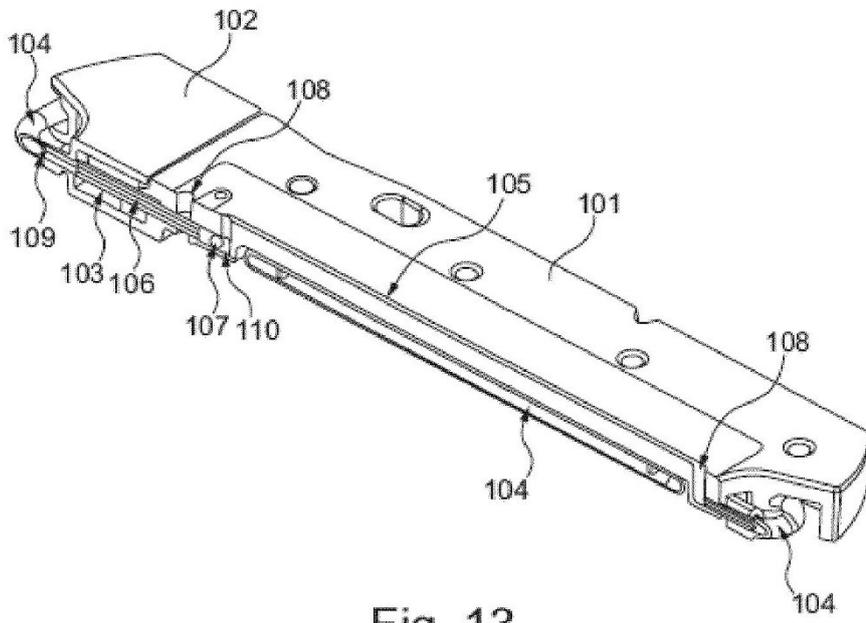
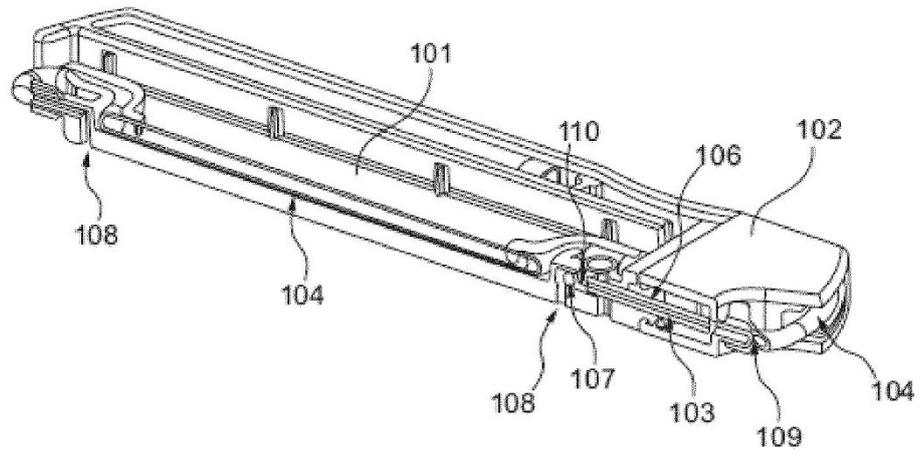


