(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 920 392**

(51) Int. CI.:

B01L 3/00 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)
B01L 9/00 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2008 E 16191793 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2022 EP 3144065**

(54) Título: **Aparato integrado para la realización de pruebas de extracción de ácido nucleico y diagnóstico en múltiples muestras biológicas**

(30) Prioridad:

13.07.2007 US 959437 P
14.11.2007 US 985577

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2022

(73) Titular/es:

HANDYLAB, INC. (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US

(72) Inventor/es:

WILLIAMS, JEFF;
WILSON, KERRY y
HANDIQUE, KALYAN

(74) Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

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

Aparato integrado para la realización de pruebas de extracción de ácido nucleico y diagnóstico en múltiples muestras biológicas

CAMPO TÉCNICO

[0001] La tecnología descrita en esta solicitud se refiere generalmente a un sistema que comprende un cartucho microfluídico y un aparato de diagnóstico para amplificar y llevar a cabo análisis de diagnóstico en nucleótidos a partir de muestras biológicas.

ANTECEDENTES

[0002] La industria del diagnóstico médico es un elemento crítico de la infraestructura sanitaria actual. Sin embargo, en la actualidad, los análisis de diagnóstico in vitro, por más rutinarios que sean, se han convertido en un cuello de botella en la atención al paciente. Hay varias razones para ello. En primer lugar, muchos análisis de diagnóstico solo se pueden realizar con equipos altamente especializados que son caros y solo operables por médicos capacitados. Tal tipo de equipo se encuentra solo en unos pocos lugares, a menudo solo uno en una zona urbana determinada. Esto significa que la mayoría de los hospitales están obligados a enviar muestras para análisis a estos lugares, incurriendo así en costos de envío y retrasos en el transporte, e incluso posiblemente pérdida de muestras o mal manejo. En segundo lugar, el equipo en cuestión no suele estar disponible «a demanda», sino que funcionan en lotes, lo que retrasa el tiempo de procesamiento de muchas muestras porque deben esperar a que una máquina se llene antes de poder funcionar.

[0003] Entendiendo que el flujo de muestras se divide en varias etapas claves, sería deseable considerar formas de automatizar tantos de estos como sea posible. Por ejemplo, una muestra biológica, una vez extraída de un paciente, debe ponerse en una forma adecuada para un régimen de procesamiento que típicamente implica el uso de PCR para amplificar un vector (tal como un nucleótido) de interés. Una vez amplificada, la presencia de un nucleótido de interés de la muestra debe determinarse de forma inequívoca. La preparación de muestras para la PCR es actualmente un paso que requiere mucho tiempo y trabajo, aunque no requiere habilidades especializadas, y podría automatizarse de manera útil. Por el contrario, las etapas como la PCR y la detección de nucleótidos (o "pruebas de ácido nucleico") generalmente solo han estado dentro de la brújula de personas especialmente capacitadas que tienen acceso a equipos especializados.

[0004] Existe la necesidad de un procedimiento y aparato para llevar a cabo la preparación de muestras en muestras en paralelo, con o sin PCR y detección en las muestras biológicas preparadas, y preferentemente con alto rendimiento, pero de una manera que se puede realizar de manera rutinaria en el punto de atención, o sin necesidad de que la muestra se envíe a un centro especializado.

[0005] El documento US 2002/0001848 describe dispositivos, métodos y sistemas para procesar materiales de muestra, que pueden proporcionar un puente entre los sistemas, métodos, protocolos, etc. de placas de microtitulación estándar (que incluyen pocillos dispuestos en matrices rectangulares) y dispositivos y sistemas de procesamiento de muestras giratorios que permiten a los usuarios obtener las ventajas de procesamiento rápido de los dispositivos de procesamiento de muestras más avanzados. Los dispositivos de procesamiento de muestras incluyen preferiblemente un cuerpo rectangular para mejorar la compatibilidad de los dispositivos de procesamiento de muestras de la presente invención con equipos diseñados para uso con placas de microtitulación más convencionales (que típicamente tienen forma rectangular). Los dispositivos de procesamiento de muestras también incluyen al menos un conjunto de cámaras de procesado dispuestas en uno o más arcos circulares y pueden incluir cámaras de entrada y/o salida dispuestas en una matriz en rejilla rectilínea.

[0006] En el documento US 2007/0026421 A1 se describe tecnología anterior adicional.

[0007] La descripción de los antecedentes en esta solicitud se incluye para explicar el contexto de las invenciones descritas en esta solicitud. Esto no debe considerarse como una admisión de que cualquiera de los materiales a los que se hace referencia fue publicado, conocido o formaba parte del conocimiento general común en la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

[0008] A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la memoria descriptiva, la palabra «comprende» y sus variaciones, tales como «que comprende» y «comprende», no pretende excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

RESUMEN

[0009] El alcance de la protección se define en la reivindicación independiente, a la cual se hace referencia a continuación. Las características opcionales se proporcionan en las reivindicaciones independientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS SELECCIONADOS

[00010]

La figura 1A muestra un esquema de un aparato preparatorio; la figura 1B muestra un esquema de un aparato de diagnóstico.

La figura 2 muestra un esquema de los circuitos de control.

Las figuras 3A y 3B muestran vistas exteriores de un aparato ejemplar.

La figura 4 muestra una vista interior ejemplar de un aparato.

La figura 5 muestra vistas en perspectiva de un portaobjetos ejemplar para soportes de muestra.

La figura 6 muestra vistas en perspectiva del portaobjetos de la figura 5 junto con una unidad calentadora.

La figura 7 muestra una vista en perspectiva de un portaobjetos ejemplar para soportes de muestra.

Las figuras 8A - 8K muestran varias vistas del portaobjetos de la figura 7.

La figura 9 muestra un área de un aparato configurado para aceptar un portaobjetos de la figura 7.

Las figuras 10A y 10B muestran una primera realización ejemplar de un soporte de reactivo que tiene una funda de pipeta, en vista en perspectiva (figura 10A) y vista inferior (figura 10B).

La figura 11 muestra un ejemplo de un soporte de reactivo que no tiene una funda de pipeta, en vista en perspectiva.

Las figuras 12A - 12C muestran un ejemplo alternativo de un soporte de reactivo que tiene una funda de pipeta, en vista en perspectiva (figura 12A) y vista en sección transversal (figura 12B), y vista en despiece (figura 12C).

Las figuras 13A y 13B muestran un elemento estrellado en el interior de un tubo de reactivo, en vista transversal (figura 13A) y en planta (figura 13B).

La figura 14 muestra una secuencia de operaciones de pipeteo junto con un tubo de reactivo que tiene un rasgo estrellado.

La figura 15 muestra una capa laminada.

La figura 16 muestra una secuencia de operaciones de pipeteo junto con una capa laminada.

Las figuras 17A - 17D muestran un kit ejemplar que contiene soportes y reactivos.

La figura 18 muestra un cabezal dispensador de líquido.

Las figuras 19A - 19C muestran un cabezal dispensador de líquido.

La figura 20 muestra un colector de distribución ejemplar.

La figura 21 muestra un cabezal de lectura de escaneo unido a un cabezal dispensador de líquido.

La figura 22 muestra un escáner de código de barras en vista transversal.

La figura 23 muestra un lector de códigos de barras colocado sobre un cartucho microfluídico.

La figura 24 muestra sensores de punta de pipeta.

Las figuras 25A y 25B muestran un dispositivo ejemplar para separar la punta de la pipeta.

La figura 26 muestra una unidad calentadora en perspectiva y en vista en sección transversal.

La figura 27 muestra un calentador integrado y una unidad separadora en vista transversal.

La figura 28 muestra un autocargador de cartuchos.

La figura 29 muestra un apilador de cartuchos.

La figura 30 muestra un apilador de cartuchos en posición para suministrar un cartucho a un autocargador.

La figura 31 muestra un sistema de carga de cartuchos.

La figura 32 muestra una unidad de eliminación para cartuchos usados.

La figura 33 muestra un apilador de cartuchos en configuraciones completas y vacías.

La figura 34 muestra un cartucho microfluídico, un cabezal de lectura y una bandeja de cartucho.

La figura 35 muestra una sección transversal de un cabezal de pipeteo y un cartucho en posición en un aparato microfluídico.

La figura 36 muestra un cartucho microfluídico ejemplar que tiene una construcción de 3 capas.

La figura 37 muestra un plan de circuitos microfluídicos y entradas en un cartucho de múltiples carriles ejemplar.

La figura 38A muestra un cartucho de múltiples carriles ejemplar.

La figura 38B muestra una parte de un cartucho de múltiples carriles ejemplar.

Las figuras 39A, 39B muestran una red microfluídica ejemplar en un carril de un cartucho de múltiples carriles;

Las figuras 40A - 40C muestran diagramas ejemplares de válvulas microfluídicas. La figura 40A muestra adicionalmente la válvula en un estado abierto, y la válvula en un estado cerrado.

La figura 41 muestra un conducto de ventilación.

La figura 42 muestra un cartucho microfluídico altamente multiplexado ejemplar;

las figuras 43-46 muestran diversos aspectos ejemplares de cartuchos microfluídicos altamente multiplexados; y

las figuras 47A-C muestran diversos aspectos de un cartucho microfluídico altamente multiplexado configurado radialmente.

La figura 48 muestra una vista en sección transversal de un cartucho microfluídico.

Las Figuras 49A, 49B muestran una cámara de reacción de PCR y calentadores asociados.

La figura 50 muestra imágenes térmicas de los circuitos del calentador en funcionamiento.

Las figuras 51A-51C muestran varias secciones de corte que pueden usarse para mejorar las velocidades de enfriamiento durante el ciclado térmico de PCR.

La figura 52 muestra una gráfica de temperatura contra el tiempo durante un procedimiento de PCR, tal como se realiza en un cartucho microfluídico tal como se describe en esta solicitud.

La figura 53 muestra un procedimiento de ensamblaje para un cartucho como se describe adicionalmente en esta solicitud.

Las figuras 54A y 54B muestran un aparato ejemplar para llevar a cabo la deposición de cera.

Las figuras 55A y 55B muestran depósito ejemplar de gotas de cera en válvulas microfluídicas.

La figura 56 muestra una superposición de un conjunto de elementos calentadores en un cartucho microfluídico de múltiples carriles ejemplar, donde se ven varias redes microfluídicas.

La figura 57 muestra una vista de sección transversal de un detector ejemplar.

La figura 58 muestra una vista en perspectiva de un detector en un cabezal de lectura.

La figura 59 muestra una vista recortada de un detector ejemplar en un cabezal de lectura.

La figura 60 muestra una vista exterior de un cabezal de lectura multiplexado ejemplar con un conjunto de detectores en el mismo.

La figura 61 muestra una vista recortada de un cabezal de lectura multiplexado ejemplar con un conjunto de detectores en el mismo.

La figura 62 muestra un diagrama de bloques de circuitos electrónicos ejemplares junto con un detector como se describe en esta solicitud.

La figura 63 muestra un sistema dispensador de líquido ejemplar.

la figura 64 muestra un calentador/separador ejemplar.

Las figuras 65A y 65B muestran aspectos ejemplares de una interfaz de usuario basada en ordenador.

La figura 66 muestra esquemáticamente la disposición de los componentes de un aparato preparatorio.

La figura 67 muestra la disposición de los componentes de un aparato preparatorio ejemplar.

La figura 68 muestra esquemáticamente la disposición de los componentes de un aparato de diagnóstico.

La figura 67 muestra la disposición de los componentes de un aparato de diagnóstico ejemplar.

Las figuras 70 y 71 muestran el exterior y el interior de un aparato de diagnóstico ejemplar.

Las figuras 72A y 72B muestran una unidad de termociclado configurada para aceptar un cartucho microfluídico.

La figura 73 muestra esquemáticamente una disposición de los componentes de un aparato de diagnóstico de alta eficiencia.

La figura 74 muestra la disposición de los componentes de un aparato de diagnóstico de alta eficiencia ejemplar.

La figura 75 muestra una vista en planta de un cartucho microfluídico de 24 carriles.

La figura 76 muestra una vista en perspectiva del cartucho de la figura 75.

La figura 77 muestra una vista en despiece del cartucho de la figura 75;

La figura 78 muestra una unidad de detección ejemplar.

Las figuras 79A, 79B muestran partes recortadas de la unidad de detección de la figura 78.

Las figuras 80 y 81 muestran la alineación de la unidad de detección con un cartucho microfluídico.

Las figuras 82 y 83 muestran exterior y cortes, respectivamente, de un bloque óptico.

La figura 84 muestra una reacción de Escorpión, esquemáticamente.

Las figuras 85A-85C muestran, esquemáticamente, el uso del cabezal de pipeta durante varios procedimientos preparatorios.

Las figuras 86 - 91 muestran diseños ejemplares de circuitos de control de electrónica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00011] La prueba de ácido nucleico (NAT), tal como se usa en esta solicitud, es un término general que abarca tanto la prueba de ADN (ácido desoxirribonucleico) como de ARN (ácido ribonucleico). En esta solicitud, se describen protocolos ejemplares que son específicos de ARN y ADN. Debe entenderse que las descripciones generalizadas donde no son específicas de ARN o ADN se aplican a cada uno por igual o pueden adaptarse fácilmente a cualquiera con variaciones menores de la descripción en esta solicitud como susceptibles para un experto en la materia. También debe entenderse que los términos ácido nucleico y polinucleótido pueden usarse indistintamente en esta solicitud.

[00012] Los aparatos tal como se describen en esta solicitud, por lo tanto, encuentran aplicación para analizar cualquier muestra que contenga ácido nucleico para cualquier propósito, que incluya pero no se limite a pruebas

genéticas y pruebas clínicas para diversas enfermedades infecciosas en humanos. Los objetivos para los cuales existen ensayos clínicos actualmente y que pueden analizarse para utilizar el aparato y los procedimientos en esta solicitud pueden ser bacterianos o virales e incluyen, pero sin limitación: Chlamydia trachomatis (CT); Neisseria Gonorrhea (GC); Estreptococo del grupo B; HSV; Tipado HSV CMV; Influenza A y B; MRSA VSR; TB; Trichomonas; Adenovirus; Bordatella; BK; JC; HHV6; EBV; Enterovirus; y M. pneumoniae.

[00013] El aparato en esta solicitud puede configurarse para funcionar en una mesa de laboratorio, o entorno similar, y puede analizarse alrededor de 45 muestras por hora cuando se ejecuta continuamente a lo largo de un día de trabajo normal. Esta cantidad se puede aumentar, de acuerdo con la cantidad de pruebas que se pueden acomodar en un solo lote, como se verá claramente en la descripción de esta solicitud. Los resultados de muestras brutas individuales suelen estar disponibles en menos de 1 hora.

[00014] Cuando se usa en esta solicitud, el término «módulo» debe entenderse como un ensamblaje de componentes, cada uno de los cuales puede tener funciones separadas, distintas y/o independientes, pero que están configurados para funcionar juntos para producir un resultado o resultados deseados. No se requiere que cada componente dentro de un módulo esté conectado directamente o en comunicación directa con todos los demás. Además, la conectividad entre los diversos componentes puede lograrse con la ayuda de un componente, tal como un procesador, que es externo al módulo.

Descripción general del aparato

[00015] Un aparato que tiene varios componentes como se describe adicionalmente en esta solicitud puede configurarse en al menos dos formatos, preparatorio y de diagnóstico, como se muestra respectivamente en las figuras 1A y 1B. Una descripción esquemática de un aparato preparatorio 981 para llevar a cabo la preparación de la muestra como se describe adicionalmente en esta solicitud se muestra en la figura 1A. Una descripción general de un aparato de diagnóstico 971 se muestra en la figura 1B. La disposición geométrica de los componentes de los sistemas 971, 981 que se muestra en las figuras 1A y 1B es ejemplar y no pretende ser limitativa.

[00016] Un procesador 980, tal como un microprocesador, está configurado para controlar las funciones de varios componentes del sistema como se muestra, y por lo tanto está en comunicación con cada uno de tales componentes que requieren control. Debe entenderse que muchas de dichas funciones de control pueden llevarse a cabo opcionalmente de forma manual, y no bajo el control del procesador. Además, el orden en el que se describen las diversas funciones, a continuación, no limita el orden en el que el procesador ejecuta las instrucciones cuando el aparato está funcionando. Por lo tanto, el procesador 980 puede configurarse para recibir datos sobre una muestra para analizar, por ejemplo, de un lector de muestras 990, que puede ser un lector de código de barras, un lector de caracteres ópticos o un escáner de RFID (lector de etiquetas de radiofrecuencia). También debe entenderse que, aunque se muestra que un único procesador 980 controla todas las operaciones de los aparatos 971 y 981, tales operaciones pueden distribuirse, según sea conveniente, en más de un procesador.

[00017] El procesador 980 puede configurarse para aceptar instrucciones de usuario de una entrada 984, donde tales instrucciones pueden incluir instrucciones para comenzar a analizar la muestra y opciones de condiciones operativas. Aunque no se muestra en las figuras 1A y 1B, la entrada 984 puede incluir uno o más dispositivos de entrada seleccionados del grupo que consiste en: un teclado, una superficie sensible al tacto, un micrófono, un panel táctil, un escáner de retina, una proyección holográfica de un dispositivo de entrada y un ratón. Un dispositivo de entrada adecuado puede comprender además un lector de medios electrónicos formateados, tal como, pero sin limitación, una tarjeta de memoria flash, una tarjeta de memoria, un dispositivo USB, un CD o un disquete. Un dispositivo de entrada puede comprender además una característica de seguridad tal como un lector de huellas dactilares, un escáner de retina, un lector de tiras magnéticas o un lector de código de barras, para garantizar que un usuario del sistema esté de hecho autorizado para hacerlo, de acuerdo con las características de identificación precargadas de los usuarios autorizados. Un dispositivo de entrada puede funcionar adicional y simultáneamente como un dispositivo de salida para escribir datos en relación con el análisis de muestras. Por ejemplo, si un dispositivo de entrada es un lector de medios electrónicos formateados, también puede ser un escritor de tales medios. Los datos que pueden escribirse en tales medios mediante dicho dispositivo incluyen, de modo no taxativo, información ambiental, tal como temperatura o humedad, perteneciente a un análisis, así como un resultado de diagnóstico, y datos de identificación para la muestra en cuestión.

[00018] El procesador 980 también puede configurarse para comunicarse con una pantalla 982, de modo que, por ejemplo, la información sobre un análisis se transmita a la pantalla y, por lo tanto, se comunique a un usuario del sistema. Tal información incluye, pero no se limita a: el estado actual del aparato; progreso del termociclado de PCR; y un mensaje de advertencia en caso de mal funcionamiento del sistema o del cartucho. Además, el procesador 980 puede transmitir una o más preguntas que se mostrarán en la pantalla 982 que piden a un usuario que proporcione entrada en respuesta a la misma. Por lo tanto, la entrada 984 y la pantalla pueden integrarse entre sí.

[00019] El procesador 980 puede configurarse opcionalmente además para transmitir los resultados de un análisis a un dispositivo de salida tal como una impresora, una pantalla visual, una pantalla que utiliza una proyección

holográfica, o un altavoz, o una combinación de los mismos.

[00020] El procesador 980 puede conectarse aún más opcionalmente a través de una interfaz de comunicación tal como una interfaz de red a una red informática 988. La interfaz de comunicación puede ser una o más interfaces seleccionadas del grupo que consiste en: una conexión en serie, una conexión paralela, una conexión de red inalámbrica, una conexión USB y una conexión de red por cable. De este modo, cuando el sistema está adecuadamente dirigido en la red, un usuario remoto puede acceder al procesador y transmitir instrucciones, datos de entrada o recuperar datos, tal como pueden almacenarse en una memoria (no mostrada) asociada con el procesador, o en algún otro medio legible por ordenador que está en comunicación con el procesador. La interfaz también puede permitir de este modo la extracción de datos a una ubicación remota, tal como un ordenador personal, asistente digital personal, o dispositivo de almacenamiento en red tal como servidor informático o granja de discos. El aparato puede configurarse además para permitir que un usuario envíe por correo electrónico los resultados de un análisis directamente a alguna otra parte, tal como un proveedor de atención médica, o un centro de diagnóstico, o un paciente.

[00021] Además, el aparato puede comprender además un medio de almacenamiento de datos configurado para recibir datos de uno o más del procesador, un dispositivo de entrada y una interfaz de comunicación, donde el medio de almacenamiento de datos es uno o más medios seleccionados del grupo que consiste en: una unidad de disco duro, una unidad de disco óptico, una tarjeta flash y un CD-Rom.

[00022] El procesador 980 puede configurarse además para controlar diversos aspectos de la preparación y el diagnóstico de muestras, tal como se describe a continuación en una descripción general y tal como se describe adicionalmente en esta solicitud. En las figuras 1A y 1B, el aparato 981 (o 971) está configurado para funcionar junto con un portaobjetos complementario 970. El portaobjetos está configurado en sí mismo, como se describe adicionalmente en esta solicitud, para recibir una cantidad de muestras biológicas 996 en una forma adecuada para el trabajo y el análisis de diagnóstico, y una cantidad de soportes 972 que están equipados con diversos reactivos, puntas de pipeta y receptáculos. El portaobjetos está configurado de modo que, durante el procesamiento de la muestra, las muestras se procesan en los respectivos soportes, el procesamiento incluye someterse, individualmente, a calentamiento y enfriamiento a través del ensamblaje de calentador 977. Las funciones de calentamiento del ensamblaje de calentador pueden controlarse mediante el procesador 980. El conjunto de calentador 977 funciona junto con un separador 978, tal como un separador magnético, que también puede ser controlado por el procesador 980 para moverse dentro y fuera de una proximidad cercana a una o más cámaras de procesamiento asociadas con los soportes 972, donde están presentes partículas tales como partículas magnéticas.

[00023] El dispensador de líquido 976, que de manera similar puede ser controlado por el procesador 980, está configurado para llevar a cabo diversas operaciones de succión y dispensación en muestras respectivas, fluidos y reactivos en los soportes 972, para lograr la extracción de ácido nucleico de las muestras. El dispensador de líquido 976 puede llevar a cabo tales operaciones en múltiples soportes simultáneamente. El lector de muestras 990 está configurado para transmitir indicios de identificación sobre la muestra, y en algunos casos el soporte, al procesador 980. Un lector de muestras puede estar unido al dispensador de líquidos y, por lo tanto, puede leer indicios acerca de una muestra sobre la cual se ubica el dispensador de líquidos. Alternativamente, el lector de muestras no está unido al dispensador de líquidos y se puede mover de forma independiente, bajo el control del procesador. El dispensador de líquido 976 también está configurado para tomar alícuotas de fluido que contiene ácido nucleico extraído de una o más muestras y dirigirlas al área de almacenamiento 974, que puede ser un enfriador. El área 974 contiene, por ejemplo, un tubo de PCR correspondiente a cada muestra. De manera alternativa, no hay un área separada 974, pero se puede configurar un enfriador para enfriar el uno o más soportes 972 de modo que el ácido nucleico extraído se enfríe y almacene *in situ en* lugar de transferirse a una ubicación separada.

[00024] La figura 1B muestra un ejemplo esquemático de un aparato de diagnóstico 971, que tiene elementos en común con el aparato 981. La figura 1A pero, en lugar de un área de almacenamiento 974, que tiene un compartimento de recepción 992 en el que se recibe un cartucho 994. El compartimento de recepción está en comunicación con un calentador 998 que en sí mismo puede ser controlado por el procesador 980 de tal manera que las regiones específicas del cartucho se calientan en momentos específicos durante el análisis. Por lo tanto, el dispensador de líquido 976 está configurado para tomar alícuotas de fluido que contiene ácido nucleico extraído de una o más muestras y dirigirlas a las entradas respectivas en el cartucho 994. El cartucho 994 está configurado para amplificarse, tal como mediante la realización de PCR, en los ácidos nucleicos respectivos. El procesador también está configurado para controlar un detector 999 que recibe una indicación de un diagnóstico del cartucho 994. El diagnóstico puede transmitirse al dispositivo de salida 986 y/o la pantalla 982, tal como se describió anteriormente en esta solicitud.

[00025] Un procesador adecuado 980 se puede diseñar y fabricar según, respectivamente, principios de diseño y procedimientos de procesamiento de semiconductores conocidos en la técnica.

[00026] Los aparatos que se muestran en el esquema en las figuras 1A y 1B, como con otros ejemplos descritos en esta solicitud, es ventajoso porque no requieren ubicaciones dentro del aparato configurado adecuadamente para el almacenamiento de reactivos. Los ejemplos tampoco requieren puertos de entrada o salida que estén configurados

para recibir reactivos de, por ejemplo, recipientes almacenados externamente tales como botellas, botes o depósitos. Por lo tanto, los aparatos en las figuras 1A y 1B están integrados y funcionan junto con los soportes 972, donde los soportes están preenvasados con reactivos, tal como en ubicaciones dentro de este dedicadas al almacenamiento de reactivos.

[00027] Los aparatos de las figuras 1A y 1B pueden configurarse para llevar a cabo la operación en una única ubicación, tal como un entorno de laboratorio, o pueden ser portátiles para que puedan acompañar, *por ejemplo,* a un médico u otro profesional sanitario, que puede visitar a pacientes en diferentes ubicaciones. Los aparatos suelen estar provistos de un cable de alimentación para que puedan aceptar la alimentación de CA de una fuente de alimentación o generador. Un transformador opcional (no mostrado) incorporado en cada aparato, o situado externamente entre una toma de corriente y el sistema, transforma la fuente de entrada de CA en una salida de CC para su uso por el aparato. El aparato también puede configurarse para funcionar mediante el uso de una o más baterías y, por lo tanto, también está equipado típicamente con un sistema de recarga de baterías y varios dispositivos de advertencia que alertan a un usuario si la energía de la batería se está volviendo demasiado baja para iniciar o completar un análisis de diagnóstico de forma confiable.

[00028] Los aparatos de las figuras 1A y 1B pueden configurarse además, para el análisis de muestras multiplexadas y/o el análisis de múltiples lotes de muestras, donde, *por ejemplo,* un único portaobjetos contiene un solo lote de muestras. En una de dichas configuraciones, las instancias de un sistema, como se describe en la figura 1B, aceptan y procesan múltiples cartuchos microfluídicos 994. Cada componente mostrado en las figuras 1A y 1B puede por tanto estar presente tantas veces como lotes de muestras, aunque los diversos componentes pueden configurarse en un alojamiento común.

[00029] En aun otra configuración, un sistema está configurado para aceptar y procesar múltiples cartuchos, pero uno o más componentes en las figuras 1A y 1B es común a múltiples cartuchos. Por ejemplo, un único aparato se puede configurar con múltiples compartimentos de recepción de cartuchos, pero un procesador, detector e interfaz de usuario común puede configurarse adecuadamente para permitir el control simultáneo, consecutivo o simultáneo de los diversos cartuchos. Además, es posible utilizar un único lector de muestras y un único dispositivo de salida.

[00030] En aun otra configuración, un sistema como se muestra en la figura 1B se configura para aceptar un solo cartucho, donde el único cartucho se configura para procesar más de 1, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 muestras en paralelo e independientemente entre sí. La tecnología ejemplar para crear cartuchos que pueden manejar múltiples muestras se describe en otra parte, por ejemplo, en la solicitud estadounidense n.º de serie 60/859.284.

[00031] Además, es coherente con la presente tecnología que un cartucho se puede etiquetar, por ejemplo, con un código de barras molecular indicativo de la muestra, para facilitar el seguimiento de la muestra y para minimizar el riesgo de mezcla de la muestra. Los procedimientos para tal etiquetado se describen en otra parte, *por ejemplo,* en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 10/360.854.

[00032] La electrónica de control 840 implementada en el aparato 971 o 981, que se muestra esquemáticamente en el diagrama de bloques en la figura 2, puede incluir una o más funciones, por ejemplo, para el control principal 900, la multiplexación 902, el control de visualización 904, el control de detector 906 y similares. La función de control principal puede servir como el centro de la electrónica de control 840 en los aparatos de las figuras 1A y 1B, y puede gestionar la comunicación y el control de las diversas funciones electrónicas. La función de control principal también puede soportar la interfaz eléctrica y de comunicaciones 908 con un usuario o un dispositivo de salida tal como una impresora 920, así como funciones de diagnóstico y seguridad opcionales. Junto con la función de control principal 900, la función de multiplexor 902 puede controlar los datos del sensor 914 y la corriente de salida 916 para ayudar a controlar el ensamblaje de calentador 977. La función de control de visualización 904 puede controlar la salida y, si corresponde, interpretar la entrada desde la pantalla táctil LCD 846, lo que puede proporcionar una interfaz gráfica al usuario. La función de detector 906 puede implementarse en componentes electrónicos de control 840 utilizando circuitos de procesamiento y control típicos para recopilar, digitalizar, filtrar y/o transmitir los datos de un detector 999 tal como uno o más detectores de fluorescencia. Las funciones adicionales, que no se muestran en la figura 2, incluyen, de modo no taxativo, funciones de control para controlar elementos en las figuras 1A y 1B tal como un cabezal dispensador de líquido, un separador, un enfriador y para aceptar datos de un lector de muestras.

[00033] Un aparato ejemplar, que tiene funciones de acuerdo con las figuras 1A o 1B, se muestra en las figuras 3A y 3B. El aparato ejemplar en las figuras 3A y 3B tiene un alojamiento 985, y una cubierta 987, que se muestra en una posición cerrada en la figura 3A, y en una posición abierta en la figura 3B para revelar los elementos interiores 995. La cubierta 987 opcionalmente tiene un mango 989, que se muestra como ovalado y elevado desde la superficie de la cubierta, pero que puede ser de otras formas tales como cuadrado, rectangular o circular, y que puede estar empotrado en la superficie de la cubierta o al ras de esta. La cubierta 987 se muestra con una bisagra, aunque son posibles otras configuraciones tales como una cubierta deslizante. El tope 991 sirve para evitar que la cubierta caiga demasiado hacia atrás y/o proporciona un punto que mantiene la cubierta 987 estable en una posición abierta. La cubierta 985 se muestra adicionalmente como que tiene uno o más puertos de comunicación 983 y uno o más puertos de energía 993, que pueden colocarse en otro lugar, tal como en la parte trasera del instrumento.

[00034] El aparato de las figuras 1A y 1B puede comprender opcionalmente una o más patas estabilizadoras que hacen que el cuerpo del dispositivo se eleve por encima de una superficie en la que está dispuesto el sistema 100, permitiendo así la ventilación por debajo del sistema 100, y también proporcionando a un usuario una capacidad mejorada de levantar el sistema 100. Puede haber 2, 3, 4, 5, o 6, o más pies, dependiendo del tamaño del sistema 100. Tales pies están hechos preferentemente de caucho, plástico o metal, y pueden elevar el cuerpo del sistema 10 de alrededor de 2 a alrededor de 10 mm por encima de una superficie en la que se encuentra.

[00035] La figura 4 muestra una configuración ejemplar de una parte de una parte interior de un aparato ejemplar, tal como el que se muestra en las figuras 3A y 3B. En la figura 4 se muestra un portaobjetos 970, que contiene una cantidad de porta reactivos 972 y muestras de pacientes 996, así como, muy cerca de este, un compartimento de recepción 992 que tiene un cartucho 994, para realizar PCR en polinucleótidos extraídos de las muestras.

Portaobjetos

[00036] El aparato comprende además uno o más portaobjetos configurados para insertarse y extraerse del aparato, cada uno de los portaobjetos está configurado además para recibir una pluralidad de soportes de reactivo, y para recibir una pluralidad de tubos de muestra, donde los soportes de reactivo están en correspondencia uno a uno con los tubos de muestra, y donde los soportes de reactivo contienen cada uno suficientes reactivos para extraer polinucleótidos de una muestra y colocar los polinucleótidos en una forma lista para PCR. Los ejemplos de soportes de reactivo se describen adicionalmente en otra parte de la presente solicitud.

[00037] Un aparato puede comprender 1, 2, 3, 4 o 6 portaobjetos, y cada portaobjetos puede aceptar 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 o 20 muestras tales como en tubos de muestra 802 y una cantidad correspondiente de soportes 804, cada uno con al menos una o más puntas de pipeta y uno o más recipientes para reactivos.

[00038] Un portaobjetos está configurado típicamente para aceptar una cantidad de soportes de reactivo 804, tales como los descritos adicionalmente en esta solicitud, el portaobjetos está configurado para sostener uno o más de tales soportes, ya sea permitiendo el acceso en una mesa de laboratorio a los reactivos almacenados en los soportes, o situado en una región dedicada del aparato permitiendo el acceso a los soportes mediante una o más funciones adicionales del aparato, tales como pipeteo automático, calentamiento de los tubos de procesamiento y separación magnética de las esferas de afinidad.

[00039] En la figura 5, se muestran dos vistas en perspectiva de un portaobjetos ejemplar 800, configurado para aceptar 12 tubos de muestra y 12 soportes de reactivo correspondientes, en 12 carriles. Un carril, tal como se usa en esta solicitud en el contexto de un portaobjetos, es una región dedicada del portaobjetos diseñada para recibir un tubo de muestra y el soporte de reactivo correspondiente. En la figura 6 se muestran dos vistas en perspectiva del mismo portaobjetos ejemplar, junto con una unidad calentadora.

[00040] Varias vistas de un segundo portaobjetos ejemplar 800, también configurado para aceptar 12 tubos de muestra y 12 soportes de reactivo, se muestran en las figuras 7 y las figuras 8A - 8K. Por consiguiente, se muestran las siguientes vistas: plano lateral (figura 8A); plano frontal, que muestra tubos de muestra (figura 8B); plano trasero, que muestra los soportes de reactivo (figura 8C); elevación trasera, que muestra los soportes de reactivo (figura 8D); elevación frontal, que muestra tubos de muestra (figura 8E); superior, que muestra la inserción de un soporte de reactivo (figuras 8F y 8G). la parte superior que muestra la ranura para insertar un soporte de reactivo (figura 8H); vista superior que muestra el registro del soporte de reactivo (figura 81); cierre del portaobjetos en estado de inserción/extracción parcial del aparato (figura 8J); y el portaobjetos sostenido por el mango, retirado del aparato (figura 8K). Un área empotrada en un aparato de diagnóstico o preparación, como se describe adicionalmente en esta solicitud, para aceptar el portaobjetos extraíble ejemplar de la figura 7 se muestra en la figura 9. Otras áreas empotradas configuradas adecuadamente para recibir otros portaobjetos que difieren en forma, aspecto y forma, en lugar de función, son coherentes con la descripción en esta solicitud.

[00041] Los dos ejemplos de portaobjetos que se muestran en las figuras que son características generales no limitantes de portaobjetos contemplados en esta solicitud se describen ahora usando los dos ejemplos de portaobjetos como ilustrativos de estos. Por ejemplo, al menos el primer carril y el segundo carril son paralelos entre sí, una configuración que aumenta la eficiencia de pipeteo. Típicamente, cuando son paralelos entre sí, los pares de carriles de muestra adyacentes están separados por 24 mm en sus respectivos puntos medios. (Otras distancias son posibles, como 18 mm de separación, o 27 mm de separación. La distancia entre los puntos medios depende del paso de las boquillas en el cabezal dispensador de líquido, como se describe adicionalmente en esta solicitud. Mantener la separación en múltiplos de 9 mm permite una carga fácil desde el portaobjetos a una placa de 96 pocillos (donde los pocillos típicamente están separados por 9 mm). Típicamente, también, el portaobjetos es tal que la pluralidad de soportes de reactivo en la pluralidad de carriles se mantienen a la misma altura entre sí.

[00042] El portaobjetos está configurado para aceptar un soporte de reactivo de tal manera que el soporte de reactivo encaje o se bloquee de manera reversible en su lugar, y permanezca estable mientras se accede a los

reactivos en él, y mientras el portaobjetos se transporta de un lugar a otro o se inserta o se retira del aparato. En cada ejemplo, cada una de las segundas ubicaciones comprende una llave mecánica configurada para aceptar el soporte de reactivo en una sola orientación. En la figura 5, se muestra que el o los soportes de reactivo se deslizan horizontalmente en ranuras orientadas verticalmente, una por soporte, ubicadas en el portaobjetos. En tal ejemplo, el borde de un miembro de conexión en el soporte se acopla con una ranura complementaria en la parte superior de una ranura. En las figuras 8F, 8G y 81, se muestra que el o los soportes de reactivo pueden acoplarse con el portaobjetos a través de una llave mecánica que mantiene los soportes estables y en su lugar. Por ejemplo, la llave mecánica puede comprender una parte elevada o cóncava que, al acoplarse con una parte complementaria del soporte de reactivo, permite que el soporte de reactivo encaje en la segunda ubicación. También se puede ver en los ejemplos que se muestran que el soporte de reactivo tiene un primer extremo y un segundo extremo, y la llave mecánica comprende un primer rasgo configurado para acoplarse con el primer extremo, y un segundo rasgo configurado para acoplarse con el segundo extremo de tal manera que un soporte de reactivo no se pueda insertar de manera incorrecta.

[00043] En determinados ejemplos, los soportes de reactivo bloquean cada bloqueo en su lugar en el portaobjetos, tal como con un mecanismo de bloqueo de leva que se reconoce como bloqueado de forma audible y/o física, o tal como con una llave mecánica. El portaobjetos se puede configurar de modo que los soportes, cuando se colocan en él, se alineen para la recogida de punta de pipeta adecuada usando un dispensador de líquido como se describe adicionalmente en esta solicitud. Además, la segunda ubicación de cada carril puede ser lo suficientemente profunda como para alojar una o más puntas de pipeta, tal como las contenidas en una funda de punta de pipeta.

[00044] En determinados ejemplos, el portaobjetos está configurado para aceptar las muestras en tubos de muestra individuales 802, cada uno montado adyacente a un soporte correspondiente 804, por ejemplo, en un lado del portaobjetos 800. Los tubos de muestra pueden ser accesibles a un verificador de identificación de muestra tal como un lector de código de barras, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud. En la figura 5, un tubo de muestra es sostenido en su parte inferior por un miembro receptor cilíndrico. En la figura 7, se muestra que un tubo de muestra puede sostenerse tanto en su parte superior como en su parte inferior, tal como mediante una parte cóncava 803 configurada para recibir una parte inferior de un tubo de muestra, y una abertura 805 configurada para sostener una parte superior del tubo de muestra. La abertura puede ser un anillo o un bucle abierto, o un orificio en una lámina metálica. La parte cóncava puede ser como en la figura 7, donde es una lámina en ángulo de un alojamiento de metal que tiene un orificio lo suficientemente grande para alojar un tubo de muestra.

[00045] El portaobjetos puede diseñarse de modo que pueda retirarse fácilmente del aparato y transportarse hacia y desde el entorno de laboratorio externo al aparato, tal como un banco, y el aparato, por ejemplo, para permitir la carga fácil del o los tubos de muestra y el o los soportes de reactivo en el portaobjetos. En determinados ejemplos, el portaobjetos está diseñado para ser estable en una superficie horizontal, y no se derriba fácilmente durante el transporte, y, con este fin, el portaobjetos tiene una o más patas (tales como 2, 3, 4, 6, 8) 809. En determinados ejemplos, el portaobjetos tiene un mango 806 para facilitar el levantamiento y el movimiento, y como se muestra en la figura 5, el mango puede bloquearse en una posición vertical, durante el transporte, también para reducir el riesgo de que el portaobjetos se derrumbe. El mango puede tener opcionalmente un agarre blando 808 en su centro. En el portaobjetos ejemplar de la figura 7, el mango de transporte se coloca alrededor de un eje desplazado desde un eje que pasa a través del centro de gravedad del portaobjetos cuando se carga, y es libre de caer a una posición al ras con una superficie superior del portaobjetos, bajo su propio peso.

[00046] El portaobjetos ejemplar de la figura 5 tiene un miembro de base metálico 810 que tiene 4 pies 811 que también sirven como localizadores de posición al insertar el portaobjetos en la parte dedicada del aparato. El mango está unido al miembro base. La parte del portaobjetos 812 que acepta las muestras y los soportes puede estar hecha de plástico, y comprende 12 ranuras, y puede ser desechable.

