



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 022**

51 Int. Cl.:
B01J 19/00 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
C12M 1/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01118242 .5**
96 Fecha de presentación : **24.12.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1179585**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2002**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para lisis.**

30 Prioridad: **24.12.1997 US 998188**
14.07.1998 US 115454

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **Cepheid**
1190 Borregas Avenue
Sunnyvale, California 94089, US

72 Inventor/es: **Pourahmadi, Farzad;**
McMillian, William A.;
Ching, Jesus;
Chang, Ronald;
Christel, Lee A.;
Kovacs, Gregory T.;
Northrup, M. Allen y
Petersen, Kurt E.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 309 022 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 y procedimiento para lisis.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un cartucho para el procesado de una muestra fluida.

Antecedentes de la invención

10 El análisis de fluidos clínicos o medioambientales generalmente conlleva una serie de etapas de procesamiento químico, óptico, eléctrico, mecánico o térmico en las muestras de fluido. Si se incorporan en un instrumento con guía para mesa, un cartucho desechable o una combinación de los dos, dichos procesamientos conllevan montajes de fluidos complejos y el procesamiento de algoritmos.

15 Los instrumentos para el procesamiento biomédico contemporáneo generalmente son dispositivos complejos que operan con robótica y mueven bolos de líquidos automáticamente de una zona de procesamiento a otra. Generalmente, los cartuchos también se han utilizado para procesar una muestra de fluido, tal como un fluido tapón o bolos, moviendo una pequeña cantidad de la muestra de una zona a otra, donde otro proceso se lleva a cabo. Por ejemplo, Anderson *et. al.* describen un dispositivo para el procesamiento de muestras en un artículo titulado "Microfluidic Biochemical Analysis System", Transducers'97, 1997 Conferencia Internacional sobre Sensores y Actuadores en estado sólido, Chicago, Junio 16-19, 1997, pág. 477-480.

25 En muchos procesos analíticos deben analizarse relativamente grandes volúmenes de líquido (desde microlitros hasta mililitros). Utilizando la propuesta de bolos, dichos volúmenes deben mantenerse en un contenedor mientras cada operación se realiza. Mientras la propuesta de bolos tiene en cuenta la implementación de métodos de procesamiento complejos, el volumen de la muestra de fluido que puede procesarse está limitado por el tamaño de las zonas individuales de procesamiento, esencialmente donde la muestra se procesa transitoriamente. Así, la concentración de analito detectable más pequeña, es decir, la sensibilidad, en cualquier ensayo basado en una propuesta de bolos también está limitada.

30 Si el contenedor se ha fabricado con tecnologías de chips de circuito integrado (chips microfluidicos), el chip microfabricado debe ser muy grande para acomodar los volúmenes relativamente grandes necesarios para detectar una baja concentración de analito. Por ejemplo, para un volumen de 100 microlitros, es necesario un chip de por lo menos 1 cm de lado para cada zona de procesamiento de bolos. Dicho chip grande no sólo es caro, sino que también fracasará el objetivo de miniaturización, especialmente para muchos tipos de usos de diagnóstico medioambiental o médico desechables.

40 La tecnología microfluidica de hoy en día se ha centrado en volúmenes de fluidos picolitros, nanolitros y microlitros. Estos volúmenes pequeños no son prácticos para muchas aplicaciones de diagnóstico realistas. Tal y como se muestra en la Figura 1, el intervalo completo de concentraciones de productos químicos que uno puede desear detectar en muestras biológicas abarca por lo menos 20 órdenes de magnitud (desde 6 copias/ml a 6×10^{20} copias/ml). Por lo tanto, un cartucho para detectar el intervalo completo de analitos potenciales (especialmente ADN que existe en concentraciones muy bajas en la mayoría de muestras biológicas) debe ser capaz de procesar grandes así como pequeños volúmenes de muestras.

55 Es de especial interés la detección de concentraciones de pequeñas copias de analitos tal como ADN, en cuyo caso se requieren grandes volúmenes de muestra. Por ejemplo, la concentración detectable mínima teórica para ensayos de sonda de ADN requiere tamaños de muestra grandes, tales como aproximadamente 10^{-4} litros o más. En la detección de enfermedades infecciosas, las bacterias gram-negativas pueden estar presentes en menos de 10 copias por mililitro de sangre, el criptosporidium generalmente aparece sólo en pequeñas copias por galón de agua de beber, los agentes bioterroristas concentrados, por ejemplo, ántrax, a menos de 100 copias por mililitro de agua y los agentes de intoxicación alimentaria, tal como la *E. coli* y salmonela, pueden manifestarse en menos de 10 copias por gramo de alimento.

60 Así, los volúmenes de muestra necesarios para detectar dichos analitos de enfermedades infecciosas deberían ser mayores que los necesarios para la detección de los analitos presentes en concentraciones superiores como en la mayoría de ensayos clínicos e inmunoquímicos. Además, en el caso de analitos más concentrados, tales como los de inmunoensayos y ensayos químicos clínicos, una muestra de gran volumen proporciona más opciones de selección de medios de detección menos sensibles, así como la facilidad de dividir la muestra y detectar múltiples analitos. Por otro lado, a pesar del mérito de volúmenes de grandes muestras, de forma general es reconocido que las funciones únicas pueden realizarse con estructuras microfluidas, que generalmente no son compatibles con grandes volúmenes.

65 Históricamente, la etapa de lisis en el procesamiento de muestras ha requerido mucho tiempo y ha dificultado el trabajo especialmente para esporas y determinadas estructuras celulares. La patente US5374522 describe un procedimiento para la interrupción de células en soluciones o suspensiones con perlas en el medio, sometiendo las soluciones o suspensiones a radiación ultrasónica. A la inversa, DE 4034036 describe un procedimiento de lisis que conlleva la inmovilización de células en una matriz sometiendo las células inmovilizadas a ultrasonidos.

Descripción resumida

La presente invención, en uno de sus aspectos, proporciona un cartucho tal y como se ha especificado en la reivindicación 1 y un dispositivo tal y como se ha especificado en la reivindicación 4, mientras en otro de sus aspectos la presente invención proporciona un procedimiento tal y como se ha especificado en la reivindicación 6. En una realización preferida de la invención, la invención proporciona un dispositivo para la separación de un analito deseado de una muestra de fluido y para la concentración del analito en un volumen de fluido de elución más pequeño que el volumen de la muestra original. El analito deseado puede comprender, por ejemplo, organismos, células, proteínas, ácido nucleico, carbohidratos, partículas de virus, bacterias, productos químicos o bioquímicos. En una utilización preferida, el analito deseado comprende ácido nucleico.

El dispositivo comprende un cartucho que tiene formado en su interior un orificio de entrada para la introducción de la muestra en el cartucho y una trayectoria para fluir la mezcla que se extiende desde el orificio de entrada a través del cuerpo del cartucho.

En una realización preferida de funcionamiento, el cartucho se utiliza para separar ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, desde una muestra de fluido y para concentrar el ácido nucleico en un volumen más pequeño de fluido de elución. La trayectoria de flujo de la muestra formada en el cartucho incluye una cámara de lisis, para someter a una lisis células, esporas o microorganismos en la muestra de fluido. Preferiblemente, un transductor ultrasónico, tal como un brazo ultrasónico, se acopla al cartucho para la transferencia de energía ultrasónica a la muestra de fluido en la cámara de lisis, realizándose de esta manera la lisis de las células, esporas o microorganismos. De forma adicional, la cámara de lisis incluye perlas para la rotura de las células, esporas o microorganismos a medida que se aplica la energía ultrasónica. La cámara de lisis contiene filtros o membranas para capturar las células, esporas o microorganismos a medida que la muestra fluye a través de la cámara. La lisis se completa aplicando energía ultrasónica a las células, esporas o microorganismos capturados en la fase sólida. La energía ultrasónica puede suministrarse a partir de, por ejemplo, un brazo ultrasónico acoplado a una pared de la cámara de lisis. El cartucho puede también contener o estar acoplado a un elemento de calentamiento en contacto térmico con la cámara de lisis. El cartucho también puede contener o estar acoplado a un elemento de calentamiento en contacto térmico con la cámara de lisis para el calentamiento de la muestra de fluido cuando se aplica la energía ultrasónica. La trayectoria de flujo de la muestra incluye una zona de captura del analito que tiene por lo menos un componente a través del flujo para capturar el analito deseado de la muestra.

Preferiblemente, el componente que actúa a través del flujo es un chip microfabricado que tiene una cámara con microestructuras internas formadas. Las microestructuras tienen suficientemente área elevada de superficie y afinidad de unión con el analito deseado para capturar el analito a medida que la muestra fluye a través del chip. Preferiblemente, las microestructuras comprenden un disposición de columnas íntegramente formadas con por lo menos una pared de la cámara y se extiende hacia la cámara. En una realización alternativa, el componente de flujo comprende un canal o cámara en el cartucho que contiene por lo menos un soporte sólido para capturar el analito. Soportes sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, filtros, perlas, fibras, membranas, lana de vidrio, papel de filtro, polímeros y geles.

En el cartucho también se ha formado una trayectoria de flujo para llevar a cabo la elución del fluido. La trayectoria de flujo para elución pasa a través del componente de flujo, liberando de esta forma el analito capturado desde el componente hasta el fluido de elución. La trayectoria de flujo para elución diverge de la trayectoria de flujo de la muestra después de pasar a través del componente. En la realización preferida, el cartucho también incluye o puede estar acoplado a un elemento de calentamiento para calentar el componente, aumentado de esta manera la eficacia de elución.

El cartucho también incluye por lo menos un controlador de flujo, por ejemplo, una o más válvulas, desviadores de flujo o diodos de flujo para dirigir la muestra de fluido hacia una certificación de flujo de la muestra después de que la muestra fluya a través del componente de captura y para dirigir el fluido de elución y el analito eluido dentro de la trayectoria de flujo de elución después de que el fluido de elución fluya a través del componente de captura. En una realización preferida, el cartucho incluye además una cámara de residuos al final de la trayectoria de flujo de la muestra para recoger la muestra de fluido restante y una segunda cámara al final de la trayectoria de flujo de elución para recibir el analito eluido. Alternativamente, la segunda cámara puede ser una cámara de reacción formada en un recipiente de reacción separado y acoplado al cartucho para recibir el analito eluido destinado a otro proceso.

Contrariamente a los cartuchos para fluidos del estado de la técnica que procesan una muestra de fluido, tal como un bolo, el cartucho de flujo continuo de la presente invención permite el procesado rápido de una muestra fluida que es mayor en volumen que cualquier zona interactiva dentro del cartucho. La capacidad de procesamiento de volúmenes de muestra mayores permite aumentar la sensibilidad en la detección de concentraciones de bajas copias de analitos, tales como el ácido nucleico.

En otra realización del cartucho, la cámara de lisis se sitúa aguas arriba de la zona de captura, y el cartucho incluye además una cámara de reactivo en comunicación fluida con la cámara de lisis para contener un reactivo para la lisis. En esta realización, se proporciona también una fuente para el movimiento del fluido, tal como una bomba, para forzar el flujo del reactivo para la lisis hacia la cámara para lisis para el contacto con la muestra. Los reactivos para lisis pueden también utilizarse en combinación con las realizaciones de lisis ultrasónica descritas más arriba.

En una realización preferida, la invención también proporciona un instrumento externo para la recepción de uno o más cartuchos. El instrumento externo incluye una fuente de movimiento del fluido, por ejemplo, una o más bombas, fuentes de presión o de vacío, que conectan con una o más puertas o salidas de aire formadas en el cartucho para forzar que la muestra fluya a través del cartucho. Ya bien sea el instrumento o el cartucho pueden contener componentes electrónicos de procesamiento, por ejemplo, uno o más microprocesadores, microcontroladores o chips de memoria para el control del funcionamiento del cartucho.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico de la concentración de analito (número de copias) respecto el volumen de la muestra que muestra el volumen mínimo requerido para la detección con seguridad estadística del analito.

La Figura 2 es una vista en planta esquemática de un cartucho para el procesamiento de una muestra de fluido.

La Figura 3 es una vista en perspectiva de un instrumento que aloja distintos cartuchos para el procesamiento.

La Figura 4 es una vista despiezada de un diodo de fluido para prevención de reflujos.

La Figura 5A es una vista en planta esquemática de una bomba electrolítica.

La Figura 5B es una vista lateral esquemática de la bomba de la Figura 5A.

La Figura 6 es una vista parcialmente despiezada de otro cartucho que muestra un plato en la parte inferior, zonas interactivas, canales de conexión, circuitos flexibles, envolturas para fluidos y un plato superior con un orificio de entrada del fluido.

La Figura 7 es una vista en sección de una zona del cartucho de la Figura 6 que contiene papel de filtro para la captura del analito.

La Figura 8 es una vista esquemática de una zona con desviador de flujo del cartucho de la Figura 6.

La Figura 9 es una vista lateral esquemática de un brazo ultrasónico acoplado a un cartucho para la lisis de componentes de una muestra.

La Figura 10 es una vista lateral esquemática de un transductor ultrasónico acoplado a un cartucho que contiene perlas para la lisis de los componentes de una muestra según una realización de la invención.

Descripción detallada de la invención

Las realizaciones de la presente invención proporcionan un cartucho para realizar distintas operaciones en una muestra de fluido a medida que la muestra fluye a través de una serie de zonas interactivas intercomunicadas dentro del cartucho. Las zonas se sitúan secuencialmente a lo largo de una trayectoria de flujo de fluido a través del cartucho, de manera que un parte de la corriente del fluido está expuesta a una operación específica en una zona, después a otra operación en la siguiente zona, etc. La muestra fluye a través de las zonas interactivas de manera que está simultáneamente en contacto con más de una zona a un tiempo dado. Preferiblemente, el flujo de la muestra es continuo, de manera que las operaciones en cada zona tienen lugar simultáneamente y secuencialmente en la corriente de fluido.

Los cartuchos de las realizaciones de la presente invención tienen en cuenta un procesamiento significativamente mejorado de una muestra de fluido para la detección y/o análisis de componentes químicos en la muestra, tales como moléculas biológicas. Una mejora pionera respecto el estado de la técnica es la capacidad de procesar rápidamente una muestra de fluido que es mayor en volumen que cualquier zona interactiva dentro del cartucho, permitiendo de esta manera una sensibilidad incrementada en la detección de concentraciones de pocas copias de analito, tales como el ácido nucleico. Los cartuchos también pueden diseñarse para llevar a cabo los procesos de manera automática, tales como la mezcla de reactivos con la muestra de fluido, lisis, filtración e introducción de la mezcla dentro de la cámara de reacción o recipiente de reacción separado apropiados para procesos adicionales, por ejemplo, la detección o amplificación del analito.

Puesto que las operaciones en la muestra de fluido se realizan en la corriente de la muestra a medida que ésta fluye a través de las distintas zonas del cartucho, cualquier chip de procesado microfluídico incorporado u otro componente puede ser muy pequeño, tanto como cien veces más pequeño que con la propuesta orientada a los bolos. Esto permite que la facilidad completa del procesamiento sea pequeña (por ejemplo, 0,1 a 10 ml), y así tener la ventaja de las propiedades únicas de chips microfluidicos muy pequeños u otros componentes de procesado de fluidos.

En una realización preferida, la invención proporciona un dispositivo para la separación de un analito deseado de una muestra de fluido y para la concentración del analito en un volumen de fluido de elución más pequeño que el volumen de la muestra original. El analito deseado puede comprender, por ejemplo, organismos, células, proteínas, ácido nucleico, carbohidratos, partículas de virus, bacterias, productos químicos o bioquímicos. En una utilización preferida, el analito deseado comprende ácido nucleico.