Fig. 13

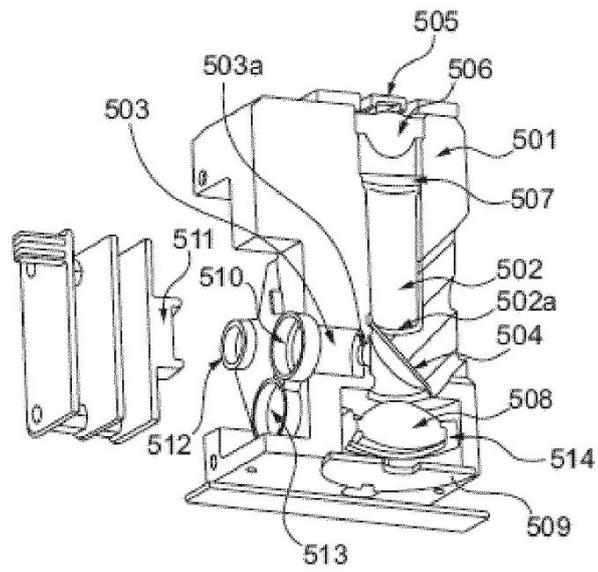


Fig. 14a

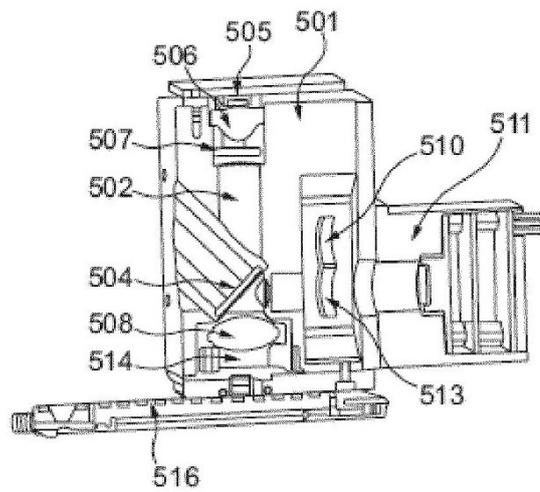


Fig. 14b

