

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 486**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2018 PCT/US2018/066706**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2019 WO19143440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2018 E 18834203 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024 EP 3740314**

54 Título: **Dispositivo microfluídico con microcámaras ventiladas**

30 Prioridad:

17.01.2018 US 201815873722

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

20.06.2024

73 Titular/es:

**QIAGEN SCIENCES, LLC (100.0%)
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874, US**

72 Inventor/es:

**YAMANA, KABIR, JAMES y
YAMANA-HAYES, SEAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 973 486 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfluídico con microcámaras ventiladas

Campo

5 Los aspectos de la presente descripción se refieren generalmente a métodos y a dispositivos para la manipulación de microfluidos.

Análisis de la técnica relacionada

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica usada en biología molecular para amplificar una sola copia o unas pocas copias de un segmento de ADN en varios órdenes de magnitud, generando de millones a miles de millones de copias de una secuencia de ADN particular. Es una manera fácil, económica y fiable de replicar repetidamente un segmento específico de ADN, un concepto que es aplicable a numerosos campos de la biología moderna y ciencias afines.

15 La PCR es una técnica común usada en laboratorios clínicos y de investigación para una amplia diversidad de aplicaciones. Los ejemplos de dichas aplicaciones incluyen clonación de ADN para secuenciación, clonación y manipulación génica, mutagénesis génica; construcción de filogenias a base de ADN, o análisis funcional de genes; diagnóstico y monitorización de enfermedades hereditarias; amplificación de ADN antiguo; análisis de huellas genéticas para elaborar perfiles de ADN (por ejemplo, en ciencia forense y pruebas de paternidad); y detección de patógenos en pruebas de ácido nucleico para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

20 Típicamente, los métodos de PCR se basan en ciclos térmicos, lo que implica exponer los reactivos a ciclos de calentamiento y enfriamiento repetidos, lo que permite que diferentes reacciones dependientes de la temperatura, específicamente la fusión del ADN y la replicación del ADN impulsada por enzimas, se realicen rápidamente muchas veces en secuencia. Los cebadores (fragmentos cortos de ADN) que contienen secuencias complementarias a la región diana, junto con una ADN polimerasa, permiten una amplificación selectiva y repetida. A medida que avanza la PCR, el propio ADN generado se usa como plantilla para la replicación, lo que pone en marcha una reacción en cadena en la que la plantilla de ADN original se amplifica exponencialmente.

25 Por ejemplo, cuando se exponen a una temperatura relativamente alta (p. ej., superior a 90 °C), las moléculas de doble hélice de una muestra de ADN se separan en cadenas sencillas. A una temperatura relativamente más baja (p. ej., 50-70 °C). Los cebadores de ADN se unen en los sitios diana a las cadenas sencillas de la muestra de ADN. En un intervalo intermedio de temperatura (p. ej., 60-80 °C), la polimerasa facilita el alargamiento de los fragmentos de ADN formados a partir de la unión inicial de los cebadores a las moléculas de ADN monocatenario. A continuación, los productos de ADN bicatenario de un ciclo de PCR pueden dividirse en un intervalo de temperatura relativamente alto y unirse a nuevas cadenas de cebador, duplicando la cantidad de ADN en cada ciclo hasta que se agoten los reactivos. Por lo tanto, la concentración de una muestra de ADN que contiene una secuencia de ADN diana, cuando se somete a PCR, puede aumentar exponencialmente.

35 La PCR digital (dPCR) es un tipo de análisis de PCR que implica dividir una muestra de ADN en una gran cantidad de alícuotas separadas, y amplificar las alícuotas para determinar si una molécula de ADN diana estaba presente dentro de la alícuota. En función del número de alícuotas que han experimentado un crecimiento exponencial, se puede determinar la concentración original de ADN antes de la división.

40 La PCR digital puede proporcionar una mayor especificidad de detección. En los casos donde la diana es relativamente rara en comparación con la cantidad de ADN no diana, el ADN de fondo puede competir por los reactivos y provocar una amplificación no específica. Dividir la muestra en muchas cámaras pequeñas en una microplaca de dPCR aumenta la concentración eficaz de dianas raras en las divisiones.

El documento US 2004/096358 A1 describe un dispositivo microfluídico que incluye cámaras dispuestas tanto en serie como en paralelo.

45 Un objeto de la invención es proporcionar un dispositivo microfluídico para manipular muestras de fluidos que pueden someterse a dPCR u otras técnicas asociadas con la biología molecular.

Compendio

La presente descripción se refiere a un dispositivo microfluídico, tal como una microplaca, para manipular muestras de fluidos que pueden someterse a diversas técnicas asociadas con aplicaciones de biología molecular.

50 El dispositivo microfluídico según la presente invención se describe en la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes. El dispositivo microfluídico comprende al menos un pocillo microfluídico configurado para recibir una muestra de fluido. El al menos un pocillo microfluídico incluye una pluralidad de microcámaras y al menos un canal microfluídico que acopla de manera fluida la pluralidad de microcámaras. Cada microcámara incluye una cámara de reacción y una cámara de ventilación, estando la cámara de reacción configurada para recibir la muestra de fluido del canal microfluídico y estando la cámara de ventilación configurada para expulsar

el gas de la cámara de reacción a través del canal microfluídico a medida que la muestra de fluido fluye hacia la cámara de reacción.

5 Se proporciona un circuito microfluídico en al menos un pocillo microfluídico. El circuito microfluídico está configurado para distribuir la muestra de fluido dentro del pocillo microfluídico. El circuito microfluídico incluye una pluralidad de cámaras de reacción, al menos un canal microfluídico que acopla de manera fluida las cámaras de reacción, y una pluralidad de válvulas microfluídicas asociadas con la pluralidad de cámaras de reacción. Cada válvula microfluídica está acoplada de manera fluida a una cámara de reacción asociada. Cada cámara de reacción está configurada para recibir una muestra de fluido del canal microfluídico y cada válvula microfluídica está configurada para expulsar el gas de una cámara de reacción correspondiente a través del canal microfluídico a medida que la muestra de fluido fluye hacia la cámara de reacción.

10 Se describe un método no reivindicado para manipular una muestra de fluido. El método comprende (a) suministrar una muestra de fluido a un dispositivo microfluídico que incluye una pluralidad de microcámaras y al menos un canal microfluídico que acopla de manera fluida la pluralidad de microcámaras. Cada microcámara incluye una cámara de reacción y una cámara de ventilación acoplada de manera fluida a la cámara de reacción. El método comprende además (b) dirigir la muestra de fluido a la cámara de reacción de cada microcámara, y (c) expulsar el gas de la cámara de reacción a través de la cámara de ventilación a medida que la muestra de fluido fluye hacia la cámara de reacción.

Lo anterior es un resumen no limitativo de la descripción. Otros aspectos, realizaciones y/o características resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción.

20 Diversas realizaciones de la presente descripción pueden proporcionar determinadas ventajas y pueden superar determinados inconvenientes de los dispositivos microfluídicos anteriores. Las realizaciones de la descripción pueden no compartir las mismas ventajas, y aquellas que sí las tienen pueden no compartirlas en todas las circunstancias.

Breve descripción de los dibujos

A continuación se describen aspectos de la presente descripción, a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que números similares hacen referencia a elementos similares, y en donde:

25 La FIG. 1 es una vista superior de un dispositivo microfluídico según una realización;

la FIG. 2 es una vista ampliada de un pocillo del dispositivo microfluídico de la FIG. 1 que ilustra un circuito microfluídico según una realización;

la FIG. 3 es una vista ampliada del pocillo de la FIG. 2 que ilustra microcámaras y canales microfluídicos del circuito microfluídico según una realización;

30 la FIG. 4 es una vista en sección transversal del circuito microfluídico tomada a lo largo de la línea de sección 4-4 de la FIG. 3

la FIG. 5 es una vista ampliada de una microcámara según una realización;

la FIG. 6 es una vista en sección transversal de la microcámara microfluídica tomada a lo largo de la línea de sección 6-6 de la FIG. 5;

35 la FIG. 7 es una vista superior de la microcámara de las FIGS. 5-6 recibiendo una muestra de fluido en la misma;

la FIG. 8 es una ilustración esquemática de la FIG. 6 con la muestra de fluido llenando parcialmente una cámara de reacción y el aire ventilándose a través de una cámara de ventilación;

la FIG. 9 es una ilustración esquemática de la FIG. 6 con la muestra de fluido llenando la cámara de reacción y manteniéndose en la cámara de reacción por la estenosis con respecto a la cámara de ventilación;

40 la FIG. 10 es una ilustración esquemática de la FIG. 6 con el aumento de la presión del fluido en la cámara de reacción provocando que la superficie libre sobresalga más allá de la estenosis y dentro de la cámara de ventilación antes de que el fluido supere la tensión superficial que mantiene el fluido en la cámara de reacción;

la FIG. 11 es una vista esquemática superior de la microcámara de la FIG. 10

45 la FIG. 12 es una vista esquemática de un pocillo de microplaca que ilustra un circuito de fluido representativo de microcámaras;

la FIG. 13 es una vista en sección transversal de la microplaca tomada a lo largo de la línea de sección 13-13 de la FIG. 13 que ilustra un grupo de microcámaras acopladas de manera fluida; y

las FIGS. 14A-19B son vistas esquemáticas que ilustran un proceso de llenado de un pocillo de una microplaca con una muestra de fluido para su procesamiento con una técnica de dPCR.

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que los aspectos de la presente descripción se describen en el presente documento con referencia a las figuras, que muestran realizaciones ilustrativas según aspectos de la descripción. Las realizaciones ilustrativas descritas en el presente documento no pretenden mostrar necesariamente todos los aspectos de la descripción, sino que se usan para describir algunas realizaciones ilustrativas. Por lo tanto, no se pretende que los aspectos de la descripción se interpreten de manera estricta en vista de las realizaciones ilustrativas. Debe apreciarse, entonces, que los diversos conceptos y realizaciones que se analizan en el presente documento pueden implementarse de cualquiera de las numerosas formas, ya que los conceptos y realizaciones que se describen no se limitan a ninguna manera particular de implementación. Además, debe entenderse que los aspectos de la descripción pueden usarse solos o en cualquier combinación adecuada con otros aspectos de la descripción.