ES 2 309 022 T3

Tal y como se ha utilizado aquí, el término “ácido nucleico” se refiere a cualquier ácido nucleico sintético o que tiene lugar de forma natural, tal como ADN o ARN, en cualquier configuración, es decir, en forma de ácido nucleico de doble cadena, ácido nucleico de cadena simple o cualquier combinación de los mismos. Tal y como se ha utilizado aquí, el término “muestra de fluido” incluye tanto gases como líquidos, preferiblemente el último. La muestra de fluido puede ser una solución acuosa que contiene partículas, células, microorganismos, iones o moléculas grandes o pequeñas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, etc. En una utilización particular, la muestra de fluido puede ser un fluido corporal, por ejemplo, sangre u orina, o una suspensión tal como sangre pulverizada. La muestra de fluido puede estar pretratada, por ejemplo, mezclada con productos químicos, centrifugada, comprimida, etc., o la muestra de fluido puede estar en forma cruda.

La Figura 2 muestra un cartucho 101 que no forma parte del alcance de las reivindicaciones. El cartucho se ha diseñado para procesar una muestra de fluido y para amplificar ácidos nucleicos, tales como por reacción en cadena polimerasa (PCR). El cartucho 101 incluye un orificio de muestra 103 para la introducción de una muestra de fluido en un cartucho y una trayectoria de flujo de la muestra que se extiende desde el orificio 103 dentro del cuerpo del cartucho.

La trayectoria de flujo de la muestra incluye un canal 105 principal desde el orificio de la muestra 103 hasta una cámara de mezclado 107 para la mezcla de la muestra con los reactivos de lisis. La trayectoria de flujo de la muestra también incluye una cámara de lisis 119 donde la muestra contacta un filtro para capturar los componentes, por ejemplo, células, esporas o microorganismos en la muestra. Los componentes capturados se someten a lisis en la cámara 119. La trayectoria de flujo de la muestra incluye un componente a través del flujo 122 para capturar un analito deseado, por ejemplo, ácido nucleico, desde la muestra a medida que la muestra fluye a través del componente 122.

Preferiblemente, el componente a través del flujo 122 es un chip microfabricado que tiene una cámara con microestructuras internas formadas allí. Las microestructuras tienen área de superficie suficientemente grande y la afinidad de unión con el analito deseado para capturar el analito a medida que la muestra fluye a través del chip. Preferiblemente, las microestructuras comprenden una serie de columnas íntegramente formadas con por lo menos una pared de la cámara y se extienden hacia la cámara. Se describen distintas realizaciones del chip microfabricado en detalle a continuación con referencia a las Figuras 6-14.

En una realización alternativa, el componente a través del flujo 122 comprende un canal o cámara formada en el cartucho. El canal o cámara contiene por lo menos un soporte sólido para capturar el analito deseado desde la muestra de fluido a medida que la muestra fluye a través del soporte sólido. Los soportes sólidos adecuados incluyen filtros, perlas, fibras, membranas, lana de vidrio, papel de filtro, polímeros y geles.

La trayectoria de flujo de la muestra incluye un canal 135 principal para fluir los controladores 41A y 41B, y un canal 136 principal para una cámara de residuos con salidas de aire 139. Los controladores de flujo 41A y 41B están dispuestos para dirigir la muestra hacia la cámara de residuos 139 después de fluir la muestra a través del componente de captura 122. Los controladores de flujo 41A y 41B pueden ser, por ejemplo, válvulas, desviadores o diodos de fluidos.

En el cartucho 101 también existe una trayectoria de flujo para llevar a cabo el fluido de elución. En una realización preferida, el cartucho incluye una cámara de almacenaje 127 para el almacenamiento del fluido de elución. La trayectoria de flujo de elución se extiende desde la cámara 127 a través de un canal 131 y pasa a través del componente de flujo 122, de manera que tiene lugar la liberación del analito capturado desde el componente hasta el fluido de elución. En una realización alternativa, el cartucho incluye un orificio de entrada separado, en lugar de o además de la cámara de almacenaje 127, para la introducción del fluido de elución dentro del cartucho desde una fuente externa.

La trayectoria de flujo de elución diverge desde la trayectoria de flujo de la muestra después de pasar a través del componente 122. En este ejemplo, la trayectoria de flujo de elución sigue el canal 135 hacia los controladores de flujo 41A y 41B. Los controladores de flujo 41A y 41B están dispuestos para dirigir el fluido de elución y el analito eluido dentro de una cámara de reactivo 141 que contiene reactivos PCR. La cámara de reactivo 141 está en comunicación fluida con una cámara de reacción 143 para la amplificación PCR.

La cámara de reacción 143 puede ser una cámara formada en el cartucho 101. Alternativamente, la cámara de reacción 143 puede formarse en un recipiente de reacción separado diseñado para estar acoplado al cartucho para recibir el analito eluido. Los recipientes de reacción adecuados para este propósito se encuentran descritos en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US98/03962 presentada el 2 de Marzo de 1998 y titulada “Heat Exchanging, Optically Interrogated Chemical Reaction Assembly”.

La solicitud también describe una camisa térmica para la recepción y el ciclo térmico de la cámara de reacción. Por esta razón, es ventajoso para la cámara de reacción sobresalir del resto del cuerpo del cartucho para facilitar la inserción de la cámara de reacción dentro de la camisa térmica.

El cartucho 101 también incluye una cámara de almacenaje 109 para almacenar un reactivo de lisis y una cámara de almacenaje 125 para almacenar un reactivo de lavado. El cartucho 101 además incluye controladores de flujo 123, tales como válvulas o diodos de fluido, para el control del flujo del fluido a través del cartucho. Preferiblemente, el cartucho 101 también incluye sensores resistivos 115 para detectar la presencia de fluido en las distintas zonas y canales.

ES 2 309 022 T3

Con referencia a la Figura 3, preferiblemente, el cartucho 101 se utiliza en combinación con un portátil, es decir, un terminal portátil de mano o un terminal de pupitre, instrumento externo 211 diseñado para aceptar uno o más cartuchos 101. La conexión entre los cartuchos 101 disponible y el instrumento externo 211 se realiza preferiblemente mediante una sección delgada tipo tarjeta del cartucho 101, y un conector de acoplamiento dentro del instrumento 211. Este tipo de conexión es similar a los conectores con ficha de tarjeta estándares utilizados en paneles de circuitos impresos en, por ejemplo, ordenadores personales o porta-fichas.

Tal y como se muestra en la Figura 2, los dedos estrechos 151 de material conductor sobre la tarjeta o sobre la lámina entran en contacto con los conectores de oro en el instrumento a medida que el cartucho 101 se inserta para su procesamiento. Pueden realizarse muchas conexiones con una pequeña anchura del cartucho en esta configuración. En el caso del cartucho, la tarjeta puede ser una sección delgada de plástico moldeado u hoja sobre la cual se han depositado materiales conductores.

Las conexiones eléctricas también pueden utilizarse para transferir información hacia y desde la memoria almacenada y/o inteligencia sobre el cartucho 101. Por ejemplo, una memoria o chip microprocesador puede incorporarse como parte del cartucho. Preferiblemente, este chip contiene información del tipo de cartucho, información del programa tal como los protocolos específicos para el procesado del cartucho, las tolerancias para aceptar y descartar números de serie y códigos de lotes para el seguimiento de calidad y previsiones para el almacenaje de los resultados del proceso.

La memoria electrónica integrada en el cartucho 101 tiene en cuenta la rápida, fácil y sin error puesta en funcionamiento del instrumento 211 para los distintos protocolos de procesado fluido. Cuando un cartucho se inserta en el instrumento, el instrumento puede electrónicamente dirigir la memoria en el cartucho y de esta manera recibir automáticamente el juego de instrucciones apropiadas para el control de la secuencia del tiempo de las operaciones con fluidos llevados a cabo dentro del cartucho insertado. El instrumento 211 puede simplemente y secuencialmente recuperar y ejecutar cada etapa en la memoria del cartucho o descargar su contenido de manera que el usuario puede editar la secuencia utilizando, por ejemplo, un teclado 213.

Si la memoria adecuada se incluye en el cartucho, tal como una memoria gravable (por ejemplo, ROM borrable programable (EPROM), ROM programable y borrable eléctricamente (EEPROM)), etc., resultados intermedios y finales, basados en la muestra introducida en el cartucho podrían escribirse mediante el instrumento dentro de la memoria del cartucho para el almacenaje colocado en la misma posición con la muestra física después del procesado. Esto es especialmente ventajoso en aplicaciones donde es necesaria la obtención de muestras y resultados, como forenses.

Además, puede almacenarse otra información en la memoria del cartucho, en formas inalterables (o alterables). Por ejemplo, el número de serie del cartucho, información sobre el lote de fabricación e información relacionada podría pre-programarse y ser inalterable. Los datos de usuario, número de identificación del técnico, fecha del ensayo, sitio de ensayo y número de serie del instrumento podría escribirse inalterablemente dentro del cartucho. Esto tiene en cuenta la identificación fácil de la "cadena de custodia" en el manejo de un espécimen. Los ingenieros expertos en la técnica del almacenaje de los datos reconocerán que otros medios de memoria pueden utilizarse, tales como zonas de impresión dirigidas ópticamente (por ejemplo, impresoras térmicas o de chorro de tinta), tiras magnéticas, etc.

Una fuente eléctrica puede ser suministrada al cartucho 101 desde un instrumento externo 211. Alternativamente, en lugar de fabricar el instrumento más voluminoso y más pesado mediante la adición de baterías para acomodar las necesidades de energía de los múltiples cartuchos utilizados secuencialmente para procesar muchas muestras, la fuente de energía para cada cartucho puede incluirse en el cartucho, suficiente para alimentar al instrumento y al cartucho.

Preferiblemente, el instrumento 211 incluye componentes electrónicos de proceso, por ejemplo, uno o más microprocesadores, multiplexores, circuitos de control de energía y circuitos sensores para el control de la operación del cartucho 101. Los componentes electrónicos de proceso están conectado por los dedos de contacto 151 y los conductores eléctricos 147 a varias zonas, áreas de almacenaje, bombas, sensores y canales del cartucho 101. Alternativamente, pueden haber otras uniones de datos del cartucho al instrumento, tales como uniones de radio frecuencia o infrarrojos. Aunque los componentes electrónicos están físicamente situados en el instrumento externo 211 en la realización preferida, se entiende que los componentes electrónicos de proceso pueden también estar situados en el cartucho 101.

Ambas fuentes de movimiento del fluido, externas e internas, son adecuadas para la utilización en los cartuchos descritos aquí. La fuente de movimiento del fluido puede estar contenida dentro o sobre el cartucho 101 o puede ser externa al cartucho, por ejemplo, incluida en el instrumento externo 211 dentro del cual el cartucho 101 se inserta para el procesado. Un tipo de fuente de movimiento del fluido descrita en esta descripción es una bomba electrolítica (e-bomba) situada dentro del cartucho 101. El fluido dentro de un estuche sellado se descompone en elementos gaseosos mediante una corriente eléctrica, ejerciendo presión y expandiendo de esta manera el estuche. Este estuche de bombeo sellado o e-bomba se sitúa contra un estuche de reactivo y se fuerza el contenido del estuche de reactivo hacia el circuito fluido a medida que el estuche de bombeo se expande.

Pueden también utilizarse otros tipos de fuentes de movimiento del fluido con los cartuchos de la presente invención. Por ejemplo, puede utilizarse un motor de velocidad gradual o un solenoide para proporcionar una fuerza y presión contra un estuche de reactivo dentro del cartucho, forzando de esta manera los contenidos del estuche de reactivo hacia el circuito fluido. Alternativamente, un resorte mecánico situado bien sea dentro del cartucho bien sea

ES 2 309 022 T3

dentro del instrumento externo puede proporcionar la fuente de movimiento para ejercer presión sobre el estuche de reactivo y forzar al reactivo a entrar en el circuito de fluidos. La energía mecánica almacenada en el resorte puede bien construirse dentro del cartucho durante la fabricación o bien generarse durante la inserción del cartucho dentro del instrumento (es decir, armamento del resorte durante la inserción manual del cartucho).

5

Otras fuentes de movimiento del fluido potenciales incluyen una fuente de presión neumática (o fuente de vacío) situada dentro del cartucho o dentro del instrumento. Dicha fuente de movimiento del fluido puede proporcionarse por un receptáculo bajo vacío o presurizado, chip u otro contenedor. La fuente de movimiento podría también ser un compresor o bomba de vacío situada bien dentro del cartucho bien dentro del instrumento. En los casos en los que se utiliza una fuente de movimiento al vacío o presión externa, el cartucho tiene puertas adecuadas, salidas de aire o canales para la conexión en cascada con la fuente. Asimismo, pueden utilizarse fuentes electroforéticas o electroosmóticas. También pueden incorporarse válvulas o bombas de membrana movidas piezoeléctricamente, magnéticamente o electrostáticamente en el cartucho o instaladas de forma permanente en el instrumento de manera que los dispositivos están conectados en cascada mecánicamente con el cartucho cuando el cartucho se inserta dentro del instrumento.

15

En funcionamiento, pero no cubierto por el procedimiento de las reivindicaciones, se añade a la puerta 103 de la muestra una muestra de fluido que contiene el analito deseado, por ejemplo, ácido nucleico del cartucho 101 y se fuerza que fluya de manera continua (tal como una bomba electrolítica o mecánica) hacia abajo al canal 105 y dentro de la cámara de mezclado 107. Los reactivos de lisis se liberan simultáneamente de la cámara de almacenaje 109 y se fuerzan que fluyan hacia abajo al canal 111 y dentro de la cámara 107. Reactivos de lisis adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones que contienen una sal chaotrópica, tal como HCl de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, yoduro de sodio, urea, perclorato sódico y bromuro potásico.

20

La muestra de fluido y reactivos de lisis que viajan en los canales 105 y 111, respectivamente, se detectan mediante sensores resistivos 115. A medida que el reactivo de lisis entra en contacto con la muestra de fluido, las células, esporas o microorganismos presentes en la muestra de fluido se someten a la lisis. La muestra de fluido y el reactivo de lisis continua fluyendo hacia la cámara de lisis 119 donde la muestra contacta el filtro y las células, esporas o microorganismos son capturados. El reactivo de lisis continua la lisis de los componentes de la muestra capturados. El filtro también sirve para eliminar los desechos de la muestra de fluido. En una realización de la invención, un transductor ultrasónico se acopla al cartucho 101 al lado de la cámara de lisis 119, por ejemplo, acoplado a una pared de la cámara 119 y los componentes de la muestra se someten a lisis mediante energía ultrasónica proporcionada por el transductor.

25

30

La muestra que ha sido sometida a lisis prosigue desde la cámara de lisis 119 hacia abajo al canal 121 y se fuerza que fluya a través del componente de captura 122. A medida que la muestra de fluido y reactivo de lisis fluye a través del componente 122, el ácido nucleico en la muestra de fluido se une al componente 122. Preferiblemente, el caudal de la muestra de fluido a través del componente 122 está en el intervalo de 0,1 a 50 $\mu\text{l/s}$. La muestra de fluido y reactivo de lisis que salen del componente 122 fluyen hacia abajo al canal 135 a través del controlador de flujo 41A y a través del canal 136 hacia la cámara de residuos 139. En otra realización, después de fluir a través del componente 122, la muestra de fluido puede redirigirse al recirculado a través de los tiempos extra de componente.

