



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 289**

51 Int. Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **00937894 .4**

96 Fecha de presentación : **30.05.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1181098**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2002**

54 Título: **Cartucho para realizar una reacción química.**

30 Prioridad: **28.05.1999 US 136703 P**
21.12.1999 US 469724

45 Fecha de publicación de la mención y de la
traducción de patente europea: **01.05.2007**

45 Fecha de la publicación de la mención de la
patente europea modificada BOPI: **21.10.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente
europea modificada: **21.10.2011**

73 Titular/es: **CEPHEID**
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, California 94089, US

72 Inventor/es: **Petersen, Kurt, E.;**
Mcmillan, William, A.;
Pourahmadi, Frazad;
Chang, Ronald y
Dority, Douglas, B.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 272 289 T5

DESCRIPCIÓN

Cartucho para efectuar una reacción química

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere en general al campo del análisis bioquímico, y en particular a un cartucho novedoso para efectuar una reacción química.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El análisis de fluidos clínicos o medioambientales implica en general una serie de etapas de procesos químicos, ópticos, eléctricos, mecánicos o térmicos en las muestras de fluido. En los últimos años, ha crecido el interés en el desarrollo de cartuchos desechables para efectuar análisis de muestras biológicas para diversos usos de diagnósticos y seguimiento. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.587.128 de Wilding describe dispositivos para amplificar un polinucleótido preseleccionado en una muestra mediante la realización de una reacción de amplificación de polinucleótidos. La Patente de Estados Unidos 5.922.591 de Anderson et al. describe un dispositivo y un sistema de diagnosis de ácidos nucleicos, miniaturizado e integrado. El dispositivo es capaz generalmente de realizar una o más operaciones de adquisición y de preparación de la muestra, en combinación con una o más operaciones de análisis de la muestra.

[0003] WO 98/38487 proporciona un montaje para realizar reacciones de intercambio de calor controlado. El montaje tiene una cámara de reacción química adaptada para recibir una muestra y permitir que la muestra reaccione químicamente; un manguito térmico que tiene elementos de calefacción para realizar un contacto térmico eficiente con una cámara de reacción; un instrumento con un habitáculo que comprende una conexión eléctrica, una fuente de refrigeración, una área de proceso adaptada para recibir un manguito térmico; y un montaje óptico en comunicación óptica con una cámara de reacción química; y un circuito para el seguimiento y el control del montaje óptico y para recoger la señal de salida del montaje óptico.

[0004] A pesar de estos progresos, sin embargo, existe la necesidad de un cartucho que permita el proceso térmico rápido de una mezcla de reacción así como una mayor sensibilidad en la detección de analito en la mezcla.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0005] La presente invención proporciona un cartucho como el definido en la reivindicación 1. Las características opcionales del cartucho están definidas en las reivindicaciones 2 a 18. El aparato incluye un cartucho para separar un analito deseado de la muestra y para retener el analito para la reacción química y la detección óptica. El aparato puede incluir también un instrumento para recibir el cartucho para el procesamiento de muestra. El analito deseado puede comprender, por ejemplo, organismos, células, proteínas, ácido nucleico, carbohidratos, partículas virales, bacterias, sustancias químicas o sustancias bioquímicas. En una utilización preferida, el analito deseado comprende ácido nucleico y la reacción química realizada es la amplificación del ácido nucleico usando, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

[0006] En una realización preferida, el cartucho comprende un cuerpo que tiene por lo menos una vía de flujo formada en el interior. El cartucho también incluye un recipiente de reacción que se extiende desde el cuerpo para retener la mezcla de reacción para la reacción química y la detección óptica. El recipiente comprende una estructura rígida que define las paredes laterales de una cámara de reacción. La estructura incluye por lo menos un canal que conecta la vía de flujo a la cámara. El recipiente también incluye por lo menos una película o una lámina flexibles acopladas a la estructura rígida para formar una pared principal de la cámara. La pared principal es suficientemente flexible para ajustarse a una superficie térmica. Preferiblemente, el recipiente incluye una primera y una segunda láminas flexibles acopladas a las caras opuestas de la estructura rígida para formar las paredes principales opuestas de la cámara. Además, por lo menos dos de las paredes laterales son ópticamente transmisivas y angularmente compensadas entre sí aproximadamente 90°.

[0007] El cartucho se utiliza preferiblemente en combinación con un instrumento que tiene platos térmicos opuestos ubicados para acoger la cámara entre ellos. El instrumento también incluye una fuente de presión para incrementar la presión en la cámara de reacción. El incremento de presión en la cámara es suficiente para forzar las paredes principales que contacten y se ajusten a las superficies de los platos, asegurando la conducción térmica óptima de la cámara de reacción. El instrumento también incluye elementos de calefacción dispuestos encima de los platos para el procesamiento térmico rápido de la mezcla de reacción. El instrumento incluye además un sistema

óptico que tiene por lo menos una fuente de luz para excitar la mezcla de reacción en la cámara a través de una primera de las paredes laterales ópticamente transmisivas y que tiene por lo menos un detector para detectar la luz emitida de la cámara a través de una segunda de las paredes laterales ópticamente transmisivas.

5 **[0008]** El cartucho de la presente invención permite el calentamiento y el enfriamiento extremadamente rápidos de la mezcla de reacción, asegura la transferencia térmica óptima entre la mezcla y los elementos de calentamiento y enfriamiento, suministra la detección óptica en tiempo real y controla los productos de reacción con la sensibilidad de detección aumentada.

10 **[0009]** Un mayor entendimiento de la invención se puede conseguir teniendo en cuenta la siguiente descripción detallada y los dibujos que se acompañan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

15 **[0010]**

Figura 1 es una vista isométrica de un cartucho para analizar una muestra de fluido de acuerdo con una primera realización de la invención.

Figura 2 es una vista isométrica inferior del cartucho de la Figura 1.

20 Figura 3 es una vista explosionada del cartucho de la Figura 1.

Figura 4 es otra vista explosionada del cartucho de la Figura 1.

Figura 5 es una vista transversal cortada parcialmente de una bocina ultrasónica acoplada a una pared de una cámara de lisis formada en el cartucho de la Figura 1.

Figura 6 es una vista explosionada de un grupo de filtros colocados en la cámara de lisis del cartucho de la Figura 1.

25 Figura 7 es una vista plana superior del cartucho de la Figura 1.

Figura 8 es una vista plana inferior del cartucho de la Figura 1.

Figura 9 es un diagrama de bloques esquemático del cartucho de la Figura 1.

Figura 10 es una vista isométrica de un instrumento por el que el cartucho de la Figura 1 está colocado para el proceso.

30 Figura 11 es una vista isométrica del cartucho de la Figura 1 en el instrumento de la Figura 10.

Figura 12 es una vista transversal cortada parcialmente del cartucho de la Figura 1 en el instrumento de la Figura 10.

Figura 13 es una vista plana, esquemática, de los sensores ópticos colocados para detectar niveles de líquido en el cartucho de la Figura 1.

Figura 14 es una vista lateral transversal cortada parcialmente, esquemática, de un sensor óptico ranurado colocado para detectar el nivel de líquido en una cámara de sensor del cartucho de la Figura 1.

Figura 15A es una vista en corte transversal de una parte del cuerpo del cartucho de la Figura 1 que ilustra dos tipos diferentes de válvulas en el cartucho.

Figura 15B es una vista en corte transversal de las válvulas de la Figura 15A en una posición cerrada.

Figura 16A es otra vista en corte transversal de una de las válvulas de la Figura 15A en una posición abierta.

Figura 16B es una vista en corte transversal de la válvula de la Figura 16A en una posición cerrada.

Figuras 17-19 ilustran un sistema de actuación de válvula para abrir y cerrar las válvulas de la Figura 15A.

Figura 20 es una vista en corte transversal de los actuadores de válvulas alternativos para abrir y cerrar las válvulas en el cartucho de la Figura 1. La Figura 20 también muestra una boquilla de liberación de presión sellada a un puerto de presión que se encuentra en el cartucho de la Figura 1.

Figura 21 es una vista isométrica, parcialmente explosionada, de un recipiente de reacción del cartucho de la Figura 1.

Figura 22 es una vista frontal del recipiente de la Figura 21.

Figura 23 es una vista lateral del recipiente de la Figura 21 introducida entre dos platos de calefacción.

Figura 24 es una vista frontal de uno de los platos de calefacción de la Figura 23.

Figura 25 es una vista frontal del recipiente de reacción alternativo según la presente invención.

Figura 26 es una vista frontal de otro recipiente de reacción según la presente invención.

Figura 27 es otra vista frontal del recipiente de la Figura 21.

Figura 28 es una vista frontal del recipiente de la Figura 21 insertada en el módulo de intercambio de calor del instrumento de la Figura 10.

Figura 29 es una vista explosionada de una estructura de soporte para sostener los platos de la Figura 23.

Figuras 30-31 son vistas ensambladas de la estructura de soporte de la Figura 29.

Figura 32 es una vista isométrica que muestra el exterior de uno de los montajes ópticos en el módulo de intercambio de calor de la Figura 28.

Figura 33 es una vista isométrica de los platos de la Figura 23 en contacto con los montajes ópticos de la Figura 32.

Figura 34 es una vista isométrica, transversal cortada parcialmente, del recipiente de reacción de la Figura 21

insertado entre los platos de la Figura 23. En la figura sólo se incluye la parte inferior del recipiente.

Figura 35 es un diagrama de bloques esquemático de la electrónica del módulo de intercambio de calor de la Figura 28.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0011] La presente invención proporciona un aparato y un procedimiento para analizar una muestra de fluido. En una primera realización, la invención proporciona un cartucho para separar un analito deseado de una muestra de fluido y para retener el analito para una reacción química. La muestra de fluido puede ser una solución o una suspensión. En una utilización particular, la muestra puede ser un fluido corporal (por ejemplo, sangre, orina, saliva, esputo, fluido seminal, fluido raquídeo, mocos, u otros fluidos corporales). Alternativamente, la muestra puede ser un sólido hecho soluble o suspendido en un líquido o la muestra puede ser una muestra ambiental tal como tierra o agua residual, extractos del suelo, residuos de pesticidas o esporas transportadas por el aire ubicadas en un fluido.

[0012] Además, la muestra se puede mezclar con una a más sustancias químicas, reactivos, diluyentes o soluciones tampón. La muestra se puede pretratar, por ejemplo, mezclar con sustancias químicas, centrifugar, moler, etc., o la muestra puede estar en su forma natural.

[0013] El analito deseado es normalmente material intracelular (por ejemplo, ácido nucleico, proteínas, carbohidratos, lípidos, bacterias o parásitos intracelulares). En una utilización preferida, el analito es ácido nucleico que el cartucho separa de la muestra de fluido y retiene para la amplificación (por ejemplo, utilizando la PCR) y la detección óptica. Tal y como se usa aquí, el término "ácido nucleico" se refiere a cualquier ácido nucleico producido sintéticamente o naturalmente, tal como el ADN o el ARN, en cualquier configuración posible, es decir, en forma de ácido nucleico de doble hélice, de ácido nucleico de hélice simple, o cualquier combinación de los mismos.

[0014] La Figura 1 muestra una vista isométrica de un cartucho 20 de acuerdo con la realización preferida. El cartucho 20 está diseñado para separar el ácido nucleico de una muestra de fluido y retener el ácido nucleico para la amplificación y la detección. El cartucho 20 tiene un cuerpo que comprende una pieza superior 22, una pieza intermedia 24 y una pieza inferior 26. Para introducir una muestra de fluido en el cartucho se encuentra en la pieza superior 22 un puerto de entrada, sellado por una tapa -30-. Para acoger las boquillas de las fuentes de presión están seis puertos de presión 32, por ejemplo, bombas o aspirantes. El cartucho también incluye patas alineadas 28 que se extienden desde la pieza inferior 26 para posicionar el cartucho 20 en un instrumento (descrito más abajo con referencia a la Figura 10). En la parte superior e intermedia de las piezas 22, 24 se encuentran hendiduras o depresiones 38A, 38B y 38C. Las hendiduras están para acoger los sensores ópticos que detectan el flujo de fluido en el cartucho 20. El cartucho 20 incluye además los conductos de ventilación 34, 36. Cada puerto de presión y cada conducto de ventilación incluyen preferiblemente una membrana hidrofóbica que permite el paso de gas pero no de líquido dentro o fuera de los conductos de ventilación y de los puertos de presión. Las membranas copoliméricas acrílicas modificadas están disponibles comercialmente, por ejemplo, por Gelman Sciences (Ann Arbor, MI), y membranas policarbonadas gravadas en vía por partículas ("particle-track etched polycarbonate membranes") son vendidas por Poretics, Inc. (Livermore, CA).

[0015] La Figura 2 es una vista isométrica que muestra la parte inferior del cartucho 20. En la parte inferior de la pieza 26 se encuentran nueve agujeros 60 para acoger los actuadores de la válvula que abren y cierran las válvulas en el cartucho 20. En la parte inferior de la pieza 26 se encuentra también un agujero 62 para acoger un transductor (descrito en detalle más abajo con referencia a la Figura 5). El cartucho 20 también incluye un recipiente de reacción 40 que se extiende hacia el exterior desde el cuerpo del cartucho. El recipiente 40 tiene una cámara de reacción 42 para retener la mezcla de reacción (por ejemplo, ácido nucleico mezclado con reactivos de amplificación y sondas fluorescentes) para la reacción química y la detección óptica. Una de las vías de flujo en el cartucho lleva la mezcla de reacción a la cámara 42 para la reacción química y la detección óptica. El recipiente 40 se extiende hacia el exterior desde el cuerpo del cartucho 20 de manera que el recipiente 40 puede ser insertado entre un par de platos térmicos opuestos (para el calentamiento y el enfriamiento de la cámara 42) sin necesidad de desacoplar el recipiente 40 del resto del cartucho 20. Esto reduce enormemente el riesgo de contaminación y/o derrame. El recipiente 40 se puede encontrar integrado con el cuerpo del cartucho (por ejemplo, moldeado íntegramente con la pieza intermedia 24). Actualmente se prefiere, sin embargo, producir el recipiente 40 como un elemento separado que se acopla al cuerpo durante la fabricación del cartucho.

[0016] Las Figuras 3 y 4 muestran vistas explosionadas del cartucho. Tal y como se muestra en la Figura 3, la pieza intermedia 24 tiene cámaras múltiples en su interior. En particular, la pieza intermedia 24 incluye una cámara de muestra 65 para contener la muestra de fluido introducida a través del puerto de entrada 64, una cámara de lavado 66 para contener la solución de lavado, una cámara de reactivo 67 para contener el reactivo de lisis, una

cámara de residuo 68 para acoger la muestra utilizada y la solución de lavado, una cámara de neutralizado 70 para contener un neutralizador, y una cámara de mezcla patrón 71 para contener la mezcla patrón (por ejemplo, reactivos de amplificación y sondas fluorescentes) y para mezclar los reactivos y las sondas con el analito separado de la muestra de fluido. La cámara de muestras 65 incluye opcionalmente un compartimiento lateral 155 que tiene paredes ligeramente más bajas que la cámara de muestras 65. El compartimiento lateral 155 está para indicar visualmente a un usuario cuando ha sido añadida suficiente muestra a la cámara de muestras, es decir, cuando el nivel de líquido en la cámara 65 está suficientemente alto para derramarse en el compartimiento 155.

[0017] La pieza superior 22 incluye los conductos de ventilación 34, 36 y los seis puertos de presión 32, tal y como se ha descrito anteriormente. Una membrana o una junta elastoméricas 61 está ubicada y apretada entre las piezas 22, 24 para sellar las diversas cámaras y canales existentes en las piezas. La pieza intermedia 24 incluye preferiblemente bordes sellantes múltiples para asegurar que la junta 61 forma un sellado adecuado. En particular, la pieza intermedia 24 incluye preferiblemente bordes sellantes 73 alrededor de cada una de las cámaras 65, 66, 67, 68, 70 y 71. La pieza intermedia 24 también incluye paredes de soporte 75 alrededor del perímetro, y bordes sellantes intermedios 76. Los bordes sellantes 73, 76 y las paredes de soporte 75 comprimen la junta 61 en la zona y logran el sellado.

[0018] Tal y como se muestra en la Figura 4, la pieza intermedia 24 contiene en su parte inferior varios canales, uno de los cuales conduce a una cámara de lisis 86. La cámara 86 está alineada con el agujero 62 en la pieza inferior 26, de manera que se puede insertar un transductor (por ejemplo, una bocina ultrasónica) a través del agujero 62 para generar ondas de presión en la cámara de lisis 86. La pieza intermedia 24 también tiene nueve asientos de válvula 84 en su superficie inferior. Los asientos de válvula 84 están alineados con los nueve agujeros 60 en la parte inferior de la pieza 26 para que los actuadores de la válvula se puedan insertar a través de los agujeros 60 en los asientos de válvula 54.

[0019] Una membrana o una junta elastoméricas 61 está ubicada y apretada entre las piezas 24, 26 para sellar los diferentes canales, los asientos de válvula, y la cámara que se encuentra en la pieza intermedia 24. La pieza intermedia 24 incluye preferiblemente bordes sellantes para asegurar que la junta 63 forma un sellado adecuado. En particular, la pieza intermedia 24 incluye preferiblemente bordes sellantes 73 rodeando la cámara de lisis 86, los asientos de válvula 84 y los diferentes canales. La pieza intermedia 24 incluye también paredes de soporte 75 alrededor de su perímetro, y bordes sellantes intermedios 76. Los bordes sellantes 73, 76 y las paredes de soporte 75 comprimen en la zona la junta 63 y logran un sellado. Además de sellar diferentes canales y cámaras, la junta 63 también funciona como una boquilla de la válvula por compresión, cuando se acciona uno de los agujeros 60, en su asiento de válvula correspondiente 84, de este modo se cierra uno de los canales de flujo en la pieza intermedia 24. Esta actuación de la válvula se analiza más abajo con mayor detalle con la referencia de las Figuras 15-16.

[0020] La junta 63 forma también la pared de abajo de la cámara de lisis 86 contra la que se ubica un transductor para perturbar el desarrollo de las células o de los virus en la cámara 86. Cada una de las juntas 61, 63 se compone preferiblemente de un elastómero. Los materiales adecuados de juntas son goma de silicona, neopreno, EPDM y cualquier otro material amoldable. Cada una de las juntas 61, 63 tiene preferiblemente un grosor en el intervalo de 0,005 a 0,125 pulgadas (de 0,125 a 3,175 mm), y más preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 0,06 pulgadas (de 0,25 a 1,5 mm), con un grosor actualmente preferido de 0,031 pulgadas (0,79 mm). El grosor se selecciona para asegurar que la junta sea amoldable para sellar los canales y las cámaras, para comprimir en los asientos de válvula 84 cuando sean obligadas, y para expandirse bajo presión al contacto del transductor.

[0021] Como se muestra en la Figura 3, la pieza intermedia 24 incluye una ranura 76 por la que el recipiente de reacción 40 se inserta durante el montaje del cartucho. El recipiente 40 tiene dos puertos de fluido 41, 43 para añadir y retirar fluido del recipiente. Cuando la pieza superior 22 se sella a la pieza intermedia 24 por medio de la junta 61, los puertos 41, 43 se colocan en comunicación fluida con los canales 80, 81, respectivamente, que están ubicados en la pieza superior 22 (ver la Figura 4). La junta 61 sella las respectivas interfaces fluidas entre los puertos 41, 43 y los canales 80, 81. Las piezas superior, intermedia e inferior 22, 24, 26 son preferiblemente piezas moldeadas de inyección hechas de un material polimérico tal como polipropileno, policarbonato o acrílico. Aunque se prefiere el moldeo para producción en masa, es posible también torneear las piezas superior, intermedia e inferior 22, 24, 26. Las piezas 22, 24, 26 se pueden sujetar con tornillos o cierres. Otras posibilidades se podrían utilizar para montar el cartucho, como la adhesión ultrasónica, la adhesión por disolventes, o los diseños a medida de cierres.

[0022] La Figura 4 también muestra un anillo de filtro 88. El anillo de filtro 88 comprime y sostiene un montón de filtros en la cámara de lisis 86. La Figura 6 muestra una vista explosionada de un montón de filtros 87. La

intención del montón de filtros 87 es capturar las células o los virus de una muestra de fluido cuando la muestra fluye a través de la cámara de lisis 86. Las células o los virus capturados son entonces alterados (lisados) en la cámara 86. Las células pueden ser células de animales o de plantas, esporas, bacterias o microorganismos. Los virus pueden ser cualquier tipo de agentes de infección que tengan una capa proteínica alrededor de un núcleo de ADN o de ARN.

[0023] El montón de filtros 87 comprende una junta 93, un primer filtro 94, una junta 95, un segundo filtro 97 que tiene un menor tamaño de poro que el primer filtro 94, una junta 95, un tercer filtro 100 que tiene un menor tamaño de poro que el segundo filtro 97, una junta 101, una malla tramada 102, y una junta 103. El montón de filtros también incluye preferiblemente un primer juego de perlas 96 dispuestas entre el primer y segundo filtros 94 y 97 y un segundo juego de perlas 99 dispuestas entre el segundo y tercer filtros 97 y 100. El anillo de filtro 88 comprime el montón de filtros 87 en la cámara de lisis 86 de manera que la junta 93 sea presionada contra el filtro 94, el filtro 94 sea presionado contra la junta 95, la junta 95 sea presionada contra el filtro 97, el filtro 97 sea presionado contra la junta 98, la junta 98 sea presionada contra el filtro 100, el filtro 100 sea presionado contra la junta 101, la junta 101 sea presionada contra la malla 102, la malla 102 sea presionada contra la junta 103, y la junta 103 sea presionada contra el perímetro exterior de la pared de abajo de la cámara de lisis 86. La junta 95 es más gruesa que el diámetro medio de las perlas 96 de manera que las perlas son libres de moverse en el espacio entre los filtros 94 y 97. De modo parecido, la junta 98 es más gruesa que el diámetro medio de las perlas 99 de manera que las perlas 99 son libres de moverse en el espacio entre los filtros 97 y 100. Una muestra de fluido fluyendo a través del canal 106 en la cámara de lisis 86 fluye primero a través del filtro 94, luego a través del filtro 97, después a través del filtro 100, y finalmente a través de la malla 102. Después de fluir a través del montón de filtros 87, la muestra fluye a lo largo de estrías de flujo que se encuentran en la parte superior de la cámara de lisis 86 y a través de un canal de salida (no mostrada en la Figura 6).

[0024] Haciendo referencia a la Figura 5, las células y los virus capturados en el montón de filtros (no mostrado en la Figura 5 para la claridad de la ilustración) son lisados por acoplamiento a un transductor 92 (por ejemplo, una bocina ultrasónica) directamente a la pared de la cámara de lisis 86. En esta realización, la pared de la cámara de lisis 86 está formada por una junta flexible 63. El transductor 92 se debería poner directamente en contacto con una superficie externa de la pared. El término "superficie externa" intenta significar una superficie de la pared que es externa a la cámara de lisis 86. El transductor 92 es un dispositivo vibrante u oscilante que se activa para generar ondas de presión en la cámara 86. Las ondas de presión agitan las perlas 96, 99 (Figura 6), y el movimiento de las perlas rompe las células y los virus capturados. En general, el transductor para poner en contacto la pared de la cámara de lisis 86 puede ser un transductor ultrasónico, piezoeléctrico, magnetostriectivo o electrostático. El transductor también puede ser un dispositivo electromagnético que tenga una bobina envuelta, tal como un motor de bobina de voz o un dispositivo solenoide. En este momento es preferible que el actuador sea un transductor ultrasónico, tal como una bocina ultrasónica. Las bocinas adecuadas son vendidas de forma comercial por Sonics & Materials, Inc. que tienen una oficina en 53 Church Hill, Newton, Connecticut 06470-1614 USA. Otra posibilidad es que el transductor ultrasónico pueda comprender un disco piezoeléctrico o cualquier otro tipo de transductor ultrasónico que pueda ser acoplado al envase. En este momento es preferible utilizar una bocina ultrasónica porque la estructura de la bocina es mucho más resonante y mantiene frecuencias de excitación repetibles y agudas y gran movimiento de la punta de la bocina.

[0025] Como antes se describió en la Figura 6, el montón de filtros incluye una junta en sus dos finales. Como se muestra en la Figura 5, la pieza del cartucho intermedio 24 tiene un borde sellado 90 contra el cual es comprimida la junta de uno de los finales del montón de filtros. La junta del otro final del montón de filtros es comprimida por el anillo de filtro 88 para formar un sellado. El material de la junta se puede dilatar en la zona de relieve exterior del borde sellado 90. La anchura del borde sellado 90 es pequeña (normalmente 0,5 mm) de manera que una excesiva cantidad de fuerza no sea necesaria para lograr un sellado suficiente.

[0026] El anillo de filtro 88 está sujeto entre el montón de filtros y la junta del cartucho 63. La junta del cartucho 63 está sujeta entre la pieza intermedia 24 y la parte de abajo 26 por un borde sellado 406. La fuerza es por lo tanto transferida desde la pieza de abajo 26 a través de la junta 63 del anillo de filtro 88 y finalmente al montón de filtros. El anillo de filtro 88 contiene un borde de contacto 404 que se pone en contacto con la junta 63. El borde de contacto 404 no es un borde primario de sellado (a través de él se sellará) pero si un mecanismo de transferencia de fuerza. La anchura del borde de contacto 404 es más grande que la anchura del borde sellado 90 para garantizar que la acción de deformación y de sellado ocurre en el montón de filtros y para no continuar con un apretón en la junta del cartucho 63. La pieza intermedia del cartucho 24 también tiene un borde sellado 406 que envuelve el anillo de filtro 88. Esto es una zona de sellado activa que no se debería comprometer por la presencia del anillo de filtro 88. Por esta razón, hay un espacio 407 entre el borde sellado 406 y el borde de contacto 404 encima del anillo de filtro 88. El espacio 407 proporciona que se permita a la junta 63 extrudir en el espacio 407 como a él se le

comprime por el borde sellado 406 y el borde de contacto 404. Si el borde de contacto 404 llega a una elevación diferente que la del borde sellado 406, el sellado no se comprimirá a causa del espacio 407 y de la distancia entre los bordes 404 y 406.

[0027] Haciendo referencia otra vez a la Figura 6, el montón de filtros 87 es efectivo para capturar las células y los virus cuando una muestra de fluido fluye a través el montón 87 sin que se obstruya ninguno de los filtros 94, 97, 100 en el montón. El primer filtro 94 (que tiene el tamaño de poros más grande) filtra hacia fuera el material basto tal como cristales de sal, restos celulares, pelo, tejido, etc. El segundo filtro 97 (que tiene el tamaño de poro medio) captura las células y los virus en la muestra de fluido. El tercer filtro 100 (que tiene el tamaño de poros más pequeño) captura las células y los virus más pequeños en la muestra de fluido. El montón de filtros 87 es capaz de este modo de capturar simultáneamente componentes de muestras de tamaños diferenciados sin la obstrucción de los filtros. El tamaño de poro promedio del primer filtro 94 es seleccionado para ser lo suficientemente pequeño para filtrar material basto de una muestra de fluido (por ejemplo, cristales de sal, restos celulares, pelo, tejido) y lo suficientemente grande todavía para permitir el paso de las células y los virus objetivo que están contenidos en el analito deseado (por ejemplo, ácido nucleico o proteínas). En general, el tamaño de poro del primer filtro 94 debería estar en el intervalo de aproximadamente 2 a 25 μm , prefiriendo actualmente un tamaño de poro de aproximadamente 5 μm .

[0028] Los tamaños de los poros promedios del segundo y del tercer filtro son seleccionados con dependencia del tamaño promedio de las células y los virus objetivo que contiene el(los) analito(s) deseado(s). Por ejemplo, en una realización, el montón de filtros 87 se usa para capturar organismos de la gonorrea (GC) y de la clamidia (Ct) para determinar la presencia de la enfermedad en la muestra de fluido. Los organismos de GC y de Ct tienen diferentes diámetros promedio, aproximadamente de 1 a 2 μm para los organismos GC y aproximadamente 0,3 μm para los organismos Ct. En esta realización, el segundo filtro 97 tiene un tamaño de poro promedio de aproximadamente 1,2 μm en tanto que el tercer filtro 100 tiene un tamaño de poro promedio de aproximadamente 0,22 μm por lo que la mayoría de los organismos GC son capturados por el segundo filtro 97 mientras que la mayoría de los organismos Ct son capturados por el tercer filtro 100. De este modo el montón de filtros es capaz de capturar simultáneamente organismos objetivos de tamaños diferenciados y hacer eso sin la obstrucción de los filtros. El tamaño de poro de los filtros 97, 100 se puede seleccionar para capturar células y virus deseados de cualquier tamaño, y el alcance de la invención no queda limitado por el ejemplo específico dado.

[0029] El montón de filtros 87 es también útil para perturbar el desarrollo de las células y los virus capturados al liberar el material intracelular (por ejemplo, ácido nucleico) de su interior. El primer y el segundo juego de perlas 96, 99 sirven en esta consideración para dos útiles propósitos. Primero, las perlas son agitadas por las ondas de presión generadas por el transductor. El movimiento de las perlas rompe las células y los virus capturados. Segundo, las perlas pueden cortar el ácido nucleico liberado de las células y de los virus lisados de manera que los filamentos del ácido nucleico sean lo suficientemente cortos para fluir a través de los filtros y fuera de la cámara de lisis 86. Las perlas apropiadas para la ruptura de células o de virus incluyen perlas de cristales de borosilicato, de cristales de cal, de sílice y de poliestireno.

[0030] Las perlas pueden ser porosas o no porosas y preferiblemente pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de 1 a 200 μm . El diámetro promedio de las perlas 96, 99 se selecciona con dependencia de las células y los virus objetivos deseados para ser rotos por las perlas. El diámetro promedio de las perlas 96 en el primer juego puede ser igual al diámetro promedio de las perlas 99 en el segundo juego. Otra posibilidad es que cuando el primer juego de perlas 96 se utiliza para romper un tipo de células y virus objetivo, que difiere del tipo de células y de virus a romper por el segundo juego de perlas 99, es favorable seleccionar el diámetro promedio de las perlas tal que el diámetro promedio de las perlas 96 en el primer juego difiera del diámetro promedio de las perlas 99 en el segundo juego. Por ejemplo, cuando el montón de filtros se usa para capturar GC y Ct como se describió anteriormente, las perlas 96 tienen 20 μm de diámetro de perlas de cristales de borosilicato para romper los organismos GC y las perlas 99 tienen 106 μm de diámetro de perlas de cristales de cal de sosa para romper los organismos Ct. Cada una de las juntas de silicona 95, 98 debería ser suficientemente gruesa para permitir el espacio para que las perlas 96, 99 se muevan y rompan las células y los virus.

[0031] La malla 102 sirve también para dos útiles propósitos. Primero, la malla proporciona soporte al montón de filtros 87. Segundo, la malla dispersa las burbujas de aire de manera que las burbujas se puedan canalizar a través de las estrías de flujo 91 y fuera de la cámara de lisis 86. Para dispersar con eficacia y reducir el tamaño de las burbujas de aire, la malla 102 tiene preferiblemente un tamaño de poro pequeño. Preferiblemente, es una malla de polipropileno tejida que tiene un tamaño de poro promedio de aproximadamente 25 μm . Para asegurar que las burbujas de aire pueden escapar de la cámara de lisis 86, es deseable utilizar el cartucho en una orientación en la que el líquido fluya hacia arriba (en referencia a la gravedad) a través del montón de filtros 87 y la cámara de lisis 86.