La presente descripción se refiere a un dispositivo microfluídico para manipular muestras de material fluido que se van a someter a técnicas asociadas con la biología molecular, y es particularmente adecuado para su uso con técnicas de PCR digital (dPCR). Para facilitar la comprensión, y sin limitar el alcance de la descripción, el dispositivo microfluídico se describe a continuación particularmente en relación con técnicas de dPCR incluyendo, pero sin limitación, la fusión de ADN y la replicación de ADN impulsada por enzimas. Debe entenderse, sin embargo, que el dispositivo microfluídico no está tan limitado y puede emplearse con otras técnicas clínicas y/o de investigación asociadas con la biología molecular, como debería ser evidente para un experto en la técnica. Por ejemplo, y sin limitación, el dispositivo microfluídico puede emplearse para clonación de ADN para secuenciación, clonación y manipulación génica, mutagénesis génica; construcción de filogenias a base de ADN, o análisis funcional de genes; diagnóstico y monitorización de enfermedades hereditarias; amplificación de ADN antiguo; análisis de huellas genéticas para perfiles de ADN; y detección de patógenos en pruebas de ácido nucleico para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. El dispositivo microfluídico puede incluir una o más características, contribuyendo cada una independientemente, o en combinación, a dichos atributos.

La presente descripción se refiere más particularmente a un dispositivo microfluídico que incluye uno o más pocillos microfluídicos para recibir una o más muestras de fluido que se van a analizar usando una técnica de dPCR, aunque la descripción no está tan limitada. Cada pocillo microfluídico puede incluir una pluralidad de microcámaras configuradas para recibir un volumen de la muestra de fluido suministrada al pocillo. Cada microcámara puede estar acoplada de manera fluida a una microcámara adyacente mediante un canal microfluídico o un segmento del canal. Las microcámaras pueden estar acopladas de manera fluida mediante uno o más canales microfluídicos que se extienden a través del pocillo. Por ejemplo, las microcámaras pueden disponerse en grupos separados de microcámaras, estando cada grupo de microcámaras acoplado de manera fluida mediante un canal microfluídico separado que se extiende a través del pocillo. Una disposición de este tipo crea un circuito microfluídico mediante el cual una muestra de fluido puede fluir desde una microcámara a una microcámara adyacente a través de los canales microfluídicos.

Antes de recibir una muestra de fluido en el pocillo microfluídico, las microcámaras y los canales microfluídicos del pocillo típicamente se llenan con un gas, tal como aire. Por conveniencia, en lo sucesivo la descripción se referirá al aire, aunque en el circuito microfluídico pueden estar presentes otros gases adecuados para una técnica de dPCR. La introducción de una muestra de fluido en el pocillo microfluídico requiere desplazar el aire de las microcámaras y los canales microfluídicos para permitir que la muestra de fluido fluya y llene el circuito microfluídico. Cualquier aire que quede en el circuito microfluídico podría formar burbujas en las microcámaras que pueden afectar a la precisión de la técnica de dPCR.

La formación de burbujas en un dispositivo microfluídico puede abordarse variando la relación de aspecto entre la profundidad y el diámetro de la microcámara. Por ejemplo, una microcámara configurada con una profundidad relativamente poco profunda y un diámetro grande (es decir, una relación de aspecto relativamente pequeña) puede ser eficaz para evitar la formación y/o el atrapamiento de burbujas de aire a medida que el fluido fluye hacia la microcámara. Los inventores han apreciado que tal configuración de microcámaras puede limitar el número de microcámaras dentro de un pozo microfluídico. Los inventores han apreciado además que puede ser deseable para algunas aplicaciones de un dispositivo microfluídico aumentar el número de microcámaras dentro de un pocillo microfluídico. Aumentar el número de microcámaras requerirá el uso de microcámaras que tengan una relación de aspecto relativamente mayor (es decir, un diámetro más pequeño, mayor profundidad) para lograr el mismo volumen que una microcámara que tiene una relación de aspecto menor. Sin embargo, los inventores han apreciado que las microcámaras configuradas con una relación de aspecto relativamente mayor pueden ser más susceptibles a la formación de burbujas. Por ejemplo, puede ser deseable acoplar de manera fluida microcámaras con canales microfluídicos relativamente poco profundos, por lo que las microcámaras están sustancialmente más profundas que los canales microfluídicos. A medida que la muestra de fluido fluye hacia la microcámara a través de un canal de entrada, el fluido entrante desplaza el gas dentro de la microcámara y escapa a través de un canal de salida. Sin embargo, es posible que la muestra de fluido llegue al canal de salida antes de llenar completamente la microcámara. Una vez que la muestra de fluido alcanza y entra en el canal de salida, no puede escapar ningún gas adicional de la microcámara, lo que puede provocar que una burbuja quede atrapada dentro de la microcámara.

Los inventores han apreciado que sería ventajoso un dispositivo microfluídico que reduzca, si no elimine, la presencia de burbujas en el circuito microfluídico, particularmente las microcámaras dentro del pocillo microfluídico,

particularmente para técnicas de dPCR. Los inventores han apreciado además que sería beneficioso desarrollar un dispositivo microfluídico que reduzca el potencial de formación de burbujas en las microcámaras de una manera rentable.

5 Un dispositivo microfluídico de la presente descripción puede estar dotado de una serie de microcámaras en las que cada microcámara incluye una cámara de reacción y una cámara de ventilación asociada. El circuito microfluídico puede disponerse de manera que una muestra de fluido introducida en el pocillo microfluídico fluya hacia la cámara de reacción y el aire u otro gas presente en la cámara de reacción se expulse de la microcámara a través de la cámara de ventilación. La microcámara puede configurarse para permitir solo el flujo de aire hacia la cámara de ventilación desde la cámara de reacción hasta el momento en que la muestra de fluido haya desplazado el aire de la cámara de reacción y/o se haya recibido en la cámara de reacción un volumen predefinido de la muestra de fluido. La microcámara puede configurarse además para permitir que la muestra de fluido fluya posteriormente desde la cámara de reacción hacia la cámara de ventilación. El conjunto de microcámaras puede disponerse de manera que el fluido que sale de la cámara de ventilación pueda fluir a la cámara de reacción de la siguiente microcámara en el circuito microfluídico a través de un canal microfluídico que acopla de manera fluida las microcámaras. El canal microfluídico puede ser menos profundo que las microcámaras para facilitar el sellado de los canales después de que las microcámaras se llenen con la muestra de fluido.

La microcámara puede incluir una válvula microfluídica o una disposición similar a una válvula entre la cámara de reacción y la cámara de ventilación para controlar el flujo del fluido y el aire. En un aspecto, la microcámara puede configurarse de manera que la cámara de ventilación sea más pequeña que la cámara de reacción en al menos una dimensión y configurarse para crear suficiente tensión superficial en la transición de la cámara de reacción a la cámara de ventilación para impedir que el fluido entre en la cámara de ventilación hasta que la tensión superficial sea superada por la presión del fluido. De esta manera, se forma una válvula microfluídica en la transición o entrada a la cámara de ventilación que actúa de manera pasiva sin necesidad de actuación activa de la válvula para permitir el flujo del fluido.

La cámara de ventilación puede configurarse para que tenga una profundidad que sea igual o incluso más profunda que la cámara de reacción. La cámara de ventilación puede estar conectada a la cámara de reacción a lo largo de la mayor parte, si no la totalidad, de la profundidad de la microcámara de manera que, a medida que la muestra de fluido fluya hacia la microcámara, el gas pueda escapar hasta que el fluido llene toda la profundidad de la cámara de reacción. Como alternativa, para algunas aplicaciones en las que puede ser deseable atrapar una burbuja predefinida, la profundidad de la cámara de ventilación puede ser menor que la profundidad de la cámara de reacción y extenderse a lo largo de solo una porción de la cámara de reacción. Cuando la muestra de fluido alcanza la porción de la cámara de reacción no acoplada a la cámara de ventilación, el volumen de gas que queda en la cámara de reacción no puede expulsarse y queda atrapado formando así una burbuja definida por la porción de la cámara de reacción no ventilada por la cámara de ventilación.

Cada pocillo microfluídico puede estar dotado de una entrada principal para recibir una muestra de fluido y un respiradero principal para expulsar el aire y cualquier exceso de fluido de las microcámaras a medida que la muestra de fluido se suministra al pocillo. Las entradas principales a los pocillos microfluídicos pueden disponerse para alojar el pipeteo u otras técnicas para suministrar muestras de fluido a cada pocillo microfluídico, como debería ser evidente para un experto en la técnica.

Cada pocillo microfluídico puede configurarse para distribuir porciones de la muestra de fluido a cada una de las microcámaras. Por ejemplo, y sin limitación, las microcámaras pueden disponerse en múltiples grupos, suministrándose una porción de la muestra de fluido a cada grupo de microcámaras mediante un canal microfluídico separado que acopla de manera fluida cada microcámara del grupo. Para algunas aplicaciones, las microcámaras de cada grupo pueden estar acopladas de manera fluida en serie mediante una pluralidad de canales microfluídicos o segmentos de un canal microfluídico. Cada grupo también puede disponerse para recibir porciones de la muestra de fluido en paralelo entre sí. Sin embargo, la presente descripción no está tan limitada y las microcámaras pueden disponerse y/o acoplarse de manera fluida de cualquier manera adecuada, como debería ser evidente para un experto en la técnica.

En una realización mostrada en la FIG. 1, un dispositivo microfluídico 20 puede incluir una microplaca 22 dotada de uno o más pocillos microfluídicos 24 para recibir una o más muestras de fluido que se van a analizar usando, pero sin limitación, una técnica de dPCR. Cada uno de los pocillos microfluídicos 24 puede recibir la misma muestra de fluido o diferentes pocillos pueden recibir diferentes muestras de fluido para su análisis, como debería apreciar un experto en la técnica.

Como se ilustra, los pocillos microfluídicos 24 pueden disponerse en una matriz que tenga un patrón de rejilla, aunque se contemplan otras disposiciones adecuadas para una técnica y/o sistema microfluídico en particular. En una realización, el dispositivo microfluídico puede incluir noventa y seis (96) pocillos microfluídicos dispuestos en un patrón de rejilla de 8 x 12. Otras disposiciones pueden incluir, pero sin limitación, una microplaca con veinticuatro (24) pocillos microfluídicos dispuestos en un patrón de rejilla.

Cada pocillo microfluídico 24 puede tener un circuito microfluídico 26 que incluye una pluralidad de microcámaras 28 acopladas de manera fluida por uno o más canales microfluídicos 30 que se extienden a través del pocillo. Las

microcámaras 28 pueden configurarse para recibir y contener un volumen predeterminado de la muestra de fluido que se va a someter a dPCR u otra técnica. Cada pocillo microfluídico 24 puede incluir una entrada primaria 32 para recibir la muestra de fluido que se distribuirá por todo el circuito microfluídico y un respiradero primario 34 para expulsar el aire y el exceso de fluido del circuito microfluídico.