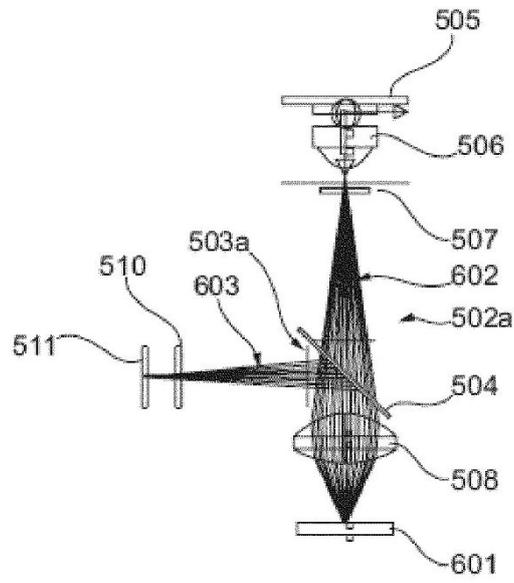


Fig. 15

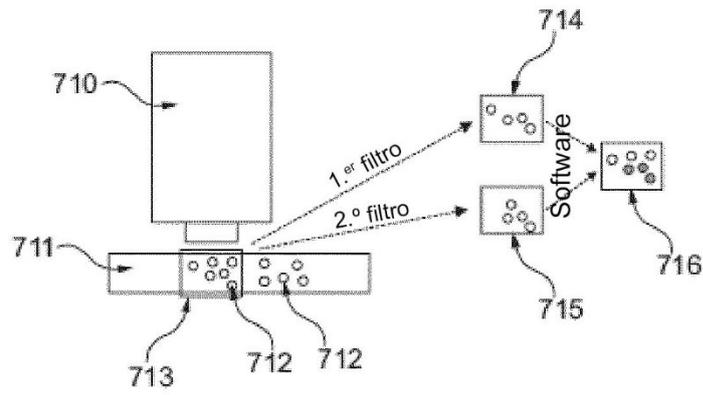


Fig. 16a

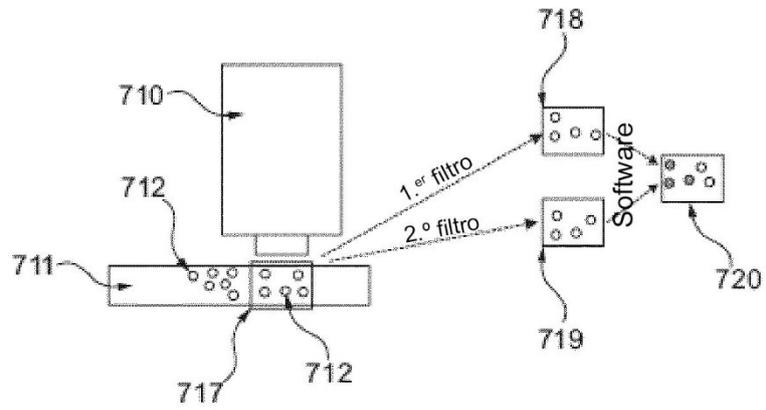