35

40

Después de que la muestra se haya forzado a fluir a través del componente 122, el reactivo de lavado en la zona de almacenamiento 125 se fuerza a fluir hacia abajo al canal 129 y a través del componente 122. Preferiblemente, el caudal de lavado está en el intervalo comprendido entre 0,5 y 50 $\mu\text{l/s}$. Se impide que el fluido fluya aguas arriba al cartucho mediante los controladores de flujo 123 en los canales 121, 129 y 131. El reactivo de lavado lava los contaminantes residuales, tales como sales chaotrópicas, desde el componente 122. Puede utilizarse una variedad de soluciones de lavado adecuadas variando el pH, la composición del disolvente y la fuerza iónica puede utilizarse para este fin que es bien conocida en el estado de la técnica. Por ejemplo, un reactivo de lavado adecuado es una solución de 80 mM de acetato de potasio, 8,3 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 40 μM de EDTA y 55% de etanol. El reactivo de lavado continúa fluyendo a través del controlador de flujo 41A y dentro de la cámara de residuos 139.

45

50

Después del lavado del componente 122, el fluido de elución se fuerza que fluya desde la zona de almacenaje 127 hacia abajo al canal 131 y a través del componente 122, liberando de esta manera el ácido nucleico del componente hacia el fluido de elución. En este punto, los controladores de flujo 41A y 41B se reconfiguran para evitar que el fluido de elución fluya a través del controlador de flujo 41A y para permitir que el fluido de elución fluya a través del controlador de flujo 41B dentro de la cámara de reactivo 141. Preferiblemente, el caudal de fluido de elución a través del componente 122 está en el intervalo comprendido entre 0,1 y 10 $\mu\text{l/s}$. El caudal del fluido de elución puede ser relativamente lento comparado con el caudal de la muestra de fluido que tiene en cuenta más analito a liberar del componente.

55

60

En general, cualquier fluido de elución adecuado puede utilizarse para eluir el ácido nucleico del componente 122. Dichos fluidos de elución son bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, el fluido de elución puede comprender agua pura de grado molecular o alternativamente, una solución tampón, que incluye pero no se limita a una solución de TRIS/EDTA; TRIS/acetato/EDTA, por ejemplo, 4 mM Tris-acetato (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, y 50 mM NaCl; TRIS/borato; TRIS/borato/EDTA; fosfato de potasio/DMSO/glicerol; NaCl/TRIS/EDTA; NaCl/TRIS/EDTA/TWEEN; TRIS/NaCl/TWEEN; tampones fosfato; tampones TRIS; tampones HEPES; tampones de amplificación de ácido nucleico; tampones de hibridación de ácido nucleico, etc.

65

ES 2 309 022 T3

Opcionalmente, antes que el fluido de elución fluya a través del componente 122 puede llevarse a cabo una etapa intermedia de separación con aire. Un gas, preferiblemente aire, puede forzarse a fluir a través del componente 122 después de que la solución de lavado fluya a través y antes de que el fluido de elución fluya a través. La etapa de separación con aire proporciona una clara distinción de las fases líquidas y ayuda al menos substancialmente al secado del componente 122 de cualquier solución de lavado restante antes de la elución.

Preferiblemente, el componente 122 se calienta a medida que el fluido de elución se fuerza que fluya a través del mismo para aumentar la eficacia de elución. Preferiblemente, el calentamiento se lleva a cabo suministrando energía al elemento de calentamiento resistivo en un sistema de retroceso de lazo cerrado bajo el control de elementos electrónicos de procesamiento en el cartucho. En una realización preferida, el componente 122 se calienta a una temperatura en el intervalo comprendido entre 60 y 95°C a medida que el fluido de elución fluye a través del mismo.

El fluido de elución que contiene el ácido nucleico deja el componente 122 y viaja hacia abajo al canal 135 hasta la cámara de reactivo 141. El fluido de elución y el ácido nucleico contactan y reconstituyen los reactivos PCR secados contenidos en la cámara 141 y el fluido de elución, ácido nucleico y los reactivos PCR continúan fluyendo dentro de la cámara de reacción 143 para la amplificación PCR y detección. En una realización alternativa, la solución de elución ya incluye los reactivos PCR de manera que el reactivo no necesita secarse en la cámara 141. Las salidas de aire 145 en comunicación con la cámara de residuos 139 y la cámara de reacción 143 permiten la liberación de los gases durante el procedimiento.

Una ventaja del cartucho de flujo continuo de la realización preferida es que permite que el analito, por ejemplo, el ácido nucleico, de un volumen relativamente grande de la muestra de fluido, por ejemplo de varios mililitros o más, se concentre en un volumen de fluido de elución mucho más pequeño, por ejemplo, de 25 μl o menos. A diferencia de los dispositivos del estado de la técnica, el cartucho de la presente invención permite factores de concentración extraordinarios mediante la extracción eficaz del analito de cantidades de mililitros de la muestra de fluido y la elución del analito en eluatos de cantidades de microlitros. En la realización preferida, el volumen de la muestra forzado a fluir a través del cartucho está en el intervalo comprendido entre 1 y 100 ml, permitiendo factores de concentración de 100 o superiores. Por ejemplo, el analito de 1 ml de muestra de fluido puede capturarse en el dispositivo y concentrarse en 10 μl o menos de fluido de elución.

Una muestra de fluido puede introducirse en el cartucho mediante una variedad de medios, naturales o automatizados. Para la adición manual, puede situarse un volumen medido de material en un área de recepción del cartucho a través de una ventana de entrada y, a continuación, se sitúa un tapón sobre la puerta. Alternativamente, una cantidad mayor de material de muestra del requerido para el análisis puede añadirse al cartucho y los mecanismos dentro del cartucho pueden realizar la medida precisa y parte alícuota de la muestra necesaria para el protocolo especificado.

Puede ser deseable situar ciertas muestras tales como material de biopsia de tejidos, tierra, heces, exudados y otros materiales complejos dentro de otro dispositivo o accesorio y, a continuación, situar el segundo dispositivo o accesorio dentro del cartucho provocando una acción mecánica que realiza una función tal como mezclado, separación o extracción. Por ejemplo, un trozo de tejido puede situarse dentro del lumen de un dispositivo secundario que sirve como tapón de la puerta de entrada. Cuando el tapón se presiona hacia la puerta, el tejido se fuerza a través de una malla que corta o divide el tejido.

Para la introducción de muestras automatizadas se utilizan características de diseño del cartucho adicionales y, en muchos casos, se imparten directamente y funcionalmente en la adhesión del espécimen dentro del cartucho. Con determinadas muestras, tales como aquellas que presentan un riesgo de peligro al operador o al medioambiente, tales como patógenos de retrovirus humanos, la transferencia de la muestra al cartucho puede suponer un riesgo. Así, en una realización, puede estar integrada dentro de un dispositivo una jeringuilla para proporcionar medios para mover las muestras de fluidos externos directamente dentro del cartucho. Alternativamente, una aguja de punción venosa y un tubo de recogida de sangre pueden estar unidos al cartucho que forma un conjunto que puede utilizarse para obtener una muestra de sangre. Después de la recogida, el tubo y la aguja se eliminan y descargan y, a continuación, el cartucho se sitúa en un instrumento para realizar el procesamiento. La ventaja de tal propuesta es que el operador o el medio ambiente no están expuestos a los agentes patógenos.

La puerta de entrada puede diseñarse con la consideración de factores humanos apropiados en función de la naturaleza del espécimen deseado. Por ejemplo, los especímenes respiratorios pueden adquirirse desde el tracto respiratorio más inferior como expectoraciones de tos o como tapón impregnado o muestras de cepillo de detrás de la garganta. En el primer caso, la ventana de entrada puede diseñarse para permitir que el paciente tosa directamente dentro del cartucho o de otra manera se facilite la proyección de la muestra expectorada dentro del cartucho. Para especímenes de cepillo o tapón impregnado, el espécimen se sitúa dentro de la ventana de entrada donde las características de la puerta y el cerrado facilita la rotura y retención al final del tapón impregnado o cepillo en la zona de recepción del cartucho.

En otra realización, el cartucho incluye tubos de entrada y de salida que pueden situarse en una unidad de muestra de volumen muy grande, tal como una corriente que fluye de agua, de manera que el material de la muestra fluya a través del cartucho. Alternativamente, puede servir un material hidrofílico de purga como una zona interactiva de manera que el cartucho completo pueda sumergirse directamente dentro del espécimen y una cantidad suficiente del

ES 2 309 022 T3

espécimen se absorba dentro del material de purga. A continuación, el cartucho se retira y puede transportarse hasta el laboratorio o directamente analizarlo utilizando un instrumento portátil. En otra realización, el sistema de tubos puede utilizarse de manera que un extremo del tubo está en contacto directo con el cartucho para proporcionar una interfase de fluidos con por lo menos una zona interactiva y el otro extremo está accesible al medioambiente externo para servir como receptáculo de la muestra. A continuación, el tubo puede situarse dentro de un espécimen y servir como detector.

El cartucho por sí solo puede también servir como el dispositivo de recogida de especímenes actual, reduciendo de esta manera el manejo e incomodidades. En el caso de especímenes implicados en disputas legales o investigaciones criminales, es ventajoso el acceso directo del material de ensayo dentro del cartucho para fluidos porque la cadena de custodia es convenientemente y fidedigna preservada.

En las aplicaciones generales del cartucho, las interacciones químicas de la muestra de fluido con uno o más reactivos pueden ser necesarias, de manera que es deseable incluir zonas interactivas que proporcionen reactivos químicos, el número y tipo en función del protocolo analítico específico que se haya facilitado. Las zonas múltiples interactivas, cada una conteniendo diferentes reactivos, pueden disponerse en series para permitir el procesado secuencial de la muestra.

Los reactivos pueden introducirse de manera exógena dentro del cartucho antes de su uso, por ejemplo, a través de aperturas sellables en cada zona del cartucho. Alternativamente, los reactivos pueden situarse en el cartucho durante la fabricación. Los reactivos pueden estar dispuestos dentro de zonas interactivas que realizan las operaciones para las cuales los reactivos se utilizarán o dentro de zonas que conducen a una zona interactiva particular. Alternativamente, los reactivos pueden estar dispuestos dentro de cámaras de almacenaje en comunicación fluida con las zonas interactivas.

El tipo de reactivo utilizado en una zona interactiva depende, entre otros, de las características del fluido y del tamaño de la muestra, la naturaleza y concentración de los constituyentes objetivo y del protocolo de procesado deseado. En el caso de interacciones de fases en solución, los reactivos pueden ser soluciones acuosas o reactivos secados que requieren reconstitución. El formato particular se selecciona en función de una variedad de parámetros, que incluyen si la interacción es una fase en solución o una fase sólida, la estabilidad térmica inherente del reactivo, velocidad de reconstitución y cinéticas de reacción.

Los reactivos líquidos pueden incluir, aunque no se limitan a ellos, soluciones tampones tales como solución salina, TRIS, ácidos, bases, soluciones de detergentes y soluciones chaotropicas que se utilizan de forma habitual para la purificación y lavado de ADN y ARN. Los reactivos secados pueden utilizarse como materiales precursores para la reconstitución y interacción en la fase en solución o como reactivos de fase sólida que incluyen indicadores de pH; indicadores redox; encimas tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, transcriptasa invertida, polimerasa de ADN y encimas de restricción; sustratos encimáticos; encima-anticuerpo o conjugados encima-antígeno; iniciadores de ADN y sondas; sales tampón; y detergentes. Además, pueden utilizarse en una zona de interacción los revestimientos de reactivo de fase sólida tales como albúmina de suero, estreptavidina y una variedad de proteínas reticuladas tales como polisacáridos.

Los reactivos secados también pueden estar contenidos dentro de un material de membrana que puede utilizarse como zona interactiva mediante la incorporación física del material dentro de una zona en comunicación con los canales de fluidos. La celulosa, nitrocelulosa, policarbonato, nylon y otros materiales habitualmente utilizados como materiales de membrana pueden fabricarse de manera que contengan los reactivos. Dichas membranas se diseñan para capturar células diana, realizar la lisis de células huésped, liberar ácidos nucleicos marcados y separar los contaminantes que puedan interferir con la reacción en cadena de la polimerasa u otros acontecimientos analíticos. Estos papeles pueden situarse dentro de una zona que permita el flujo cruzado o flujo tangencial de los fluidos. Debido a que los papeles pueden coger físicamente y simultáneamente las células diana, células de lisis y la unión de los analitos marcados o la competición de contaminantes o inhibidores de reacción analítica, proporcionan múltiples modos de actividad en una zona interactiva individual dentro del cartucho.

Los reactivos pueden estar contenidos como líquidos dentro de zonas específicas del cartucho utilizando técnicas de empaquetamiento o de estuche, cuyos diseños se optimizan para permitir la integración dentro del cartucho. Los reactivos que contienen compuestos que son térmicamente inestables cuando están en solución pueden estabilizarse mediante el secado utilizando técnicas comunes tales como la liofilización. Los aditivos, tales como azúcares de alcoholes simples, metilcelulosas y proteínas voluminosas pueden añadirse al reactivo antes del secado para aumentar la estabilidad o reconstitución. Para estos reactivos, la actividad del reactivo se reconstituye por rehidratación con la muestra de fluido o con un fluido de reconstitución separado, bien por pre-mezclado o preferiblemente durante el flujo de la muestra.

Pueden utilizarse una variedad de técnicas que proporcionan para el reactivo sólido patrones de deposición que facilitan la reconstitución uniforme. El reactivo puede depositarse en un patrón parabólico reflejando el patrón de flujo del fluido delante del canal estrecho y amplio, proporcionando de esta manera la probabilidad de exposición uniforme de los contenidos de la muestra al reactivo. La selección de hojas de reactivos secados, capas de reactivos o disposiciones del lugar individuales depende del programa de reconstitución deseado, el caudal de reconstitución y de si se han utilizado elementos de mezcla adicionales.

ES 2 309 022 T3

Para disposiciones del lugar de reactivo, impresión de chorro de tinta y punta de micropipeta piezoacoplada, pueden dispensarse gotas de reactivo líquido en una variedad de patrones uniformes y no uniformes sobre la superficie de una zona activa y la deposición de reactivos separados en áreas separadas de la zona activa puede conseguirse si se desea la modificación secuencial de la muestra de fluido o si los reactivos combinados no pueden secarse como un reactivo individual. Si la zona activa es una gran superficie respecto la estructura volumétrica, la zona puede sumergirse, pulverizarse o exponerse a un reactivo y secarse antes de la introducción en el cartucho.

Las operaciones permitidas por las interacciones de compuestos químicos específicas incluyen la dilución en volumen del espécimen; el ajuste de pH; la solubilización bioquímica; la agregación molecular; la lisis celular o vírica; la aglutinación de células diana o la captura de partículas; la filtración; la neutralización; la extracción y purificación de analitos específicos; la extracción y separación de contaminantes; la precipitación de moléculas específicas; la unión de analitos a mitades indicadoras; y la reconstitución de reactivos secados.

La geometría global del cartucho puede tener distintas formas. Por ejemplo, el cartucho puede incorporar una pluralidad de zonas interactivas, por ejemplo, canales o cámaras y zonas de almacenamiento, dispuestas en serie, de manera que una muestra de fluido se mueva en serie a través de las zonas y se lleven a cabo las respectivas operaciones en estas zonas.