5 Para facilitar el flujo de fluido a través del circuito microfluídico, las microcámaras pueden disponerse en grupos o subcircuitos que estén acoplados de manera fluida entre sí. En una realización ilustrada en las FIGS. 2-4, las microcámaras pueden disponerse en múltiples grupos 36, y las microcámaras de cada grupo pueden estar acopladas de manera fluida entre sí en serie con un canal microfluídico 30 o segmentos de un canal microfluídico. Cada grupo
10 36 de microcámaras puede disponerse para recibir flujo de fluido en paralelo entre sí. Cada grupo 36 de microcámaras puede incluir un canal microfluídico 30 con un extremo de entrada 38 y un extremo de salida 40. El extremo de entrada 38 puede estar acoplado de manera fluida a la entrada primaria 32 a través de un canal microfluídico de entrada 42 y el extremo de salida 40 puede estar acoplado de manera fluida al respiradero primario 34 a través de un canal microfluídico de salida 44. Debe apreciarse que se puede emplear cualquier disposición de circuito microfluídico adecuada para facilitar el flujo y la distribución de la muestra de fluido, como debería ser evidente para un experto en la técnica.
15

Para algunas aplicaciones, puede ser deseable aumentar el número de canales microfluídicos dentro de un pocillo microfluídico. Esto se puede lograr disminuyendo el espacio entre microcámaras adyacentes, lo que puede implicar disminuir el diámetro de la microcámara. Para mantener el mismo volumen de la microcámara, se aumentará la profundidad de la microcámara. Sin embargo, los inventores han apreciado que cambiar la relación de aspecto de la
20 microcámara de esta manera puede crear un flujo menos eficiente de la muestra de fluido a través del circuito microfluídico del pocillo microfluídico con un mayor potencial para atrapar burbujas en las microcámaras.

Para abordar esta preocupación, cada microcámara puede configurarse para expulsar gas, tal como aire, a medida que la muestra de fluido fluye hacia la microcámara de una manera que permite que el fluido fluya eficientemente a través del circuito microfluídico con una incidencia reducida de burbujas atrapadas en la microcámara.

25 En una realización ilustrada en las FIGS. 3-5, cada microcámara 28 puede incluir una cámara de reacción 46 y una cámara de ventilación 48 asociada. La cámara de reacción 46 está configurada para recibir y contener un volumen predefinido de la muestra del canal microfluídico 30 y la cámara de ventilación 48 está configurada para expulsar gas de la cámara de reacción 46 a medida que la muestra de fluido fluye hacia la cámara de reacción. Cuando el gas se ha expulsado de al menos la cámara de reacción y/o la cámara de reacción recibe un volumen predefinido de fluido,
30 la muestra de fluido fluye a través de la cámara de ventilación 48 y continúa a lo largo del canal microfluídico 30 hasta la siguiente microcámara en el circuito microfluídico. De esta manera, la cámara de reacción 46 recibe fluido de un segmento aguas arriba 30a del canal microfluídico y el fluido pasa a través de la cámara de ventilación hasta un segmento aguas abajo 30b del canal microfluídico. Además, el aire que reside en el circuito microfluídico se expulsa del circuito microfluídico mediante el flujo de avance de la muestra de fluido a lo largo del canal microfluídico.

35 Como se ha indicado anteriormente, la microcámara 28 puede incluir una válvula microfluídica o una disposición similar a una válvula para controlar el flujo de fluido y aire. En una realización, la cámara de ventilación 48 puede configurarse para actuar de manera similar, si no como, una válvula capilar o una válvula hidrófoba. Más particularmente, la microcámara 28 puede configurarse con una estenosis hidrófoba estrecha 50 para evitar que la muestra líquida entre inicialmente en la cámara de ventilación 48 hasta que la cámara de reacción 46 esté esencialmente libre de aire lo
40 que de otro modo formaría burbujas en la cámara de reacción durante el proceso de llenado. Además, o como alternativa, la microcámara 28 puede configurarse con una estenosis hidrófoba estrecha 50 para evitar que la muestra de fluido entre inicialmente en la cámara de ventilación 48 hasta que la cámara de reacción 46 se llene con un volumen predefinido de la muestra de fluido que puede ser adecuado para proporcionar resultados precisos.

45 Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, las fuerzas capilares dan como resultado la interacción de superficies líquidas, aire y sólidas en la interfaz entre las mismas. Las moléculas en la fase líquida se mantienen juntas mediante fuerzas cohesivas que se equilibran en la mayor parte del líquido. Para las moléculas de líquido en el borde del líquido, las fuerzas cohesivas con otras moléculas de líquido son mayores que la interacción con las moléculas de aire adyacentes, lo que hace que las moléculas de líquido en la interfaz se acerquen hacia el líquido. El efecto general de estas fuerzas es minimizar la superficie libre del líquido que está expuesta al aire. La proporcionalidad entre la
50 disminución de energía de la superficie resultante de la disminución del área superficial es la tensión superficial.

La tensión superficial es responsable del aumento de presión necesario para empujar el líquido hacia un conducto vacío que no se humedece, tal como un capilar. Por lo tanto, proporcionar una estenosis hidrófoba estrecha 50 desde la cámara de reacción 46 a la cámara de ventilación 48 evitará el flujo de la muestra de fluido desde la cámara de reacción a la cámara de ventilación hasta que la tensión superficial en la estenosis sea superada por una mayor
55 presión del fluido dentro de la cámara de reacción. La microcámara puede configurarse de modo que la presión necesaria para superar la tensión superficial se produzca cuando un volumen predefinido de líquido esté presente en la cámara de reacción, lo que resulta cuando el aire se ha desplazado de la cámara de reacción hacia o a través de la cámara de ventilación.

El efecto capilar entre la cámara de reacción 46 y la cámara de ventilación 48 puede lograrse con una configuración

de microcámara que incluye una estenosis estrecha 50 ubicada entre las cámaras. En una realización ilustrada en las FIGS. 3-5, la cámara de reacción 46 puede tener una configuración circular con un diámetro D y una profundidad d . La cámara de ventilación 48 puede tener una configuración rectangular con una longitud L y un ancho A . Como se muestra, la longitud L de la cámara de ventilación puede extenderse en una dirección a lo largo del microcanal 30, siendo el ancho W transversal, tal como perpendicular, a la longitud. La cámara de ventilación 48 puede tener la misma profundidad que la cámara de reacción para facilitar la expulsión del gas de toda la cámara de reacción. La cámara de reacción 46 puede estar acoplada de manera fluida a la cámara de ventilación mediante una entrada o estenosis 50 definida por el ancho A de la cámara de ventilación y la profundidad d de las cámaras. En otras realizaciones, la profundidad de la cámara de ventilación puede ser menor que la cámara de reacción, particularmente si se desea atrapar una cantidad definida de gas y formar una burbuja dentro de la cámara de reacción.

El efecto capilar de la microcámara 28 puede verse afectado por las relaciones dimensionales asociadas con las cámaras. Por ejemplo, el efecto capilar puede verse afectado por la relación de diámetro-ancho DAY entre la cámara de reacción 46 y la cámara de ventilación 48, la relación de longitud-ancho LAV de la cámara de ventilación 48, y la relación de profundidad-diámetro d/D de la cámara de reacción 46.

En una realización ilustrativa, la microcámara 28 puede configurarse con una relación de diámetro-ancho de $DAY \geq 2$ y una relación de longitud-ancho de $LAV \geq 1$. Una configuración de microcámara con estas relaciones es adecuada para una configuración de microcámara con una cámara de reacción que tiene una relación de profundidad-diámetro de $d/D \leq 2$. Por ejemplo, y sin limitación, se puede emplear una relación de profundidad-diámetro d/D de 1,5 con $D/A \geq 2$ y $L/A \geq 1$. Sin embargo, debe apreciarse que se pueden emplear otras relaciones para que la microcámara alcance un nivel deseado de tensión superficial o efecto capilar. En otras realizaciones, la cámara de ventilación 48 puede tener una relación de longitud-ancho de $L/A \geq 0,7$, una relación de longitud-ancho de $L/A \geq 0,8$, una relación de longitud-ancho de $L/A \geq 0,9$, o una relación de longitud-ancho de $L/A \geq 1$.

El efecto capilar también puede verse afectado por aspectos geométricos de las cámaras. Por ejemplo, y sin limitación, la configuración del borde de la entrada 50 a la cámara de ventilación 48 puede afectar a la cantidad de tensión superficial que impide que el fluido entre en la cámara de ventilación. Más particularmente, un borde relativamente afilado puede dar como resultado una tensión superficial mayor en comparación con un borde más redondeado. En una realización, la microcámara puede configurarse con un borde relativamente afilado en la entrada a la cámara de ventilación para mejorar la tensión superficial y retener el fluido dentro de la cámara de reacción hasta que el volumen de fluido dentro de la cámara de reacción cree suficiente presión de fluido para superar la tensión superficial. La microcámara puede configurarse para que esto tenga lugar cuando la cámara de reacción esté libre de burbujas de aire.

Otras relaciones dimensionales asociadas con características de la microcámara y/o el circuito microfluídico también pueden afectar al flujo de la muestra de fluido y/o al atrapamiento de burbujas dentro de la microcámara. Por ejemplo, el flujo de fluido y/o el atrapamiento de burbujas pueden verse afectados por la relación de profundidad entre la cámara de reacción 46 y el canal microfluídico 30, y la relación de profundidad entre la cámara de reacción 46 y la cámara de ventilación 48. En una realización, la cámara de reacción y el canal microfluídico pueden tener una relación de profundidad de $d/d_2 \geq 2:1$. En una realización, la profundidad de la cámara de ventilación puede ser al menos el 50 % de la profundidad de la cámara de reacción. Sin embargo, debe apreciarse que se pueden emplear otras relaciones de profundidad como debería ser evidente para un experto en la técnica.

En una realización ilustrativa, la microcámara 28 puede configurarse teniendo la cámara de reacción 46 un diámetro D de $60 \mu\text{m}$ y teniendo la cámara de ventilación 48 una anchura A de $25 \mu\text{m}$ y una longitud L de aproximadamente $16 \mu\text{m}$. Cada una de la cámara de reacción y la cámara de ventilación puede tener una profundidad d de $100 \mu\text{m}$. La microcámara también puede tener una longitud total L_2 que se extiende en la dirección del microcanal 30 y a través del diámetro D de la cámara de reacción hasta la pared final 52 de la cámara de ventilación de $75 \mu\text{m}$. Preferiblemente, el diámetro de la cámara de reacción puede ser de $30 \mu\text{m}$ a $600 \mu\text{m}$. Sin embargo, para algunas aplicaciones puede usarse una cámara de reacción con un diámetro inferior a $30 \mu\text{m}$. De manera similar, la cámara de reacción puede configurarse con un diámetro superior a $600 \mu\text{m}$, aunque los efectos de la tensión superficial pueden disminuir y volverse menos eficaces a medida que el diámetro aumenta por encima de $600 \mu\text{m}$.