De este modo, el puerto de entrada para la entrada de los fluidos en la cámara 86 debería por lo general estar en el punto más bajo en la cámara, mientras que el puerto de salida debería estar en el más alto.

[0032] Muchas realizaciones diferentes del montón de filtros son posibles. Por ejemplo, en una realización alternativa, el montón de filtros tiene solo dos filtros y un juego de perlas dispuestas entre los filtros. El primer filtro tiene un tamaño de poro más grande (por ejemplo, 5 μm) y filtra hacia fuera el material basto tal como cristales de sal, restos celulares, pelo, tejido, etc. El segundo filtro tiene un tamaño de poro más pequeño que el primer filtro y ligeramente más pequeño que las células y los virus objetivo para ser capturados. Tal montón de filtros está descrito más abajo con referencia a la Figura 38. En otra realización del cartucho, el filtro que tiene el tamaño de poro más grande (para filtrar el material basto) se ubica en la cámara de filtros (no mostrada) que está ubicada a contra corriente de la cámara de lisis 86. Un canal conecta la cámara de filtros a la cámara de de lisis 86. En esta realización, una muestra de fluido fluye primero a través del filtro de bastos en la cámara de filtros y entonces a través del segundo filtro en la cámara de lisis para atrapar las células y los virus objetivos en la cámara de lisis.

[0033] Además, en el montón de filtros las perlas pueden tener una afinidad vinculante para las células y los virus objetivo en la muestra de fluido, para facilitar la captura de las células y los virus objetivo. Por ejemplo, anticuerpos o receptores inevitables pueden estar cubiertos en la superficie de las perlas para ligar las células objetivo en la muestra. Por otra parte, la cámara de lisis 86 puede contener dos tipos diferentes de perlas para interaccionar con las células y los virus objetivos. Por ejemplo, la cámara de lisis puede contener un primer juego de perlas cubiertas con anticuerpos o con receptores para ligar las células y los virus objetivo y un segundo juego de perlas (entremezclados con el primer juego) para romper las células y los virus capturados. Las perlas en la cámara de lisis 86 pueden tener también una afinidad vinculante para el material intracelular (por ejemplo, ácido nucleico) liberado de la ruptura de células y virus. Tales perlas son útiles para aislar ácido nucleico objetivo para la subsiguiente dilución y análisis. Por ejemplo, la cámara de lisis puede contener perlas de sílice para aislar ADN o perlas de celulosa con oligo dT para aislar ARN mensajero para RT-PCR. La cámara de lisis 86 puede también contener perlas para sacar material no deseado (por ejemplo, proteínas, péptidos) o sustancias químicas no deseadas (por ejemplo, sales, iones metálicos o detergentes) de la muestra que podría inhibir la PCR. Por ejemplo, la cámara 86 puede contener perlas de intercambio iónico para retirar las proteínas. Otra posibilidad es que las perlas tengan quelatos de iones metálicos tal como el ácido iminodiacético que retirará los iones metálicos de las muestras biológicas.

[0034] Las Figuras 21-22 ilustran en gran detalle el recipiente de reacción 40. La Figura 21 muestra una vista isométrica, parcialmente explosionada, del recipiente 40, y la Figura 22 muestra una vista frontal del recipiente 40. El recipiente 40 incluye la cámara de reacción 42 (realizada de forma adiamantada) para contener la mezcla de reacción. El recipiente 40 está diseñado para una transferencia de calor óptima, para y desde la mezcla de reacción, y para una eficiente exposición óptica de la mezcla. La forma delgada del recipiente contribuye a una cinética térmica óptima mediante el suministro de grandes superficies para conducción térmica y por el contacto con los platos térmicos. Además, las paredes del recipiente proporcionan en la cámara 42 ventanas ópticas de manera que la mezcla entera de reacción puede ser ópticamente interrogada. En más detalle en las Figuras 21-22, el recipiente de reacción 40 incluye una estructura rígida 46 que define las paredes laterales 57A, 57B, 59A, 59 B de la cámara de reacción 42. La estructura 46 también define un puerto de entrada 41 y un canal 50 conectando el puerto 41 a la cámara 42. El puerto de entrada 41 y el canal 50 se utilizan para añadir fluido en la cámara 42, y el canal 52 y el puerto de salida 43 se utilizan para la salida del fluido desde la cámara 42. Las puntas alineadas 44A, 44B se utilizan para ubicar correctamente el recipiente 40 durante el montaje del cartucho.

[0035] Como se muestra en la Figura 21, el recipiente 40 incluye también láminas flexibles delgadas sujetadas a los lados opuestos de la estructura rígida 48 de la cámara (La pared principal 48 se muestra en la Figura1 explosionada desde la estructura rígida 46 por claridad ilustrativa). La cámara de reacción 42 se define de este modo por las paredes laterales rígidas 57A, 57B, 59A, 59B de la estructura 46 y por las paredes principales opuestas 48. Las paredes principales opuestas 48 están soldadas por los lados opuestos de la estructura 46 de manera que las paredes laterales 57A, 57B, 59A, 59B conectan las paredes principales 48 la una contra la otra. Las paredes 48 facilitan la conductancia térmica óptima para la mezcla de reacción contenida en la cámara 42. Cada una de las paredes 48 es suficientemente flexible para contactar y para ajustarse a una respectiva superficie térmica, de este modo se provee para un contacto térmico óptimo y para una transferencia de calor entre la superficie térmica y la mezcla de reacción contenida en la cámara 42. Además, las paredes flexibles 48 se continúan ajustando a las superficies térmicas si la forma de las superficies cambia debido a la expansión o la contracción térmica en el transcurso de la operación de intercambio térmico.

[0036] Como se muestra en la Figura 23, las superficies térmicas para poner en contacto las paredes flexibles 48 están formadas preferiblemente por un par de platos opuestos 190A, 190B colocados para acoger entre

ellos la cámara 42. Cuando la cámara 42 del recipiente 40 se inserta entre los platos 190A, 190B, las superficies interiores de los platos se ponen en contacto con las paredes 48 y las paredes flexibles se ajustan a la superficie de los platos. Los platos están preferiblemente espaciados a una distancia uno de otro igual a su grosor T de la cámara 42, definida por el grosor de la estructura 46. En esta posición, se encuentran o no espacios mínimos entre las superficies de los platos y las paredes 75. Los platos pueden ser calentados y enfriados mediante elementos térmicos diversos para inducir cambios de temperatura dentro de la cámara 42, como se describe con más detalle más abajo.

[0037] Las paredes 48 son preferiblemente películas flexibles de material polimérico tal como polipropileno, polietileno, poliéster u otros polímeros. Las películas se pueden poner en capas, por ejemplo, laminadas, o las películas pueden ser homogéneas. Se prefieren las películas en capas porque generalmente tienen mejor resistencia e integridad estructural que las películas homogéneas. En particular, las películas de polipropileno en capas son preferidas en este momento porque el polipropileno no es inhibidor de la PCR. Otra posibilidad es que las paredes 48 puedan comprender cualquier otro material que pueda estar formado en una lámina flexible y delgada y que permita una transferencia rápida de calor. Para una buena conductancia térmica, el grosor de cada pared 48 se encuentra preferiblemente en aproximadamente 0,003 a 0,5 mm, más preferiblemente entre aproximadamente 0,01 a 0,15 mm, y la que más preferiblemente entre aproximadamente 0,025 a 0,08 mm.

[0038] Haciendo referencia otra vez a la Figura 22, el recipiente 40 también incluye preferiblemente ventanas ópticas para la interrogación óptica in situ de la mezcla de reacción en la cámara 42. En la realización preferible, las ventanas ópticas son las paredes laterales 57A, 57B de la estructura rígida 46. Las paredes laterales 57A, 57B son ópticamente transmisivas para permitir la excitación de la mezcla reactiva en la cámara 42 a través de la pared lateral 57A y la detección de la luz emitida desde la cámara 42 a través de la pared lateral 57B. La flecha A representa el haz de iluminación entrando en la cámara 42 a través de la pared lateral 57A y la flecha B representa la luz emitida (por ejemplo, la emisión fluorescente de analitos etiquetados en la mezcla de reacción) saliendo de la cámara 42 a través de la pared lateral 57B.

[0039] Las paredes laterales 57A, 57B están preferiblemente compensadas angularmente entre sí. Es preferiblemente normal que las paredes 57A, 57B estén compensadas entre sí aproximadamente 90°. Un ángulo de 90° entre la trayectoria de excitación y la de detección asegura que una mínima cantidad de radiación de excitación que entra a través de la pared 57A saldrá a través de la pared 57B. Además, el ángulo de 90° permite una cantidad máxima de luz emitida (por ejemplo, fluorescente) para ser recogida a través de la pared 57B. Las paredes 57A, 57B están preferiblemente unidas entre sí para formar una intersección en forma de "V" en la parte de abajo de la cámara 42. Otra posibilidad es que las paredes angulares 57A, 57B necesiten no estar directamente unidas una con otra, pero pueden estar separadas por una parte intermedia, como con otra pared o con características mecánicas o fluidas diversas que no interfieran con el comportamiento térmico y óptico del recipiente. Por ejemplo, las paredes 57A, 57B se pueden encontrar en un puerto que conduzca a otra zona de tratamiento en comunicación con la cámara 42, tal como una zona de electroforesis capilar integrada. Actualmente en la realización preferible, una lengüeta localizada 58 se extiende desde la estructura 46 debajo de la intersección de las paredes 57A, 57B. La lengüeta 58 se utiliza para posicionar correctamente el recipiente 40 en el módulo intercambiador de calor descrito más abajo con la referencia de la Figura 28.

[0040] La sensibilidad óptica óptima se puede lograr potenciando al máximo la longitud del camino óptico de los haces de luz excitando el analito etiquetado en la mezcla de reacción y la luz emitida que se detecta, que se representa por la ecuación.

$$I_o / I_i = C \cdot L \cdot A,$$

donde I_o es la iluminación de salida de la luz emitida en voltios, en fotones u otro por el estilo, C es la concentración de analito que fue detectado, I_i es la iluminación de entrada, L es la longitud del camino, y A es la absorptividad intrínseca de la tintura utilizada para etiquetar el analito.

[0041] El delgado y plano recipiente de reacción 40 de la presente invención optimiza la sensibilidad de detección mediante el suministro de la máxima longitud de camino óptico por unidad de volumen de analito. Haciendo referencia a las Figuras 23 y 27, el recipiente 40 se construye preferiblemente de tal forma que cada una de las paredes laterales 57A, 57B, 59A, 59B de la cámara 42 tenga una longitud L en el intervalo de 1 a 15 mm, la cámara tenga una anchura W en el intervalo de 1,4 a 20 mm, la cámara tenga un grosor T en el intervalo de 0,5 a 5 mm, y la proporción de la anchura W de la cámara al grosor T de la cámara sea de por lo menos 1:2. Estos parámetros son en estos momentos preferibles para proporcionar un recipiente que tenga una longitud de camino óptico promedio relativamente grande a través de la cámara, es decir, de 1 a 15 mm de promedio, mientras se

mantiene todavía la cámara lo suficientemente delgada como para permitir el calentamiento y el enfriamiento extremadamente rápido de la mezcla de reacción contenida en el interior. La longitud de camino óptico promedio de la cámara 42 es la distancia desde el centro de la pared lateral 57A hasta el centro de la cámara 42 más la distancia desde el centro de la cámara 42 hasta el centro de la pared lateral 57B.

[0042] Más preferiblemente, el recipiente 40 se construye de manera que cada una de las paredes laterales 57A, 57B, 59A, 59B de la cámara 42 tenga una longitud L en el intervalo de 5 a 12 mm, la cámara tenga una anchura W en el intervalo de 7 a 17 mm, la cámara tenga un grosor T en el intervalo de 0,5 a 2 mm, la proporción de la anchura W de la cámara al grosor T de la cámara sea por lo menos 4:1. Estos intervalos son muy preferibles porque proporcionan un recipiente que tiene tanto una gran longitud de camino óptico promedio (es decir, de 5 a 12 mm) como una capacidad de volumen en el intervalo de 12 a 100 μ l mientras todavía se mantiene una cámara suficientemente delgada para permitir el calentamiento y el enfriamiento extremadamente rápido de una mezcla de reacción. La relativamente gran capacidad de volumen proporciona la sensibilidad aumentada en la detección de analitos de baja concentración, tales como los ácidos nucleicos.

[0043] En la realización preferible, el recipiente de reacción 40 tiene una cámara 42 de forma adiamantada definida por las paredes laterales 57A, 57B, 59A, 59B, de las que cada una de las paredes laterales tiene una longitud de aproximadamente 10 mm, la cámara tiene una anchura de aproximadamente 14 mm, la cámara tiene un grosor T de 1 mm tal como se definió el grosor de la estructura 46, y la cámara tiene una capacidad de volumen de aproximadamente 100 μ l. Este recipiente de reacción proporciona una relativamente gran longitud de camino óptico promedio de 10 mm a través de la cámara 42. Además, la cámara delgada permite el calentamiento y/o el enfriamiento extremadamente rápido de una mezcla de reacción contenida en el interior. La forma adiamantada de la cámara 42 ayuda a prevenir burbujas de aire que se forman en la cámara cuando de llena con la mezcla de reacción y también ayuda en la interrogación óptica de la muestra.

[0044] Haciendo referencia otra vez a la Figura 22, la estructura 46 está hecho preferiblemente de un material ópticamente transmisor, por ejemplo, un policarbonato o polipropileno aclarado, de manera que las paredes laterales 57A, 57B sean ópticamente transmisivas. Como se utiliza aquí, el término ópticamente transmisor significa que una o más longitudes de onda de luz pueden ser transmitidas a través de las paredes. En la realización preferible, las paredes ópticamente transmisivas 57A, 57B son substancialmente transparentes. Además, pueden estar presentes uno o más elementos ópticos en las paredes laterales ópticamente transmisivas 57A, 57B. Los elementos ópticos se pueden diseñar, por ejemplo, para maximizar el volumen total de solución que es iluminado por una fuente de luz, hacia la luz de excitación del foco encima de una zona específica de la cámara 42, o para reunir tanta señal fluorescente tan amplia como sea posible de una fracción del volumen de la cámara. En realizaciones alternativas, los elementos ópticos pueden comprender rejillas para seleccionar longitudes de onda específicas, filtros para permitir pasar sólo ciertas longitudes de onda, o lentes coloreadas para proporcionar funciones de filtraje. Las superficies de las paredes pueden estar cubiertas o compuestas de materiales tales como cristal líquido para aumentar la absorción de ciertas longitudes de onda. En la actual realización preferible, las paredes ópticamente transmisivas 57A, 57B son sustancialmente ventanas transparentes y planas que tienen un grosor de aproximadamente 1 mm.

[0045] Las paredes laterales 59A, 59B incluyen preferiblemente caras reflectantes 56 que internamente reflectan luz intentando salir de la cámara 42 a través de las paredes laterales 59A, 59B. Las caras reflectantes 56 están dispuestas de tal forma que caras adyacentes están compensadas angularmente entre sí aproximadamente 90°. Además, la estructura 46 define espacios abiertos entre las paredes laterales 59A, 59B y la estría de soporte 53. Los espacios abiertos están ocupados por aire ambiental que tiene un índice de refracción diferente al del material que compone la estructura (por ejemplo, plástico). Debido a la diferencia en los índices de refracción, las caras reflectantes 56 son efectivas para la luz reflectante interna intentando salir de la cámara a través de las paredes laterales 59A, 59B y proporciona para aumentar la detección de la señal óptica a través de las paredes 57A, 57B. Preferiblemente, las paredes laterales ópticamente transmisivas 57A, 57B definen la parte de abajo de la cámara de forma adiamantada 42, y las paredes laterales retro-reflectantes 59A, 59B definen la parte superior de la cámara.

[0046] Un procedimiento preferible para la fabricación de recipientes de reacción 40 será descrito ahora con la referencia de las Figuras 21-22. El recipiente de reacción 40 se puede fabricar primeramente moldeando la estructura rígida 46 utilizando técnicas de moldeo por inyección conocidas. La estructura 46 es preferiblemente moldeado como una pieza individual de material polimérico, por ejemplo, polipropileno aclarado. Después de que la estructura 46 se haya producido, las láminas flexibles delgadas se cortan a tamaño y se sellan a las caras opuestas de la estructura 46 para formar las paredes principales 48 de la cámara 42. Las paredes principales 48 son preferiblemente películas moldeadas o extrudidas de material polimérico, por ejemplo, películas de polipropileno, que se cortan a tamaño y se sujetan a la estructura 46 utilizando el siguiente procedimiento. Una primera pieza de

película se coloca por encima de un lado de la estructura 46. La estructura 46 incluye preferiblemente una barra clavada 47 para alinear la parte superior del filo de la película. La película se coloca encima de la parte inferior de la estructura 46 de tal forma que el filo superior de la película esté alineado con la barra clavada 47 y de manera que la película cubra completamente la parte inferior de la estructura 46 debajo de la barra clavada 47. La película debería ser mas larga que la parte inferior de la estructura 46 de manera que pueda ser fácilmente sujeta y extendida de forma plana por toda la estructura. La película se corta entonces al tamaño para igualar el contorno de la estructura sujetando a la estructura la parte de película que cubre la estructura y recortando las porciones de la película que se extienden pasado el perímetro de la estructura utilizando, por ejemplo, un láser o troquel.

La película está entonces solada a la estructura, preferiblemente utilizando un láser.

[0047] La película está entonces sellada a la estructura 46, preferiblemente mediante sellado por calor. El sellado por calor es preferible en estos momentos porque produce un sellado fuerte sin la introducción de contaminantes potenciales al recipiente como cuando se utilizan técnicas adherentes con adhesivo o con solvente que podrían hacerlo. El sellado por calor es también sencillo y económico. El sellado por calor se puede conseguir utilizando, por ejemplo, una placa de presión térmica. Un procedimiento idéntico se puede utilizar para cortar y sellar una segunda lámina al lado opuesto de la estructura 46 para completar la cámara 42. Son posibles muchas variaciones de este procedimiento de fabricación. Por ejemplo, en una realización alternativa, la película se extiende por toda la parte de abajo de la estructura 46 y se sella entonces la estructura previa para cortar la película al tamaño. Después del sellado de la película a la estructura, las porciones de la película que se extienden pasado el perímetro de la estructura se cortan utilizando, por ejemplo, un láser o troquel.

[0048] Aunque es preferible en estos momentos moldear la estructura 46 como una pieza individual, es posible también fabricar la estructura a partir de piezas múltiples. Por ejemplo, las paredes laterales 57A, 57B que forman las ventanas ópticas angulares se pueden moldear a partir de policarbonato, que tiene buena transparencia óptica, mientras que el resto de la estructura se moldea a partir de polipropileno, que es económico y compatible con la PCR. Las piezas separadas se pueden pegar juntas en un paso secundario. Por ejemplo, las paredes laterales 57A, 57B se pueden encajar a presión y/o adherido a la parte que queda de la estructura 46. Las paredes flexibles 48 se pueden entonces adjuntar a las caras opuestas de la estructura 46 como se describió antes.

[0049] Haciendo referencia otra vez a la Figura 3, es en estos momentos preferible utilizar una junta 61 para sellar los puertos 41, 43 del recipiente 40 correspondiente a los canales 80, 81 (Figura 4) en el cuerpo del cartucho. Otra posibilidad es que los sellados fluidos se puedan establecer usando un encaje de tipo Luer, un encaje por compresión o un encaje por estampado. En otra realización, el cuerpo del cartucho y la estructura del recipiente 40 se moldean como una parte individual, y las paredes principales flexibles del recipiente se sellan por calor a los lados opuestos de la estructura.

[0050] Haciendo referencia otra vez a la Figura 22, la cámara 42 se llena de líquido obligado (por ejemplo, una mezcla de reacción) a fluir a través del puerto 41 y el canal 50 en la cámara 42. El líquido se obliga a fluir en la cámara 42 utilizando diferentes presiones (es decir, abriéndose el líquido camino a través del puerto de entrada 41 o aspirando el líquido aplicando vacío en el puerto de salida 43). Como el líquido llena la cámara 42, desplaza el aire en la cámara. El aire desplazado sale de la cámara 42 a través del canal 52 y el puerto 43. Para la detección óptica del analito en la cámara 42, la cámara no debería contener burbujas de aire. Para ayudar a prevenir la retención de burbujas de aire en la cámara 42, la conexión entre la cámara 42 y el canal de salida 52 debería ser el punto más alto (con respecto a la gravedad) en la cámara 42. Esto permite que las burbujas de aire en la cámara 42 escapen sin ser atrapadas. De este modo, el recipiente 40 está diseñado para ser utilizado en la orientación vertical mostrada en la Figura 22.

[0051] La Figura 25 muestra otro recipiente 206 diseñado para utilizarse en una posición horizontal. El recipiente 206 tiene un puerto de entrada 41 y un canal de entrada 50 que conecta el puerto de entrada 41 a la parte de abajo de la cámara 42. El recipiente tiene también un puerto de salida 43 y un canal de salida 50 que conecta el puerto de salida 43 con la parte superior de la cámara 42. De este modo, cualquier burbuja de aire en la cámara 42 puede escapar a través del canal de salida 52 sin quedar retenida. La Figura 26 muestra otro recipiente 207 que tiene dos puertos de entrada 41, 45 y un puerto de salida 43. Los canales de entrada 50, 54 conectan los respectivos puertos de entrada 41, 45 de la cámara 42, y el canal de salida 52 conecta la cámara 42 al puerto de salida 43. Son también posibles muchas otras realizaciones diferentes del recipiente. En cada realización, es deseable el desalojo de la cámara 42 por el punto más alto (con respecto a la gravedad) en la cámara y la introducción de líquido en la cámara desde un punto más bajo.

[0052] Las Figuras 15A-15B ilustran dos tipos de válvulas utilizadas en el cartucho. Como muestra la Figura 15A, hay dos tipos de conceptos fundamentales para la actuación de la válvula, y de ahí dos tipos de válvulas. La

primera válvula utiliza un asiento de válvula en forma de cono o cónica 160 que se encuentra en la pieza del cartucho intermedio 24. El asiento de válvula 160 es un hueco, una depresión o una cavidad, moldeado o torneado en medio de la pieza 24. El asiento de válvula 160 está en fluida comunicación con la cámara 167 a través de un puerto o un canal 157 que intersecciona el centro del asiento de válvula cónico 160. Como de muestra en la Figura 15B, el actuador de la válvula 164, que tiene una superficie esférica, se obliga contra la membrana elástica 63 y con el asiento de válvula 160, estableciendo un anillo circular de contacto entre la membrana 63 y el asiento de válvula 160. El principio cinemático es que una bola se asiente en un cono. El sellado circular formado por la membrana 63 y el asiento de válvula 160 evita flujos entre el canal 157 (y de ahí a la cámara 167) y un canal lateral 158 que se extiende desde un lado del asiento de válvula 160. El canal lateral 158 se define por la membrana 63 y la pieza del cartucho intermedio 24.

[0053] Como se muestra en la Figura 15A, el otro tipo de válvula controla el flujo circulante entre el canal 158 y el otro canal lateral 159 formado entre la membrana 63 y la pieza del cartucho intermedio 24. En este caso, sería ineficaz un anillo circular de contacto. Así que, la segunda válvula comprende un hueco, una depresión o una cavidad 161 que se encuentra en la pieza del cartucho intermedio 24. La cavidad 161 separa los canales 158, 159 el uno del otro. Un final en el canal 158 está ubicado en un lado de la cavidad 161, y un final del canal 159 está ubicado en el lado opuesto de la cavidad 161. La cavidad 161 está definida por una primera superficie curva 162A ubicada de forma adyacente al final del canal 158, una segunda superficie curva 162B ubicada de forma adyacente al final del canal 159, y una tercera superficie 163 entre la primera y la segunda superficies curvas 162A, 162B. Como se muestra en la Figura 15B, las superficies curvas proporcionan a dos asientos de válvulas que sean el área de contacto primaria para la membrana 63 para cerrar el flujo entre los canales 158 y 159. El principio cinemático es que una bola (o final esférico en un actuador de válvula) esté sujetado por tres puntos de contacto, la fuerza ascendente en el actuador y las dos válvulas de asiento 162A, 162B.

[0054] Como se muestra en la Figura 16A, la primera y la segunda superficies curvas 162A, 162B son preferiblemente superficies esféricas concéntricas. El actuador de válvula 164 tiene también una superficie esférica para presionar a la membrana 63 con fuerza contra las superficies 162A, 162B. Además, cada una de las superficies 162A, 162B tienen preferiblemente un radio esférico de curvatura R1 igual al radio combinado de curvatura R2 del actuador de válvula 164 más el grosor T de la membrana 63. Por ejemplo, si el radio de curvatura R2 de la superficie del actuador de válvula es de 0,094 pulgadas y la membrana 63 tiene un grosor de 0,031 pulgadas, el radio de curvatura R1 de cada una de las superficies 162A, 162B es entonces de 0,125 pulgadas. En general, el tamaño y el radio de curvatura de los asientos de válvula dependen del tamaño de los canales en el cartucho. Las válvulas se fabrican preferiblemente con el gran tamaño suficiente como para sellar con efectividad los canales pero no muy grandes para que sea mínimo el volumen muerto en el cartucho.

[0055] Como se muestra en la Figura 16B, la tercera superficie 163 está oculta por la primera y la segunda superficies 162A, 162B para proporcionar un espacio 166 entre la membrana 63 y la tercera superficie 163 cuando la membrana 63 esté presionada contra la primera y la segunda superficies 162A, 162B. Establecido otra vía, las superficies 162A, 162B están alzadas o elevadas de la superficie 163. El espacio 166 asegura que la membrana 63 contacta fundamentalmente más los asientos de válvula 162A, 162B que la superficie entera de la cavidad 161 de manera que la presión máxima se aplica a los asientos de válvula 162A, 162B mediante la membrana 63. Esto proporciona un sellado muy fuerte con una mínima fuerza requerida del actuador.

[0056] Haciendo referencia otra vez a la Figura 15B, en ambos tipos de válvulas el respectivo principio cinemático define la ubicación de las partes de acople. Tanto en el concepto de la bola en el cono como en el concepto de bola contra dos superficies esféricas, a la bola o al actuador de válvula de forma esférica se le permite buscar su propia ubicación cuando es obligado contra lo(s) asiento(s) de válvula. Hay un espacio libre deliberado (por ejemplo, de 0,01 a 0,03 pulgadas) entre el actuador de válvula y el agujero en la parte inferior de la pieza del cartucho 26 en que el actuador 164 viaja de manera que sólo la actuación del asiento de válvula define la ubicación de las piezas de acople.

[0057] Los actuadores de válvula se pueden controlar con una variedad de mecanismos. La Figuras 17-19 ilustran uno de estos mecanismos. Como muestra la Figura 17, un actuador de válvula 172 tiene una superficie esférica para presionar la junta 63 en la válvula de asiento. El actuador 172 tiene también una pestaña 177 en su parte inferior.

El cartucho incluye un cuerpo elástico, tal como un resorte 174, que empuja contra un saliente en la pieza del cartucho inferior 26 para influir en el actuador de válvula contra la junta 63. El resorte 174 es suficientemente fuerte como para cerrar la válvula a menos que una fuerza deliberada se aplique para tirar abajo el actuador 172. Las válvulas en el cartucho se pueden mantener cerradas en cierta medida para el transporte y el almacenamiento antes que sea utilizado el cartucho. De este modo, el cartucho se puede precargar durante su fabricación con los reactivos

necesarios y las soluciones de lavado para analizar la muestra de fluido sin que los fluidos se filtren del cartucho durante el transporte y el almacenamiento.

[0058] El mecanismo desplegable del actuador se localiza normalmente en un instrumento en el que el cartucho se ubica para el análisis de muestra (uno como el instrumento descrito en detalle más abajo con referencia a la Figura 10). El mecanismo comprende una guía deslizadora 175 que hace rotar a un miembro desplegable con bisagras 180 que tiene una mordaza 181 para recibir la pestaña 177 del actuador 172. Como se muestra en la Figura 18, la guía deslizadora 175 hace rotar el miembro desplegable con bisagras 180 hasta que la pestaña 177 se ubique dentro de la mordaza 181. Como se muestra en la Figura 19, un solenoide 146 tira para abajo el miembro 180 y el actuador de válvula 172 de manera que la junta 63 se libera del asiento de válvula, de este modo se abre la válvula y se permite que el fluido fluya entre los canales 170 y 171.

[0059] La Figura 20 ilustra la forma en que el fluido fluye dentro y fuera de la cámara de muestra, de la cámara de lavado, de la cámara de neutralizado y de las cámaras de reactivos, y como se controla en el cartucho. Cada una de estas cámaras, como se ilustra la cámara 414 en la Figura 20, se cubre con una membrana hidrofóbica 410 que permite el paso a su través de gas pero no el de líquido. La membrana hidrofóbica 410 se ubica entre la cámara 414 y el puerto de presión 32. El puerto de presión 32 se encuentra en la pieza del cartucho superior 22 y ubicado encima de la cámara 414. La membrana 410 retiene los líquidos en la cámara 414 durante el transporte y el almacenamiento del cartucho, incluso si el cartucho está girado por el lado de abajo. El puerto de presión 32 se hace con un tamaño tal como para recibir una boquilla de presión 182 que está conectada a una fuente de presión (por ejemplo, una bomba de vacío o una bomba neumática) ubicada normalmente en el instrumento exterior. La boquilla 182 incluye un anillo circular 184 y una pestaña 415. Un resorte 185 empuja contra la pestaña 415 para obligar a la boquilla 182 en el puerto de presión 30 de manera que el anillo circular 184 establezca un sellado alrededor del puerto 32. En funcionamiento, a la cámara 414 se le aplica la presión de aire positiva o un vacío a través del puerto de presión 32 para obligar a los líquidos hacia afuera o hacia adentro, respectivamente, de la cámara 414.

[0060] El asiento de válvula cónica 160 (anteriormente descrita con referencia a las Figuras 15A-5B) se encuentra en la pieza del cartucho intermedio 24 debajo de la cámara 414 para controlar el flujo de líquido entre la cámara 414 y el canal de comunicación 411. La válvula se abre y se cierra por el actuador de válvula 188 que tiene una pestaña 187 para retener la válvula cerrada hasta que una fuerza hacia abajo sea aplicada hacia el actuador 186. Esta fuerza hacia abajo es suministrada preferiblemente por un solenoide que tira para abajo al actuador 186 para abrir la válvula. El actuador de válvula 186 y el solenoide se ubican preferiblemente en el instrumento.

[0061] Las Figuras 7-8 muestran unas vistas planas superiores, respectivamente, del cartucho. La Figura 9 es un diagrama de bloques esquemático del cartucho. Como se muestra en cualquiera de las Figuras 7-9, el cartucho incluye una cámara de muestra 65 que tiene un puerto para adicionar una muestra de fluido al cartucho y una vía de flujo de muestra extendida desde la cámara de muestra 65. La vía de flujo de muestra se extiende desde la cámara de muestra 65 a través de la válvula 107 y en un canal 106. El canal 106 incluye una zona sensor 136 en la que el canal 106 tiene un plano por debajo que le permite una fácil detección óptica de la presencia de líquido en el canal. La vía de flujo de muestra continúa desde el canal 106 en la cámara de lisis 86 y a través del montón de filtros 87. La vía de flujo de muestra también incluye una canal 109 para la salida de fluido desde la cámara de lisis 86, un canal 110 que tiene una zona de detección de fondo plano 137, una válvula 111 y un canal 112 que lleva a la cámara de residuos de descarga 68 a través de una válvula 114.