[00047] En el portaobjetos ejemplar de la figura 7, el portaobjetos comprende un alojamiento, una pluralidad de carriles en el alojamiento, y donde cada carril de la pluralidad de carriles comprende: una primera ubicación configurada para aceptar un tubo de muestra; y una segunda ubicación, configurada para aceptar un soporte de reactivo; y un miembro de registro complementario a un compartimento de recepción de un aparato de diagnóstico. Típicamente, el alojamiento está hecho de un metal, tal como aluminio, que es a la vez ligero pero también se puede mecanizar a alta tolerancia y es lo suficientemente resistente como para asegurar que el portaobjetos permanezca estable cuando se encuentra en el aparato de diagnóstico. El miembro de registro en la figura 7 comprende cuatro (4) clavijas de tolerancia herméticas 815, ubicadas una por esquina del portaobjetos. Tales clavijas son tales que encajan de forma firme y ajustada en los orificios complementarios en el compartimento de recepción del aparato y, por lo tanto, estabilizan el portaobjetos. Otros ejemplos que tienen, por ejemplo, 2, o 3, o más de 4 de tales clavijas son coherentes con la presente descripción.

[00048] En particular, el alojamiento en el portaobjetos ejemplar de la figura 7 comprende un miembro horizontal 821, y dos o más miembros verticales 822 conectados al miembro horizontal, y es tal que la segunda ubicación de cada carril respectivo es una parte cóncava dentro del miembro horizontal. Los dos o más miembros verticales 809 en el portaobjetos ejemplar de la figura 7 están configurados para permitir que el portaobjetos se libere sobre el mismo. El alojamiento puede comprender además dos o más patas o guías, unidas simétricamente a los miembros verticales

primero y segundo y que dan estabilidad adicional al portaobjetos cuando se coloca en una superficie de mesa de laboratorio.

[00049] Además, en el portaobjetos ejemplar de la figura 7, el alojamiento comprende además una pluralidad de miembros espaciadores 825, cada uno de los cuales está dispuesto entre un par de carriles adyacentes. Opcionalmente, dichos miembros espaciadores pueden estar dispuestos verticalmente entre los carriles.

[00050] Aunque no se muestra en las figuras, un portaobjetos puede comprender además un identificador de carril asociado con cada carril. Un identificador de carril puede ser una marca permanente o temporal tal como un número o letra única, o puede ser un RFID, o código de barras, o puede ser una etiqueta de color única para un carril en particular.

[00051] Un portaobjetos está configurado para que pueda colocarse fácilmente en la ubicación adecuada en el instrumento y le da al usuario retroalimentación positiva, como audible o físicamente, que se coloca correctamente. En determinados ejemplos, el portaobjetos puede bloquearse en su posición. Es deseable que el portaobjetos se coloque correctamente y no se permita que se mueva posteriormente, de modo que el movimiento del dispensador de líquido no se vea comprometido durante las operaciones de manipulación de líquidos. Por lo tanto, el portaobjetos tiene un miembro de registro para garantizar un posicionamiento adecuado. En el portaobjetos ejemplar de la figura 7, el miembro de registro comprende dos o más pasadores de posicionamiento configurados para asegurar que el portaobjetos solo se pueda colocar en el aparato de diagnóstico en una sola orientación; y proporcionar estabilidad a el portaobjetos cuando se coloca en el aparato de diagnóstico. El portaobjetos ejemplar de la figura 7 tiene, opcionalmente, un accionador de sensor 817 configurado para indicar la colocación adecuada del portaobjetos en el aparato de diagnóstico. Dicho sensor puede comunicarse con un procesador 980 para proporcionar al usuario una advertencia, tal como una advertencia audible, o una advertencia visual comunicada a través de una interfaz, si el portaobjetos no está asentado correctamente. También se puede configurar para evitar que un procedimiento de preparación de muestras se inicie o continúe si se detecta un error de asiento.

[00052] El interior del portaobjetos alrededor de la ubicación de los tubos de procesamiento en los diversos soportes puede configurarse para tener espacio libre para un ensamblaje de calentador y/o un separador magnético como se describe adicionalmente en esta solicitud. Por ejemplo, el portaobjetos está configurado de manera que las cámaras de procedimiento en los soportes individuales sean aceptadas por unidades de calentador en un ensamblaje de calentador como se describe adicionalmente en esta solicitud.

[00053] Tener un portaobjetos extraíble permite al usuario mantener un siguiente portaobjetos cargado con muestras y en línea mientras el aparato prepara un portaobjetos de muestras anterior, de modo que se maximiza el tiempo de uso del aparato.

[00054] El portaobjetos también se puede limpiar convenientemente fuera del instrumento en caso de cualquier derrame de muestra sobre él o simplemente como un mantenimiento de rutina de los productos de laboratorio.

[00055] Los portaobjetos pueden tener una o más partes desechables.

Soporte

[00056] Las figuras 10A y 10B muestran vistas de un soporte ejemplar 501 como se describe adicionalmente en esta solicitud. La figura 11 muestra una vista en planta de otro soporte ejemplar 502, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud. La figura 12A muestra un soporte ejemplar 503 en vista en perspectiva, y la figura 12B muestra el mismo soporte en vista transversal. La figura 12C muestra una vista en despiece del mismo soporte que en las figuras 12A y 12B. Todos estos soportes ejemplares, así como otros coherentes con la descripción escrita en esta solicitud, aunque no se ilustran, se describen ahora.

[00057] Los soportes ejemplar que se muestran en las figuras 10A, 10B, 11, 12A, 12B y 12C pueden denominarse cada uno una "tira desechable unificada" o una "tira unificada", porque están destinados a ser utilizados como una sola unidad que está configurada para sostener todos los reactivos y recipientes necesarios para realizar una preparación de muestra, y porque están dispuestos en un formato de tira. Es coherente con la descripción en esta solicitud, sin embargo, que se contemplan otras disposiciones geométricas de los diversos receptáculos, de modo que la descripción no se limita a una disposición lineal, o de tira, sino que puede incluir una disposición circular o de portaobjetos.

[00058] Algunos de los reactivos contenidos en el soporte se proporcionan como líquidos, y otros pueden proporcionarse como sólidos. En algunos ejemplos, se utiliza un tipo diferente de recipiente o tubo para almacenar líquidos de aquellos que almacenan los sólidos.

[00059] El soporte puede ser desechable, tal como está destinado a un solo uso, después de lo cual se desecha.

[00060] El soporte está hecho típicamente de un plástico tal como polipropileno. El plástico es tal que tiene cierta flexibilidad para facilitar la colocación en un portaobjetos, como se describe adicionalmente en este documento. Sin embargo, el plástico es típicamente rígido, de modo que el soporte no se hundirá o flexionará significativamente bajo su propio peso y no se deformará fácilmente durante la manipulación y el transporte de rutina, y por lo tanto no permitirá que los reactivos se escapen de él.

[00061] El soporte comprende un miembro de conexión 510 que tiene una o más características de la siguiente manera. El miembro de conexión 510 sirve para conectar varios componentes del soporte entre sí. El miembro de conexión 510 tiene un lado superior 512 y, opuesto al lado superior, un lado inferior 514. En la figura 10B, se muestra una vista de la parte inferior 514, que tiene varios puntales 597 que conectan un borde del miembro de conexión con diversos zócalos, tubos de procesamiento y tubos de reactivo. Los puntales 597 son opcionales, y pueden omitirse en su totalidad o en parte, o pueden sustituirse, en su totalidad o en parte, por otras piezas que mantienen unido el soporte.

[00062] El soporte está configurado para comprender: un tubo de procedimiento 520 fijado al miembro de conexión y que tiene una abertura 522 ubicada en el miembro de conexión; al menos un portalámparas 530, ubicado en el miembro de conexión, el portalámparas está configurado para aceptar una punta de pipeta desechable 580; dos o más tubos de reactivo 540 dispuestos en la parte inferior del miembro de conexión, donde cada uno de los tubos de reactivo tiene una abertura de entrada 542 ubicada en el miembro de conexión; y uno o más receptáculos 550, ubicados en el miembro de conexión, donde el uno o más receptáculos están configurados cada uno para recibir un recipiente complementario tal como un tubo de reactivo (no mostrado) insertado desde el lado superior 512 del miembro de conexión.

[00063] El soporte es típicamente tal que el miembro de conexión, el tubo de procedimiento y los dos o más tubos de reactivo están hechos de una sola pieza, tal como una pieza de polipropileno.

[00064] El soporte también es típicamente tal que al menos el tubo de procedimiento, y los dos o más tubos de reactivo son translúcidos.

[00065] El uno o más recipientes 550 están configurados para aceptar tubos de reactivo que contienen, respectivamente, cantidades suficientes de uno o más reactivos típicamente en forma sólida, tal como en forma liofilizada, para llevar a cabo la extracción de ácido nucleico de una muestra que está asociada con el soporte. Los receptáculos pueden ser todos del mismo tamaño y forma, o pueden ser de diferentes tamaños y formas entre sí. Se muestra que los receptáculos 550 tienen fondos abiertos, pero no se limitan a tales topologías, y pueden cerrarse aparte de la entrada 552 en el lado superior del miembro de conexión 510. Preferentemente, los recipientes 550 están configurados para aceptar recipientes de uso común en el campo del análisis de laboratorio, o recipientes configurados adecuadamente para su uso con el soporte en esta solicitud. Los recipientes se almacenan típicamente por separado de los soportes para facilitar la manipulación de muestras, ya que los reactivos sólidos normalmente requieren condiciones de almacenamiento diferentes de los reactivos líquidos. En particular, muchos reactivos sólidos pueden ser extremadamente sensibles a la humedad.

[00066] Los tubos de reactivo encajados que contienen diferentes reactivos pueden ser de diferentes colores o codificados por colores para una fácil identificación por parte del usuario. Por ejemplo, pueden estar hechos de material de diferentes colores, como plástico teñido, o pueden tener algún tipo de etiqueta de identificación en ellos, como una franja de color o punto. También pueden tener una etiqueta impresa en el lado y/o pueden tener un identificador tal como un código de barras en la capa de sellado en la parte superior.

[00067] Los recipientes 554 recibidos por los recipientes 550 pueden ser alternativamente una parte integrada del soporte y pueden ser el mismo tipo de recipiente que la cámara de desechos y/o el o los tubos de reactivo, o pueden diferir de estos.

[00068] En un ejemplo, los recipientes 554 que contienen reactivos liofilizados, dispuestos en los receptáculos 550 (que se muestran, por ejemplo, en las figuras 12A y 12C), son tubos de 0,3 ml que se han configurado adicionalmente para tener un patrón de estrella (véanse las figuras 13A y 13B) en sus respectivas superficies interiores inferiores. Esto es de modo que cuando se ha añadido un fluido a los reactivos liofilizados (que están secos en el envase inicial), una punta de pipeta puede colocarse en el tubo y aún ser capaz de extraer casi todo el fluido del tubo, como se muestra en la figura 14, durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico. El diseño del patrón estelar se describe adicionalmente en otra parte de la presente invención.

[00069] Los tubos de reactivo, tales como los que contienen los reactivos liofilizados, pueden sellarse a través de sus partes superiores mediante una lámina metálica, tal como una lámina de aluminio, sin capa de revestimiento de plástico, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud.

[00070] Los soportes 501, 502 y 503 se muestran configurados con una cámara de desechos 560, que tiene una abertura de entrada 562 en el lado superior del miembro de conexión. La cámara de desechos 560 es opcional y,

cuando está presente, está configurada para recibir reactivos líquidos usados. Cuando no está presente, los reactivos líquidos usados se pueden transferir y desechar en una ubicación fuera del soporte, tal como, por ejemplo, un tubo de muestra que contenía la muestra original cuyo contenido se está analizando. La cámara de desechos 560 se muestra como parte de un montaje que comprende adicionalmente dos o más tubos de reactivo 540. Se entenderá que tal arreglo se realiza por conveniencia, por ejemplo, de fabricación; son posibles otras ubicaciones de la cámara de desechos, o la cámara de desechos puede estar adyacente a un tubo de reactivo, pero no conectada a él que no sea a través del miembro de conexión.

[00071] El soporte es típicamente tal que el miembro de conexión, el tubo de procedimiento, los dos o más tubos de reactivo y la cámara de desechos (si está presente) están hechos de una sola pieza, hecha de un material tal como polipropileno.

[00072] Los soportes 501 y 503 se muestran con una funda de pipeta 570. Este es un componente opcional de los soportes descritos en esta solicitud. Puede estar fijado de forma permanente o extraíble al miembro de conexión 510, o puede estar formado, por ejemplo, moldeado, como parte de un ensamblaje de una sola pieza para el soporte. Por ejemplo, la vista en despiece del soporte 503 en la figura 12C muestra uniones tipo orejeta 574 en la superficie superior de una funda de pipeta extraíble 570 que se acopla con partes o orificios cóncavos complementarios en la parte inferior 514 del miembro de conexión 510. Son posibles otras configuraciones de unión. La funda de pipeta 570 se configura típicamente para rodear al menos un zócalo y una punta y una parte inferior de una punta de pipeta cuando la punta de pipeta se coloca en el al menos un zócalo. El al menos un zócalo puede comprender dos, tres, cuatro, cinco o seis zócalos.

[00073] La funda de pipeta 570 típicamente está configurada para tener una parte inferior 576 y una parte de pared 578 dispuesta entre la parte inferior y el miembro de conexión. La funda de pipeta 570 puede tener adicional y opcionalmente una o más partes recortadas 572 en la pared 578, o en la parte inferior 576. Tales recortes proporcionan ventilación para las puntas de pipeta y también reducen la cantidad total de material utilizado en la fabricación del soporte. El soporte 503 tiene una funda de pipeta sin tales recortes. En el soporte 501, tal recorte se muestra como un triángulo isósceles en la parte superior de la funda; un recorte de forma similar puede encontrarse en una posición correspondiente en el lado opuesto de la funda, oscurecido a la vista en la figura 10A. Otros recortes podrían tener otras formas triangulares, circulares, ovaladas, cuadradas, rectangulares u otras formas poligonales o irregulares, y ser varias, como muchas, en número. La pared 578 de la funda de pipeta 570 también puede tener una malla o estructura similar a un marco que tiene fenestraciones o intersticios. En realizaciones que tienen una funda de pipeta, un propósito de la funda es atrapar goteos de las puntas de pipeta usadas y, por lo tanto, evitar la contaminación de muestras cruzadas, del uso de un soporte a otro en una ubicación similar, y/o a cualquier portaobjetos de soporte en el que se encuentre el soporte. Típicamente, entonces, la parte inferior 576 es sólida y en forma de cuenco (cóncava) de modo que las gotas se retienen dentro de ella. Un soporte tal como 502, que no tiene funda de pipeta, podría utilizar, por ejemplo, una bandeja de goteo o una salida de drenaje, colocada adecuadamente debajo de las puntas de pipeta ubicadas en el uno o más zócalos, para el mismo propósito. Además de atrapar goteos, la funda de la punta de la pipeta evita o inhibe que las puntas de otros soportes de reactivo, tales como los que están situados adyacentes a aquella en cuestión en un portaobjetos como se describe adicionalmente en esta solicitud, se toquen entre sí cuando las puntas se recogen y/o se dejan caer antes o después de alguna etapa de procesamiento de líquido. El contacto entre las puntas en los soportes adyacentes generalmente no está previsto, por ejemplo, por un cabezal dispensador automatizado que controla el procesamiento de muestras en los soportes en paralelo, pero las puntas de pipeta que son largas pueden tocar fácilmente una punta en una tira cercana si el ángulo al caer de la punta se desvía ligeramente de la vertical.

[00074] Los soportes 501, 502 y 503, todos tienen un miembro de conexión que está configurado de modo que al menos un zócalo, el uno o más receptáculos y las respectivas aberturas del tubo de procedimiento, y los dos o más tubos de reactivo, estén todos dispuestos linealmente entre sí (*es decir,* sus puntos medios se encuentran en el mismo eje). Sin embargo, los soportes en esta solicitud no se limitan a configuraciones particulares de receptáculos, cámara de desechos, tubo de procedimiento, tomas y tubos de reactivo. Por ejemplo, un soporte se puede acortar, si algunas aberturas se escalonan entre sí y ocupan posiciones 'fuera del eje'. Los diversos receptáculos, etc., tampoco necesitan ocupar las mismas posiciones entre sí como se muestra en las figuras 12A y 12B, donde el tubo de procedimiento está dispuesto aproximadamente cerca del medio del soporte, los reactivos líquidos se almacenan en recipientes montados en un lado del tubo de procedimiento, y los recipientes que contienen reactivos sólidos están montados en el otro lado del tubo de procedimiento. Por lo tanto, en las figuras 10A, 10B y 11, el tubo de procedimiento está en un extremo del miembro de conexión y la funda de pipeta está en el otro extremo, adyacente a, en una posición interior, una cámara de desechos y dos o más tubos de reactivo. Aún son posibles otras disposiciones, tales como montar el tubo de procedimiento en un extremo del soporte, montar el tubo de procedimiento adyacente a las puntas de pipeta y la funda de punta de pipeta (como se describe adicionalmente en esta solicitud) y montar el tubo de desechos adyacente al tubo de procedimiento. Se entenderá que las configuraciones alternativas de las diversas partes del soporte dan lugar solo a variaciones de forma y se pueden alojar dentro de otras variaciones del aparato como se describe, que incluyen pero no se limitan a conjuntos de instrucciones alternativos para un cabezal de pipeta dispensadora de líquido, ensamblaje de calentador y separador magnético, como se describe adicionalmente en esta solicitud.

[00075] El tubo de procedimiento 520 también puede ser un tubo a presión, en lugar de ser parte de una pieza integrada. El tubo de procedimiento 520 se utiliza típicamente para diversos procedimientos de mezcla y reacción que se producen durante la preparación de la muestra. Por ejemplo, la lisis celular puede ocurrir en el tubo de procedimiento 520, al igual que la extracción de ácidos nucleicos. A continuación, el tubo de procedimiento 520 se coloca ventajosamente en una ubicación que minimiza, en general, las operaciones de movimiento del cabezal de pipeta involucradas en la transferencia de líquidos al tubo de procedimiento 520.

[00076] Los tubos de reactivo 540 se configuran típicamente para contener reactivos líquidos, uno por tubo. Por ejemplo, en los soportes 501, 502 y 503, se muestran tres tubos de reactivo, que contienen respectivamente tampón de lavado, tampón de liberación y tampón de neutralización, cada uno de los cuales se utiliza en un protocolo de preparación de muestras.

[00077] Los tubos de reactivo 540 que contienen líquidos o reactivos líquidos se pueden sellar con una estructura de laminado 598. La estructura de laminado típicamente tiene una capa de sellado térmico, una capa de plástico tal como una capa de polipropileno y una capa de metal tal como papel de aluminio, donde la capa de sellado térmico es adyacente al uno o más tubos de reactivo. La película de plástico adicional que se utiliza en un laminado para recipientes que contienen reactivos líquidos es típicamente para evitar que el líquido entre en contacto con el aluminio.

[00078] Dos ejemplos de una estructura de laminado, que difieren en sus estructuras de capa, se muestran en la figura 15. En ambos ejemplos, la capa de sellado térmico 602, por ejemplo, hecha de una laca u otro polímero similar con un punto de fusión bajo, está en la parte inferior, adyacente a la parte superior del soporte, cuando se aplica. La capa de plástico 604 se encuentra típicamente en la parte superior de la capa de sellado térmico, y típicamente está hecha de polipropileno, que tiene un espesor en el intervalo de 10 a 50 micrones. La capa metálica 608 se encuentra típicamente encima de la capa plástica y puede ser una capa de lámina A2 unida a la capa plástica con una capa de adhesivo 606, como en el primer ejemplo en la figura 15, o puede ser una capa de metal que se evapora o salpica en su lugar directamente sobre la capa plástica. Los espesores ejemplares para las capas respectivas se muestran en la figura 15, donde se debe entender que las variaciones de hasta un factor de 2 en espesor son coherentes con la tecnología en esta solicitud. En particular, la lámina de aluminio puede tener entre 0,1 y 15 micrones de espesor y la capa de polímero puede tener entre 15 y 25 micrones de espesor. En otro ejemplo, el aluminio tiene un espesor de 0,1 a 1 micrones, y la capa de polímero tiene un espesor de 25 a 30 micrones.

[00079] Los laminados desplegados en esta solicitud facilitan el almacenamiento a más largo plazo porque el soporte incluye la presencia de reactivos liofilizados sellados, así como líquidos sellados en estrecha proximidad, lo que normalmente es difícil de lograr.

[00080] En un ejemplo, las tapas de los tubos de reactivo tienen bordes biselados de modo que cuando una lámina de aluminio está unida por calor a la parte superior, el plástico fundido no se extiende más allá del borde del tubo. Esto es ventajoso porque, si la fusión de plástico reduce el diámetro interior del tubo, causará interferencia con la punta de la pipeta durante el funcionamiento. Alternativamente, una parte plana elevada 599 facilita la aplicación y eliminación del laminado 598. La superficie elevada 599, en el lado superior del miembro de conexión, y que rodea las aberturas de entrada a los tubos de reactivo y, opcionalmente, la cámara de desechos, es una característica opcional del soporte.

[00081] La forma en que se extrae el líquido por pipeta es tal que una punta de pipeta que perfora a través de la lámina se rompe sin crear un sello alrededor de la punta de pipeta, como en la figura 16. Tal sello alrededor de la punta durante el pipeteo sería desventajoso porque una cierta cantidad de flujo de aire es deseable para la operación de pipeteo. En este caso, no se crea un sello porque la estructura laminada hace que la lámina perforada permanezca en la posición adoptada inicialmente cuando se perfora. Los cinco paneles superiores en la figura 16 ilustran el pipeteo de un reactivo fuera de un tubo de reactivo sellado con un laminado como se describe adicionalmente en esta solicitud. En A, la punta de pipeta se coloca aproximadamente centralmente sobre el tubo de reactivo que contiene el reactivo 707. En B, la punta de la pipeta se baja, generalmente se baja de forma controlable, en el tubo de reactivo, y al hacerlo perfora la lámina 598. La vista en despiece de esta área muestra que el borde del laminado perforado está en contacto con la punta de la pipeta en la parte más ancha en la que penetra el tubo de reactivo. En C, la punta de pipeta se retira ligeramente, manteniendo la punta dentro del volumen del reactivo 707. La vista en despiece muestra que la lámina perforada ha conservado la configuración que adoptó cuando se perforó y la punta de la pipeta descendió a su posición más profunda dentro del tubo de reactivo. En D, la punta de la pipeta aspira el reactivo 707, posiblemente alterando su altura a medida que más y más personas mayores se someten a tales pruebas. En E, la punta de la pipeta se retira por completo del tubo de reactivo.

[00082] Los materiales de los diversos tubos y cámaras pueden configurarse para tener al menos una lisura de superficie interior y un recubrimiento de superficie para reducir la unión de ADN y otras macromoléculas a este. La unión del ADN no es deseada debido a la sensibilidad reducida que es probable que dé lugar a la detección y el análisis posteriores del ADN que no está atrapado en la superficie del titular.

[00083] El tubo de procedimiento también puede tener una superficie de unión baja y permite que las esferas magnéticas se deslicen hacia arriba y hacia abajo de la pared interior fácilmente sin adherirse a él. Además, tiene un recubrimiento superficial hidrófobo que permite una baja adherencia del fluido y, por lo tanto, una baja unión de ácidos nucleicos y otras moléculas.

[00084] En algunos ejemplos, el soporte comprende un miembro de registro tal como una llave mecánica. Típicamente, tal llave es parte del miembro de conexión 510. Una llave mecánica asegura que el soporte sea aceptado por un miembro complementario en, por ejemplo, un portaobjetos de soporte o un compartimento de recepción de un aparato que controla las operaciones de pipeteo en los reactivos en el soporte. Una llave mecánica es normalmente un recorte de forma particular que coincide con un recorte o saliente correspondiente en un aparato receptor. Por lo tanto, el soporte 501 tiene una llave mecánica 592 que comprende un par de recortes de forma rectangular en un extremo del miembro de conexión. Esta característica, tal como se muestra, proporciona adicionalmente una pestaña mediante la cual un usuario puede obtener una compra adecuada al insertar y retirar el soporte en un portaobjetos u otro aparato. Los soportes 501 y 502 también tienen una llave mecánica 590 en el otro extremo del miembro de conexión 510. La llave 590 es un recorte en ángulo que facilita la inserción del soporte en un portaobjetos, así como asegura un buen registro en la misma cuando colinda con un corte en ángulo complementario en un área empotrada configurada para recibir el soporte. Otras variaciones de una llave mecánica son, por supuesto, coherentes con la descripción en esta solicitud: por ejemplo, recortes curvos, o varias combinaciones de muescas o salientes que facilitarían el registro seguro del soporte.

[00085] El soporte puede comprender además un identificador fijado al miembro de conexión. El identificador puede ser una etiqueta, tal como una etiqueta grabable, un código de barras, un código de barras bidimensional, o una etiqueta RFID. El identificador puede ser, *por ejemplo,* con el fin de revelar rápidamente qué combinación de reactivos está presente en el soporte y, por lo tanto, para qué tipo de protocolo de preparación de muestras se pretende. El identificador también podrá indicar el lote a partir del cual se fabricó el titular, a efectos de control de calidad o de mantenimiento de registros. El identificador también puede permitir que un usuario empareje un titular particular con una muestra particular.

[00086] También debe considerarse coherente con la descripción en esta solicitud que un soporte pueda configurarse adicionalmente para aceptar una muestra, tal como en un tubo de muestra. Por lo tanto, como se describe en otra parte de la presente solicitud, un portaobjetos acepta una cantidad de tubos de muestra y una cantidad de soportes correspondientes de tal manera que los tubos de muestra y soportes se pueden cargar de forma separada e independiente entre sí. Sin embargo, un soporte se puede configurar para aceptar también una muestra, por ejemplo, en un tubo de muestra. Y, por lo tanto, un portaobjetos complementario está configurado para aceptar una cantidad de soportes, donde cada soporte tiene una muestra, así como reactivos y otros artículos. En tal ejemplo, el soporte está configurado de modo que la muestra sea accesible para un verificador de identificación de muestras.

Kits

[00087] El soporte descrito en esta solicitud puede proporcionarse en una bolsa sellada, para reducir la posibilidad de que el aire y la humedad entren en contacto con los reactivos en el soporte. Tal bolsa sellada puede contener uno o más de los soportes descritos en esta solicitud, tales como 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 o 24 soportes.

[00088] El soporte también puede proporcionarse como parte de un kit para llevar a cabo la preparación de muestras, donde el kit comprende una primera bolsa que contiene uno o más de los soportes descritos en esta solicitud, cada uno de los soportes configurados con reactivos líquidos para, *por ejemplo,* lisis, lavado y liberación, y una segunda bolsa, que tiene una atmósfera inerte en el interior, y uno o más tubos de reactivo que contienen reactivos de PCR liofilizados, como se muestra en la figura 17. Tal kit también se puede configurar para proporcionar análisis de múltiples muestras y contener suficientes reactivos de PCR (u otros reactivos de amplificación, tales como para RT-PCR, amplificación mediada por transcripción, amplificación por desplazamiento de cadena, NASBA, amplificación dependiente de helicasa y otros conocidos para un experto en la materia, y otros descritos en esta solicitud) para procesar tales muestras, y una cantidad de soportes individuales tales como 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 o 24 soportes.

Tubos de reactivo

[00089] Tal como se hace referencia en otra parte de la presente solicitud, los recipientes 554 que contienen reactivos liofilizados son tubos de 0,3 ml que se han configurado adicionalmente para tener un patrón en forma de estrella -o estrellado- (véanse las Figuras 13A y 13B) en sus respectivas superficies interiores inferiores. Aún otros tubos para su uso en esta solicitud, así como para otros usos no descritos en esta solicitud, se pueden configurar de manera similar. Por lo tanto, por ejemplo, los beneficios proporcionados por el patrón en forma de estrella también se acumulan en los tubos de reactivo que contienen muestras líquidas que se pipetean directamente fuera de los tubos (así como en aquellos tubos que inicialmente contienen sólidos que se constituyen en forma líquida antes de pipetear). Otros tubos de tamaño que se beneficiarían de tal patrón en forma de estrella tienen tamaños en el intervalo de 0,1 ml a 0,65 ml. por ejemplo.

[00090] El patrón en forma de estrella asegura que cuando se retira un fluido del tubo, una punta de pipeta puede colocarse en el tubo y aun así ser capaz de retirar la totalidad, o casi la totalidad, del fluido del tubo, como se muestra en la figura 14. Esto es importante porque, cuando se trabaja con volúmenes tan pequeños, y cuando el ADN objetivo puede estar presente en muy pocas copias, la pérdida de muestras debido a imperfecciones de pipeteo debe minimizarse en toda la medida de lo posible.

[00091] El diseño del patrón en forma de estrella es importante, especialmente cuando se utiliza para la recuperación de ADN/ARN presente en cantidades muy pequeñas en la muestra clínica. El patrón estrellado debe permitir el pipeteado de la mayor parte del líquido (volumen residual < 1 microlitro) cuando se utiliza con una pipeta que toca el fondo del tubo. Además, el patrón estrellado debe diseñarse para minimizar el área de superficie, así como las ranuras de extremo muerto que tienden a tener dos efectos indeseables - para atrapar el líquido, así como para aumentar la retención indeseable de polinucleótidos por adsorción.

[00092] La figura 14 se describe a continuación. La figura 14 tiene una cantidad de paneles, A - G, cada uno representa, en secuencia, una etapa en una operación de pipeteo. En A, una punta de pipeta 2210, que contiene un líquido 2211 (tal como una solución tamponadora), se coloca directa o aproximadamente por encima del centro del tubo de reactivo 2200. El tubo contiene una cantidad de gránulos liofilizados 2212, y está sellado por una capa 2214, tal como de papel de aluminio. La lámina puede estar sellada con calor en la parte superior del tubo. Aunque una capa de laminado, como se describe adicionalmente en esta solicitud, se puede colocar en el tubo de reactivo, típicamente una capa de papel de aluminio es adecuada, donde el contenido del tubo es sólido, por ejemplo, reactivos liofilizados. En algunos ejemplos, la parte superior del tubo de reactivo tiene bordes biselados para reducir la expansión del borde superior del tubo durante el sellado térmico de una lámina en la parte superior del tubo. El tubo puede comprender además un código identificable, tal como un código de barras 1-D o 2-D en la parte superior. Tal código es útil para identificar la composición de los reactivos almacenados dentro, y/o un número de lote para su preparación, y/o una fecha de vencimiento. El código se puede imprimir, por ejemplo, con una impresora de inyección o transferencia de tinta.

[00093] Se muestra el patrón estrellado 2203 en la superficie interior inferior del tubo 2200. En B, la punta de la pipeta se baja, se perfora el sello 2214 y se coloca en una posición por encima de las partículas 2212. En C, el líquido 2211 se descarga desde la punta de la pipeta hacia las partículas, disolviéndose las mismas, como se muestra en D. Después de que las partículas se disuelven completamente, formando una solución 2218, la punta de la pipeta se baja a una posición donde está en contacto con el patrón estrellado 2203. En E, se hace que la punta de la pipeta aspire la solución 2218, y en F, la punta puede descargar opcionalmente la solución nuevamente en el tubo. Las etapas E y F se pueden repetir, según se desee, para facilitar la disolución y mezcla de los componentes liofilizados en una solución. En la etapa G, después de aspirar la mayor cantidad de la solución 2218 que sea posible en la punta de la pipeta, la punta de la pipeta se retira del tubo. Idealmente, se extrae el 100% en volumen de la solución 2218 en la punta de pipeta en G. En otros ejemplos, y dependiendo de la naturaleza de la solución 2218, se extrae al menos el 99% en volumen de la solución. En aun otros ejemplos, se extrae al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95% y al menos 90% en volumen de la solución.

[00094] El diseño del patrón estrellado o en forma de estrella se puede optimizar para maximizar la velocidad de flujo de líquido a través de los huecos entre una pipeta de fondo, tal como una pipeta p1000, y el patrón de estrella, y se describe adicionalmente en la solicitud de patente provisional estadounidense n .º de serie 60/959.437, presentada el 13 de julio de 2007. Se entenderá que, aunque la descripción en esta solicitud se refiere a pipetas y puntas de pipetas que se utilizan típicamente en la preparación de muestras biológicas, los principios y aspectos detallados del diseño son tan aplicables a otros tipos de pipetas y puntas de pipetas, y pueden adaptarse así.

[00095] La figura 13A muestra una vista en perspectiva en sección transversal de un tubo de reactivo 2200 que tiene una pared lateral 2201 y una parte inferior 2202. La superficie interior 2204 de la parte inferior es visible. Un recorte en forma de estrella 2203 se muestra en parte, como tres ranuras apicales.

[00096] Típicamente, el patrón en forma de estrella está presente como una parte elevada en la superficie interior inferior del tubo. Por lo tanto, durante la fabricación de un tubo de reactivo, tal como mediante moldeo por inyección, una parte externa del molde es una cavidad que define la forma exterior del tubo. Una forma interior del tubo está formada por un molde colocado concéntricamente con el molde de la parte externa, y que tiene una estructura en forma de estrella fresada fuera de su punta. Por lo tanto, cuando se inyecta plástico líquido en el espacio entre las dos partes del molde, la forma de estrella se forma como una parte elevada en la superficie interior inferior del tubo.

[00097] El ejemplo de patrón estelar 2203 que se muestra en la figura 13B en vista en planta se asemeja a una "rueda de barco" y comprende un centro 2209, un anillo circular 2207 centrado en el centro 2209 y 8 segmentos radiales configurados como ranuras radiales 2205. Cada ranura se encuentra con las otras ranuras en el centro 2209, y tiene un extremo radial, también denominado vértice o vértice. El patrón estelar 2203 tiene 8 ranuras, pero se entendería que un patrón estelar que tiene una cantidad menor o mayor de ranuras, tales como 3, 4, 6, 10 o 12, sería coherente con el diseño de la presente. El número de ranuras de la estrella debe ser mínimo consecuente con el pipeteo efectivo de líquido y también lo suficientemente espaciado como para no atrapar la punta de ninguna de las

puntas de pipeta que se utilizarán en las aplicaciones de manejo de líquido.

[00098] El centro 2209 se coloca típicamente coincidentemente con el centro geométrico de la parte inferior del tubo de reactivo 2200. El tubo es típicamente circular en sección transversal, por lo que identificar su centro (por ejemplo, en un punto de cruce de dos diámetros) es normalmente sencillo. El centro 2209 puede ser mayor que el que se muestra en la figura 13B, tal como puede ser un recorte circular o una parte elevada que excede el diámetro de la región formada por el punto de encuentro de las ranuras 2205.

[00099] El anillo 2207 es una característica opcional del patrón en forma de estrella 2203. Típicamente, el anillo 2207 está centrado alrededor del centro 2209, y típicamente también tiene una dimensión que corresponde a la superficie inferior de una punta de pipeta. Por lo tanto, cuando una punta de pipeta 'toca el fondo en la parte inferior del tubo de reactivo 2200, la parte inferior de la punta de pipeta descansa en contacto con el anillo 2207. El anillo 2207 es, por lo tanto, preferentemente un elemento de corte o empotrado que puede alojar la punta de la pipeta y ayudar a guiar su posicionamiento centralmente en la parte inferior del tubo. En otros ejemplos, están presentes más de uno, tal como 2, 3 o 4 anillos concéntricos 2207.

[000100] El patrón de estrella está configurado para tener dimensiones que proporcionan una velocidad de flujo óptima de líquido desde el tubo de reactivo hacia una punta de pipeta colocada adecuadamente. El patrón de estrella se muestra en la figura 13B como significativamente más pequeño en diámetro que el diámetro del tubo en su punto más ancho. El patrón de estrella puede tener un diámetro (medido desde el centro 2209 hasta el vértice de una ranura 2205) de 5 a 20% del diámetro del tubo de reactivo, o de 10 a 25% del diámetro del tubo de reactivo, o de 15 a 30% del diámetro del tubo de reactivo, o de 20 a 40% del diámetro del tubo de reactivo, o de 25 a 50% del diámetro del tubo de reactivo, o de 30 a 50% del diámetro del tubo de reactivo, o de 40 a 60% del diámetro del tubo de reactivo, o de 50 a 75% del diámetro del tubo de reactivo, o de 65 a 90% del diámetro del tubo de reactivo.

[000101] Por lo tanto, las ranuras 2205 están separadas por crestas (que ocupan el espacio entre las ranuras adyacentes). Las ranuras pueden ser más estrechas (ocupar un ángulo radial más pequeño) que los espacios entre ellas. Alternativamente, las ranuras pueden ser proporcionalmente más anchas que los espacios entre ellas. En este caso, puede ser más apropiado describirlas como que tienen crestas en lugar de ranuras. Alternativamente, las ranuras y crestas que las separan son de igual anchura en cada distancia radial desde el centro.

[000102] Las ranuras que forman los ápices de la estrella pueden ser redondeadas en sus superficies inferiores, tales como semicirculares en sección transversal, pero son típicamente en forma de V. También pueden ser trapezoidales en sección transversal, tales como tener una parte superior más ancha que la inferior, que es plana, la parte superior y la inferior están conectadas por paredes inclinadas.

[000103] En algunos ejemplos, para facilitar la fabricación, las ranuras terminan en el mismo nivel en la parte inferior del tubo. Así, los extremos radiales están todos dispuestos en la circunferencia de un círculo. Alternativamente, las ranuras no terminan todas en el mismo nivel. Por ejemplo, las ranuras pueden terminar alternativamente en diferentes niveles, y por lo tanto los extremos están dispuestos alternativamente en las circunferencias respectivas de dos círculos que ocupan planos diferentes en el espacio entre sí.

[000104] Las ranuras 2205 se muestran en la figura 13B con longitudes iguales (tal como se midió desde el centro 2209 hasta el vértice). Esto no tiene por qué ser así. En realizaciones alternativas, las ranuras pueden tener diferentes longitudes entre sí, por ejemplo, como longitudes alternas en ranuras alternas, donde hay una cantidad uniforme de ranuras. Además, los ápices pueden ser redondeados, en lugar de puntiagudos.

[000105] Típicamente, las ranuras se estrechan uniformemente en ancho y profundidad desde el centro 2209 hasta cada vértice respectivo. Aun otras configuraciones son posibles, tales como una ranura que sigue una anchura constante, o profundidad, hacia fuera a una extensión radial particular, tal como 30 - 60% de su longitud, y a continuación se estrecha o se vuelve menos profunda hacia su ápice. Alternativamente, una ranura puede comenzar estrecha en el centro 2209, ensancharse a una región más ancha cerca de su punto medio de longitud, y a continuación estrecharse hacia su ápice. Aun otras posibilidades, no descritas en esta solicitud, son coherentes con el patrón estrellado.

[000106] En un tubo de 0,3 ml, el ancho de cada ranura 2205 en su punto más ancho es típicamente de alrededor de 50 micrones, y el ancho típicamente se estrecha uniformemente desde un punto más ancho, más cercano o en el centro 2209, al ápice.

[000107] En un tubo de 0,3 ml, la profundidad de una ranura en el punto más profundo es típicamente de alrededor de 25 - 50 micrones y la profundidad típicamente se estrecha uniformemente desde un punto más profundo, más cercano o en el centro 2209, hasta un ápice.

[000108] En un tubo de 0,3 ml, el radio de la estrella formada a partir de las ranuras, medido como la distancia más corta desde el centro 2209 hasta el ápice, es típicamente de alrededor de 0,5 mm, pero puede ser de 0,1 a 1 mm,

o de 0,3 a 2 mm.

[000109] Alternativamente, en un tubo de 0,3 ml, las ranuras pueden redondearse y tener menos de 100 micrones de profundidad, o menos de 50 micrones de profundidad, o menos de 25 micrones de profundidad.

[000110] El patrón estrellado típicamente tiene un eje de rotación de simetría, el eje dispuesto perpendicularmente en la parte inferior del tubo y a través del centro 2209, de modo que las ranuras estén dispuestas simétricamente alrededor del eje de rotación. Con esto se quiere decir que, para n ranuras, una rotación de *2* ° alrededor del eje central (rotacional) puede hacer que cada ranura coincida con la ranura adyacente a ella.