En una realización ilustrativa, el circuito microfluídico de cada pocillo 24 puede disponerse para incluir aproximadamente ciento dieciséis (116) grupos de microcámaras 28, incluyendo cada grupo aproximadamente setenta y cuatro (74) microcámaras acopladas de manera fluida entre sí con un canal microfluídico 30 resultante en el pocillo que tiene más de ocho mil quinientas (8500) microcámaras para recibir porciones separadas de la muestra de fluido. Como se ilustra en las FIGS. 2-3, los grupos 36 de microcámaras pueden disponerse en un patrón lineal que se extiende a través del pocillo. El circuito microfluídico puede disponerse para dirigir la muestra de fluido para que fluya a través de cada grupo en paralelo entre sí y estando las microcámaras de cada grupo dispuestas en serie. Sin embargo, debe apreciarse que el circuito microfluídico puede emplear cualquier configuración adecuada, como debería ser evidente para un experto en la técnica.

En una realización ilustrativa, cada grupo de microcámaras puede disponerse con una separación S_1 de aproximadamente $70 \mu\text{m}$ de un grupo adyacente. Como se muestra en la FIG. 3, las microcámaras en grupos adyacentes pueden disponerse con un desfase S_2 de aproximadamente $55 \mu\text{m}$ para aumentar aún más la densidad

de las microcámaras dentro del pocillo. Cada canal microfluídico o segmento de conexión de un canal microfluídico puede tener un ancho A_2 de aproximadamente 45 μm y una profundidad d_2 de aproximadamente 20 μm . Sin embargo, debe apreciarse que el circuito microfluídico puede emplear cualquier espacio adecuado entre las microcámaras y cualquier tamaño de canal microfluídico adecuado, como debería ser evidente para un experto en la técnica.

5 En una realización ilustrativa como se muestra en la FIG. 1, el dispositivo microfluídico puede incluir una microplaca con noventa y seis (96) pocillos dispuestos en una disposición de rejilla de 8 x 12. Cada pocillo puede tener una configuración cuadrada de 9 mm x 9 mm. El tamaño total de la microplaca puede ser de 72 mm x 108 mm. Una disposición de este tipo puede proporcionar más de 760.000 microcámaras por microplaca. Debe entenderse que el dispositivo microfluídico puede emplear otras disposiciones adecuadas de pocillos, como debería ser evidente para un experto en la técnica.

El dispositivo microfluídico puede fabricarse a partir de cualquier material adecuado usando cualquier técnica de fabricación adecuada, como debería ser evidente para un experto en la técnica.

15 En una realización ilustrativa, el dispositivo microfluídico puede formarse a partir de múltiples capas de material. Las capas del dispositivo microfluídico pueden estar compuestas por materiales similares o diferentes. En una realización, el dispositivo microfluídico puede incluir un material hidrófobo para mejorar el efecto capilar dentro de la microcámara para controlar el flujo de fluido y aire a la cámara de ventilación cuando la cámara de reacción recibe fluido.

20 En algunas realizaciones, una capa del dispositivo puede estar hecha de un plástico relativamente rígido, por ejemplo, polipropileno, polietileno, policarbonato, PTFE y similares. Algunos plásticos, tales como PTFE, polipropileno, son naturalmente hidrófobos, por lo que pueden mejorar el rendimiento del efecto capilar evitando que el líquido fluya prematuramente hacia la cámara de ventilación. Como alternativa, una capa puede incluir un material flexible similar al caucho, tal como silicona u otro elastómero. Otros materiales potenciales pueden incluir vidrio, cerámica, silicio o similares. Como tal, una capa puede ser rígida o deformable. Dichos materiales pueden ser translúcidos o transparentes para permitir fácilmente mediciones ópticas del contenido dentro de las cámaras/cavidades.

25 Las capas individuales del dispositivo microfluídico pueden fabricarse mediante cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, las capas se fabrican mediante moldeo por inyección, estampando las cavidades y canales en una lámina delgada de plástico, grabado, o cualquier otro método adecuado. Por ejemplo, los espacios que definen las cavidades y canales pueden formarse (p. ej., moldearse, grabarse) en un material de plástico/polímero o elastomérico que constituya la capa.

30 En algunas realizaciones, diferentes capas pueden definir cavidades y canales que inicialmente están en comunicación fluida. Por ejemplo, una primera capa puede definir varias cavidades sin definir los canales que conectan las cavidades entre sí; una capa adicional adyacente a la primera capa puede definir aquellos canales que conectan las cavidades. Tales canales pueden sellarse apropiadamente, por ejemplo, mediante compresión de las dos capas entre sí.

35 En algunas realizaciones, una capa puede incluir adhesivo acrílico, adhesivo de caucho natural o adhesivo de silicona. Dichos materiales pueden ser adecuados para deformarse en canales del dispositivo (p. ej., como material de sellado) cuando se someten a compresión. En algunas realizaciones, los adhesivos pueden disponerse sobre una capa relativamente rígida o, como alternativa, sobre un soporte separado. Ejemplos de soportes adecuados pueden incluir, pero sin limitación, polipropileno, polietileno, policarbonato y/u otros plásticos adecuados.

40 Se pueden adherir diversos componentes (p. ej., capas, adhesivos, etc.) de un dispositivo microfluídico mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede usarse un adhesivo para unir uno o más componentes entre sí, tal como para unir un material de separación/sellado y una primera y/o segunda capas. En algunas realizaciones, los componentes del dispositivo microfluídico se pueden comprimir juntos (p. ej., mediante sujeción, rodamiento u otra fuerza aplicada externamente) para dar como resultado una unión distribuida uniformemente entre superficies de diferentes capas.

45 Para determinados materiales, la aplicación de una cantidad adecuada de compresión y/o calor puede dar como resultado cambios en determinadas características de los componentes del dispositivo. Por ejemplo, a temperaturas elevadas, determinados materiales tales como la cera se volverán cada vez más pegajosos y/o adhesivos, dando como resultado una fuerte adherencia entre los componentes del dispositivo. Por consiguiente, las diferentes capas del dispositivo, incluyendo una capa de cera, pueden ensamblarse y a continuación someterse a compresión y calentamiento durante un período de tiempo apropiado, permitiendo que la cera cree una unión. En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más disolventes apropiados para promover la unión entre capas.

Las FIGS. 6-11 ilustran un ejemplo del flujo de fluido y aire hacia y desde una microcámara mientras una muestra de fluido fluye a través del circuito microfluídico de un pocillo.

La FIG. 6 ilustra una microcámara 28 que contiene sólo aire, o algún otro gas, antes de la introducción de una muestra de fluido.

55 Las FIGS. 7-8 ilustran la muestra de fluido que entra en la cámara de reacción 46 y que desplaza el aire hacia la cámara de ventilación 48. Aunque la FIG. 8 ilustra la muestra de fluido que fluye en dirección descendente a medida

que entra en la cámara de reacción, el dispositivo microfluídico típicamente estaría orientado de modo que la muestra de fluido realmente entre en el fondo de la cámara de reacción y fluya en dirección ascendente. A este respecto, las FIGS. 6-11 ilustran la microcámara girada 180° con respecto a cómo se orientaría típicamente durante el uso con el dispositivo microfluídico.

5 La FIG. 9 ilustra la cámara de reacción 46 llena con la muestra de fluido y libre de burbujas de aire debido a la expulsión del aire de la cámara de reacción. Como se ilustra, el fluido se mantiene en la cámara de reacción 46 mediante la tensión superficial creada en la entrada 50 a la cámara de ventilación 48.

10 Como se ilustra en las FIGS. 10-11, un aumento en la presión del fluido dentro de la cámara de reacción 46 hace que la superficie libre 60 del fluido sobresalga a través de la entrada 50 hasta que la presión del fluido supera la tensión superficial y el fluido fluye hacia la cámara de ventilación 48. Como se ilustra en la FIG. 10, puede ser posible que una burbuja de aire quede atrapada dentro de la cámara de ventilación 48 dependiendo de dónde y con qué rapidez el fluido atraviese la estenosis. Sin embargo, no se espera que una burbuja de aire atrapada dentro de una porción de la cámara de ventilación afecte adversamente a la reacción que tiene lugar dentro de la cámara de reacción.

15 Las FIGS. 12-19 ilustran un ejemplo de una muestra de fluido que se introduce a través de un circuito microfluídico de un pocillo de un dispositivo microfluídico para someterse a una dPCR u otra técnica relacionada con la biología molecular.

20 La FIG. 12 es una ilustración esquemática de un pocillo de microplaca 22 con un circuito microfluídico 26 antes de la introducción de una muestra de fluido. El circuito microfluídico incluye catorce (14) grupos 26 de microcámaras 28 dispuestas en paralelo y cada grupo incluye trece (13) microcámaras acopladas de manera fluida en serie por un canal microfluídico. Un primer extremo 38 de cada canal microfluídico 30 está acoplado de manera fluida a un canal de entrada 42 y un segundo extremo 40 de cada canal microfluídico 30 está acoplado de manera fluida a un canal de salida 44. Una entrada de circuito 32 está acoplada al canal de entrada 42 y un respiradero de circuito 34 está acoplado al canal de salida 44.

25 La FIG. 13 es una vista lateral del pocillo de la FIG. 12 que ilustra la entrada de circuito y un grupo de microcámaras acopladas de manera fluida por un canal microfluídico.

Como se ilustra en las FIGS. 14A-14B, se suministra una muestra de fluido, tal como una mezcla de reacción de PCR, a la entrada de circuito 32. En una realización, puede usarse una pipeta para suministrar la mezcla de reacción de PCR a la entrada.

30 Como se ilustra en la FIG. 15, se aplica un sello de placa flexible 62 a la parte superior de la microplaca 22 y sobre cada pocillo 24 con la mezcla de reacción de PCR restante en la entrada de circuito 32. Posteriormente, la microplaca se coloca en un instrumento para realizar una técnica de dPCR en la mezcla. Por ejemplo, y sin limitación, la microplaca puede ser particularmente adecuada para su uso con el sistema de PCR digital CONSTELLATION disponible en Formulatrix de Bedford, MA.