Fig. 16b

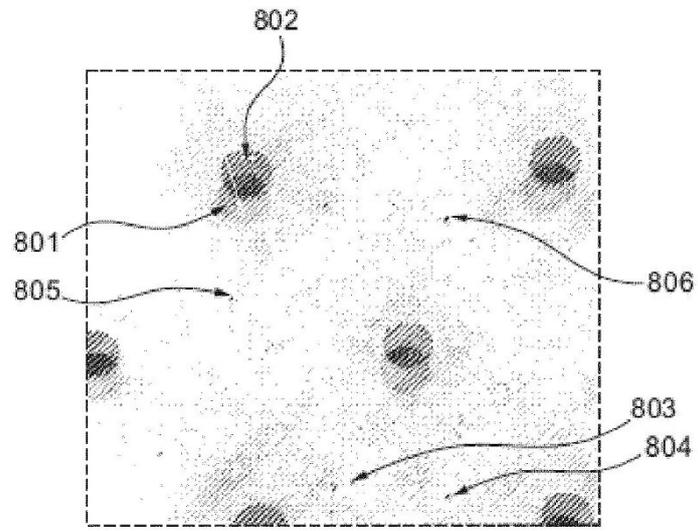


Fig. 17

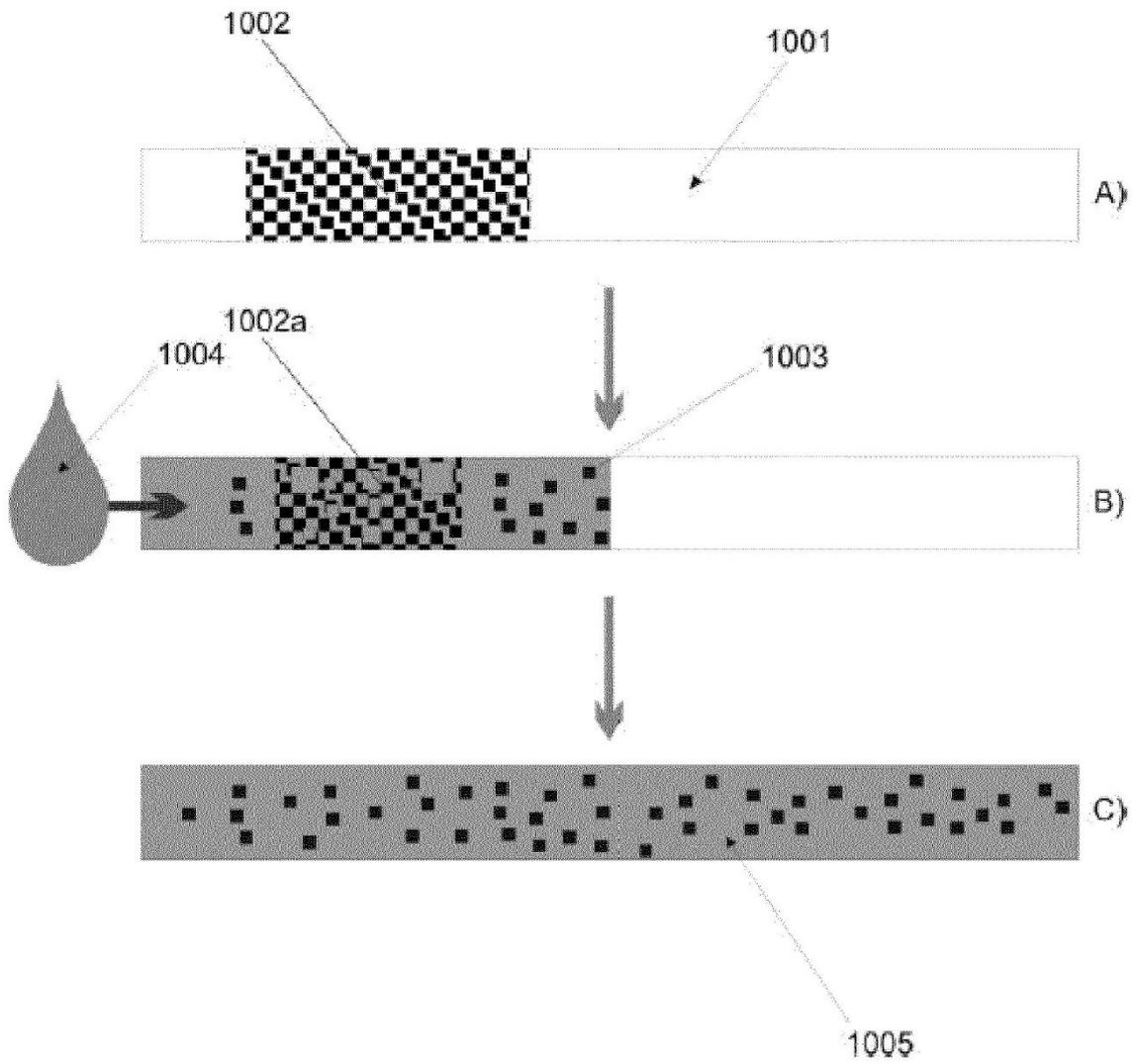


Fig. 18