Alternativamente, el cartucho puede incorporar una zona interactiva de fluido central conectada en las cámaras de almacenamiento del diluyente o reactivo periféricas.

Generalmente, un cartucho individual incluye por lo menos dos zonas interactivas distintas y, preferiblemente, por lo menos tres o más zonas interactivas diferentes. Las zonas individuales y las zonas pueden variar en tamaño y forma según la función específica de una región u otra. En algunos casos, pueden utilizarse zonas o cámaras interactivas esféricas o alargadas. En general, las zonas interactivas pueden variar en dimensiones desde microescala (micrones) a mesoescala (submilímetros) y a macroescala (milímetros).

En algunos casos, puede utilizarse una zona separada como zona volumétrica, por ejemplo, para medir de forma precisa los volúmenes de fluido a introducir dentro una zona adyacente. En dichos casos, el volumen de la zona da órdenes por necesidad volumétrica de una reacción dada. Además, el cartucho puede estar fabricado de manera que incluya una serie de zonas que tengan dimensiones y volúmenes modificados con respecto a otras.

Las áreas de sección transversal de las zonas dan órdenes a la resistencia de fluido, presión y caudales de flujo volumétrico. Las zonas tienen dimensiones o propiedades (por ejemplo, diámetro interno, fricción de superficie, materiales, chips insertados, temperatura u otros factores) que precisan el control del caudal de flujo volumétrico, tiempos de toma de muestras en las zonas, eficacia de procesamiento sobre la tarjeta, reactivos pre-empaquetados y eficacias de los sensores y detectores. En consecuencia, pueden implementarse los tiempos precisos de toma de muestras, los caudales de reconstitución del reactivo, los caudales de flujo, las direcciones de flujo y todos los elementos y parámetros que intervienen a través del flujo.

El cartucho puede fabricarse utilizando uno o más de una variedad de métodos y materiales disponibles para las técnicas de microfabricación. Por ejemplo, en aspectos preferidos, el cartucho puede comprender un número de elementos planos que pueden individualmente ser hojas o partes moldeadas de inyección fabricadas a partir de distintos materiales poliméricos o pueden ser silicona, vidrio o semejantes. En el caso de sustratos tipo sílice, vidrio o silicona, pueden utilizarse métodos para el ataque químico, molturación, perforación, etc. para fabricar huecos y depresiones que reúnan las distintas zonas, cámaras y canales de fluido dentro del cartucho capaces de recibir elementos tales como estuches, chips, papeles, perlas, geles, materiales porosos, comprimidos y semejantes.

Las técnicas de microfabricación, tales como las utilizadas habitualmente en las industrias de semiconductores y microelectrónica, son especialmente adecuadas para estos materiales y procedimientos. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, electrodeposición, deposición de vapor a baja presión, soldadura de vidrio, fotolitografía, ataque químico en húmedo, ataque con iones reactivos (RIE), perforación láser y semejantes. Cuando se utilizan estos métodos, generalmente será deseable fabricar los miembros planos del cartucho de materiales similares a aquellos utilizados en la industria de semiconductores, por ejemplo, vidrio de sílice, silicona, arsenio de galio, poliimidas, películas metálicas y semejantes. En realizaciones adicionales, el cartucho puede comprender una combinación de materiales y técnicas de fabricación descritas más arriba. En algunos casos, el cartucho puede incluir algunas partes de plástico moldeado por inyección y semejantes, mientras otras partes del cuerpo pueden comprender vidrio gravado o miembros de silicona y semejantes.

El cartucho puede también incorporar uno o más filtros para capturar componentes de la muestra, por ejemplo, células, esporas o microorganismos que se sometan a lisis. Los filtros pueden también utilizarse para eliminar partículas, escombros de células y sólidos de proteínas de la muestra. Los filtros pueden estar dentro de cualquier zona, por ejemplo, dentro de los pasajes o canales de fluido que conducen entre zonas o dentro de una zona interactiva particular. Pueden utilizarse una variedad de medios de filtro que incluyen, por ejemplo, celulosa, nitrocelulosa, polisulfona, nylon, copolímeros de vinilo, fibra de vidrio, estructuras micromaquinadas y semejantes. De forma similar, también pueden estar incluidos en el cartucho medios de separación, por ejemplo, resinas de intercambio iónico, resinas de afinidad o semejantes.

ES 2 309 022 T3

Las superficies de las zonas interactivas de fluido que contactan con la muestra de fluido y los reactivos pueden estar hechas de material hidrofóbico o hidrofílico en función de la aplicación particular. Cuando los reactivos implicados en un análisis particular son incompatibles con los materiales utilizados para fabricar el cartucho, por ejemplo, partes de silicona, vidrio o poliméricas, pueden aplicarse una variedad de revestimientos sobre las superficies de estas partes que contactan con los reactivos. Por ejemplo, los componentes que tienen elementos de silicona pueden estar revestidos con una capa de nitruro de silicio o una capa metálica de, por ejemplo, oro o níquel, pulverizado o metalizados sobre la superficie para evitar zonas adversas con estos reactivos.

De forma similar, los revestimientos de polímeros inertes, revestimientos de Parilene® o modificaciones con silano de superficies también pueden aplicarse en las superficies internas del cartucho con el fin de hacer todo el sistema más compatible con las reacciones que se van a llevar a cabo. Por ejemplo, en el caso de análisis de ácido nucleico, puede ser deseable revestir las superficies con, por ejemplo, un revestimiento de no adhesión para prevenir la adhesión de los ácidos nucleicos en la superficie. De forma adicional, pueden utilizarse conductores eléctricos metálicos patrón para la activación de los actuadores, calentadores, sensores y semejantes. Dichos conductores pueden estar revestidos con revestimientos aislantes en aquellas circunstancias donde los cables eléctricos se sitúan en contacto con los fluidos, para evitar un corte o formación de gas por electrólisis. Dichos aislantes son bien conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, polímeros de pantalla, epóxidos, cerámicas y semejantes.

Aunque las realizaciones preferidas incorporan controladores de flujo, por ejemplo, válvulas, es posible para que una corriente de fluido fluya continuamente guiarla, dividirla y desviarla en varias zonas dentro del cartucho sin la incorporación de válvulas. En una realización, la corriente de fluido fluye hacia abajo al canal con relativa baja resistencia del fluido dentro de una segunda zona, por ejemplo, una cámara de residuos. La cámara de residuos puede ser ventilada a través de un orificio bloqueado con una membrana porosa hidrofóbica, tal como Gorotex®. Cuando se llena la cámara de residuos y todo el aire en la cámara de residuos se expulsa a través de la salida de la membrana, la muestra de fluido no puede pasar a través de la membrana y se crea una presión de retorno.

La presión de retorno es suficientemente grande como para forzar la corriente de fluido restante a través de un canal capilar, secundario, más pequeño, de un filtro sensible a la presión u otro reductor de flujo situado aguas arriba de la primera cámara. Una vez el flujo de fluido se ha iniciado a través del pequeño canal, no fluirá un fluido adicional dentro del primer canal y la corriente de fluido se desviará completamente hacia el segundo canal. Opcionalmente, el canal más pequeño puede calentarse localmente con el fin de provocar un desvío de la muestra que fluye hacia el canal más pequeño antes de que la zona o cámara más grande esté llena.

Además, el fluido puede impedirse que fluya hacia atrás aguas arriba mediante diodos de fluido. La figura 4 muestra un ejemplo de dicho diodo de fluido. El fluido se deja fluir en una dirección de A hacia B, pero se evita que fluya en la dirección opuesta de B hacia A. El diodo 91 comprende una parte superior 43 que tiene un orificio 45 y una cavidad continua 47; una placa de circuito impreso 49 que tiene un flap 51; una zona de fondo 53 que tiene un canal 55. Cuando el diodo 91 se desactiva, un disco magnético 57 sobre el flap 51 es atraído hacia la zona superior 43 por una fuerza magnética externa proporcionada, por ejemplo, por el instrumento externo. El flap es desviado contra la cavidad 47 en el fondo de la zona 43, permitiendo de esta manera que el flujo fluya a través del orificio 45 para pasar debajo del flap 51 y a través del canal 55 de la zona de fondo 53.

Cuando el diodo 91 se activa, la fuerza magnética se inhabilita y el flap 51 vuelve a la posición de cerrado debido a la constante del muelle del flap que impide el paso del fluido del orificio 45 debajo del flap 51 y a través del canal 55. De esta manera, el fluido presente en la zona de fondo 53 se impide que fluya hacia atrás a través del orificio 45 de la zona de cabeza.

Preferiblemente, el cartucho tiene un elemento de ventilación para liberar la presión de retorno de los fluidos. La ventilación puede incluir una abertura al entorno externo (por ejemplo, un orificio de entrada o un orificio de salida con o sin una ventilación hidrofóbica). Convenientemente, la ventilación puede ser una cavidad interna expandible tal como una membrana corrugada o una membrana de látex elástica. La liberación de los fluidos a través de la ventilación puede ser pasiva o activa, como la aplicación de vacío en un orificio en el cartucho.

La inclusión de barreras de fluido permeables al gas, por ejemplo, tapones de filtro pobremente humedecidos o membranas hidrofóbicas, en los cartuchos también puede utilizarse para crear una dirección de fluido y un sistema de control. Dichos tapones de filtro, cuando se incorporan en el extremo de una zona interactiva químicamente opuesta a una entrada de fluido, permite que el aire u otros gases presentes en la zona interactiva sean expulsados durante la adición del componente líquido dentro de la zona. Después del llenado de la zona, la muestra de fluido contacta el fluido hidrofóbico parando de esta manera el flujo de líquido neto. La resistencia de fluido puede también utilizarse como una barrera permeable al gas con el fin de obtener el mismo resultado, por ejemplo, utilizando pasajes de fluido que sean suficientemente estrechos para proporcionar una resistencia excesiva, parando o retardando eficazmente de esta manera el flujo de líquido mientras fluye el aire o el gas.

Son adecuados para utilizar como tapones de filtro permeables al gas o pobremente humedecidos una variedad de materiales que incluyen, por ejemplo, materiales poliméricos hidrofóbicos porosos, tales como fibras hiladas de acrílicos, policarbonato, Teflón®, fibras de polipropileno comprimidas o cualquier número de tapones de filtro disponible comercialmente. De forma alternativa, una membrana hidrofóbica puede estar unida sobre un agujero pasante para suministrar una estructura similar. Las membranas de copolímeros acrílicos modificados están comercialmente dispo-

ES 2 309 022 T3

nibles, por ejemplo, por Gelman Sciences (Ann Arbor, MI) y las membranas de policarbonato gravadas en una pista de partículas están disponibles por Poretics, Inc. (Livermore, CA.). La ventilación de las cámaras de calentamiento puede incorporar barreras para la evaporación de la muestra, por ejemplo, una cámara de reflujo. La evaporación excesiva de un fluido de la muestra puede evitarse por disposición de una capa de aceite mineral dentro de la cámara y sobre la superficie superior de la muestra para permitir la evolución del gas mientras se controla la evaporación.

En realizaciones de la presente invención, las zonas destinadas a someter una lisis dentro del cartucho se diseñan para realizar la lisis de las células diana mediante medios químicos. Los medios físicos incluyen la ruptura mecánica de las células por vibración de las perlas de vidrio o plástico.

La transferencia de energía térmica, tal como el calentamiento de una suspensión de virus a 95°C o la descongelación por congelación repetida de esporas de bacterias activadas para romper las paredes celulares también puede utilizarse.

La lisis química puede utilizarse en combinación con la lisis física o ultrasónica. Los agentes de lisis química típicos caen en diferentes categorías, tales como enzimas, detergentes y chaotropos. La lisosima es una enzima que ataca hidrolíticamente las paredes celulares de muchas bacterias; la tripsina es una enzima proteasa que rompe la membrana celular de la mayoría de células eucarióticas. Otras proteasas con especificidad para determinadas secuencias peptídicas pueden utilizarse y son preferibles si la parte diana tiene tendencia a determinadas proteasas. A menudo, se utiliza la proteinasa K porque también digiere proteínas nucleares y enzimas de células huésped que pueden interferir en la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Para las células eucarióticas, detergentes tales como Triton X-100 o dodecil sulfato sódico solubilizan la membrana celular y liberan los contenidos intracelulares. Las chaotropos tales como el isotiocianato de guanidina o la urea pueden utilizarse para las células lisis y tienen el beneficio adicional de inhibir las NRAs que pueden destruir el NRA diana.

La ruptura mecánica de las células diana o virus puede conseguirse en zonas interactivas diseñadas para rasgar la membrana de superficie o la pared de la célula del organismo diana vía cizallamiento o vibración. La vibración puede conseguirse conteniendo perlas de vidrio u de otro tipo en una cámara y sometiendo la cámara a un transductor ultrasónico tal como un brazo ultrasónico en una pared de la cámara para transferir la energía ultrasónica hacia las células. La frecuencia y amplitud del ultrasonido se afina al correspondiente con la frecuencia de resonancia de las células diana y se optimiza para llevar a cabo la lisis con el mínimo calentamiento o cavitación, aunque el último puede ser necesario para una lisis eficaz.

Normalmente será deseable llevar a cabo una extracción para separar los ácidos nucleicos de los otros elementos del extracto crudo, por ejemplo, proteínas desnaturalizadas, partículas de la membrana celular y sales. Generalmente, la eliminación de la materia particulada se lleva a cabo por filtración, floculación y semejantes. Pueden fácilmente incorporarse una variedad de tipos de filtro dentro de las zonas interactivas química y/o mecánicamente del cartucho. Además, cuando se utilizan métodos de desnaturalización química es deseable desalar las sales de la muestra antes de llevar a cabo los procedimientos de la siguiente etapa. La desalación de la muestra y el aislamiento del ácido nucleico puede llevarse a cabo, por ejemplo, por unión de los ácidos nucleicos en una fase sólida y el arrastre de las sales contaminantes o por cromatografía de filtración de gel en la muestra, por el paso de las sales a través de membranas de diálisis y semejantes. Los soportes sólidos adecuados para la unión de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, filtros, perlas, fibras, membranas, lana de vidrio, papel de filtro, polímeros y medios de exclusión de gel.

En algunas realizaciones, las enzimas tales como la enzima polimerasa puede estar presente dentro de una zona de amplificación unida a un soporte sólido adecuado o en las paredes y superficies de la zona. Los soportes sólidos adecuados incluyen aquellos que son bien conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, agarosa, celulosa, sílice, divinilbenceno, poliestireno, etc. La unión de enzimas en soportes sólidos ha demostrado impartir estabilidad a la enzima en cuestión, que permite el almacenamiento de días, semanas o incluso meses sin una pérdida sustancial de la actividad enzimática y sin la necesidad de liofilización de la enzima. Están disponibles anticuerpos monoclonales que unen la enzima sin afectar su actividad polimerasa. En consecuencia, el enlace covalente de la enzima polimerasa activa en el soporte sólido o las paredes de la zona de amplificación puede llevarse a cabo utilizando el anticuerpo como un elemento de unión entre la enzima y el soporte.