35 Una vez colocada en el instrumento, la muestra de fluido se carga en cada microcámara 28 moviendo el fluido a través del circuito microfluídico 26 y expulsando el aire dentro del circuito desde el respiradero de circuito 34. Como se ilustra en las FIGS. 16A-16B, la muestra de fluido puede inyectarse en el circuito microfluídico 26 usando un pistón 64 u otro dispositivo adecuado que presiona el sello de placa 62 en la entrada de circuito 32 para crear un diferencial de presión entre la entrada de circuito y el respiradero de circuito causando que el fluido fluya a través del circuito microfluídico. Además del aire, el exceso de fluido dentro del circuito microfluídico puede salir a través del respiradero de circuito 34.

40 Con el circuito microfluídico lleno con la muestra de fluido, puede usarse un rodillo 66 para comprimir un sello inferior 68 de la microplaca, como se ilustra en las FIGS. 17A-17B, para bloquear los canales microfluídicos 30 y aislar las muestras de fluido retenidas por cada una de las microcámaras 28, como se ilustra en las FIGS. 18A-18B. Posteriormente, el instrumento puede termociclar la microplaca para exponer los reactivos dentro de cada microcámara a ciclos de calentamiento y enfriamiento repetidos, permitiendo así diferentes reacciones dependientes de la temperatura. Por ejemplo, y sin limitación, el termociclado de la microplaca puede dar como resultado una duplicación de un ADN diana con cada ciclo.

45 Como se ilustra en las FIGS. 19A-19B, las microcámaras 28a que contienen el ADN diana se vuelven fluorescentes. A continuación, el instrumento puede tomar imágenes de la microplaca para contar el número de microcámaras positivas.

50 Para los fines de esta solicitud de patente y de cualquier patente que se publique al respecto, los artículos indefinidos "un" y "una", como se emplean en esta memoria y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse como "al menos uno/una". La expresión "y/o", como se emplea en esta memoria y en las reivindicaciones, debe entenderse como "cualquiera o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes de manera conjunta en algunos casos y presentes de manera disyuntiva en otros casos. Varios elementos enumerados con "y/o" deben interpretarse de la misma manera, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos. Opcionalmente, pueden estar presentes otros elementos además de los elementos específicamente

identificados por la cláusula "y/o", ya estén relacionados o no con estos elementos específicamente identificados.

El uso de "que incluye", "que comprende", "que tiene", "que contiene", "que implica", y/o variaciones de los mismos en el presente documento, pretende abarcar los elementos enumerados a continuación y equivalentes de los mismos, así como elementos adicionales.

- 5 También debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluya más de una etapa o acto, el orden de los pasos o actos del método no se limita necesariamente al orden en que se mencionan las etapas o actos del método.

La descripción anterior de diversas realizaciones pretende ser meramente ilustrativa de las mismas, estando definido el alcance de la invención por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfluídico (20) para manipular una muestra de fluido que comprende:
 - al menos un pocillo microfluídico (24) configurado para recibir la muestra de fluido,
 - en donde el al menos un pocillo microfluídico (24) incluye una pluralidad de canales microfluídicos (30), cada canal microfluídico (30) acopla de manera fluida un grupo (36) de microcámaras (28), y en donde cada canal microfluídico (30) acopla de manera fluida el grupo (36) de microcámaras (28) en serie;
 - comprendiendo además el pocillo microfluídico (24)
 - una entrada primaria (32) acoplada de manera fluida a un canal microfluídico de entrada (42),
 - estando el canal microfluídico de entrada (42) acoplado de manera fluida a través de un extremo de entrada (38) a la pluralidad de canales microfluídico (30) dispuestos en paralelo que están acoplados de manera fluida a través de un extremo de salida (40) a un canal microfluídico de salida (44),
 - estando el canal microfluídico de salida (44) acoplado de manera fluida a un respiradero primario (34) configurado para expulsar el gas de la pluralidad de microcámaras (28),
 - incluyendo cada microcámara (28) una cámara de reacción (46) y una cámara de ventilación (48), estando la cámara de reacción (46) configurada para recibir la muestra de fluido del canal microfluídico (30) y acoplada de manera fluida a la cámara de ventilación (48) configurada para expulsar el gas de la cámara de reacción (46) a través del canal microfluídico (30) a medida que la muestra de fluido fluye hacia la cámara de reacción (46),
 - en donde la cámara de ventilación (48) está configurada para evitar inicialmente el flujo de la muestra de fluido desde la cámara de reacción (46) mientras permite el flujo de gas desde la cámara de reacción (46) a medida que la muestra de fluido fluye hacia la cámara de reacción (46), y
 - en donde la cámara de reacción (46) está acoplada de manera fluida a un primer segmento del canal microfluídico (30) y la cámara de ventilación (48) está acoplada de manera fluida a un segundo segmento del canal microfluídico (30), y
 - el primer segmento del canal microfluídico (30) acopla de manera fluida la cámara de reacción (46) a una primera microcámara (28) ubicada adyacente a la cámara de reacción (46), y
 - el segundo segmento del canal microfluídico (30) acopla de manera fluida la cámara de ventilación (48) a una segunda microcámara (28) ubicada adyacente a la cámara de ventilación (48).
2. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 1, en donde la cámara de ventilación (48) está configurada para liberar el flujo de la muestra de fluido de la cámara de reacción (46) cuando el gas se ha expulsado de la cámara de reacción (46).
3. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 1, en donde la cámara de ventilación (48) incluye una entrada (50) configurada para actuar como una válvula.
4. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 1, en donde la cámara de reacción (46) tiene un diámetro D y la cámara de ventilación (48) tiene una longitud L que se extiende en una dirección a lo largo de la pluralidad de canales microfluídicos (30) dispuestos en paralelo y un ancho A que se extiende en una dirección perpendicular a la longitud, en donde la relación de diámetro-ancho basada en el diámetro (D) de la cámara de reacción (46) en comparación con el ancho (A) de la cámara de ventilación (48) es $D/A > 2$, y la relación de longitud-ancho basada en la longitud (L) y el ancho (A) de la cámara de ventilación (48) es $L/A > 0,7$.
5. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 4, en donde la relación de longitud-ancho es $L/A > 0,8$.
6. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 5, en donde la relación de longitud-ancho es $L/A > 0,9$.
7. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 6, en donde la relación de longitud-ancho es $L/A > 1$.
8. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 4, en donde la cámara de reacción (46) tiene una profundidad d y una relación de profundidad-diámetro de $d/D < 2$.
9. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 8, en donde la relación de profundidad-diámetro d/D es aproximadamente 1,5.
10. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 4, en donde el diámetro D es < 600 pm.
11. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 10, en donde el diámetro D es al menos 60 pm.

12. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 1, en donde la cámara de reacción (46) tiene una profundidad d y el canal microfluídico (30) tiene una profundidad d_2 , y una relación d/d_2 de la profundidad de la cámara de reacción (46) con respecto a la profundidad del canal microfluídico (30) no es superior a 2: 1.

5 13. El dispositivo microfluídico (20) según la reivindicación 12, en donde la cámara de ventilación (48) tiene una profundidad que es al menos el 50 % de la profundidad de la cámara de reacción (46).