[0062] El cartucho también incluye la cámara de residuos 66 para contener la solución residual y la cámara de reactivos 67 para contener los reactivos de lisis. La cámara de residuos 66 está conectada a la cámara de lisis 86 a través de una válvula 115, el canal 117 y el canal 106. La cámara de reactivos 67 está conectada a la cámara de lisis 86 a través de una válvula 119, el canal 117 y el canal 106. Los componentes de la muestra (por ejemplo, células y virus en la muestra) son capturados en el montón de filtros 87 y lisados en la cámara 86 para liberar el analito objetivo (por ejemplo, ácido nucleico) de los componentes de la muestra. El cartucho también incluye una vía de flujo de analito que se extiende desde la cámara de lisis 86 para llevar el analito separado de la muestra de fluido al recipiente de reacción 40 para la reacción química y la detección óptica. La vía de flujo de analito se extiende desde la cámara 86 a través del canal 109, el canal 110 y la válvula 111. Después de pasar a través de la válvula 111, la vía de flujo de analito diverge de la vía de flujo de muestra. Mientras que la vía de flujo de muestra se extiende a través del canal 112 en la cámara de residuos 68, la vía de flujo de analito diverge en el canal en forma de U 122. La vía de flujo de analito se extiende entonces dentro y fuera de la cámara neutralizadora 70 a través de una válvula 124. La vía de flujo de analito pasa entonces dentro y fuera de la cámara de mezcla patrón 71 a través de una válvula 126. Desde la cámara de mezcla patrón 71, la vía de flujo de analito se extiende a lo largo del canal 122, a través de una válvula 127, a través del canal 80, y en el recipiente de reacción 70 a través del puerto 41.

[0063] El recipiente de reacción 40 incluye el puerto 41 para adicionar la mezcla de reacción al recipiente, y el puerto 43 para la salida de los fluidos (por ejemplo, el aire o el exceso de mezcla de reacción) del recipiente. El cartucho también retiene el canal 81 en fluida comunicación con el puerto 43. El canal 81 incluye una zona de detección de fondo plano 130 para detectar la presencia de líquido en el canal. El canal 81 se conecta a un canal 131 (el canal 131 se extiende recto hacia abajo perpendicular a la página en la vista plana superior de la Figura 7). El canal 131 se conecta a un canal 132 que en el giro se conecta al canal 134 a través de una válvula 133 (el canal 134 se extiende recto hacia abajo perpendicular a la página en la vista plana superior de la Figura 7). El canal 134 se lleva al conducto de ventilación 36 que es una membrana hidrofóbica que permite desde el cartucho el paso de gas pero no el de líquido. Los canales, el conducto de ventilación, y la válvula ubicada aguas abajo desde el recipiente de reacción 40 se utilizan para presurizar la cámara 42 del recipiente, como se describe en la sección de funcionamiento siguiente.

[0064] El cartucho también incluye un primer puerto de presión 105 ubicado encima de la cámara de muestra 65, un segundo puerto de presión 116 ubicado encima de la cámara de residuo 66, un tercer puerto de presión 118 ubicado encima de la cámara de reactivos 67, un cuarto puerto de presión 123 ubicado encima de la cámara de neutralizado 70, un quinto puerto de presión 125 ubicado encima de la cámara de mezcla patrón 71, y un sexto puerto de presión 128 ubicado al final de el canal en forma de U 122. El cartucho incluye además las cámaras de los sensores 120 y 121 en fluida comunicación con la cámara de residuo 68. Las cámaras de los sensores 120 y 121 indican cuando los volúmenes predeterminados de líquido se han recibido en la cámara de residuo 68, tal como se describe en detalle más abajo.

[0065] Haciendo referencia a la Figura 10, el cartucho se utiliza preferiblemente en combinación con un instrumento 140 diseñado para aceptar uno o más cartuchos. Para clarificar la ilustración, el instrumento 140 muestra en la Figura 10 que sólo acepta un cartucho. Se sobreentiende, sin embargo, que el instrumento se puede diseñar para procesar múltiples cartuchos simultáneamente. El instrumento 140 incluye un nido de cartucho 141 en el que el cartucho se coloca para el procesamiento. El instrumento 140 también incluye el transductor 92 (por ejemplo, una bocina ultrasónica) para generar ondas de presión en la cámara de lisis del cartucho, nueve actuadores de válvula 142 para actuar las nueve válvulas en el cartucho, los nueve correspondiente solenoides 146 para tirar hacia abajo los actuadores de válvula, y seis boquillas de presión 145 para interrelacionarse con los seis correspondientes puertos de presión que se encuentran en el cartucho. Además, el instrumento incluye o está conectado a una o más fuentes de presión regulada para suministrar presión al cartucho a través de las boquillas de presión 145. Las fuentes de presión adecuadas incluyen bombas de jeringa, fuentes de aire comprimido, bombas neumáticas, o conexiones a fuentes externas de presión. El instrumento incluye además tres sensores ópticos ranurados 143 y tres sensores ópticos reflectivos 144.

[0066] La Figura 13 ilustra los sensores ópticos ranurados 143 ubicados para detectar líquido en las cámaras de sensores 120, 121 y la cámara de reactivos 67. Cada sensor 143 incluye incorporados un LED y un fotodiodo ubicados en los lados opuestos del sensor. El LED emite un haz que es detectado por el fotodiodo si el haz no es substancialmente refractado.

Tales sensores ópticos ranurados son vendidos de forma comercial por cierto número de proveedores. Al cartucho se le da tal forma que los sensores ópticos ranurados encajan alrededor de las cámaras 67, 120 y 121. El funcionamiento de cada sensor se produce como sigue. Si el líquido no está presente en la cámara el sensor lo rodea, el haz del LED se refracta substancialmente por el aire en la cámara y las paredes interiores curvadas de la cámara y sólo una señal débil, si es que la hay, se detecta por el fotodiodo ya que el aire tiene un índice de refracción que no iguala de cerca al del cartucho de plástico. Si hay líquido presente en la cámara, sin embargo, el haz desde el LED no refracta o sólo es refractado ligeramente y produce una señal mucho más fuerte detectada por el fotodiodo ya que el líquido tiene un índice de refracción que iguala de cerca al del cartucho de plástico. Los sensores ópticos 143 se utilizan por lo tanto para determinar la presencia o la ausencia de líquido en las cámaras 67, 120 y 121.

[0067] La Figura 14 muestra una vista lateral transversal cortada parcialmente, esquemática, de la cámara de sensor 120 en fluida comunicación con la cámara de residuo 68 y rodeado por el sensor óptico ranurado 143. La cámara de sensor 120 y el sensor 143 se utilizan para indicar cuando un volumen predeterminado de líquido está presente en la cámara de residuo 68. La cámara de sensor 120 se separa parcialmente desde la cámara de residuo 68 por una pared 151 que tiene un borde de desbordamiento 152. La altura de la pared se selecciona de manera que cuando el volumen predeterminado de líquido se reciba en la cámara de residuo 68, el líquido se derrame por encima del borde de desbordamiento y dentro de la cámara de sensor 120. El líquido en la cámara de sensor 120 se detecta entonces por el sensor 143.

[0068] Haciendo referencia otra vez a la Figura 13, el cartucho puede incluir también una segunda cámara de

sensor 121 en fluida comunicación con la cámara de residuo 68. La segunda cámara de sensor 121 está también separada de la cámara de residuo 68 por una pared 153 que tiene un borde de desbordamiento. La pared 153 es más alta que la pared 152 de manera que el líquido no se derrama sobre la pared 153 hasta un segundo volumen predeterminado de fluido además de que el primer volumen predeterminado de fluido se haya recibido en la cámara de residuo 68. Las cámaras de sensores 120, 121 y los sensores ópticos 143 son útiles para controlar el funcionamiento en el cartucho. La altura de la pared 152 se elige preferiblemente de manera que un volumen fijo de muestra de fluido de la cámara de muestra 65 haya fluido a través de la vía del flujo de muestra a la cámara de residuo 68, el líquido de muestra se derrama por encima en la cámara de sensor 120 y se detecta. La detección en la cámara 120 desencadena la liberación de solución de lavado de la cámara de lavado 66 que fluye a través de la vía del flujo de muestra a la cámara de residuo 68. Cuando un incremento del volumen de la solución de lavado se recibe en la cámara 68, el líquido se derrama sobre la pared 153 en la cámara de sensor 121 y se detecta. La detección de líquido en la cámara 121 desencadena entonces la liberación de reactivos de lisis desde la cámara 67. El sensor 143 que rodea la cámara 67 se puede utilizar entonces para indicar cuando la cámara 67 está vacía, desencadenando el inicio de la lisis ultrasónica. En una realización alternativa, el cartucho puede tener dos cámaras de residuo, una para la muestra y una para el lavado, y que cada cámara de residuo tenga una respectiva cámara de sensor conectada con ella.

[0069] Los sensores ópticos reflectantes en línea 144 se utilizan para determinar la presencia o la ausencia de líquido en las zonas de detección de fondo plano 130, 136, 137, de los canales 81, 106 y 110, respectivamente (Figura 7). Cada sensor 144 tiene incorporado un emisor y un detector ubicados encima de la zona de detección de fondo plano. El emisor emite un haz que se refleja desde el cartucho y se detecta por el detector. El sensor detecta un cambio en la señal cuando una interfase aire/líquido pasa a través de la región de detección. Opcionalmente, los sensores ópticos reflectantes de emisión dual se pueden utilizar para funcionamientos de detección más fiables. Ambos tipos de sensores ópticos reflectantes son bien conocidos en el sector y vendidos de forma comercial.

[0070] Haciendo referencia otra vez a la Figura 10, el instrumento 140 incluye también un módulo de intercambiador de calor 147 que tiene una ranura 148 para recibir el recipiente de reacción del cartucho. El módulo 147 está descrito con detalle más abajo con la referencia de la Figura 28. El instrumento 140 incluye además un mecanismo pasador 147 para asegurar una tapa 150 por encima de un cartucho. El nido del cartucho 141 incluye agujeros alineados 401 para recibir las patas del cartucho. Los agujeros alineados 401 aseguran un adecuado posicionamiento del cartucho en el nido 141 de manera que las boquillas de presión 145, el transductor 92 y el actuador de válvula 142 encajen en los correspondientes puertos en el cartucho y de manera que el recipiente de reacción encaje en la ranura 148. El transductor 92 debería posicionarse en el instrumento 140 de manera que cuando el cartucho se ubique en el nido 141, el transductor contacte con la pared de abajo de la cámara de lisis 86, como se muestra en la vista cortada parcialmente de la Figura 5. Además, el instrumento puede incluir un resorte o un mecanismo similar para influir en el transductor 92 contra la pared de la cámara de lisis 86.

[0071] El instrumento 140 también incluye varios equipamientos convencionales no mostrados en la Figura 10 que incluyen una placa lógica principal que tiene un microcontrolador para controlar el funcionamiento de los solenoides 146, el transductor 92, el módulo de intercambio de calor 147 y los sensores ópticos 143, 144. El instrumento también incluye o está conectado a una fuente de alimentación para alimentar el instrumento y una bomba neumática para suministrar aire a presión a través de las boquillas 145. El instrumento 140 se controla preferiblemente por ordenador utilizando, por ejemplo, el microcontrolador que está programado para desempeñar las funciones descritas en la sección de funcionamiento de más abajo. Otra posibilidad es que el instrumento pueda ser controlado por un ordenador aparte, o controlado por una combinación de un ordenador aparte y un microcontrolador integrado.

[0072] La Figura 11 muestra una vista isométrica de un cartucho 20 ubicado en el instrumento 140 para procesamiento. La Figura 11 muestra una vista parcial transversal cortada del instrumento 140 con la tapa 150 cerrada. Haciendo referencia otra vez a la Figura 11, una memoria o un chip microprocesador se pueden incorporar opcionalmente como parte del cartucho 20. El chip consta preferiblemente de información como el tipo de cartucho, la información de programa así como los protocolos específicos para el procesamiento del cartucho, tolerancias para la aceptación y el rechazo, los números de serie y los códigos de lotes para el seguimiento de la calidad, y el aprovisionamiento para el almacenamiento de los resultados del procesamiento. La memoria electrónica integrada en el cartucho 20 permite una configuración rápida, fácil y libre de error del instrumento 140 para diferentes protocolos de procesamiento fluido. Cuando el cartucho 20 se inserta en el instrumento 140, el instrumento puede dirigir electrónicamente la memoria en el cartucho, y de este modo recibir automáticamente el juego apropiado de instrucciones para controlar el tiempo-secuencia de las operaciones fluidas para llevar a cabo con el cartucho insertado. El instrumento 140 puede sencillamente recuperar secuencialmente y ejecutar cada paso en la memoria del cartucho, o descargar su contenido de manera que el usuario pueda editar la secuencia utilizada, por ejemplo, el

ordenador de control.

[0073] Si se incluye en el cartucho la memoria adecuada, tal como memoria gravable, por ejemplo, memoria de sólo lectura programable y borrrable (EPROM), memoria de sólo lectura programable y borrrable eléctricamente (EEPROM), etc., los resultados intermedios y finales basados en la muestra introducida en el cartucho, se podrían grabar en el instrumento mediante la memoria del cartucho para el almacenamiento reubicado con la muestra física después del procesamiento. Esto es particularmente ventajoso en aplicaciones donde es necesario el archivo de muestras y de resultados, como es el caso de los forenses. Además, otra información se puede almacenar en la memoria del cartucho, en forma definitiva (o alterable). Por ejemplo, el número de serie del cartucho, la información del lote de fabricación e información afín se podrían preprogramar y dejar como definitivas. Los datos de usuario, el número de identificación del técnico, la fecha de ensayo, la localización del ensayo y el número de serie del instrumento se podrían grabar definitivamente en el cartucho. Esto permite una fácil identificación de la "cadena de custodia" en el manejo de un espécimen. Expertos ingenieros en el sector del almacenamiento de datos reconocerán que otros medios de memoria como la electrónica se pueden utilizar, tales como zonas de impresión ópticamente dirigidas (por ejemplo, de chorro de tinta o térmico), bandas magnéticas, etc.

[0074] La Figura 28 muestra el módulo de intercambio de calor 147 del instrumento en que el recipiente de reacción se inserta para el procesamiento térmico y la detección óptica del(de los) analito(s) objetivo(s) en la mezcla de reacción. El módulo 147 incluye preferiblemente un alojamiento 208 para retener los diferentes componentes del módulo. El módulo 147 también incluye unos platos térmicos 190 que se describen más abajo. El alojamiento 208 incluye una ranura (que no se muestra en la Figura 28) encima de los platos 190 de tal forma que la cámara de reacción del recipiente 40 se pueda insertar a través de la ranura y entre los platos. El módulo de intercambio de calor 147 incluye también preferiblemente un sistema de refrigeración, como un ventilador 212. El ventilador 212 se ubica para ventilar el aire de refrigeración pasando por la superficie de los platos 190 para refrigerar los platos y de ahí refrigerar la mezcla de reacción en el recipiente 40. El habitáculo 208 define preferiblemente los canales para dirigir el paso de aire de refrigeración a los platos 190 y fuera del módulo 147.

[0075] El módulo de intercambio de calor 147 incluye además un montaje de excitación óptica 216 y un montaje de detección óptica 218 para interrogar ópticamente la mezcla de reacción contenida en el recipiente 40. El montaje de excitación 216 incluye una placa de circuito 220 para contener sus componentes electrónicos, y el montaje de detección 218 incluye una segunda placa de circuito 222 para contener sus componentes electrónicos. El montaje de excitación 216 incluye una o más fuentes de luz (por ejemplo, un LED, un láser o una bombilla) para excitar analitos etiquetados fluorescentemente en el recipiente 40. El montaje de excitación 216 incluye también una o más lentes para colimar la luz de las fuentes de luz, y también con filtros para seleccionar los intervalos de interés de la longitud de onda de excitación. El montaje de detección 218 incluye uno o más detectores (por ejemplo, un fotodiodo, un tubo fotomultiplicador, o un CCD) para detectar la luz emitida desde el recipiente 40. El montaje de detección 218 también incluye una o más lentes para enfocar la luz emitida, y también los filtros para seleccionar los intervalos de interés de la longitud de onda de emisión. Los montajes adecuados de excitación óptica y de detección óptica para utilizar en el módulo de intercambio de calor 147 se describen en la Publicación Internacional Número WO 99/60380 (Publicación Internacional Número PCT/US99/11182) publicada el 25 de noviembre de 1999.

[0076] Los montajes ópticos 216, 218 se ubican en el habitáculo 208 de manera que la cámara del recipiente 40 se inserte entre los platos 190, el montaje de excitación 216 esté en comunicación óptica con la cámara 42 a través de la pared lateral ópticamente transmisiva 57A (ver Figura 22) y el montaje de detección 218 está en comunicación óptica con la cámara a través de la pared lateral ópticamente transmisiva 57B (ver Figura 22). En la realización preferible, los montajes ópticos 216, 218 se ubican en comunicación óptica con las paredes laterales ópticamente transmisivas simplemente para ubicar los montajes ópticos 216, 218 cerca de los bordes de abajo de los platos 190 de manera que cuando la cámara del recipiente se ubique entre los platos, los montajes ópticos 216, 218 contacten directamente, o en cercana proximidad, con las paredes laterales.

[0077] La Figura 34 muestra una vista isométrica, transversal cortada parcialmente, de la cámara del recipiente insertado entre los platos 190A, 190B (la parte superior del recipiente está cortada transversalmente). El recipiente tiene preferiblemente una parte inferior angulada (por ejemplo, triangular) formada por las paredes laterales ópticamente transmisivas 57A, 57B. Cada uno de los platos 190A, 190B tienen una parte inferior de forma proporcional. La parte de abajo del primer plato 190A tiene un primer borde inferior 250A y un segundo borde inferior 2190B. De modo parecido, la parte de abajo del segundo plato 190B tiene un primer borde inferior 252A y un segundo borde inferior 252B. El primer y el segundo bordes inferiores de cada plato están preferiblemente compensados angularmente el uno del otro por el mismo ángulo con que las paredes 57A, 57B están compensadas entre sí (por ejemplo, 90°). Además, los platos 190A, 190B se ubican preferiblemente para acoger la cámara del

recipiente entre ellos de tal forma que la primera pared lateral 57A se posiciona substancialmente de forma adyacente y paralela a cada uno de los primeros filos inferiores 250A, 252A y de manera que la segunda pared lateral 57B se ubique de forma adyacente y paralela a cada uno de los segundos bordes inferiores 2190B, 252B. Esta disposición proporciona un fácil acceso óptico a las paredes laterales ópticamente transmisivas 57A, 57B y de ahí a la cámara del recipiente. Se pueden utilizar opcionalmente un gel o un fluido para establecer o mejorar la comunicación óptica entre cada montaje óptico y las paredes laterales 57A, 57B. El gel o el fluido deberían tener un índice de refracción cercano a los índices de refracción de los elementos a los que está acoplado.

[0078] Haciendo referencia otra vez a la Figura 28, los montajes ópticos 216, 218 se disponen preferiblemente para proporcionar un ángulo de 90° entre las trayectorias de excitación y de detección. El ángulo de 90° entre las trayectorias de excitación y de detección asegura que una cantidad mínima de radiación de excitación que entra a través de la primera pared lateral de la cámara sale a través de la segunda pared lateral. Además, el ángulo de 90° permite una cantidad máxima de radiación emitida recopilada a través de la segunda pared lateral. En la realización preferible, el recipiente 40 incluye una lengüeta localizada 58 (ver la Figura 22) que encaja en una ranura formada entre los montajes ópticos 216, 218 para asegurar el adecuado posicionamiento del recipiente 40 para la detección óptica. Para mejorar la detección, el módulo 147 también incluye preferiblemente una tapa ligeramente ajustada (no mostrada) que se ubica encima de la parte superior del recipiente 40 y fabricada de forma aligerada en el habitáculo 208 después de que el recipiente sea insertado entre los platos 190.

[0079] Aunque es actualmente preferible ubicar los montajes ópticos 216, 218 cerca de los bordes inferiores de los platos 190, muchas otras disposiciones son posibles. Por ejemplo, la comunicación óptica se puede establecer entre los montajes ópticos 216, 218 y las paredes del recipiente 40 vía fibras ópticas, tubos de luz, guía de onda, o dispositivos similares. Una ventaja de estos dispositivos es que eliminan la necesidad de ubicar los montajes ópticos 216, 218 físicamente adyacentes a los platos 190. Esto deja más espacio alrededor de los platos en los que circula el aire refrigerado o el refrigerante, de manera que la refrigeración puede ser mejorada.

[0080] El módulo de intercambio de calor 147 incluye también una placa de PC 226 que contiene los componentes electrónicos del módulo y un conector de extremo 224 para conectar el módulo 147 al instrumento 140 (Figura 10). Los elementos de calefacción y los sensores de temperatura en los platos 190, y también las placas ópticas 220, 222, se conectan a la placa de PC 226 mediante cables de flexo (no mostrados en la Figura 28 para clarificar la ilustración). El módulo 147 también puede incluir una traza de base 228 para proteger el circuito de detección óptica. El módulo 147 puede opcionalmente incluir un indicador, tal como un LED 214, para indicar a un usuario la posición actual del módulo de la forma "calefacción", "refrigeración", "finalizado" o "avería".

[0081] El habitáculo 208 se puede moldear de plástico de alto rendimiento, u de otro material convencional. Las funciones primarias del habitáculo 208 son proporcionadas por una estructura para acoger los platos 190, los montajes ópticos 216, 218, el ventilador 212, y la placa de PC 226. El habitáculo 208 proporciona también preferiblemente canales de caudal y puertos para dirigir el aire de refrigeración desde el ventilador 212 por todas las superficies de los platos 190 y fuera del habitáculo. En la realización preferible, el habitáculo 208 comprende piezas complementarias (sólo se muestra una pieza en la vista lateral esquemática de la Figura 28) que encajan juntas para encerrar los componentes del módulo 147 entre ellos.

[0082] Haciendo referencia otra vez a la Figura 23, los platos 190A, 190B pueden estar fabricados por diferentes materiales térmicamente conductivos incluyendo cerámica o metales. Los materiales cerámicos adecuados incluyen nitruro de aluminio, óxido de aluminio, óxido de berilio y nitruro de silicio. Otros materiales de los que los platos se pueden fabricar incluyen, por ejemplo, arseniuro de galio, silicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, cuarzo, vidrio, diamante, poliacrílicos, poliamidas, policarbonatos, poliésteres, poliimidas, polímeros de vinilo y polímeros de vinilo halogenados, tales como los politetrafluoroetilenos. Otros posibles materiales de los platos incluyen cromo/aluminio, superaleaciones, aleaciones de circonio, aluminio, acero, oro, plata, cobre, molibdeno, tantalio, latón, zafiro, o cualquier otro de los numerosos materiales cerámicos, metálicos o poliméricos disponibles en el sector.

[0083] Los platos cerámicos son preferibles actualmente porque sus superficies interiores pueden ser convenientemente torneados hasta una muy alta suavidad por la alta resistencia al desgaste, la alta resistencia química, y el buen contacto térmico con las paredes flexibles del recipiente de reacción. Los platos cerámicos también se pueden fabricar muy finos, preferiblemente entre aproximadamente 0,6 y 1,3 mm, para que masas térmicas bajas para provocar cambios de temperatura extremadamente rápidos. Un plato fabricado de cerámica es también un buen conductor térmico y un aislante eléctrico, de manera que la temperatura del plato se puede controlar correctamente utilizando un elemento resistivo de calefacción conectado al plato.

[0084] Diversos elementos térmicos se pueden emplear para calentar y/o refrigerar los platos 190A, 190B y de este modo controlar la temperatura de la mezcla de reacción en la cámara 42. En general, los elementos adecuados de calefacción para calentar el plato incluyen calentadores por conducción, calentadores por convección o calentadores por radiación. Los ejemplos de calentadores por conducción incluyen elementos calentadores por resistencia o inductivos acoplados a los platos, por ejemplo, resistencias o dispositivos termoeléctricos. Los ejemplos de calentadores por convección incluyen calentadores de aire forzado o intercambiadores de calor de fluido para flujos de fluido que pasa por los platos. Los ejemplos de calentadores por radiación incluyen calentadores por infrarrojos o microondas. De modo parecido, diversos elementos de refrigeración se pueden utilizar para refrigerar los platos. Por ejemplo, se pueden emplear diversos elementos de refrigeración por convección, como un ventilador, un dispositivo de efecto Peltier, un dispositivo de refrigeración, o una boquilla de chorro para el flujo de fluidos refrigerados pasando por las superficies de los platos. Diversos elementos de refrigeración por conducción son otra posibilidad, como puede ser un foco frío, por ejemplo, un bloque de metal enfriado, en contacto directo con los platos.

[0085] Haciendo referencia a la Figura 24, cada plato 190 tiene preferiblemente un elemento de calefacción resistivo 206 dispuesto en su superficie exterior. El elemento de calefacción resistivo 206 es preferiblemente una película gruesa o fina y puede estar directamente serigráfica en cada uno de los platos 190, especialmente los platos que contienen un material cerámico, tal como el nitrato de aluminio o el óxido de aluminio. La serigrafía proporciona alta fiabilidad y baja sección para transferir eficientemente calor en la cámara de reacción. Las resistencias de película gruesa o fina con diseños de variadas geometrías se pueden depositar en las superficies exteriores de los platos para proporcionar más calefacción uniforme, por ejemplo teniendo resistencias más densas en los extremos y resistencias más finas en el medio. Aunque es preferible actualmente depositar un elemento de calefacción en la superficie exterior de cada plato, un elemento de calefacción puede si no hornearse en el interior de cada plato, en especial si los platos son cerámicos. El elemento de calefacción 206 puede comprender metales, molibdeno, polisilicio, u otros materiales que calienten cuando una diferencia de potencial se aplique por todo el material. El elemento de calefacción 206 tiene dos finales que están conectados a los contactos respectivos 204 que están a su vez conectados a una fuente de voltaje (no mostrada en la Figura 24) para provocar una corriente al flujo a través del elemento de calefacción. Cada plato 190 también incluye preferiblemente un sensor de temperatura 192, tal como un termopar, un termistor, o un RTD, que está conectado por dos señales 202 a sus respectivos contactos 204. El sensor de temperatura 192 está acostumbrado a controlar del plato 190 mediante un bucle de retroalimentación controlado.

[0086] Los platos tienen una masa térmica baja para posibilitar el calentamiento rápido y la refrigeración rápida de los platos. En particular, es actualmente preferible que cada uno de los platos tenga una masa térmica de aproximadamente menos de 5 J/°C, más preferiblemente de aproximadamente menos de 3 J/°C, y mucho más preferiblemente de aproximadamente menos de 1 J/°C. Como se utiliza aquí, la masa térmica calificada de un plato se define como el calor específico del plato multiplicado por la masa del plato. Además, cada plato debería ser lo suficientemente grande como para cubrir una pared principal respectiva de la cámara de reacción. Actualmente en la realización preferible, por ejemplo, cada uno de los platos tiene una anchura X en el intervalo de 2 a 22 mm, una longitud Y en el intervalo de 2 a 22 mm, y un grosor en el intervalo de 0,5 a 5 mm. La anchura X y la longitud Y de cada plato se seleccionan para ser ligeramente más grandes que la anchura y la longitud de la cámara de reacción. Además, cada plato tiene preferiblemente una parte inferior angulada que iguala la geometría de la parte inferior de la cámara de reacción, como antes se describió con referencia a la Figura 34. También en la realización preferible, cada uno de los platos está fabricado de nitrato de aluminio que tiene un calor específico de aproximadamente 0,75 J/g°C. La masa de cada uno de los platos está preferiblemente en el intervalo de 0,005 a 5,0 g de manera que cada plato tenga una masa térmica dentro el intervalo de 0,00375 a 3,75 J/°C.

[0087] Los platos opuestos 190 se ubican para recibir entre ellos la cámara del recipiente 40 de manera que las paredes principales flexibles de la cámara contactan y se ajustan a las superficies interiores de los platos. Actualmente es preferible que los platos 190 se contengan en una relación opuesta el uno del otro utilizando, por ejemplo, fijaciones, soportes o prensaestopas. Otra posibilidad es que los platos 190 se puedan orientar el uno hacia el otro con un muelle como describe la Publicación Internacional Número Wo 98/38487. En otra realización de la invención, uno de los platos se sostiene en una posición fija, y el segundo plato es orientado hacia el primer plato con un muelle. Si uno o más resortes se utilizan para influir en los platos el uno hacia el otro, los resortes deberían ser lo suficientemente rígidos como para asegurar que los platos están presionados contra las paredes flexibles del recipiente con la suficiente fuerza como para provocar a las paredes que se ajusten a las paredes interiores de los platos.

[0088] Las Figura 29-30 ilustran una estructura de soporte 209 preferible para sostener los platos 190A, 190B en una relación opuesta entre sí. La Figura 29 muestra una vista explosionada de la estructura, y la Figura 30

muestra una vista ensamblada de la estructura. Para clarificar la ilustración, la estructura de soporte 209 y los platos 190A, 190B se muestran al revés en relación con su normal orientación en el módulo de intercambio de calor de la Figura 28. Haciendo referencia a la Figura 29, la estructura de soporte 209 incluye un plato montado 210 que tiene la ranura 148 en el interior. La ranura 148 es lo suficientemente grande como para permitir a la cámara del recipiente insertarse a través de ella. Los postes espaciados 230A, 230B se extienden desde el plato montado 210 en las caras opuestas de la ranura 148. El poste espaciado 230A tiene entrantes 232 que se encuentran en los lados opuestos del mismo (sólo un lado es visible en la vista isométrica de la Figura 29), y el poste espaciado 230B tiene entrantes 234 que se encuentran en los lados opuestos del mismo (sólo un lado es visible en la vista isométrica de la Figura 29). Los entrantes 232, 234 en los postes espaciados están para recibir los bordes de los platos 190A, 190B. Al montar la estructura, los platos 190A, 190B se ubican contra los lados opuestos de los postes espaciados 230A, 230B de tal forma que los bordes de los platos se ubiquen en los entrantes 232, 234. Los bordes de los platos se sostienen entonces en los entrantes utilizando medios de retención adecuados. En la realización preferible, los platos se retienen mediante ganchos de retención 236A, 236B. Otra posibilidad es que los platos 190A, 190B puedan retenerse mediante juntas adhesivas, tornillos, pestillos, abrazaderas, o cualquier otro medio adecuado.

[0089] El plato montado 210 y los postes espaciados 230A, 230B están preferiblemente formados íntegramente por una pieza de molde individual de plástico. El plástico debería ser un plástico de alta temperatura, tal como la polieterimida, que no se deformará por derretimiento cuando los platos 190A, 190B estén calientes. Los ganchos de retención 236A, 236B son preferiblemente aceros inoxidables. El plato montado 210 puede incluir opcionalmente hendiduras 240A, 240B para recibir los cables de flexo 238A, 238B, respectivamente, que conectan los elementos de calefacción y los sensores de temperatura dispuestos en los platos 190A, 190B a la placa de PC 226 del módulo de intercambio de calor 147 (Figura 28). La parte de los cables de flexo 238A adyacente al plato 190A se sostiene en la hendidura 240A mediante una pieza de cinta 242A, y la parte de los cables de flexo 238B adyacente al plato 190B se sostiene en la hendidura 240B mediante una pieza de cinta 242B.