[000111] La forma estrellada que se muestra en la figura 13B no es limitante, ya que comprende una cantidad de ranuras dispuestas radialmente 2205 y un anillo circular opcional 2207. Se pueden usar otras geometrías en forma de estrella y, dependiendo de la facilidad de fabricación, se pueden preferir. Por ejemplo, una estrella puede crearse simplemente superponiendo dos o más polígonos que tienen un centro común, pero desplazados rotacionalmente entre sí alrededor del eje central. (Véase, por ejemplo, «polígonos estelares» descritos en el sitio de Internet mathworld.wolfram.com/StarPolygon.html.) Tales formas alternativas de crear patrones en forma de estrella pueden utilizarse en esta solicitud.

Dispensador de líquidos

[000112] La reparación de una muestra lista para PCR para su uso en el diagnóstico posterior usando el aparato como se describe adicionalmente en esta solicitud, puede incluir una o más de las siguientes etapas: poner en contacto una muestra de polinucleótido neutralizado con una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa y una pluralidad de nucleótidos (en algunos casos, la mezcla de reactivos de PCR puede incluir además un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorogénica selectiva para al menos una parte del plásmido); en algunos casos, la mezcla de reactivos de PCR puede estar en forma de uno o más sedimentos liofilizados, tal como se almacena en un receptáculo en un soporte, y el procedimiento puede incluir además reconstituir el sedimento de PCR con líquido para crear una solución de mezcla de reactivos de PCR. Diversas, tales como una o más, de las operaciones de transferencia de líquido asociadas con las etapas anteriores se pueden lograr mediante un cabezal de pipeta automatizado.

[000113] Un dispensador de líquido adecuado para su uso con el aparato en esta solicitud comprende uno o más sensores; un colector; una o más bombas en comunicación fluida con el colector; uno o más cabezales dispensadores en comunicación fluida con el colector; y conexiones eléctricas que aceptan señales eléctricas de un controlador externo, donde el dispensador de líquido no tiene entrada o salida para fluidos, que no sea a través de la una o más bombas.

[000114] En la figura 18, se muestra una vista en sección transversal de un dispensador de líquido ejemplar. El dispensador de líquido está configurado para llevar a cabo operaciones de transferencia de fluido en dos o más soportes simultáneamente. Como se muestra en la figura 18, el dispensador de líquido 2105 se puede montar en un brazo que tiene tres grados de libertad de traslación. Los ejemplos alternativos pueden comprender un brazo que tiene menos de tres grados de libertad traslacional. La forma de montaje puede ser mediante una sujeción mecánica tal como uno o más tornillos, como se muestra en el lado izquierdo de la figura 18. Un brazo adecuado comprende tres ejes de correderas accionadas por correa accionadas por motores a pasos codificados. Las correderas de la estructura de soporte se pueden montar en un marco de aluminio de ángulo estructural u otro material equivalente, particularmente un metal o una aleación de metal. Las correderas alineadas en direcciones x e y (dirigidas fuera y en el plano de la figura 18, respectivamente) facilitan el movimiento del brazo a través de un conjunto de soportes y en una dirección a lo largo de un soporte dado, respectivamente.

[000115] El eje z del brazo se puede asociar con un sensor de fuerza variable que puede configurarse para controlar la extensión del movimiento vertical del cabezal durante las operaciones de recogida de punta y dispensación de fluido. Se muestra en la figura 18, por ejemplo, un cabezal de pipeta 1803 puede montarse de modo que se pueda detectar una fuerza que actúa hacia arriba contra el cabezal a través de un movimiento relativo entre el cabezal y un sensor de fuerza. Por ejemplo, cuando el cabezal de pipeta 1803 fuerza contra una pipeta desechable en el portaobjetos debajo de esta, se transmite una fuerza ascendente que provoca que el cabezal 1803 se apriete alrededor del punto de pivote 2102, lo que provoca que el tornillo de fijación 2104 presione contra un sensor de fuerza. A su vez, el sensor de fuerza está en comunicación con un procesador o controlador que controla al menos el movimiento vertical del dispensador de líquido de modo que, de este modo, el procesador o controlador pueda enviar instrucciones para detener el movimiento vertical del dispensador de líquido al recibir una señal adecuada del sensor de fuerza. Un ejemplo de sensor de fuerza adecuado para su uso en esta solicitud se encuentra disponible en Honeywell; su memoria descriptiva se muestra en un apéndice de la presente. El mecanismo de sensor de fuerza que se muestra en la figura 18 es ejemplar y uno de muchos mecanismos posibles capaces de ordenar el cabezal durante las operaciones de recogida y dispensación de fluido. Por ejemplo, como alternativa a un sensor de fuerza, se puede usar un sensor de bloqueo que detecte la interrupción en el movimiento vertical de uno o más cabezales de dispensación al entrar en contacto con un tubo de muestra o soporte de reactivo. Por consiguiente, tal como lo entendería un experto en la

materia, el dispensador de líquido tal como se describe en esta solicitud no se limita al mecanismo específico que se muestra en la figura 18.

[000116] El dispensador de líquido comprende además una cantidad de cabezales de resorte individual 1803, donde cada cabezal está configurado para aceptar una punta de pipeta de la una o más puntas de pipeta en un soporte. El dispensador de líquido puede configurarse adicionalmente de modo que no haya dos cabezales que acepten puntas de pipeta del mismo soporte. Las figuras 19 A-C, por ejemplo, representan cuatro cabezas con resorte individual 1803, pero se debe entender que el dispensador no se limita a este número. Por ejemplo, otros números incluyen 2, 3, 5, 6, 8, 10 o 12. Además, los cabezales con resorte individual 1803 se muestran dispuestos en paralelo entre sí, pero pueden configurarse en otras disposiciones.

[000117] El dispensador de líquido puede comprender además una bomba controlada por ordenador 2100 conectada al colector de distribución 1802 con válvulas controladas por ordenador relacionadas. El colector de distribución 1802 puede comprender una cantidad de válvulas, tales como válvulas solenoides 1801 configuradas para controlar el flujo de aire a través de las puntas de pipeta: por ejemplo, hay dos válvulas para cada pipeta y una válvula adicional para ventilar la bomba. Por lo tanto, para un dispensador de líquido que tiene cuatro cabezas de pipeta, hay nueve válvulas. En otro ejemplo, solo hay una válvula para cada pipeta y una válvula adicional para ventilar la bomba. Sin embargo, el colector de distribución no se limita a comprender exactamente nueve válvulas solenoides.

[000118] El dispensador de líquido se configura además para aspirar o dispensar fluido en relación con el análisis o preparación de soluciones de dos o más muestras. El dispensador de líquido también está configurado para dispensar líquido en un cartucho microfluídico. Además, el dispensador de líquido está configurado para aceptar o dispensar, en una sola operación, una cantidad de 1,0 ml de fluido o menos, tal como una cantidad de fluido en el intervalo de 10 nl - 1 ml.

[000119] El dispensador de líquido está configurado de modo que la bomba 2100 bombee aire dentro y fuera del colector de distribución. El colector de distribución comprende una red microfluídica que distribuye el aire de manera uniforme entre una o más válvulas. Por lo tanto, al controlar el flujo de aire a través del colector y varias válvulas, la presión por encima de los cabezales de pipeta puede variar de modo que el líquido se extraiga o expulse de una punta de pipeta unida a los respectivos cabezales de pipeta. De esta manera no es necesario suministrar aire comprimido a través de una manguera de aire al dispensador de líquido. Tampoco es necesario proporcionar líneas de líquido al cabezal dispensador. Además, ningún reactivo líquido o muestras líquidas de los soportes entra en ninguna parte del dispensador de líquido, incluido el colector. Esto reduce las complicaciones de la introducción de burbujas de aire en muestras o reactivos líquidos. Una configuración ejemplar de un colector de distribución se muestra en la figura 20.

[000120] Como se muestra en las diversas figuras, todo el dispensador de líquido que se mueve hacia arriba y hacia abajo del eje z es una unidad autónoma que solo tiene conexiones eléctricas a un procesador o controlador, y conexiones mecánicas al brazo. Los movimientos de traslación en tres dimensiones del dispensador de líquido pueden ser controlados por un microprocesador, tal como el procesador 980. No hay líneas de manejo de fluidos asociadas con el dispensador. Este diseño permite la simplificación del montaje del instrumento, minimiza la contaminación del instrumento y la contaminación cruzada de las muestras entre las diferentes instancias de funcionamiento del aparato, aumenta la eficiencia del bombeo (volumen muerto mínimo) y permite un fácil mantenimiento y reparación del dispositivo. Esta disposición también permite una fácil actualización de las características en el dispositivo dispensador, como el control de la bomba individual e independiente para cada dispensador, la fijación o retirada individual de la pipeta, la capacidad de controlar el paso de las pipetas, etc.

[000121] Otra característica del aparato se refiere a un verificador de identificación de muestras configurado para verificar la identidad de cada una de la cantidad de muestras que contienen ácido nucleico. Tales verificadores de identificación de muestras pueden ser lectores de caracteres ópticos, lectores de códigos de barras o lectores de etiquetas de radiofrecuencia u otros lectores adecuados, según disponibilidad para un experto en la materia. Se puede montar un verificador de identificación de muestras en el brazo o unirlo al dispensador de líquido para que se mueva en conjunto con el dispensador de líquido. Alternativamente, el verificador de identificación de muestras puede montarse por separado y puede moverse independientemente del dispensador de líquido. En las figuras 21 y 22, por ejemplo, el verificador de identificación de muestras 1701 es un lector de código de barras unido al dispensador de líquido. El campo de visión del escáner de código de barras 1701 no es lineal, lo que le permite detectar la luz reflejada por el espejo 2300 del tubo de muestra clínica con código de barras 2301 en el portaobjetos desechable 2302. El escáner de código de barras lee el código de barras en el tubo de muestra clínica, identificando así la presencia y los detalles específicos del tubo de muestra. Debido al uso de un espejo, el escáner está configurado para leer un código de barras impreso en forma de imagen de espejo (que así se refleja en forma normal), o para leer una imagen de espejo de un código de barras normal y convertir la imagen de espejo a forma no reflejada a través de un algoritmo informático.

[000122] El verificador de identificación de muestras está configurado para comunicar detalles de etiquetas que ha detectado o leído a un procesador o controlador en el aparato, permitiendo de este modo que la información de identificación de muestras se asocie con los resultados de diagnóstico y otra información relacionada con la

preparación de muestras, y la extracción y amplificación de ácido nucleico en el mismo.

[000123] En la figura 23, el verificador de identificación de muestras se coloca para leer indicios de un cartucho microfluídico.

[000124] En determinados ejemplos, el dispensador de líquido también puede comprender uno o más sensores 2001 (por ejemplo, sensores infrarrojos) cada uno de los cuales detecta la presencia de una punta de pipeta en un portaobjetos. En la figura 24, por ejemplo, un sensor infrarrojo 2001 puede tener un emisor infrarrojo colocado opuesto a él, y la presencia de la punta de pipeta desechable 2000 obstruye la línea de visión entre el emisor y el detector, permitiendo así la determinación de la presencia o ausencia de la punta de pipeta. Las pipetas de disposición están configuradas perpendicularmente a la placa de alineación del separador de pipetas 2003 como se describe adicionalmente en esta solicitud.

[000125] El dispensador de líquido también puede funcionar junto con una placa motorizada configurada para separar las pipetas y alinear las pipetas durante la dispensación de fluido en un cartucho microfluídico, como se describe adicionalmente en esta solicitud.

[000126] Las figuras 25A y 25B muestran un dispositivo ejemplar para separar las puntas de pipeta de un dispensador de líquido como se describe adicionalmente en esta solicitud. Las puntas de pipeta están alineadas, todas en el mismo paso, por encima de los respectivos zócalos (sobre una funda de punta de pipeta) en un soporte. Una placa de metal que tiene orificios alargados se encuentra sobre las cavidades. Las puntas de pipeta se insertan parcialmente hacia abajo en la funda a través de los orificios alargados, y la placa metálica se mueve a lo largo de tal manera que las puntas de pipeta se sujetan por la parte alargada de los orificios. Cuando el dispensador de líquido se mueve hacia arriba, las puntas de la pipeta se separan de sus respectivas cabezas. Cuando la placa de metal se mueve posteriormente de nuevo a su posición inicial, las puntas de la pipeta permanecen en su lugar en sus respectivos zócalos.

Ensamblaje del calentador y *separador magnético*

[000127] En la figura 18 (panel derecho), se muestra una vista en sección transversal de una unidad de calentador de un ensamblaje de calentador 1401 ejemplar. El ensamblaje de calentador comprende una o más unidades de calentador controlables de forma independiente, cada una de las cuales comprende un bloque térmico. En determinados ejemplos hay 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 25, 30, 32, 36, 40, 48 o 50 unidades de calentador en un ensamblaje de calentador. Aun otras cantidades de unidades de calentador, tales como cualquier cantidad entre 6 y 100 son coherentes con la descripción en esta solicitud. El uno o más bloques térmicos se pueden formar a partir de una sola pieza de metal u otro material, o se pueden hacer por separado entre sí y montarse independientemente entre sí o conectarse entre sí de alguna manera. Por lo tanto, el término ensamblaje de calentador connota una colección de unidades de calentador pero no requiere que las unidades de calentador o sus respectivos bloques térmicos se unan directa o indirectamente entre sí. El ensamblaje de calentador puede configurarse de modo que cada unidad de calentador caliente de forma independiente cada uno de los uno o más tubos de procesamiento 1402, por ejemplo, permitiendo que cada uno de los uno o más bloques térmicos sea controlable de forma independiente, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud. En la configuración de la figura 26, el ensamblaje de calentador comprende uno o más bloques térmicos 1403 cada uno de los cuales está configurado para alinearse con un tubo de procedimiento 1402 y suministrarle calor a este. Cada bloque térmico 1403 puede estar opcionalmente asegurado y conectado al resto del aparato usando una tira 1408 y uno o más tornillos 1407 u otro dispositivo adhesivo. Este mecanismo de sujeción no se limita a tal configuración.

[000128] Aunque en la figura 26 se muestra una vista en sección transversal de un bloque térmico 1403, debe entenderse que esto es coherente con tener múltiples bloques térmicos alineados en paralelo entre sí y de modo que sus puntos medios geométricos se encuentren en un solo eje lineal, aunque no es tan limitado en su configuración. Por lo tanto, el uno o más bloques térmicos pueden colocarse a diferentes alturas entre sí, en grupos o, alternativamente, individualmente, o pueden escalonarse entre sí de izquierda a derecha en la figura 26 (panel derecho), en grupos o alternativamente, o individualmente. Además, y en otras realizaciones, los bloques térmicos no están alineados paralelos entre sí, sino que están dispuestos en ángulos entre sí, siendo los ángulos distintos de 180°. Además, aunque el bloque térmico que se muestra en la Figura 26 puede ser uno de varios que son idénticos en tamaño, es coherente con la tecnología en esta solicitud que uno o más bloques térmicos pueden estar configurados para aceptar y calentar tubos de procesamiento de diferentes tamaños.

[000129] El bloque térmico ejemplar 1403 en la figura 26 (panel derecho) está configurado para tener una cavidad interna que rodea parcialmente una parte inferior del tubo de procedimiento 1402. En el bloque térmico de la figura 26, la cavidad interna rodea la parte inferior del tubo de procedimiento 1402 en dos lados, pero no el lado frontal (orientado lejos del imán 1404) y no el lado posterior (adyacente al imán 1404). Alternativamente, el bloque térmico 1403 está configurado para rodear la parte inferior del tubo de procedimiento 1402 en tres lados, incluido el lado frontal. Aun otras configuraciones del bloque térmico 1403 son posibles, coherentes con los objetivos de lograr un calentamiento rápido y uniforme del contenido del tubo de procedimiento 1402. En determinados ejemplos, el bloque térmico tiene

una forma que se ajusta estrechamente a la forma del tubo de procedimiento 1402 para aumentar el área de superficie del bloque térmico que está en contacto con el tubo de procedimiento durante el calentamiento del tubo de procedimiento. Por lo tanto, aunque se muestra un ejemplo de bloque térmico 1403 que tiene una cavidad cónica con fondo curvo en la que se asienta un tubo de procedimiento complementario, otros ejemplos de bloque térmico 1403 tienen, por ejemplo, una cavidad cilíndrica con un fondo plano. Aun otros ejemplos del bloque térmico 1403 pueden tener una cavidad interna rectilínea tal como que podría alojar una cubeta.

[000130] Además, aunque el bloque térmico 1403 se muestra como una forma de L en la figura 26, que ayuda en la transmisión de calor del elemento de calentamiento 1501 y en la fijación de uno o más bloques térmicos al resto del aparato, no tiene por qué ser así, como se describe adicionalmente en esta solicitud. Por ejemplo, el elemento de calentamiento 1501 puede colocarse directamente debajo del tubo de procedimiento 1402.

[000131] Cada bloque térmico 1403 está configurado para tener una masa térmica baja mientras aún mantiene una alta integridad estructural y permite que un imán se deslice más allá de los bloques térmicos y los tubos de procesamiento con facilidad. Una masa térmica baja es ventajosa porque permite que el calor se suministre o se disipe rápidamente, aumentando así la eficiencia de calentamiento y enfriamiento del aparato en el que se encuentra el ensamblaje de calentador. Los factores que contribuyen a una masa térmica baja incluyen el material a partir del cual se fabrica un bloque térmico y la forma que adopta. Por lo tanto, los bloques térmicos 1403 pueden estar hechos de materiales tales como aluminio, plata, oro y cobre, y aleaciones de estos, pero no están tan limitados.

[000132] En un ejemplo, el bloque térmico 1403 tiene una masa de ~10 gramos y está configurado para calentar muestras líquidas que tienen volúmenes de entre 1,2 ml y 10 ml. El calentamiento desde la temperatura ambiente hasta 65 °C para una muestra biológica de 1 ml se puede lograr en menos de 3 minutos, y 10 ml de un líquido acuoso tal como un amortiguador de liberación hasta 85 °C (a partir de 50 °C) en menos de 2 minutos. El bloque térmico 1403 puede enfriarse hasta 50 °C desde 85 °C en menos de 3 minutos. El bloque térmico 1403 puede configurarse para tener una uniformidad de temperatura de 65 +- 4 °C para calentar 1 ml de muestra y 85 +- 3 °C para calentar 10 ml de tampón de liberación. Estos intervalos son típicos, pero el bloque térmico puede escalarse adecuadamente para calentar otros volúmenes de líquido a velocidades que son más lentas y más rápidas que las descritas. Este aspecto de la tecnología es un aspecto que contribuye a lograr una extracción rápida de ácido nucleico de múltiples muestras mediante la combinación de etapas de procesamiento de líquido, calentamiento rápido para lisis, captura y liberación de ADN y separación magnética, como se describe adicionalmente en esta solicitud.

[000133] No se muestra en la figura 26, el ensamblaje de calentador 1401 también puede estar contenido opcionalmente en un recinto que rodea los bloques térmicos 1403. El alojamiento puede configurarse para permitir suficiente flujo de aire alrededor de los tubos de procesamiento y para no inhibir significativamente la velocidad de enfriamiento. El recinto puede tener un espacio entre él y los bloques térmicos para facilitar el enfriamiento. El recinto puede ser de plástico, pero no está limitado de ese modo. El recinto se configura típicamente para que parezca estético para un usuario.

[000134] Como se muestra en la figura 26, el ensamblaje de calentador 1401 también puede comprender uno o más elementos de calentamiento (por ejemplo, una resistencia de potencia) 1501, cada uno de los cuales está configurado para interactuar térmicamente con un bloque térmico 1403 y disipar calor a él. Por ejemplo, en un ejemplo, una resistencia de potencia puede disipar hasta 25 vatios de potencia. Una resistencia de potencia es ventajosa porque es típicamente una alternativa de bajo costo a un elemento de calentamiento. También se pueden usar otros componentes electrónicos listos para usar, tales como transistores de potencia, para detectar tanto la temperatura como el calor. Aunque el elemento de calentamiento 1501 se muestra colocado en la parte inferior del bloque térmico 1403, se entenderá que otras configuraciones son coherentes con el montaje descrito en esta solicitud: por ejemplo, el elemento de calentamiento 1501 puede colocarse en la parte superior o lateral de cada bloque térmico 1403, o directamente debajo del tubo de procedimiento 1402. Alternativamente, el elemento de calentamiento tiene otras formas y no es rectangular en sección transversal, pero puede ser curvo, tal como esférico o elipsoidal. Además, el elemento de calentamiento puede moldearse o modelarse de modo de ajustarse estrecha o aproximadamente a la forma de la parte inferior del tubo de procedimiento. No se muestra en la figura 26, el ensamblaje de calentador también puede comprender un material de interfaz (por ejemplo, almohadilla de Berquist o grasa térmica) entre el elemento de calentamiento 1501 y el bloque térmico 1403 para permitir un buen contacto térmico entre el elemento y el bloque térmico.

[000135] En el ejemplo que se muestra en la figura 26, el ensamblaje de calentador comprende además uno o más sensores de temperatura 1502, tales como detectores de temperatura resistivos, para detectar las temperaturas respectivas de cada bloque térmico 1403. Aunque se muestra un sensor de temperatura 1502 colocado en la parte inferior del bloque térmico 1403, se entenderá que otras configuraciones son coherentes con el ensamblaje descrito en esta solicitud: por ejemplo, el sensor de temperatura puede colocarse en la parte superior o lateral de cada bloque térmico 1403, o más cerca de la parte inferior del tubo de procedimiento 1402 pero no tan cerca como para impedir un calentamiento uniforme del mismo. Como se muestra en la figura 26, el ensamblaje de calentador puede comprender además un material de interfaz (por ejemplo, Berquist q-pad) 1503 configurado para permitir un buen contacto térmico entre el sensor 1502 y el bloque térmico 1403, para asegurar así una lectura precisa.

[000136] Determinados ejemplos del aparato de diagnóstico o preparación en esta solicitud tienen más de un ensamblaje de calentador como se describe adicionalmente en esta solicitud. Por ejemplo, un único ensamblaje de calentador puede configurarse para calentar independientemente 6 o 12 tubos de procesamiento, y un aparato puede configurarse con dos o cuatro de dichos ensamblajes de calentador.

[000137] La descripción en esta solicitud comprende además un separador magnético, configurado para separar partículas magnéticas, el separador comprende: uno o más imanes fijados a un miembro de soporte; un mecanismo motorizado configurado para mover el miembro de soporte de tal manera que el uno o más imanes se muevan hacia atrás y hacia adelante a lo largo de un eje fijo, y durante al menos una parte del movimiento, el uno o más imanes se mantienen muy cerca de uno o más receptáculos que contienen las partículas magnéticas en solución; y circuitos de control para controlar el mecanismo motorizado.

[000138] La descripción en esta solicitud incluye además un separador magnético integrado y un calentador, que comprende: un ensamblaje de calentador, donde el ensamblaje de calentador comprende una pluralidad de unidades de calentador controlables independientemente, cada una de las cuales está configurada para aceptar y calentar uno de una pluralidad de tubos de procesamiento; uno o más imanes fijados a un elemento de soporte; un mecanismo motorizado configurado para mover el miembro de soporte de tal manera que el uno o más imanes se muevan hacia atrás y hacia delante a lo largo de un eje fijo, y durante al menos una parte del movimiento el uno o más imanes mantienen una proximidad cercana a uno o más de los tubos de procesamiento en el ensamblaje de calentador, donde el uno o más tubos de procesamiento contienen partículas magnéticas; y circuitos de control para controlar el mecanismo motorizado y para controlar el calentamiento de las unidades de calefacción.

[000139] Típicamente, cada uno de uno o más receptáculos es un tubo de procedimiento, tal como para llevar a cabo reacciones biológicas. En algunos ejemplos, la proximidad cercana puede definirse como un imán que tiene una cara a menos de 2 mm de distancia de la superficie exterior de un tubo de procedimiento sin estar en contacto con el tubo. Se puede definir además que está a menos de 1 mm de distancia sin estar en contacto con el tubo, o entre 1 y 2 mm de distancia.

[000140] Típicamente, las partículas magnéticas son micropartículas, esferas o microesferas capaces de unirse a una o más biomoléculas, tales como polinuleótidos. La separación de las partículas, mientras están en solución, comprende típicamente recolectar y concentrar, o recolectar, las partículas en una ubicación en el interior del uno o más receptáculos.

[000141] Un separador magnético ejemplar 1400 se muestra en la figura 27, configurado para funcionar junto con el ensamblaje de calentador 1401. El separador magnético 1400 está configurado para mover uno o más imanes con respecto al uno o más tubos de procesamiento 1402. Si bien el imán 1404 mostrado en la figura 27 se muestra como un bloque rectangular, no tiene una forma tan limitada. Además, la configuración de la Figura 27 es coherente con tener un único imán que se extiende a través de todos los bloques térmicos 1403 o tener múltiples imanes que funcionan en concierto y alineados para abarcar un subconjunto de los bloques térmicos, por ejemplo, alineados colinealmente en el miembro de soporte. El imán 1404 puede estar hecho de neodimio (por ejemplo, de K &J Magnetics, Inc.) y puede tener una fuerza magnética de 5000 a 15.000 Gauss (Brmax). Los polos de los imanes 1404 pueden disponerse de modo que un polo esté orientado hacia los bloques térmicos 1403 y el otro esté orientado hacia afuera de los bloques térmicos.

[000142] Además, en el ejemplo que se muestra en la figura 27, el imán 1404 está montado en un miembro de soporte 1505 que puede elevarse hacia arriba y hacia abajo a lo largo de un eje fijo usando un eje motorizado 1405. El eje fijo puede ser vertical. En el ejemplo que se muestra en la figura 27, una disposición de engranajes 1406 permite que el motor 1601 se coloque perpendicular al eje 1405, ahorrando así espacio en el aparato en el que se ubica el separador magnético 1400. En otros casos, el motor se coloca debajo del eje 1405. Se entenderá que otras configuraciones son coherentes con el movimiento del imán con respecto a los tubos de procesamiento, que incluyen, pero no se limitan a, mover el imán de lado a lado o bajar el imán desde arriba. El motor puede ser controlado por ordenador para funcionar a una velocidad particular; por ejemplo, a una velocidad de rotación que conduce al movimiento vertical del imán en el intervalo de 1 a 20 mm/s. Por lo tanto, el separador magnético puede configurarse para moverse repetidamente, por ejemplo, hacia arriba y hacia abajo, de lado a lado, o hacia atrás y hacia delante, a lo largo del mismo eje varias veces. En algunos ejemplos hay más de un eje que funciona bajo control motorizado. La presencia de al menos un segundo eje tiene el efecto de hacer que el movimiento del separador sea más suave. En algunos ejemplos, el miembro de soporte se desplaza sobre uno o más miembros de guía para asegurar que el miembro de soporte no, por ejemplo, se incline, tuerza o gire, o experimente otros movimientos internos mientras se mueve (que no sea el movimiento controlado a lo largo del eje) y, por lo tanto, reduzca la eficacia de la separación.

[000143] El miembro de soporte también puede estar configurado para mover los imanes entre una primera posición, situada lejos del uno o más receptáculos, y una segunda posición situada muy cerca del uno o más receptáculos, y está configurado además para moverse a una amplitud alrededor de la segunda posición donde la amplitud es menor que una distancia entre la primera posición y la segunda posición como se mide a lo largo del eje.

[000144] Se muestra en las figuras 26 y 27, el ensamblaje de calentador 1401 y el separador magnético 1400 pueden controlarse mediante circuitos electrónicos tales como en la placa de circuito impreso 1409. Los circuitos electrónicos 1409 pueden configurarse para hacer que el ensamblaje de calentador 1401 aplique calor independientemente a los tubos de procesamiento 1402 para minimizar el costo de calentamiento y detección. También se puede configurar para hacer que el separador magnético 1400 se mueva repetidamente con respecto a los tubos de procesamiento 1402. Los circuitos electrónicos 1409 se pueden integrar en una única placa de circuito impreso (PCB). Durante el montaje, una pieza de guía de plástico puede ayudar a mantener cierto espacio entre los bloques térmicos individuales 1403. Este diseño puede beneficiarse del uso de dispositivos electrónicos listos para usar para controlar una disposición personalizada de bloques térmicos 1403.

[000145] No se muestra en las figuras 26 y 27, un alojamiento puede cubrir el separador magnético 1400 y el ensamblaje de calentador 1401 para la protección de los subconjuntos a continuación y la estética. El alojamiento también se puede diseñar para mantener los bloques térmicos 1403 separados entre sí para garantizar la eficiencia de calentamiento y enfriamiento. El separador magnético y el conjunto de calentador pueden, alternativamente, estar encerrados por recintos separados. El uno o más recintos pueden ser de plástico.

[000146] Ventajosamente, el ensamblaje de calentador y el separador magnético funcionan juntos para permitir que se realicen operaciones de calentamiento y separación sucesivas en materiales líquidos en el uno o más tubos de procesamiento sin transportar los materiales líquidos o los tubos de procesamiento a diferentes ubicaciones para realizar calentamiento o separación. Tal operación también es ventajosa porque significa que las funciones de calentamiento y separación que, aunque son independientes entre sí, se utilizan en la preparación de muestras se pueden realizar con un aparato compacto y eficiente.

Cargador automático de cartuchos

[000147] Una realización ejemplar de un sistema de detección de amplificación de PCR 2900 para su uso con un cartucho microfluídico se muestra en la figura 28. El sistema 2900 realiza y automatiza el procedimiento de PCR en múltiples muestras que contienen ácido nucleico en paralelo. El sistema 2900 comprende un depósito 2907 para cartuchos microfluídicos no utilizados, un autocargador de cartucho, un compartimento de recepción para un cartucho microfluídico, un detector y una bandeja de desechos 2903 configurada para recibir cartuchos microfluídicos usados. En una realización, el cargador automático de cartucho comprende un paquete de cartucho 2901 y un empujador de cartucho 2904.

[000148] El sistema 2900, con fines ilustrativos, está configurado de modo que un cartucho microfluídico se mueva en un plano y de manera lineal desde el depósito hasta el compartimento de recepción, hasta el contenedor de desechos, pero no es necesario que esté dispuesto de esa manera. Por ejemplo, el contenedor de cartuchos para desecho 2903 puede alinearse ortogonalmente, o cualquier ángulo de este, con el compartimento de recepción, tal como dispuesto detrás de este. Alternativamente, cada elemento (cargador automático de cartucho 2901, compartimento de recepción 2902 y contenedor de cartuchos para desecho 2903) puede configurarse de una manera escalonada donde el paquete de cartucho 2901 se encuentre en el mismo nivel, más alto o más bajo que el sistema de detección de amplificación de PCR microfluídica 2902 y el sistema de detección de amplificación de PCR microfluídica 2902 se encuentra en el mismo nivel, más alto o más bajo que el contenedor de cartuchos para desecho 2903. Otra configuración podría ser que cada uno de los tres elementos no esté dispuesto linealmente sino en un ángulo entre sí, aunque dentro del mismo plano.

[000149] La figura 28 ilustra el paquete de cartucho 2901 y el contenedor de cartuchos para desecho 2903 debajo del plano del compartimento de recepción, y un sistema de detección 2908 por encima del plano. Esta configuración es ejemplar y se entenderá que estos elementos pueden colocarse por encima o por debajo del plano.

[000150] La figura 29 ilustra un depósito para cartuchos microfluídicos no utilizados. El depósito puede configurarse para aceptar una cantidad de cartuchos apilados individualmente y cargados individualmente, o puede configurarse para aceptar un paquete de cartuchos. Un paquete de cartuchos ejemplar tiene 24 cartuchos. El depósito puede consistir en una jaula 2910 de cualquier material que puede o no ser transparente. Por ejemplo, puede ser de metal o plástico. El paquete de cartuchos 2901 no se limita a veinticuatro cartuchos 106 por paquete, pero puede contener cualquier número de 2 a 100. Por ejemplo, otras cantidades tales como 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 36, 40, 48, 50 o 64 son cantidades posibles de cartuchos 106 por paquete. De manera similar, el depósito puede configurarse para aceptar esa cantidad de cartuchos, cuando se apilan individualmente. En un ejemplo, como en la figura 29, cada cartucho 2906, apilado individualmente, descansa sobre repisas 2911 que sobresalen de la jaula 2910. Sin embargo, son posibles muchas otras configuraciones. Por ejemplo, un cartucho 2906 puede descansar sobre ranuras cóncavas hechas dentro de las superficies interiores de la jaula 2910. Además, es posible que no sea necesario colocar el paquete de cartucho 2901 en una jaula 2910. El paquete de cartuchos 2901 puede incluir en sí mismo las conexiones necesarias para unirse de forma segura al aparato para cargar los cartuchos 2906.

[000151] La figura 30 es una ilustración de una posición de carga inicial ejemplar de un paquete de cartucho 2901

en un depósito cuando las muestras se cargan en el cartucho superior en el paquete. La figura 30 muestra el paquete de cartucho 2901 debajo de un plano que contiene un empujador de cartucho. En otros ejemplos, el paquete de cartucho 2901 puede estar por encima del plano de un empujador de cartucho donde el empujador empuja el cartucho más bajo fuera del soporte; o parcialmente por encima y parcialmente por debajo en un soporte 2920 donde un empujador de cartucho empuja un cartucho desde la mitad del paquete de cartucho 2901. En el ejemplo que se muestra, un cartucho superior 106 se empuja a lo largo de dos rieles guía 2905. Alternativamente, puede haber más o menos rieles guía (tales como uno o tres) o ningún riel guía en absoluto, siempre y cuando se pueda hacer que un cartucho 2906 se mueva a otras posiciones requeridas.

[000152] Un ejemplo de empujador de cartucho 2904 se muestra en la figura 31. El empujador de cartucho 2904 empuja un cartucho 2906 a lo largo de los rieles guía 2905, lo que permite que un cartucho 2906 se desplace a posiciones precalibradas mediante el mecanismo de un motor a pasos 2930. Sin embargo, se entenderá que el mecanismo de transporte del cartucho 2906 no se limita a un motor paso a paso a pasos 2930 y, por lo tanto, otros mecanismos también son coherentes con el empujador de cartucho 2904 como se describe en esta solicitud.

[000153] La figura 32 muestra un cartucho usado 2906 que ha sido empujado por el empujador de cartucho 2904 en el contenedor de cartuchos para desecho 2903 después de que se haya completado un procedimiento de PCR. El ejemplo muestra un mango con reborde 2940 que facilita el manejo fácil, tal como el vaciado, del contenedor 2903. Sin embargo, se entenderá que el mango 2904 no se limita al estilo y la forma mostrados.

[000154] Un paquete de cartucho 2901 ejemplar, antes y después de que se completen múltiples procedimientos de PCR, se muestra en la figura 33. Después de que el empujador de cartucho 2904 empuja un cartucho 2906 fuera del paquete de cartuchos 2901, un resorte 2950 en la parte inferior del paquete de cartuchos empuja contra la superficie inferior de la pila de cartuchos y hace que el cartucho superior esté a disposición para la inyección de muestras. El resorte 2950 no se limita en número o tipo. Por lo tanto, aunque se muestra un único resorte helicoidal o en espiral, es coherente con la descripción en esta solicitud que se podría usar más de un resorte helicoidal o en espiral, tal como 2, 3 o 4, y que alternativamente se podría usar una tira de metal con resorte, o varias tiras. Alternativamente, se podría utilizar otro mecanismo para forzar los cartuchos hacia arriba, tal como un recipiente neumático, hidráulico o inflable presurizado.

[000155] Cabe señalar que los cartuchos microfluídicos, como se describe adicionalmente en esta solicitud, que tienen un reborde elevado a lo largo de sus bordes para permitir la facilidad de apilamiento y/o almacenamiento en un paquete o un autocargador son particularmente ventajosos porque los rebordes elevados también introducen una rigidez en los cartuchos y ayudan a mantener las entradas de fluido en un cartucho lejos de las de otro cartucho durante el almacenamiento y transporte. Las regiones elevadas, que no solo deben ser rebordes a lo largo de cada borde de un cartucho, también ayudan a minimizar la fricción entre la superficie inferior de un cartucho y la superficie superior de otro.

Compartimento de recepción de cartuchos

[000156] La presente tecnología se refiere a un aparato y procedimientos relacionados para amplificar y llevar a cabo análisis de diagnóstico en nucleótidos de muestras biológicas. El aparato está configurado para actuar sobre un cartucho microfluídico desechable que contiene múltiples carriles de muestra en paralelo, y comprende una plataforma de instrumento reutilizable que puede accionar operaciones de cartucho, puede detectar y analizar los productos de la amplificación de PCR en cada uno de los carriles por separado, en todos simultáneamente, o en grupos simultáneamente, y, opcionalmente, puede mostrar los resultados en una interfaz gráfica de usuario.

[000157] La figura 34 muestra una vista en perspectiva de un cartucho ejemplar 200 que contiene múltiples carriles de muestra, y un cabezal de lectura ejemplar 300 que contiene un aparato de detección para leer señales del cartucho 200. También se muestra en la figura 34 una bandeja 110 que, opcionalmente, puede alojar el cartucho 200 antes de la inserción del cartucho en un compartimento de recepción. El aparato descrito en esta solicitud es capaz de llevar a cabo PCR en tiempo real en una cantidad de muestras en el cartucho 200 simultáneamente. Preferentemente, la cantidad de muestras es 12 muestras, tal como se ilustra con el cartucho ejemplar 200, aunque otras cantidades de muestras tales como 4, 8, 10, 16, 20, 24, 25, 30, 32, 36, 40 y 48 están dentro del alcance de la presente descripción. En el funcionamiento preferido del aparato, una solución lista para PCR que contiene la muestra y, opcionalmente, uno o más reactivos específicos del analito (ASR) que utilizan otros componentes del aparato, como se describe adicionalmente en esta solicitud, antes de la introducción en el cartucho 200.

[000158] En algunas realizaciones, un aparato incluye un compartimento configurado para recibir selectivamente un cartucho microfluídico; al menos una fuente de calor acoplada térmicamente al compartimento; y acoplada a un procesador como se describe adicionalmente en esta solicitud, donde la fuente de calor está configurada para calentar carriles de muestra individuales en el cartucho, y el procesador está configurado para controlar la aplicación de calor a los carriles de muestra individuales, por separado, en todos simultáneamente, o en grupos simultáneamente.

[000159] El aparato incluye además al menos un detector configurado para detectar un polinucleótido (ácido

nucleico) en una muestra en uno o más de los carriles de muestra individuales, por separado o simultáneamente; donde el procesador está acoplado al detector para controlar el detector y para recibir señales del detector.

[000160] El compartimento puede ser una parte del aparato que está configurada para recibir selectivamente el cartucho microfluídico. Por ejemplo, el compartimento y el cartucho microfluídico pueden tener una forma complementaria de modo que el cartucho microfluídico se reciba selectivamente, *por ejemplo,* en una sola orientación. Por ejemplo, el cartucho microfluídico puede tener un miembro de registro que se ajuste a una característica complementaria del compartimento. El miembro de registro puede ser, por ejemplo, un corte en un borde del cartucho, tal como una esquina que se corta, o una o más muescas que se hacen en uno o más de los lados. Al recibir selectivamente el cartucho, el compartimento puede ayudar a un usuario a colocar el cartucho de modo que el aparato pueda funcionar adecuadamente en el cartucho. De esta manera, se puede lograr una alineación libre de errores de los cartuchos. Además, el cartucho puede diseñarse para ser ligeramente más pequeño que el compartimento de recepción en aproximadamente 200-300 micrones para una fácil colocación y extracción del cartucho. El aparato puede incluir además un sensor configurado para detectar si el cartucho microfluídico se recibe selectivamente

[000161] El compartimento también se puede configurar de modo que varios componentes del aparato que pueden funcionar en el cartucho microfluídico (fuentes de calor, detectores, miembros de fuerza y similares) se coloquen para funcionar adecuadamente en el cartucho microfluídico. Por ejemplo, una fuente de calor de contacto puede colocarse en el compartimento de modo que pueda acoplarse térmicamente a una ubicación distinta en un cartucho microfluídico que se recibe selectivamente en el compartimento de recepción.

[000162] De manera alternativa, en relación con la alineación de microcalentadores en el módulo calentador con microcomponentes que requieren calor correspondientes (tales como válvulas, bombas, compuertas, cámaras de reacción, etc.), los microcalentadores pueden diseñarse para que sean ligeramente más grandes que los componentes microfluídicos que requieren calor, de modo que, aunque el cartucho puede estar descentrado del calentador, los componentes individuales aún pueden funcionar de manera eficaz.