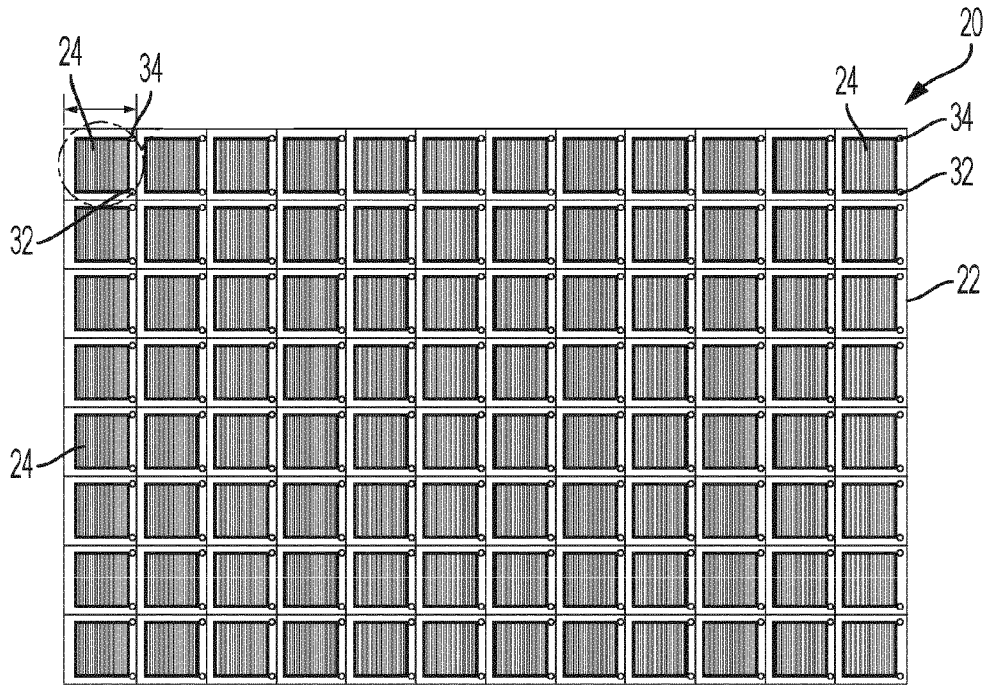


FIG. 1

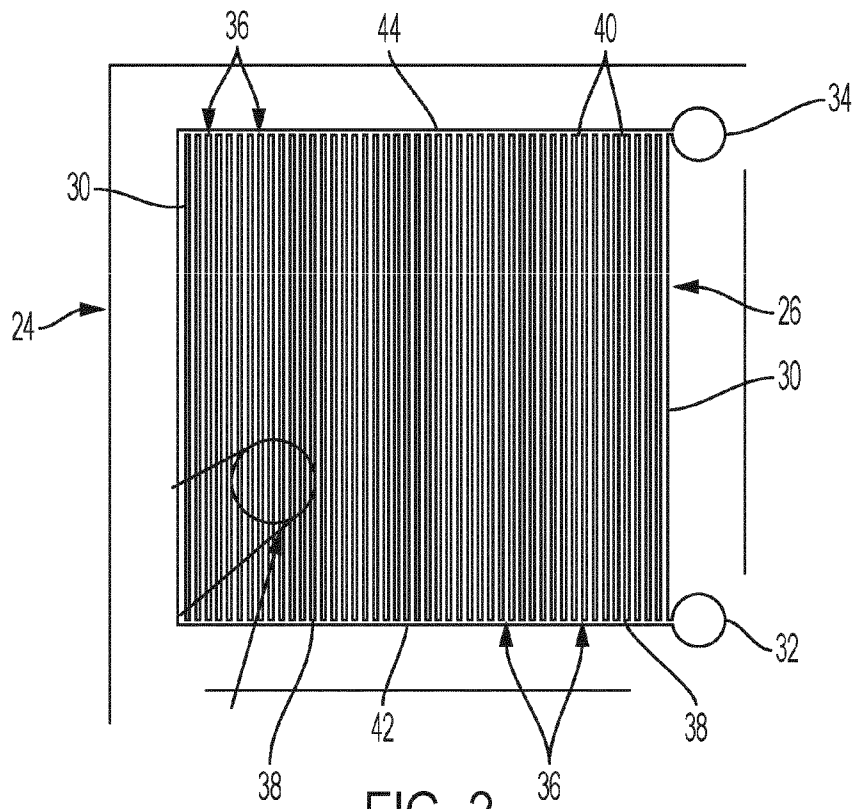


FIG. 2

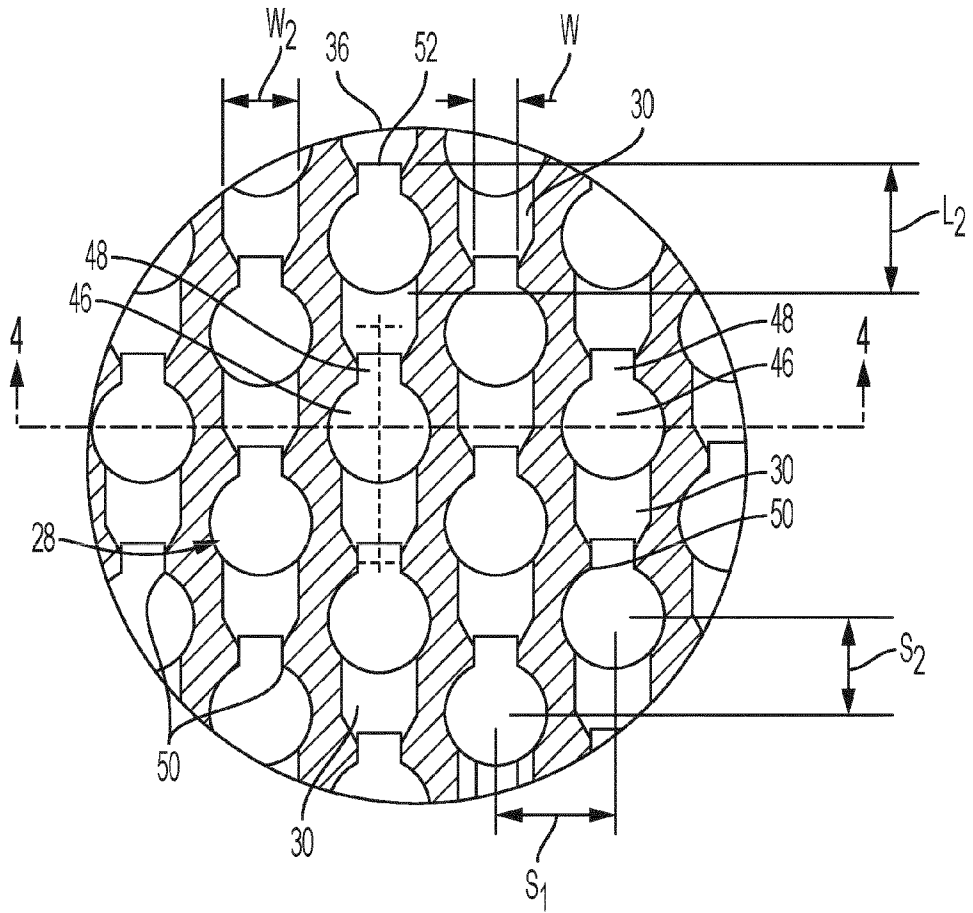


FIG. 3

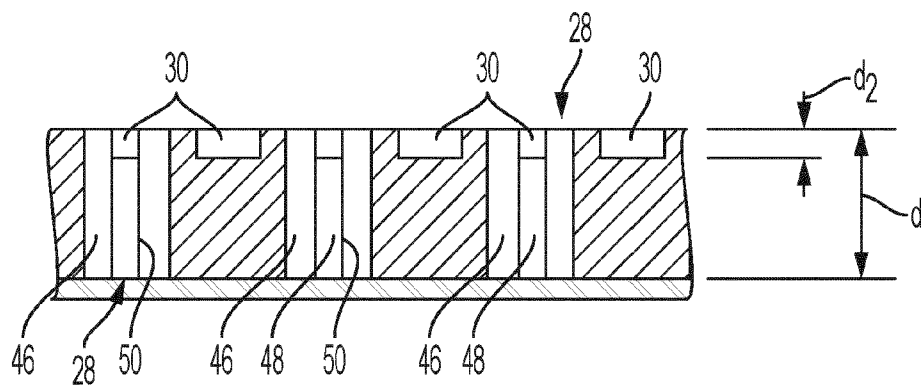


FIG. 4

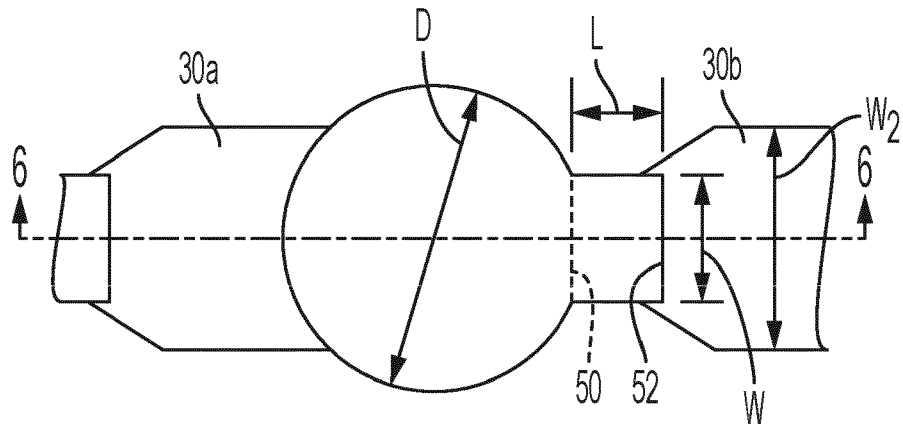


FIG. 5

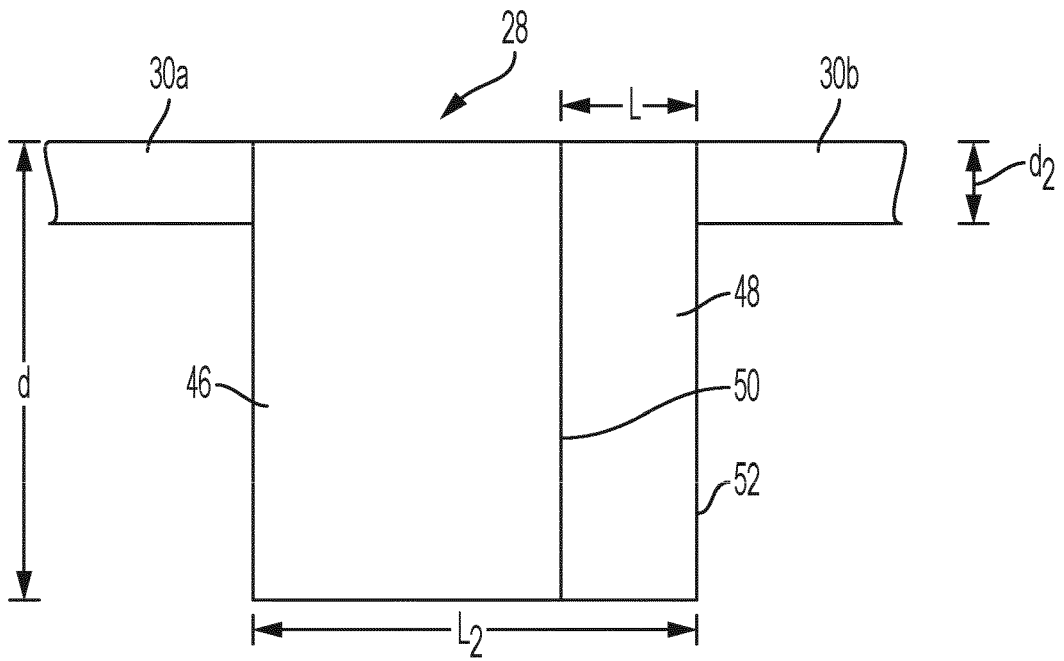