En realizaciones de la invención, pueden utilizarse métodos de unión de ligando en los cartuchos para la unión y captura de tipos de células específicas y/o otros analitos. Las entidades de unión de ligando, tales como los ácidos nucleicos y las proteínas pueden situarse en zonas de captura seleccionadas, unidas en la superficie de los componentes de captura de analito para formar una zona de reacción del analito específico. Pueden utilizarse las reacciones químicas de unión de ligando tales como las reacciones químicas basadas en silano. Pueden utilizarse elementos de unión homo- o heterobifuncionales con una unión funcionalizada en la superficie interna y la otra en una diana en la muestra de ensayo. Se hace pasar una muestra que contiene el analito diana de forma continua a través del cartucho y el analito se enlaza en la superficie cubierta de ligando. Después del subsiguiente lavado con una o más soluciones de lavado, los complejos de analito-ligando pueden eluirse. De forma alternativa, una molécula analito-ari conjugada a una molécula indicadora puede pasar a través del cartucho, de manera que el conjugado es capturado por el analito. Este complejo puede también eluirse.

En realizaciones preferidas particulares, el cartucho está fabricado a partir de por lo menos un molde de inyección, un molde a presión o una parte polimérica mecanizada que tiene una o más paredes o depresiones fabricadas dentro de

ES 2 309 022 T3

su superficie para definir varias paredes de zonas interactivas. Los ejemplos de polímeros adecuados para el moldeo por inyección o por mecanización incluyen, por ejemplo, policarbonato, poliestireno, polipropileno, polietileno, polímeros acrílicos y comerciales tales como Kapton[®], Valox[®], Teflón[®], ABS, Delrin[®] y semejantes. Una segunda parte que es complementaria en la forma se acopla a la superficie de la primera parte para definir las paredes restantes del cartucho.

5 La parte de acoplamiento o una tercera parte puede ser una tarjeta de circuito impreso para implementar un contacto eléctrico directamente con el fluido o indirectamente vía el cartucho.

El cartucho puede fabricarse de tal manera que las zonas específicas o zonas interactúen con el instrumento externo vía intercambio de radiación electromagnética. Muchos plásticos utilizados de forma general para dichos cartuchos (por ejemplo, polipropileno y policarbonato) son ópticamente transparentes. En general, los materiales aislantes permiten que la radiación electromagnética pase sobre un amplio margen de frecuencias. Dicha radiación puede ser de cualquier frecuencia coherente con el objetivo de la aplicación. Por ejemplo, las ondas de radio pueden utilizarse como medios alternativos de comunicación con el cartucho. Las ondas de radio también pueden utilizarse para suministrar pequeñas cantidades de energía a cualquier circuito interno dentro del cartucho. Las frecuencias de microondas pueden utilizarse para inducir calentamiento de la muestra de fluido. Las señales infrarrojas pueden utilizarse para el calentamiento o para el intercambio de datos vía una unión IR, similar a las utilizadas en los ordenadores personales.

10
15

Las frecuencias ópticas que utilizan diodos de emisión de luz (LEDs) y fotodetectores tales como fotodiodos son útiles para la detección de la presencia de fluido (mediante la detección de cambios en la transmitancia óptica), y para la monitorización de reacciones químicas (mediante, por ejemplo, la medida de la absorción, la fluorescencia o luminiscencia a longitudes de onda específicas). Las frecuencias ópticas, así como las ultravioletas pueden utilizarse para excitar la fluorescencia de productos de reacción para la detección. Estas frecuencias también pueden utilizarse para introducir o acelerar reacciones químicas.

20

La radiación de frecuencia más elevada, tal como la radiación de rayos X o UV profundo, también es posible para aplicaciones específicas, aunque las fuentes para estos tipos de radiación pueden no ser siempre prácticas en un instrumento pequeño. Las fuentes de ionización de radiación (tales como los materiales radioactivos) pueden razonablemente incorporarse dentro de un instrumento y dicha radiación utilizarse para fines específicos dentro del cartucho, tal como la mejora de reacciones o detección de componentes del fluido específicos o de propiedades.

25
30

El cartucho puede fabricarse de tal manera que las zonas específicas o zonas puedan interactuar con el entorno externo vía fuerzas magnéticas. Por ejemplo, una zona del cartucho puede contener un recipiente de perlas magnéticas. Dichas perlas pueden funcionalizarse con distintos agentes de unión. Mediante la aplicación de una serie de campos magnéticos en el cartucho (por ejemplo, con medios electromagnéticos conmutable) estas perlas pueden vibrar o moverse de una zona a otra. Utilizando campos electromagnéticos de AC (corriente alterna) dichas perlas pueden circular dentro de una zona pequeña del cartucho para mezclar los fluidos dentro del cartucho.

35

También pueden utilizarse fuerzas magnéticas para trabajar con válvulas pequeñas dentro del cartucho para el control del fluido. Puede incorporarse una pequeña tira de material magnético dentro del cartucho para desviar el flujo de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo particular. Otra posibilidad es fabricar una tira magnética de tal forma que ésta retorne a la primera posición cuando el campo se elimina. La tira podría fabricarse de tal manera que fuera bistable mecánicamente. La aplicación de un pulso magnético a la tira provoca una transición mecánica desde el estado bistable inicial al segundo estado. En este segundo estado, la tira desvía el flujo de fluido hacia una trayectoria alternativa. Una disposición de dichas válvulas permite el control completo del movimiento del fluido.

40
45

El cartucho puede fabricarse de manera que zonas específicas puedan interactuar con el instrumento externo vía campos eléctricos. Fabricando zonas muy delgadas dentro del cartucho y acoplando éstas con las áreas conductoras correspondientes dentro del instrumento, los campos eléctricos pueden aplicarse al fluido sin la necesidad de cualquier conexión eléctrica al propio cartucho. Dichos campos eléctricos pueden utilizarse para mover moléculas cargadas de una superficie a otra dentro del cartucho. Mediante el diseño adecuado de las trayectorias de fluidos, dicha configuración puede utilizarse para separar moléculas cargadas de moléculas no cargadas o para atraer y retener moléculas cargadas mientras otras moléculas no deseables se limpian del sistema.

50

Un número de las operaciones realizadas por las distintas zonas interactivas del cartucho requieren una temperatura controlable. Por ejemplo, la amplificación PCR requiere ciclar la muestra entre una temperatura de separación metálica, una temperatura de reacción de recocido y una temperatura de reacción de extensión. Generalmente, también se llevan a cabo otras reacciones que incluyen técnicas de amplificación de ADN isotérmicas, unión de ligandos, reacciones encimáticas, extensiones, reacciones de transcripción e hibridación a temperaturas optimizadas y controladas.

55

Generalmente, el control de la temperatura se suministra por calentadores de resistencia que se preparan utilizando métodos que son bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, estos calentadores pueden fabricarse a partir de películas metálicas delgadas aplicadas dentro o adyacentes a los canales o cámaras utilizando métodos bien conocidos tales como pulverización, deposición de vapor controlada, impresión de pantalla y semejantes. El calentador se conecta eléctricamente a una fuente de energía que libera una corriente a través del calentador. Las conexiones eléctricas pueden fabricarse utilizando métodos similares a los descritos para los calentadores.

60
65

En una realización se dispone un calentador controlador dentro o adyacente a una zona para el control térmico de la muestra. El control térmico se lleva a cabo modificando la corriente suministrada al calentador para conseguir la

ES 2 309 022 T3

temperatura deseada en la etapa particular de la reacción. De forma alternativa, el control térmico puede conseguirse transfiriendo la muestra de fluido entre un número de zonas de reacción diferentes o zonas del mismo cartucho, teniendo temperaturas constantes diferentes o mediante el flujo de la muestra a través de un canal en forma de serpentín que viaja a través de un número distintas zonas de temperatura. Alternativamente, el calentamiento puede suministrarse por exposición de la zona a una radiación láser u otra fuente de radiación.

También pueden incorporarse los elementos generadores de calor por resistencia dentro de zonas de los cartuchos por difusión de silicio dentro de las zonas o por deposición de un metal de película delgada, carbono o polisilicio en determinadas zonas. El calentamiento controlado proporciona capacidad funcional adicional tal como el mezclado, disolución de los reactivos sólidos, sometimiento de la lisis, desnaturalización térmica de proteínas y ácidos nucleicos y lisis de células, elución de moléculas enlazadas, caudales de difusión mejorados de moléculas en la muestra y modificación de los coeficientes de unión de superficie, así como una elevada ciclación térmica eficaz para las reacciones en cadena de polimerasa y ligasa. Las características de enfriamiento también pueden explotarse en zonas de elevada área de superficie, por ejemplo, con fines de enfriamiento externo.

Preferiblemente, los calentadores son capaces de producir temperaturas superiores a 100°C sin que tengan lugar efectos adversos como resultado del calentamiento. Los calentadores pueden proporcionarse en forma de una capa sobre una superficie de la zona interactiva u otra zona, o pueden proporcionarse en forma de un material adicional moldeado o maquinado que se ha incorporado en una zona o zonas. Generalmente, el control de la fuente de energía se lleva a cabo mediante un procesador programado apropiadamente tal como el procesador en el instrumento externo. Los calentadores pueden incorporarse dentro del cartucho por deposición de una película conductora resistiva o una materia adicional sobre una superficie del cartucho, o alternativamente, los calentadores pueden proporcionarse externamente, por ejemplo, en el instrumento y aplicarse en el exterior del cartucho, adyacente a una zona particular de manera que el calentador se conduce hacia la zona.

Las zonas de temperatura controlada pueden también incluir sensores de temperatura en miniatura para la monitorización de las temperaturas y de esta manera controlar la aplicación de corriente a través del calentador. Están disponibles una gran variedad de microsensores para la determinación de las temperaturas, que incluyen, por ejemplo, termopares que tienen una unión bimetálica que produce una fuerza electromotriz dependiente de la temperatura (EMF), termómetros de resistencia que incluyen material que tiene una resistencia eléctrica proporcional a la temperatura del material, termostatos, sensores de temperatura IC, termómetros de cuarzo y semejantes. Alternativamente, el coeficiente de temperatura de la resistencia del calentador puede monitorizarse para controlar la entrada de calor.

La temperatura medida por el sensor de temperaturas y la entrada de la fuente de energía generalmente serán entradas a un procesador, por ejemplo, un microprocesador o microcontrolador en el instrumento externo que ser programa para recibir y guardar estos datos. Generalmente, el mismo procesador incluye la programación para dar órdenes de reparto de la corriente apropiada para aumentar y disminuir la temperatura de la zona o zonas interactivas. Por ejemplo, el procesador puede programarse para que la zona interactiva exista a través de cualquier número de perfiles de temperatura/tiempo predeterminados, por ejemplo, ciclos térmicos para la PCR y semejantes. Teniendo en cuenta el tamaño reducido de los cartuchos de la invención, generalmente el enfriamiento de la zona de interacción tendrá lugar mediante la exposición a la temperatura ambiente. Sin embargo, si se desea pueden incorporarse elementos de enfriamiento adicionales, por ejemplo, sistemas de enfriamiento, enfriadores por efecto Peltier, baños de agua, intercambiadores y semejantes.

En realizaciones alternativas, el mezclado puede conseguirse mediante la incorporación de elementos ferromagnéticos dentro del cartucho que puede hacerse vibrar suministrando una corriente alterna a una bobina adyacente al dispositivo. La corriente oscilante crea un campo magnético oscilante a través del centro de la bobina que provoca un movimiento vibratorio y la rotación de las partículas magnéticas en el cartucho y el mezclado de los componentes del fluido.

Además de los sensores para la monitorización de la temperatura, el cartucho puede contener sensores para monitorizar el progreso de una o más de las operaciones del dispositivo. Por ejemplo, los sensores ópticos y sensores de presión pueden incorporarse dentro de una o más zonas para monitorizar el progreso de distintas reacciones o dentro de los canales de flujo para monitorizar el progreso de los fluidos o detectar las características de los fluidos, por ejemplo, el pH, la temperatura, la conductancia eléctrica, capacitancia, fluorescencia, viscosidad, químico-luminiscencia, color y semejantes.

Generalmente, el cartucho incluirá sensores y controladores de temperatura. Por ejemplo, puede disponerse un control de bloque de temperatura o elemento de calentamiento adyacente a la superficie externa de una zona interactiva químicamente para transferir calor a la zona. En este caso, los cartuchos preferidos incluyen una pared externa delgada en para zonas en las que es deseable un control térmico. Esta pared delgada puede ser un elemento de cubierta delgado, por ejemplo, una hoja de policarbonato o una banda de alta temperatura, es decir, un adhesivo de silicona sobre una banda de Kapton® (comercialmente disponible por ejemplo, 3M Corp.). En una realización, el cartucho puede comprender dos o más componentes que se han fabricado de forma separada y, a continuación, unido conjuntamente. Algunas superficies de los componentes a la larga terminarán en el interior de las zonas de flujo de fluido o canales.

En dichas superficies, pueden depositarse las capas conductoras. Estas podrían ser de diferentes metales, por ejemplo, oro, cromo, platino, plata, carbono, cobre u otros metales, depositados por técnicas de deposición de capa fina

ES 2 309 022 T3

estándar tales como metalización, evaporación o pulverización. Otro procedimiento para la deposición de dichos materiales conductores es vía tecnología de película gruesa. En este procedimiento, las pastas o tintas conductoras se depositan mediante serigrafía y, a continuación, cocer para expulsar los disolventes y dejar detrás del conductor final. Finalmente, las películas delgadas de carbono se utilizan de forma generalizada para materiales conductores de bajo coste. Estos también pueden serigrafarse y cocer a bajas temperaturas para formar las capas conductoras.

Cualquiera de los métodos de más arriba son útiles para permitir la conducción de señales eléctricas a partir del entorno exterior, a través del área de seguridad del fluido y dentro del interior del cartucho. Estos conductores pueden fabricarse muy delgados, limitados sólo por la conductividad necesaria. En el caso de un cartucho, el espesor de los conductores puede ser del orden de 0,0254 mm.

Las señales eléctricas a través de dichos conductores pueden utilizarse de una variedad de maneras, tanto como entradas al cartucho como salidas del mismo. Algunas señales implican la preparación de un circuito, parte del cual es el propio fluido dentro del cartucho. En una realización, dicho circuito se utiliza simplemente para percibir la presencia o ausencia del fluido. Se fijan dos terminales conductoras para guiar las zonas dentro del canal de fluido. Los elementos electrónicos externos monitorizan la impedancia entre estos conductores, mediante, por ejemplo la aplicación de un pequeño voltaje entre ellos y la monitorización del flujo de corriente. Cuando no hay flujo, la impedancia será muy alta. Sin embargo, cuando el fluido pasa este punto en el canal, el fluido romperá la separación entre las dos terminales. Puesto que los fluidos generalmente utilizados en aplicaciones biológicas y químicas son por lo menos suavemente conductoras, este fluido provocará que la impedancia del circuito disminuya dramáticamente. Esta disminución en la impedancia puede detectarse mediante elementos electrónicos y decisiones hechas basadas en esta entrada. Mediante la colocación de distintos de dichos circuitos a través de la longitud de cualquier canal de fluido, los elementos electrónicos externos pueden utilizarse para monitorizar la velocidad de fluido y, de esta manera, la monitorización del avance del procesamiento del fluido deseado.

Los electrodos en contacto con el fluido pueden también utilizarse para la monitorización de características específicas del fluido. La capacitancia, la conductividad del fluido, el pH del fluido, la capacitancia, la humedad de la zona de reacción (por ejemplo, en cartuchos a base de papel) son todos los ejemplos de parámetro específicos del fluido que pueden monitorizarse por medios electrónicos. Las configuraciones de electrodos específicos también son posibles para permitir la detección electroquímica de productos de reacción.