[0090] La Figura 31 es una vista isométrica de la estructura de soporte montada 209. El plato montado 210 incluye preferiblemente lengüetas 246 que se extienden desde las caras opuestas del mismo para asegurar la estructura 209 del habitáculo del módulo del intercambiador de calor. Haciendo referencia a la Figura 28, el habitáculo 208 incluye preferiblemente ranuras para acoger las lengüetas para sostener el plato montado 210 bien asegurado en su sitio. Otra posibilidad es que el plato montado 210 se pueda adjuntar al habitáculo 208 usando, por ejemplo, juntas adhesivas, tornillos, pestillos, abrazaderas, o cualquier otro medio de fijación adecuado.

[0091] Haciendo referencia otra vez a la Figura 29, la estructura de soporte 209 sustenta preferiblemente los platos 190A, 190B de manera que sus superficies interiores están anguladas muy ligeramente la una hacia la otra. En la realización preferible, cada uno de los postes espaciados 230A, 230B tiene una pared 244 que está ligeramente estrechada de manera que cuando los platos 190A, 190B se presionen contra las caras opuestas de la pared, las superficies interiores de los platos estén anguladas ligeramente la una contra la otra. Como mejor se muestra en la Figura 23, las superficies interiores de los platos 190A, 190B se orientan la una contra la otra para formar una ranura en forma ligeramente de V en la que se inserta la cámara 42. La cantidad mediante la cual las superficies interiores están anguladas la una hacia la otra es muy leve, preferiblemente de aproximadamente 1° desde el paralelo. Las paredes están anguladas la una contra la otra de manera que, antes de la inserción de la cámara 42 entre los platos 190A, 190B, las partes inferiores de los platos estén ligeramente más cerca la una de otra que las partes superiores. Este ligero angulado de las superficies interiores permite a la cámara 42 del recipiente insertarse entre los platos y retirarse de los platos con más facilidad. Otra posibilidad es que las superficies interiores de los platos 190A, 190B se podrían sustentar de forma paralela entre sí, pero la inserción y la extracción del recipiente 40 serían muy dificultosas.

[0092] Además, las superficies interiores de los platos 190A, 190B se espacian preferiblemente entre sí a una distancia igual al grosor de la estructura 46. En realizaciones en las que las superficies interiores están anguladas la una contra la otra, los centros de las superficies interiores se espacian preferiblemente a una distancia igual al grosor de la estructura 46 y las partes inferiores de los platos se espacian al principio a una distancia que es ligeramente menor que el grosor de la estructura 46. Cuando la cámara 42 se inserta entre los platos 190A, 190B, la estructura rígida 46 obliga aparte a la parte inferior de las porciones de los platos de manera que la cámara 42 se encaja firmemente entre los platos. La distancia que los platos 190A, 190B que están metidos a presión aparte por la estructura 46 es normalmente muy pequeña, por ejemplo, de aproximadamente 0,035 mm si el grosor de la estructura es de 1 mm y las superficies interiores estén anguladas la una hacia la otra por 1° .

[0093] Haciendo referencia otra vez a la Figura 30, los ganchos 236A, 236B deberían ser lo suficientemente flexibles como para alojar este ligero movimiento hacia fuera de los platos 190A, 190B, y más suficientemente rígido para contener los platos dentro de los recovecos en los postes espaciados 230A, 230B durante la inserción y la

extracción del recipiente. El apretujado del recipiente entre los platos 190A, 190B proporciona una precarga inicial contra la cámara y asegura que las paredes principales flexibles de la cámara, cuando están presurizadas, establezcan un buen contacto térmico con las superficies interiores de los platos.

[0094] Haciendo referencia otra vez a la Figura 28, para limitar la cantidad que los platos 190 se pueden esparcir aparte debido a la presurización del recipiente 40, y se pueden moldear topes en los habitáculos de los montajes ópticos 216, 218. Como se muestra en la Figura 32, el habitáculo 249 de los montajes ópticos 218 incluye unos topes tipo pinza 247A, 248B que se prolongan aparentemente desde el habitáculo. Como se muestra en la Figura 33, el habitáculo 249 se ubica de manera que los bordes inferiores de los platos 190A, 190B estén insertados entre los topes 247A, 247B. De este modo los topes 247A, 247B impiden que los platos 190A, 190B se extiendan más lejos que una distancia máxima predeterminada el uno del otro. Aunque no se muestra en la Figura 33 para ilustrar claramente la ilustración, los montajes ópticos 216 (ver la Figura 28) tienen un habitáculo con los correspondientes topes para evitar que los empalmes de los platos se extiendan más lejos que una distancia máxima predeterminada el uno del otro. Haciendo referencia otra vez a la Figura 23, la distancia máxima que los topes permiten a las superficies interiores de los platos 190A, 190B para espaciarse el uno del otro debería igualar estrechamente el grosor de la estructura 46. Preferiblemente, el espaciado máximo de las superficies interiores de los platos 190A, 190B es ligeramente más grande que el grosor de la estructura 46 para alojar variaciones de tolerancia en el recipiente 40 y los platos 190A, 190B. Por ejemplo, el espaciado máximo es preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 0,3 mm mayor que el grosor de la estructura 46.

[0095] La Figura 35 es un diagrama de bloques esquemático de la electrónica del módulo de intercambio de calor 147. El módulo incluye un conector 224 o el cable de flexo para la conexión al teclado lógico principal del instrumento. El módulo incluye también los platos calefactores 190A, 190B teniendo cada uno un elemento de calefacción resistivo como se describe más abajo. Los platos 190A, 190B están conectados en paralelo para recibir la entrada de corriente 253 del instrumento. Los platos 190A, 190B también incluyen sensores de temperatura 192A, 192B de los que salen señales analógicas de temperatura hacia un conversor analógico-digital 264. El conversor 264 convierte las señales analógicas y las envía al microcontrolador en el instrumento a través del conector 224.

[0096] El módulo de intercambio de calor incluye también un sistema de refrigeración, tal como un ventilador 212, para refrigerar los platos 190A, 190B y la mezcla de reacción contenida en el recipiente insertado entre los platos. El ventilador 212 se activa mediante la puesta de un interruptor de potencia 272, que está controlada su conexión mediante un bloque lógico de control 270 que recibe las señales de control desde el microcontrolador. El módulo incluye además cuatro fuentes de luz, tales como LEDs 200, para excitar los analitos etiquetados en la mezcla de reacción y cuatro detectores 198, preferiblemente fotodiodos, para detectar las emisiones fluorescentes desde la mezcla de reacción. El módulo también incluye una fuente ajustable de corriente 255 para suministrar una cantidad variable de corriente (por ejemplo, en el intervalo de 0 a 30 mA) a cada LED para variar el brillo del LED. El conversor analógico digital 260 se conecta entre la fuente ajustable de corriente 255 y el microcontrolador para permitir que el microcontrolador ajuste digitalmente la fuente de corriente.

[0097] La fuente ajustable de corriente 255 se utiliza preferiblemente para asegurar que cada LED tiene aproximadamente el mismo brillo cuando se activan. Debido a las discrepancias en las producciones, muchos LEDs tienen diferentes brillos cuando se les proporciona de la misma cantidad de corriente. Por lo tanto, actualmente es preferible ensayar el brillo de cada LED durante la fabricación del módulo de intercambio de calor y almacenar el dato de calibración en una memoria 268 del módulo. El dato de calibración indica la cantidad correcta de corriente a proporcionar a cada LED. El microcontrolador lee la fecha de calibración de la memoria 268 y controla en consecuencia la fuente de corriente 255.

[0098] El módulo incluye adicionalmente un bloque de condicionador de señal/selector de ganancia/ajuste de desviación 262 que comprende amplificadores, interruptores, filtros electrónicos, y un convertidor digital-analógico. El bloque 262 ajusta las señales de los detectores 198 para incrementar la ganancia, la desviación, y reducir el ruido. El microcontrolador controla el bloque 262 a través de un registro de salida digital 266. El registro de salida digital 266 recibe datos del microcontrolador y los voltajes de control de salida al bloque 262. Las señales del detector ajustadas al microcontrolador salen del bloque 262 a través de un conversor analógico-digital 264 y el conector 224. El módulo incluye también la memoria 268, preferiblemente una EEPROM en serie, para almacenar los datos específicos al módulo, tal como los datos de calibración para los LEDs 200, los platos térmicos 190A, 190B, y los sensores de temperatura 192A, 192B.

[0099] El funcionamiento del cartucho y del instrumento será descrito a continuación. Como se muestra en la Figura 3, una muestra de fluido para ser analizada es añadida a la cámara de muestra 65 a través del puerto de muestra 65 y la tapa 30 atornillada al puerto 64 para sellar el cierre del puerto. Haciendo referencia a la Figura 10, el

cartucho 20 se ubica entonces en el nido del cartucho 141 del instrumentos 140 para el procesamiento. Cuando el cartucho se ubica en el instrumento 140 todas las válvulas en el cartucho 20 están inicialmente cerradas. Cuando el cartucho se ubica en el instrumento, el transductor 92 se pone en contacto con la superficie externa de la junta flexible 63 formando la pared superior de la cámara de lisis 86, tal como se muestra en la Figura 5.

[0100] Haciendo referencia otra vez a la Figura 10, el instrumento 140 es controlado preferiblemente por ordenador para ejecutar las funciones descritas en la siguiente sección, por ejemplo, abriendo y cerrando válvulas en el cartucho utilizando actuadores de válvulas 142, suministrando presión al cartucho a través de boquillas 145, activando el transductor 92, detectando la presencia de líquido o de niveles de líquido utilizando los sensores ópticos 143 y 144, y controlando el intercambiador de calor y el módulo de detección óptica 147. Un programador que tenga habilidades normales en el sector sería capaz de programar un microcontrolador y/u ordenador para ejecutar estas funciones basadas en la siguiente descripción.

[0101] Haciendo referencia a la Figura 9, los líquidos son preferiblemente obligados a fluir a través del cartucho utilizando presiones diferenciales. Aunque aquí se describen presiones positivas, se pueden utilizar también presiones negativas (vacío) para controlar el flujo de fluido en el cartucho. La cantidad máxima de presión positiva que se puede aplicar está normalmente limitada por las membranas hidrofóbicas que puede llegar a una presión de penetración de líquido por encima de 30 libras por pulgada cuadrada (psi). El límite inferior de presión se limita por la necesidad de mover la muestra y otros fluidos a través del cartucho lo suficientemente rápido para llegar a las metas del ensayo. Por debajo de 1 psi, por ejemplo, la muestra puede no fluir de manera eficiente a través del montón de filtros 87. Presiones en el intervalo de 6 a 20 psi son generalmente las adecuadas. La velocidad del flujo de muestra a través del cartucho está preferiblemente en el intervalo de 10 a 30 ml/minuto. La velocidad del flujo de lavado puede ser más lento, por ejemplo, de 6 a 18 ml/minuto de manera que el lavado lave con eficacia la cámara de lisis 86.

[0102] Ahora se describirá un protocolo específico con referencia a la Figura 9 para ilustrar el funcionamiento del cartucho. Sirve para entender que esto es simplemente un ejemplo de un posible protocolo y que no se intenta limitar el alcance de la invención. Para empezar, el cartucho se ceba preferiblemente con una solución de lavado de la cámara de lavado 68 antes que a la muestra de fluido se le obligue a fluir desde la cámara de muestra 65. Al cebar el cartucho, las válvulas 111 y 115 están abiertas y se aplica a la cámara 66 una presión de 10 psi a través del puerto de presión 116 durante aproximadamente dos segundos. Una parte pequeña de la solución de lavado fluye a través de los canales 117 y 106, a través de la cámara de lisis 86, a través de los canales 109 y 110, en el canal con forma de U 122, y todo el camino hasta la membrana hidrofóbica por debajo del puerto de presión 128.

[0103] Siguiendo al cebado, la válvula 115 y el puerto de presión 116 están cerrados y las válvulas 107 y 114 están abiertas. A la vez, se aplica a la cámara de muestra 65 la presión de 20 psi a través del puerto de presión 105 durante aproximadamente 15 segundos para obligar a la muestra a fluir a través del canal 106, a través del montón de filtros 87 en la cámara 87, a través de los canales 110, 111, 112 y en la abertura de la cámara de residuo 68. Como la muestra pasa la zona de detección 136 en el canal 106, el sensor óptico reflectante 114 (Figura 13) se puede utilizar para determinar cuando la cámara de muestra 65 se ha vaciado. Como el líquido de muestra fluye a través del montón de filtros 87, se capturan en la muestra las células y los virus objetivos. Cuando un volumen predeterminado de muestra alcanza la cámara de residuo 68, una parte del líquido se derrama en la cámara de sensores 120, desencadenando el siguiente paso del protocolo. Otra posibilidad es que en vez de utilizar retroalimentación desde los sensores ópticos para provocar las pruebas, los pasos en un protocolo predeterminado se pueden sencillamente calcular en el tiempo, aplicando presiones predeterminadas para duraciones predeterminadas de tiempo para mover volúmenes de fluido a velocidades de caudal conocidas.

[0104] El diseño del paso de flujo a través de la cámara de lisis 86 permite que las células y los virus objetivos de un volumen de muestra relativamente grande se concentren en un volumen mucho más pequeño para la amplificación y la detección. Esto es importante para la detección de bajas concentraciones de analito en la muestra, tal como el ácido nucleico. En particular, la proporción del volumen de muestra obligada a fluir a través de la cámara de lisis 86 es preferiblemente por lo menos de 2:1, y más preferiblemente de por lo menos 5:1. El volumen de muestra obligada a fluir a través de la cámara 86 es preferiblemente de por lo menos de 100 μ l, y más preferiblemente de por lo menos 1 ml. En la presente preferible realización, un volumen de muestra de 5 ml se obliga a fluir a través de la cámara de lisis 86, y la cámara 86 tiene una capacidad de volumen de aproximadamente 0,5 ml, de manera que la proporción es de 10:1. Además, la cámara de lisis 86 se puede sonicar (por ejemplo, utilizando una bocina ultrasónica conectada a la pared de la cámara) a medida que la muestra es obligada a fluir a través de la cámara. La sonicación de la cámara 86 ayuda a prevenir obstrucciones del montón de filtros 87, manteniendo el flujo más uniforme a través de la cámara 86. En particular, las ondas de sonido ayudan a prevenir a la materia particulada o las perlas en el montón de filtros de obstruirse uno o más filtros.

[0105] En el paso siguiente, se abren las válvulas 111, 114, 115 y se aplica a la cámara de lavado 66 una presión de 20 psi durante aproximadamente siete segundos para obligar a la solución de lavado a fluir a través de los canales 117 y 106 en la cámara de lisis 86. La solución de lavado retira los inhibidores de la PCR y los contaminantes de la cámara de lisis 86 y los lleva entonces a través de los canales 109, 110 y 112 hacia la cámara de residuo 68. Una variedad de soluciones de lavado adecuadas se pueden utilizar para este propósito variando el pH, la composición del disolvente y la fuerza iónica y son bien conocidos en el sector. Por ejemplo, un reactivo de lavado adecuado es una solución de 80 mM de acetato de potasio, 8,3 mM de Tris-HCl, un pH de 7,5, 40 μ M de EDTA, y un 55 % de etanol. La cámara de lisis 86 puede sonicarse (por ejemplo, utilizando una bocina ultrasónica conectada a la pared de la cámara) mientras que a la solución de lavado se le obliga a fluir a través de la cámara. La sonicación de la cámara 86 ayuda a prevenir obstrucciones del montón de filtros 87, manteniendo el flujo más uniforme a través de la cámara 86 como se describió anteriormente. Además, las ondas de sonido pueden ayudar a soltar el material para ser retirado. Cuando el volumen aumentado de solución de lavado alcanza la cámara de residuo 68, parte del líquido se derrama en la cámara de sensores 121, desencadenando el siguiente paso en el protocolo.

[0106] En el paso siguiente, la válvula 115 se cierra y la válvula 119 se abre mientras se aplica a la cámara de reactivos 67 la presión de 15 psi a través del puerto de presión 118 durante aproximadamente tres segundos. La presión obliga al reactivo de lisis a fluir de la cámara 67 a través de los canales 117, 106 en la cámara de lisis 86, y en el canal 110. La cámara 86 se llena de este modo con líquido. Los reactivos de lisis adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones que contienen una sal caotrópica, como la guanidina de HCl, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, yoduro sódico, urea, perclorato sódico y bromuro potásico. En la actual preferible realización, se utiliza un reactivo de lisis que no es inhibidor de la PCR. El reactivo de lisis comprende 10 mM de tris, 5% entre 20, 1 mM de tris (hidrocloruro de 2-carboxietil fosfina), 0,1 mM de ácido Etileno Glicol-bis (éter b-aminoetilico) - N,N,N',N' - tetraacético. Después de que la cámara de lisis 86 se llene del reactivo de lisis, las válvulas 111, 114 se cierran. La válvula 119 se mantiene abierta y se aplica una presión de 20 psi al puerto de presión 118. La presión estática en la cámara de lisis 86 se aumenta por lo tanto a 20 psi como preparativo para el lisado de las células o los virus atrapados en el montón de filtros 87.

[0107] Haciendo referencia otra vez a la Figura 5, la presurización de la cámara de lisis 86 es importante porque asegura el acoplamiento efectivo entre el transductor 92 y la pared flexible 63 de la cámara de lisis 86. Para deteriorar las células y los virus en la cámara 86, se activa el transductor 92 (esto es, colocado en movimiento vibratorio). La pared flexible 63 de la cámara de lisis 86 transfiere el movimiento vibratorio del transductor 92 al líquido en la cámara 86 mediante la permisión de ligeras desviaciones sin la creación de altas tensiones en la pared. La pared 63 puede estar formada por una membrana elastomérica como la descrita anteriormente. Otra posibilidad es que la pared pueda ser una película o una lámina de material polimérico (por ejemplo, una película de polipropileno) que tenga preferiblemente un grosor en el intervalo de 0,025 a 0,1 mm. El transductor 92 es preferiblemente una bocina ultrasónica para la sonicación de la cámara 86. La cámara 86 se sonica preferiblemente durante 10 a 40 segundos a una frecuencia en el intervalo de 20 a 60 kHz. En el protocolo ejemplar, la cámara se sonica durante 15 segundos a una frecuencia de 47 kHz. La amplitud de la punta de la bocina está preferiblemente en un intervalo de 20 a 25 μ m (medidos pico a pico).

[0108] Tal como vibra la punta del transductor 92, impacta repetidamente contra la pared flexible 63. En su golpe hacia delante (en la dirección ascendente en la Figura 6), la punta del transductor 92 empuja a la pared 63 y crea un pulso de presión o una onda de presión en la cámara 86. En su golpe en dirección hacia atrás (hacia abajo en la Figura 5), la punta del transductor 92 se separa por lo general de la pared flexible 63 porque la pared flexible 63 no se puede mover a la misma frecuencia que el transductor. En su próximo golpe hacia delante, la punta del transductor 92 impacta de nuevo la pared 63 en una colisión frontal de manera que la punta y la pared se aceleran la una hacia la otra. A causa de que el transductor 92 y la pared 63 se separan de manera que el transductor 92 vibra, el golpe eficaz hacia delante del transductor es menor que su amplitud pico a pico. El golpe eficaz hacia delante determina el nivel de sonicación en la cámara 86. Es por lo tanto importante para incrementar la presión estática en la cámara de lisis 86 de manera que cuando la punta del transductor 92 se retira, se obliga aparentemente a la pared flexible 63 a encontrar la punta en su golpe de retorno. La presión estática en la cámara 86 debería ser suficiente para asegurar que el golpe eficaz hacia delante del transductor 92 genere pulsos de presión u ondas de presión en la cámara 86. Actualmente es preferible incrementar la presión estática en la cámara 86 hasta por lo menos 5 psi por encima de la presión ambiental del exterior del cartucho, y más preferiblemente a una presión en el intervalo de 15 a 25 psi por encima de la presión ambiental.

[0109] En cada golpe hacia delante, el transductor 92 transfiere una velocidad al líquido en la cámara 86, creando de este modo una onda de presión que rápidamente se extiende por toda la cámara 86. Las perlas en el

montón de filtros 87 (Figura 6) son agitadas por las ondas de presión en la cámara 86. Las ondas de presión impulsan las perlas en un movimiento violento en la cámara 86, y las perlas rompen mecánicamente las células y los virus para liberar el material (por ejemplo, ácido nucleico) desde allí dentro. Se debería anotar que algunos tipos de células, tales como las células sanguíneas, son relativamente débiles y se pueden deteriorar si se utilizan solamente ondas de presión (por ejemplo, ondas ultrasónicas) sin el uso de las perlas. En otros tipos de células (en particular esporas) las paredes celulares han resistido muy bien y las perlas son necesarias para el lisado efectivo.

[0110] Haciendo referencia otra vez a la Figura 9, en la siguiente perturbación de las células y los virus, las válvulas 111, 124 se abren y una presión de 12 psi se entrega durante aproximadamente 4 segundos a la cámara de reactivo 67 a través del puerto de presión 118. La presión obliga al reactivo de lisado para hacer eluyente el ácido nucleico desde el montón de filtros 87 y fluir con el ácido nucleico en la cámara de neutralización 70. La cámara de lisis 86 puede sonicarse (por ejemplo, utilizando una bocina ultrasónica acoplada a una pared de la cámara) mientras el ácido nucleico se hace eluyente. Sonicando la cámara 86 se puede ayudar a prevenir la obstrucción del montón de filtros 87, como se describió anteriormente. La cámara 420 se llena parcialmente (por ejemplo, medio llena) con el neutralizador, tal como un detergente, para neutralizar el reactivo de lisis. El neutralizador es opcional si se utiliza un reactivo de lisis no inhibidor de la PCR.

[0111] En el siguiente paso, la válvula 24 se cierra para retener el reactivo de lisis, el analito y el neutralizador en la cámara 70. La válvula 114 se abre y se aplica una presión de 15 psi durante aproximadamente tres segundos a través del puerto de presión 128 para obligar a cualquier líquido en el canal en forma de U 122 a fluir en la cámara de residuo 68. Después, las válvulas 124 y 126 se abren y se aplica una presión de 15 psi durante aproximadamente cinco segundos a través del puerto de presión 123 en la parte superior de la cámara de neutralizador 70. Las presiones obligan al reactivo de lisis neutralizado y al ácido nucleico en la cámara 70 a fluir en el canal 122 y en la cámara de mezcla patrón 71. La válvula 126 de la cámara de mezcla patrón 71 se cierra entonces. La cámara de mezcla patrón contiene los reactivos de PCR y las sondas fluorescentes que se mezclan con los reactivos de lisis neutralizados y el ácido nucleico para formar una mezcla de reacción.

[0112] En el siguiente paso, mediante la abertura de la válvula 114 el canal 122 se vacía a la cámara de residuo 68 y se aplica una presión de 15 psi durante aproximadamente 1 segundo al puerto de presión 128. En el siguiente paso, la mezcla de reacción formada en la cámara de mezcla patrón 71 se mueve en el recipiente de reacción 40 como sigue. Las válvulas 126, 127 y 133 se abren y se aplica una presión de 15 psi durante aproximadamente seis segundos al puerto de presión 125 en la parte superior de la cámara de mezcla patrón 71 para obligar a la mezcla de reacción fluir a través del canal 122, la válvula 127 y el canal 80 en el recipiente de reacción 40 a través del puerto 41. La mezcla de reacción llena la cámara 42 del recipiente, desplazando aire en la cámara que sale a través el canal de salida 52. El aire que escapa a través del canal de salida 52 viaja en el canal 81 y pasa a la zona de sensores 130 y en el canal 131. Desde el canal 131, el aire fluye en el canal 132, a través de la válvula 133, el canal 134 y sale del cartucho a través del conducto de ventilación 36. Cuando un volumen de mezcla de reacción suficiente para llenar la cámara 42 ha fluido en el recipiente, la mezcla de reacción excedente sale del recipiente a través del canal de salida 52. La mezcla de reacción excedente fluye en el canal 81 y se detecta ópticamente en la zona de sensores 130. Cuando la mezcla de reacción se detecta, la válvula 133 se cierra mientras se aplica la presión desde el puerto de presión 125 para presurizar la cámara de reacción 42.

[0113] Haciendo referencia otra vez a la Figura 23, la presurización de la cámara 42 expande las paredes principales flexibles 48 del recipiente. En particular la presión obliga a la pared principal 48 a contactar y a ajustarse a las superficies interiores de los platos 190A, 190B. Esto asegura la conductancia térmica óptima entre los platos 190A, 190B y la mezcla de reacción en la cámara 42. Actualmente es preferible el presurizado de la cámara 42 a una presión en el intervalo de 2 a 30 psi por encima de la presión ambiental. Este intervalo es actualmente preferible porque generalmente 2 psi es suficiente presión para asegurar conformidad entre las paredes 45 y las superficies de los platos 190A, 190B, mientras que presiones por encima de 30 psi pueden causar el reventón de las paredes 48, la deformación de la estructura 46 o de los platos 190A, 190B, o el reventón de las membranas hidrofóbicas en el cartucho. Más preferiblemente, la cámara 42 se presuriza a una presión en el intervalo de 8 a 15 psi por encima de la presión ambiental. Este intervalo es más preferible porque es más prudente sin llegar a los límites prácticos descritos anteriormente. Cuando la cámara 42 se presuriza, la mezcla de reacción en el recipiente 40 se procesa térmicamente y se interroga ópticamente para determinar la presencia o la ausencia del analito objetivo en la mezcla.

[0114] Haciendo referencia otra vez a la Figura 35, la mezcla de reacción es procesada térmicamente entre los platos 190A, 190B utilizando el control derivativo-integral-proporcional (PID) estándar utilizando temperaturas objetivo y señales de retroalimentación de los sensores de temperatura 192A, 192B. Si se hace proporcionalmente se puede lograr o mediante la variación de la proporción de tiempo en "on" a tiempo en "off", o, preferiblemente con

salidas analógicas proporcionales que disminuyen la potencia promedio siendo suministrada o por los elementos de calefacción de los platos 190A, 190B o por el ventilador 212 como la misma temperatura de los platos 190A, 190B se acerca a la deseada temperatura de punto de ajuste. El control PID combina el modo proporcional con una función de reposición automática (integrando la señal de desviación con respecto al tiempo) y la acción tipo (sumando la señal integral y la de desviación para cambiar la banda proporcional). El control PID estándar se conoce bien en el sector y no necesita describirse más. Otra posibilidad es que la mezcla de reacción se pueda procesar térmicamente utilizando una versión modificada del control PID descrita en la Publicación Internacional Número WO 99/48608 (Solicitud Número PCT/US99/06628).

[0115] Como la mezcla de reacción es térmicamente cíclica entre los platos 190A, 190B para amplificar una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo en la muestra, la mezcla se interroga ópticamente, preferiblemente al punto de temperatura más bajo en cada ciclo. La interrogación óptica se consume mediante la activación secuencial de cada uno de los LEDs 200 para excitar diferentes analitos etiquetados fluorescentemente en la mezcla y mediante la luz de detección emitida (salida fluorescente) desde la cámara 42 utilizando los detectores 198. Haciendo referencia otra vez a la Figura 22, los haces de excitación se transmiten preferiblemente a la cámara 42 a través de la pared lateral transmisiva 57A, mientras que la emisión fluorescente se detecta a través de la pared lateral 57B.

[0116] Una ventaja de los cartuchos de la presente invención es que permiten al material intracelular una relativamente cantidad grande de muestras de fluido, por ejemplo, unos cuantos mililitros o más, se separen de la muestra y se concentren en una cantidad mucho más pequeña de fluido de reacción, por ejemplo, 100 μ l o menos. El cartucho permite factores de concentración extraordinarios mediante el material extraído de manera eficiente de cantidades de mililitro de muestra de fluido. En particular, la cámara de muestra 65 tiene preferiblemente una capacidad de volumen en el intervalo de 100 μ l a 12 ml. Más preferiblemente, la cámara de muestra 65 tiene una capacidad de volumen de al menos 1 ml. Se prefiere el límite inferior de 1 ml porque al menos 1 ml de muestra se debería analizar para detectar analitos de concentración baja tales como el ácido nucleico. Se prefiere el límite superior de 12 ml porque un volumen de muestra mayor de 12 ml requeriría de un cartucho mucho más grande y probablemente se obstruiría el montón de filtros. En la actual preferible realización, la cámara de muestra tiene una capacidad de volumen de 5,5 ml para contener 5 ml de muestra.

[0117] La cámara de lavado 66 tiene una capacidad de volumen proporcional al volumen de la cámara de lisis 86. En particular, la cámara de lavado 66 contiene preferiblemente un volumen de lavado que es al menos una o dos veces el volumen de la cámara de lisis 86 para asegurar que hay suficiente solución de lavado para lavar los inhibidores de la PCR y para los desechos de la cámara 86. En la actual realización preferible, el volumen de la cámara de lisis 86 es aproximadamente de 0,5 ml y el volumen de la cámara de lavado 66 es de 2,5 ml para contener 2 ml de solución de lavado. El volumen de la cámara de lisis de 0,5 ml es un compromiso entre un tamaño suficientemente grande para evitar obstrucciones del montón de filtros 87 y un tamaño suficientemente pequeño para concentrar el analito en un volumen pequeño para mejorar la amplificación y la detección.

[0118] La cámara de reactivo 67 contiene preferiblemente un volumen de reactivos de lisis que es al menos una o dos veces el volumen de la cámara de lisis 86 de manera que haya suficiente reactivo de lisis para presurizar la cámara y para hacer eluyente el ácido nucleico de la cámara. En la actual realización preferible, la cámara 67 tiene una capacidad de volumen de 1,5 ml para contener aproximadamente de 1 a 1,5 ml de reactivo de lisis. La cámara de residuo 68 tiene una capacidad de volumen suficiente para contener la muestra, la solución de lavado y el reactivo de lisis sin utilizar. La cámara de residuo 68 está dimensionada a 9,5 ml de capacidad de volumen en la realización preferible.

[0119] El tamaño de la cámara de neutralización 70 cuenta con el volumen de la cámara de lisis 86 desde que el neutralizador en la cámara 70 neutraliza el volumen de reactivo de lisis que llena la cámara de lisis 86. Es comúnmente preferible que la cámara de lisis tenga un volumen de 0,5 ml, de manera que la cámara 70 tenga una capacidad de volumen de 1,0 ml para contener aproximadamente 0,5 ml de neutralizador que se mezcla con 0,5 ml del reactivo de lisis y el analito hecho eluyente. La capacidad de volumen de la cámara de mezcla patrón 71 debería ser suficiente para producir una mezcla de reacción para llenar el recipiente 40 y los canales 122, 127 para llevar hacia el recipiente. En la actual realización preferible, la cámara de mezcla patrón tiene una capacidad de volumen de 200 μ l para contener una carga inicial de 100 μ l de mezcla patrón a la que se le añade 100 μ l de reactivo de lisis neutralizado y de analito hecho eluyente para formar la mezcla de reacción.