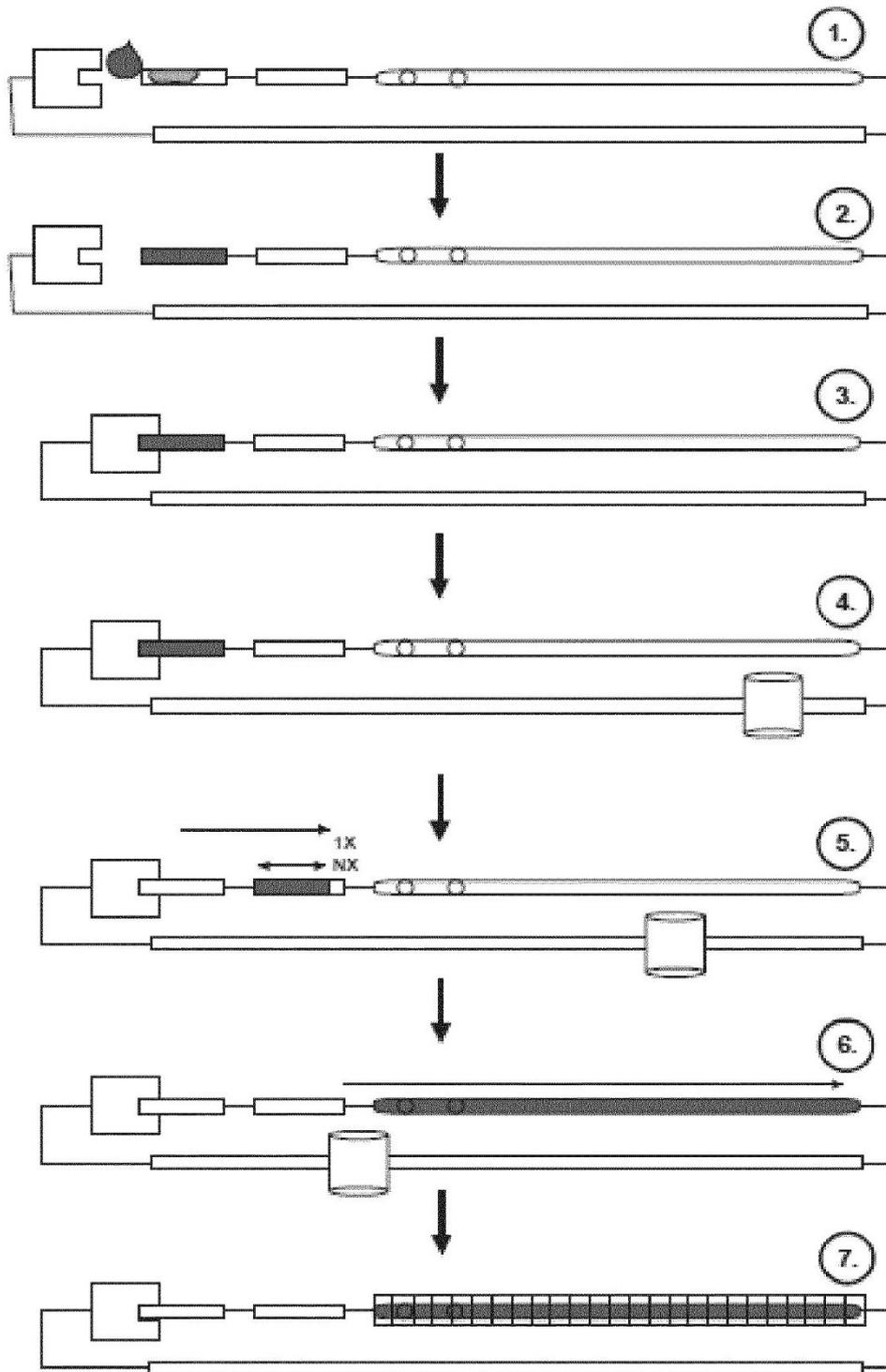
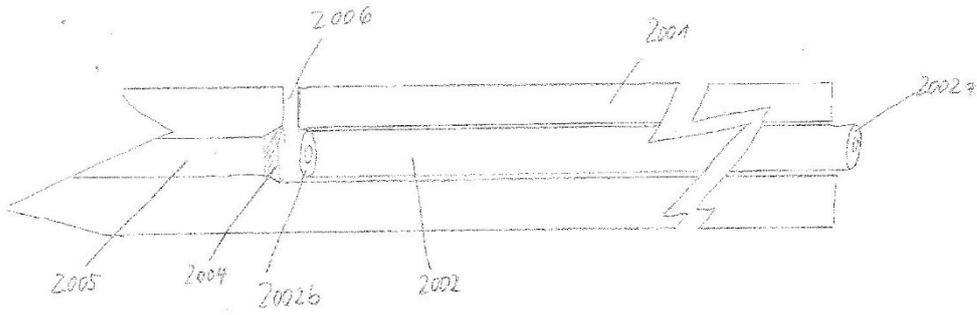
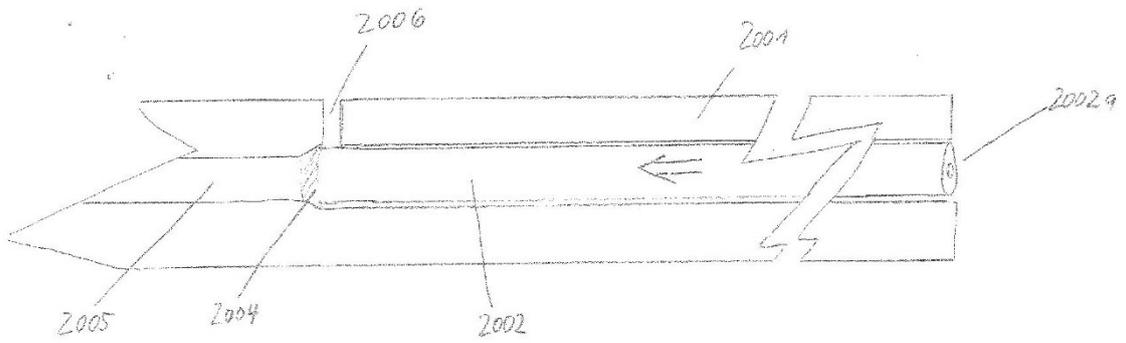