[000163] El detector 300 puede ser, por ejemplo, un detector óptico, como se describe adicionalmente en esta solicitud. Por ejemplo, el detector puede incluir una fuente de luz que emite luz selectivamente en una banda de absorción de un colorante fluorescente, y un detector de luz que detecta selectivamente la luz en una banda de emisión del colorante fluorescente, donde el colorante fluorescente corresponde a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de esta. De manera alternativa, por ejemplo, el detector óptico puede incluir un diodo filtrado por paso de banda que emite luz de forma selectiva en la banda de absorción del colorante fluorescente y un fotodiodo filtrado por paso de banda que detecta de forma selectiva la luz en la banda de emisión del colorante fluorescente; o, por ejemplo, el detector óptico puede configurarse para detectar independientemente una pluralidad de colorantes fluorescentes que tienen diferentes espectros de emisión fluorescentes, donde cada colorante fluorescente corresponde a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de esta; o, por ejemplo, el detector óptico puede configurarse para detectar independientemente una pluralidad de colorantes fluorescentes en una pluralidad de ubicaciones diferentes en un cartucho microfluídico, donde cada colorante fluorescente corresponde a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de esta en una muestra diferente.

[000164] La fuente de calor puede ser, por ejemplo, una fuente de calor tal como un calentador resistivo o una red de calentadores resistivos, una fuente de calor reversible tal como un circuito de transferencia de calor lleno de líquido o un elemento termoeléctrico, una fuente de calor radiativa tal como una lámpara de xenón y similares.

[000165] En realizaciones preferidas, la al menos una fuente de calor puede ser una fuente de calor de contacto que se selecciona de un calentador resistivo (o red de este), un radiador, un intercambiador de calor fluido y un dispositivo Peltier. La fuente de calor de contacto puede configurarse en el compartimento de recepción para acoplarse térmicamente a una o más ubicaciones distintas de un cartucho microfluídico recibido en el compartimento, mediante lo cual las ubicaciones distintas se calientan selectivamente. Se puede incluir al menos una fuente de calor de contacto adicional, donde cada una de las fuentes de calor de contacto se configura en el compartimento para acoplarse térmicamente de forma independiente a una ubicación distinta en un cartucho microfluídico recibido en el compartimento, mediante lo cual las ubicaciones distintas se calientan de forma independiente. La fuente de calor de contacto puede configurarse para estar en contacto físico directo con una ubicación distinta de un cartucho microfluídico recibido en el compartimento. En diversas realizaciones, cada calentador de fuente de contacto puede configurarse para calentar una ubicación distinta que tiene un diámetro promedio en 2 dimensiones de alrededor de 1 milímetro (mm) a alrededor de 15 mm (típicamente, alrededor de 1 mm a alrededor de 10 mm), o una ubicación distinta que tiene un área superficial de entre alrededor de 1 mm^2 alrededor de 225 mm^2 (típicamente, entre alrededor de 1 mm^2 y alrededor de 100 mm^2, o en algunas realizaciones entre alrededor de 5 mm^2 y alrededor de 50 mm^2).

[000166] En diversas realizaciones, al menos una fuente de calor puede ser una fuente de calor radiativa configurada para dirigir el calor a una ubicación distinta de un cartucho microfluídico recibido en el compartimento de recepción.

[000167] En diversas realizaciones, el aparato incluye uno o más miembros de fuerza que están configurados

para aplicar fuerza para acoplar térmicamente la al menos una fuente de calor a al menos una parte del cartucho microfluídico recibido en el compartimento. El uno o más miembros de fuerza pueden configurarse para operar un miembro mecánico en el cartucho microfluídico. Al menos un miembro de fuerza puede operarse manualmente. Al menos un miembro de fuerza puede estar acoplado mecánicamente a una tapa en el compartimento de recepción, mediante lo cual el funcionamiento de la tapa hace funcionar el miembro de fuerza.

[000168] En diversas realizaciones, la fuerza aplicada por el uno o más miembros de fuerza puede dar como resultado una presión promedio en una interfaz entre una parte del compartimento de recepción y una parte del cartucho microfluídico de alrededor de 1 psi (alrededor de 7000 Fa). La aplicación de fuerza es importante para garantizar un contacto térmico constante entre el agua del calentador y el reactor de PCR y las microválvulas en el cartucho microfluídico.

[000169] En diversas realizaciones, el aparato puede incluir además una tapa en el compartimento de recepción, la tapa puede funcionar para excluir al menos parcialmente la luz ambiente del compartimento. La tapa puede ser, por ejemplo, una tapa deslizante. La tapa puede incluir el detector óptico. Una cara principal de la tapa en el compartimento puede variar de la planicidad en menos de alrededor de 100 micrómetros, por ejemplo, menos de alrededor de 25 micrómetros. La tapa puede configurarse para ser extraíble del aparato. La tapa puede incluir un miembro de enganche que garantiza que la tapa se cierre de forma segura antes de que se apliquen reacciones de amplificación a las muestras en el cartucho.

[000170] La figura 35 muestra una vista en sección transversal esquemática de una parte de un aparato como se describe en esta solicitud, que muestra la entrada de la muestra en un cartucho 200 a través de una punta de pipeta 10 (tal como una pipeta desechable) unida a un cabezal dispensador automático y una entrada 202. Aunque no se muestra, hay tantas entradas 202 como muestras que se ingresarán al cartucho 200. La entrada 202 se configura preferentemente para recibir una pipeta o el extremo inferior de un tubo de PCR y, por lo tanto, para aceptar la muestra para su análisis con un desecho mínimo y con una introducción mínima de aire. El cartucho 200 está dispuesto sobre un microcalentador en sustrato 400 y está en contacto con este. El cabezal de lectura 300 se coloca por encima del cartucho 200 y una cubierta para óptica 310 restringe la cantidad de luz ambiental que puede ser detectada por el cabezal de lectura.

[000171] En diversas realizaciones, un sistema tal como se describe en esta solicitud puede incluir tanto un cartucho microfluídico como el aparato de diagnóstico.

Cartucho microfluídico

[000172] Un aspecto de la presente tecnología se refiere a un cartucho microfluídico que incluye una primera, segunda y tercera capas que en conjunto definen una pluralidad de redes microfluídicas, cada red tiene varios componentes configurados para llevar a cabo PCR en una muestra que tiene uno o más polinucleótidos cuya presencia se determinará. El cartucho incluye uno o más carriles de muestra en paralelo, donde cada carril está asociado independientemente con una muestra dada para procesamiento simultáneo, y cada carril contiene una red microfluídica configurada independientemente. Un cartucho ejemplar que tiene tal construcción se muestra en la figura 36. Tal cartucho es fácil de fabricar y permite la PCR en un volumen de reacción concentrado *(~ 4* ml) y permite un termociclado rápido, a *~20* segundos por ciclo.

[000173] Aunque se pueden encontrar otras capas en cartuchos que tienen un rendimiento comparable y facilidad de fabricación, el cartucho en esta solicitud incluye realizaciones que tienen solo tres capas en su construcción: un sustrato que tiene un lado superior y un lado inferior opuesto, donde el sustrato comprende una red microfluídica que tiene una pluralidad de carriles de muestra; un laminado unido al lado inferior para sellar los componentes de la red microfluídica y proporcionar una capa de transferencia térmica eficaz entre un elemento de calentamiento dedicado y los componentes en la red microfluídica; y una etiqueta, unida a la parte superior que también cubre y sella los orificios que se utilizan en el procedimiento de fabricación para cargar componentes microfluídicos como válvulas. Por lo tanto, las realizaciones de la presente incluyen cartuchos microfluídicos que consisten en tres capas, un sustrato, un laminado y una etiqueta, aunque otras características, adicionales, distintas de las capas pueden ser coherentes con dichas caracterizaciones. Las realizaciones de la presente incluyen además cartuchos microfluídicos que consisten esencialmente en tres capas, un sustrato, un laminado y una etiqueta, aunque otras características adicionales distintas de las capas pueden ser coherentes con tales caracterizaciones. Además, las realizaciones de la presente invención incluyen adicionalmente cartuchos microfluídicos que comprenden tres capas, un sustrato, un laminado y una etiqueta.

[000174] Una red microfluídica puede incluir, en comunicación fluídica, uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en: compuertas, válvulas tales como válvulas accionadas térmicamente, canales, conductos de ventilación y cámaras de reacción. Los componentes particulares de las redes microfluídicas ejemplares se describen adicionalmente en otra parte de la presente invención. El cartucho procesa típicamente la muestra mediante el aumento de la concentración de un polinucleótido que se determinará.

[000175] Un carril de muestra es un conjunto de elementos, controlables independientemente de aquellos en otro carril de muestra, mediante el cual se puede aceptar y analizar una muestra, de acuerdo con los procedimientos descritos en esta solicitud. Un carril comprende al menos una entrada de muestra y un componente microfluídico, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud en relación con un cartucho microfluídico. En algunas realizaciones, cada red microfluídica comprende adicionalmente un depósito de desbordamiento para contener líquido extra dispensado en el cartucho.

[000176] En diversas realizaciones, un carril puede incluir un puerto de entrada de muestra, una primera válvula accionada térmicamente, una segunda válvula accionada térmicamente, una cámara de reacción de PCR y canales que conectan el puerto de entrada a la cámara de reacción de PCR a través de la primera válvula, y canales que conectan la cámara de reacción de PCR a un conducto de ventilación de salida a través de la segunda válvula. La válvula de entrada de muestra puede configurarse para aceptar una cantidad de muestra a un diferencial de presión en comparación con la presión ambiente de entre alrededor de 100 a 5000 Pa. Cabe destacar que cuanto menor sea la presión de carga, mayor será el tiempo de llenado para que una alícuota de mezcla de reacción llene la red microfluídica. La aplicación de más presión reducirá el tiempo de llenado, pero si el tiempo durante el cual se aplica la presión no se determina correctamente, la muestra podría ser expulsada a través del cartucho microfluídico (si no hay un conducto de ventilación hidrófobo final). Por lo tanto, el tiempo durante el cual se aplica la presión debe determinarse adecuadamente, tal como mediante procedimientos disponibles para un experto en la materia, para evitar el llenado insuficiente o el llenado excesivo. En general, el tiempo de llenado es inversamente proporcional a la viscosidad de la solución. Por ejemplo, la figura 37 muestra un cartucho microfluídico que contiene doce carriles de muestra independientes capaces de procesar muestras de forma independiente (simultánea o sucesiva).

[000177] La red microfluídica en cada carril se configura típicamente para llevar a cabo PCR en una muestra lista para PCR, tal como una que contiene ácido nucleico (ADN o ARN) extraído de una muestra biológica bruta usando otros aspectos del aparato como se describe adicionalmente en esta solicitud. Por lo tanto, una muestra lista para PCR es típicamente una mezcla que comprende el o los reactivos de PCR y la muestra de polinucleótidos neutralizados, adecuada para someterse a condiciones de ciclado térmico que crean amplicones de PCR a partir de la muestra de polinucleótidos neutralizados. Por ejemplo, una muestra lista para PCR puede incluir una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa, un plásmido de control positivo, una sonda de hibridación fluorogénica selectiva para al menos una parte del plásmido y múltiples nucleótidos, y al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos.

[000178] Típicamente, la red microfluídica está configurada de modo que el tiempo requerido para que una microgota de muestra pase de la entrada a la segunda válvula es menos del 50% del tiempo requerido para que la muestra se desplace hasta el conducto de ventilación de salida. Típicamente, la red microfluídica está diseñada para tener una mayor resistencia al flujo aguas abajo de las dos válvulas sin aumentar el volumen total de la red microfluídica en comparación con la cantidad requerida para llenarse desde la primera válvula hasta el conducto de ventilación final de la red.

[000179] La figura 38A muestra una vista en perspectiva de una parte de un cartucho microfluídico ejemplar 200 según la presente tecnología. El cartucho puede denominarse cartucho de PCR de múltiples carriles con entradas de pipeta dedicadas 202. En la figura 38A se muestran varios componentes representativos del cartucho 200. Por ejemplo, la entrada de muestra 202 está configurada para aceptar una jeringa, una pipeta o un tubo de PCR que contiene una muestra lista para PCR. Se muestra más de una entrada 202, donde una entrada funciona junto con un solo carril. Varios componentes de los circuitos microfluídicos en cada carril también son visibles. Por ejemplo, las microválvulas 204 y 206, y los conductos de ventilación 208, son partes de circuitos microfluídicos en un carril dado. También se muestra un reactor de PCR ultrarrápido 210, que, como se describe adicionalmente en esta solicitud, es un canal microfluídico que es lo suficientemente largo como para permitir que se produzca PCR en una muestra. Por encima del reactor de PCR 210 hay una ventana 212 que permite la detección óptica, tal como la detección de fluorescencia de una sustancia fluorescente, tal como una sonda de hibridación fluorogénica, en el reactor de PCR 210 cuando un detector está situado por encima de la ventana 212.

[000180] Un cartucho de múltiples carriles está configurado para aceptar una cantidad de muestras, en algunos ejemplos 12 muestras, donde las muestras incluyen al menos una primera muestra y una segunda muestra, donde la primera muestra y la segunda muestra contienen cada una uno o más polinucleótidos en una forma adecuada para la amplificación. Los polinucleótidos en cuestión pueden ser iguales o diferentes entre sí, en diferentes carriles de un cartucho. El cartucho de múltiples muestras comprende al menos una primera red microfluídica y una segunda red microfluídica, adyacentes entre sí, donde cada una de la primera red microfluídica y la segunda red microfluídica es como se describe en otra parte de la presente solicitud, y donde la primera red microfluídica acepta la primera muestra, y donde la segunda red microfluídica acepta la segunda muestra.

[000181] Las entradas de muestra de carriles adyacentes están razonablemente separadas entre sí para evitar cualquier contaminación de una entrada de muestra de otra muestra cuando un usuario introduce una muestra en cualquier cartucho. En algunas realizaciones, las entradas de muestra están configuradas para evitar la posterior introducción inadvertida de la muestra en un carril dado después de que una muestra ya se haya introducido en ese

carril.

[000182] En algunas realizaciones, el cartucho de múltiples muestras tiene un tamaño sustancialmente igual al de una placa de 96 pocillos según se usa habitualmente en la técnica. Ventajosamente, entonces, el cartucho puede utilizarse con manipuladores de placas utilizados en otra parte de la técnica. Aun más preferentemente, sin embargo, el cartucho de múltiples muestras está diseñado para que una separación entre los centroides de las entradas de muestra sea de 9 mm, que es un estándar reconocido por la industria. Esto significa que, en determinadas realizaciones, la distancia de centro a centro entre los orificios de entrada en el cartucho que aceptan muestras de tubos de PCR, como se describe adicionalmente en esta solicitud, es de 9 mm. Los orificios de entrada se fabrican de forma frustocónica con un ángulo cónico apropiado para que las puntas de pipeta estándar de la industria (2 ml, 20 ml, 200 ml, volúmenes, etc.) se ajusten perfectamente, entrando desde el punto más ancho de la entrada. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, una entrada comprende una estructura frustocónica invertida de al menos 1 mm de altura, y que tiene un diámetro en su punto más ancho que acepta la entrada de una punta de pipeta, de 1 a 5 mm. El aparato en esta solicitud puede adaptarse para ajustarse a otros estándares de la industria que surjan posteriormente para puntas de pipeta que no se describan en esta solicitud. Por lo general, el volumen de muestra aceptado a través de una entrada en una red microfluídica en un carril de muestra es de 1 a 20 ml, y puede ser de 3 a 5 ml. El orificio de entrada puede diseñarse para que se ajuste perfectamente a una punta de pipeta y para crear un buen sello alrededor de la punta de la pipeta, dentro del cono del orificio de entrada. Sin embargo, el cono está diseñado de modo que el sellado sea reversible porque no es deseable si el sellado está tan apretado que el cartucho pueda retirarse de su bandeja, o ubicación en el compartimento de recepción, cuando las puntas de pipeta se elevan después de las operaciones de dispensación.

[000183] La figura 37 muestra una vista en planta de un cartucho microfluídico ejemplar que tiene 12 carriles. Los puertos de entrada tienen una separación de 6 mm, de modo que, cuando se usan junto con un cargador de muestras automatizado que tiene 4 cabezales, separados equidistantemente a 9 mm entre sí, las entradas se pueden cargar en tres lotes de 4 entradas: por ejemplo, entradas 1, 4, 7 y 10 juntas, seguidas por 2, 5, 8 y 11, a continuación finalmente 3, 6, 9 y 12, donde las 12 entradas se numeran consecutivamente de un lado del cartucho al otro.

[000184] La figura 39A muestra una vista en planta de un circuito microfluídico representativo que se encuentra en un carril de un cartucho de múltiples carriles tal como se muestra en las figuras 38A y 38B. La figura 39B muestra otra vista en planta (panel izquierdo) de otro circuito microfluídico representativo que se encuentra en un carril de un cartucho de múltiples carriles tal como se muestra en la figura 36, y muestra cómo el circuito es visible a través de la construcción del cartucho (panel derecho). Otras configuraciones de la red microfluídica serían coherentes con la función de los cartuchos y aparatos descritos en esta solicitud. En secuencia, la muestra se introduce a través de la entrada de líquido 202, y opcionalmente fluye hacia un canal de conducto de ventilación de eliminación de burbujas 208 (que permite que se escapen las burbujas de aire adventicias introducidas en la muestra durante la entrada), y continúa a lo largo de un canal 216. Típicamente, cuando se utiliza un dispensador robótico de muestra líquida, el volumen se dispensa con la precisión suficiente para que la formación de burbujas no sea un problema significativo, y la presencia del canal de ventilación 208 no sea necesaria.

[000185] A lo largo del funcionamiento del cartucho 200, el fluido se manipula como una microgota (que no se muestra en las figuras 39A,B). Las válvulas 204 y 206 se muestran en la figura 39A como válvulas dobles, que tienen una fuente de material térmicamente sensible (también denominado sustancia que responde a la temperatura) a cada lado del canal donde están situadas. Sin embargo, las válvulas 204 y 206 pueden ser una o ambas válvulas individuales que tienen una fuente de material térmicamente sensible en solo un lado de los canales respectivos. Las válvulas 204 y 206 están abiertas inicialmente, de modo que se puede bombear una microgota de fluido que contiene la muestra en el reactor de PCR 210 desde el orificio de entrada 202. Al iniciar el procesamiento, el detector presente en la parte superior del reactor de PCR comprueba la presencia de líquido en el reactor de PCR, y a continuación cierra las válvulas 204 y 206 para aislar la mezcla de reacción de PCR de los canales a cada lado.

[000186] El reactor de PCR 210 es un canal microfluídico que se calienta a través de una serie de ciclos para llevar a cabo la amplificación de nucleótidos en la muestra, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud. Típicamente, el reactor de PCR tiene un volumen de 3 a 5 ml, en particular, 4 ml. Las paredes interiores del canal en el reactor de PCR se hacen muy lisas y se pulen a un acabado brillante (por ejemplo, usando un pulido seleccionado de SPI A1, SPI A2, SPI A3, SPI b1 o SPI B2) durante la fabricación. Esto es con el fin de minimizar cualquier atrapamiento de aire microscópico en la superficie del reactor de PCR, lo que podría causar burbujas durante las etapas de termociclado. La presencia de burbujas, especialmente en la región de detección del reactor de PCR, podría causar una lectura falsa para la reacción de PCR. Además, el reactor de PCR 210 se hace poco profundo de modo que se minimice el gradiente de temperatura a través de la profundidad del canal. La región del cartucho 212 sobre el reactor de PCR 210 permite que un detector monitoree el progreso de la reacción y también detecte la fluorescencia de una sonda que se une a una cantidad de nucleótido amplificado. La región 212 está hecha de material más delgado que el resto del cartucho para permitir que el reactor de PCR responda mejor a un ciclo de calentamiento (por ejemplo, para calentar y enfriar rápidamente entre temperaturas apropiadas para las etapas de desnaturalización y recocido), y para reducir el reflejo, la autofluorescencia y la absorción indebida de fluorescencia. Ambas válvulas 204 y 206 se cierran antes del termociclado para evitar cualquier evaporación de líquido, generación de burbujas o movimiento de

fluido desde el reactor de PCR.

[000187] La ventilación de extremo 214 evita que un usuario introduzca cualquier cantidad excesiva de líquido en el cartucho microfluídico, así como que desempeñe un papel de contener cualquier muestra de derrame sobre las partes no deseadas del cartucho. Un usuario puede ingresar volúmenes de muestra tan pequeños como una cantidad para llenar desde el conducto de ventilación de eliminación de burbujas hasta la mitad del reactor de PCR, o hasta la válvula 204 o más allá de la válvula 204. El uso de microválvulas evita la pérdida de líquido o vapor, lo que permite de ese modo que incluso un reactor parcialmente lleno complete con éxito una reacción de termociclado de PCR. La aplicación de presión (tal como ~1 psi) para contactar el cartucho con el calentador del instrumento ayuda a lograr un mejor contacto térmico entre el calentador y las partes del cartucho que se pueden recibir con calor, y también evita que la estructura laminada inferior se expanda, como sucedería si el canal de PCR se llenara parcialmente con líquido y el aire atrapado se expandiera térmicamente durante el termociclado.

[000188] En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir opcionalmente al menos un conducto de ventilación hidrófobo adicional al conducto de ventilación final.

[000189] Después de que se ha llevado a cabo la PCR en una muestra y se ha determinado la presencia o ausencia de un polinucleótido de interés, es preferible que la muestra amplificada permanezca en el cartucho y que el cartucho se utilice de nuevo (si uno o más carriles permanecen abiertos), o se deseche. Si un usuario desea realizar un análisis posterior a la amplificación, tal como electroforesis en gel, el usuario puede perforar un orificio a través del laminado del cartucho y recuperar una cantidad - típicamente de alrededor de 1,5 microlitros - de producto de PCR. El usuario también puede colocar el carril de PCR individual en una placa calentada estrecha especial, mantenida a una temperatura para derretir la cera en la válvula, y a continuación aspirar la muestra reaccionada desde el orificio de entrada de ese carril de PCR.

[000190] En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir opcionalmente al menos un depósito configurado para contener desechos.

[000191] En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede incluir además una etiqueta, tal como una etiqueta legible por ordenador o escaneable. Por ejemplo, la etiqueta puede ser un código de barras, una etiqueta de radiofrecuencia o uno o más caracteres legibles por ordenador o analizables ópticamente. La etiqueta puede colocarse de manera que se pueda leer mediante un verificador de identificación de muestras como se describe adicionalmente en esta solicitud.

[000192] En diversas realizaciones, durante el transporte y el almacenamiento, el cartucho microfluídico puede estar rodeado además por una bolsa sellada. El cartucho microfluídico puede sellarse en la bolsa con un gas inerte. El cartucho microfluídico puede ser desechable.

[000193] El cartucho microfluídico 200 puede fabricarse según se desee. Típicamente, la capa de cartucho microfluídico incluye una capa de polipropileno u otra etiqueta plástica con adhesivo sensible a la presión (típicamente entre alrededor de 50 y 150 micrones de espesor) configurada para sellar los orificios de carga de cera de las válvulas, atrapar el aire utilizado para el accionamiento de la válvula y servir como una ubicación para las marcas del operador. Esta capa puede estar en dos piezas separadas, aunque un experto en la materia entendería que en muchas realizaciones una sola capa de pieza sería apropiada.

[000194] La capa de sustrato microfluídico es típicamente moldeada por inyección a partir de un plástico, preferentemente un plástico zeonor (polímero olefínico cíclico), que tiene un canal de PCR y canales de válvula en un primer lado, y canales de ventilación y varios orificios de entrada, que incluyen orificios de carga de cera y orificios de entrada de líquido, en un segundo lado (dispuesto hacia la etiqueta). Típicamente, todas las redes microfluídicas juntas, incluidos los reactores de PCR, los orificios de entrada y las válvulas para aislar las cámaras de reacción de PCR, se definen en un único sustrato. El sustrato está hecho de un material que confiere rigidez al sustrato y al cartucho, y es impermeable al aire o al líquido, de modo que la entrada o salida de aire o líquido durante el funcionamiento del cartucho solo es posible a través de la entrada o la ventilación.

[000195] Los canales de una red microfluídica en un carril del cartucho 200 típicamente tienen al menos una dimensión transversal submilimétrica. Por ejemplo, los canales de tal red pueden tener una anchura y/o una profundidad de alrededor de 1 mm o menos (por ejemplo, alrededor de 750 micrones o menos, alrededor de 500 micrones, o menos, alrededor de 250 micrones o menos).

[000196] El cartucho puede incluir además una capa de laminado termosellable 222 (típicamente entre alrededor de 100 y alrededor de 125 micrones de espesor) unida a la superficie inferior del sustrato microfluídico utilizando, por ejemplo, unión por calor, unión por presión o una combinación de estas. La capa de laminado 222 también puede estar hecha de un material que tiene un recubrimiento adhesivo en un solo lado, siendo ese lado el lado que entra en contacto con la parte inferior del sustrato microfluídico. Esta capa puede estar hecha de una sola cinta recubierta que tiene una capa de adhesivo 420, hecha por 3M. Los ejemplos de cintas incluyen variantes de cintas de una sola cara

de cintas de doble cara que tienen los números de producto. 9783, 9795 y 9795B, y comercializadas por 3M. Otras capas aceptables pueden incluir cintas basadas en adhesivos a base de microcápsulas.

[000197] Durante el uso, el cartucho 200 se asocia típicamente de manera térmica con una matriz de fuentes de calor configuradas para operar los componentes (por ejemplo, válvulas, compuertas y región de procesamiento 210) del dispositivo. En algunas realizaciones, las fuentes de calor son operadas por un sistema operativo, que hace funcionar el dispositivo durante el uso. El sistema operativo incluye un procesador (por ejemplo, un ordenador) configurado para accionar las fuentes de calor según un protocolo deseado. Los procesadores configurados para operar dispositivos microfluídicos se describen, *por ejemplo,* en la solicitud estadounidense n .º 09/819.105, presentada el 28 de marzo de 2001.

[000198] La Tabla 1 describe los volúmenes, las presiones de bombeo y los tiempos de funcionamiento asociados con varios componentes de un cartucho microfluídico.

Tabla 1

Funcionamiento	Presión de bombeo	Volumen de desplazamiento	Tiempo de funcionamiento
Mezcla de desplazamientos	~ 2 psi	10 a 25 ml	1 a 2 minutos
Tapones de cera de válvula móvil	~ 1-2 psi	< 1 ml	5 a 15 segundos
Funcionamiento	Bomba usada	Diseño de la bomba	Accionamiento de la bomba
Mezcla de desplazamientos	Bomba Expancel	Igual que arriba	Igual que arriba
Tapones de cera de válvula móvil	Bomba termoneumática	1 ml de aire atrapado	Aire atrapado por calor a -70-90 C

[000199] En algunas realizaciones, un cartucho microfluídico comprende además un miembro de registro que asegura que el cartucho sea recibido por un aparato de diagnóstico complementario en una sola orientación, por ejemplo, en un compartimento de recepción del aparato. El miembro de registro puede ser un corte simple de un borde o una esquina del cartucho (como se muestra en la figura 38A), o puede ser una serie de muescas, o alguna otra configuración de formas que requieren una orientación única de colocación en el aparato.

[000200] En algunas realizaciones, el cartucho microfluídico comprende dos o más elementos de posicionamiento, o elementos de referencia, para su uso cuando se llenan las válvulas con material térmicamente sensible. Los elementos de posicionamiento pueden estar ubicados en el sustrato, típicamente la cara superior del mismo.

[000201] Los cartuchos microfluídicos también pueden apilarse, tal como para un fácil almacenamiento o transporte, o pueden configurarse para ser recibidos por un dispositivo de carga, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud, que sostiene una pluralidad de cartuchos en estrecha proximidad entre sí, pero sin estar en contacto. Con el fin de lograr una o ambas de estas características, el sustrato puede comprender dos crestas, una de cada una situada a lo largo de cada uno de los dos bordes opuestos del cartucho, las crestas dispuestas en el lado superior del sustrato. Por lo tanto, cuando un cartucho tiene un aspecto rectangular (ignorando cualquier miembro de registro o llave mecánica), las dos crestas pueden estar situadas a lo largo del lado largo, o a lo largo del lado corto, del cartucho.

Válvulas

[000202] Una válvula es un componente microfluídico que tiene un estado normalmente abierto que permite que el material pase a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la válvula (por ejemplo, aguas arriba de la válvula) a una posición en el otro lado de la válvula (por ejemplo, aguas abajo de la válvula). Se muestra una válvula doble ejemplar en la figura 40A. Una válvula doble tiene dos canales, uno a cada lado del canal cuyo flujo regula, mientras que una sola válvula tiene solo un canal, dispuesto en un lado del canal cuyo flujo regula.

[000203] Tras el accionamiento, por *ejemplo,* mediante la aplicación de calor, la válvula pasa a un estado cerrado que evita que el material, tal como una microgota de muestra preparada para PCR, pase a lo largo del canal de un lado de la válvula al otro. Por ejemplo, una válvula incluye una o más masas de una sustancia térmicamente sensible (TRS) que es relativamente inmóvil a una primera temperatura y más móvil a una segunda temperatura. Una masa de TRS puede ser una masa esencialmente sólida o una aglomeración de partículas más pequeñas que cooperan para obstruir el paso tras el accionamiento. Los ejemplos de TRS incluyen una aleación eutéctica (por ejemplo, una soldadura), cera (por ejemplo, una olefina), polímeros, plásticos y combinaciones de estos. La primera y la segunda temperatura son insuficientemente altas como para dañar materiales, tales como capas de polímero de un cartucho microfluídico en el que se encuentra la válvula. Generalmente, la segunda temperatura es menor que alrededor de 90 °C y la primera temperatura es menor que la segunda temperatura (por ejemplo, alrededor de 70 °C o menos).

[000204] Para cada masa asociada con una válvula, una cámara está en comunicación gaseosa con la masa. Al calentar gas (por ejemplo, aire) en la o las cámaras y calentar una o más masas de TRS a la segunda temperatura, la presión de gas dentro de una cámara mueve la masa correspondiente hacia el canal que obstruye el paso de material a lo largo de la misma. Otras válvulas de la red tienen la misma estructura y funcionan de la misma manera que las válvulas descritas en esta solicitud.

[000205] Para que el sellado de la válvula sea muy robusto y fiable, el canal de flujo en la unión de la válvula se hace estrecho (150 m de ancho y 150 m de profundidad o más estrecho) y el canal constreñido se hace de al menos 0,5 o 1 mm de largo de modo que la cera selle un canal largo y estrecho reduciendo así cualquier fuga a través de las paredes del canal. En el caso de un mal sellado, hay una fuga de líquido alrededor de las paredes del canal, más allá de la cera. Por lo tanto, el canal de flujo se estrecha tanto como sea posible y se hace más largo*, por ejemplo,* hasta ~1 mm. La válvula funciona calentando aire en el puerto de carga de cera, lo que fuerza la cera hacia adelante de manera que no vuelva a su posición original. De esta manera, tanto el aire como la cera se calientan durante el funcionamiento de la válvula.

[000206] En diversas realizaciones, la red microfluídica puede incluir una válvula curvada como se muestra en la figura 32B (como una sola válvula) para reducir la huella de la válvula en el cartucho y, por lo tanto, reducir el costo por pieza para la fabricación de sustratos microfluídicos altamente densos. En la válvula de la figura 40B, el orificio de carga para TRS está en el centro de la válvula; las estructuras en cualquiera de los extremos son una entrada y una salida y se muestran solo con fines ilustrativos. Se muestra una sola válvula.

[000207] En diversas realizaciones, la red puede incluir una válvula curva como se muestra en la figura 40C, también como una sola válvula, con el fin de reducir la sección transversal eficaz de la microválvula, lo que permite la fabricación de dispositivos microfluídicos densos más económicos.

Conductos de ventilación

[000208] Un conducto de ventilación hidrófobo (por ejemplo, un conducto de ventilación en la figura 41) es una estructura que permite que el gas salga de un canal mientras limita (por ejemplo, evita) que el líquido salga del canal. Típicamente, los conductos de ventilación hidrófobos incluyen una capa de material hidrófobo poroso (por ejemplo, un filtro poroso tal como una membrana hidrófoba porosa de Osmonics) que define una pared del canal. Tal como se describe en esta solicitud, se pueden usar conductos de ventilación hidrófobos para colocar una microgota de muestra en una ubicación deseada dentro de una red microfluídica.

[000209] Los conductos de ventilación hidrófobos del cartucho se construyen preferentemente para que la cantidad de aire que escapa a través de ellos se maximice mientras se minimiza el volumen del canal debajo de la superficie del conducto de ventilación. Por consiguiente, es preferible que el conducto de ventilación esté construido de manera de tener una membrana hidrófoba de gran área de superficie y una sección transversal poco profunda del microcanal debajo de la superficie de ventilación.

[000210] Los conductos de ventilación hidrófobos de eliminación de burbujas típicamente tienen una longitud de al menos alrededor de 2,5 mm (por ejemplo, al menos alrededor de 5 mm, al menos alrededor de 7,5 mm) a lo largo de un canal. La longitud del conducto de ventilación hidrófobo es típicamente al menos alrededor de 5 veces (por ejemplo, al menos alrededor de 10 veces, al menos alrededor de 20 veces) mayor que una profundidad del canal dentro del conducto de ventilación hidrófobo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la profundidad del canal dentro del conducto de ventilación hidrófobo es de alrededor de 300 micrones o menos (por ejemplo, alrededor de 250 micrones o menos, alrededor de 200 micrones o menos, alrededor de 150 micrones o menos). Los conductos de ventilación de burbujas son opcionales en las redes microfluídicas de los cartuchos microfluídicos descritos en esta solicitud.

[000211] La profundidad del canal dentro del conducto de ventilación hidrófobo es típicamente de alrededor de 75% o menos (por ejemplo, alrededor de 65% o menos, alrededor de 60% o menos) que la profundidad del canal aguas arriba y aguas abajo del conducto de ventilación hidrófobo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la profundidad del canal dentro del conducto de ventilación hidrófobo es de alrededor de 150 micrones y la profundidad del canal aguas arriba y aguas abajo del conducto de ventilación hidrófobo es de alrededor de 250 micrones.

[000212] Un ancho del canal dentro del conducto de ventilación hidrófobo es típicamente al menos alrededor de 25% más ancho (por ejemplo, al menos alrededor de 50% más ancho) que una anchura del canal aguas arriba del conducto de ventilación y aguas abajo del conducto de ventilación. Por ejemplo, en una realización ejemplar, el ancho del canal dentro del conducto de ventilación hidrófobo es de alrededor de 400 micrones y el ancho del canal aguas arriba y aguas abajo del conducto de ventilación es de alrededor de 250 micrones.

Modalidad altamente multiplexada

[000213] Se pueden construir ejemplos del aparato y cartucho descritos en esta solicitud que tienen circuitos microfluídicos de alta densidad en un solo cartucho que, de este modo, permiten el procesamiento de múltiples muestras en paralelo, o en secuencia, en un solo cartucho. Las cantidades preferidas de tales muestras múltiples incluyen 36, 40, 48, 50, 64, 72, 80, 96 y 100, pero se entenderá que aún otras cantidades son coherentes con el aparato y cartucho en esta solicitud, cuando se considere conveniente y práctico.

[000214] Por consiguiente, se contemplan diferentes configuraciones de carriles, entradas de muestra y redes de calentadores asociadas que pueden facilitar el procesamiento de tal cantidad de muestras en un solo cartucho dentro del alcance de la presente descripción. De manera similar, las configuraciones alternativas de detectores para su uso junto con tal cartucho altamente multiplexado también están dentro del alcance de la descripción en esta solicitud.

[000215] En un ejemplo, un cartucho altamente multiplexado tiene 48 canales de PCR y tiene control independiente de cada válvula en el canal, con 2 bancos de protocolo de termociclado por canal, como se muestra en la figura 43. En la realización en la figura 43, los calentadores están dispuestos en tres disposiciones. Los calentadores en dos regiones de vidrio separadas solo aplican calor a las válvulas en las redes microfluídicas en cada carril. Debido a la baja conductividad térmica del vidrio, las válvulas individuales pueden calentarse por separado entre sí. Esto permite que las muestras se carguen en el cartucho en diferentes momentos y se pasen a las cámaras de reacción de PCR independientemente entre sí. Los calentadores de PCR están montados en un sustrato de silicio - y no se calientan fácilmente individualmente, pero por lo tanto permiten el procesamiento por lotes de muestras de PCR, donde múltiples muestras de diferentes carriles son amplificadas por el mismo conjunto de ciclos de calentamiento/enfriamiento. Es preferible que los calentadores de PCR se dispongan en 2 bancos (los conjuntos de calentadores a la izquierda y a la derecha no están en comunicación eléctrica entre sí), lo que permite un grado separado de control de la muestra.

[000216] La figura 42 muestra un cartucho representativo, que revela una configuración de entrada para un cartucho de 48 muestras. La configuración de entrada es compatible con una máquina de pipeteo automático que tiene cabezales dispensadores situados a una distancia de 9 mm. Por ejemplo, tal máquina que tiene 4 cabezales puede cargar 4 entradas a la vez, en 12 etapas distintas, para el cartucho de la figura 42.

[000217] La figura 44 muestra, de cerca, un espaciado ejemplar de válvulas y carriles en carriles adyacentes de un cartucho microfluídico de múltiples muestras.

[000218] Las figuras 45 y 46 muestran primeros planos de, respectivamente, conjuntos de calentadores y entradas del cartucho ejemplar que se muestra en la figura 44.

[000219] Las figuras 47A - 47C muestran varias vistas de una realización de un cartucho altamente multiplexado configurado radialmente, que tiene una cantidad de entradas, carriles microfluídicos y zonas de reacción de PCR.

[000220] Los diversos ejemplos mostrados en las figuras 42 - 47C son compatibles con dispensadores de líquidos, compartimentos de recepción y detectores que se configuran de manera diferente a los ejemplos específicos descritos en esta solicitud.

[000221] En otro ejemplo (que no se muestra en las figuras), un cartucho y aparato está configurado de modo que el cabezal de lectura no cubra las entradas de muestra, permitiendo así la carga de muestras separadas mientras otras muestras se someten a termociclado de PCR.

Configuraciones del calentador para garantizar el calentamiento uniforme de una región

[000222] Otra característica del aparato descrito en esta solicitud se refiere a un procedimiento y aparato para controlar de manera uniforme el calentamiento de una región de una red microfluídica que incluye, de modo no taxativo, uno o más componentes microfluídicos. En un ejemplo, se pueden configurar múltiples calentadores para calentar de forma simultánea y uniforme una región, tal como la zona de reacción de PCR, del cartucho microfluídico.

[000223] En algunos ejemplos, un cartucho microfluídico que tiene una red microfluídica que comprende uno o más componentes microfluídicos se pone en contacto con una fuente de calor, dentro de un aparato configurado adecuadamente. La fuente de calor está configurada de modo que los elementos de calentamiento particulares estén situados para calentar componentes específicos de la red microfluídica del cartucho.

[000224] La figura 48 muestra una vista en sección transversal de un cartucho microfluídico ejemplar para mostrar la ubicación relativa del canal de PCR en relación con los calentadores cuando el cartucho se coloca en el instrumento. La vista en la figura 48 también se conoce como una vista isométrica en sección del cartucho que se extiende sobre la oblea del calentador. Una ventana 903 sobre el canal de PCR en el cartucho se muestra en vista en perspectiva. El canal de PCR 901 (por ejemplo, 150 m de profundidad x 700 m de ancho), se muestra en una capa superior del cartucho. Una capa de laminado 905 del cartucho (por ejemplo, 125 m de espesor) se encuentra directamente debajo del canal de PCR 901. Una capa adicional de laminado de interfaz térmica 907 en el cartucho (por ejemplo, 125 m de

espesor) se encuentra directamente debajo de la capa de laminado 905. Los calentadores están situados en una capa adicional 913 directamente debajo del laminado de interfaz térmica. Los calentadores son capas metálicas de oro definidas fotolitográficamente y grabadas (típicamente de alrededor de 3000 A de espesor). Las capas de 400 A de TiW se depositan en la parte superior e inferior de la capa de oro para servir como una capa de adhesión. El sustrato utilizado es vidrio, sílice fundida o oblea de cuarzo con un espesor de 0,4 mm, 0,5 mm o 0,7 mm o 1 mm. Una fina capa eléctricamente aislante de óxido de silicio de 2 mm sirve como capa aislante sobre la capa metálica. También se pueden depositar capas aislantes eléctricas delgadas adicionales, tales como 2-4 mm de parileno, sobre la superficie de óxido de silicio. También se muestran dos calentadores largos 909 y 911, tal como se describe adicionalmente en esta solicitud.