[0120] Los canales de flujo tienen generalmente en el cartucho una forma en D en la sección transversal (con la junta 63 formando la cara plana del canal) y preferiblemente tienen una anchura o un diámetro en el intervalo de 1/64 a 1/8 de pulgada (de 0,4 a 3,2 mm), o más preferentemente una anchura de 1/32 a 1/16 de pulgada (de 0,8 a

1,6 mm). Estos intervalos son actualmente preferibles para evitar tener canales que se estrechen (que crea restricción de flujo) y para evitar tener canales demasiado anchos (que cede volúmenes no utilizados de líquido presente en la vía del flujo).

[0121] Son posibles en realizaciones alternativas muchas modificaciones en la estructura y en el funcionamiento del cartucho y del instrumento. Por ejemplo, aunque la amplificación mediante PCR es actualmente preferible, el cartucho y el instrumento se pueden utilizar para amplificar las secuencias de ácido nucleico utilizando cualquier procedimiento de amplificación, incluyendo procedimientos de amplificación cíclica térmica y procedimientos de amplificación isotérmica. Los procedimientos adecuados de amplificación cíclica térmica incluyen, pero no están limitados por ello, la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR; Patentes de los Estados Unidos Números 4683202, 4683195 y 4965188); la Transcripción Reversa PCR (RT-PCR); la Reacción en Cadena de Ligase de ADN (LCR; Solicitud de Patente Internacional Número WO 89/09835); y la amplificación basada en transcripción (D. Y. Kwok et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173-1177). Los procedimientos adecuados de amplificación isotérmica útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no están limitados por ello, la Amplificación Cíclica Escalonada; la Amplificación por Desplazamiento de Filamento (SDA; Walker et al. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392-396); la replica de Q-beta (Lizardi et al. 1988, Bio/Technology 6, 1197-1202); la Amplificación de Secuencia Basada en Ácido Nucleico (NASBA; R. Sooknanan and L. Malek 1995, Bio/Technology 13, 563-65); y el Replicado de Secuencia Autosostenida (3SR; Guatelli et al. 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874-1878).

[0122] Por otra parte, el cartucho y el instrumento se pueden utilizar para conducir otras reacciones químicas que no sean la amplificación de ácido nucleico. Además, aunque se prefiere la excitación fluorescente y la detección óptica, los procedimientos de detección óptica tales como las utilizadas en la absorción directa y/o la transmisión directa con geometrías en el eje pueden también utilizarse para detectar analito en el cartucho. Otro procedimiento de detección posible es la fluorescencia de descomposición de tiempo. Además, el cartucho no se limita a detecciones basadas en etiquetas fluorescentes. Por ejemplo, la detección puede basarse en etiquetados fosforescentes, etiquetados quimioluminiscentes o etiquetados electroquimioluminiscentes.

[0123] Se puede introducir en el cartucho una muestra de fluido mediante una variedad de procedimientos, manuales o automatizados. Para la adición manual, un volumen medido de materia se puede ubicar en el área de recibimiento del cartucho a través de una puerta de entrada y una tapa se ubica entonces encima del puerto. Otra posibilidad es que una mayor cantidad de materia de muestra que la requerida para los análisis se pueda agregar al cartucho y a los mecanismos sin que el cartucho pueda afectar a la precisión de la medida y la parte alícuota de la muestra necesitará de un protocolo específico. Se puede desear el ubicar ciertas muestras, tales como materia de biopsia de tejido, tierra, heces, supurados y otro material complejo en otro dispositivo o accesorio y ubicar entonces el segundo dispositivo o accesorio en el cartucho. Por ejemplo, una pieza de tejido se puede ubicar en el lumen de un dispositivo secundario que sirve como la tapa del puerto de entrada del cartucho. Cuando la tapa se presiona contra el puerto, se obliga al tejido a través de una malla que corta o si no divide el tejido.

[0124] Para la introducción automatizada de muestra, se emplean características adicionales de diseño del cartucho y, en muchos casos, se divulga directamente la funcionalidad de la adquisición de especímenes en el cartucho. Con ciertas muestras, tales como las que presentan un riesgo peligroso para el operador del medio, tales como los patógenos retrovirales humanos, la transferencia de la muestra al cartucho puede representar un riesgo. De este modo, en una realización, se puede integrar una jeringa en el dispositivo para proporcionar un medio para mover las muestras fluidas externas directamente en el cartucho. Otra posibilidad es que una aguja de punción venosa y un tubo de sangre extraída se pueden aplicar al cartucho formando un montaje que se pueda utilizar para adquirir una muestra de sangre. Después de la recogida, el tubo y la aguja son eliminados y desechados, y el cartucho se ubica entonces en un instrumento para efectuar el procesamiento. La ventaja de tal enfoque es que el operador del medio no está expuesto a los patógenos.

[0125] El puerto de entrada se puede diseñar considerando apropiados factores humanos como una función de la naturaleza del espécimen buscado. Por ejemplo, especímenes respiratorios se pueden adquirir de tracto respiratorio inferior como expectorantes de tosido, o como muestras de frotis o de efluvios de la parte trasera de la garganta o de los picos. En el primer caso, el puerto de entrada se puede diseñar para permitir al paciente toser directamente en el cartucho o de otra forma facilitar esputos de las muestras expectorantes en el cartucho. Para especímenes de efluvios y de frotis, el espécimen se ubica en el puerto de entrada donde las características del puerto y su cierre facilitan la rotura y la retención de la parte final del frotis o del efluvio en la zona de recepción del cartucho.

[0126] En otra realización, el cartucho incluye tubos de entrada y de salida que se pueden posicionar en un

baño de muestra de gran volumen, tal como una corriente de flujo de agua, de manera que la materia de muestra fluya a través del cartucho. Otra posibilidad es que una materia de capilaridad hidrofílica puede servir como una zona interactiva de manera que el cartucho entero se puede sumergir directamente en el espécimen, y se absorbe una cantidad suficiente de espécimen en la materia capilar. El cartucho se retira entonces, y se puede transportar al laboratorio o analizar directamente utilizando un instrumento portátil. En otra realización, se puede utilizar un trozo de tubo de manera que un final del tubo se encuentre en comunicación directa con el cartucho para proporcionar una interrelación fluida con al menos una zona interactiva y el otro final sea accesible al medio externo para servir como un receptor de muestra. El tubo se puede ubicar entonces en un espécimen y servir como un sorbedor. El mismo cartucho puede también servir como el mismo dispositivo de recogida de espécimen, y de este modo reducir tratamientos y molestias. En el caso de especímenes envueltos en disputas legales o en investigaciones criminales, el acceso directo a la materia de ensayo en el cartucho fluido es ventajoso porque la cadena de custodia se preserva convenientemente y de forma fiable.

[0127] Haciendo referencia otra vez a la Figura 9, los reactivos se pueden introducir exógenamente en el cartucho antes de su uso, por ejemplo, a través de oberturas sellables en la cámara de reacción 67, en la cámara de neutralizado 70 y en la cámara de mezcla patrón 71. Otra posibilidad es que los reactivos puedan ubicarse en el cartucho durante la fabricación, por ejemplo, como soluciones acuosas o como reactivos secos que necesitan reconstitución. El formato de este modelo se selecciona basándose en una variedad de parámetros, si la interacción es o no fase solución o fase sólida, la estabilidad térmica inherente del reactivo, y la cinética de la reacción. Los reactivos contienen compuestos que son térmicamente inestables estando en solución y se puede estabilizar mediante secado utilizando técnicas tales como la liofilización. Los aditivos, tales como los azúcares alcohólicos sencillos, las metilcelulosas, y las proteínas de gran tamaño se pueden adicionar al reactivo antes del secado para incrementar la estabilidad y la posibilidad de reconstitución.

[0128] Haciendo referencia otra vez a la Figura 21, el recipiente de reacción 40 no necesita dos láminas flexibles para formar las paredes principales opuestas 48 de la cámara de reacción 42. Por ejemplo, en una realización alternativa, el recipiente 40 tiene solamente una lámina flexible para formar una pared principal de la cámara. La estructura rígida 46 define la otra pared principal de la cámara, tan bien como las paredes laterales de la cámara. En esta realización, la pared principal formada por la estructura 46 debería tener un grosor de aproximadamente 0,05 pulgadas (1,25 mm) que es normalmente el grosor mínimo viable para el moldeo por inyección, mientras que la lámina flexible puede ser tan fina como 0,0005 pulgadas (0,0125 mm). La ventaja de esta realización es que la fabricación del recipiente de reacción 40 se simplifica, y de ahí es menos cara, desde que se necesita sujeta a la estructura 46 sólo una lámina flexible. La desventaja es que las velocidades de calefacción y de refrigeración de la mezcla de reacción son probablemente más lentas desde que la pared principal formada por la estructura 46 no permita probablemente velocidades de transferencia de calor tan altas como las de lámina flexible y fina.

[0129] Haciendo referencia a la Figura 28, el módulo de intercambio de calor 147 requiere sólo una superficie térmica para contactar con una pared flexible del recipiente de reacción 40 y un elemento térmico para la calefacción y/o la refrigeración de la superficie térmica. La ventaja de utilizar una superficie térmica y un elemento térmico es que el aparato se puede fabricar de forma menos cara. La desventaja es que las velocidades de calefacción y de refrigeración son probablemente alrededor de dos veces más lentas. Además, aunque actualmente es preferible que las superficies térmicas estén ubicadas en los platos térmicamente conductivos 190, cada superficie térmica puede estar provista de una estructura rígida que tiene una zona de contacto para ponerse en contacto con una pared del recipiente 40. La superficie térmica consta preferiblemente de un material que tiene una conductividad térmica alta, tal como cerámica o metal. Por otra parte, la superficie térmica puede constar en la misma superficie del elemento térmico. Por ejemplo, la superficie térmica puede ser la superficie de un dispositivo termoelectrico que pone en contacto la pared para calentar y/o enfriar la cámara.

[0130] Actualmente es preferible construir el transductor en el instrumento 140. En otra realización, sin embargo, el transductor se puede construir en el cartucho. Por ejemplo, un disco piezoeléctrico se puede construir en el cartucho para sonicar la cámara de lisis. Otra posibilidad es que un altavoz o un dispositivo de bobina electromagnética se puedan construir en el cartucho. En estas realizaciones, el cartucho incluye conectores eléctricos adecuados para conectar el transductor a una fuente de alimentación. En realizaciones en que el transductor se construye en el cartucho, se debería prevenir que el transductor contacte directamente con la muestra de fluido, por ejemplo, el transductor debería plastificarse o separarse de la muestra mediante una pared de la cámara. Además, el lisado de las células o de los virus se puede conseguir utilizando un calefactor en lugar del transductor o en combinación con el transductor. El calefactor puede ser un elemento de calefacción resistivo que sea parte del cartucho, o el calefactor podría construirse en el instrumento que recibe el cartucho. En esta

realización, las células o los virus se deterioran mediante calefacción de la cámara de lisis a una alta temperatura (por ejemplo, de 95°C) para deteriorar las paredes de las células.

5 **[0131]** Aunque la descripción anterior contiene muchas especificaciones, estas no se deberían interpretar como limitaciones en el alcance de la invención, sino como ejemplos de algunas de las realizaciones preferibles actualmente. Se pueden hacer muchas modificaciones o sustituciones al aparato y los procedimientos descritos sin apartarse del alcance de la invención.

10 **[0132]** Por lo tanto, el alcance de la invención se debería determinar mediante las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes legales.

REIVINDICACIONES

1. Cartucho para realizar una reacción química que comprende un cuerpo que tiene al menos un primer canal y un segundo canal (80, 81) ubicados en su interior, que se caracterizan porque:

dicho cartucho comprende además un recipiente de reacción (40) que se extiende desde el cuerpo, teniendo el recipiente de reacción (40):

(i) una estructura rígida (46) que define las paredes laterales (57A, 57B) de una cámara de reacción (42), en la que la estructura rígida (46) incluye un canal de entrada (50) y un canal de salida (52);

(ii) al menos una lámina acoplada a la estructura rígida (46) para formar una pared principal (48) de la cámara (42), en la que la pared principal (48) es lo suficientemente flexible para ajustarse a una superficie térmica.

(iii) un puerto de entrada (41) conectado a la cámara de reacción (42) a través del canal de entrada (50); y

(iv) un puerto de salida (43) conectado a la cámara de reacción a través del canal de salida (52);

en el que el puerto de entrada (41) del recipiente (40) está conectado al primer canal (80) en el cuerpo y en el que el puerto de salida (43) del recipiente (40) está conectado al segundo canal (81) en el cuerpo.

2. Cartucho según la reivindicación 1, en el que el cuerpo incluye además un conducto de ventilación (36) en comunicación de fluidos con el segundo canal (81) para dar salida al gas.

3. Cartucho según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además un dispositivo de presión diferencial para obligar al fluido en el primer canal (80) en el cuerpo a fluir a través del puerto de entrada (41) del recipiente (40) y en la cámara de reacción (42).

4. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el recipiente (40) incluye una primera y una segunda láminas o películas flexibles acopladas a los lados opuestos de la estructura (46) para formar las paredes principales opuestas (48) de la cámara de reacción (42).

5. Cartucho según la reivindicación 4, en el que cada una de la primera y la segunda láminas o películas flexibles comprende una película polimérica.

6. Cartucho según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que al menos dos de las paredes laterales (57A, 57B, 59A, 59B) son ópticamente transmisivas y compensadas angularmente entre sí.

7. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proporción de la anchura de la cámara de reacción (42) con respecto al grosor de la cámara de reacción (42) es de al menos 2:1.

8. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la cámara de reacción (42) tiene un grosor menor o igual a 5 mm.

9. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la cámara de reacción (42) tiene un grosor en el intervalo de 0,5 a 5 mm.

10. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proporción de la anchura de la cámara de reacción (42) con respecto al grosor de la cámara de reacción (42) es de al menos 4:1.

11. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 10, en el que la cámara de reacción (42) tiene un grosor menor o igual a 2 mm.

12. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 10-11, en el que la cámara de reacción (42) tiene un grosor en el intervalo de 0,5 a 2 mm.

13. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el cuerpo incluye además una cámara de mezcla (71) para mezclar una muestra de fluido con los reactivos de amplificación, estando la cámara de mezcla (71) conectada al puerto de entrada (41) del recipiente (40) a través del primer canal (80).

14. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el cuerpo está formado en su interior por:

(i) una vía de flujo de muestras; y

(ii) una zona de separación en la vía de flujo de muestras para separar el analito deseado de una muestra de fluido, estando la zona de separación conectada al puerto de entrada (41) del recipiente a través del primer canal (80).

15. Cartucho según la reivindicación 14, en el que la zona de separación en el cuerpo comprende:

- 5 a) una cámara de lisis (86) en la vía de flujo de muestra para lisar células o virus en la muestra para liberar materia de la misma; y
- b) al menos un soporte sólido ubicado en la cámara de lisis (86) para capturar las células o los virus a lisar.

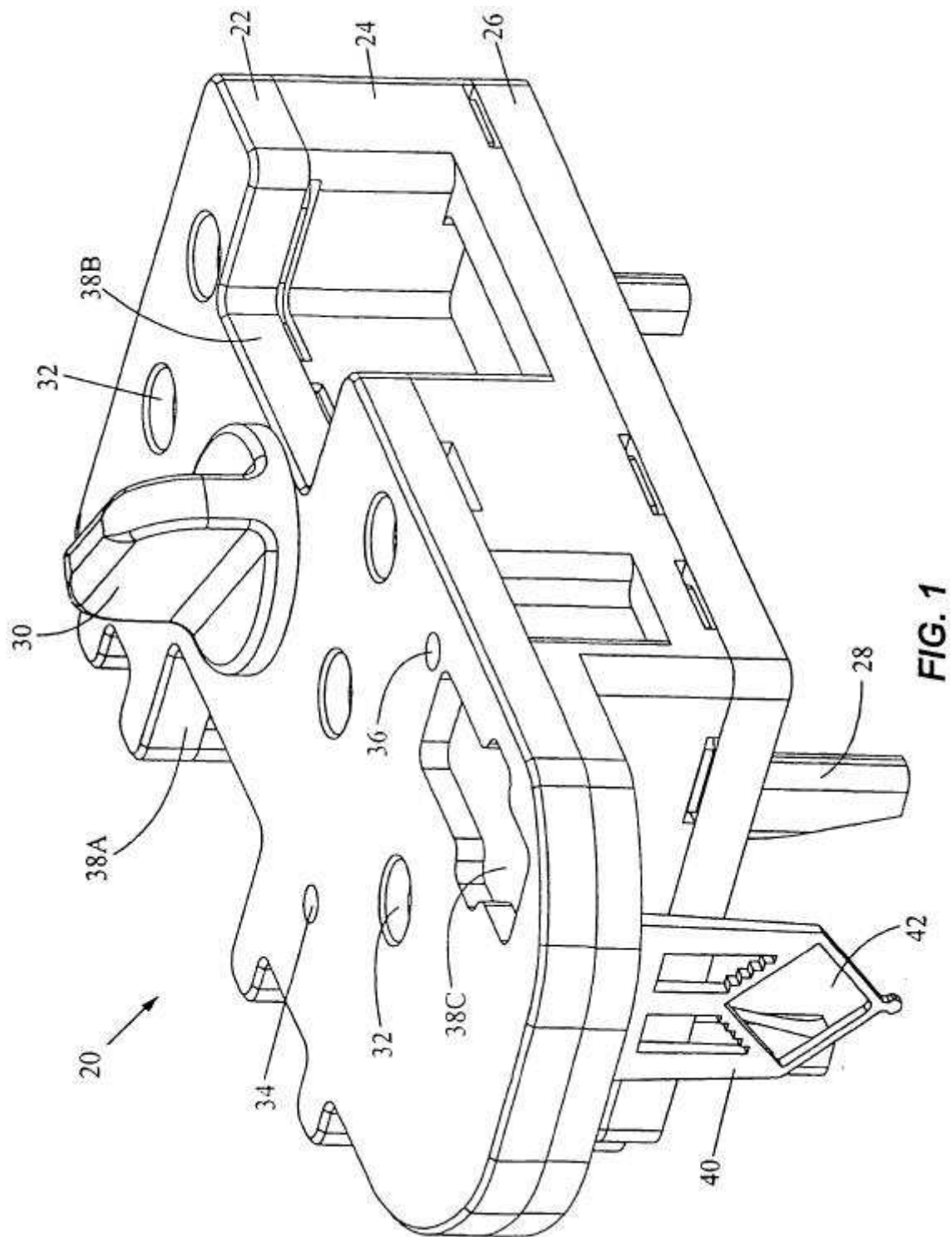
10 16. Aparato que comprende un cartucho según la reivindicación 1, en el que el aparato comprende además:

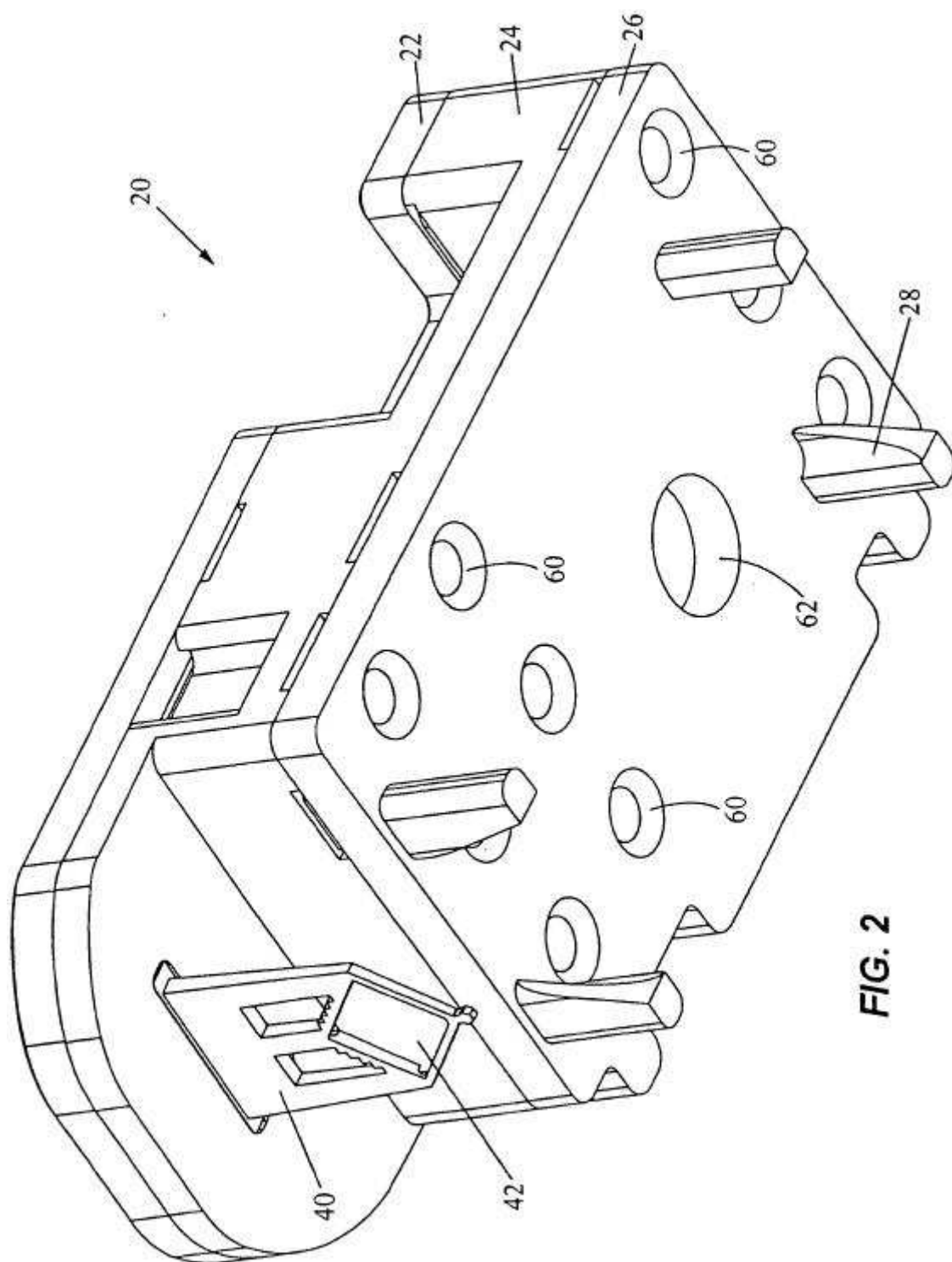
- a) al menos una superficie térmica para contactar con la lámina o la película;
- b) medios para incrementar la presión en la cámara de reacción, en la que el aumento de la presión en la cámara es suficiente para forzar a la lámina o a la película a ajustarse a la superficie térmica; y
- 15 c) al menos un elemento térmico para calentar o para enfriar la superficie para inducir un cambio de temperatura dentro de la cámara.

17. Cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el recipiente (40) incluye:

- 20 (i) dos paredes principales opuestas (48);
- (ii) paredes laterales (57A, 57B, 59A, 59B) que conectan las paredes principales (48) entre sí para definir la cámara de reacción (42), en la que al menos dos de las paredes laterales (57A, 57B, 59A, 59B) son ópticamente transmisivas y angularmente compensadas entre sí.

- 25 18. Aparato que comprende un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el recipiente (40) incluye dos paredes principales opuestas (48) y paredes laterales (57A, 57B, 59A, 59B) que conectan las paredes principales (48) entre sí para formar la cámara de reacción (42), al menos dos de las paredes laterales (48) son ópticamente transmisivas, y el aparato comprende además un sistema óptico que tiene al menos una fuente de luz para iluminar la cámara de reacción (42) a través de una primera de las paredes laterales ópticamente transmisivas
- 30 y que tiene al menos un detector para detectar la luz de salida de la cámara a través de una segunda de las paredes laterales ópticamente transmisivas.





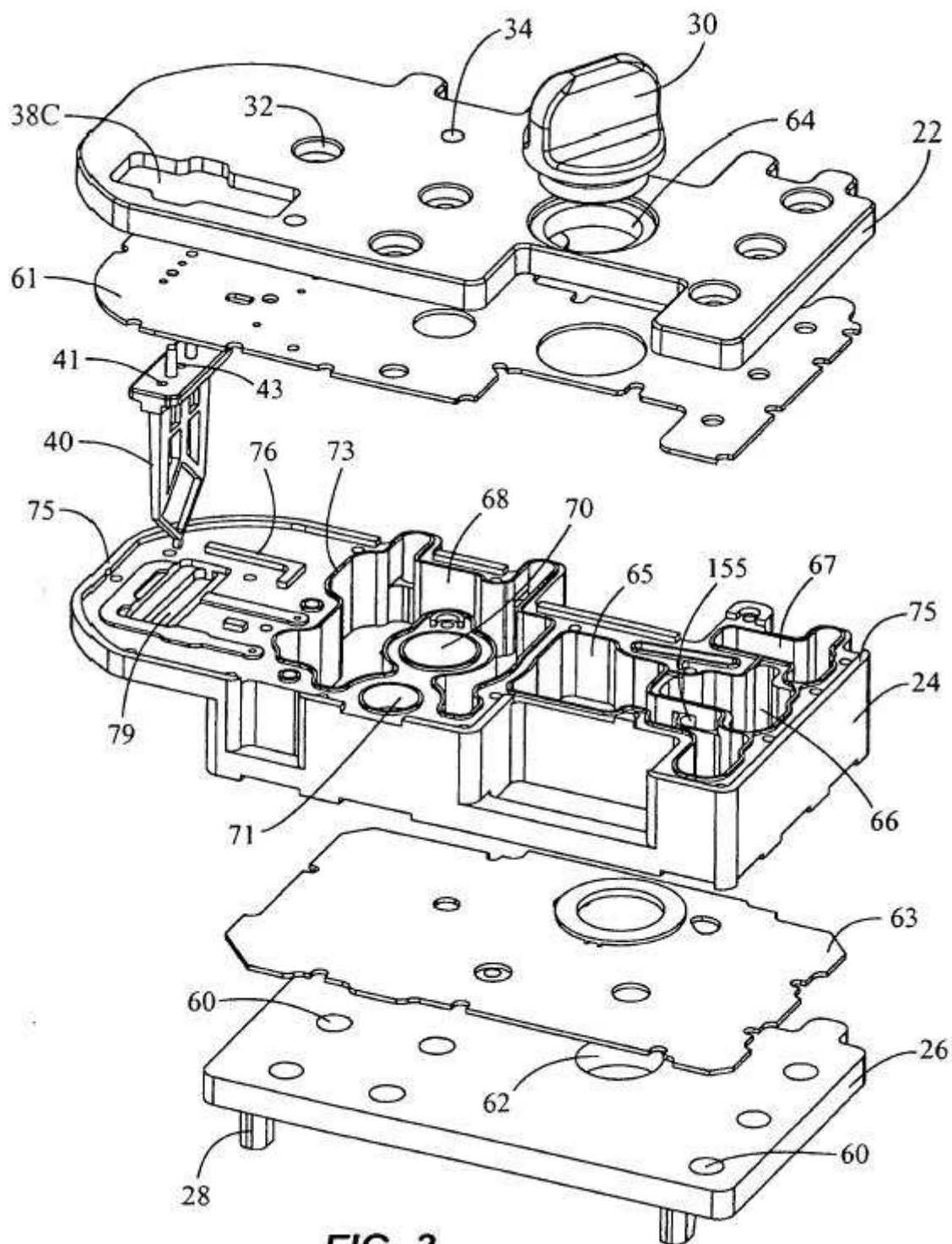


FIG. 3

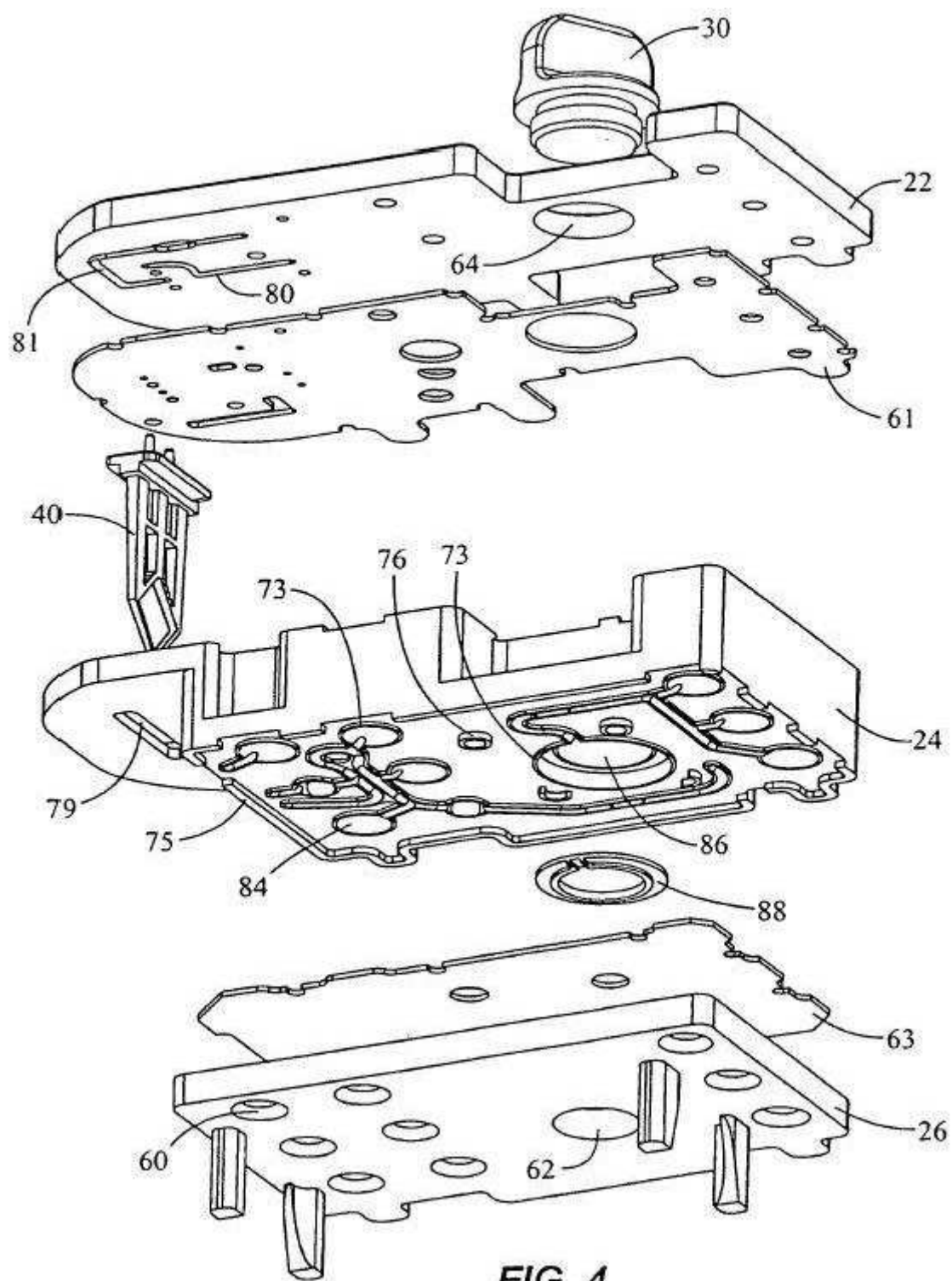
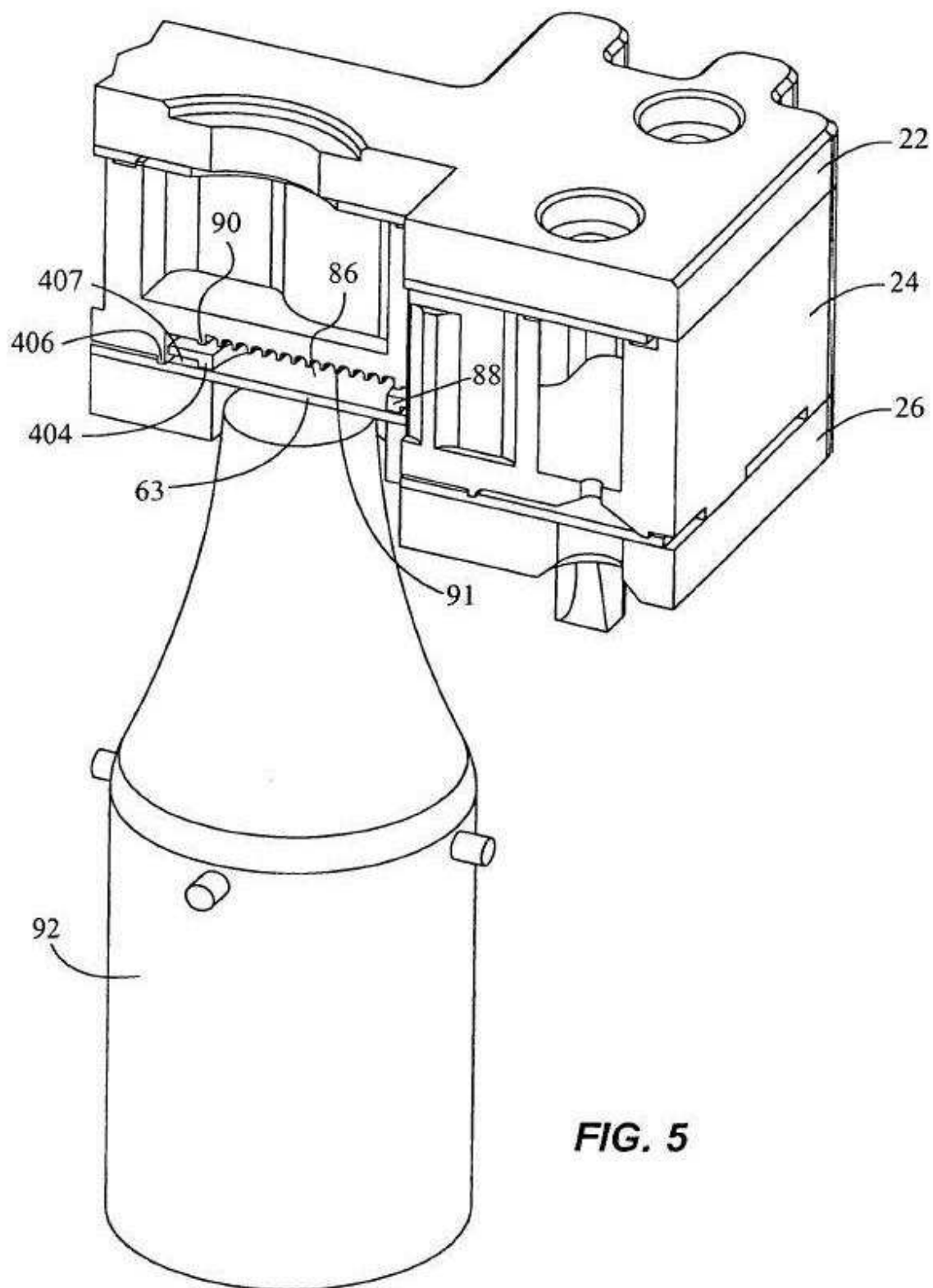