Otro ejemplo es la utilización de dichas conexiones eléctricas dentro del fluido para la manipulación de biomoléculas tales como el ADN. Dichas moléculas pueden moverse a través de los fluidos mediante electroforesis DC. En este caso, un electrodo entra en contacto con el fluido como un contraelectrodo. Muchos otros electrodos pueden desviarse con respecto al contraelectrodo para atraer las moléculas cargadas. Por ejemplo, algunas macromoléculas tales como el ADN están negativamente cargadas. Mediante el desvío de los electrodos cargados positivamente con respecto al contraelectrodo, estas macromoléculas pueden atraerse hacia los electrodos positivos. Esto puede ser útil para el aislamiento de dichas moléculas de otros componentes del fluido, o para atraer dichas moléculas a zonas de reacción específicas dentro del cartucho.

Otra técnica electrónica útil para el movimiento y aislamiento de biomoléculas es la dielectroforesis AC. En este caso, dos o más electrodos están generalmente configurados cerrados con respecto al otro y en una configuración física que proporciona campos eléctricos no uniformes. Es conocido que los campos AC a frecuencias de hasta decenas de MHz induzcan polarización eléctrica de dichas moléculas provocando el movimiento o que sean atraídas a zonas donde éstas puedan aislarse o procesarse. Las moléculas también tienen identificaciones únicas, es decir, determinadas moléculas responden a una frecuencia particular de excitación. Así, pueden aislarse moléculas específicas de la muestra de fluidos mediante sintonización de la frecuencia de la excitación AC. Utilizando excitación de ondas oscilantes a lo largo de una serie de electrodos, estas moléculas específicas pueden moverse de un sitio a otro.

Otra aplicación de una conexión eléctrica es la de la conducción de una reacción de electrólisis para conseguir el movimiento del fluido.

Las conexiones eléctricas a un depósito de fluido podría utilizarse para llevar una bomba electrolítica. En dicho dispositivo, la corriente pasa a través de un depósito de electrolito. Esta corriente provoca la evolución del gas a medida que el disolvente electrolito se descompone en gases tales como oxígeno e hidrógeno. Estos gases generan una presión localizada y pueden servir como una fuente de movimiento. Esta presión puede transmitirse al fluido del proceso dentro del cartucho a través de, por ejemplo, una membrana flexible provocando de esta manera un movimiento de fluido del fluido que va a procesarse.

Las Figuras 5A y 5B muestran una de dichas bombas electrolíticas 25. Tal y como se muestra en la vista en planta de la Figura 5A, la bomba 25 incluye electrodos 27 que tienen una forma de estrella para asegurar que la trayectoria de la corriente esté siempre disponible incluso después de empezar el burbujeo que se forma dentro del depósito 29. Un anillo de estanqueidad 4 atrapa el electrolito dentro del depósito 29. Tal y como se muestra en la vista lateral esquemática de la Figura 5B, el fluido 39 está contenido dentro de una bolsa 35 que tiene una membrana expandible 37. El fluido contacta los electrodos 27 y se descomponen cuando la corriente eléctrica se aplica a los electrodos. La descomposición del fluido crea una acumulación de la presión dentro de la bolsa 35. A medida que la bolsa se expande debido al aumento de la presión, la bolsa se desvía contra una bolsa de reactivo líquido (no mostrada), forzando así la liberación del reactivo líquido contenido dentro de la bolsa de líquido. Controlando la corriente (energía) en los

ES 2 309 022 T3

electrodos 27 y conjuntamente con los medios antes mencionados para la monitorización de la velocidad de flujo de fluido, puede obtenerse un sistema de control de flujo de fluido de lazo cerrado. Dicha puesta en práctica abre muchas posibilidades para un buen control de las reacciones, como la velocidad del fluido (y, por lo tanto, el tiempo de residencia en distintas zonas de reacción) que puede independientemente controlarse y monitorizarse en diferentes puntos en el ciclo de procesamiento.

La Figura 6 muestra un cartucho que no está dentro del alcance de las reivindicaciones. El cartucho 161 consiste en una parte superior 163 y una parte de fondo 165 con una parte central 167 entre ambas. Preferiblemente, la parte central 167 es una placa de circuito impreso que tiene una circuitometría eléctrica 169. La unión de la placa 167 con la parte de fondo 165 forma una pared de las zonas de flujo de fluido. La trayectoria del flujo de la muestra incluye, en una dirección aguas abajo, una cámara de lisis 173, un chip de flujo continuo 177 y una cámara de residuos de salida 203. La trayectoria de flujo de elución incluye el chip de flujo continuo 177, una cámara de reactivo 179 y una cámara de reacción 181.

Tal y como se muestra en la Figura 6 y el detalle de la Figura 7, la cámara para la lisis 173 tiene un papel de filtro tratado químicamente 183 que acepta la muestra. El tapón 185 está conectado a la parte superior mediante un brazo flexible 187 y hecho para cubrir la cámara de lisis 173 después de añadirse la muestra. El brazo incluye una membrana 189 hecha de material tal como Gorotex® que permite la transmisión de gases pero evita el flujo del fluido. Un desecador 191 se sitúa en el brazo sobre la membrana 189. Se sitúa un calentador 193 sobre el circuito impreso 167 debajo del orificio de la muestra y calienta el papel de filtro 183 y la muestra cuando el brazo está en la posición de cerrado.

En funcionamiento, después de añadir la muestra al papel de filtro 183, el calentador seca la muestra y la humedad sube a través de la membrana 189 y se absorbe dentro del desecador 191. Al mismo tiempo, los compuestos químicos impregnados en el papel lisan las células y unen distintas moléculas biológicas al mismo papel. La parte de fondo del cartucho incluye una cámara de almacenamiento de lavado 195 que se conecta mediante el canal 197 al orificio de la muestra en un área debajo del papel de filtro 183. De esta manera, después de secar la muestra, el fluido lavado se fuerza a fluir desde C hasta D, tal y como se representa en la Figura 7, a través del papel de filtro 183 para quitar y/o eluir los compuestos químicos de procesamiento que están presentes en el papel de filtro. Se impide el flujo de los compuestos químicos de procesamiento y lavado dentro de desecador por la membrana 189 y sale la muestra a través de la salida D.

Tal y como se muestra en la Figura 6 y el detalle de la Figura 8, el fluido de residuo se lava lejos de la trayectoria de flujo de la muestra y se redirige hacia la cámara de residuos 201 mediante un desviador de flujo 174. Los desviadores de flujo 174 y 175 pueden comprender una membrana capilar o hidrofóbica para permitir que el fluido pase cuando tiene lugar una presión de retroceso crítica en las zonas antes de los desviadores. El fluido residual que llena la cámara de residuos 201 genera presión en la zona 176. Una vez la cámara de residuos 201 se llena con el fluido, la presión en la zona 176 hace funcionar el desviador 174 para permitir el paso del fluido. Simultáneamente, la muestra en la cámara de lisis 173 se calienta mediante el calentador 193 provocando la liberación del ácido nucleico desde el papel de filtro 183 y el flujo a través de la salida D.

La muestra fluye a lo largo de la trayectoria de flujo de la muestra a través del desviador 174 y dentro del chip 177 donde se extrae el analito diana. Los componentes residuales que fluyen del chip 177 se redirigen mediante el desviador de flujo 175 dentro de una segunda cámara de residuos 203. Los componentes residuales que se recogen en una segunda cámara de residuos 203 crean presión de retroceso en la zona 178. Una vez los componentes residuales llenan la segunda cámara de residuos 203, la presión en la zona 178 es suficiente para liberar el desviador 175 y permitir el paso del fluido. Simultáneamente, se aplica voltaje o calor al chip 177 a través de los conectores en el circuito impreso 167, liberando el analito diana. De esta manera, el analito fluye hacia abajo la trayectoria de flujo de elución y dentro de una cámara de reactivo 179 donde los reactivos previamente secados se reconstituyen y mezclan con el analito. La mezcla continua fluyendo y llenando la cámara de reacción 181. La trayectoria de flujo de elución termina en la cámara de reacción 181 donde tiene lugar una amplificación, por ejemplo por PCR.

Las realizaciones de la presente invención muestran el problema histórico del consumo de tiempo y la tarea difícil de someter la lisis proporcionando un procedimiento y dispositivo para una rápida lisis de componentes de una muestra, por ejemplo, células, esporas o microorganismos, utilizando ultrasonidos. La lisis ultrasónica puede realizarse en un cartucho completamente integrado, tal como el cartucho de la Figura 2 o puede realizarse con un cartucho que lleva a cabo sólo la lisis de los componentes de una muestra.

La Figura 9 muestra un dispositivo para someter a lisis los componentes de una muestra, por ejemplo, células, esporas o microorganismos. El dispositivo incluye un cartucho 70 que tiene un orificio de entrada 72 para la introducción de la muestra dentro del cartucho y una cámara para lisis 74 en comunicación fluida con el orificio de entrada 72 para la recepción de la muestra. El cartucho también incluye un orificio de salida 76 para la salida de la muestra de la cámara 74.

La cámara 74 contiene una fase sólida para capturar los componentes de la muestra que se van a someter a lisis. Las fases sólidas adecuadas para la captura de las células, esporas o microorganismos incluyen, por ejemplo, filtros, perlas, fibras, membranas, fibra de lana, papel de filtro, polímeros y geles. La fase sólida puede capturar los componentes de la muestra deseados a través de una retención física, por ejemplo, exclusión por tamaño, a través de una retención

ES 2 309 022 T3

por afinidad o a través de una selección química. En la presente y preferida realización, la fase sólida comprende una membrana o filtro 86 para la captura de los componentes que se van a someter a lisis. Los materiales de filtro adecuados incluyen vidrio, fibra de vidrio, nylon, derivados del nylon, celulosa, derivados de celulosa y otros polímeros. En una realización alternativa, la fase sólida comprende perlas de poliestireno, sílice, agarosa, celulosa o acrilamida.

5 El dispositivo también incluye un transductor ultrasónico, tal como un brazo ultrasónicos 88, que está unido al cartucho para transferir la energía ultrasónica a los componentes capturados en la fase sólida, por ejemplo, capturados sobre el filtro 86. Se prefiere en esta realización un brazo ultrasónico en miniatura como transductor porque permite centrar la energía ultrasónica sobre los componentes capturados en la fase sólida. A este extremo, también es preferible
10 que el brazo 88 esté unido al cartucho 70 de tal manera que el eje longitudinal del brazo 88 sea perpendicular al filtro 86. De forma adicional, el brazo 88 está preferiblemente unido directamente a la pared de la cámara 74.

En funcionamiento, un fluido de muestra se introduce en el orificio de entrada 72 y se hace fluir hacia la cámara 74. A medida que la muestra fluye hacia la cámara 74, los componentes de la muestra a someter a lisis se capturan
15 por el filtro 86. Puede hacerse que la muestra fluya continuamente a través de la cámara 74 o el cartucho 70 puede incluir controladores de flujo, por ejemplo, válvulas para alojar el fluido de la muestra en la cámara 74 para la lisis. Es adecuado el procesamiento de flujo continuo para volúmenes de muestra muy grandes, por ejemplo, 1 ml o superiores, mientras el alojamiento de la muestra en la cámara 74 puede ser apropiado para volúmenes de muestra más pequeños, por ejemplo 100 μm .

20 Los componentes de la muestra capturados en el filtro 86 se someten, a continuación, a lisis mediante la transferencia de energía ultrasónica desde el brazo 88 hacia los componentes capturados. La energía ultrasónica provoca una lisis rápida de las células, esporas o microorganismos capturados en el filtro. Como ejemplo específico, se consiguió una rápida lisis de esporas en 100 μl de muestra aplicando ultrasonidos durante treinta segundos a una frecuencia de 47
25 Hz y una salida ultrasónica de 50 vatios. En este caso es preferible una salida ultrasónica comprendida en el intervalo de 10 a 60 vatios. La lisis por ultrasonidos puede llevarse a cabo con o sin la utilización de reactivos para la lisis, por ejemplo, chaotropos, detergentes, sales y agentes reductores. La lisis ultrasónica permite la selección de la solución tampón/resuspensión en relación al protocolo posterior a la lisis (por ejemplo, un tampón que no sea inhibidor de la PCR).

30 Generalmente, el transductor ultrasónico será un componente separado del cartucho y unido al cartucho mediante un operador o máquina. De forma alternativa, el transductor puede situarse en un instrumento externo que recibe el cartucho para el procesamiento. En esta realización, preferiblemente el transductor se situará en el instrumento de tal manera que presiona contra una pared de la cámara de lisis cuando el cartucho se inserta dentro del instrumento para su procesamiento. En otra realización, el transductor puede empotrarse dentro del cartucho. En esta realización, el
35 cartucho incluye conectores eléctricos adecuados para la conexión del transductor a una fuente de energía. En las realizaciones en las cuales el transductor está empotrada en el cartucho, el transductor debe evitar contactar directamente la muestra de fluido, por ejemplo, el transductor debe estar laminado o separado de la muestra por una pared de la cámara.

40 El cartucho 70 puede fabricarse utilizando técnicas previamente descritas para el cartucho de la Figura 2. En particular, preferiblemente el cartucho 70 comprende una primera y segunda partes plásticas moldeadas 78 y 80 que soportan el filtro 86. Opcionalmente, el filtro 86 puede estar sellado en caliente a las partes plásticas 78 y 80. El cartucho también incluye una primera y segunda película plástica 82 y 84 selladas a las partes 78 y 80, respectivamente. Ejemplos de materiales adecuados para las partes plásticas 78 y 80 y para las películas 82 y 84 incluyen, por
45 ejemplo, polímeros de policarbonato, poliestireno, polipropileno, polietileno, acrílicos y comerciales. Para facilitar la transferencia de energía ultrasónica a los componentes de la muestra, es preferible que las películas 82 y 84 sean relativamente delgadas. Las películas 82 y 84 preferiblemente tienen un espesor en el intervalo de 0,01 a 0,5 mm y, más preferiblemente, tienen un espesor de aproximadamente 0,05 mm.

50 La Figura 10 muestra una realización de un cartucho para los componentes de una muestra que se someta a la lisis ultrasónicamente. El cartucho 90 incluye perlas 94 en su cámara de lisis para la rotura de los componentes capturados sobre la fase sólida. El cartucho 90 también incluye un transductor ultrasónico 92 en forma de un disco unido a una pared de la cámara. En funcionamiento, el transductor 92 transfiere la energía ultrasónica a los componentes de la muestra capturados para realizar la lisis. La energía ultrasónica también agita las perlas de manera que las perlas rompen los componentes de la muestra para realiza la lisis. Las perlas adecuadas para la rotura de los componentes de una muestra incluyen poliestireno y sílice. Las perlas pueden ser porosas o no porosas y, preferiblemente, tienen un diámetro en el intervalos de 1 a 200 μm . Como ejemplo específico, la cámara de lisis ultrasónica puede tener una capacidad en volumen de 110 μl y contener 10 μl de perlas de vidrio.

60 Aunque la realización de la Figura 10 muestra cartuchos que llevan a cabo sólo funciones de lisis, se entiende que la lisis ultrasónica de la presente invención puede incorporarse dentro de los cartuchos que realizan una variedad de otras funciones. Por ejemplo, haciendo referencia de nuevo a la Figura 2, un transductor ultrasónico puede unirse a la cámara de lisis 119 para someter a lisis células, esporas o microorganismos en una muestra de fluido y las perlas introducidas
65 en la cámara 119 rompen los componentes de la muestra. En otra realización, un elemento de calentamiento puede utilizarse en combinación con un transductor ultrasónico para realizar la lisis de componentes de la muestra capturados sobre una fase sólida.