[000225] Con referencia a las figuras 49A y 49B, la zona de reacción de PCR 1001, que típicamente tiene un volumen ~ 1,6 ml, se configura con un lado largo y un lado corto, cada uno con un elemento de calentamiento asociado. Por lo tanto, el aparato incluye preferentemente cuatro calentadores dispuestos a lo largo de los lados y configurados para calentar la zona de reacción de PCR, como se muestra en la realización ejemplar de la figura 38A: calentador superior largo 1005, calentador inferior largo 1003, calentador izquierdo corto 1007 y calentador derecho corto 1009. El pequeño espacio entre el calentador superior largo 1005 y el calentador inferior largo 1003 da como resultado un gradiente de temperatura insignificante (menos de 1 °C a través del ancho del canal de PCR en cualquier punto a lo largo de la longitud de la zona de reacción de PCR) y, por lo tanto, una temperatura efectivamente uniforme en toda la zona de reacción de PCR. Los calentadores en los bordes cortos del reactor de PCR proporcionan calor para contrarrestar el gradiente creado por los dos calentadores largos desde el centro del reactor hasta el borde del reactor. Un experto en la materia entendería que aun otras configuraciones de uno o más calentadores situados alrededor de una zona de reacción de PCR son coherentes con los procedimientos y aparatos descritos en esta solicitud. Por ejemplo, un lado 'largo' de la zona de reacción puede configurarse para ser calentado por dos o más calentadores. Las orientaciones y configuraciones específicas de los calentadores se utilizan para crear zonas uniformes de calentamiento incluso en sustratos que tienen mala conductividad térmica porque la mala conductividad térmica del vidrio, o cuarzo, o sustratos de sílice fusionados se utilizan para ayudar en el funcionamiento independiente de varios componentes microfluídicos tales como válvulas y el funcionamiento independiente de los diversos carriles de PCR.

[000226] En realizaciones preferidas, cada calentador tiene un sensor de temperatura asociado. En la realización de la figura 49A, se utiliza un único sensor de temperatura 1011 para ambos calentadores largos. También se muestran un sensor de temperatura 1013 para el calentador izquierdo corto y un sensor de temperatura 1015 para el calentador derecho corto. El sensor de temperatura en el medio del reactor se utiliza para proporcionar retroalimentación y controlar la cantidad de energía suministrada a los dos calentadores largos, mientras que cada uno de los calentadores cortos tiene un sensor de temperatura dedicado colocado adyacente a él con el fin de controlarlo. Tal como se describe adicionalmente en esta solicitud, los sensores de temperatura se configuran preferentemente para transmitir información sobre la temperatura en su proximidad al procesador en momentos en que los calentadores no reciben corriente que los haga calentarse. Esto puede lograrse con un control adecuado de los ciclos actuales.

[000227] Con el fin de reducir la cantidad de elementos de sensor o calentador necesarios para controlar un calentador de PCR, podemos utilizar los calentadores para detectar, así como el calor, y así obviar la necesidad de tener un sensor dedicado separado para cada calentador. En otra realización, cada uno de los cuatro calentadores puede diseñarse para tener una potencia adecuada y conectar los cuatro calentadores en serie o en paralelo para reducir la cantidad de elementos controlables electrónicamente de 4 a solo 1, reduciendo así la carga sobre los componentes electrónicos.

[000228] La figura 49B muestra vistas expandidas de calentadores y sensores de temperatura utilizados junto con una zona de reacción de PCR de la figura 49A. Los sensores de temperatura 1001 y 1013 están diseñados para tener una resistencia a temperatura ambiente de alrededor de 200 a 300 ohmios. Este valor de resistencia se determina mediante el control del espesor de la capa metálica depositada (por ejemplo, un sándwich de 400 A TiW 3000A Au/ 400 A TiW), y el grabado de la línea de metal de bobinado para tener una anchura de alrededor de 10 - 25 mm y 20 - 40 mm de longitud. El uso de metal en esta capa le da un coeficiente de temperatura de resistividad del orden de 0,5 - 20 °C/ohmios, preferentemente en el intervalo de 1,5 - 3 °C/ohmios. La medición de la resistencia a temperaturas más altas permitirá determinar la temperatura exacta de la ubicación de estos sensores.

[000229] La configuración para el calentamiento uniforme, que se muestra en la figura 49A para una única zona de reacción de PCR, puede aplicarse a un cartucho de PCR de múltiples carriles en el que se producen múltiples reacciones de PCR independientes.

[000230] Cada calentador puede controlarse independientemente mediante un procesador y/o circuitos de control utilizados junto con el aparato descrito en esta solicitud. La figura 50 muestra imágenes térmicas, desde la superficie superior de un cartucho microfluídico que tiene calentadores configurados como en las figuras 49A y 49B, cuando cada calentador a su vez se activa, de la siguiente manera: (A): Solo parte superior larga; (B) Solo fondo largo; (C) Solo parte izquierda corta; (D) Solo parte derecha corta; y (E) los cuatro calentadores encendidos. El panel (F) muestra una vista de la zona de reacción y los calentadores en la misma escala que los otros paneles de imagen en la figura 50. También se muestra en la figura una barra de temperatura.

Uso de cortes en el sustrato del cartucho para mejorar la velocidad de enfriamiento durante el ciclo de PCR

[000231] Durante una amplificación por PCR de una muestra de nucleótidos, se llevan a cabo una serie de ciclos térmicos. Para mejorar la eficiencia, el enfriamiento entre cada aplicación de calor es preferentemente lo más rápido posible. La velocidad de enfriamiento mejorada puede lograrse con varias modificaciones al sustrato de calentamiento, como se muestra en las figuras 51A - 51C.

[000232] Una forma de lograr un enfriamiento rápido es cortar partes del sustrato de cartucho microfluídico, como se muestra en la figura 51A. El panel superior de la figura 51A es una sección transversal de un cartucho microfluídico ejemplar tomado a lo largo de la línea punteada A - A' como se marca en el panel inferior de la figura 51A. Se muestran la zona de reacción de PCR 901 y los calentadores representativos 1003. También se muestran dos partes recortadas, una de las cuales está etiquetada 1201, que están situadas junto a los calentadores que están situados a lo largo del lado largo de la zona de reacción de PCR. Las partes recortadas tales como 1201 reducen la masa térmica del cartucho y también permiten que el aire circule dentro de las partes recortadas. Ambos aspectos permiten que el calor se conduzca rápidamente lejos de las inmediaciones de la zona de reacción de PCR. Otras configuraciones de recortes, tales como en forma, posición y número, son coherentes con la presente tecnología.

[000233] Otra forma de lograr un enfriamiento rápido es cortar partes del sustrato del calentador, como se muestra en la figura 51B. El panel inferior de la figura 51B es una sección transversal de un cartucho microfluídico ejemplar y un microcalentador en sustrato tomado a lo largo de la línea punteada A - A' como se marca en el panel superior de la figura 51B. Se muestran la zona de reacción de PCR 901 y los calentadores representativos 1003. También se muestran cuatro partes recortadas, una de las cuales está etiquetada 1205, que están situadas junto a los calentadores que están situados a lo largo del lado largo de la zona de reacción de PCR. Las partes recortadas tales como 1205 reducen la masa térmica del microcalentador en sustrato, y también permiten que el aire circule dentro de las partes recortadas. Ambos aspectos permiten que el calor se conduzca rápidamente lejos de las inmediaciones de la zona de reacción de PCR. En la figura 51B, se muestran cuatro partes recortadas separadas para que los circuitos de control a los diversos calentadores no se vean interrumpidos. Otras configuraciones de recortes, tales como en forma, posición y número, son coherentes con la presente tecnología. Estos recortes pueden crearse mediante un procedimiento seleccionado de: grabado selectivo utilizando procedimientos de grabado húmedo, grabado iónico reactivo profundo, grabado selectivo usando láser de CO_2 o láser de femtosegundo (para evitar grietas superficiales o tensión cerca de la superficie), perforación mecánica selectiva, perforación ultrasónica selectiva o voladura selectiva de partículas abrasivas. Se debe tener cuidado para mantener la integración mecánica del calentador mientras se reduce la mayor cantidad de material posible.

[000234] La figura 51C muestra una combinación de recortes y el uso de enfriamiento con aire ambiente para aumentar la velocidad de enfriamiento durante la etapa de enfriamiento del termociclado. Una cantidad sustancial de enfriamiento ocurre por pérdida convectiva desde la superficie inferior de la superficie del calentador al aire ambiente. La fuerza motriz de esta pérdida convectiva es el diferencial de temperaturas entre la superficie del vidrio y la temperatura del aire. Al disminuir la temperatura del aire ambiente mediante el uso, por ejemplo, de un enfriador Peltier, se puede aumentar la velocidad de enfriamiento. La pérdida de calor por convección también puede aumentarse manteniendo el aire a una velocidad superior a cero.

[000235] Un ejemplo de rendimiento de ciclado térmico obtenido con una configuración como se describe en esta solicitud, se muestra en la figura 52 para un protocolo que se configura para calentarse hasta 92 °C, y permanecer allí durante 1 segundo, a continuación enfriarse hasta 62 °C, y permanecer durante 10 segundos. El tiempo de ciclo es de alrededor de 29 segundos, con 8 segundos requeridos para calentarse a 62 °C y estabilizarse a 92 °C, y 10 segundos requeridos para enfriarse a 92 °C y estabilizarse a 62 °C.

Proceso de fabricación de cartuchos

[000236] La figura 53 muestra un diagrama de flujo 2800 para un procedimiento de ensamblaje para un cartucho ejemplar como se describe adicionalmente en esta solicitud. Un experto en la materia entendería que se pueden realizar varias etapas en un orden diferente al establecido en la figura 53, y además que cualquier etapa dada puede llevarse a cabo mediante procedimientos alternativos a los establecidos en la figura. También se entenderá que, cuando se ilustran etapas separadas para llevar a cabo dos o más funciones, tales funciones se pueden realizar de forma síncrona y combinarse en etapas individuales y ser coherentes con el procedimiento general descrito en esta solicitud.

[000237] En 2802, se aplica una capa de laminado a un sustrato microfluídico que se ha diseñado previamente para tener una red microfluídica construida en él; los bordes se recortan desde el laminado donde se derraman sobre los límites del sustrato.

[000238] En 2804, la cera se dispensa y se carga en las microválvulas de la red microfluídica en el sustrato microfluídico. Un procedimiento ejemplar para llevar a cabo esto se describe adicionalmente en esta solicitud.

[000239] En 2806, el cartucho se inspecciona para garantizar que la cera de la etapa 2804 se cargue correctamente y que el laminado de la etapa 2802 se adhiera adecuadamente al sustrato microfluídico. Si un sustrato no satisface una o ambas de estas pruebas, se desecha. Si los sustratos fallan repetidamente una o ambas de estas pruebas, entonces se revisan las etapas de dispensación de cera o aplicación de laminado, según corresponda.

[000240] En 2808, se aplica una membrana de ventilación hidrófoba a la parte superior del sustrato microfluídico sobre las válvulas de cera y sobre la cara opuesta del sustrato del laminado, y se une con calor a esta. Se recortan los bordes de la membrana que están por encima del límite del sustrato.

[000241] En 2810, el ensamblaje se inspecciona para asegurar que la membrana de ventilación hidrófoba se una bien al sustrato microfluídico sin obstruir térmicamente los canales microfluídicos. Si alguno de los canales está bloqueado, o si el enlace entre la membrana y el sustrato es imperfecto, el ensamblaje se desecha y, en el caso de eventos de desecho repetidos, se revisa la etapa del procedimiento anterior.

[000242] En 2812, se aplica una capa de almohadilla térmicamente conductora al laminado inferior del cartucho.

[000243] En 2814, se aplican dos tiras de etiquetas a la parte superior del sustrato microfluídico, una para cubrir las válvulas y una segunda para proteger las membranas de ventilación. Se entenderá que se puede diseñar una tira de etiqueta única para cumplir con ambos roles.

[000244] En 2816, se imprimen o aplican etiquetas adicionales para mostrar características de identificación, tales como un número de código de barras, un número de lote y la fecha de caducidad en el cartucho. Preferentemente una o más de estas etiquetas tiene un espacio y una superficie grabable que permite al usuario hacer una anotación de identificación en la etiqueta, a mano.

[000245] En 2818, para facilitar el transporte y la entrega a un cliente, los cartuchos ensamblados y etiquetados se apilan y empaquetan en grupos, tales como grupos de 25, o grupos de 10, o grupos de 20, o grupos de 50. Preferentemente, el empaque es a través de un medio inerte y/o sin humedad.

Ejemplo de procedimiento de deposición de cera

[000246] El depósito de cera en válvulas de la red microfluídica, como en la etapa 2804, puede llevarse a cabo con el equipo ejemplar que se muestra en las figuras 54A y 54B. La serie DispenseJet DJ-9000 (figuras 54A y 54B) es un dispensador sin contacto que proporciona suministro de alta velocidad y control volumétrico excepcional para diversos fluidos, incluido adhesivo de montaje en superficie, relleno inferior, encapsulantes, recubrimiento de conformación, adhesivos UV y epoxi de plata. El DJ-9000 chorrea en espacios reducidos tan pequeños como 200 micrómetros y crea franjas de saturación tan pequeñas como 300 micrómetros en el lado dispensado de un sustrato, como un troquel. Dispensan fluido como puntos distintos o una rápida sucesión de puntos para formar una corriente de fluido de 100 micrones (4 mil) de diámetro desde la boquilla. Es totalmente compatible con otros sistemas disponibles comercialmente, tales como el Asymtek Century C-718/C-720, Millennium M-2000, y Axiom X-1000 Series Dispensing Systems.

[000247] Un DJ-9000 es fabricado por Asymtek bajo estándares de control de calidad de fabricación con el objetivo de proporcionar un rendimiento preciso y confiable. Las especificaciones representativas del aparato son las siguientes.

Características	Especificación
Tamaño	Anchura: 35 mm Altura: 110 mm Profundidad: 100 mm
Peso	400 gramos - seco
Ensamblaje del tubo de alimentación	Ajuste de nailon Poliuretano - Tubo
Cámara de fluidos	Acero inoxidable de tipo 303
Asiento y boquilla	Serie 300/400 S/S, carburo
Ensamblaje de la aguja	Acero para rodamientos - eje 52100 Placa de cromo duro Carburo - Punta
Sello de fluido	PEEK/Acero inoxidable
Junta tórica de la cámara de fluido	Propileno de etileno
Cuerpo de chorro	Aluminio 6061-T6 Niquelado
Rodamientos de ensamblaje de agujas	PEEK

(continuación)

Cuerpo de control térmico	Aluminio 6061-T6 Niquelado
Soporte de depósito	Acetilo
Tamaño del depósito	5, 10 o 30 cc (0,17, 0,34 o 1,0 oz)
Empalme del ensamblaje del tubo de alimentación	Luer femenino según ANSI/HIMA MD70.1-1983
Frecuencia máxima del ciclo	200 Hz
Presión mínima de aire de la válvula	5,5 bares (80 psi)
Nivel de ruido de funcionamiento	70 dB
Solenoide	24 VCC, 12,7 vatios
Calentador de control térmico	24 VCC, 14,7 vatios, 40 ohmios
RTD de control térmico	100 ohmios, platino
Punto de ajuste máximo del calentador	80C
*A la frecuencia de ciclo máxima	

[000248] Una vista en despiece de este aparato se muestra en la figura 54B.

Teoría de funcionamiento del DJ-9000

[000249] El DJ-9000 tiene un mecanismo de retorno de resorte normalmente cerrado, accionado por aire, que utiliza principios de transferencia de impulso para expulsar volúmenes precisos de material. El aire presurizado está regulado por un solenoide de alta velocidad para retraer un conjunto de aguja del asiento. El fluido, introducido en la cámara de fluido, fluye sobre el asiento. Cuando el aire se agota, la aguja viaja rápidamente a la posición cerrada, desplazando el fluido a través del asiento y la boquilla en forma de una gota. Múltiples gotas disparadas en sucesión se pueden usar para formar volúmenes y líneas de dispensación más grandes cuando se combinan con el movimiento de un robot dispensador.

[000250] El equipo tiene varias características ajustables: Las siguientes características afectan el rendimiento del DJ-9000 y generalmente se ajustan para adaptarse a condiciones de procedimiento específicas.

[000251] La presión del fluido debe ajustarse de modo que el fluido se llene hasta el asiento, pero no debe influir en el empuje del fluido a través del asiento y la boquilla. En general, una mayor presión de fluido da como resultado un mayor volumen de material inyectado.

[000252] El ajuste de carrera controla la distancia de recorrido del conjunto de la aguja. El control se gira en sentido antihorario para aumentar el recorrido del conjunto de aguja, o se gira en sentido horario para disminuir el recorrido. Un aumento de la distancia de viaje a menudo dará como resultado un mayor volumen de material inyectado.

[000253] La válvula solenoide controla el funcionamiento de la válvula. Cuando se energiza, permite que el aire en la cámara de aire de chorro comprima un resorte y, por lo tanto, eleve el conjunto de la aguja. Cuando se desenergiza, el aire se libera y el resorte fuerza el pistón hacia abajo de modo que la punta de la aguja entre en contacto con el asiento.

[000254] La geometría del asiento y la boquilla son típicamente los principales factores que controlan el volumen de material dispensado. El asiento y el tamaño de la boquilla se determinan en función de la aplicación y las propiedades del fluido. Otros parámetros se ajustan según las opciones de asiento y boquilla. Los tamaños de asiento y boquilla disponibles se enumeran en la tabla a continuación.

[000255] Ensamblaje de control térmico: La temperatura del fluido a menudo influye en la viscosidad del fluido y las características del flujo. El DJ- 9000 está equipado con un conjunto de control térmico que garantiza una temperatura de fluido constante.

[000256] Parámetros de línea y punto: Además de la configuración y los ajustes del hardware DJ-9000, los parámetros de línea y punto se establecen en un programa de software (denominado FmNT) para controlar el tamaño y la calidad de los puntos y las líneas dispensadas.

Carga de cera en válvulas

[000257] Las figuras 55A y 55B muestran cómo se usa una combinación de dispensación de gota caliente controlada en un dispositivo de microcanal calentado de las dimensiones y geometría adecuadas para cargar cera con

precisión en un microcanal de un cartucho microfluídico para formar una válvula. El cabezal dispensador calentado puede colocarse con precisión sobre un orificio de entrada del microcanal en el dispositivo microfluídico, y puede dispensar gotas de cera fundida en volúmenes tan pequeños como 75 nanolitros con una precisión del 20 %. El orificio de entrada del dispositivo de microcanal está dimensionado de tal manera que la gota de 75 nl puede dispararse con precisión al fondo del orificio de entrada usando, por ejemplo, aire comprimido, o de una manera similar a un procedimiento de impresión por chorro de tinta. El dispositivo de microcanal se mantiene a una temperatura por encima del punto de fusión de la cera, lo que permite que la cera permanezca en un estado fundido inmediatamente después de su dispensación. Después de que la gota cae al fondo del orificio de entrada, la cera fundida es arrastrada al canal estrecho por acción capilar. El volumen de la sección estrecha está diseñado para ser aproximadamente igual a una cantidad típica máxima que se dispensa en el orificio de entrada.

Multiplexación del calentador (bajo control de software)

[000258] Otro aspecto del aparato descrito en esta solicitud se refiere a un procedimiento para controlar el calor dentro del sistema y sus componentes, tal como se ilustra en la figura 56. El procedimiento conduce a una mayor eficiencia energética del aparato descrito en esta solicitud, porque no todos los calentadores se calientan al mismo tiempo, y un calentador dado recibe corriente solo durante una parte del tiempo.

[000259] Generalmente, el calentamiento de los componentes microfluídicos, tal como una zona de reacción de PCR, se controla mediante el paso de corrientes a través de calentadores microfabricados configurados adecuadamente. El calentamiento se puede controlar adicionalmente encendiendo y apagando periódicamente la corriente con modulación de ancho de pulso variable (PWM), donde la modulación de ancho de pulso se refiere a la relación de tiempo de encendido/apagado para la corriente. La corriente se puede suministrar conectando un calentador microfabricado a una fuente de alto voltaje (por ejemplo, 30 V), que se puede bloquear mediante la señal PWM. En algunas realizaciones, el dispositivo incluye 48 generadores de señales PWM. El funcionamiento de un generador PWM incluye la generación de una señal con un período programable elegido (el recuento final) y granularidad. Por ejemplo, la señal puede ser de 4000 ms (microsegundos) con una granularidad de 1 us, en cuyo caso el generador PWM puede mantener un contador comenzando en cero y avanzando en incrementos de 1 ms hasta llegar a 4000 ms, cuando vuelve a cero. Por lo tanto, la cantidad de calor producido se puede ajustar ajustando el recuento final. Un recuento final alto corresponde a una mayor longitud de tiempo durante el cual el calentador microfabricado recibe corriente y, por lo tanto, una mayor cantidad de calor producido.

[000260] En diversas realizaciones, el funcionamiento de un generador PWM también puede incluir un recuento de inicio programable además del recuento final y la granularidad mencionados anteriormente. En tales realizaciones, múltiples generadores de PWM pueden producir señales que pueden no superponerse selectivamente (por ejemplo, al multiplexar el tiempo de encendido de los diversos calentadores) de modo que no se exceda la capacidad de corriente de la energía de alto voltaje. Múltiples calentadores pueden ser controlados por diferentes generadores de señales PWM con diferentes recuentos de inicio y fin. Los calentadores pueden dividirse en bancos, por lo que un banco define un grupo de calentadores del mismo recuento inicial. Por ejemplo, 36 generadores PWM se pueden agrupar en seis bancos diferentes, cada uno correspondiente a una cierta parte del ciclo PWM (500 ms para este ejemplo). El recuento final para cada generador PWM se puede programar selectivamente de modo que no se enciendan más de seis calentadores en cualquier momento dado. Una parte de un ciclo PWM puede seleccionarse como tiempo muerto (conteo de 3000 a 4000 para este ejemplo) durante el cual no se produce calentamiento y los circuitos de detección sensibles a la temperatura pueden usar este tiempo para detectar la temperatura. La siguiente tabla representa un ciclo PWM para el ejemplo anterior:

	Recuento inicial	**Recuento final**	**Recuento final máximo**
		Banco 1	
Generador PWM número 1	0	150	500
Generador PWM número 2	0	220	500
…	…	…	
Generador PWM número 6	0	376	500
		Banco 2	
Generador PWM número 7	500	704	1000
Generador PWM número 8	500	676	1000
…	…	…	…
Generador PWM número 12	500	780	1000
		Banco 3	
Generador PWM número 13	1000	1240	1500
Generador PWM número 14	1000	1101	1500
…	…	…	…
Generador PWM número 18	1000	1409	1500
		Banco 4	
Generador PWM número 19	1500	1679	2000

(continuación)

	Recuento inicial	Recuento final	Recuento final máximo
Generador PWM número 20	1500	1989	2000
…	…	…	
Generador PWM número 24	1500	1502	2000
	Banco 5		
Generador PWM número 25	2000	2090	2500
Generador PWM número 26	2000	2499	2500
…	…	…	
Generador PWM número 30	2000	2301	2500
	Banco 6		
Generador PWM número 31	2500	2569	3000
Generador PWM número 32	2500	2790	3000
…	…	…	
Generador PWM número 36	2500	2678	3000

Uso del sistema de detección para medir/detectar fluidos en la cámara de PCR

[000261] El aparato tiene opcionalmente un detector de fluorescencia muy sensible que es capaz de recolectar luz de fluorescencia de la cámara de PCR 210 de un cartucho microfluídico. Este detector se utiliza para detectar la presencia de líquido en la cámara, medida que determina si se va a realizar o no un ciclo de PCR. Se realiza una lectura de fondo antes de llenar la cámara con líquido. Se toma otra lectura después de que se hayan realizado operaciones microfluídicas que deberían dar como resultado el llenado de la cámara de PCR con líquido. La presencia de líquido altera la lectura de fluorescencia de la cámara. Se usa un valor umbral programable para sintonizar un algoritmo programado en el procesador (por ejemplo, la segunda lectura tiene que exceder la primera lectura en un 20%). Si las dos lecturas no difieren más allá del margen programado, se considera que el líquido no ha entrado en la cámara y no se inicia un ciclo de PCR para esa cámara. En su lugar, se emite una advertencia a un usuario.

Producto del programa informático

[000262] En varios ejemplos, un producto de programa informático para su uso con el aparato en esta solicitud incluye instrucciones legibles por ordenador para el funcionamiento del aparato.

[000263] En varios ejemplos, el producto de programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema: produzca un indicador de la colocación del cartucho microfluídico en el compartimento; lea una etiqueta de muestra o una etiqueta de cartucho microfluídico; emita instrucciones para que un usuario introduzca un identificador de muestra; emita instrucciones para que un usuario cargue un miembro de transferencia de muestra con la muestra lista para PCR; emita instrucciones para que un usuario introduzca la muestra lista para PCR en el cartucho microfluídico; emita instrucciones para que un usuario coloque el cartucho microfluídico en el compartimento de recepción; emita instrucciones para que un usuario cierre la tapa para operar el miembro de fuerza; emita instrucciones para que un usuario presurice la muestra lista para PCR en el cartucho microfluídico inyectando la muestra lista para PCR con un volumen de aire de entre alrededor de 0,5 mL y alrededor de 5 mL; y emita información de estado para el progreso de la muestra de uno o más carriles del cartucho.

[000264] En varios ejemplos, el producto de programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema: caliente la muestra lista para PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir del polinucleótido neutralizado; poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o un amplicón de PCR de este con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos; poner en contacto independientemente cada una de la muestra de polinucleótidos neutralizados y un polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear independientemente amplicones de PCR de la muestra de polinucleótidos neutralizados y amplicones de PCR del polinucleótido de control negativo; poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o un amplicón de PCR de este y el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR de este con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos; producir una determinación de la presencia de una secuencia de polinucleótidos en la muestra biológica, la secuencia de polinucleótidos correspondiente a la sonda, si la sonda se detecta en la muestra de polinucleótidos neutralizada o un amplicón de PCR de esta; y/o emitir una determinación de un resultado contaminado si la sonda se detecta en el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR del mismo.

[000265] En varios ejemplos, el producto de programa informático puede incluir una o más instrucciones para hacer que el sistema realice automáticamente una o más de las etapas del procedimiento.

[000266] En varios ejemplos, el cartucho microfluídico comprende dos o más carriles de muestra, cada uno de los cuales incluye una válvula de entrada de muestra, un conducto de ventilación de eliminación de burbujas, una

bomba accionada térmicamente, una válvula accionada térmicamente y una zona de reacción de PCR, donde las instrucciones legibles por ordenador están configuradas para operar independientemente uno o más componentes de cada uno de dichos carriles en el sistema, independientemente entre sí, y para provocar que un detector mida la fluorescencia de las zonas de reacción de PCR.

Muestra

[000267] En varios ejemplos, la muestra puede incluir una mezcla de reactivos de PCR que comprende una enzima polimerasa y una pluralidad de nucleótidos. La mezcla de reactivos de PCR puede estar en forma de uno o más sedimentos liofilizados y las etapas mediante las cuales se prepara la muestra lista para PCR pueden implicar poner en contacto el sedimento de PCR con líquido para crear una solución de mezcla de reactivos de PCR. En aun otro ejemplo, cada uno de los carriles de PCR puede tener reactivos ASR liofilizados o secos precargados de modo que el usuario solo necesite ingresar una muestra de polinucleótido preparada en la PCR. En otra realización, los carriles de PCR pueden tener solo las sondas y cebadores específicos de la aplicación premedidos y precargados, y el usuario introduce una muestra mezclada con los reactivos de PCR.

[000268] En diversas realizaciones, la red microfluídica puede configurarse para acoplar el calor de una fuente de calor externa a una mezcla de muestra que comprende reactivo de PCR y muestra de polinucleótido neutralizado en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir de la muestra de polinucleótido neutralizado.

[000269] En varios ejemplos, la muestra lista para PCR puede incluir además un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorogénica selectiva para al menos una parte del plásmido. En varios ejemplos, la muestra lista para PCR incluye además un tampón de muestra y al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos*, por ejemplo,* la secuencia de polinucleótidos que es característica de un patógeno que se selecciona del grupo que consiste en bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, levaduras, hongos, protozoos y virus.

[000270] En diversas realizaciones, el cartucho microfluídico puede alojar un polinucleótido de control negativo, donde la red microfluídica puede configurarse para llevar a cabo independientemente PCR en cada una de una muestra de polinucleótido neutralizado y un polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear independientemente amplicones de PCR de la muestra de polinucleótido neutralizado y amplicones de PCR del polinucleótido de control negativo. Cada carril de un cartucho de múltiples carriles como se describe en esta solicitud puede realizar dos reacciones debido a la presencia de dos sistemas de detección de fluorescencia por carril. Se puede realizar una variedad de combinaciones de reacciones en el cartucho, tales como dos reacciones de muestra en un carril, un control positivo y un control negativo en otros dos carriles; o una reacción de muestra y un control interno en un carril y un control negativo en un carril separado.

[000271] En varios ejemplos, la muestra puede incluir al menos una sonda que puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos, donde las etapas mediante las cuales se prepara la muestra lista para PCR implican poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizada o un amplicón de PCR de esta con la sonda. La sonda puede ser una sonda de hibridación fluorogénica. La sonda de hibridación fluorogénica puede incluir una secuencia de polinucleótidos acoplada a un colorante indicador fluorescente y un colorante amortiguador de fluorescencia. La mezcla de reactivos de PCR puede incluir además un plásmido de control positivo y una sonda de hibridación fluorogénica de plásmido selectiva para al menos una parte del plásmido y el cartucho microfluídico puede configurarse para permitir la detección óptica independiente de la sonda de hibridación fluorogénica y la sonda de hibridación fluorogénica de plásmido.

[000272] En varios ejemplos, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que es característica de un organismo, por ejemplo, cualquier organismo que emplea polinucleótidos de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. Por consiguiente, la sonda puede ser selectiva para cualquier organismo. Los organismos adecuados incluyen mamíferos (que incluyen humanos), aves, reptiles, anfibios, peces, animales domesticados, animales salvajes, organismos extintos, bacterias, hongos, virus, plantas y similares. La sonda también puede ser selectiva para componentes de organismos que emplean sus propios polinucleótidos, por ejemplo, mitocondrias. En algunas realizaciones, la sonda es selectiva para microorganismos, por ejemplo, organismos utilizados en la producción de alimentos (por ejemplo, levaduras empleadas en productos fermentados, mohos o bacterias empleadas en quesos y similares) o patógenos (por ejemplo, de seres humanos, mamíferos domesticados o salvajes, aves domesticadas o salvajes y similares). En algunos ejemplos, la sonda es selectiva para organismos seleccionados del grupo que consiste en bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, levaduras, hongos, protozoos y virus.

[000273] En varios ejemplos, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que es característica de un organismo seleccionado del grupo que consiste en Staphylococcus spp., por ejemplo, S. epidermidis, S. aureus, Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA), Staphylococcus resistente a la vancomicina; Estreptococo (por ejemplo, h, h o h-hemolítico, Grupo A, B, C, D o G) tal como S. pyogenes, S. agalactiae; E. faecalis, E. durans y E. faecium (anteriormente S. faecalis, S. durans, S. faecium); estreptococos no enterocócicos

del grupo D, por ejemplo, S. bovis y S. equinos; Estreptococos viridans, por ejemplo, S. mutans, S. sanguis, S. salivarius, S. mitior, A. milleri, S. constellatus, S. intermedius y S. anginosus; S. iniae; S. pneumoniae; *Neisseria,* por ejemplo, N. *meningitides, N. gonorrhoeae, Neisseria* sp saprofita; Erysipelothrix, por ejemplo, E. rhusi-opathiae; Listeria spp., por ejemplo, L. monocytogenes, raramente L. ivanovii y L. seeligeri; Bacilos, por ejemplo, B. anthracis, B. cereus, B. subtilis, B. subtilus niger, B. thuringiensis; Asteroides de Nocardia; Legionela, por ejemplo, L. pneumonophilia, Pneumocystis, por ejemplo, P. carinii; Enterobacterias tales como Salmonella, Shigella, Escherichia (por ejemplo, E. coli, E. coliO157:H7); Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus, Morganella, Providencia, Yersinia y similares, por ejemplo, Salmonella, por ejemplo, S. typhi S. paratyphi A, B (S. Schottmuelleri) y C (S. hirschfeldii), S. dublin S. choleraesuis, S. enteritidis, S. typhimurium, S. heidelberg, S. newport, S. infantis, S. agona, S. montevideo y S. saint-paul; Shigella, por ejemplo, subgrupos: A, B, C y D, tales como S. flexneri, S. sonnei, S. boydii, S. dysenteriae; Proteus (P. mirabilis, P. vulgaris y P. myxofaciens), Morganella (M. morganii); Providencia (P. rettgeri, P. alcalifaciens y P. stuartii); Yersinia, por ejemplo, Y. pestis, Y. enterocolitica,; Haemophilus, por ejemplo, H. influenzae, H. parainfluenzae H. aphrophilus, H. ducreyi; Brucella, por ejemplo, B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. canis; Francisella, por ejemplo, F. tularensis; Pseudomonas, por ejemplo, P. aeruginosa, P. paucimobilis, P. putida, P. fluorescens, P. acidovorans, Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei, Burkholderia mallei, Burkholderia cepacia y Stenotro- phomonas maltophilia; Campylobacter, por ejemplo, C. fetus fetus, C. jejuni, C. pylori (Helicobacter pylori); Vibrio, por ejemplo, V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. mimicus, V. alginolyticus, V. hollisae, V. vulnificus y los vibrios no aglutinables; Clostridia, por ejemplo, C. perfringens, C. tetani, C. difficile, C. botulinum; Actinomyces, por ejemplo, A. israelii; Bacteroides, por ejemplo, B. fragilis, B. thetaiotaomicron, B. distasonis, B. vulgatus, B. ovatus, B. caccae y B. merdae; Prevotella, por ejemplo, P. mela-ninogenica; género Fusobacterium; Treponema, por ejemplo, T. pallidum subespecie endemicum, T. pallidum subespecie pertenue, T. carateum y T. pallidum subespecie pallidum; el género Borrelia, por ejemplo, B burgdorferi; género Leptospira; Streptobacillus, por ejemplo, S. moniliformis; Spirillum, por ejemplo, S. menos; Mycobacterium, por ejemplo, M. tuberculosis, M. bovis, M. afri- canum, M. avium M. intracellulare, M.. kansasii, M. xenopi, M. marinum, M. ulcerans, el complejo M. fortuitum (M. fortuitum y M. chelonei), M. leprae, M. asiaticum, M. chelonei subespecie abscessus, M. fallax, M. fortuitum, M. malmoense, M. shimoidei, M. simiae, M. szulgai, M. xenopi; Mycoplasma, por ejemplo, M. hominis, M. orale, M. salivarium, M. fermentans, M. pneumoniae, M. bovis, M. tuberculosis, M. avium, M. leprae; Mycoplasma, por ejemplo, M. genitalium; Ureaplasma, por ejemplo, U. urealyticum; Trichomonas, por ejemplo, T. vaginalis; Cryptococcus, por ejemplo, C. neoformans; Histoplasma, por ejemplo, H. capsulatum; Candida, por ejemplo, C. albicans; Aspergillus sp; Coccidioides, por ejemplo, C. immitis; Blastomyces, por ejemplo, B. dermatitidis; Paracoccidioides, por ejemplo, P. brasiliensis; Penicillium, por ejemplo, P. marneffei; Sporothrix, por ejemplo, S. schenckii; Rhizopus, Rhizomucor, Absidia y Basidiobolus; enfermedades causadas por Bipolaris, Cladophialophora, Cladosporium, Drechslera, Exophiala, Fonsecaea, Phialophora, Xylohypha, Ochroconis, Rhinocladiella, Scolecobasidium y Wangiella; Tricosporon, por ejemplo, T. beigelii; Blastoschizomyces, por ejemplo, B. capitatus; Plasmodium, por ejemplo, P. falciparum, P. vivax, P. ovale y P. malariae; Babesia sp; protozoos del género Trypanosoma, por ejemplo, T. cruzi; Leishmania, por ejemplo, L. donovani, L. major L. tropica, L. mexicana, L. braziliensis,L. viannia braziliensis; Toxoplasma, por ejemplo, T. gondii; Amoebas de los géneros Naegleria o Acanthamoeba; Entamoeba histolytica,; Giardia lamblia; género Cryptosporidium, por ejemplo, C. parvum; Isospora belli; Cyclospora cayetan- ensis; Ascaris lumbricoides; Trichuris trichiura; Ancylostoma duodenale o Necator americanus; Strongyloides stercoralis Toxocara, por ejemplo, T. canis, T. cati; Baylisascaris, por ejemplo, B. procyonis; Triquinas, por ejemplo, T. spiralis; Dracunculo, por ejemplo, D. medinensis; género Filarioidea; Wuchereria bancrofti; Brugia, por ejemplo, B. malayi o B. timori; Onchocerca volvulus; Loa loa; Dirofilaria immitis; género Schistosoma, por ejemplo, S. japonicum, S. mansoni, S. mekongi, S. intercalatum, S. haematobium; Paragonimus, por ejemplo, P. Westermani, P. Skriabini; Clonorchis sinensis; Fasciola hepatica; Opisthorchis sp; Fasciolopsis buski; Diphyllobothrium latum; Taenia, por ejemplo, T. saginata, T. solium; Echinococcus, por ejemplo, E. granulosus, E. multilocularis; Picornavirus, rinovirus, ecovirus, coxsackievirus, virus de la gripe; paramixovirus, por ejemplo, tipos 1, 2, 3 y 4; adnovirus; Herpesvirus, por ejemplo, HSV-1 y HSV-2; virus varicela-zóster; virus linfotrópico de células T humano (tipo I y tipo II); Arbovirus y Arenavirus; Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae; Flavivirus; Hantavirus; Encefalitis viral (alfavirus [por ejemplo, encefalitis equina venezolana, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental]); Fiebres hemorrágicas virales (filovirus [por ejemplo, Ébola, Marburg] y arenavirus [por ejemplo, Lassa, Machupo]); Viruela (variola); retrovirus, por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2; virus del papiloma humano [VPH] tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35.

[000274] En varios ejemplos, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que es característica de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Acinetobacter Baumannii, Serratia marcescens, Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecium,* enterococcus resistente a la vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA)*, Streptococcus viridans, Listeria monocytogenes, Enterococcus spp., Streptococcus* grupo B, *Streptococcus* grupo C, *Streptococcus* grupo G, *Streptococcus* grupo F, *Enterococcus faecalis, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus epidermidis, Gardenerella vaginalis, Micrococcus sps., Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeee, Moraxella catarrahlis, Salmonella sps., Chlamydia trachomatis, Peptostreptococcus productus, Peptostrepto- coccus anaerobius, Lactobacillus fermentum, Eubacterium lentum, Candida glabrata, Candida albicans,* Chlamydia spp., Camplobacter spp., Salmonella spp., viruela (variola major), Yersina Pestis, Herpes Simplex Virus I (HSV I) y Herpes Simplex Virus II (HSV II).