FIG. 6

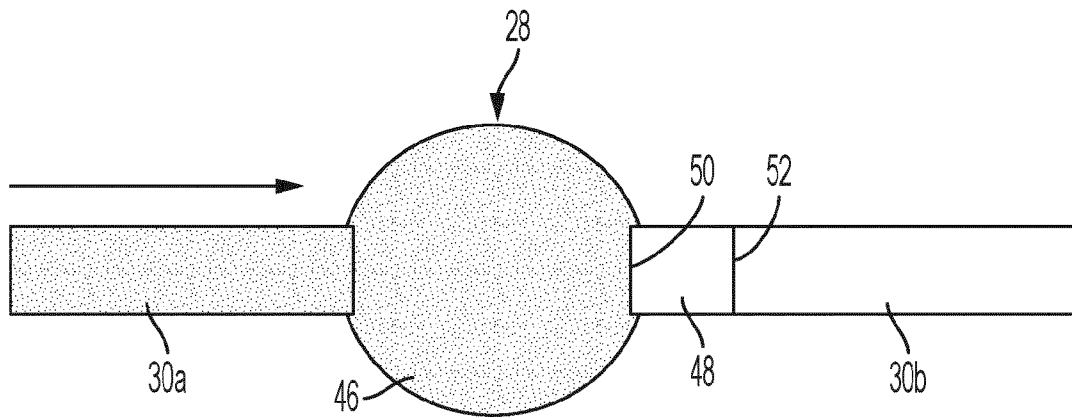


FIG. 7

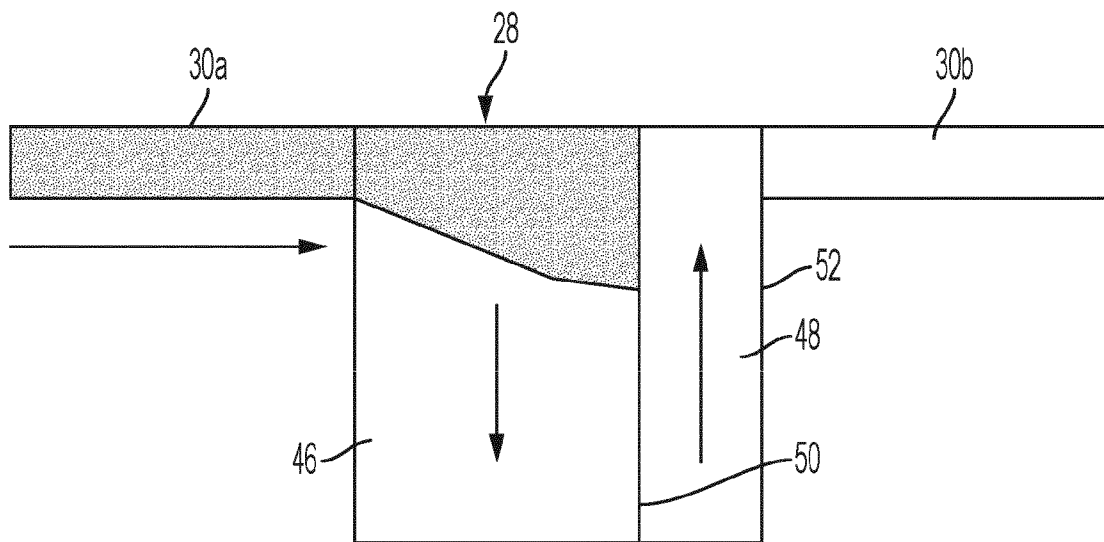


FIG. 8

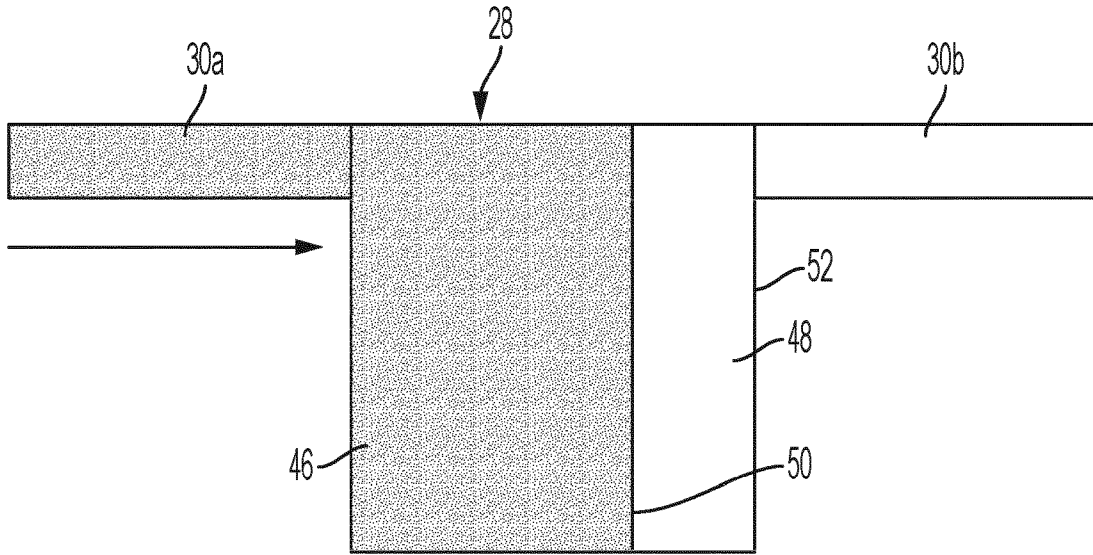


FIG. 9

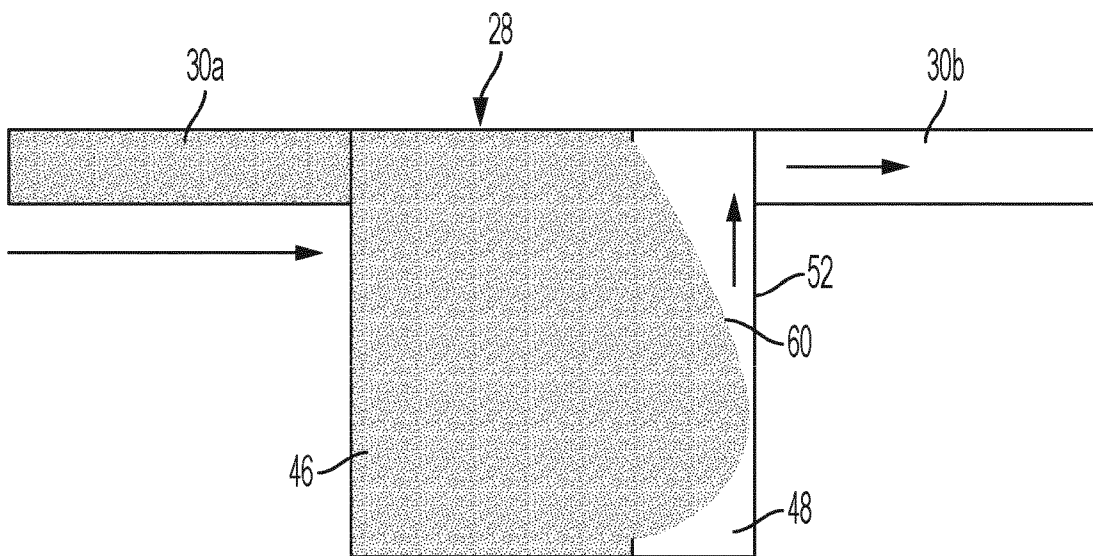
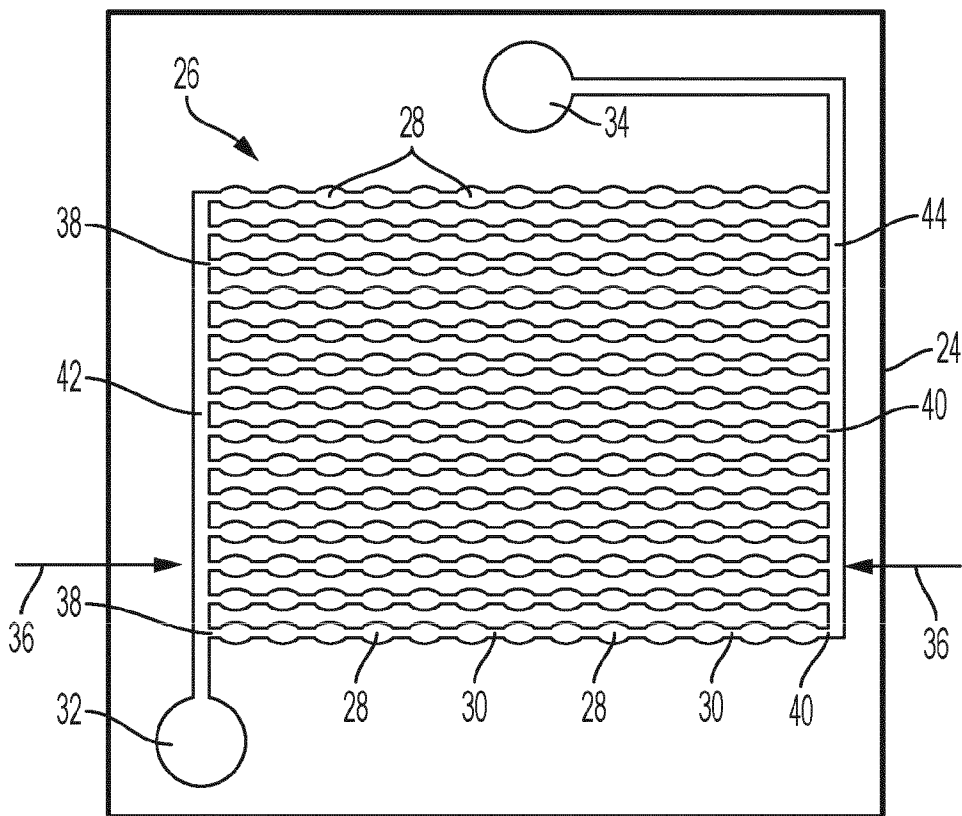
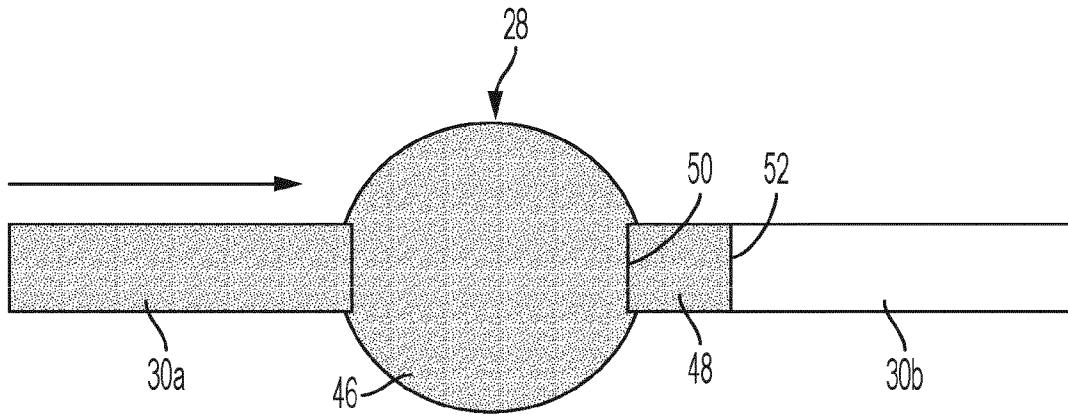