ES 2 309 022 T3

Aunque la descripción de más arriba contiene muchas especificidades, estas no deben entenderse como limitaciones del alcance de la invención, sino meramente como ilustraciones de algunas de las realizaciones preferidas actuales. Las variaciones y modificaciones posibles de la invención serán aparentes para un experto en la materia después de considerar esta descripción.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 309 022 T3

REIVINDICACIONES

1. Cartucho para someter a lisis los componentes de una muestra fluida, presentando el cartucho:

5 a) un orificio de entrada para la introducción de la muestra dentro del cartucho;

b) una cámara para lisis que contiene una membrana o filtro para capturar los componentes a medida que la muestra fluye a través de la cámara de lisis;

10 c) un orificio de salida para la salida de la muestra de la cámara de lisis; y

d) perlas en la cámara de lisis para la rotura de los componentes;

15 donde la cámara de lisis tiene una pared en la cual puede acoplarse un transductor ultrasónico para realizar la transferencia de energía ultrasónica a la cámara de lisis.

2. Cartucho según la reivindicación 1, donde las perlas tienen un diámetro comprendido en el intervalo de 1 a 200 μm .

20 3. Cartucho según las reivindicaciones 1 ó 2, donde la pared comprende un material polimérico y donde la pared tiene un espesor comprendido en el intervalo de 0,01 a 0,5 mm.

4. Dispositivo para someter a lisis compuestos de una muestra, comprendiendo el dispositivo

25 a) un cartucho según cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y

b) un transductor ultrasónico para transferir energía ultrasónica a la cámara de lisis para agitar las perlas y de esta manera romper los componentes, en donde el transductor está acoplado a la pared de la cámara de lisis.

30 5. Dispositivo según la reivindicación 4, donde el transductor comprende un brazo ultrasónico.

6. Procedimiento para someter a lisis compuestos de una muestra fluida, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

35 a) introducir la muestra dentro del cartucho que tiene la cámara de lisis, en donde la cámara de lisis contiene una membrana o filtro para capturar los componentes;

b) forzar la muestra a fluir a través de la cámara de lisis para capturar los componentes en la membrana o filtro; y

40 c) agitar las perlas en la cámara de lisis para someter a lisis los componentes, en donde las perlas están agitadas por la transferencia de energía ultrasónica a la cámara de lisis utilizando un transductor ultrasónico acoplado a una pared de la cámara.

45 7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde las perlas tienen un diámetro comprendido en el intervalo de 1 a 200 μm .

8. Procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, donde la pared comprende un material polimérico, y donde la pared tiene un espesor comprendido en el intervalo de 0,01 a 0,5 mm.

50 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el transductor comprende un brazo ultrasónico.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, donde el volumen de la muestra forzada a fluir a través de la cámara de lisis es mayor que la capacidad en volumen de la cámara de lisis.

55 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde el volumen de la muestra forzada a fluir a través de la cámara de lisis es por lo menos 1 ml.