[000275] En varios ejemplos, la sonda puede ser selectiva para una secuencia de polinucleótidos que es

característica del grupo

B *Streptococcus.*

[000276] Llevar a cabo la PCR en una muestra lista para PCR puede incluir calentar la mezcla de reactivos de PCR y la muestra de polinucleótidos neutralizados en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear amplicones de PCR a partir de la muestra de polinucleótidos neutralizados; poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o un amplicón de PCR de este con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos; poner en contacto independientemente cada una de la muestra de polinucleótidos neutralizados y un polinucleótido de control negativo con la mezcla de reactivos de PCR en condiciones de ciclado térmico adecuadas para crear independientemente amplicones de PCR de la muestra de polinucleótidos neutralizados y amplicones de PCR del polinucleótido de control negativo; y/o poner en contacto la muestra de polinucleótido neutralizado o un amplicón de PCR de este y el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR de este con al menos una sonda que es selectiva para una secuencia de polinucleótidos.

[000277] En varios ejemplos, un procedimiento para llevar a cabo la PCR en una muestra puede incluir además una o más de las siguientes etapas: calentar la muestra biológica en el cartucho microfluídico; presurizar la muestra biológica en el cartucho microfluídico a un diferencial de presión en comparación con la presión ambiente de entre alrededor de 20 kilopascales y 200 kilopascales, o en algunas realizaciones entre alrededor de 70 kilopascales y 110 kilopascales.

[000278] En varios ejemplos, un procedimiento de uso del aparato descrito en esta solicitud puede incluir además una o más de los siguientes etapas: determinar la presencia de una secuencia de polinucleótidos en la muestra biológica, la secuencia de polinucleótidos correspondiente a la sonda, si la sonda se detecta en la muestra de polinucleótidos neutralizada o un amplicón de PCR de esta; determinar un resultado contaminado si la sonda se detecta en el polinucleótido de control negativo o un amplicón de PCR del mismo; y/o en algunas realizaciones, donde la mezcla de reactivos de PCR comprende además un plásmido de control positivo y una sonda de plásmido selectiva para al menos una parte del plásmido, el procedimiento incluye además determinar que se ha producido una reacción de PCR si se detecta la sonda de plásmido.

Sistema de detección de fluorescencia, que incluye lentes y filtros, y detección paralela múltiple para un cartucho de múltiples carriles

[000279] Se puede incorporar un sistema de detección de fluorescencia miniaturizado y altamente sensible para monitorizar la fluorescencia de las reacciones bioquímicas que son la base de los procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como PCR.

[000280] Por consiguiente, otro aspecto del aparato incluye un sistema para monitorizar la fluorescencia de reacciones bioquímicas. El sistema puede ser, por ejemplo, un detector óptico que tiene una fuente de luz (por ejemplo, un LED) que emite selectivamente luz en una banda de absorción de un colorante fluorescente, lentes para enfocar la luz y un detector de luz (por ejemplo, un fotodiodo) que detecta selectivamente luz en una banda de emisión del colorante fluorescente, donde el colorante fluorescente corresponde a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de esta. Alternativamente, el detector óptico puede incluir un diodo filtrado por paso de banda que emite selectivamente luz en la banda de absorción del colorante fluorescente (una sonda fluorogénica) y un fotodiodo filtrado por paso de banda que detecta selectivamente luz en la banda de emisión del colorante fluorescente. Por ejemplo, el detector óptico puede configurarse para detectar independientemente una pluralidad de colorantes fluorescentes que tienen diferentes espectros de emisión fluorescentes, donde cada colorante fluorescente corresponde a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de esta. Por ejemplo, el detector óptico se puede configurar para detectar independientemente una pluralidad de colorantes fluorescentes en una pluralidad de ubicaciones diferentes de, por ejemplo, un cartucho microfluídico, donde cada colorante fluorescente corresponde a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de esta.

[000281] En algunas realizaciones, un detector dado para su uso con el aparato descrito en esta solicitud es capaz de detectar una señal de fluorescencia a partir de reacciones de PCR a escala de nanolitros. Ventajosamente, el detector se forma a partir de componentes económicos, que no tienen partes móviles. El detector también está configurado para acoplarse con un cartucho microfluídico como se describe adicionalmente en esta solicitud, y también es preferentemente parte de un sistema de aplicación de presión, tal como una tapa deslizante, que mantiene el cartucho en su lugar. El detector tiene además potencial para la detección de 2 o 3 colores y es controlado por el software, preferentemente software personalizado, configurado para muestrear información del detector.

[000282] Las figuras 57 a 59 representan una realización de un sistema de detección de fluorescencia altamente sensible que incluye diodos emisores de luz (LED), fotodiodos y filtros/lentes para monitorizar, en tiempo real, una o más señales fluorescentes que emanan del cartucho microfluídico. La realización en las figuras 57 - 59 tiene un sistema de detección de dos colores que tiene un diseño modular que se acopla con un cartucho microfluídico de un solo carril. El detector consta de dos LED (azul y rojo, respectivamente) y dos fotodiodos. Los dos LED están configurados para

transmitir un haz de luz enfocada a una región particular del cartucho. Los dos fotodiodos están configurados para recibir luz que se emite desde la región del cartucho. Un fotodiodo está configurado para detectar luz roja emitida, y el otro fotodiodo está configurado para detectar luz azul emitida.

[000283] Las figuras 60 y 61 muestran un ejemplo de cabezal de lectura que comprende un sistema de detección de color multiplexado 2, tal como múltiples instancias de un sistema de detección que se muestra en las Figuras 57 - 59, que está configurado para acoplarse con un cartucho microfluídico de múltiples carriles. La figura 60 muestra una vista del exterior de un cabezal de lectura multiplexado. La figura 61 es una vista en despiece que muestra cómo se configuran varios detectores dentro de un cabezal de lectura multiplexado ejemplar, y en comunicación con una placa de circuito electrónico.

[000284] El módulo en las figuras 60 y 61 está configurado para detectar fluorescencia desde cada carril de un cartucho de 12 carriles, y por lo tanto comprende 24 detectores controlables independientemente, dispuestos como 12 pares de elementos de detección idénticos. Cada par de elementos es entonces capaz de detectar de dos colores un conjunto predeterminado de sondas fluorescentes. Un experto en la materia entenderá que otros números de pares de detectores son coherentes con el aparato descrito en esta solicitud. Por ejemplo, 4, 6, 8, 10, 16, 20, 24, 25, 30, 32, 36, 40 y 48 pares también son coherentes y se pueden configurar de acuerdo con procedimientos y criterios comprendidos por un experto en la materia.

Ensamblaje de óptica ejemplar

[000285] En una realización ejemplar, el conjunto de chasis óptico/presión está alojado en un recinto (hecho de plástico en determinadas realizaciones) que puede colocarse para cubrir un cartucho microfluídico de múltiples carriles. El alojamiento puede tener opcionalmente un mango que el usuario puede agarrar fácilmente, y se guía para un empuje y tire suave y fácil. El mango también puede servir como un dispositivo de bloqueo de presión. La posición horizontal del alojamiento se detecta tanto en la posición totalmente abierta como en la posición totalmente hacia adelante, y se informa al software de control. El alojamiento y el conjunto de presión del chasis óptico se registran con un módulo de casete calentador colocado debajo de un cartucho microfluídico dentro de 0,010". Un ajuste ceñido es importante para las conexiones adecuadas de la interfaz del calentador/cartucho. El conjunto del alojamiento no se degrada en rendimiento durante una vida útil de 10.000 ciclos, donde un ciclo se define como: comienza con el deslizador en la posición posterior, y se desliza hacia adelante y a continuación bloquea el mango en un cartucho, desbloquea el mango y lo devuelve a la posición posterior original. Todas las partes de la trayectoria óptica deben ser no reflectantes (anodizadas, pintadas, moldeadas, etc.) y no perder esta característica durante 10.000 ciclos. La unidad óptica no se ve afectada por una intensidad de luz de <=9.000 pie candelas de una fuente colocada a 12" del instrumento en ángulos donde es más probable que ocurra la penetración de la luz. No se mide la degradación del rendimiento en el fotodetector después de 10.000 ciclos.

[000286] Al fabricar un conjunto detector, se realiza un solo canal que alberga dos fuentes LED (azul y ámbar) y dos canales adicionales que albergan un detector de fotodiodos cada uno (cuatro orificios perforados totales). Los dos canales emparejados (fuente y detector) están orientados 43° entre sí, medidos desde el eje óptico y están en línea con los otros canales emparejados que están en la misma orientación de 43°. Los orificios perforados en el chasis óptico contienen filtros y lentes con espaciadores adecuados, cuyas especificaciones se describen adicionalmente en esta solicitud. Los LED se mantienen en su lugar para evitar el movimiento, ya que la alineación mecánica es importante para una buena iluminación de la fuente. Los LED se tuercen preferentemente hasta que los dos "puntos calientes" se alinean con los canales de lectura en el cartucho. Esta posición debe mantenerse hasta que los LED no se puedan mover. El chasis óptico puede ser de aluminio y ser anodizado en negro. La superficie de presión inferior del chasis óptico es plana a 60,001" a través de toda la superficie. El chasis óptico está equilibrado en el centro de manera que el centro de la fuerza del chasis óptico esté cerca del centro del cartucho de reactivo. El conjunto de presión (parte inferior del chasis óptico) proporciona una presión uniforme de un mínimo de 1 psi en todas las secciones del calentador del cartucho de reactivo. El conjunto óptico se puede mover lejos del área del cartucho de reactivo para la extracción y colocación del cartucho. Se prefiere una conexión a tierra adecuada del chasis óptico para evitar que las señales espurias emanen a la PCB óptica.

[000287] Las fuentes de luz LED (ámbar y azul) son incidentes en un cartucho microfluídico a través de un filtro de paso de banda y una lente de enfoque. Estas fuentes de luz LED tienen una salida mínima de 2800 milicandelas (azul) y 5600 milicandelas (verde), y las longitudes de onda centrales son 470 nanómetros (azul) y 575 nanómetros (ámbar), con una anchura de banda media de no más de 75 nanómetros.

[000288] La luz LED excita al menos una molécula fluorescente (inicialmente unida a una sonda de oligonucleótidos) en una sola cámara en un cartucho, volviéndola fluorescente. Esta fluorescencia normalmente será bloqueada eficientemente por una molécula amortiguadora muy espaciada. La amplificación de ADN a través de la enzima TAQ separará las moléculas fluorescentes y amortiguadoras de la sonda de oligonucleótidos, desactivando la amortiguación. La amplificación de ADN solo se producirá si la molécula diana de la sonda (una secuencia de ADN) está presente en la cámara de muestra. La fluorescencia ocurre cuando una determinada longitud de onda golpea la molécula diana. La luz emitida no es la misma que la luz incidente. La luz azul incidente está bloqueada del detector

por el filtro de emisión solo verde. Del mismo modo, la luz incidente verde está bloqueada del detector por el filtro de emisión amarillo. La luz fluorescente es capturada y viaja a través de una vía hacia una lente de enfoque, a través de un filtro y hacia un fotodiodo muy sensible.
La cantidad de luz detectada aumenta a medida que aumenta la cantidad de amplificación del ADN. La señal variará con el colorante fluorescente utilizado, pero el ruido de fondo debe ser inferior a 1 mV de pico a pico. El fotodetector, que puede montarse permanentemente en el chasis óptico en una posición fija, debe ser estable durante 5 años o 10.000 ciclos, y debe ser sensible a niveles de luz extremadamente bajos, y tener un valor oscuro de no más de 60 mV. Además, el fotodetector debe estar disponible comercialmente durante al menos 10 años. Las lentes son plano-convexas (detector de 6 mm y distancia focal de la fuente de 12 mm) con el lado plano hacia el cartucho de prueba en ambas lentes. Los filtros deben permanecer estables en los intervalos normales de humedad y temperatura de funcionamiento.

[000289] Los filtros, por ejemplo, suministrados por Omega Optical (Brattleboro, VT 05301), son un sustrato de vidrio óptico con una calidad superficial de F/F por Mil-C-48497A. Los filtros individuales tienen un diámetro de 6,0 +/- 0,1 mm, un espesor de 6,0 +/- 0,1 mm, y el AOI y AOI 1/2 cono es de 0 grados y 68 grados, respectivamente. La abertura transparente es >/= 4 mm de diámetro y el tratamiento del borde se ennegrece antes de montarlo en un anillo de metal anodizado negro. Los filtros del excitador FITC son suministrados por, por ejemplo, Omega Optical (PN 481AF30-RED-EXC). Tienen una frecuencia de corte de 466 +/- 4 nm y una frecuencia de corte de 496 +/- 4 nm. La transmisión es >/= 65% pico y el bloqueo es: >/= OD8 en teoría de 503 a 580 nm, >/= OD5 de 501-650 nm, >/= OD4 promedio sobre 651-1000 nm, y >/= OD4 UV-439nm. Los filtros emisores FITC son suministrados por, por ejemplo, Omega Optical (PN 534AF40-RED-EM). Tendrán una frecuencia de corte de 514 +/- 2 nm y una frecuencia de corte de 554 +/- 4 nm. La transmisión es >/= 70% pico y el bloqueo es: >/= OD8 en teoría de 400 a 504 nm, >/= OD5 UV-507 nm, y >/= OD4 promedio 593 a 765nm Los filtros del excitador ámbar son suministrados por, por ejemplo, Omega Optical (PN 582AF25-RED- EXC). Tienen una frecuencia de corte de 594 +/- 5 nm y una frecuencia de corte de 569 +/- 5 nm. La transmisión es >/= 70% pico y el bloqueo es: >/= OD8 en teoría de 600 a 700 nm, >/= OD5 600-900 nm, y >/= OD4 UV-548 nm. Los filtros emisores ámbar son suministrados por, por ejemplo, Omega Optical (PN 627AF30-RED-EM). Tienen una frecuencia de corte de 642 +/- 5 nm y una frecuencia de corte de 612 +/- 5 nm. La transmisión es >/= 70% pico y el bloqueo es: >/= OD8 en teoría de 550 a 600 nm, >/= OD5 UV-605 nm, y >/= OD5 promedio 667 a 900 nm. Los espaciadores deben ser inertes y la temperatura estable en todo el intervalo de operación y deben mantener los filtros en posición y alineación estrictas. El epoxi utilizado debe tener material ópticamente negro y opaco y sólido seco sin desechos pegajosos. Además, debe tener estabilidad de temperatura y humedad, no ejercer presión sobre los componentes retenidos, y debe montar la PCB de tal manera que sea fija y estable sin posibilidades de rotación o cambios de altura vertical. El 50% de la iluminación deberá caer sobre el plano de muestra dentro de un área de 0,1" (2,5 mm) de ancho por 0,3" (7,5 mm) a lo largo del eje del canal de detección. La fluorescencia del chip de control no debe cambiar más del 0,5% de la señal medida por 0,001" de altura a través de una región +/- 0,010 desde la altura nominal del chip de control.

[000290] Una placa óptica ejemplar se muestra en la figura 62, y se usa para detectar y amplificar la firma fluorescente de una reacción química exitosa en un cartucho microfluídico, y controla la intensidad de los LED usando modulación de ancho de pulso (PWM) para iluminar la muestra de cartucho en hasta cuatro canales, cada uno con dos opciones de color. Además, recibe instrucciones y envía datos de resultados a través de una SPI (interfaz periférica en serie) de LVDS (señalización diferencial de bajo voltaje). Los sistemas de placa de alimentación incluyen: una entrada de +12V; y salidas de +3,3V, +3,6V, +5V y -5V, configuradas de la siguiente manera: la salida de +3,3V contiene un regulador lineal, se utiliza para alimentar la interfaz de LVDS, debe mantener una precisión de +/-5% y suministrar una corriente de salida de 0,35A; la salida de +3,6 V contiene un regulador lineal, se utiliza para alimentar el MSP430, debe mantener una precisión de +/-5% y suministrar una corriente de salida de 0,35 A; la salida de +5V contiene un regulador lineal, se utiliza para alimentar el carril más para los op-amperios, debe mantener una precisión de +/-5% y suministrar una corriente de salida de 0,35A; la salida de -5V recibe su energía de la fuente de alimentación de +5V, se utiliza para alimentar el carril negativo para los op-amperios y para el sesgo del foto-detector, debe mantener una precisión de tensión de +/-1% y suministrar una corriente de salida de 6,25 mA +/-10%. Además, la placa de alimentación tiene una resistencia a la fuente de 80 ohmios, y el software de la placa principal puede habilitar/deshabilitar las salidas del regulador.

[000291] La interfaz de placa principal utiliza un solo canal del estándar de LVDS para comunicarse entre placas. Esto tiene lugar utilizando la señalización de SPI a través de la interfaz de LVDS que está conectada al puerto de SPI principal del procesador de control. La interfaz también contiene un puerto en serie para la programación en el sistema.

[000292] El sistema de detección óptica ejemplar de la figura 62 consiste en un procesador de control, controladores de LED y un sistema de fotodetección. En la realización ejemplar, el procesador de control es un TI MSP430F1611 que consiste en una SPI dual (una para la interfaz de placa principal y otra para la interfaz ADC) y SRAM extendida para el almacenamiento de datos. Tiene las funciones de monitorización de energía, control LED PWM y SPI que se conecta a ADC y la placa principal. Los controladores de LED contienen interruptores de transistores NPN, están conectados a las salidas PWM del procesador de control, pueden disipar 10 mA a 12V por LED (80 mA en total) y son de un solo canal con 2 LED (uno de cada color) conectados a cada uno. El sistema de fotodetección tiene dos canales y consiste en un fotodetector, un detector de fotodiodos de alta sensibilidad, un

convertidor de corriente a voltaje de alta ganancia, un amplificador de inversión de voltaje de ganancia de unidad y un ADC. Además, contiene un Sigma-delta de 16 canales (que utiliza solo los primeros 8 canales) que está conectado al segundo puerto SPI del procesador de control. Un experto en la materia entenderá que otras opciones y combinaciones de elementos pueden unirse para hacer un sistema de detección funcional coherente con la descripción en esta solicitud.

Ventajas y características adicionales de la tecnología en esta solicitud

[000293] El uso de una cámara de procesamiento desechable, que tiene propiedades de recubrimiento superficial y de material para permitir un volumen bajo, y una liberación calentada con tubo abierto para maximizar la concentración de muestra en el volumen más bajo posible.

[000294] El separador de calor magnético integrado que permite calentar varias muestras de forma independiente pero separadas mediante una única plataforma magnética móvil.

[000295] Un diseño de lector/bandeja que permite la fácil colocación del cartucho microfluídico y el pipeteo de múltiples muestras de líquido utilizando un dispensador robótico en una posición; desplazamiento relativo a otra ubicación y aplicación de presión para posteriores etapas rápidas de incubación de calor y detección óptica. La superficie inferior del cartucho se acopla con la superficie de calentamiento. Además, es típicamente más fácil mover un cartucho y un calentador dentro y fuera de posición que un detector.

[000296] Un diseño de cabezal de lectura móvil para la detección de fluorescencia de canales de PCR microfluídicos.

[000297] Aspectos del soporte, tales como una tira desechable unificada, que incluyen la presencia de reactivos liofilizados sellados, así como líquidos sellados en estrecha proximidad, que normalmente es difícil de lograr. Los laminados desplegados en esta solicitud facilitan el almacenamiento.

[000298] El soporte permite el corte de múltiples tubos ASR y los procedimientos de dispensación de líquidos asociados que minimizan la contaminación cruzada de la muestra, pero se deben realizar múltiples preparaciones de PCR a partir de una sola muestra clínica.

[000299] Las características del software permiten al usuario obtener resultados de las 24 muestras lo más rápido posible o las primeras 12 muestras lo más rápido posible y las siguientes, 12 más tarde.

[000300] Los instrumentos de preparación y diagnóstico descritos en esta solicitud permiten que se procesen diferentes tipos de muestras (tales como sangre, orina, hisopo, etc.) al mismo tiempo, aunque cada uno puede requerir diferentes temperaturas, tiempos o reactivos químicos. Esto se logra en parte mediante el uso de soportes individualizados pero compatibles.

[000301] La alimentación automática de cartuchos microfluídicos en un lector de PCR a través de un cargador automático de cartuchos ahorra tiempo al usuario y conduce a una mayor eficiencia del funcionamiento general.

[000302] Perforación a través de una lámina sobre un tubo de líquido y una forma confiable de recoger el líquido.

[000303] Un cabezal de lectura móvil que tiene las bombas, sensores (detección de pipeta, detección de fuerza), verificador de identificación de muestras, etc., que se mueve con este y, por lo tanto, minimiza el número de líneas de control que se mueven a través del instrumento durante el uso.

[000304] Alineación precisa y rápida de puntas de pipeta con orificios de entrada de cartucho que utilizan una placa de alineación motorizada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Soporte de reactivo

[000305] Un soporte de reactivo ejemplar coherente con la descripción en esta solicitud tiene las siguientes dimensiones y capacidades:

- 180 mm de largo x 22 mm de ancho x 100 mm de alto;
- Hecho de polipropileno.
- Un tubo de baja fijación a presión de 1,7 ml que funciona como un tubo de procedimiento.
- 3 tubos incorporados que funcionan como receptáculos para reactivos, de la siguiente manera:
    - Un tubo que contiene 200 a 1000 µl de tampón de lavado (Tris 0,1 mM, pH 8)

○ Un tubo que contiene 200 a 1000 µl de solución de liberación (NaOH 40 mM)
○ Un tubo que contiene 200 a 1000 µl de solución de neutralización (Tris 330 mM, pH 8,0).

• Un tubo incorporado que funciona como cámara de desechos (puede contener ~ 4 ml de desechos líquidos).
• 3 recipientes para aceptar recipientes para reactivos sólidos. Los tubos de PCR a presión de 0,3 ml o 0,65 ml (que normalmente se almacenan por separado del soporte del reactivo) se colocan en cada una de estas ubicaciones y contienen, respectivamente:

○ reactivos de preparación de muestras liofilizadas (mezcla de enzimas de lisis y esferas de afinidad magnética).
○ Primera mezcla maestra de PCR liofilizada, sondas y cebadores para una primera detección de analito diana.
○ Segunda mezcla maestra de PCR liofilizada, sondas y cebadores para una segunda detección de analito diana (solo se ofrece en casos selectos, como la detección de clamidia y gonorrea a partir de orina).

• 4 puntas de pipeta ubicadas en 4 zócalos respectivos.
• Funda con punta de pipeta: Las puntas de la pipeta tienen una funda/bandeja de goteo debajo para ayudar a capturar cualquier goteo de las puntas de la pipeta después de su uso, y también para evitar la contaminación no deseada del instrumento.
• El mango y el Flex-Lock permiten una fácil inserción, extracción y ubicación positiva de la tira en el portaobjetos.
• Una o más etiquetas: colocadas hacia arriba para facilitar la lectura a simple vista y/o, por ejemplo, un lector de códigos de barras, la una o más etiquetas que contienen información legible por humanos y máquinas perteneciente al análisis que realizar.

[000306] Se entiende que estas dimensiones son ejemplares. Sin embargo, es particularmente deseable asegurarse de que un soporte no exceda estas dimensiones de modo que un portaobjetos y un aparato que se adapte al o los soportes de reactivo no se vuelvan inconvenientemente grandes, y se puedan ubicar adecuadamente en un laboratorio, por ejemplo, en una mesa de trabajo.

Ejemplo 2: Fabricación de soportes de reactivos desechables

[000307] Se pueden diseñar accesorios simples y mecanizarse para permitir la manipulación y el procesamiento de múltiples tiras. Se pueden realizar cinco etapas para producir este componente. El soporte de reactivo desechable se colocará en un accesorio y se llenará con líquidos mediante pipeteo manual/eléctrico-múltiple. Inmediatamente después de dispensar todos los líquidos en la tira, la lámina se sellará térmicamente al plástico utilizando un equipo de sellado térmico ejemplar (prensa de cabezal plano Hix FH-3000-D) y la lámina se recortará según sea necesario. Después de sellar con calor los líquidos a bordo, todos los sedimentos en los tubos pueden encajarse en la tira, pueden insertarse puntas de pipeta en sus respectivos zócalos y se puede colocar una etiqueta con código de barras. Los paquetes de desecante pueden colocarse en el portaobjetos moldeado por soplado o termoformado diseñado para albergar 12 soportes. Doce tiras desechables se cargarán en el portaobjetos y a continuación se sellarán con papel de aluminio. La bolsa sellada se colocará en una caja y se etiquetará para su envío.

Ejemplo 3: Sellado de lámina de tubos de reactivo que contienen tampón

[000308] Los tubos que contienen tampones deben sellarse con materiales de barrera contra el vapor de alta humedad para retener el líquido durante un largo período de tiempo. Puede que los soportes desechables necesiten tener una vida útil de 1 a 2 años y, como tales, no deben perder más del 10 al 15% del volumen de líquido durante el período de tiempo, para mantener el volumen requerido de líquido y para mantener la concentración de varias moléculas presentes en la solución. Además, los materiales utilizados para la construcción del tubo, así como el laminado de sellado, no deben reaccionar con el tampón líquido. Los laminados de plástico especiales pueden proporcionar la barrera de humedad, pero puede que tengan que ser muy gruesos (más de 300 mm de espesor), lo que hace que la fuerza de perforación aumente enormemente, o de polímero especial y costoso (como Aclar). Las láminas de aluminio, incluso una lámina delgada de unos pocos cientos de angstrom proporciona una barrera eficaz contra la humedad, pero el aluminio básico reacciona con algunos tampones líquidos, tales como hidróxido de sodio, incluso una lámina de aluminio con un recubrimiento pulverizado de un polímero no reactivo puede no ser capaz de soportar los vapores corrosivos durante un largo tiempo. Pueden reaccionar a través de pequeños orificios de pasador presentes en el recubrimiento y pueden fallar como barrera con el tiempo.

[000309] Por estas razones, las láminas de aluminio con una estructura laminada se han identificado como una barrera adecuada, cuyas propiedades ejemplares se describen a continuación:

1. Sellado
Sellos térmicos a la tira de polipropileno unificada (temperatura de sellado ~ 170-180 °C)
Sin arrugas, grietas ni microfisuras de la lámina después del sellado

2. Velocidad de transmisión de vapor de humedad (MVTR)

Pérdida de menos del 10% de líquido (20 microlitros de un volumen de 200 microlitros) durante un periodo de 1 año almacenado a temperatura y presión ambiente. (el área efectiva de transporte es ~ 63 mm^2); MVTR aproximada ~ 0,8 cc/m^2/día

3. Descripción
Capacidad de no reaccionar con hidróxido de sodio 40 mM (pH< 12,6): la lámina debe tener un laminado plástico de al menos 15 micrones de espesor más cerca del fluido sellado.
Capacidad de no reaccionar con otros tampones que contienen detergentes suaves

4. Capacidad de perforación para perforar usando una pipeta p1000 con una fuerza inferior a 3 lb
Antes de perforar, una membrana totalmente soportada de 8 mm de diámetro no se estirará más de 5 mm en la dirección ortogonal
Después de perforar, la lámina no debe sellar la punta de la pipeta alrededor de la circunferencia de la pipeta.

5. Otras características
Sin perforación de pasador
No hay burbujas en el caso de estructuras multilaminadas.

Ejemplo 4: Mecanismo de perforación a través de un laminado plastificado y tampón de extracción líquido

[000310] El laminado de aluminio que contiene una película de plástico descrita en otra parte de la presente solicitud sirve bien para no reaccionar con reactivos corrosivos tales como tampones que contienen NaOH, y que tienen propiedades favorables de penetrabilidad y actúan como una barrera contra la humedad. Sin embargo, presenta algunas dificultades adicionales durante la perforación. El papel de aluminio tiende a reventar en un patrón poligonal irregular más grande que el diámetro de la pipeta, mientras que la película de plástico tiende a envolverse alrededor de la punta de la pipeta con un espacio mínimo entre la pipeta y la película de plástico. El diámetro del orificio en la película de plástico es similar al diámetro máximo de la pipeta que había cruzado a través del laminado. Esta envoltura de la pipeta causa dificultad en las operaciones de dispensación y pipeteo a menos que haya un orificio de ventilación que permita que las presiones se equilibren entre el exterior del tubo y el aire dentro del tubo.

[000311] Una estrategia para el pipeteo exitoso del fluido es la siguiente:

1. Perfore a través de la estructura del laminado y haga que la pipeta se acerque al fondo del tubo de reactivo para que el orificio creado en el laminado sea casi tan grande como el diámetro máximo de la pipeta (por ejemplo, ~6 mm para una pipeta p1000)
2. Retire la pipeta una corta distancia para que quede un pequeño orificio de ventilación anular entre la pipeta y el laminado. La pipeta p1000 tiene un diámetro exterior más pequeño de 1 mm y un diámetro exterior máximo de 6 mm y la sección cónica de la pipeta es de alrededor de 28 mm de largo. Un espesor de orificio de ventilación de cien micrones es suficiente para crear un orificio de ventilación confiable. Corresponde a la pipeta insertada a un diámetro de 5,8 mm, dejando un espacio anular de 0,1 mm a su alrededor.
3. Retire el líquido del tubo. Tenga presente que el tubo está diseñado para contener más fluido del necesario para retirarse de este para un procedimiento de preparación de muestras.

Ejemplo 5: Perforación de lámina y disolución de reactivos liofilizados:

[000312] Los recipientes de reactivos liofilizados proporcionados junto con un soporte como se describe en esta solicitud se sellan típicamente mediante una lámina de aluminio no plastificada (*es decir,* no un laminado como se usa para sellar los tubos de reactivo). El papel de aluminio revienta en un patrón poligonal irregular cuando se perfora a través de una pipeta y sale de un conducto de ventilación de aire a pesar de que la pipeta se mueve al fondo del tubo. Con el fin de ahorrar en reactivos, es deseable disolver los reactivos y maximizar la cantidad extraída del tubo. Para lograr esto, se coloca un patrón estrellado (estrellado) en la parte inferior del recipiente para maximizar el volumen de líquido retirado y la velocidad de flujo entre las crestas.

[000313] Las etapas ejemplares para disolver y extraer el fluido son los siguientes:

1. Perforar a través de la pipeta y dispensar el fluido lejos del material liofilizado. Si la pipeta va por debajo del nivel del material liofilizado, entrará en la pipeta y puede causar la obstrucción del flujo de líquido fuera de la pipeta.
2. Dejar que el material liofilizado se disuelva durante unos segundos.
3. Mover la pipeta hacia abajo tocando la parte inferior estriada del tubo.
4. Realizar un número adecuado de operaciones de succión y salivación (4-10) para mezclar completamente los reactivos con el tampón líquido.
5. Retirar todos los reactivos y mover la pipeta para dispensarla en el siguiente tubo de procesamiento.

Ejemplo 6: Propiedad del material y de la superficie del tubo de lisis

[000314] El material, las propiedades de la superficie y el acabado de la superficie tienen un profundo impacto en la sensibilidad del ensayo realizado. En aplicaciones clínicas, el ADN/ARN tan bajo como 50 copias/muestra (~1 ml de volumen) debe detectarse positivamente en un fondo de miles de millones de otras moléculas, algunas de las cuales inhiben fuertemente la PCR. Con el fin de lograr estos altos niveles de sensibilidad, la superficie del tubo de reacción, así como el material de la superficie, debe elegirse para tener una unión mínima de polinucleótidos. Durante la creación de la herramienta de moldeo por inyección para crear estos tubos de plástico, las superficies inherentes creadas por el mecanizado pueden tener un área de superficie grande debido a marcas de corte tan grandes como decenas de micrones de picos y valles. Estas superficies tienen que ser pulidas con acabado SPI A1/A2 (acabado espejo) para eliminar las irregularidades microscópicas de la superficie. Además, la presencia de estos valles microscópicos atrapará esferas magnéticas (0,5 a 2 m) en lugares no deseados y causará un rendimiento irregular. Además de la rugosidad superficial real, la hidrofobicidad superficial/moléculas superficiales presentes pueden hacer que los polinucleótidos se adhieran en lugares no deseados y reducir la sensibilidad de la prueba general. Además de los usos del material base, tales como polipropileno homogéneo y otros polímeros, los materiales específicos utilizados durante el moldeo de estos tubos, tales como compuestos de liberación de molde o cualquier aditivo para ayudar en la fabricación pueden tener un impacto profundo en el rendimiento de las reacciones.

Ejemplo 7: Cabezal dispensador de líquido

[000315] Con referencia a las figuras 18, 19A-C y 63, un dispensador de líquido ejemplar está unido a un brazo y recibe instrucciones a través del cable eléctrico 1702. El escáner de código de barras 1701 está montado en una cara del dispensador de líquido. El brazo está montado en un riel horizontal 1700 para proporcionar movimiento en la dirección x. No se muestra un riel dispuesto ortogonalmente para proporcionar movimiento en la dirección y. El dispensador de líquido comprende una bomba motorizada controlada por ordenador 1800 conectada al colector de distribución de fluido 1802 con válvula controlada por ordenador relacionada 1801 y un pipeteador de 4 canales con cabezales de resorte individual 1803. El colector de distribución de fluido tiene nueve válvulas solenoides 1801 de Lee Co. que controlan el flujo de aire a través de las puntas de pipeta: dos válvulas para cada pipeta y una válvula adicional para ventilar la bomba. El lector de código de barras 1701 permite la detección positiva de tubos de muestra, reactivos desechables y cartuchos microfluídicos. El escáner está montado en el eje z para que pueda colocarse para leer los códigos de barras del tubo de muestra, la tira y el cartucho.

Ejemplo 8: Calentador/separador integrado

[000316] En la figura 64, se muestra un separador magnético integrado ejemplar y un ensamblaje de calentador. Se fabricó el separador magnético 1400 y el ensamblaje de calentador 1401 que comprende doce bloques térmicos alineados paralelos entre sí. Cada bloque térmico 1403 está hecho de aluminio y tiene una configuración en forma de L que tiene una entrada en forma de U para aceptar una cámara de procesamiento 1402. Cada bloque térmico 1403 está asegurado y conectado por una tira de metal 1408 y tornillos 1407. El imán 1404 es un bloque rectangular de neodimio (u otros materiales de tierras raras permanentes, K & J Magnetics, Forcefield Magnetics) dispuesto detrás de cada bloque térmico 1403 y montado en un miembro de soporte. Los engranajes 1406 comunican la energía de rotación de un motor (no mostrado) para hacer que el eje motorizado 1405 suba y baje el imán 1404 con respecto a cada bloque térmico. El motor está controlado por ordenador para mover el imán a velocidades de 1 a 20 mm/s. El dispositivo comprende además una placa de circuito impreso (PCB) 1409 configurada para hacer que el ensamblaje de calentador aplique calor independientemente a cada cámara de procesamiento 1402 a continuación de recibir las instrucciones apropiadas. En la realización ejemplar, el dispositivo también comprende un sensor de temperatura y un resistor de potencia junto con cada bloque térmico.

Ejemplo 9: Software ejemplar

[000317] El software ejemplar que acompaña el uso del aparato en esta solicitud puede incluir dos partes amplias - interfaz de usuario y firmware del dispositivo. El software de interfaz de usuario puede permitir aspectos de la interacción con el usuario, tales como: ingresar información del paciente/muestra, monitorizar el progreso de la prueba, advertencias de error, imprimir los resultados de la prueba, cargar los resultados en las bases de datos y actualizar el software. El firmware del dispositivo puede ser el software de bajo nivel que realmente ejecuta la prueba. El firmware puede tener una parte genérica que puede ser independiente de la prueba y una parte específica de la prueba que se está realizando. La parte específica de la prueba ("protocolo") puede especificar las operaciones microfluídicas y su orden para realizar la prueba.

[000318] Las figuras 65A y 65B muestran capturas de pantalla de la interfaz de programación y monitorización de detector óptico y sensor de calor en tiempo real. Esta supervisión del rendimiento del dispositivo en tiempo real es para fines de prueba; no visible para el usuario en la configuración final.

Interfaz de usuario:

[000319] Una pantalla LCD de grado médico y un conjunto de pantalla táctil pueden servir como interfaz de usuario a través de una interfaz gráfica de usuario que proporciona instrucciones de fácil operación y resolución de

problemas menores. La pantalla LCD y la pantalla táctil se han especificado para garantizar la compatibilidad de todas las superficies con los agentes de limpieza comunes. Se puede configurar un escáner de código de barras integrado con el analizador para escanear el código de barras del cartucho (especificando el tipo de cartucho, el número de lote, la fecha de caducidad) y, si está a disposición, la identificación del paciente y del usuario de uno o más tubos de muestra.

Ejemplo 10: Aparatos de preparación ejemplares

[000320] Este producto es un instrumento que permite que 24 muestras clínicas se procesen automáticamente para producir ácido nucleico purificado (ADN o ARN) en alrededor de media hora (figura 66). El ácido nucleico purificado puede procesarse en una máquina de detección de amplificación separada para detectar la presencia de determinados ácidos nucleicos diana. Las muestras se procesan en una tira desechable unificada, se precargan con analitos químicos de preparación de muestras y se dispensan ácidos nucleicos purificados finales en tubos de PCR. El manejo de fluidos es habilitado por un cabezal de pipeteo movido por un brazo xyz. (figura 67).

[000321] El sistema cuenta con los siguientes subsistemas:

- Dos portaobjetos de procesamiento de muestras, cada portaobjetos procesa hasta 12 muestras clínicas en tiras desechables unificadas
- Ensamblaje separador magnético con calentador de tubos (24 estaciones de calefacción)
- Un cabezal dispensador de líquido de cuatro sondas
- Carcasa de 3 ejes para mover el cabezal de la pipeta
- Estación de soporte de tubo de pcr refrigerado por Peltier para recibir el ADN/ARN purificado
- Sistema electrónico de control
- Lector de códigos de barras

[000322] Operación: El usuario obtendrá una lista de trabajo para cada muestra, ya sea que desee extraer ADN o ARN para cada muestra clínica. Los tubos de muestra se colocan en el portaobjetos y para cada tipo de muestra (ADN o ARN), el usuario desliza un reactivo unificado desechable (procesamiento de ADN o ARN) en el carril correspondiente del portaobjetos. El (soporte) desechable unificado tendrá todos los reactivos de preparación de muestras, tubos de procedimiento, así como pipetas desechables ya preenvasados en él. Una vez que todos los elementos desechables se cargan en el portaobjetos, el portaobjetos se coloca en su ubicación en el instrumento. Los tubos abiertos se colocan en el soporte de tubo enfriado por peltier donde se dispensará el ácido nucleico purificado final. El usuario cierra la puerta del instrumento y a continuación inicia el procesamiento de la muestra utilizando la GUI (interfaz gráfica de usuario).

[000323] El instrumento verifica la funcionalidad de todos los subsistemas y a continuación lee el código de barras de los tubos de muestra y el reactivo unificado desechable. Se determina cualquier desajuste con una lista de trabajo preexistente y los errores se marcan, si es necesario. El instrumento a continuación pasa a través de una serie de separaciones magnéticas, calentamiento y procesamiento de líquidos para completar las etapas de preparación de la muestra para cada una de la muestra clínica y produce el ácido nucleico purificado en el tubo de PCR. Las etapas básicas involucradas en cada procesamiento de muestra son la lisis de muestra, la captura de ácido nucleico en esferas de afinidad magnética, el lavado de las esferas magnéticas para eliminar impurezas, la liberación del ácido nucleico de las esferas magnéticas, la neutralización del ADN liberado y la dispensación en el tubo de PCR final. Estos tubos se mantienen a 4 °C hasta que todas las muestras se procesan y el usuario retira el tubo para el procesamiento posterior de los ácidos nucleicos.

Ejemplo 11: Aparatos de diagnóstico ejemplares

[000324] El aparato, en combinación con los consumibles asociados, realiza automáticamente todos los aspectos de las pruebas de ácido nucleico, incluida la preparación de muestras, la amplificación y la detección de hasta 48 muestras por hora con los primeros 24 resultados disponibles en menos de una hora. El sistema es fácil de usar. Un operador simplemente toma una alícuota de una parte de la muestra del paciente en un tubo dedicado que contiene tampón preenvasado. El operador coloca los tubos dedicados en posiciones en un portaobjetos de muestras. A continuación, el operador carga una tira de reactivo de plástico desechable para la prueba adecuada en el portaobjetos. Los únicos otros consumibles utilizados en el aparato son cartuchos de PCR microfluídicos para realizar la amplificación y detección; cada cartucho es capaz de realizar hasta doce pruebas de PCR y se pueden cargar dos cartuchos en el analizador a la vez. Si el aparato requiere un nuevo cartucho de PCR, el analizador le pedirá al operador que cargue el cartucho. El analizador le pedirá al operador que cierre la tapa para iniciar la prueba. Todos los consumibles y tubos de muestra tienen un código de barras para la identificación positiva de la muestra.