FIG. 10



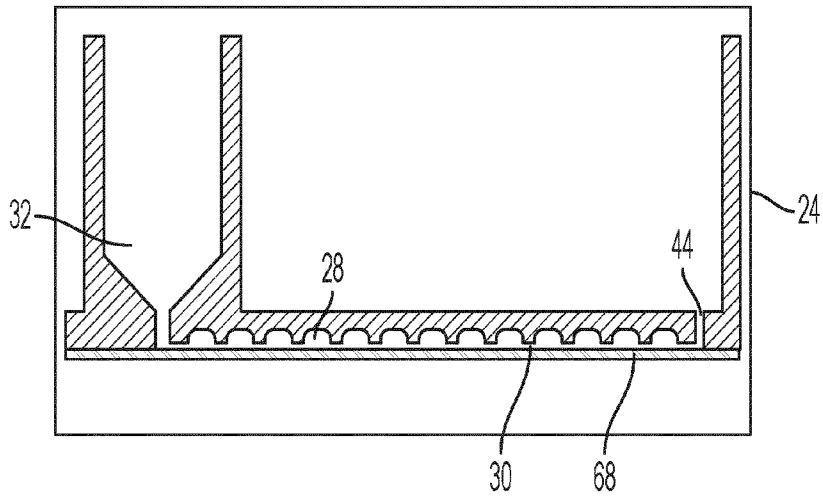


FIG. 13

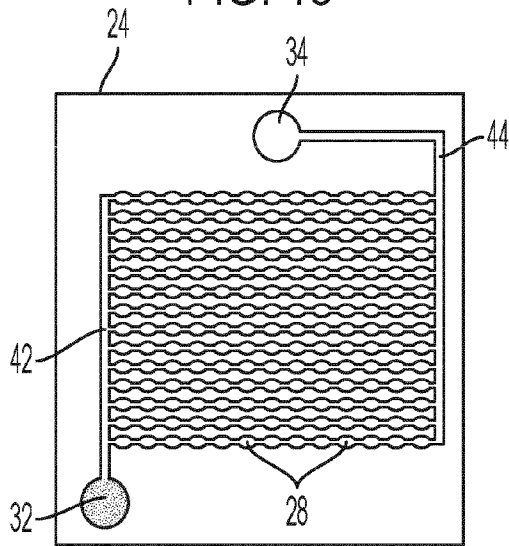


FIG. 14A

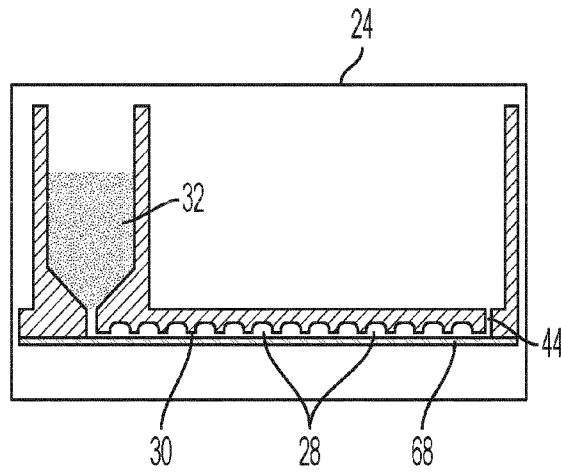


FIG. 14B

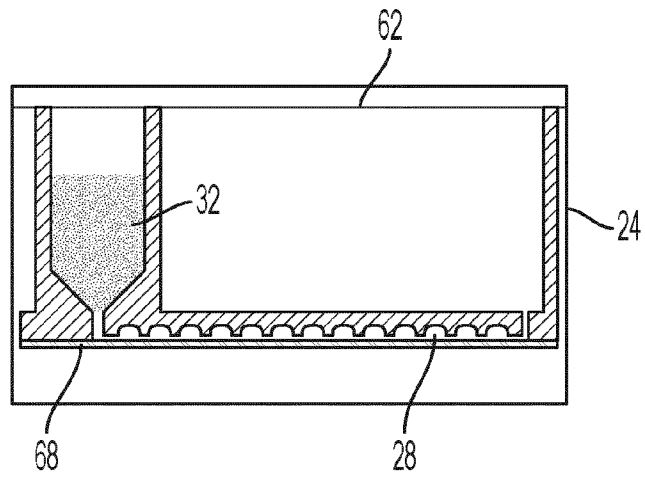


FIG. 15

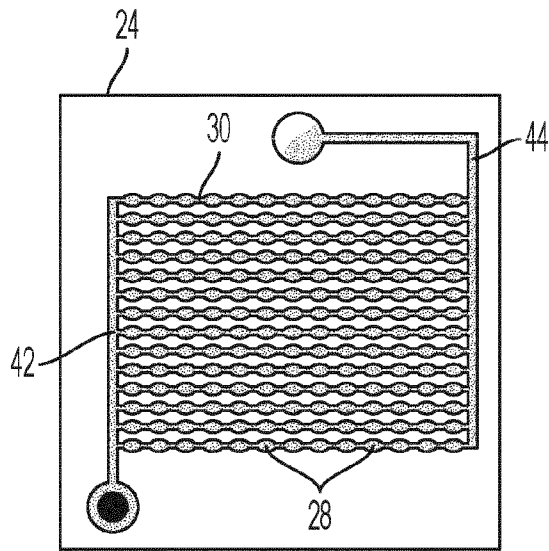


FIG. 16A

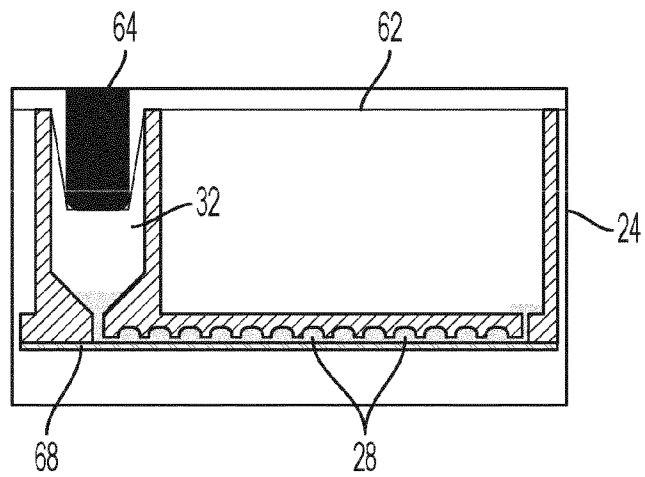


FIG. 16B

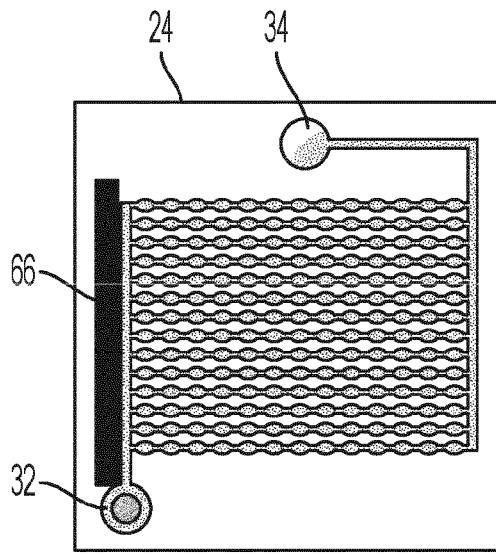


FIG. 17A

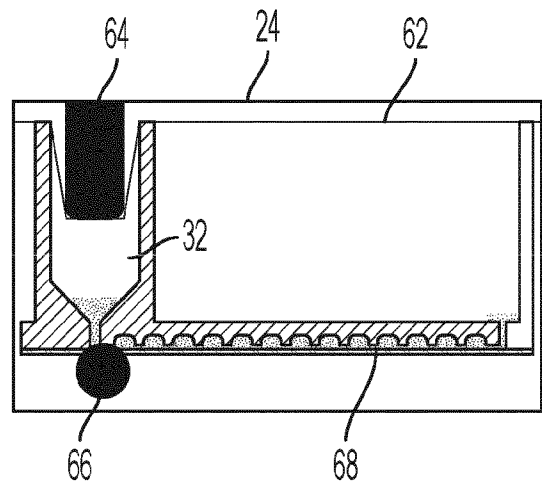


FIG. 17B

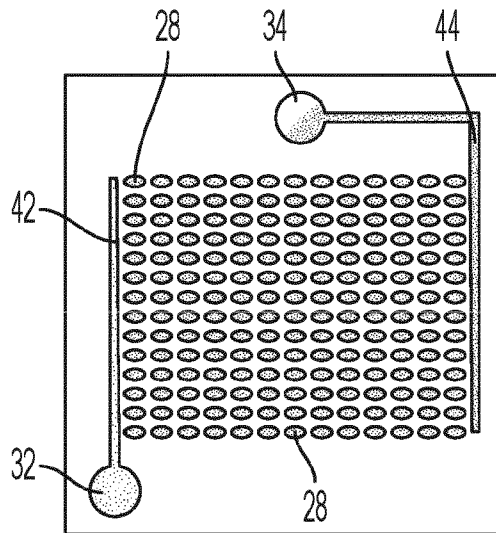


FIG. 18A

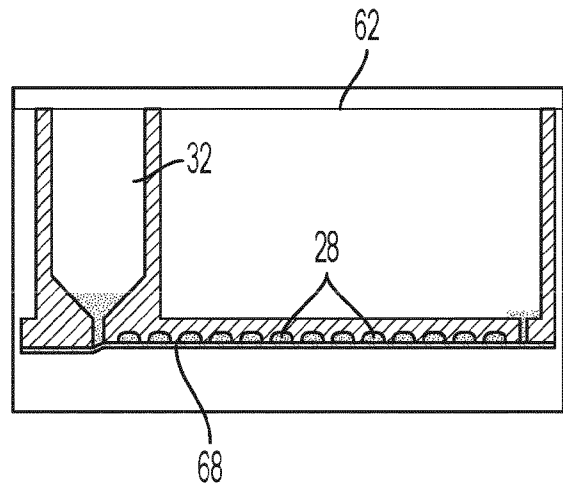


FIG. 18B

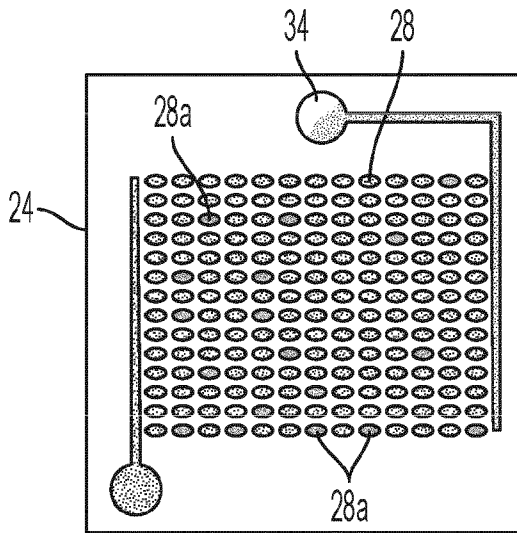


FIG. 19A

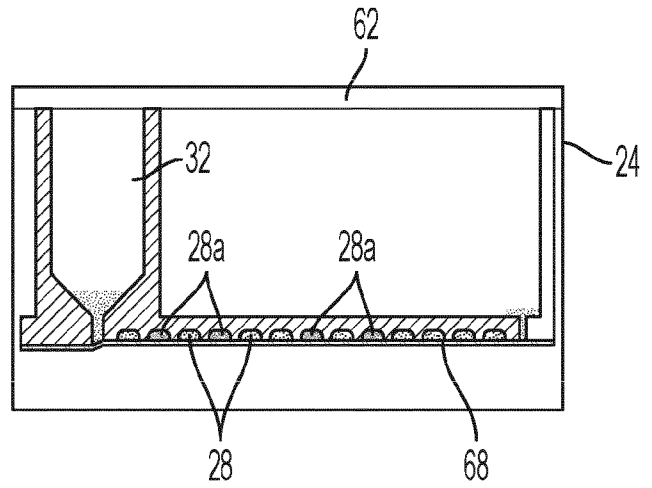


FIG. 19B