FIG. 4



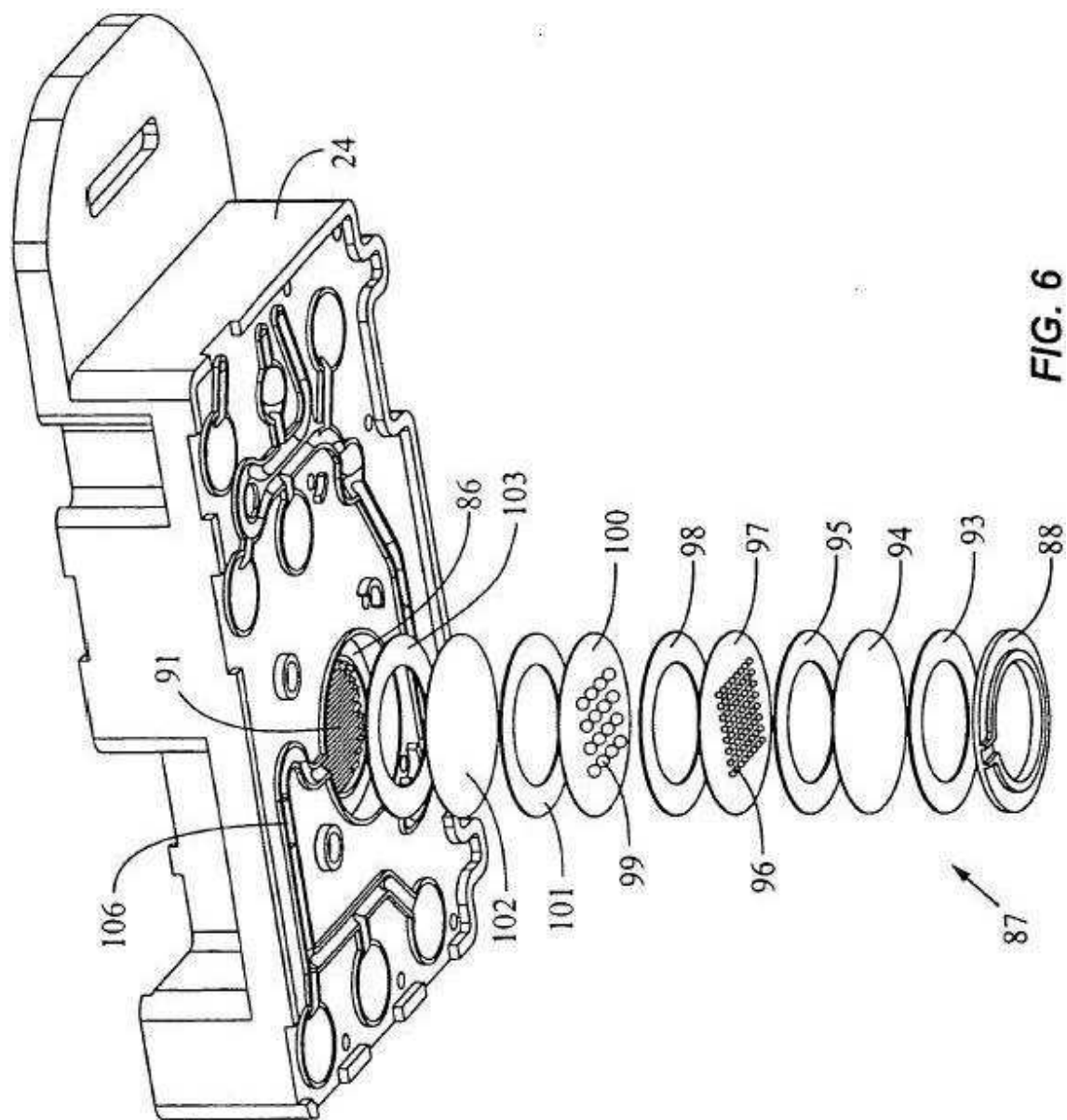


FIG. 6

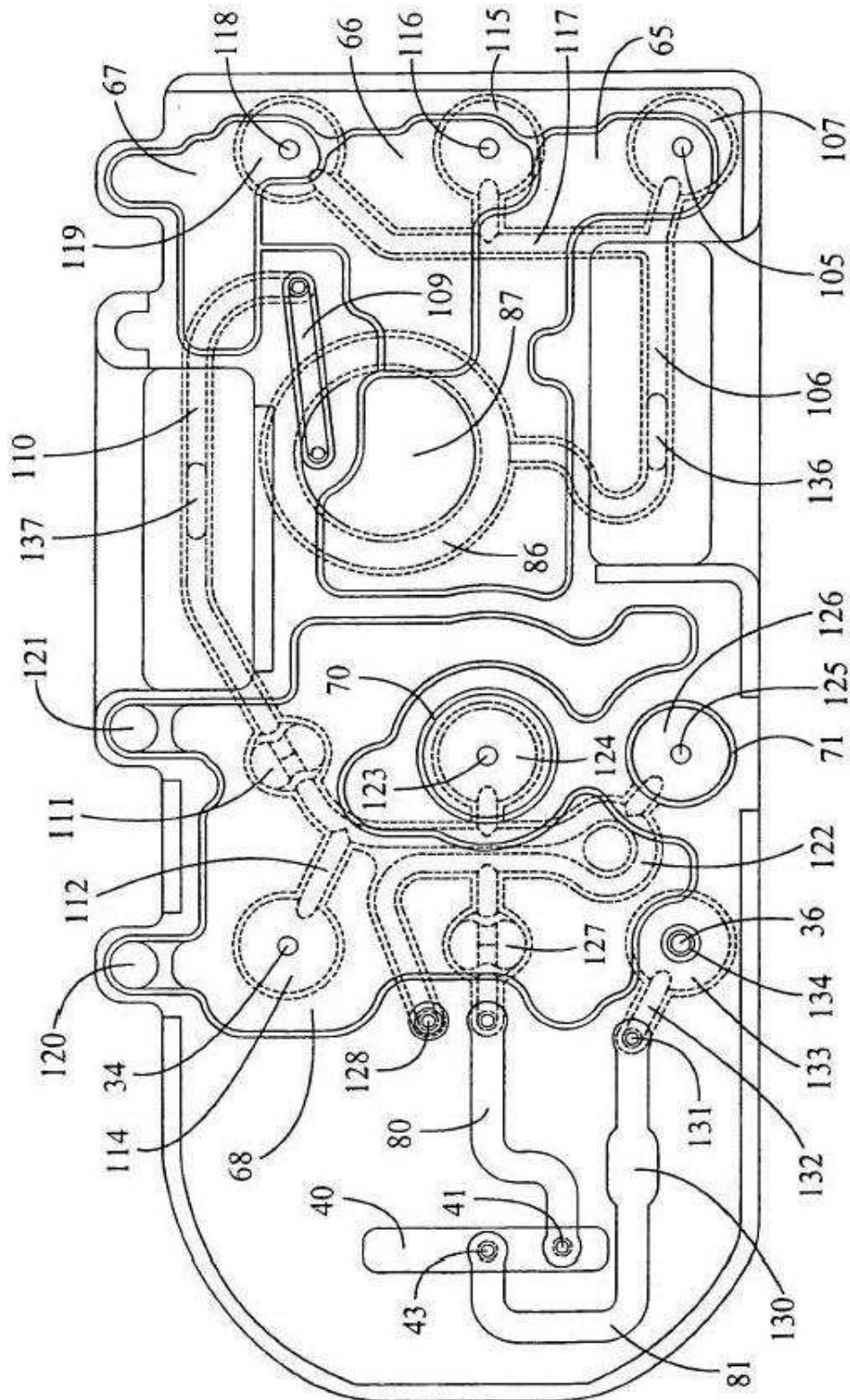


FIG. 7

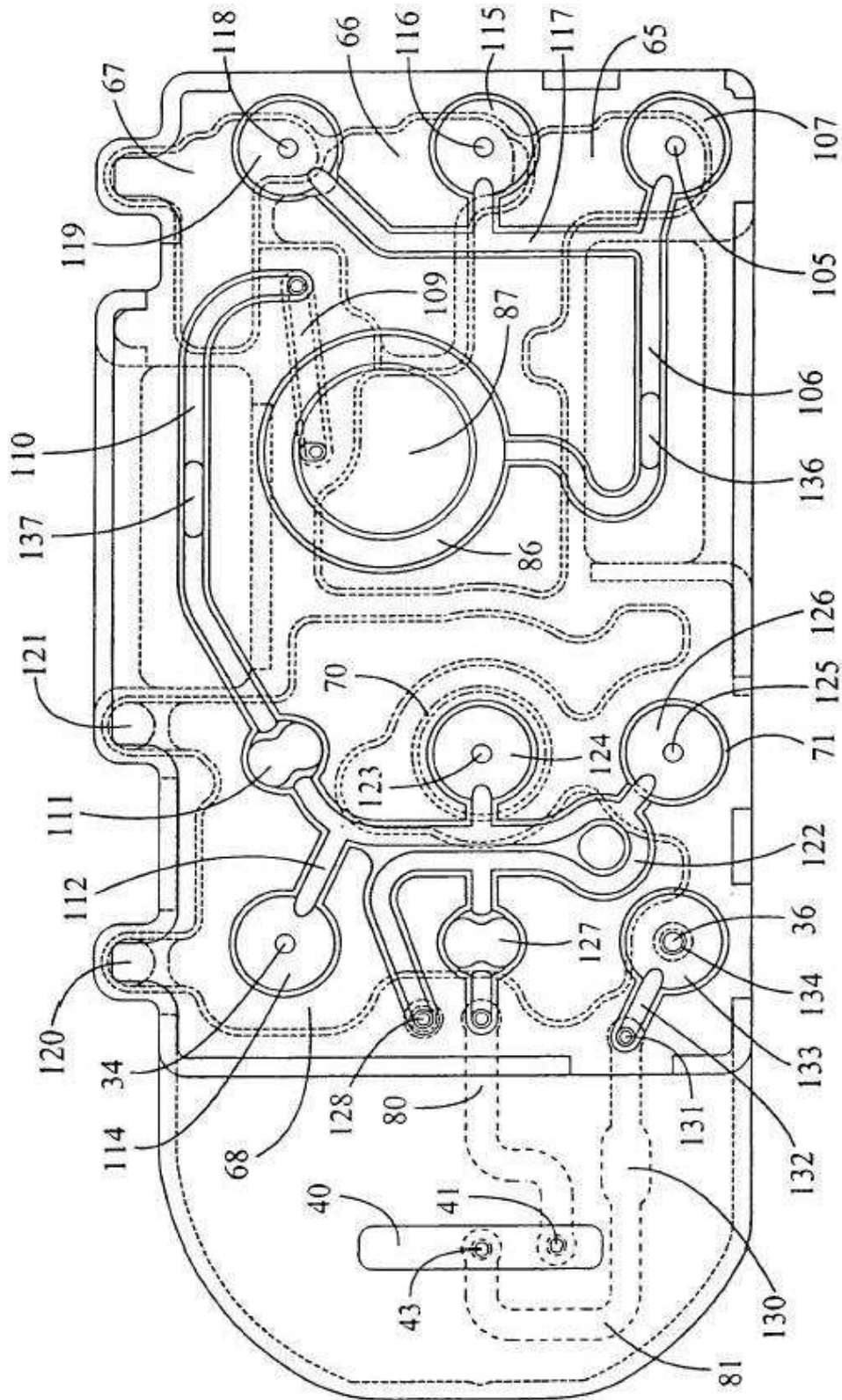


FIG. 8

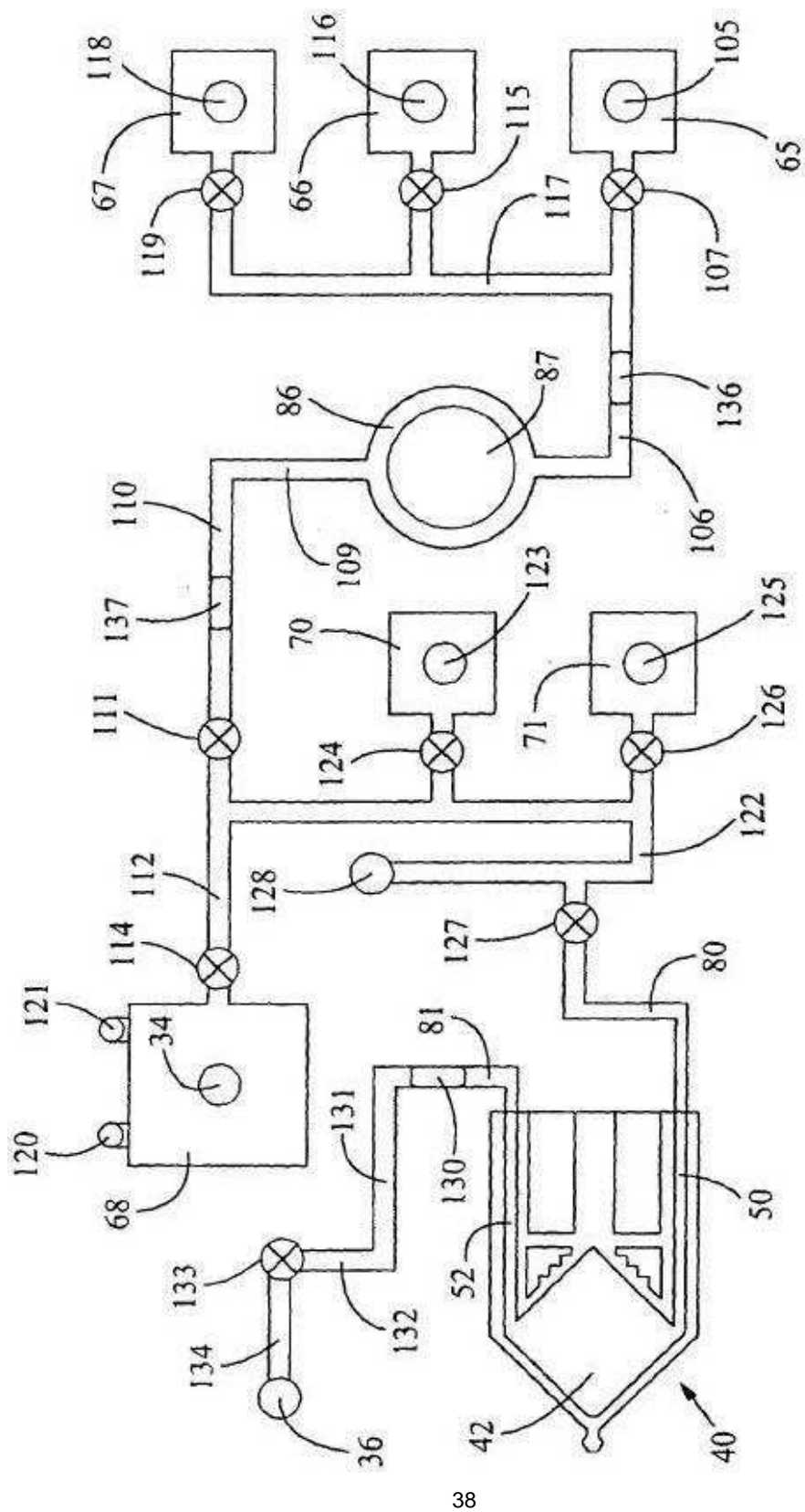


FIG. 9

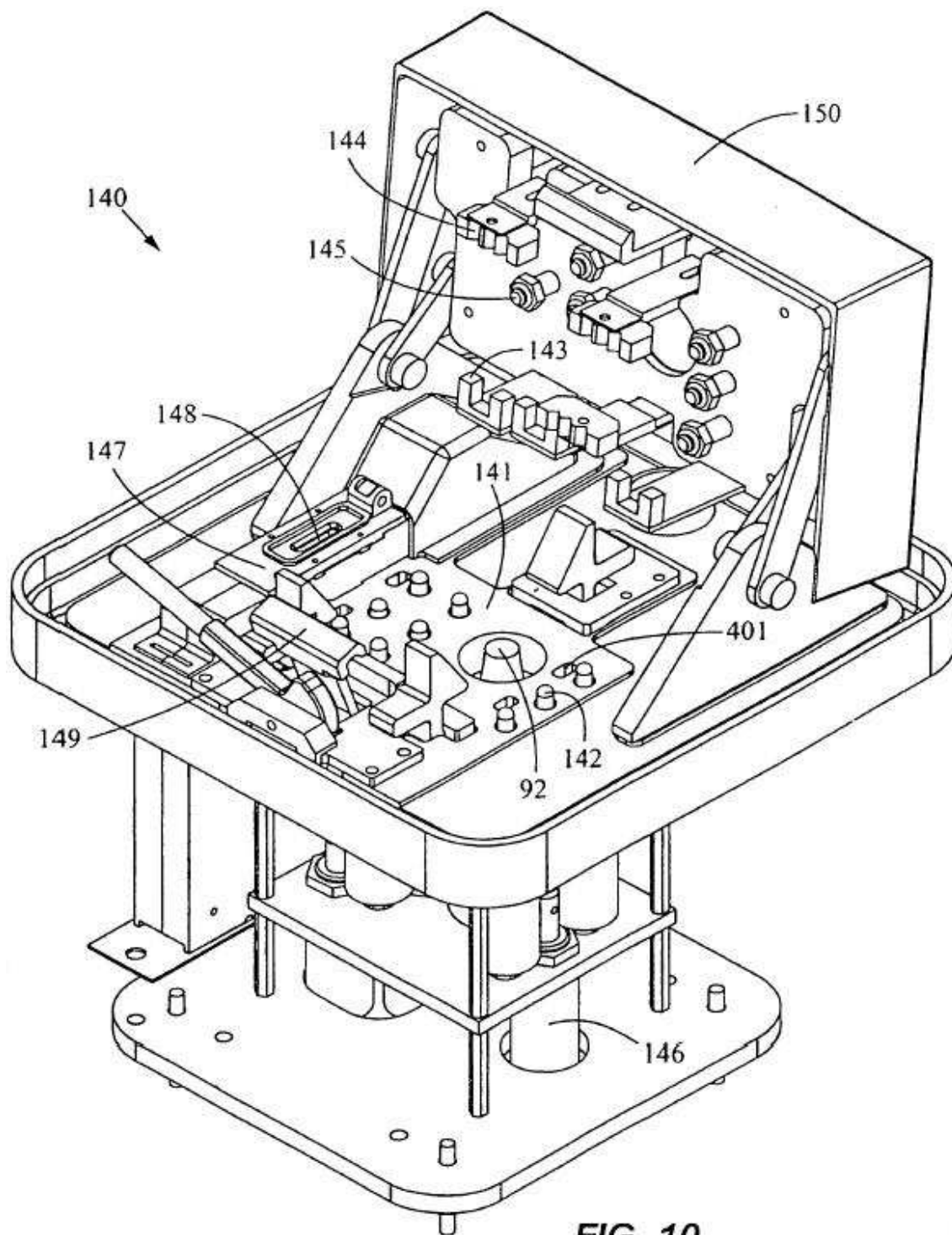


FIG. 10

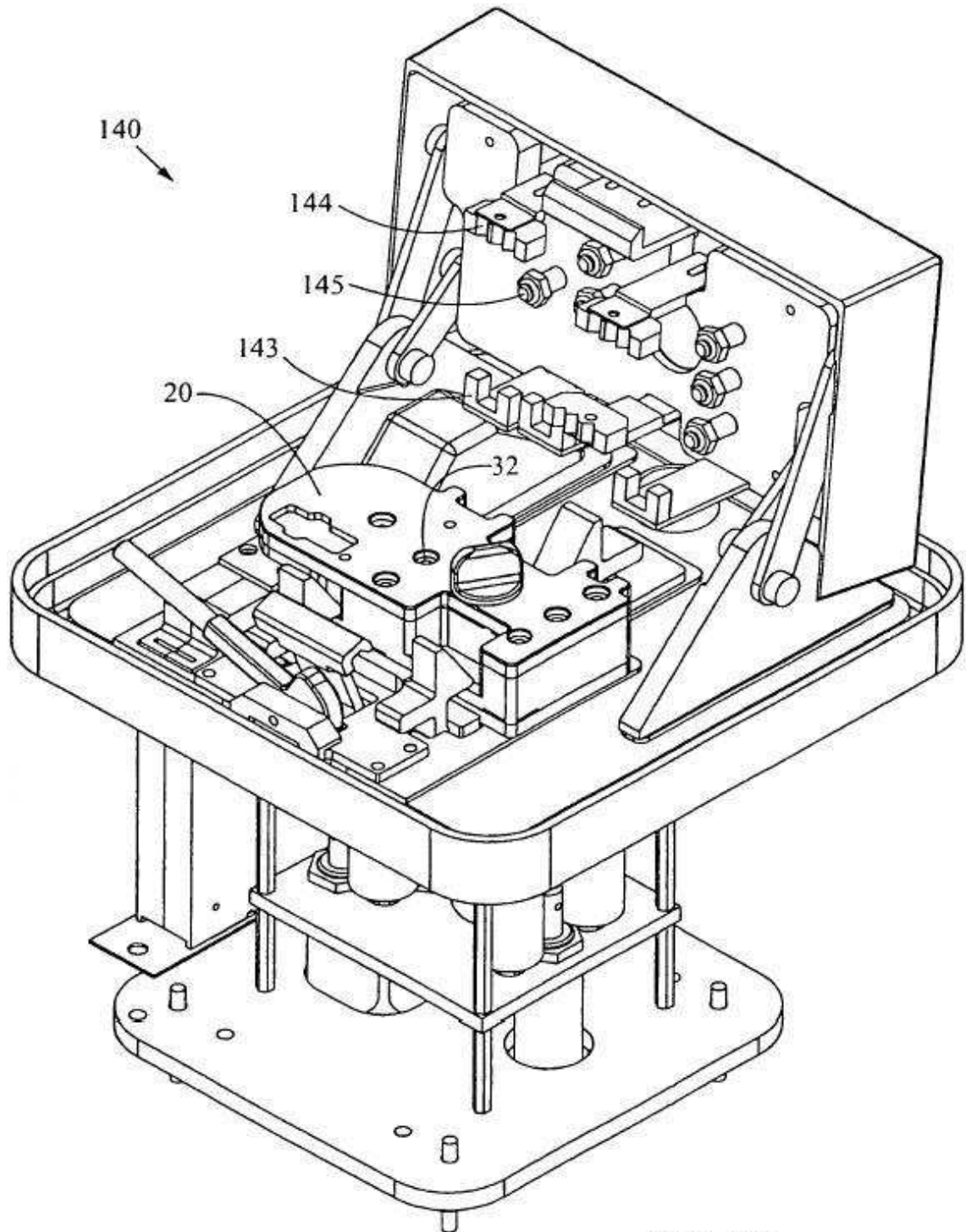


FIG. 11

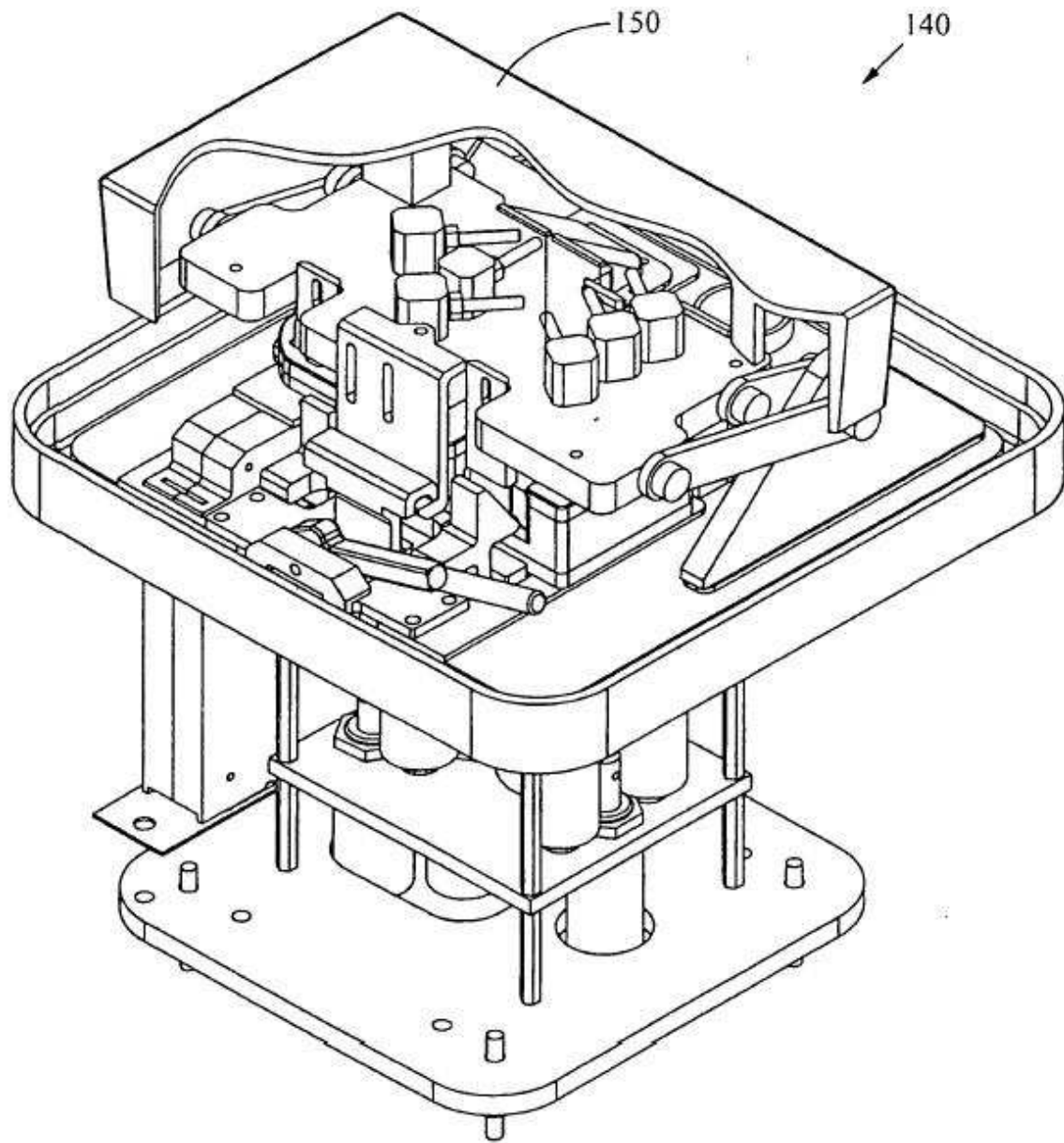


FIG. 12

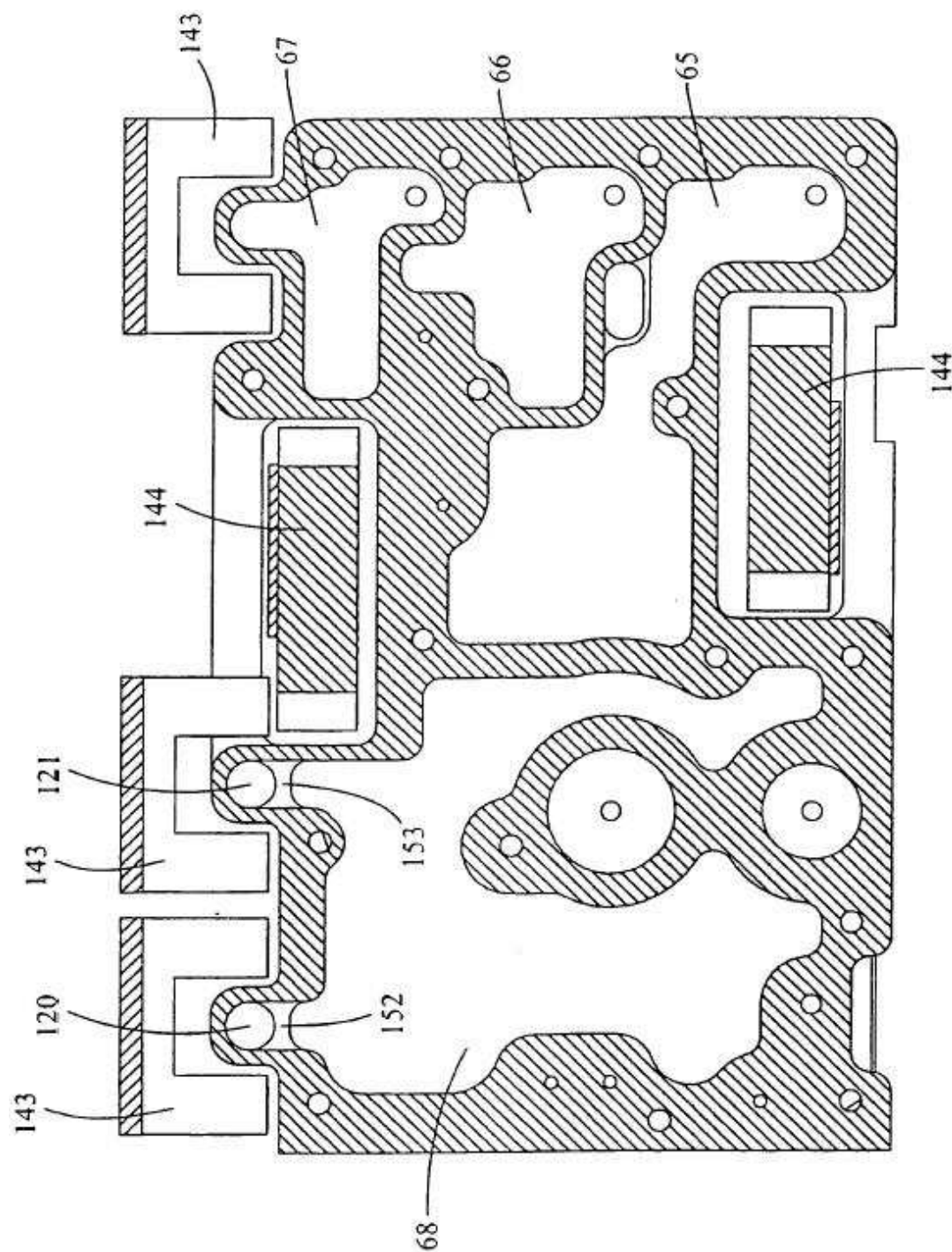


FIG. 13

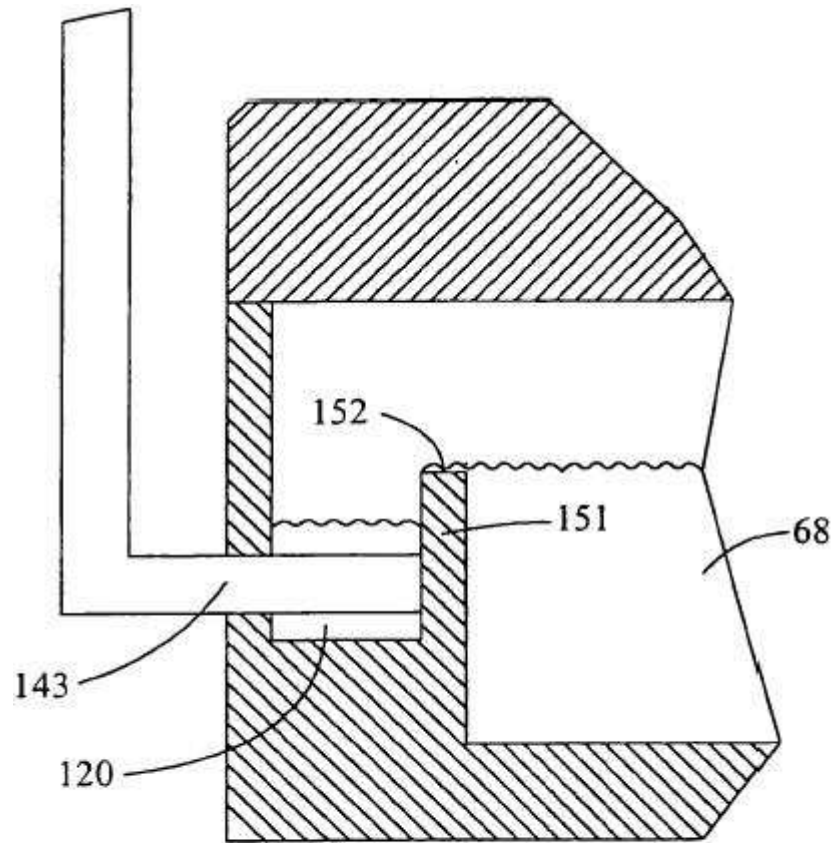


FIG. 14

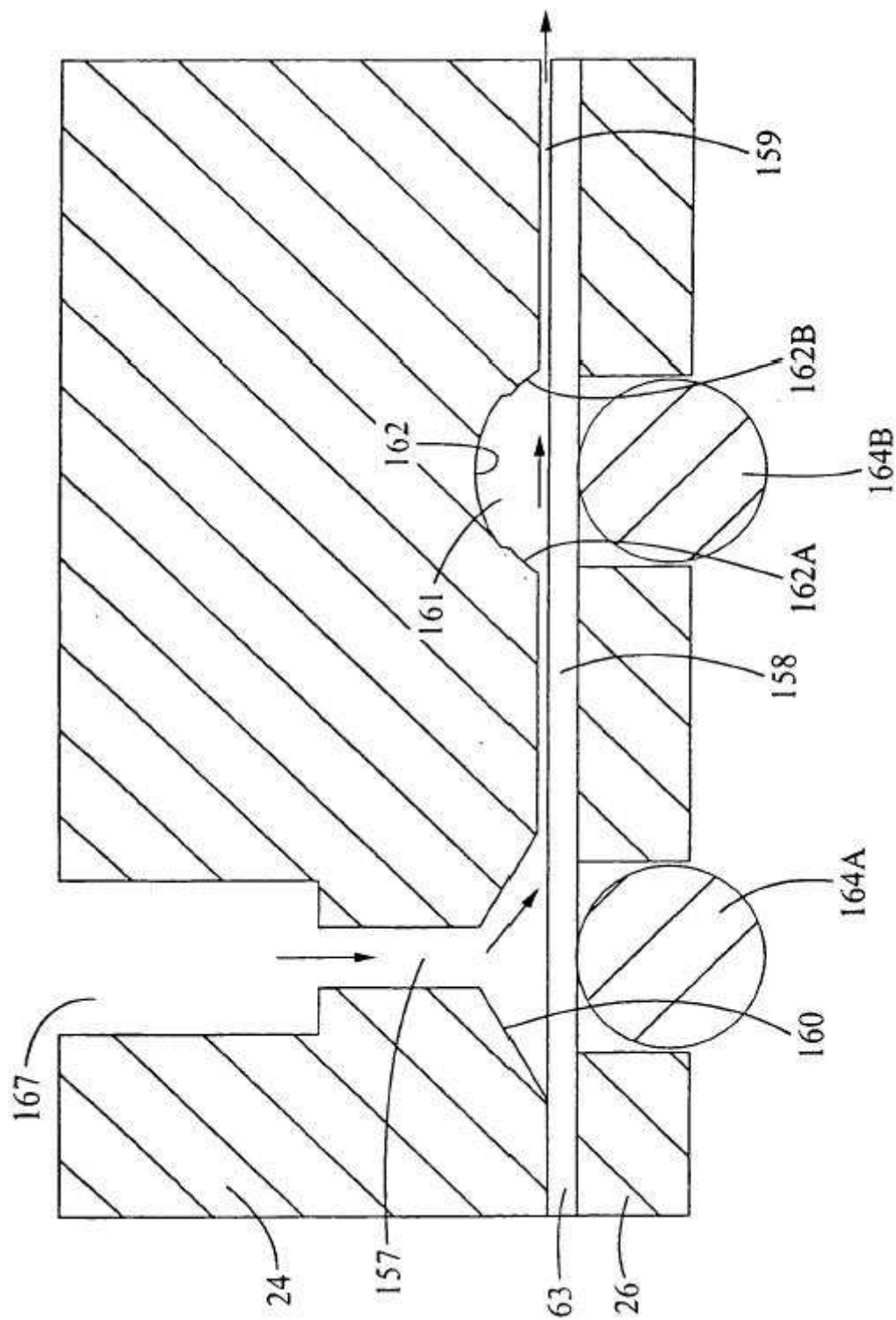


FIG. 15A

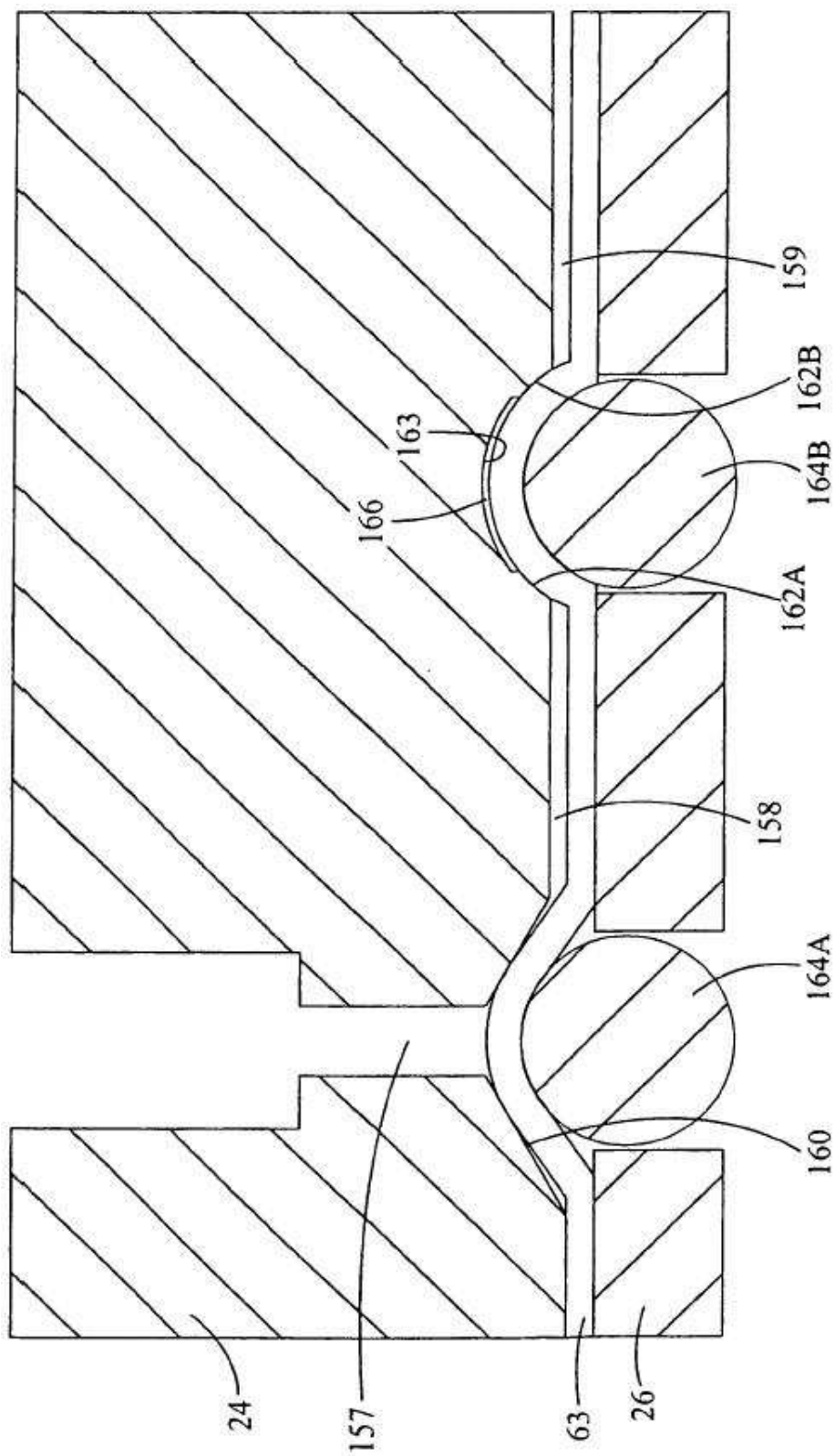