[000325] La lisis de muestras y la preparación de ADN, que requerirán alrededor de media hora para un ciclo completo de 24 muestras, se realiza automáticamente por los componentes robóticos y de manejo de líquidos del analizador utilizando protocolos y reactivos ubicados en tiras de plástico unificadas y desechables. El aparato a

continuación mezcla automáticamente la muestra y los reactivos de PCR, e inyecta la mezcla en un cartucho que será procesado automáticamente por una máquina de PCR integrada. La PCR y la detección rápidas y en tiempo real requieren menos de 20 minutos. Los resultados, que estarán disponibles automáticamente al finalizar la PCR, se muestran en la pantalla táctil de los instrumentos, se imprimen o se envían al sistema de información del hospital, según lo especificado por el usuario (o el supervisor del usuario).

[000326] Cada instrumento puede procesar hasta 24 muestras a la vez con un rendimiento total de 48 muestras por hora después de la primera ejecución. El analizador tiene un poco menos de 1 m de ancho y cabe fácilmente en un banco de laboratorio estándar. Todas las operaciones de la unidad se pueden dirigir utilizando la varilla con código de barras y la pantalla táctil incluidas. El analizador se puede interconectar con sistemas de información de laboratorio, redes hospitalarias, PC, impresoras o teclados a través de cuatro interfaces USB y un puerto Ethernet.

[000327] El aparato tiene las siguientes características.

[000328] Sensibilidad: el aparato tendrá un límite de detección de ~50 copias de ADN o ARN. (y puede tener un límite de detección tan bajo como 25-30 copias de ADN/ARN).

[000329] Costo por prueba: Debido a la naturaleza miniaturizada y simplificada de los reactivos, cartuchos y otros consumibles de HandyLab, el coste de los productos por prueba será relativamente bajo y muy competitivo.

[000330] Automatización: En contraste con los sistemas NAT «automatizados» actuales, que requieren cierto grado de interacción del tecnólogo razonablemente extensa con el sistema, a través del uso de pruebas unificadas y la integración completa de la extracción, preparación, amplificación y detección de muestras, el aparato en este documento ofrecerá un mayor nivel de automatización y la correspondiente reducción en el tiempo del tecnólogo y el nivel de habilidad requerido, lo que afectará favorablemente los costos de mano de obra generales.

[000331] Rendimiento: El rendimiento se define como el número de pruebas que un sistema puede realizar en un período de tiempo determinado. El aparato será capaz de realizar 45 pruebas por hora, de media.

[000332] Tiempo hasta el primer resultado: En un entorno hospitalario, el tiempo hasta el primer resultado es una consideración especialmente importante. El aparato producirá los primeros 24 resultados en menos de una hora y otros 24 resultados cada media hora a partir de entonces.

[000333] Acceso aleatorio y análisis urgentes: El acceso aleatorio es la capacidad de ejecutar una variedad de pruebas juntas en una sola ejecución y colocar muestras en ubicaciones no asignadas en el analizador. Además, con la química y los sistemas de inmunoensayo, es deseable ser capaz de añadir pruebas después de que una ejecución ha comenzado. Esto a menudo se conoce como «verdadero acceso aleatorio», ya que se proporciona al usuario una flexibilidad completa con respecto a qué pruebas se pueden ejecutar en un analizador y cuándo se puede agregar una nueva muestra a una ejecución. Una determinación urgente es una muestra que requiere un resultado lo más rápido posible, y por lo tanto se le da prioridad en la señal de prueba en el analizador. Hoy en día, esencialmente todos los analizadores de química e inmunoensayo son verdaderos accesos aleatorios y ofrecen capacidades de análisis urgentes Para NAT, sin embargo, muy pocos sistemas ofrecen acceso aleatorio o capacidades de análisis urgentes. El instrumento en el presente documento proporcionará acceso aleatorio y capacidades de análisis urgentes.

[000334] Menú: El número y tipo de pruebas disponibles para el analizador es un factor muy importante en la elección de los sistemas. El aparato en esta solicitud despliega una estrategia de menú de lanzamiento que implica una mezcla de pruebas de ácido nucleico «estándar» de alto volumen combinadas con pruebas novedosas de alto valor.

[000335] El aparato permite procesar automáticamente 24 muestras clínicas para purificar el ácido nucleico, mezclar el ADN/ARN purificado con reactivos de PCR y realizar PCR en tiempo real en cartucho microfluídico para proporcionar muestra a resultados en una hora. El aparato ejemplar tiene dos lectores de PCR, cada uno capaz de ejecutar un cartucho microfluídico de 12 carriles usando un sistema óptico que tiene un sistema de detección óptica bicolor dedicado. Figuras 68, figura 69.

[000336] El aparato tiene los siguientes subsistemas:

- Dos portaobjetos de procesamiento de muestras, cada portaobjetos procesa hasta 12 muestras clínicas en tiras desechables unificadas
- Conjunto separador magnético con calentador de tubos (24 estaciones de calefacción)
- Un cabezal dispensador de líquido de cuatro sondas
- Carcasa de 3 ejes para mover el cabezal de la pipeta
- Dos estaciones de detección de amplificación de PCR, cada una capaz de ejecutar un cartucho microfluídico de 12 carriles y un sistema de detección óptica de 2 colores dedicado para cada carril de PCR.
- Electrónica de control

• Lector de códigos de barras

[000337] Las imágenes del exterior (cara a cara) e interior se encuentran en las figuras 70, 71, respectivamente.

[000338] Operación: El usuario obtendrá una lista de trabajo para cada muestra, si desea detectar cierto analito diana (como GBS, clamidia, gonorrea, HSV) para cada muestra clínica. Los tubos de muestra se colocan en el portaobjetos y, para cada muestra, el usuario desliza un reactivo unificado desechable (específico del analito) en el carril correspondiente del portaobjetos. El desechable unificado tendrá todos los reactivos de preparación de muestras, reactivos de PCR, tubos de procesamiento, así como pipetas desechables ya preenvasadas en él. Una vez que todos los elementos desechables se cargan en el portaobjetos, el portaobjetos se coloca en su ubicación en el instrumento. A continuación, el usuario coloca dos cartuchos de PCR microfluídica de 12 carriles en las dos bandejas del lector de PCR. El usuario cierra la puerta del instrumento y a continuación inicia el procesamiento de la muestra utilizando la GUI (interfaz gráfica de usuario).

[000339] El instrumento verifica la funcionalidad de todos los subsistemas y a continuación lee el código de barras de los tubos de muestra, los reactivos desechables unificados y los cartuchos microfluídicos. Se determina cualquier desajuste con una lista de trabajo preexistente y los errores se marcan, si es necesario. El instrumento que pasa por una serie de procesamiento de líquido, calentamiento, separación magnética para completar las etapas de preparación de la muestra para cada una de la muestra clínica, mezcla el ácido nucleico purificado con reactivos de PCR y dispensa la mezcla final en un carril de los cartuchos microfluídicos. Después de que un cartucho microfluídico se carga con la mezcla de PCR final, la bandeja de cartucho se mueve y alinea el cartucho en el lector y el sistema de detección óptica presiona el cartucho contra una superficie del calentador de PCR microfluídico. Las válvulas en chip se accionan para cerrar la mezcla de reacción y a continuación se inicia el termociclado para iniciar la reacción de PCR. En cada ciclo de PCR (hasta 45 ciclos), la fluorescencia de cada carril de PCR es detectada por el sistema de detección óptica (2 colores por carril de PCR) y el resultado final se determina en función del ciclo umbral (Ct).

[000340] Las etapas de preparación de la muestra para 24 muestras se realizan en alrededor de 40 minutos y la reacción de PCR en alrededor de 20 minutos.

Lector de muestra:

[000341] El lector realiza pruebas de funcionamiento de hasta doce muestras de pacientes preparadas adecuadamente mediante el procedimiento de PCR (PCR en tiempo real) cuando se utiliza junto con los cartuchos microfluídicos HandyLab (prueba). Cada unidad empleará dos módulos de lectura para un total de hasta veinticuatro pruebas. (figuras 72A y 72B) El funcionamiento del lector está diseñado para una interacción mínima con el cliente, que requiere la carga y descarga de cartuchos de prueba solamente. Durante la secuencia "Cargar desechables", el Lector presentará una bandeja accionada por motor para la instalación del cartucho desechable. Al deslizar una pequeña perilla ubicada en la parte delantera de la bandeja, se levantará una cubierta protectora con resorte que permitirá que el cartucho de prueba se anide correctamente en su lugar. Luego se baja la cubierta hasta que la perilla se autobloquea en el marco de la bandeja, asegurando el cartucho y evitando el movimiento durante la secuencia de carga de la muestra.

[000342] Una vez que las muestras preparadas se hayan dispensado a través de pipetas en el cartucho de prueba, la bandeja se retraerá en el lector, colocando con precisión el cartucho de prueba debajo del chasis del ensamblaje óptico. El conjunto óptico será entonces bajado por un motor paso a paso accionado por tornillo capturado hasta que se haga contacto con el cartucho de prueba. En este punto, el cartucho de prueba está ubicado 1/8" por encima de la ubicación objetivo en el conjunto del calentador. A medida que el movimiento hacia abajo continúa, el cartucho de prueba y su soporte dentro de los resortes de compresión de la bandeja en el marco de la bandeja (estos se utilizan más tarde para devolver el cartucho a su posición normal y poder limpiar los enlaces de alambre encapsulados ubicados en el conjunto del calentador durante el funcionamiento de la bandeja). El movimiento del cartucho de prueba y el ensamblaje óptico se completa una vez que se hace contacto con el ensamblaje de calentador y se obtiene un mínimo de 2 psi a través de los dos tercios del área del cartucho alrededor de los canales de PCR y sus puertas de control. En este punto, la prueba del cartucho se realiza utilizando el conjunto del calentador, medido con la óptica a bordo, y se controla a través de software y electrónica de la misma manera que se hace funcionar actualmente en instrumentos HandyLab similares.

[000343] Una vez completada la prueba funcional, el motor principal eleva el conjunto óptico, liberando la presión sobre el cartucho de prueba para volver a su posición normal. Cuando se le ordena, el motor de la bandeja que funciona de manera de piñón y cremallera, presenta la bandeja al cliente para la extracción y eliminación de cartuchos. Cuando la bandeja está en la posición extendida, está suspendida sobre un bloque de soporte ubicado en el chasis del aparato. Este bloque evita que el cartucho se deslice a través del soporte en la bandeja durante la carga y actúa como soporte mientras las muestras se pipetean en el cartucho desechable. También se proporciona en este bloque de soporte una palanca de asistencia para levantar y agarrar el cartucho desechable durante la extracción. Todos los componentes de la bandeja, así como el bloque de soporte y el soporte de elevación del cartucho pueden ser extraídos por el cliente, sin herramientas, para su limpieza y reinstalación fácilmente.

Módulo calefactor de PCR microfluídica:

[000344] El módulo calefactor de PCR microfluídico comprende una oblea de vidrio con microcalentadores y sensores definidos fotolitográficamente para proporcionar calor con precisión para el accionamiento de válvulas y realizar el termociclado requerido para realizar una reacción de PCR en tiempo real. La superficie de la oblea tiene zonas de calentamiento controladas individualmente para cada uno de los carriles de PCR en el cartucho microfluídico. Para un cartucho de 12 canales, hay 12 zonas de PCR y el cartucho de 24 canales, hay 24 zonas de calentamiento de PCR. Los calentadores y sensores individuales están conectados eléctricamente a una placa de circuito impreso utilizando enlaces de alambre de oro o aluminio. Un encapsulante térmicamente compatible proporciona protección física a las uniones de alambre. Mientras que el presente dispositivo se fabrica en oblea de vidrio, los calentadores pueden fabricarse en obleas de Si-on-Glass y otros sustratos poliméricos. Cada sustrato puede tener ventajas específicas relacionadas con sus propiedades térmicas y mecánicas. Además de utilizar el procedimiento de fotolitografía, tales sustratos de calentamiento también pueden ensamblarse usando componentes electrónicos listos para usar tales como resistencias de potencia, peltiers, transistores, manteniendo la superficie de calentamiento superior de cada uno de los componentes para que esté en el mismo nivel para proporcionar calentamiento a un cartucho microfluídico. Los valores de calibración de temperatura para cada sensor de temperatura pueden almacenarse en una EEPROM u otros dispositivos de memoria colocados en la placa de circuito impreso del calentador.

Cartucho de 12 carriles:

[000345] Este cartucho de 12 canales es el mismo diseño básico que se describe en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º de serie 60/859.284, presentada el 14 de noviembre de 2006, con las siguientes modificaciones: aumentar el volumen de PCR de 2 ml a 4,5 ml, lo que lleva a un aumento en el volumen de entrada de 4 ml a 6 ml. Los orificios de entrada se mueven a pocos milímetros del borde del cartucho para dejar espacio para un saliente de alineación de 2 mm en el cartucho. Una repisa de alineación similar también se incluye en el otro borde del cartucho. (figuras 31A, 31B)

Recinto:

[000346] El diseño del recinto del aparato debe cumplir con los requisitos: para la seguridad del cliente durante el funcionamiento; proporcionar acceso a las interfaces de alimentación y comunicación; proporcionar entrada, salida y filtrado de aire; facilitar la apertura de la instalación y la retirada de materiales con una sola mano; incorporar una estética comercializable.

Enfriamiento:

[000347] El enfriamiento del aparato se diseñará junto con el recinto y el sistema general para garantizar que todos los conjuntos que requieren aire estén dentro de la vía de flujo o reciban aire desviado.

[000348] El concepto actual es que la entrada de aire se ubique en la parte inferior del panel frontal inferior. El aire pasará a través de un filtro que puede limpiarse antes de entrar en el aparato. Los componentes de chapa metálica dirigirán el aire tanto a los portaobjetos desechables como a la fuente de alimentación principal. El aire se dirigirá a través de las jaulas de tarjetas, alrededor de los lectores y saldrá a través de las ranuras proporcionadas en la parte superior del recinto.

Placa de base

[000349] La etapa y el marco XYZ están montados en la placa base de manera que no haya desalineación entre la etapa, el cartucho y el desechable. El alojamiento está montado en la placa base. El diseño final del alojamiento determina el patrón de orificio del perno para el montaje. La placa posterior se monta en la placa base con separadores. Todas las demás tablas se montan en la placa posterior. Los soportes desechables se montan en un portaobjetos que será extraíble de los soportes montados en la placa base. Los soportes del lector se atornillan a la placa base. El diseño final de los soportes del lector determina el patrón del orificio del perno. La fuente de alimentación se monta en la placa base. La placa base se extiende a lo ancho y longitudinalmente debajo de todo el instrumento.

Ejemplo 12: Aparatos de diagnóstico de alta eficiencia ejemplares

[000350] Un ejemplo más altamente multiplexado, también permite que 24 muestras clínicas se procesen automáticamente para purificar ácidos nucleicos, mezclar el ADN/ARN purificado con reactivos de PCR y realizar PCR en tiempo real en un cartucho microfluídico. Este producto tiene un solo lector de PCR, con un cabezal de lectura de escaneo, capaz de leer hasta 4 colores diferentes de cada uno de los carriles de PCR. El cartucho tiene 24 canales de PCR que permiten que un solo cartucho ejecute las 24 muestras clínicas. Además, este producto tiene un cargador automático de cartuchos, mediante el cual el instrumento alimenta automáticamente el lector de PCR desde un

paquete de cartuchos al instrumento y desecha el cartucho usado en una bandeja de desechos. Los diagramas se muestran en las figuras 73 y 74.

[000351] El aparato tiene los siguientes subsistemas:

- Dos portaobjetos de procesamiento de muestras, cada portaobjetos procesa hasta 12 muestras clínicas en tiras desechables unificadas
- Ensamblaje separador magnético con calentador de tubos (24 estaciones de calefacción)
- Un cabezal dispensador de líquido de cuatro sondas
- Carcasa de 3 ejes para mover el cabezal de la pipeta
- Una sola estación de detección de amplificación de PCR capaz de ejecutar un cartucho microfluídico de 24 carriles y una unidad de escáner para detectar hasta 4 colores desde cada carril de PCR.
- Una unidad de carga automática para alimentar el cartucho microfluídico de 24 carriles de una caja a la unidad de detección de PCR.
- Sistema electrónico de control 1 Lector de código de barras

[000352] Operación: El usuario obtendrá una lista de trabajo para cada muestra, si desea detectar cierto analito diana (como GBS, clamidia, gonorrea, HSV) para cada muestra clínica. Los tubos de muestra se colocan en el portaobjetos y, para cada muestra, el usuario desliza un reactivo unificado desechable (específico del analito) en el carril correspondiente del portaobjetos. El desechable unificado tendrá todos los reactivos de preparación de muestras, reactivos de PCR, tubos de procesamiento, así como pipetas desechables ya preenvasadas en él. Una vez que todos los elementos desechables se cargan en el portaobjetos, el portaobjetos se coloca en su ubicación en el instrumento. El usuario cierra la puerta del instrumento y a continuación inicia el procesamiento de la muestra utilizando la GUI (interfaz gráfica de usuario).

[000353] El instrumento verifica la funcionalidad de todos los subsistemas y a continuación lee el código de barras de los tubos de muestra, los reactivos desechables unificados y la presencia de un cartucho microfluídico de 24 carriles. Se determina cualquier desajuste con una lista de trabajo preexistente y los errores se marcan, si es necesario. El instrumento que pasa por una serie de procesamiento de líquido, calentamiento, separación magnética para completar las etapas de preparación de la muestra para cada una de la muestra clínica, mezcla el ácido nucleico purificado con reactivos de PCR y dispensa la mezcla final en un carril de un cartucho microfluídico de 24 carriles. Después de que el cartucho microfluídico se carga con la mezcla de PCR final, el cartucho se mueve y se alinea mediante un empujador motorizado automatizado en el lector de PCR. El sistema de detección óptica, a continuación presiona el cartucho contra una superficie del calentador de PCR microfluídico. Las válvulas en chip se accionan para cerrar la mezcla de reacción y a continuación se inicia el termociclado para iniciar la reacción de PCR. En cada ciclo de PCR (hasta 45 ciclos), el sistema de detección óptica detecta la fluorescencia de cada carril de PCR (2 colores por carril de PCR) y el resultado final se determina en función del ciclo umbral (Ct). El cartucho usado se empuja automáticamente a un contenedor de cartuchos de desecho.

[000354] Los cartuchos microfluídicos se almacenan en un paquete de cartuchos (máximo 24 cartuchos) y el instrumento alerta al usuario para que reemplace el paquete de cartuchos y vacíe el contenedor de cartuchos de desecho una vez que todos los cartuchos del paquete se hayan agotado.

Cartucho de 24 carriles

[000355] El cartucho de 24 carriles tiene dos filas de 12 carriles de PCR. Varias vistas se muestran en las figuras. 75 - 77 El cartucho tiene 3 capas, un laminado, un sustrato y una etiqueta. La etiqueta se muestra en dos piezas. Cada carril tiene un puerto de entrada de líquido, que interactúa con una pipeta desechable; una cámara de reacción de PCR de 4 microlitros (1,5 mm de ancho, 300 micrones de profundidad y alrededor de 10 mm de largo), dos microválvulas a cada lado del reactor de PCR y ventilación de salida. Las microválvulas normalmente están abiertas y cierran el canal en el accionamiento. Los orificios de salida permiten que se contenga líquido adicional (~1 ml) en el canal de fluido en caso de que se dispense más de 6 ml de fluido en el cartucho.

[000356] Los orificios de entrada del cartucho tienen forma cónica y tienen un diámetro de 3-6 mm en la parte superior para garantizar que las pipetas puedan deslizarse fácilmente por el cabezal dispensador de fluido dentro del orificio cónico. Una vez que la pipeta se desliza dentro del cono, la forma cónica guía la pipeta y sella mecánicamente para proporcionar una dispensación o extracción de fluido libre de errores en el cartucho. Cuanto más grandes sean los orificios, mejor será alinearlos con la pipeta, sin embargo, debemos maximizar el número de puertos de entrada dentro del ancho del cartucho, así como mantener el paso entre los orificios compatibles con la distancia entre pipetas. En este diseño en particular, la distancia entre pipetas es de 18 mm y la distancia entre los orificios de carga en el cartucho es de 8 mm. Por lo tanto, los carriles 1, 4, 7, 11 se pipetean durante una operación de dispensación; carriles 2, 5, 8 y 12 en el siguiente, y así sucesivamente.

[000357] La altura de los orificios cónicos se mantiene por debajo de la altura de los salientes en el cartucho para

garantizar que los cartuchos se puedan apilar en los cartuchos. Los salientes en los dos bordes largos del cartucho permiten el apilamiento de los cartuchos con un contacto superficial mínimo entre dos cartuchos apilados y también ayudan a guiar el cartucho hacia el interior del lector desde el paquete de cartuchos (véanse las figuras 28 - 33).

Cargador automático de cartuchos

[000358] El cargador automático de cartuchos consiste en un lugar para bloquear positivamente un paquete de 24 cartuchos microfluídicos, previamente apilados en una caja con resorte (por ejemplo, figura 33). La caja tiene elementos estructurales en los lados para permitir el posicionamiento unidireccional y el bloqueo de la caja en el autocargador (figura 33). Para cargar una caja nueva, el usuario mueve un elemento deslizante a la izquierda del autocargador, coloca y empuja la caja en la ranura y libera el bloqueo deslizante para retener la caja en su ubicación correcta. Los resortes cargados en la parte inferior de la caja ayudan a empujar la caja hacia arriba cuando es necesario reemplazarla. El resorte espiral presente en la parte inferior del paquete de cartuchos es empujado contra los cartuchos y es capaz de empujar continuamente el cartucho con una fuerza de 4 a 20 libras.

[000359] La presencia o ausencia de cartuchos se detecta leyendo el código de barras en la parte superior del cartucho, si está presente.

[000360] Para iniciar una ejecución de PCR, el cabezal de pipeta dispensa la mezcla de reacción de PCR en el número requerido de carriles en el cartucho superior en el autocargador (por ejemplo, figura 28). El empujador empuja el cartucho superior desde la caja de autocarga hacia los dos rieles que guían el cartucho hacia el lector de PCR. El cartucho se empuja a la ubicación calibrada debajo del lector y a continuación el bloque óptico se mueve hacia abajo usando un motor a pasos para empujar el cartucho contra la superficie del microcalentador. La parte inferior del bloque óptico (placa de abertura) tiene proyecciones en los lados para permitir que el cartucho se alinee con precisión contra las aberturas. El motor a pasos empuja el cartucho a una posición precalibrada (*por ejemplo,* figura 30) que proporciona una presión de contacto mínima de 1 psi en la superficie de calentamiento del cartucho microfluídico.

[000361] Una vez completada la reacción de PCR, el motor a pasos se aleja 5 a 10 mm del cartucho, alivia la presión de contacto y permite que el cartucho se desplace en sus rieles guía. El empujador se activa y empuja el cartucho hacia el contenedor de desechos del cartucho (*por ejemplo,* figura 32). Después de esta etapa, el empujador regresa a su posición inicial. Durante su recorrido hacia atrás, el empujador puede elevarse por encima de la parte superior del cartucho en el paquete de cartuchos porque tiene un grado angular de libertad (véase la figura). Un resorte de torsión asegura que el empujador regrese a una posición horizontal para permitirle empujar contra el siguiente cartucho en la cola. El empujador está conectado mecánicamente a una correa de distribución. La correa de distribución puede moverse en cualquier dirección girando un motorreductor. El empujador está montado en una disposición deslizante para restringirlo para que se mueva en un solo eje (véase, *por ejemplo,* la figura 31).

[000362] El mecanismo de empuje del cartucho también puede hacerse no solo para empujar el cartucho desde la caja de carga automática a la posición de detección, sino que también se puede usar para moverlo de vuelta a la posición de carga automática. Esto permitirá que los carriles no utilizados en el cartucho microfluídico se utilicen en la próxima ejecución de PCR.

[000363] La caja de carga automática de cartuchos también está diseñada para que, una vez que se usen todos los cartuchos, la caja pueda reciclarse fácilmente o se le agreguen cartuchos nuevos. Esto reduce el costo para el cliente y el fabricante.

Lector

[000364] El lector consiste en una unidad de detección óptica que puede presionarse contra un cartucho microfluídico de 24 carriles para interactuar ópticamente con los carriles de PCR, así como presionar el cartucho contra un sustrato de calentador microfluídico (figura 78). La parte inferior del bloque óptico tiene 24 aberturas (dos filas de 12 aberturas) que es similar en dimensión a los reactores de PCR más cercanos al cartucho. La placa de abertura está hecha de material fluorescente bajo, tal como aluminio negro anodizado y durante el funcionamiento, minimizó la fluorescencia de fondo total mientras maximiza la recolección de fluorescente solo del reactor de PCR (figuras 79A y 79B). La parte inferior de la placa de abertura tiene dos bordes biselados que ayudan a alinear dos bordes de los cartuchos adecuadamente de modo que las aberturas se alineen con los reactores de PCR. (figuras 80, 81)

[000365] Las unidades de detección óptica (un total de 8 unidades de detección) se ensamblan y montan en un riel deslizante dentro de la caja óptica para que las unidades ópticas se puedan escanear sobre las aberturas (figura 82). Cada unidad es capaz de excitar y enfocar una cierta longitud de onda de luz en el reactor de PCR y recoger la fluorescencia emitida de longitud de onda particular en un fotodetector. Utilizando 4 colores diferentes en los 4 canales superiores y repitiendo los 4 colores en los canales inferiores, el escáner completo puede escanear hasta 4 colores de cada uno de los carriles de PCR.

[000366] El bloque óptico puede mecanizarse de aluminio y anodizar o moldear por inyección usando plástico

negro de baja fluorescencia (figura 83). El moldeo por inyección puede reducir drásticamente el coste por unidad y también facilitar el ensamblaje de componentes ópticos. Las unidades diseñadas se pueden apilar una tras otra.

Ejemplo 13: Sistema electrónico ejemplar para su uso con aparatos de preparación y diagnóstico como se describe en esta solicitud

[000367] Hay varios módulos de software independientes que se ejecutan en hardware dedicado: en esta solicitud, se describen ejemplos de especificaciones para los componentes electrónicos utilizados en el sistema de diagnóstico (PCR). En otra parte de esta solicitud, se describe información adicional relacionada con el sistema de PCR. En algunos ejemplos, el sistema de PCR incluye dieciocho placas de circuito impreso (PCB) de nueve tipos diferentes. Con referencia a la figura 86, el sistema puede contener tres placas de multiplexación (MUX) 100a-c, dos de las cuales (placas de microcalentador MUX 100a-b), puede usarse cada una para hacer funcionar una placa de microcalentador 110a-b y la tercera (placa de calentador de lisis MUX 100c) puede hacer funcionar una o más placas de calentador de lisis 116 y 117. Cada una de las tres placas MUX 100a-c puede ser controlada por una placa de procesador de PC a través de un puerto Ethernet. Las dos placas de microcalentador 110a-b, cada una controlada por una de las placas MUX 100a-b, calientan microzonas en el cartucho microfluídico. En algunos ejemplos , el sistema incluye las dos placas de calentamiento de lisis 116 y 117, controladas por la placa de calentamiento de lisis MUX 100C, que calientan los tubos de lisis en cada uno de los dos 12 portaobjetos de muestra.

[000368] Aun con referencia a los PCB incluidos en el sistema de PCR, el sistema puede incluir dos placas de detección óptica de 12 canales 130a-b que pueden detectar cada una fluorescencia óptica emitida por la química del cartucho microfluídico. Las placas de detección óptica pueden controlarse mediante una o más de las placas MUX 100a-c, usando SPI, a través de una interfaz RS-422. El sistema puede incluir tres tableros de control de motor 140a-c, donde un tablero (por ejemplo, tablero de control de motor 140c) puede controlar dos motores de separación magnética (no mostrados), y los dos tableros de control de motor restantes (por ejemplo, tableros de control de motor 140a-b) pueden hacer funcionar cada uno un motor de bandeja de lector (no mostrado) y un motor de presión de lector (no mostrado). La placa de control del motor que hace funcionar los motores de separación magnética (por ejemplo, la placa de control del motor 140c) puede controlarse mediante la interfaz RS-485 desde la placa MUX del calentador de lisis 100c y las dos placas de control del motor 140a-b, cada una con un motor de bandeja de lectura y un motor de presión del lector, puede controlarse mediante la interfaz RS-485 mediante las placas MUX del microcalentador 100a-b. El sistema también puede incluir una placa de procesador de PC 150, que dirige la secuenciación general del sistema y se puede controlar a través de interfaces Ethernet y USB externas, y una placa base de procesador de PC 160, que proporciona interfaces internas para la placa de procesador de PC 150 al resto del sistema y las interfaces externas. El sistema puede incluir un panel posterior principal 180 que interconecta todas las placas del sistema, un panel posterior de control del motor 190 que interconecta las placas de control del motor 140a-c con el panel posterior principal 180 y el brazo (no se muestra), y dos placas de sensor de puerta (no se muestran). Una placa de sensor de puerta proporciona una interconexión entre las cerraduras de solenoide de puerta delantera y la placa base del procesador de PC 160 y la otra placa de sensor de puerta proporciona una interconexión entre los sensores de posición y la placa base del procesador de PC 160.

[000369] En algunos ejemplos, el sistema de PCR puede incluir la placa de procesador de PC comercial 150. La placa de procesador de PC 150 puede ser una placa de factor de forma ETX que incluye un puerto Ethernet BASE-T 10/100, cuatro puertos USB, un puerto de pantalla VGA analógica, dos puertos UART, un reloj en tiempo real, un puerto paralelo, un puerto de teclado PS2, un puerto de ratón PS2, salida de audio estéreo, una interfaz IDE y una interfaz 12C.

[000370] Con referencia a la figura 87, el sistema también puede incluir la placa base del procesador de PC 160 que incluye un puente Ethernet BASE-T de cinco puertos 10/100 161 para la comunicación interna, uno de los cuales puede conectarse al puerto Ethernet BASE T 10/100 de la placa del procesador de PC 150, otro de los cuales puede ser para uso de diagnóstico (con un conector dentro de la cubierta del sistema), y tres de los cuales pueden comunicarse con las tres placas MUX 100a-c (un puerto para cada placa MUX 100a-c) a través del panel posterior 180. La placa base del procesador de PC 160 también puede incluir un puerto Ethernet de USB a 10/100 BASE-T 162 para conexiones Ethernet externas, un concentrador USB de cuatro puertos 163 para conexiones externas, un conector VGA externo 164, un conector interno de ratón PS2 165 (con un conector dentro de la cubierta del sistema) y un conector interno de teclado PS2 166 (con un conector dentro de la cubierta del sistema. La placa base del procesador de PC 160 también puede incluir una salida de audio estéreo interno 167 a los altavoces integrados 168, un conector CompactFlash interno 169 desde un puerto IDE (con un conector dentro de la cubierta del sistema) y una interfaz RS-232 interna 170 desde un puerto UART (con un conector dentro de la cubierta del sistema). Los componentes adicionales incluidos en la placa base del procesador de PC pueden incluir una interfaz RS-485 interna 171 de un puerto UART (con un conector dentro de la cubierta del sistema), un sensor de temperatura interna 172 conectado a la interfaz 12C, una batería para el reloj en tiempo real y un puerto paralelo 173. El puerto paralelo 173, con conectores dentro de la cubierta del sistema, puede conectarse internamente de la siguiente manera: se puede usar un bit para accionar un interruptor lateral bajo de alta corriente para los dos solenoides de puerta, se puede usar un bit para generar una interrupción del procesador cuando cualquiera de los sensores de puerta indica que una puerta está abierta, se pueden usar tres bits para programar la EEPROM para configurar el puente Ethernet 161, y se pueden

conectar dos bits a la interfaz de gestión del puente Ethernet (no se muestra). Los bits restantes pueden permanecer sin asignar, con resistencias opcionales pull-up y pull-down, y ser llevados a un cabezal de contacto Phoenix de 10 pines.

[000371] Con referencia ahora a la figura 88, en algunos ejemplos, el sistema puede incluir las tres placas MUX 100a-c. Si bien la figura 88 ilustra una placa MUX 100a ejemplar, cada una de las tres placas MUX 100a-c puede incluir una o más de las características descritas a continuación. La placa MUX 100A puede incluir 96 canales de calentamiento controlados por ancho de pulso modulado (PWM) con calentadores (de alrededor de 33 ohmios a alrededor de 150 ohmios), que pueden soportar accionamientos de 20 o 24 voltios (voltaje proporcionado externamente) con una corriente máxima de alrededor de 800 mA. Cada PWM puede ser de 12 bits con puntos de inicio y parada programables, puede tener una resolución de 1 microsegundo y puede tener un ciclo de trabajo máximo de alrededor del 75%. Cada período de PWM es programable y se establece preferentemente en 4 ms. Las placas MUX pueden incluir una conexión RTD/calentador de 4 hilos con corriente de detección de precisión de 1 mA que puede alojar alrededor de 50 ohmios a alrededor de 2500 ohmios de dispositivos de temperatura resistiva y tienen una precisión de medición de +/- 0,5 ohmios. El período de muestra de medición térmica de las placas MUX es de 32 ms, incluidos 8 períodos PWM donde 12 ADC de 16 bits 101a muestran 8 canales sucesivos cada uno. La dirección MUX se puede etiquetar en los datos ADC.

[000372] Aún con referencia a la placa MUX 100a representada en la figura 88, se puede incluir una interfaz de placa óptica RS-422 102a que se interconecta a través del panel posterior 180 y transfiere datos a través de una interfaz SPI de 4 hilos usando señales e interrupciones de establecimiento de comunicación locales en la placa MUX 100a. La placa MUX 100a también puede incluir una interfaz Ethernet 10/100 BASE-T 103a que se interconecta al sistema a través del panel posterior 180 y una interfaz RS-485 104a que se interconecta al controlador del motor 140a a través del panel posterior 180.

[000373] Con referencia ahora a la figura 89, en algunos ejemplos, el sistema puede incluir las placas de detección óptica 130a-b. Si bien la figura 89 ilustra una placa de detección óptica 130a ejemplar, cada una de las placas de detección óptica 130a-b puede incluir una o más de las características descritas a continuación. La placa de detección óptica 130a puede incluir un diseño de placa óptica de 12 canales modificado para utilizar una interfaz RS-422 131a. La placa de detección óptica 130a puede incluir 12 - 3 vatios, LED azules 132a accionados con alrededor de 6 V a un máximo de alrededor de 625 mA. Un LED ejemplar utilizado en la placa de detección 130a es el emisor Luxeon K2 que produce luz azul a una longitud de onda de alrededor de 470 nm utilizando alrededor de 27 mW a 700 mA. La placa de detección óptica 130a también puede incluir 12 - 3 vatios, LED ámbar 133a accionados con alrededor de 6 V a un máximo de alrededor de 625 mA. Un LED ejemplar utilizado en la placa de detección 130a es el emisor Luxeon K2 que produce luz ámbar a una longitud de onda de alrededor de 590 nm utilizando alrededor de 60 mW a 700 mA. La placa de detección 130a puede incluir 24 detectores de fotodiodos de silicio con lente 134a, un ejemplo de los cuales es el Hamamatsu S2386-18L. Estos detectores de fotodiodos 134a están diseñados en un paquete TO-18 común. La placa de detección 130a también puede incluir un procesador MSP430 135a con dos canales PWM, uno para el canal azul y otro para el canal ámbar. La placa 130a puede incluir LED individuales que permiten 136a y 137a para cada uno de los 12 pares de colores configurados sobre el bus SPI local.

[000374] El sistema de PCR puede incluir una placa calentadora de lisis que proporciona y monitoriza el calentamiento a los tubos de lisis. La placa calentadora puede incluir resistencias de potencia TO-247 de 12 a 70 vatios (proporcionar calor a los tubos de lisis) diseñadas para alimentarse 24 V desde una o más de las placas MUX 100A-c (por ejemplo, placa MUX 100C) y dispositivos de temperatura resistiva (RTD) de 12 - 2000 ohmios para monitorizar la temperatura de los tubos de lisis. Se pueden incluir resistencias opcionales para modificar el intervalo de escala completa de los RTD. En la placa calefactora de lisis se incluye una EEPROM en serie que puede contener un número de serie de la placa y puede usarse para identificar el tipo de placa y el nivel de revisión del software.

[000375] Con referencia ahora a la figura 90, en algunos ejemplos, el sistema puede incluir las placas de microcalentador 110a-b. Si bien la figura 90 ilustra una placa de microcalentador 110a ejemplar, cada una de las placas de microcalentador 110a-b puede incluir una o más de las características descritas a continuación. En algunos ejemplos, el sistema puede incluir la placa de microcalentador 110a que incluye una EEPROM en serie y dos interruptores ópticos. La EEPROM en serie puede contener un número de serie de placa, puede contener datos de calibración de RTD y puede usarse para identificar el tipo de placa y el nivel de revisión del software. Los interruptores ópticos pueden usarse para detectar la posición de la bandeja del lector para la placa de control del motor 140a y envían la información a los Blue Cobra (controladores del motor), que procesa la información sobre las posiciones de las bandejas del lector y, en consecuencia, controla la energía a los emisores suministrados por la placa de control del motor 140a. La placa de microcalentador 110a puede proporcionar conexiones a la placa de microcalentador de 96 canales y controlar los 96 dispositivos de calentamiento/RTD multiplexados para controlar la temperatura de la característica de cartucho. Los dispositivos de calentamiento/RTD pueden estar entre alrededor de 50 ohmios y alrededor de 500 ohmios. La placa de microcalentamiento 110a puede conectar la interfaz RS-422 desde, por ejemplo, la placa MUX 100a a la placa de detección óptica 130a. La conexión desde la placa de microcalentador 110a a la placa MUX 100a está sobre el panel posterior 180, mientras que la conexión a la placa óptica 130a está sobre un cable FFC de 40 pines.

[000376] Con referencia ahora a la figura 91, en algunos ejemplos, el sistema puede incluir las placas de control del motor 140a-c. Si bien la figura 91 ilustra un ejemplo de placa de control del motor 140a, cada una de las placas de control del motor 140a-c puede incluir una o más de las características descritas a continuación. En algunos ejemplos, el sistema puede incluir la placa de control del motor 140a que puede controlar dos motores microescalonados 141a y puede conectarse al panel posterior 180 a través de una interfaz RS-485. La salida a los motores puede ser de hasta 24 V suministrada externamente a través del panel posterior 180. La corriente de salida puede ser seleccionable por puente. Las corrientes de salida ejemplares que pueden seleccionarse mediante ajustes de puente pueden incluir alrededor de 700 mA, alrededor de 1,0 A o 2,3 A. La placa de control del motor 140a incluye una salida de interrupción de TTL de colector abierto a la placa MUX 100a y entradas de indicadores. Las entradas de indicadores pueden proporcionar una salida de potencia de 1,5 V a los sensores y se pueden encender y apagar mediante software.

[000377] Los interruptores de límite se colocan en las ubicaciones extremas de cada eje, por ejemplo, x-mínimo y x-máximo, que apaga la energía al accionamiento del motor en caso de que ocurra un mal funcionamiento del eje y el cabezal de la pipeta se mueva fuera de la distancia de trabajo diseñada. Las opciones pull-up y pull-down se usan con la salida de los interruptores ópticos.)

[000378] En algunos ejemplos, el sistema puede incluir una o más placas de interconexión, tal como el panel posterior principal 180. El panel posterior principal 180 puede interconectar otras PCB, tales como las placas MUX 100A-C, la placa base del procesador de PC 160 y las placas de interconexión del calentador. El panel posterior principal 180 puede cablearse al panel posterior de control del motor 190 y a dos placas calentadoras de lisis. El panel posterior principal 180 puede distribuir energía y señalización, implementar 10/100 BASE-T Ethernet y RS-485 sobre el panel posterior 180, y suministra voltajes desde un conector externo. Los ejemplos de voltajes suministrados incluyen +3,3 V, +5,0 V, +12,0 V, -12,0 V, +20,0 V y +24,0 V.