Fig. 19



**Fig. 20**



**Fig. 21**

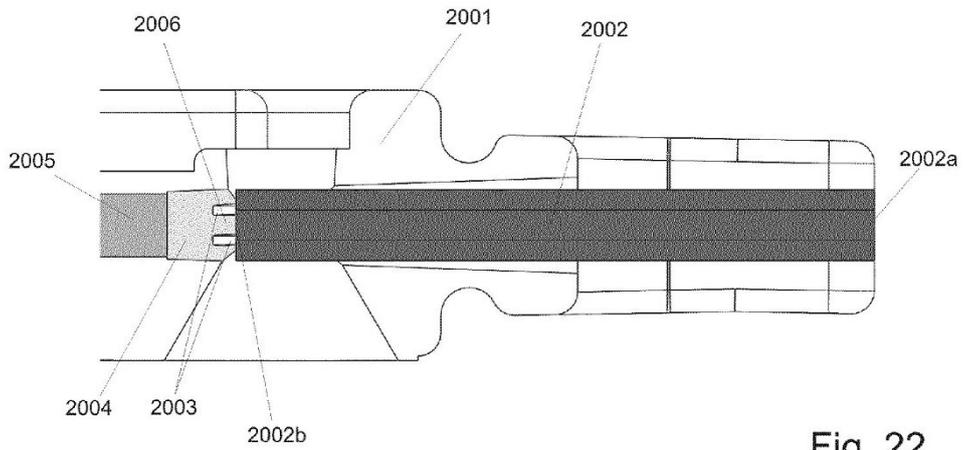


Fig. 22

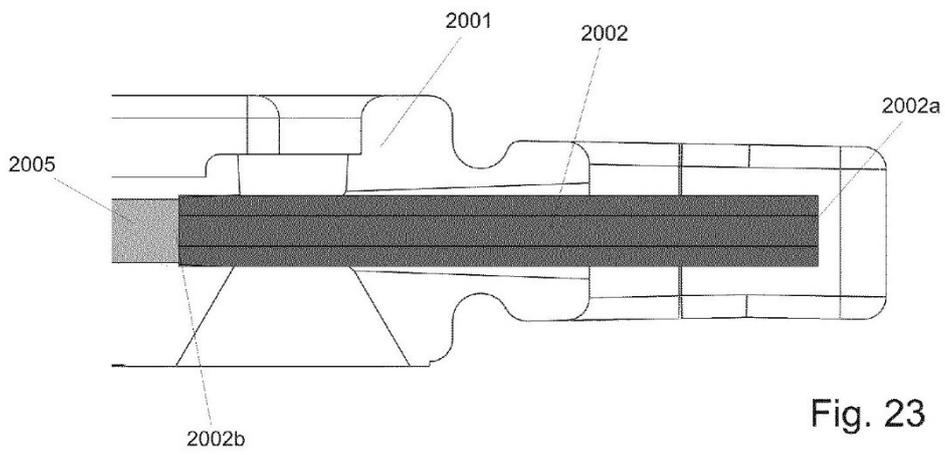


Fig. 23

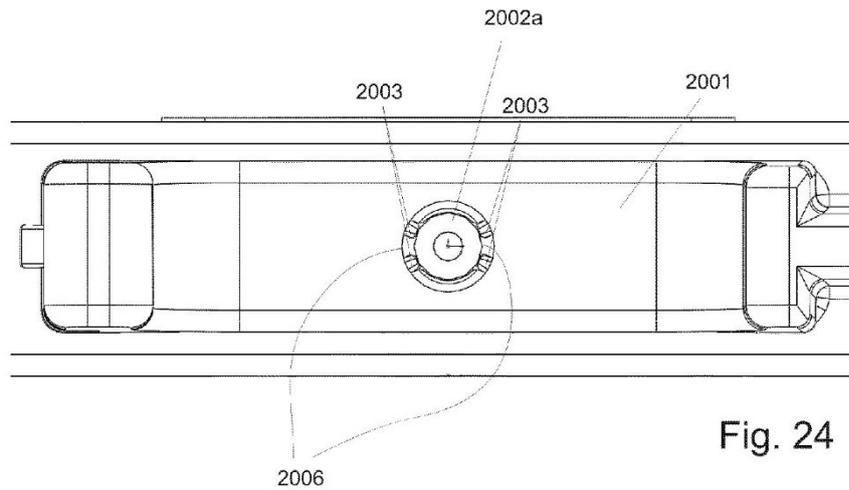


Fig. 24