60

65

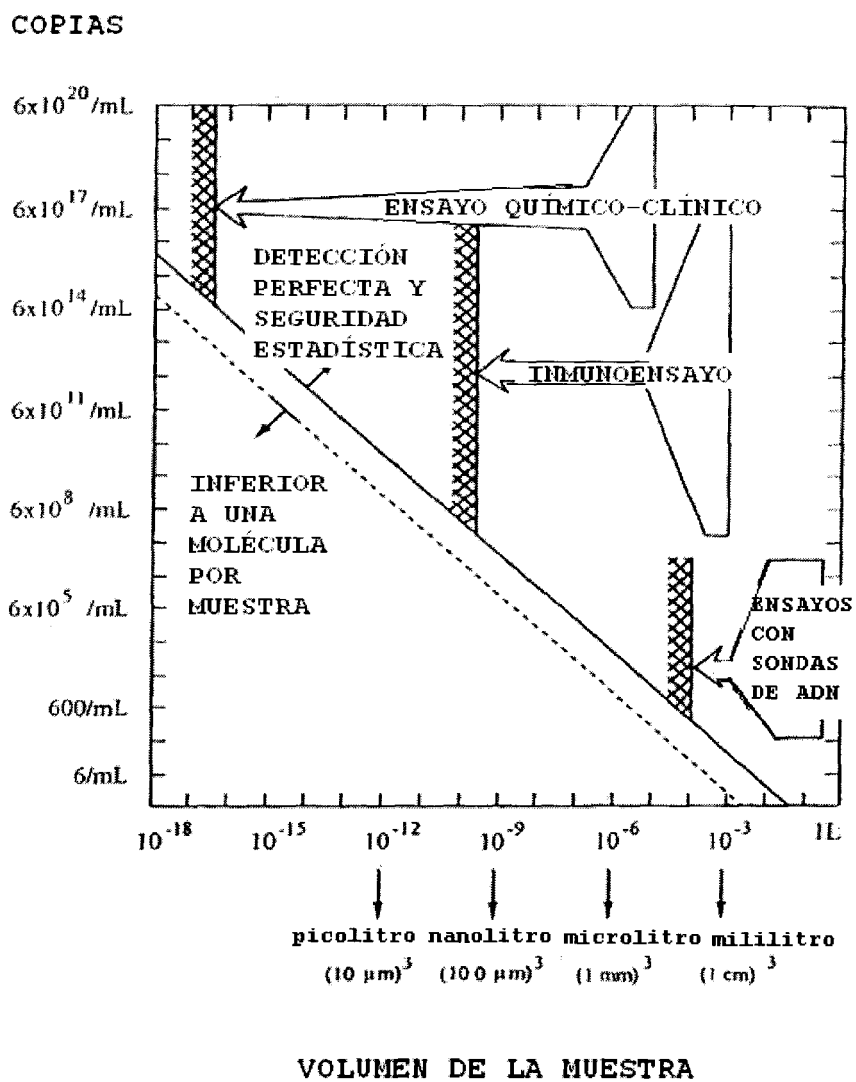


FIG. 1

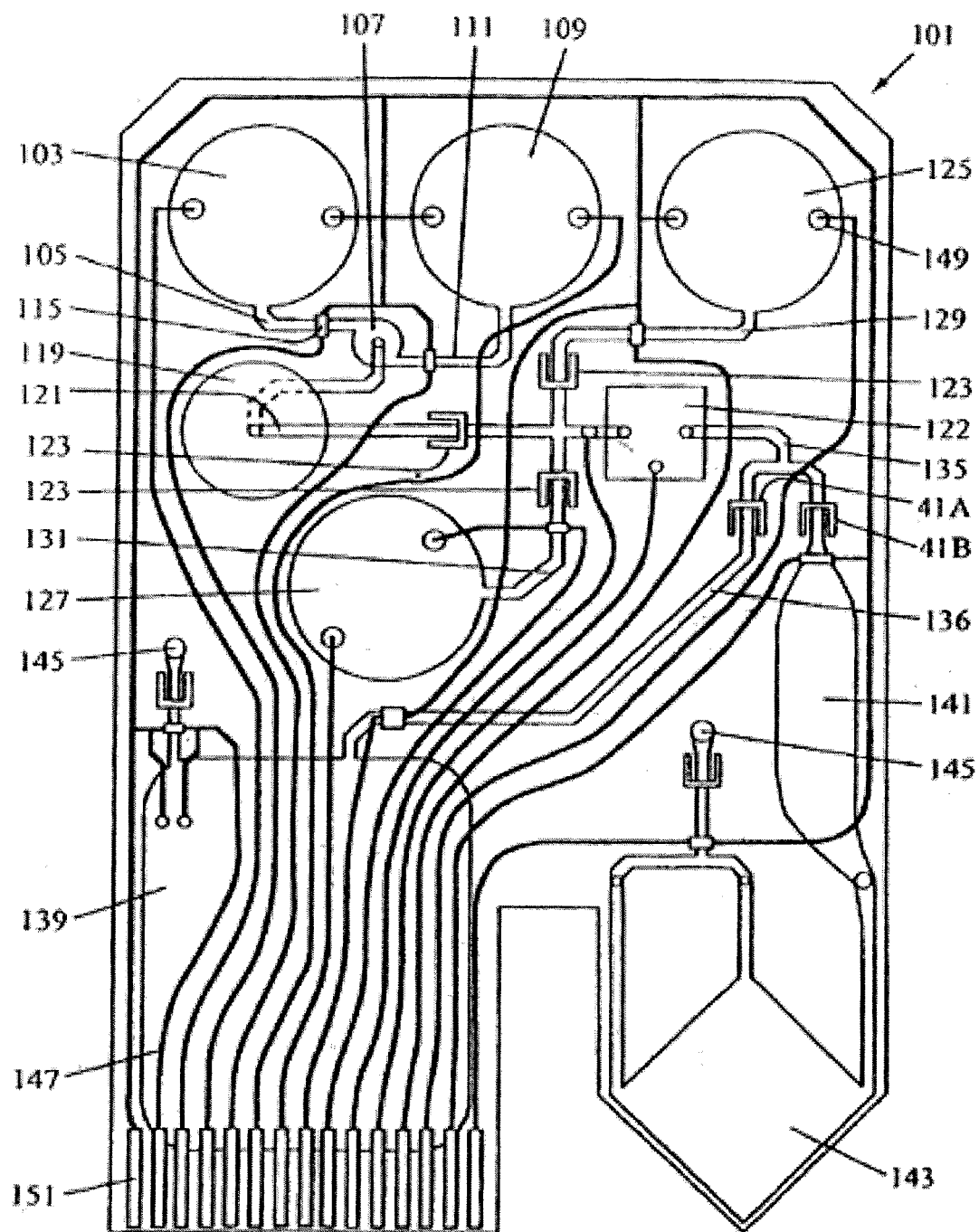


FIG. 2

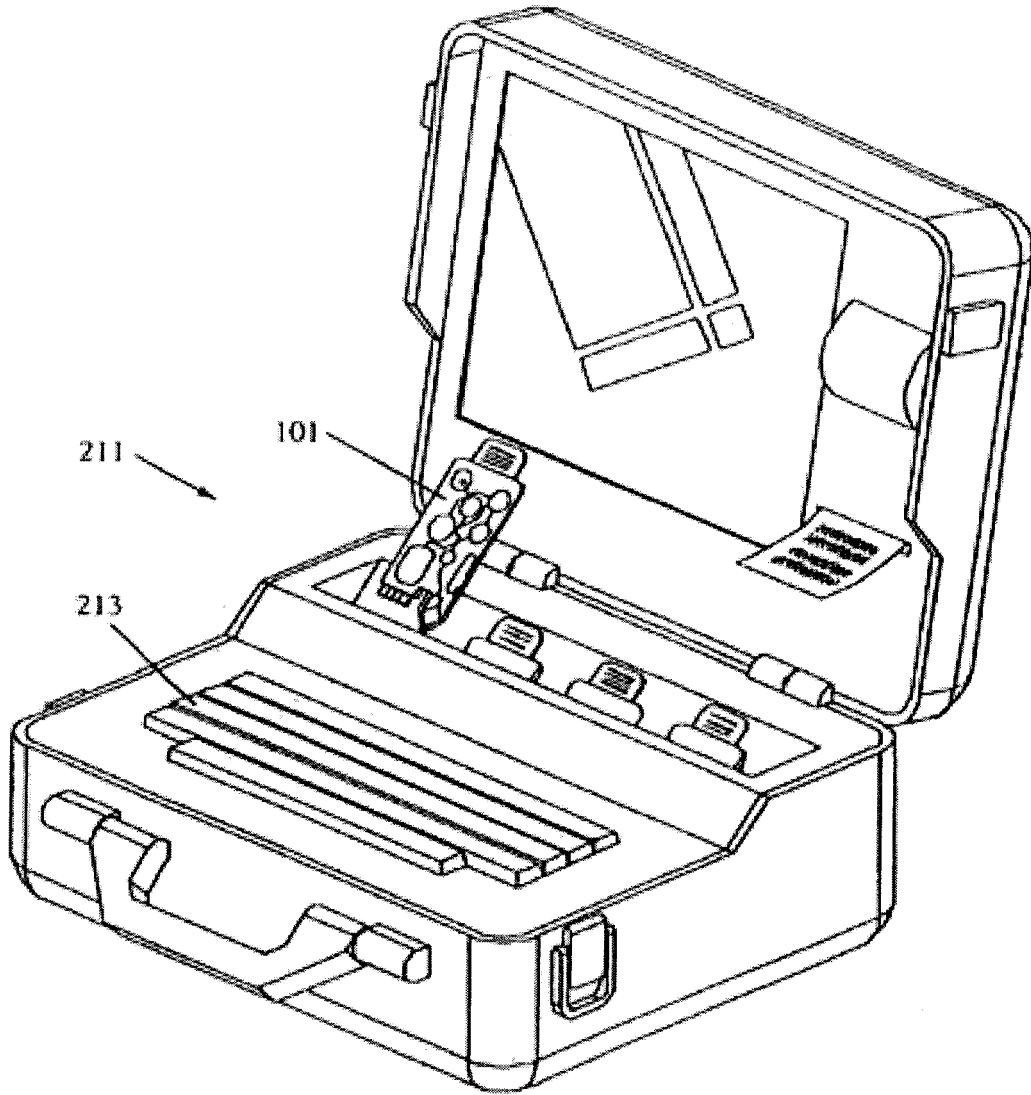


FIG. 3

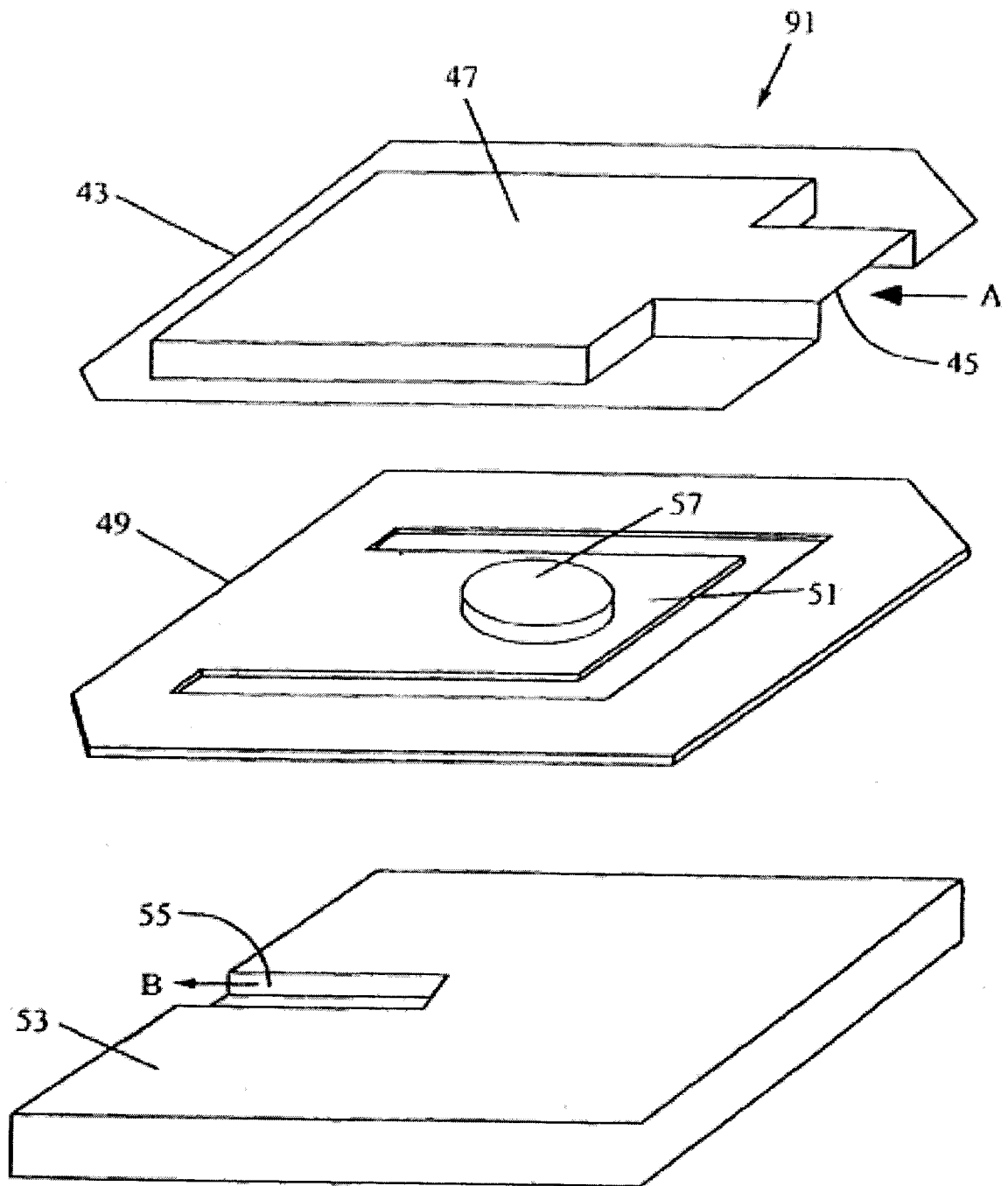
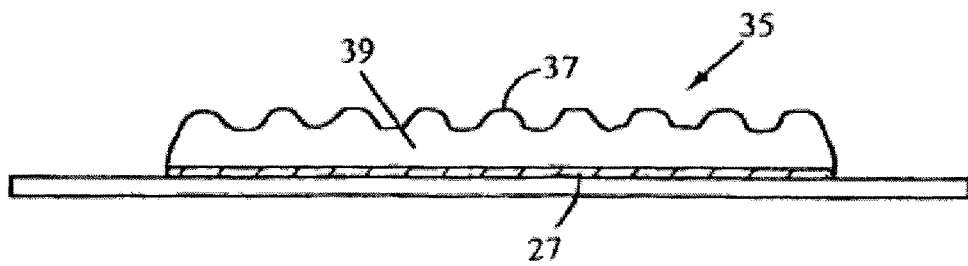
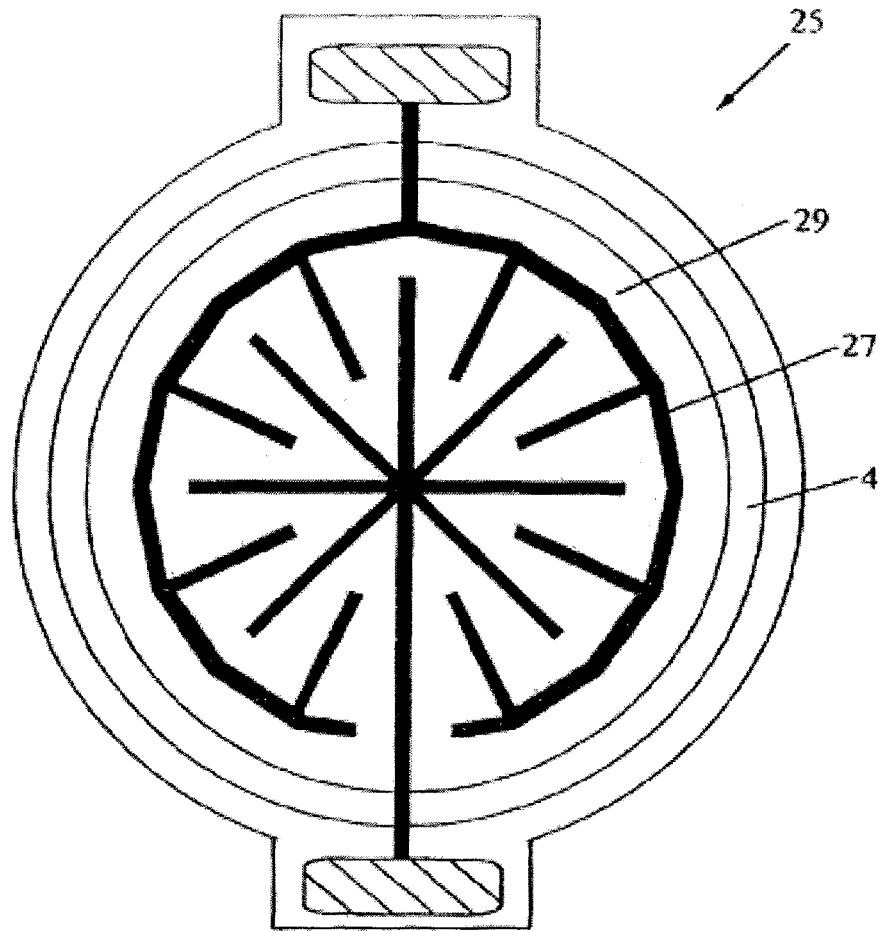


FIG. 4



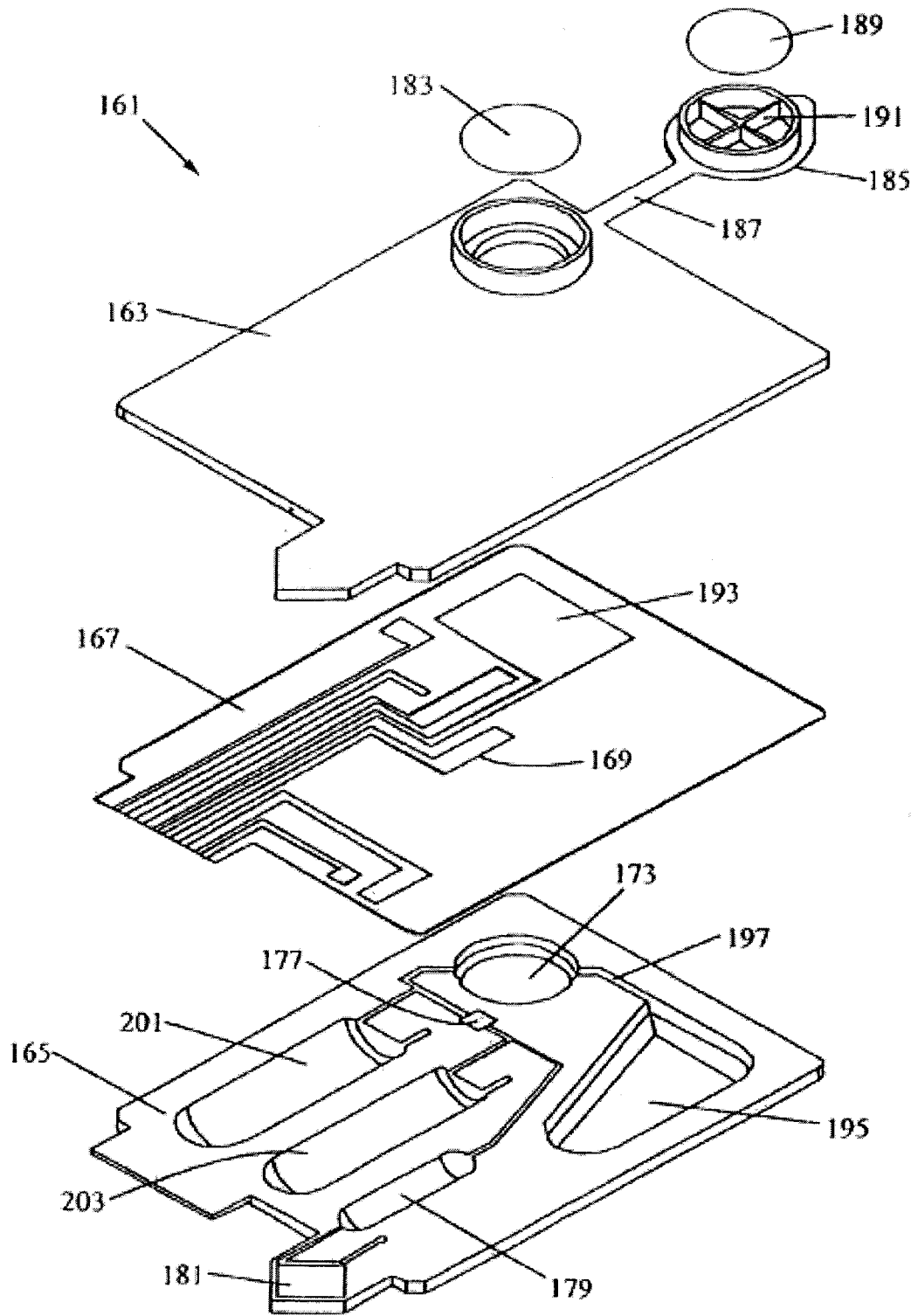


FIG. 6

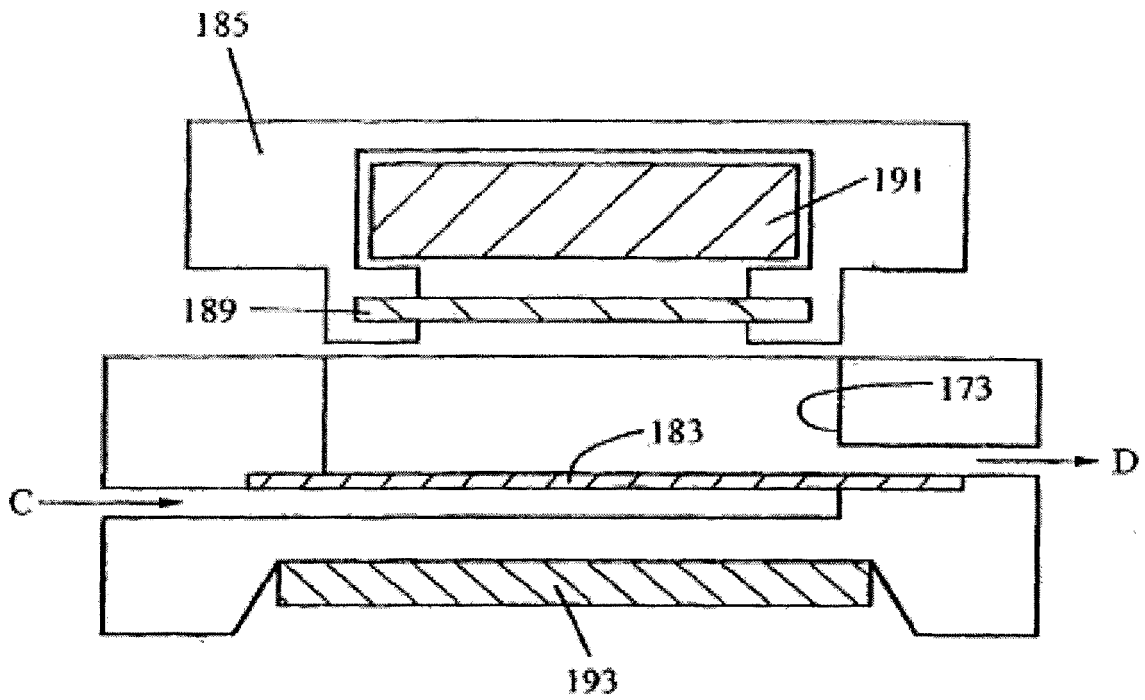


FIG. 7

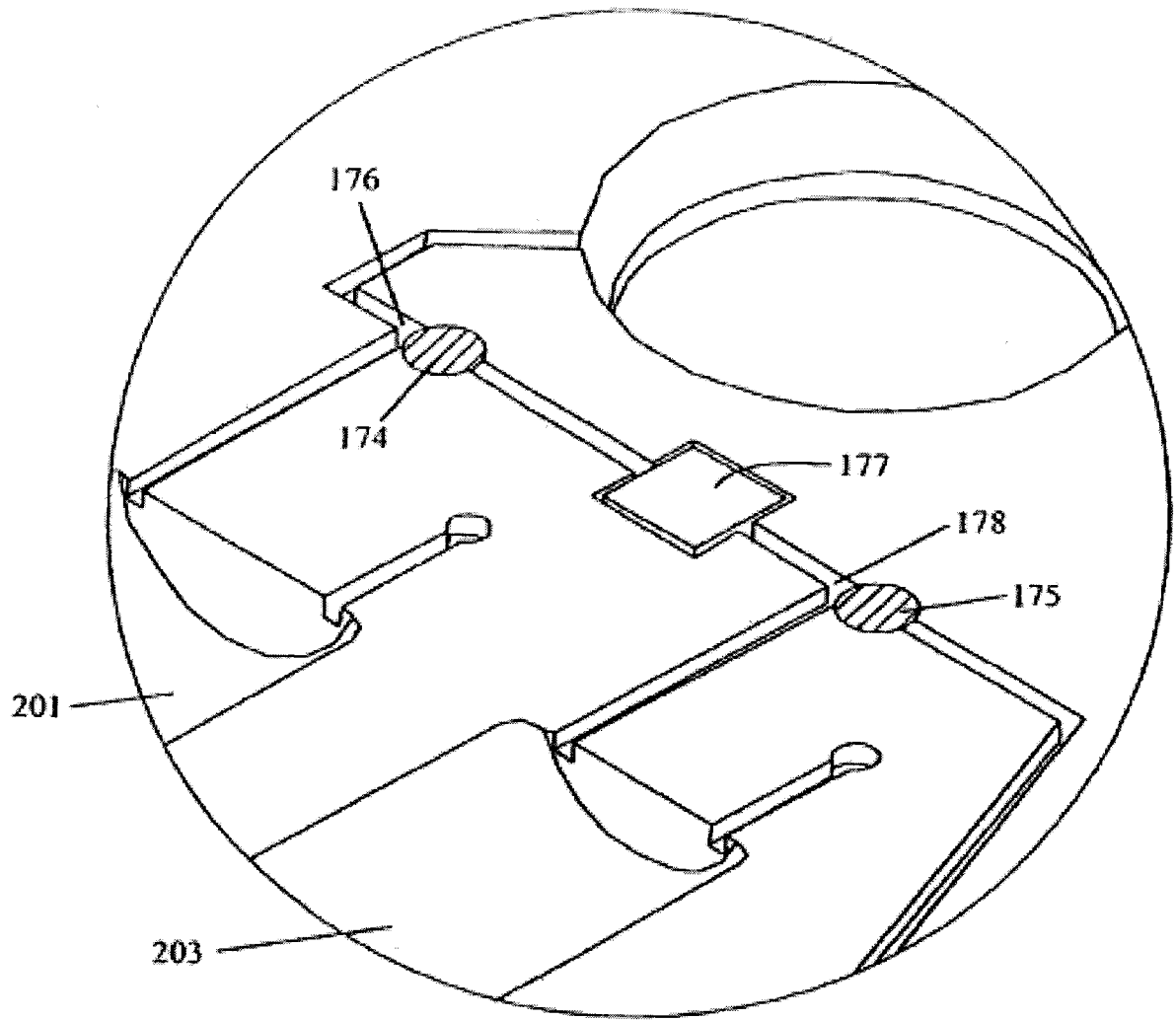


FIG. 8