FIG. 15B

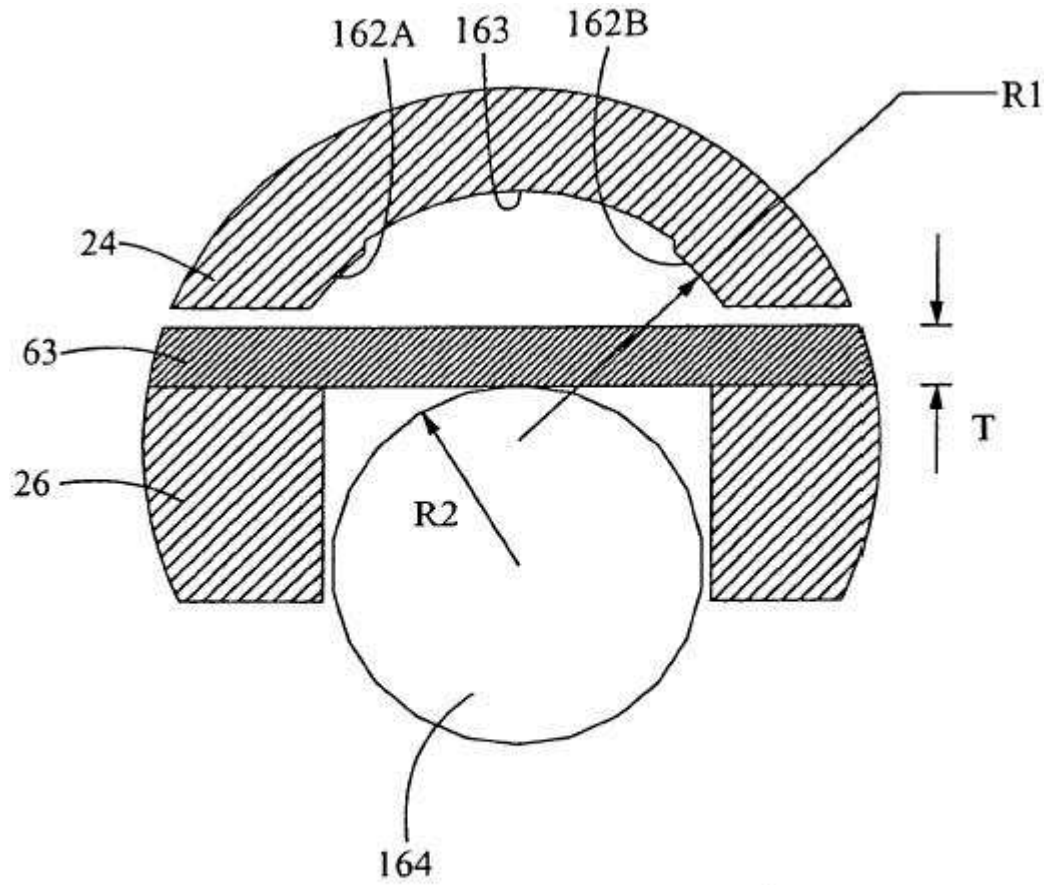


FIG. 16A

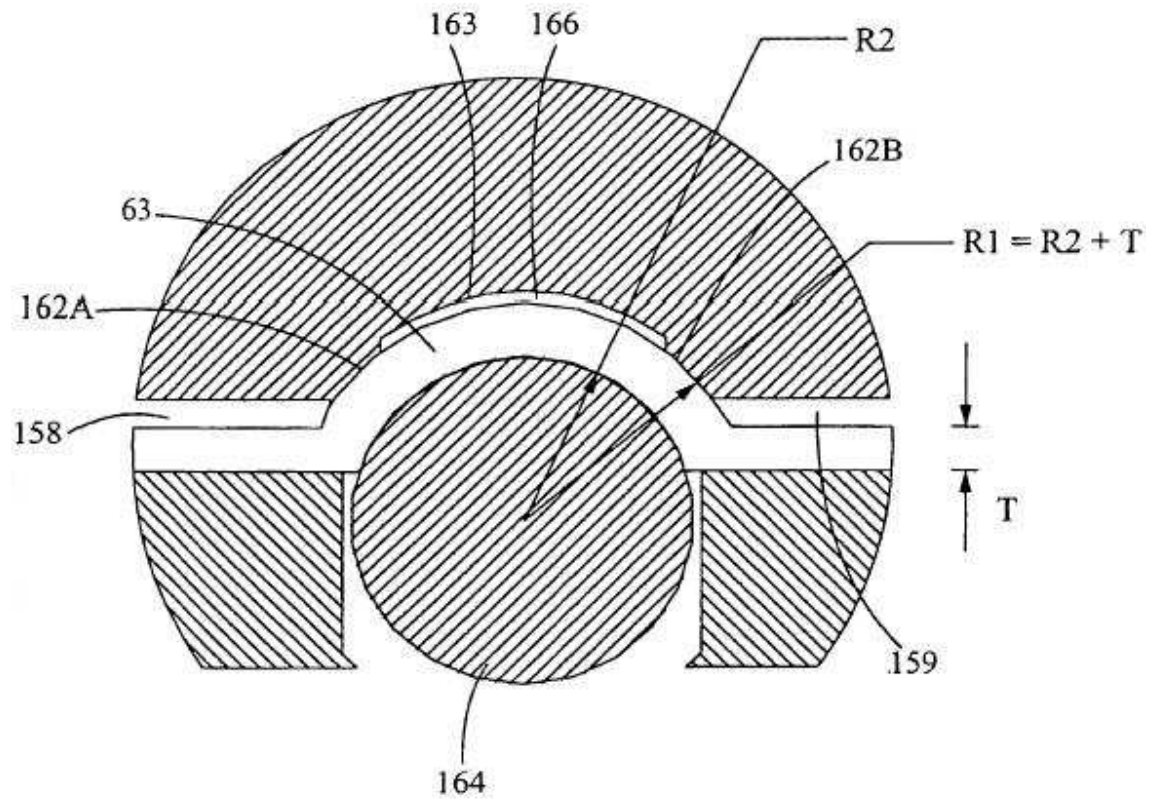


FIG. 16B

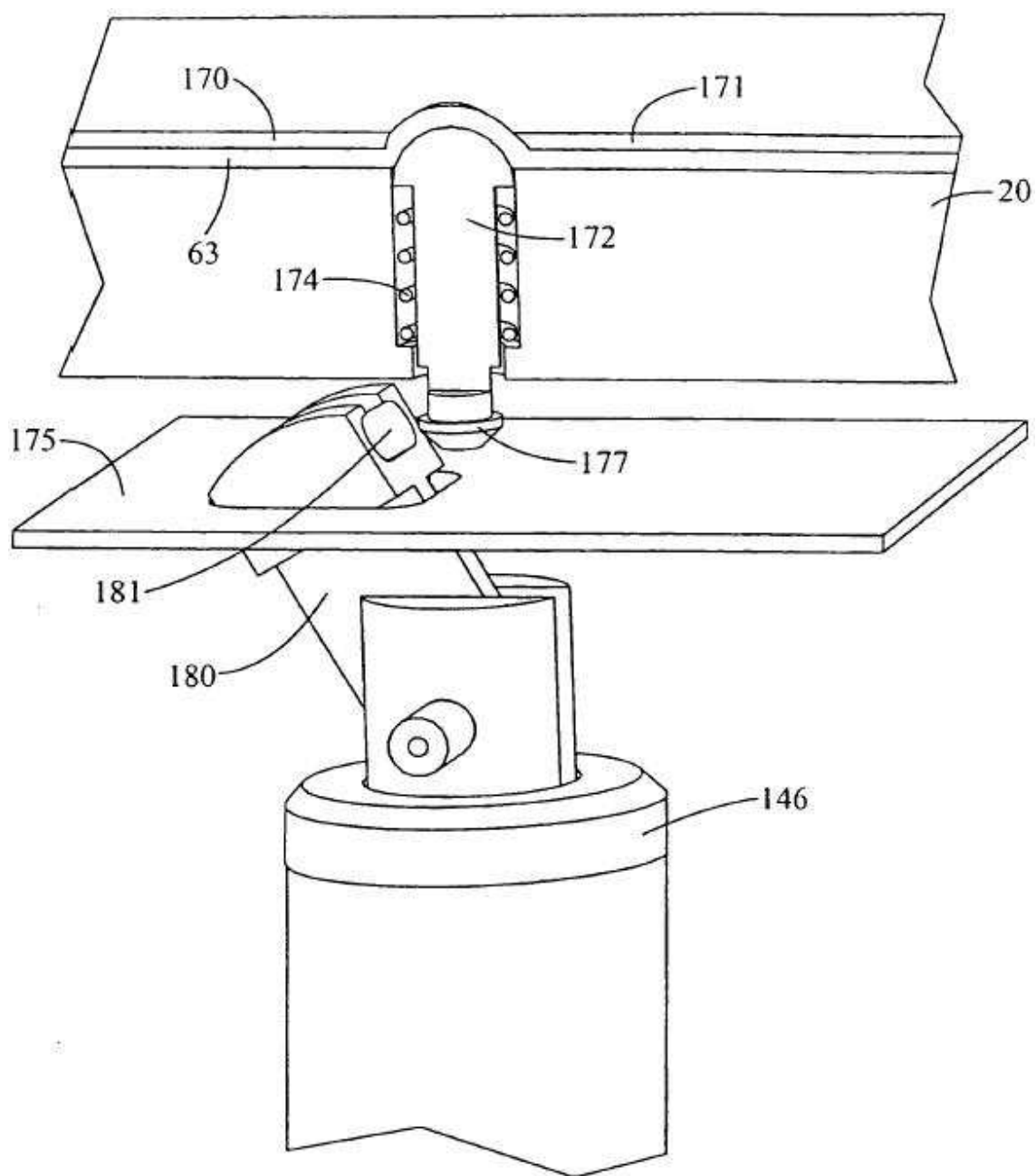


FIG. 17

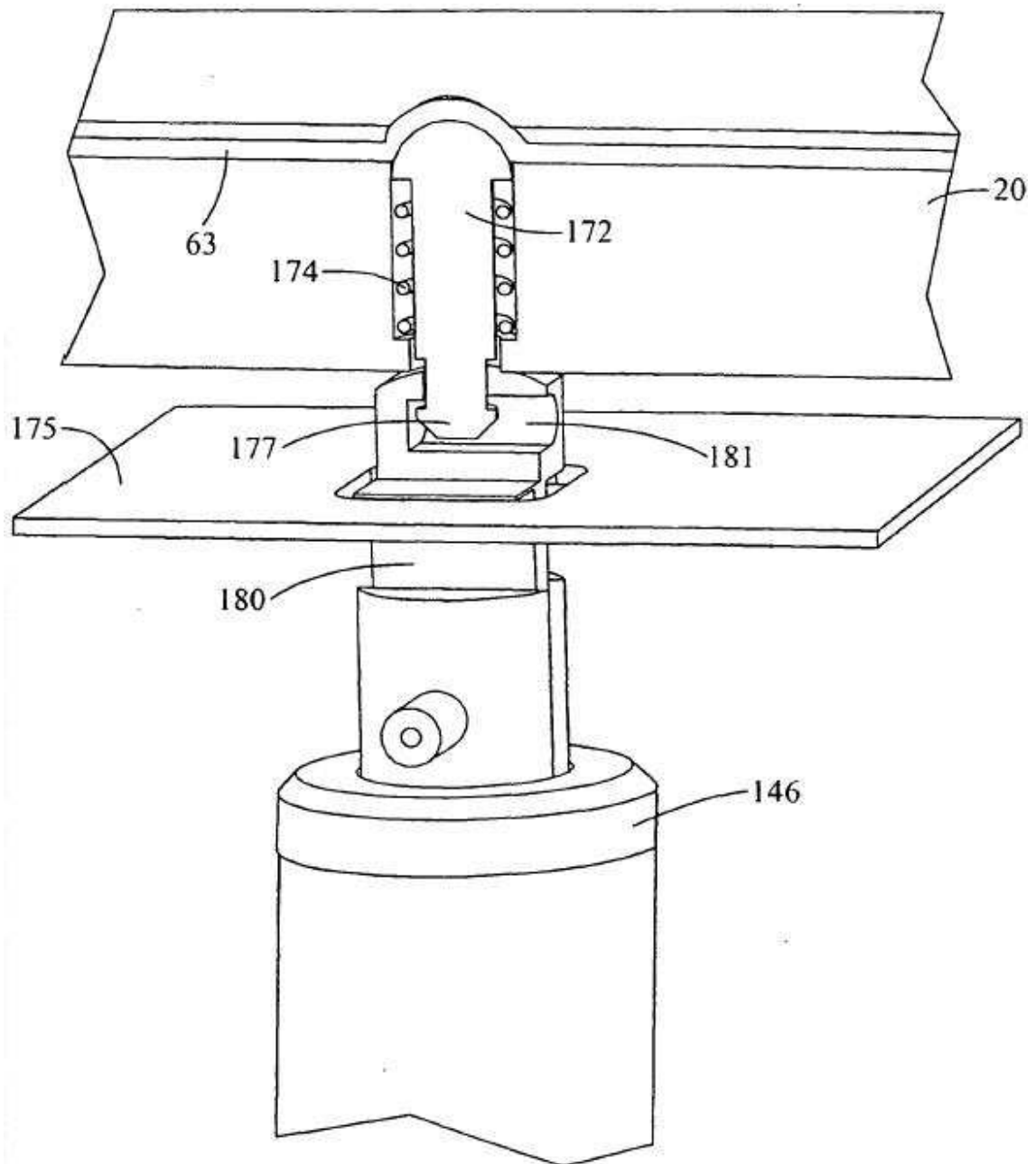


FIG. 18

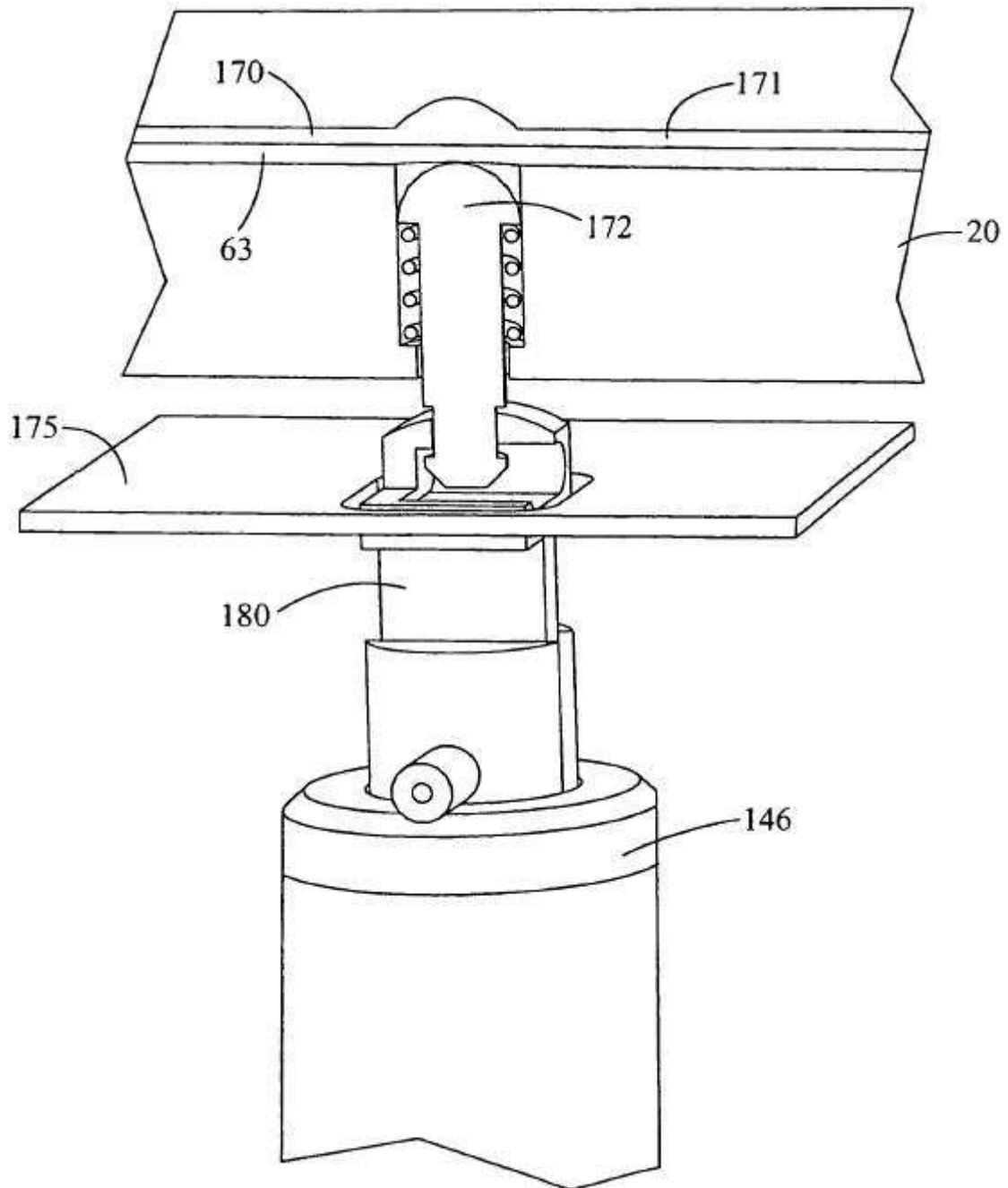


FIG. 19

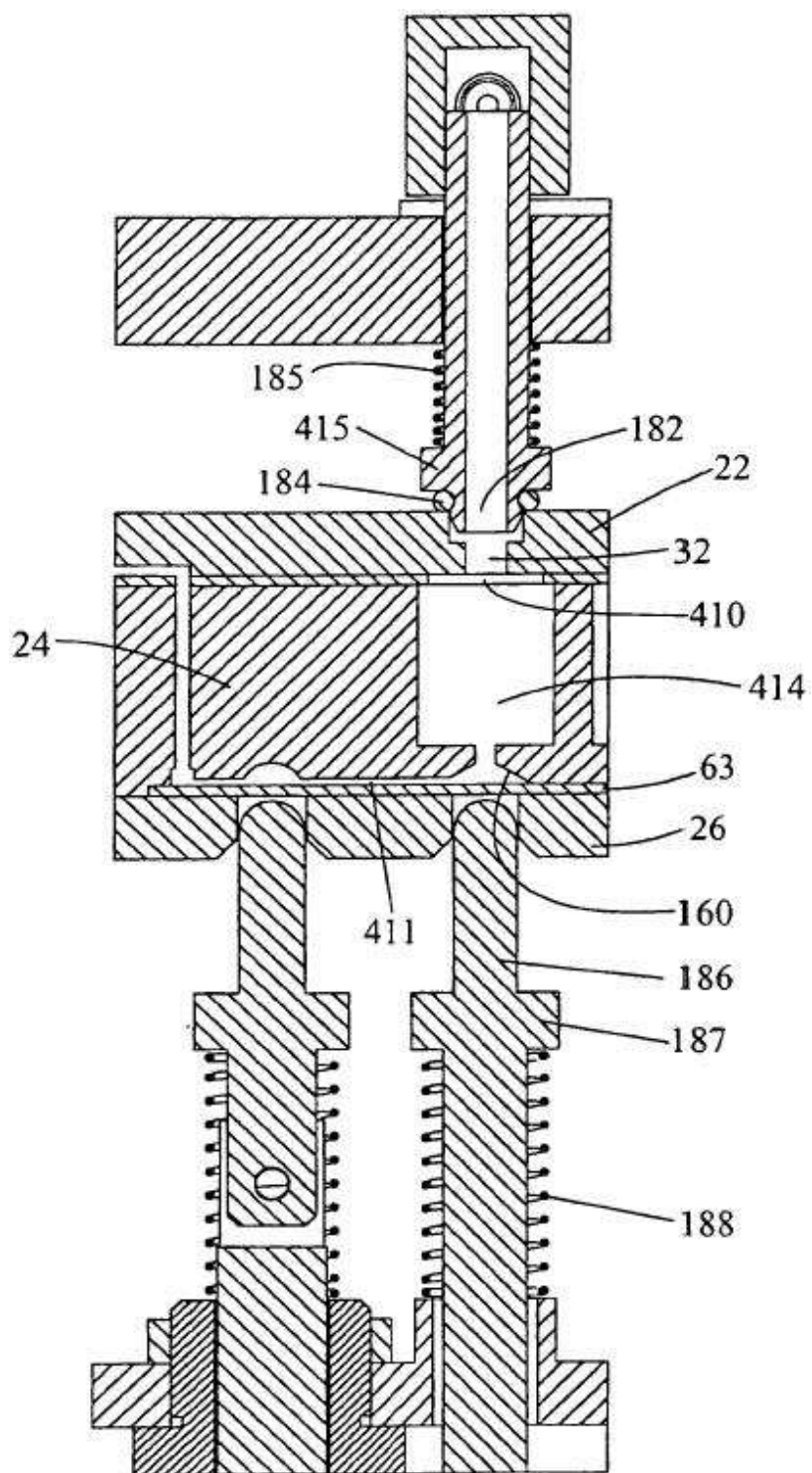


FIG. 20

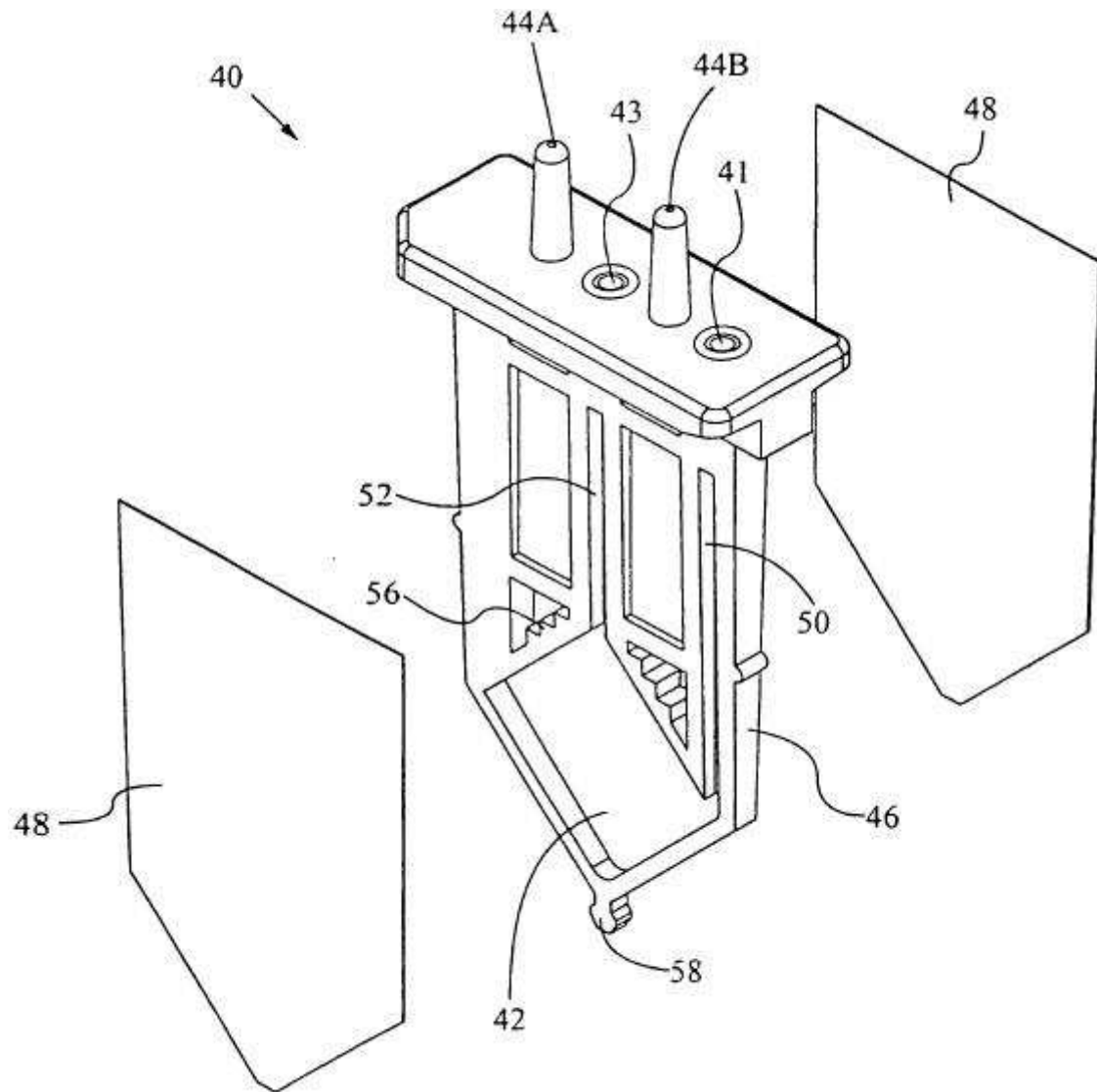


FIG. 21

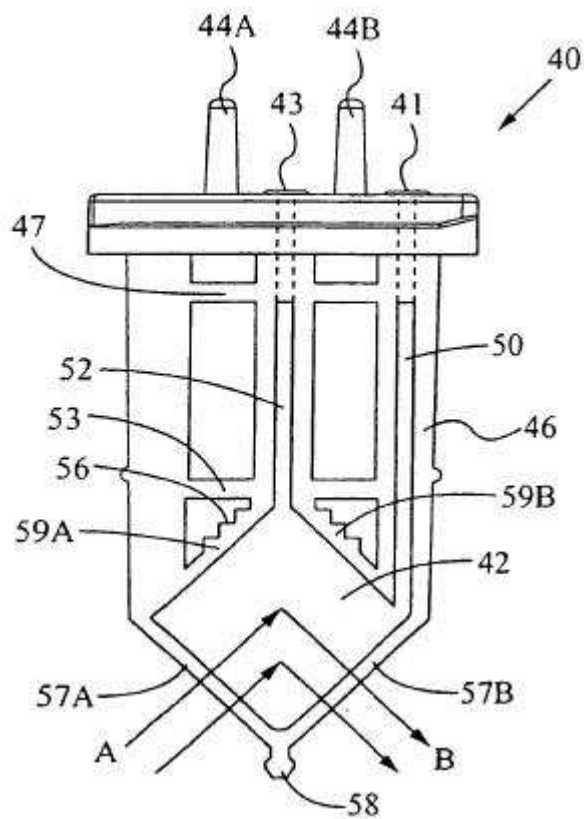


FIG. 22

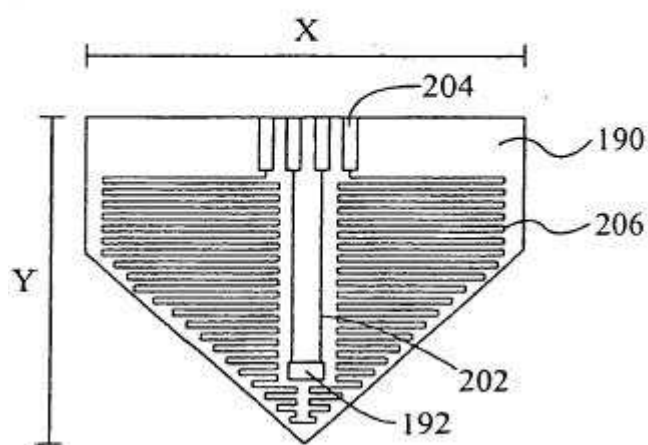


FIG. 24

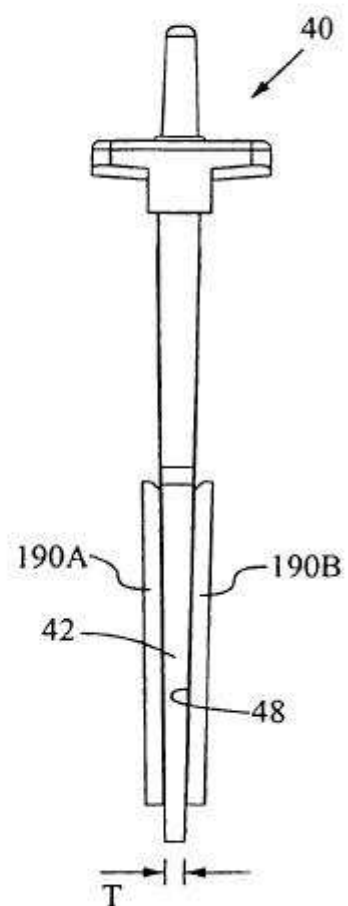


FIG. 23

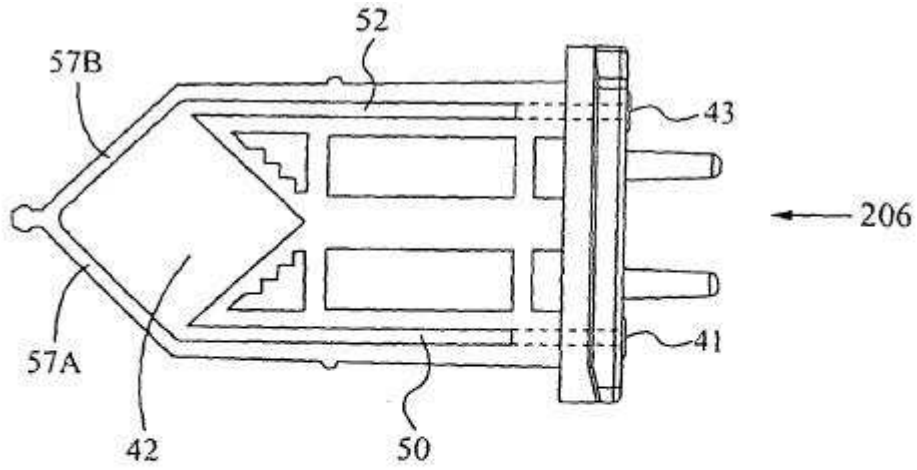


FIG. 25

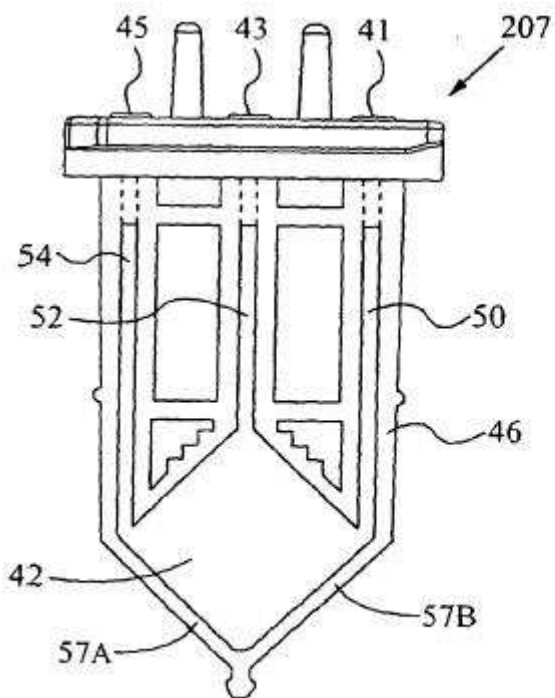


FIG. 26

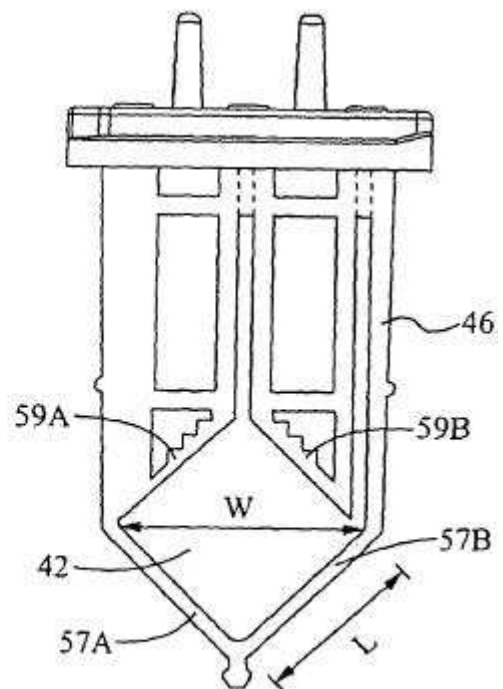


FIG. 27

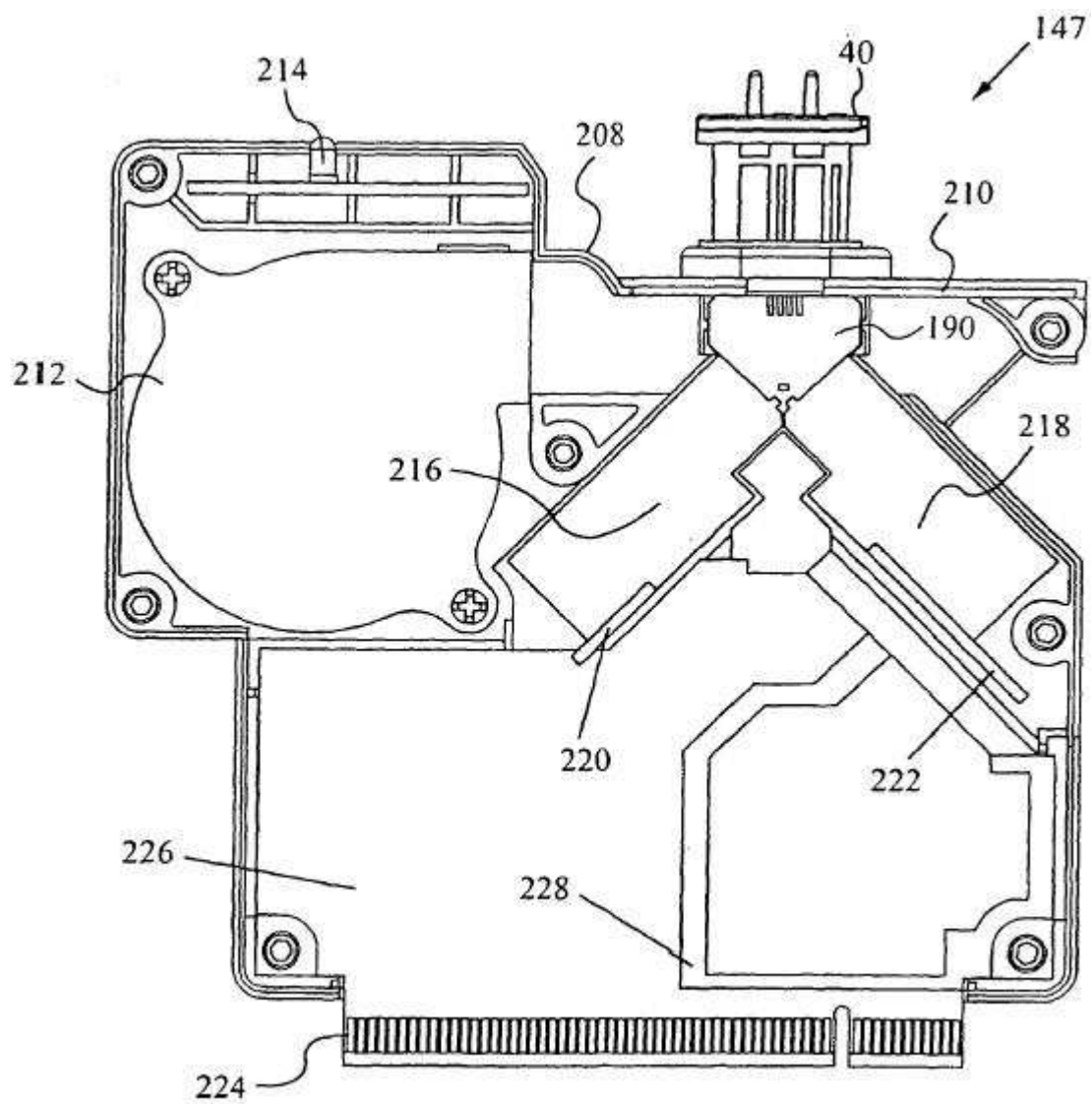


FIG. 28

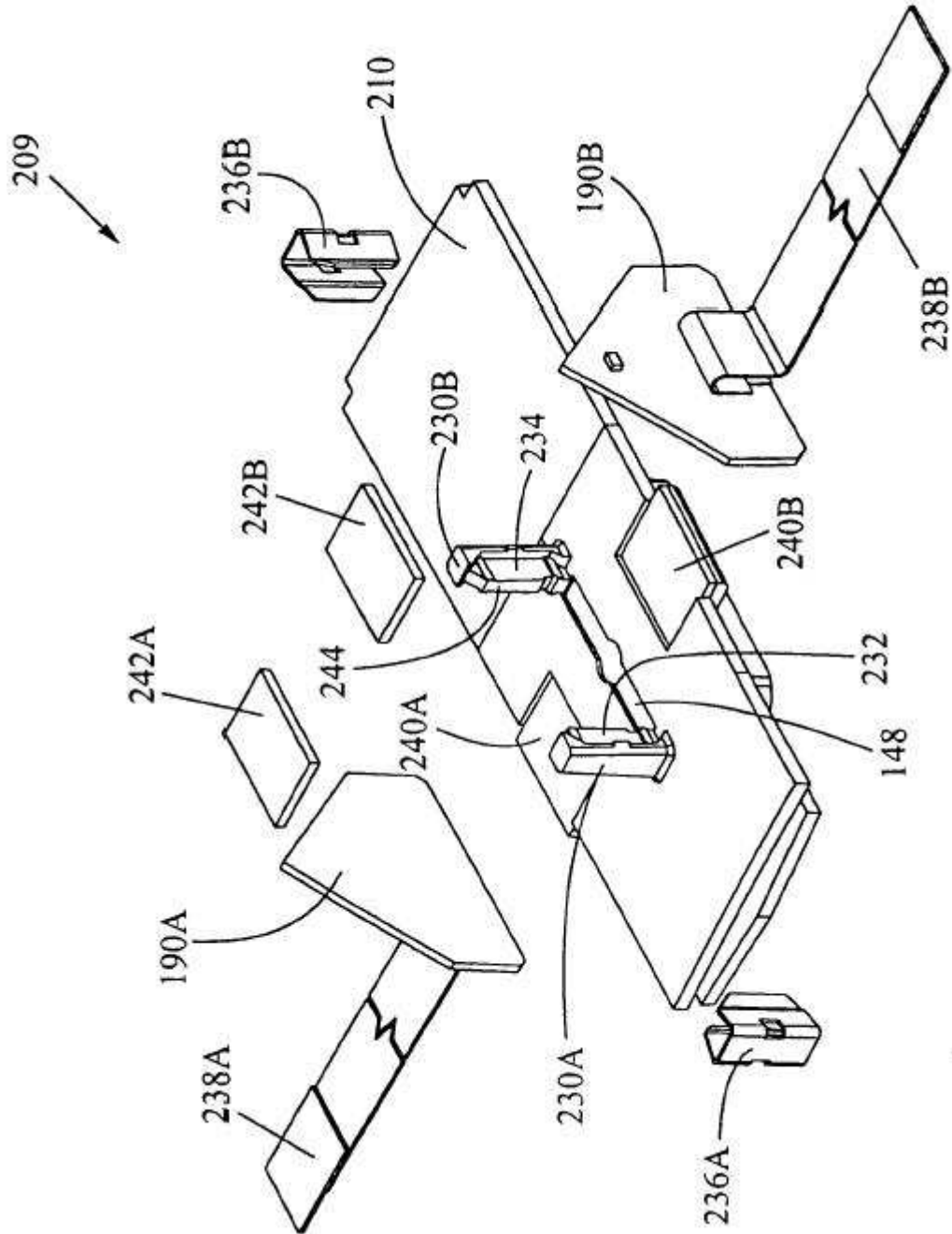


FIG. 29

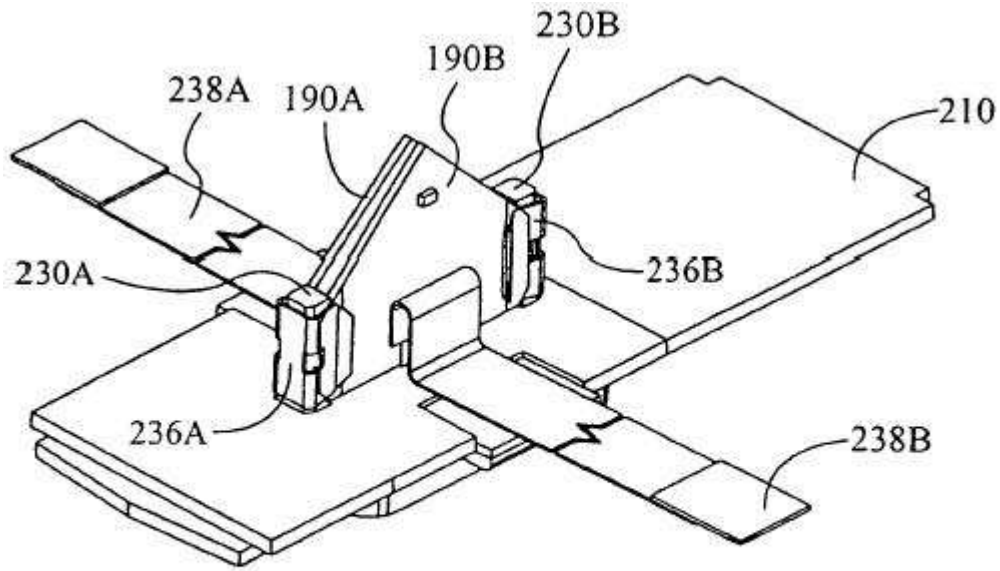


FIG. 30

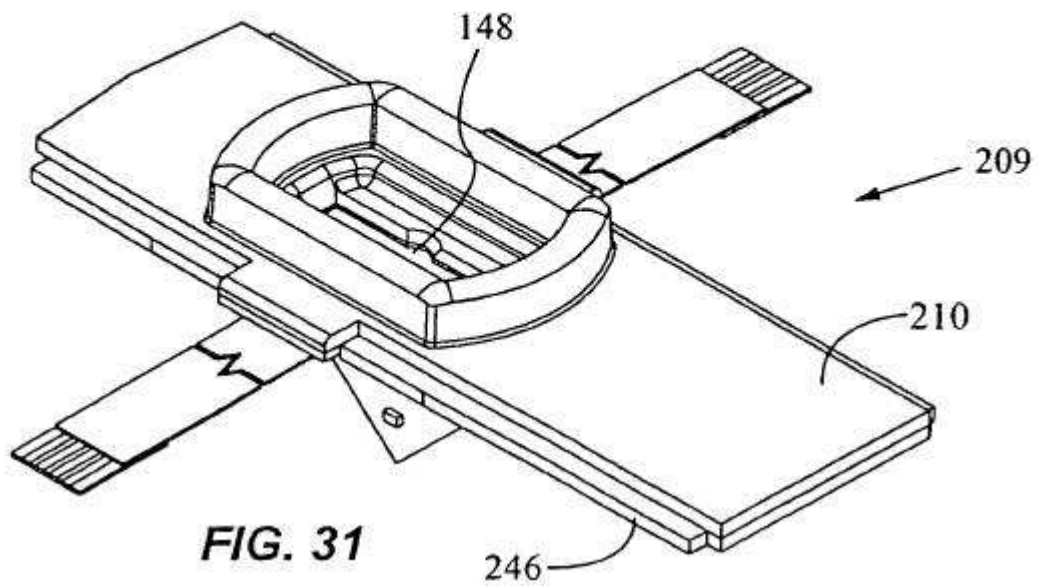


FIG. 31

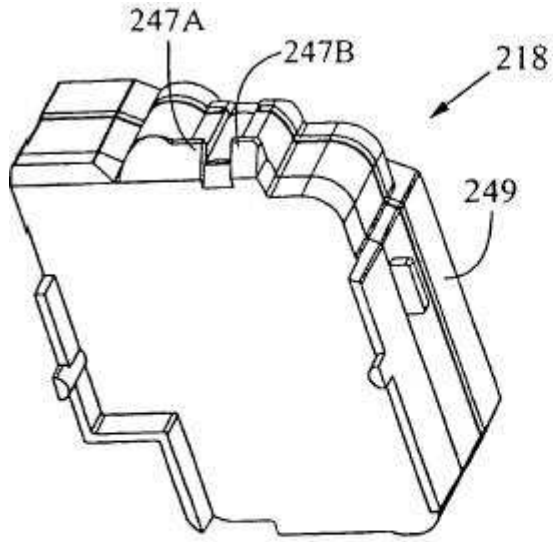


FIG. 32

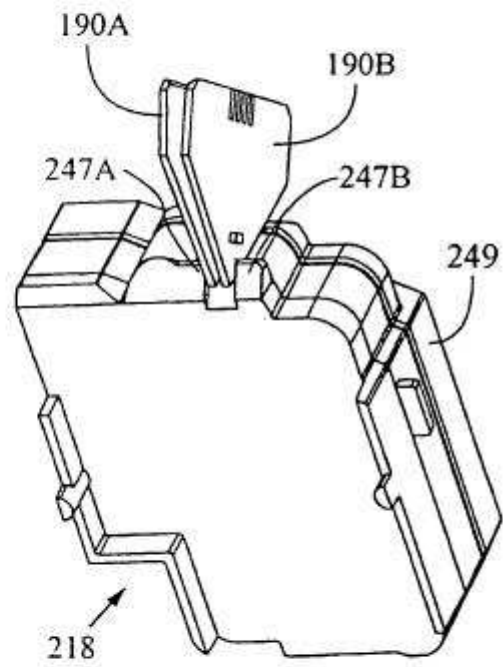


FIG. 33

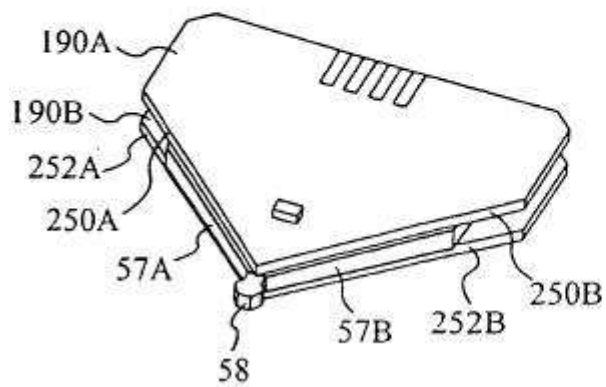


FIG. 34

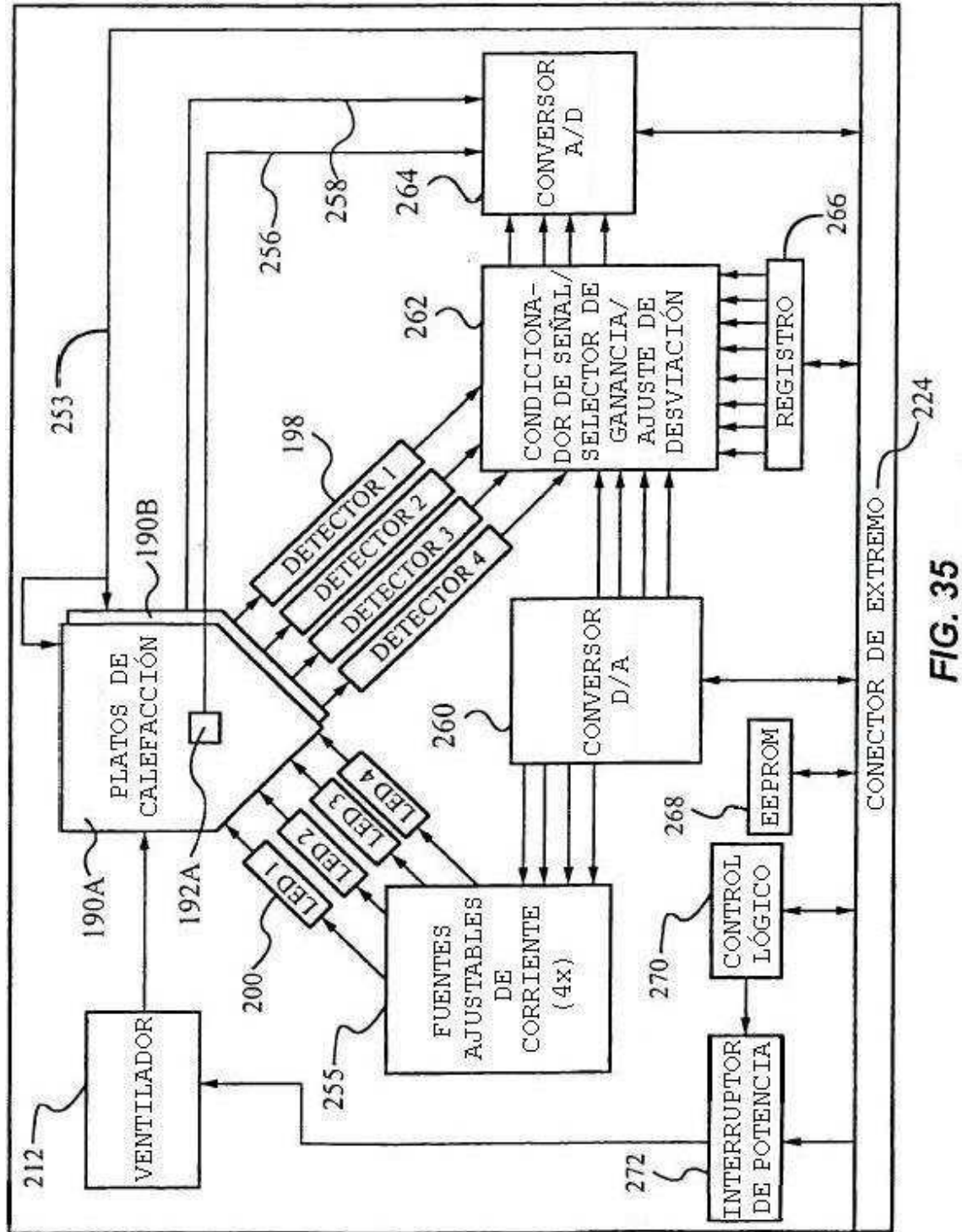


FIG. 35