[000379] El sistema puede incluir el panel posterior de control del motor 190 que puede distribuir energía y señalización para todos los tableros de control del motor 140A-C. El panel posterior de control del motor 190 puede suministrar +5,0 V y 24,0 V desde un conector externo. El panel posterior de control del motor 190 puede incluir 1 ranura para la señalización RS-485 de cada una de las dos placas MUX 100a-b (total de 2 ranuras), 6 ranuras para la señalización RS-485 del calentador de lisis que controla la placa MUX 100c y un conector que proporciona señalización RS-485 y energía al brazo. El panel posterior de control del motor 190 puede proporcionar resistencias pull-up y pull-down para manejar buses flotantes.

[000380] En algunos ejemplos, el sistema puede incluir una placa de interconexión de calentador y una placa de sensor de puerta. La placa de interconexión del calentador puede conectar las placas de microcalentador 110a-b al panel posterior principal 180 usando solo una interconexión física (por ejemplo, sin circuitos activos). La placa del sensor de puerta puede proporcionar una interfaz de cable y lógica de mezcla desde los interruptores ópticos, que detectan que la puerta está abierta, y proporcionar una interfaz de montaje y cableado al solenoide de bloqueo de puerta.

Ejemplo 14: Software ejemplar para uso con aparatos de preparación y diagnóstico como se describe en esta solicitud

[000381] Hay varios módulos de software independientes que se ejecutan en hardware dedicado:

Lector (2);
Preparación de la muestra (1);
Interfaz de usuario (1);
Detector(2);
Control del motor (8)

[000382] La comunicación entre módulos es a través de un bus Ethernet interno, la comunicación con la interfaz de usuario es a través de un bus SPI de alta velocidad y la comunicación con el control del motor a través de un bus en serie RS485.

[000383] El software Reader y Sample-Prep se ejecutan en hardware idéntico y son idénticos, incorporando las siguientes funciones:

Script Engine (una forma parametrizada de un protocolo)
Motor de protocolo
Control de temperatura (microfluidos, lisis, liberación)
Control del motor (a través de módulos externos de control del motor). Las características destacadas del software de control del motor son:
Comando/respuesta en ASCII y capacidad de direccionamiento para permitir la conexión en serie del enlace de comunicación.

Detección (a través de módulos detectores externos) El módulo detector controla la iluminación LED y la digitalización del fotodetector.

[000384] La interfaz de usuario se implementa como un programa que se ejecuta bajo el sistema operativo Linux en un PC compatible con x86 integrado. Se abordan las siguientes funciones:

Control y monitor de prueba de interfaz gráfica de usuario
Almacenamiento y recuperación de resultados de pruebas Conectividad de red a través de Ethernet (a sistemas de información de laboratorio)
Impresora de interfaz USB
Escáner (interno y externo)
Teclado
Ratón
Bloqueo y detección de la puerta

Ejemplo 15: Química y procedimientos de uso ejemplares

Descripción general de la química:

[000385] El procedimiento químico se centra en la detección e identificación de organismos en una muestra clínica, en virtud de la detección de ácidos nucleicos del organismo en cuestión. Esto implica el aislamiento de ácidos nucleicos de organismos diana que están contenidos en una muestra clínica, seguido de un procedimiento que detectará la presencia de secuencias de ácido nucleico específicas. Además de la detección diana, se agregará un ácido nucleico de control positivo interno al tampón de recolección y se tomará a través de todo el procedimiento de extracción y detección junto con los ácidos nucleicos diana. Este control monitorizará la efectividad de todo el procedimiento y minimizará el riesgo de tener resultados falsos negativos.

Extracción y purificación de ácido nucleico:

[000386] Los procedimientos de extracción de ácido nucleico comienzan con la adición de una muestra clínica a una solución de recolección de muestras preparada. Esto se puede hacer en un sitio de recolección de muestras o en el sitio de prueba. Habrá dos formatos de soluciones de recolección:

uno para fluidos corporales y uno para muestras de hisopos. Las soluciones de recolección utilizadas en los sitios de recolección servirán como soluciones de transporte de muestras y, por lo tanto, esta solución debe mantener la integridad de la muestra y el analito.

[000387] El procedimiento de extracción y purificación, que es totalmente automatizado, procede de la siguiente manera:

Los organismos diana se lisan calentando la solución de recogida que contiene detergente.
Las esferas magnéticas, añadidas a la mezcla de muestra/solución de recolección, unen de forma no específica todo el ADN que se libera en la solución.
Las esferas magnéticas se aíslan y se lavan para eliminar los contaminantes. El ADN se libera de las esferas usando pH alto y calor.
La solución que contiene ADN se retira y neutraliza con un tampón

Amplificación de ácido nucleico:

[000388] Los ácidos nucleicos que han sido capturados por esferas magnéticas, lavados, liberados en pH alto y neutralizados con tampón, se agregan a una mezcla de tampones, sales y enzimas que se han liofilizado en un tubo. La mezcla se rehidrata rápidamente, y a continuación una parte de la solución se carga en un cartucho microfluídico. Luego, el cartucho se carga en el módulo de instrumento de amplificación, que consiste en una unidad de calentamiento capaz de realizar ciclos térmicos y un sistema de detección óptica. La detección de ácidos nucleicos diana procede de la siguiente manera:

El líquido está sellado en una cámara de reacción.
El ciclado térmico rápido se usa para potenciar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se usa para amplificar el ADN diana específico.
El ADN amplificado se vuelve fluorescente y puede ser detectado por sensores ópticos.
Se incorpora una "cola" de sonda fluorescente en cada pieza amplificada de ADN
A una temperatura específica, la sonda adopta una conformación que produce fluorescencia (esto se denomina una reacción de "escorpión", véase la figura 84).
La fluorescencia se detecta y se monitoriza a lo largo de la reacción.

Proceso *de extracción y amplificación/detección:*

[000389] Se han realizado extensos análisis de laboratorio en matraz volumétrico para optimizar la química de extracción de ácido nucleico, que incluye el tampón de recolección, la formulación de tampón de lavado, la formulación de solución de liberación y las mezclas de reactivos de PCR. El procedimiento de extracción totalmente automatizado, seguido de una PCR de 12 canales, fue capaz de proporcionar una sensibilidad muy alta coherentemente con 150 copias/muestra.

[000390] Ejemplos: Clamidia en la orina (50/50); Gonrorrea en la orina; GBS en plasma.

[000391] Varios analitos químicos de detección como Taqman, Scorpion, SYBRg Green funcionan de forma fiable en el cartucho microfluídico.

Fabricación de reactivos

[000392] Se realizaron estudios de viabilidad para determinar si los reactivos de PCR podrían liofilizarse en tubos de PCR además del uso de gránulos liofilizados de 2 ml. Los estudios han indicado que la sensibilidad de las reacciones realizadas utilizando reactivos liofilizados por tubo es equivalente a la de los reactivos húmedos o reactivos de gránulos de 2 ml, por lo que se ha demostrado la viabilidad. Los estudios de estabilidad para este formato indican datos de estabilidad similares. Hemos visto que los gránulos de PCR liofilizados de 2 microlitros son estables hasta 2 años a temperatura ambiente, una vez sellados en atmósfera de nitrógeno.

[000393] Descripción general de la fabricación: La fabricación de los componentes del sistema se puede lograr en HandyLab, Inc., Ann Arbor, MI. La tarea de fabricación se ha dividido en cinco áreas que consisten en: fabricación química, tira desechable, kit de recolección, cartucho y analizador.

[000394] Fabricación de productos químicos: Actualmente hay siete componentes químicos individuales mezclados identificados para su posible uso con el sistema descrito en esta solicitud. La mezcla, mezcla y procesamiento de reactivos/productos químicos se puede realizar en HandyLab, Inc., con el equipo existente ya en su lugar. Serán necesarias herramientas y accesorios adicionales a medida que el producto madure y aumentemos la producción a alto volumen, pero los costos iniciales serán mínimos.

[000395] El tampón de recolección y los líquidos de lavado, liberación y neutralización son recetas simples con muy bajo riesgo, y se pueden hacer en grandes lotes para mantener los costos de mano de obra de mezcla/mezlcado en o por debajo de las proyecciones objetivo. Se mezclarán y colocarán en contenedores intermedios para su almacenamiento, y a continuación se emitirán para la fabricación de tiras desechables para su dispensación. Los PNT definitivos se implementan a partir de la actividad de proyecto anterior.

[000396] Las esferas de afinidad (AB) tienen un buen potencial para ser almacenadas y utilizadas como líquido en la tira, pero las contingencias de diseño para el uso de un sedimiento liofilizado están en su lugar como respaldo. Es fundamental mantener las esferas suspendidas en solución durante la dispensación. El equipo dispensador (por ejemplo, fabricado por Innovadyne) que proporciona agitación para la suspensión continua durante la dispensación se ha identificado para su compra una vez que se ha demostrado la estabilidad para el almacenamiento de AB líquido en la tira. El procedimiento para fabricar y magnetizar las esferas de afinidad abarca un tiempo de ciclo de 9 horas para producir un lote de 2000 alícuotas, pero ese mismo período de tiempo se puede utilizar para lotes de recetas ampliados una vez que pasemos a la producción de alto volumen. Este artículo tiene el mayor contenido de mano de obra de toda la fabricación de productos químicos que se requiere actualmente para el aparato.

[000397] Los reactivos/enzimas de PCR se liofilizarán en nuestra cámara liofilizante existente (Virtis Genesis), pero no requerirá la formación de sedimentos esféricos. En cambio, la mezcla se dispensa en, y a continuación se liofiliza, dentro del tubo de uso final. Primero se mezclan los analitos químicos según los PNT establecidos, y a continuación se realizan los siguientes etapas para lograr la liofilización: Los tubos individuales se colocan en un portaobjetos/accesorio, y la solución se dispensa en cada uno, utilizando el equipo existente (EFD Ultra Dispense Station.). El portaobjetos lleno se colocará dentro de una caja hermética de acero inoxidable (modificada para aceptar tapones en la tapa) y a continuación se colocará en la cámara de liofilización y el ciclo de secado comenzará sin supervisión. Durante la liofilización, los tapones están en una posición elevada que permite que el aire/nitrógeno circule hacia y que la humedad salga de la caja de acero inoxidable que sostiene los portaobjetos de los viales. Al final del ciclo, los estantes de nuestra cámara de liofilización bajan para asentar los topes en la tapa, formando un sello mientras todavía está dentro de la cámara cerrada, en una atmósfera de nitrógeno libre de humedad. Las cajas de acero se retiran de la cámara, y cada portaobjetos interior se procesará en una sola operación para sellar todos los viales en ese portaobjetos. Inmediatamente después del sellado, los viales se troquelarán de la lámina en una sola operación, permitiendo que los viales individuales se envíen al área de fabricación desechable para su colocación en una tira. El control interno se agregará a una solución existente o se dispensará en su propia cavidad de la misma manera que el tampón de recolección, las soluciones de lavado, neutralización y liberación. Si se requiere liofilización, se realizará de la misma manera que la química de PCR, y a continuación se encajará en la tira. Se están realizando estudios de

estabilidad de la vida útil.

Fabricación de kits de recolección

[000398] El kit de recolección se procesará manualmente de manera doméstica para las cantidades iniciales. Las cantidades iniciales no requerirán gastos de capital, ya que tenemos todo el equipo necesario para poder cumplir con las proyecciones hasta 2008. Utilizaremos nuestro equipo existente (EFD 754-SS Aseptic Valve & Valvemate 7000 Digital Controller,) para llenar el vial de recolección. Los viales tienen una tapa giratoria que se torcerá, y el vial tendrá un código de barras de identificación patentado en cada vial. Se colocarán 24 viales en una bolsa de plástico que se puede volver a cerrar y se colocarán en una caja para su envío.

Colocar los viales en el portaobjetos.
Dispensar la solución en viales.
Instalar y apretar las tapas.
Etiquetar los viales.
Embolsar los viales y etiquetar la bolsa.
Colocar la bolsa del vial y las instrucciones/insertar en la caja, cerrar y etiquetar.

Fabricación de cartuchos:

[000399] Los equipos semiautomáticos existentes para laminado y encerado (Think & Tinker DF-4200 y Asymtek Axiom Heated Jet Platform, respectivamente) se utilizarán para cumplir con todos los requisitos de fabricación de cartuchos. La huella del cartucho desechable de 12 canales es la misma que la del cartucho RTalO, por lo que no son necesarios accesorios adicionales.

Laminar el microsustrato y recortar el exceso.
Llenar las válvulas con cera caliente e inspeccionar.
Aplicar etiqueta y código de barras.
Unir las 24 piezas juntas.
Embolsar y sellar los cartuchos con bandas, etiquetar la bolsa.
Colocar la bolsa e insertar en la caja, sellar y etiquetar.

[000400] Esta parte del producto es relativamente simple, aunque hay una diferencia entre el cartucho de 12 canales automatizado (tal como se usa en esta solicitud) y el cartucho de 12 canales independiente. No se requerirá ventilación en el cartucho, lo que elimina el procedimiento que consume más tiempo para la fabricación del cartucho, junto con el mayor riesgo y el mayor costo para la automatización totalmente integrada. Se han producido con éxito más de 1000 piezas del de 12 canales con ventilación.

Ejemplo 16: Ejemplos de procedimientos químicos

Preprocesamiento de muestras

[000401] Para la muestra de orina: Tomar 0,5 ml de orina y mezclarla con 0,5 ml de tampón de recolección HandyLab. Filtrar la muestra a través del prefiltro de HandyLab Inc. (contiene dos membranas de tamaño de poro de 10 micrones y 3 micrones). Colocar el tubo de muestra en la posición especificada para el tubo de muestra externo en el portaobjetos de 12 canales.

[000402] Para la muestra de plasma: Tomar 0,5 ml de plasma y mezclarlo con 0,5 ml de tampón de recolección HandyLab. Colocar el tubo de muestra en la posición especificada para el tubo de muestra externo en el portaobjetos de 12 canales.

[000403] Para muestras de hisopos de GBS: Tomar la muestra de hisopo y sumergirla en 1 ml de tampón de recolección HandyLab. Colocar el tubo de muestra en la posición especificada para el tubo de muestra externo en el portaobjetos de 12 canales.

[000404] El tampón de recolección de muestras HandyLab contiene Tris 50 mM pH 7, Triton X-100 al 1%, citrato 20 mM, borato 20 mM, EDTA 100 mM, más 1000 copias de ADN de control positivo.

Carga del instrumento e inicio del procesamiento de la muestra

[000405]

1. Cargar el tubo de PCR que contiene la mezcla maestra de PCR en una de las ubicaciones a presión especificadas del desechable unificado.

2. Cargar el tubo de PCR que contiene las sondas y cebadores de PCR para el analito objetivo en consideración en la ubicación especificada del desechable unificado.

3. En caso de dos pruebas de analito, cargar el tubo de PCR que contiene sondas y cebadores para el segundo analito en la ubicación especificada del desechable unificado.

4. Cargar el desechable unificado en el portaobjetos de 12 canales en el mismo carril que el tubo de muestra en consideración.

5. Preparar y cargar las tiras de reactivo unificadas para otras muestras en consideración.

6. Cargar el portaobjetos de 12 canales en una de las ubicaciones del instrumento.

7. Cargar el cartucho de 12 canales en la posición de carga de la bandeja de cartuchos.

8. Comenzar la operación.

Etapas de procesamiento de líquidos

[000406]

1. Usando la punta de pipeta núm. 1, el robot transfiere la muestra clínica desde el tubo de muestra externo al tubo de lisis de la tira desechable unificada.

2. Usando la misma punta de pipeta, el robot toma alrededor de 100 ml de muestra, mezcla la enzima liofilizada y las esferas de afinidad, transfiere los reactivos al tubo de lisis. La mezcla se realiza en el tubo de lisis mediante 5 operaciones de succión y dispensación.

3. El robot coloca la punta de pipeta núm. 1 en su ubicación designada en la tira desechable unificada.

4. Calentar el tubo de lisis a 60 C y mantenerlo durante 10 minutos.

5. Después de 5 minutos de lisis, el robot recoge la punta de la pipeta núm. 1 y mezcla el contenido mediante 3 operaciones de succión y dispensación.

6. El robot coloca la punta de pipeta núm. 1 en su ubicación designada en la tira desechable unificada.

7. Después de 10 minutos de lisis, un imán se mueve por el lado del tubo de lisis a una altura media de la muestra y se mantiene en esa posición durante un minuto para capturar todas las esferas magnéticas contra la pared del tubo.

8. El imán se baja lentamente para deslizar las esferas capturadas cerca de la parte inferior (pero no de la parte inferior) del tubo.

9. Usando la punta de la pipeta núm. 2, aspirar todo el líquido y colocarlo en el tubo de desecho.

10. Aspirar por segunda vez para eliminar la mayor cantidad de líquido posible del tubo de lisis.

11. Usando la misma punta de pipeta núm. 2, retirar 100 ml de tampón de lavado y dispensar en el tubo de lisis. Durante esta dispensación, el imán se mueve hacia abajo, lejos del tubo de lisis.

12. Realizar 15 etapas de mezcla para mezclar completamente las esferas magnéticas con el tampón de lavado.

13. Esperar 30 segundos.

14. Mover el imán hacia arriba para capturar las esferas hacia un lado y sostenerlo durante 15 segundos.

15. Usando la punta de la pipeta núm. 2, aspirar el tampón de lavado dos veces para eliminar la mayor cantidad de líquido posible y volver a colocarlo en el tubo de lavado.

16. Mover el imán hacia abajo lejos del tubo de lisis.

17. Colocar la punta de la pipeta núm. 2 en la ubicación especificada de la tira desechable unificada.

18. Recoger una nueva punta de pipeta (punta núm. 3) y retirar 8-10 ml de tampón de liberación y dispensarlo

sobre las esferas en el tubo de lisis.

19. Esperar 1 minuto y a continuación realizar 45 mezclas.

20. Calentar la solución de liberación a 85 °C y mantener la temperatura durante 5 minutos.

21. Colocar la punta de la pipeta núm. 3 en la ubicación especificada de la tira desechable unificada.

22. Subir el imán por el tubo, capturar todas las esferas contra la pared del tubo y moverlo hacia arriba y lejos de la parte inferior del tubo.

23. Recoger una nueva punta de la pipeta (punta núm. 4) y retirar todo el tampón de liberación del tubo de lisis y a continuación retirar 3 a 10 ml de tampón de neutralización, mezclarlo en la punta de la pipeta y dispensarlo en el tubo de PCR. (En caso de dos detecciones de analitos, dispensar la mitad de la solución de ADN neutralizado en el primer tubo de PCR y el resto de la solución en el segundo tubo de PCR.

24. Usando la punta de la pipeta núm. 4, mezclar el ADN neutralizado con los reactivos liofilizados mediante 4 a 5 operaciones de succión y dispensación y retirar toda la solución en la punta de la pipeta.

25. Usando la punta de la pipeta núm. 4, cargar 6 ml de la solución final de PCR en un carril del cartucho de 12 canales.

[000407] El uso de cabezas de pipeta durante varios procedimientos se muestra esquemáticamente en las Figuras 85A-C.

PCR en tiempo real

[000408] Después de que todos los carriles de PCR apropiados del cartucho de PCR se carguen con la solución final de PCR, la bandeja que contiene el cartucho lo mueve en el analizador de PCR. El cartucho es presionado por el cabezal de lectura de detección óptica contra el calentador de PCR. Los calentadores activan las válvulas para cerrar cualquiera de los extremos del reactor de PCR y se inicia el procedimiento de termociclado en tiempo real. Después de completar los ciclos de PCR apropiados (-45 ciclos), el analizador decide si la muestra tiene el ADN diana basado en los datos de fluorescencia de salida.

Detección de pipeta

[000409] El cabezal de la pipeta tiene 4 sensores infrarrojos para detectar la presencia de pipetas. Esto es esencial para garantizar que el ordenador sepa positivamente que hay una pipeta presente o que falta. Dado que las pipetas se recogen mediante forzamiento mecánico contra la pipeta y también se dispensan mediante el movimiento mecánico de una placa eyectora, la detección de la pipeta ayuda a prevenir errores que de otro modo podrían ocurrir.

Detección de fuerza del cabezal de la pipeta

[000410] El cabezal multipipeta se ensambla de tal manera y un sensor de fuerza interactúa con él de modo que cada vez que los asientos del cabezal de pipeta contra la o las pipetas desechables o la o las pipetas recogidas son forzadas a través del laminado en el reactivo desechable o la pipeta es forzada contra la parte inferior de los tubos en el reactivo desechable, una fuerza ascendente actúa sobre el cabezal de pipeta a través de la boquilla de sujeción de la pipeta o las propias pipetas. Todo el cabezal está girado, como se muestra en la figura, y cualquier fuerza que actúa sobre el cabezal hace que un tornillo de ajuste en la parte superior del cabezal presione contra un sensor de fuerza. Este sensor de fuerza está calibrado para el desplazamiento vertical del cabezal contra una superficie no móvil. Utilizando esta calibración, se puede determinar cuándo dejar de mover el cabezal en la dirección z para detectar si las pipetas están correctamente asentadas o si las pipetas golpean los fondos del tubo.

Alineación de puntas de pipeta durante la carga de reactivos de PCR en el cartucho microfluídico

[000411] Las pipetas utilizadas en el aparato pueden tener volúmenes tan pequeños como 10 ml hasta tan grandes como 1 ml. Las pipetas de mayor volumen pueden ser de hasta 95 mm (pipeta p 1000). Cuando se sacan 4 puntas de pipeta largas del cabezal, incluso una desalineación de 1° durante el asiento puede hacer que la punta esté descentrada 1,7 mm. Como es imposible tener una alineación perfecta de la punta tanto en la parte superior donde está interconectada con el soporte de la punta como en la parte inferior, se hace necesario restringir mecánicamente todas las puntas en otra ubicación más cercana a la parte inferior. Hemos utilizado la placa separadora, que tiene una estructura de orificio definida para usarla para alinear todas las puntas. El orificio de la placa del separador limpia todas las 4 puntas de la pipeta cuando se recogen. Después de que las puntas están correctamente asentadas, la placa del separador se mueve en el eje x utilizando un motor para mover todas las pipetas contra la muesca provista en la placa del separador (véase la Figura 46B). Ahora todas las pipetas caen en los orificios de entrada del cartucho con facilidad.

Extensiones de preparación de muestras

[000412] La tecnología actual describe detalles del procesamiento de muestras clínicas para extraer polinucleótidos (ADN/ARN). La misma plataforma de producto se puede extender para procesar muestras para extraer proteínas y otras macromoléculas cambiando las moléculas de afinidad presentes en las esferas magnéticas. La plataforma de detección de amplificación también puede usarse para realizar otras reacciones enzimáticas, tales como inmunoPCR, PCR de transcriptasa inversa, TMA, SDA, NASBA, LAMP, LCR, reacciones de secuenciación, etc. La preparación de muestras también puede utilizarse para preparar muestras para detecciones de micromatrices altamente multiplexadas.

Ejemplo 16: Material ejemplar para matriz de afinidad de ARN

[000413] Un ejemplo de material de captura de polinucleótidos preferentemente retiene polinucleótidos tales como ARN en su superficie cuando se pone en contacto con un medio líquido que contiene polinucleótidos mezclados con otras especies tales como proteínas y péptidos que podrían inhibir la detección o amplificación posterior de los polinucleótidos.

[000414] El material de captura de polinucleótidos ejemplar es: Poliamidoamina (PAMAM) Generación 0, disponible en la Sigma-Aldrich Chemical Company ("Sigma-Aldrich"), número de producto 412368. PAMAM es un dendrímero cuyas moléculas contienen una mezcla de grupos amina primarios y terciarios. PAMAM (Generación 0) tiene la estructura que se muestra en esta solicitud.

[000415] El PAMAM, durante el uso, se inmoviliza en un soporte sólido, tal como esferas carboxiladas o esferas magnéticas. El material de captura de polinucleótidos comprende moléculas policatiónicas durante una operación de captura de polinucleótidos. La afinidad entre el material y los polinucleótidos es alta porque los polinucleótidos tales como ADN y ARN típicamente comprenden polianiones en solución.

[000416] Después de que las moléculas de polinucleótidos se capturan en una superficie del material y los inhibidores restantes y otros compuestos en solución se han irrigado con una solución tamponadora alcalina, tal como Tris 0,1 mM acuoso (pH 8,0), los polinucleótidos pueden liberarse de la superficie del material, por ejemplo, lavando el material con un segundo tampón más alcalino, tal como Tris que tiene un pH de 9,0.

[000417] Los protocolos ejemplares para el uso de PAMAM en pruebas de ácido nucleico se encuentran en la solicitud de patente estadounidense n .º de serie 12/172.214 presentada el 11 de julio de 2008.

Ejemplo 17: Material ejemplar para la matriz de afinidad de ADN

[000418] El material de captura de polinucleótidos ejemplar es: Polietilenimina (PEI), disponible en la Sigma-Aldrich Chemical Company ("Sigma-Aldrich"), número de producto 408719.

[000419] Los protocolos ejemplares para el uso de PEI en pruebas de ácido nucleico se encuentran en la solicitud de patente estadounidense n .º de serie 12/172.208 presentada el 11 de julio de 2008.

Ejemplo 18: Aparato ejemplar

[000420] en esta solicitud se describen ejemplos de especificaciones para el diseño mecánico del sistema de PCR. En algunos ejemplos, el sistema puede tener alrededor de 28,5 pulgadas de profundidad (alrededor de 72 cm), o menos, y alrededor de 43 pulgadas (alrededor de 109 cm) de anchura, o menos, y pesar alrededor de 250 libras (alrededor de 113 kg) o menos. El sistema puede diseñarse con una vida útil de alrededor de 5 años (por ejemplo, suponiendo 16,000 pruebas por año) y puede diseñarse de tal manera que el nivel de sonido para este instrumento (durante el funcionamiento) no exceda los 50 dB medidos a 12 pulgadas (alrededor de 30 cm) del instrumento en todas las direcciones de la ordenada. En algunos ejemplos, el exterior del sistema puede ser blanco con textura.

[000421] Con referencia al sistema general, en algunas realizaciones, los componentes críticos del sistema pueden permanecer ortogonales o paralelos (según corresponda) hasta dentro de 0,04 grados. Los ejemplos de componentes críticos pueden incluir rieles de movimiento, pipetas, boquillas (por ejemplo, axialmente como boquillas individuales, linealmente como una matriz de cuatro centroides de boquilla o similares), calentadores de lisis, bordes principales del soporte de cartucho instalado en el cajón de lectura, la cara frontal de los imanes de separación y similares. En las siguientes descripciones, el eje X (o dirección X) se refiere al eje que se extiende de izquierda a derecha cuando se encuentra frente al frente del sistema, el eje Y (o dirección Y) se refiere al eje que se extiende de atrás hacia adelante cuando se encuentra frente al frente del sistema, y el eje Z (o dirección Z) se refiere al eje que se extiende hacia arriba desde la parte inferior cuando se encuentra frente al frente del sistema. Como se ve desde la parte superior del instrumento, el centroide de la boquilla de pipeta más a la izquierda en la carga activa Z (como se ve desde la parte delantera del instrumento) puede ser capaz de viajar sin obstáculos en la dirección X desde un punto

a 80 mm desde el borde más exterior de la placa base izquierda hasta un punto a 608 mm desde el borde más exterior de la placa base izquierda y puede ser capaz de viajar sin obstáculos en la dirección Y desde un punto a 60 mm desde el borde más exterior de la placa base delantera hasta un punto a 410 mm desde el borde más exterior de la placa base delantera.

[000422] Aún con referencia al sistema, visto desde la parte frontal del instrumento, la cara más inferior de las boquillas de pipeta en la carga activa Z puede ser capaz de desplazarse sin obstrucciones en la dirección Y desde un punto 156 mm por encima de la superficie superior de la placa base hasta un punto 256 mm por encima de la superficie superior de la placa base. Las puntas de pipeta de 1 ml pueden penetrar en las cubiertas de aluminio incluidas en las tiras de reactivos desechables. Esta penetración no puede crear contaminación, afectar los analitos químicos asociados o dañar las puntas de la pipeta. Los movimientos se pueden ejecutar de tal manera que se elimine la histéresis mecánica, según sea necesario. Los movimientos del brazo se pueden optimizar para evitar la contaminación entre carriles y el arrastre. El portaobjetos puede alinear las tiras de reactivo a una tolerancia de +/- 0,010 pulgadas (alrededor de +/- 0,25 mm) en las direcciones X e Y.

[000423] Con referencia ahora al brazo, en algunos ejemplos, el compartimento puede consistir en un sistema robótico cartesiano accionado por un motor paso a paso, accionado por correa/tornillo. El brazo puede ser libre de moverse, con o sin accesorios, por encima de los módulos que están por delante de la fachada trasera y por debajo de la cara horizontal más inferior en el cabezal Z, siempre que la carga activa Z esté totalmente retraída. El brazo puede ser capaz de viajar a velocidades de hasta alrededor de 500 mm/s en las direcciones X e Y y hasta alrededor de 100 mm/s en la dirección Z. La precisión y exactitud de los movimientos del eje (por ejemplo, con respecto a los sensores de inicio X, Y y Z) puede ser de 25 mm o mejor para cada eje, y se puede retener durante todo el período de mantenimiento. Las correas de transmisión del eje no pueden dejar desechos en áreas donde se procesan PCR y muestras. El brazo puede contener disposiciones para enrutar sus propios arneses de cableado de carga activa Z y todos los arneses de cableado de carga Z de vuelta al instrumento. La tensión de la banda en los ejes X e Y se puede ajustar a 41,5 +/- 3,5 libras (18,8 +/- 1,6kg).

[000424] Con referencia ahora a la carga de pago Z, el cabezal de fluido puede tener 4 boquillas de fijación de pipeta ubicadas en centros de 24 mm. Las puntas de pipeta ejemplar que las boquillas de pipeta pueden capturar sin fugas incluyen las puntas Biorobotix PN23500048 (50 mL), PN23500049 (1,75 mL) y PN23500046 (1 ml). La carga útil Z puede incorporar una placa separadora accionada de forma gradual capaz de retirar las puntas de pipeta (por ejemplo, las puntas de pipeta descritas anteriormente). El sistema puede incluir un sistema de bomba y colector que incluye aspiración controlada por software, dispensación y ventilación de volúmenes de fluido individuales dentro de cada una de las cuatro puntas individuales y dispensación y ventilación simultáneas en todas las puntas. El sistema de bomba y colector puede tener una precisión y exactitud de alrededor de +/- 2 mL por punta para volúmenes que son inferiores a 20 mL y alrededor de +/- 10% para volúmenes mayores o iguales a 20 mL (por ejemplo, al aspirar o dispensar en puntas individuales). El volumen total de carrera de la bomba puede ser mayor que alrededor de 8 mL y menor que alrededor de 1250 mL. La velocidad mínima de aspiración y dispensación puede ser de alrededor de 10 mL/s a alrededor de 300 mL/seg. El centroide de la cara más inferior de cada punta de pipeta se puede alinear axialmente con el centroide de la boquilla de las boquillas de pipeta dentro de 0,2 mm. Las caras inferiores de la punta de la pipeta pueden ser coplanares dentro de 0,2 mm. La carga activa Z puede incorporar un sensor de fuerza del eje Z capaz de retroalimentar el software para fuerzas aplicadas de entre alrededor de 0 y 4 libras (entre alrededor de 0 y 1,8 kg). La carga activa Z puede incorporar un lector de código de barras orientado hacia abajo capaz de leer los códigos de barras del sistema como se describe en otra parte en esta solicitud.

[000425] Con referencia ahora a los portaobjetos incluidos en el sistema, las tiras de reactivo desechables (por ejemplo, orientadas ortogonalmente a la parte delantera del instrumento) pueden estar contenidas en portaobjetos de 2, 12 carriles. Las 12 tiras de reactivo en un portaobjetos dado pueden registrarse y bloquearse en el portaobjetos tras la inserción por parte de un usuario. El portaobjetos puede contener un área para 12 tubos de lisis de muestra (por ejemplo, PN 23500043) y sostener los fondos del tubo coplanares, lo que permite al usuario orientar el código de barras hacia la parte posterior del instrumento. Ciertas características, incluidas las enumeradas anteriormente, pueden permitir que los portaobjetos sean insertados y orientados en el instrumento por un usuario mínimamente capacitado. La colocación adecuada del portaobjetos puede confirmarse mediante la retroalimentación al software. En algunos ejemplos, los portaobjetos pueden ser negros y permanentes (por ejemplo, el color puede no degradarse apreciablemente con el uso o lavado con una solución de lejía al 10%) y el material del portaobjetos puede ser dimensionalmente estable dentro de 0,1 mm sobre el intervalo de temperatura de funcionamiento del sistema. El portaobjetos puede diseñarse con provisiones para permitir que el portaobjetos se pueda llevar hacia y desde el instrumento y para minimizar o eliminar la probabilidad de que los tubos sostenidos por el portaobjetos se derramen cuando se colocan en una superficie plana.

[000426] Con referencia ahora al lector y calentador de PCR incluido en el sistema, el lector puede permitir la inserción y extracción de cartucho por, por ejemplo, un usuario mínimamente capacitado. El cartucho puede permanecer asentado en el lector durante el funcionamiento del sistema. En algunos ejemplos, el escáner de código de barras puede no leer correctamente el código de barras del cartucho si el cartucho se inserta incorrectamente (por ejemplo, boca abajo o hacia atrás), por lo tanto, el sistema puede indicar a un usuario que vuelva a insertar

correctamente el cartucho en la bandeja del lector cuando el cartucho se inserta incorrectamente. El cajón del lector puede localizar repetidamente el cartucho, para la carga por las puntas de la pipeta, dentro de 0,5 mm. El lector puede suministrar el cartucho desde la posición de carga a una posición de reacción y detección por medio de un mecanismo de cajón automatizado bajo control de software. Los carriles de PCR del cartucho se pueden alinear, tanto con el sistema óptico como con el calentador, mediante la bandeja del lector y el mecanismo del cajón. El cartucho puede entrar en contacto con los calentadores de forma uniforme con una presión media de alrededor de 1 psi (alrededor de 7000 Pa), o mayor, en las áreas de los canales de PCR y las válvulas de cera. Las uniones de alambre del calentador pueden protegerse de daños para no interferir con el movimiento del sistema. El registro desde el calentador hasta el cartucho y desde el cartucho hasta los centros de trayectoria óptica puede estar dentro de +/- 0,010 pulgadas (alrededor de +/- 0,25 mm). El lector puede realizar un ciclo mecánico de un mínimo de alrededor de 80.000 movimientos sin fallar.

[000427] Con referencia ahora al uno o más calentadores de lisis incluidos en el sistema, los calentadores para cada una de las 24 estaciones de lisis pueden controlarse individualmente por software. Los tiempos de aumento de temperatura de lisis (por ejemplo, el tiempo que tarda el agua en un tubo de lisis en elevarse de una temperatura de alrededor de 2,5 °C a una temperatura dada) pueden ser inferiores a 120 segundos para un aumento a 50 °C y inferiores a 300 segundos para un aumento a 75 °C. La temperatura de lisis (por ejemplo, tal como se mide en el agua contenida en un tubo de lisis) puede mantenerse, mediante los calentadores de lisis, dentro de +/- 3 °C de la temperatura deseada. El intervalo de temperatura de lisis accesible puede ser de alrededor de 40 °C a alrededor de 82 °C. Cada uno de los calentadores de lisis puede extraer alrededor de 16 vatios o más de energía cuando está en funcionamiento. El calentador de lisis puede diseñarse para maximizar la transferencia térmica al tubo de lisis y también acomodar las tolerancias de las piezas. Los calentadores de lisis pueden permitir que los tubos de lisis estén en contacto directo con los imanes (descritos con más detalle en esta solicitud). Los calentadores de lisis pueden ajustarse en el plano horizontal durante el ensamblaje y no pueden interferir con las cubiertas instaladas del sistema.

[000428] Con referencia ahora a los imanes incluidos en el sistema, los mecanismos relacionados con la lisis y el imán pueden caber debajo del portaobjetos y no pueden interferir con la inserción o el registro del portaobjetos. Los imanes pueden ser imanes de alto flujo (por ejemplo, tienen un flujo de alrededor de 1000 gauss, o mayor, medido dentro de un tubo de lisis dado) y pueden moverse una distancia suficiente para lograr la separación magnética de esferas en uno o más de los tubos de lisis llenos a un volumen de 900 mL. Los imanes pueden ser controlables por software a velocidades de movimiento de alrededor de 1 mm/s a alrededor de 25 mm/s. El cableado, incluido como parte de los ensamblajes de calentador y controlador, puede contenerse y protegerse de posibles derrames (por ejemplo, derrames de los tubos de lisis). Los imanes pueden ubicarse a alrededor de 1,25 pulgadas o más de la parte inferior del tubo de lisis cuando no están en uso y pueden retenerse de tal manera que se maximice el contacto con el tubo de lisis al tiempo que se evita el atasco.

[000429] En algunos ejemplos, el alojamiento del sistema incluye una tapa semitransparente (por ejemplo, con accesorios y/o hardware opacos) en la parte delantera del instrumento para permitir que los usuarios vean las funciones del instrumento. La tapa puede incluir un logotipo de la empresa y/o del producto y un mango que se pueda agarrar (por ejemplo, permitiendo que el usuario levante la tapa). Cuando está cerrada, la tapa puede tener una fuerza de apertura no mayor que 15 libras (alrededor de 6,8 kg) (por ejemplo, cuando se mide tangencial a la rotación de la puerta en el centro del borde inferior del mango) y puede bloquearse en la posición abierta (por ejemplo, "arriba") de modo que no se requiera más que alrededor de 5 libras de fuerza (alrededor de 2,3 kg de fuerza) (por ejemplo, aplicada en el mango y tangencial a la rotación de la puerta) para superar el bloqueo del mango y devolver la tapa a la posición cerrada. La tapa puede incluir dos cerraduras de la tapa de seguridad que normalmente se bloquean cuando no se aplica energía y pueden permitir que el sistema monitorice el estado (por ejemplo, abierto o cerrado) de la tapa. La tapa se puede diseñar de tal manera que la tapa no se caiga cuando se encuentre entre las posiciones abierta y cerrada. El alojamiento puede incluir un interruptor de alimentación ubicado en el lado derecho del instrumento. Un cable de alimentación puede sobresalir del alojamiento de tal manera que el posicionamiento del instrumento no dañe los cables ni provoque una desconexión accidental. El recinto puede evitar que el usuario entre en contacto con, por ejemplo, partes móviles, campos magnéticos altos, conexiones eléctricas activas y similares. El recinto puede incluir cuatro pies de soporte, ubicados en la parte inferior del recinto, para proporcionar un espacio libre de alrededor de 0,75 pulgadas (alrededor de 1,9 cm) o más entre la parte inferior del recinto y la parte superior de la mesa. El alojamiento puede incluir un área empotrada con acceso a conexiones de accesorios externos tales como el puerto de visualización, el puerto de Ethernet, los 4 puertos USB y similares.

[000430] Con referencia ahora al subsistema de enfriamiento incluido en el sistema de PCR, se puede proporcionar una entrada de aire en la parte delantera de la unidad y se puede proporcionar un escape de aire en la parte trasera de la parte superior de la unidad. El aire de admisión puede pasar a través de la entrada de aire y a través de un elemento de filtro (por ejemplo, un elemento de filtro extraíble y lavable). El subsistema de enfriamiento puede mantener una temperatura del aire interior (por ejemplo, la temperatura medida en la superficie de las tiras de reactivo, tal como las tiras de reactivo numeradas 1, 12 y 24, en la superficie de los cartuchos de PCR y similares) alrededor de 10 °C mayor o menor que la temperatura del aire ambiente. El subsistema de enfriamiento puede mantener la temperatura interna del aire a o por debajo de alrededor de 32 °C. Uno o más ventiladores de enfriamiento incluidos como parte del subsistema de enfriamiento pueden requerir alrededor de 5,7 vatios, o menos, de energía por

ventilador.

[000431] En algunos ejemplos, el sistema puede incluir cubiertas en subconjuntos internos (con la excepción del brazo). Las cubiertas pueden limpiarse con una solución de lejía al 10% aplicada con un paño suave sin degradación significativa. Las cubiertas pueden suministrar una barrera de seguridad entre un usuario y los conjuntos mecánicos electrónicos y móviles incluidos en el sistema. Las cubiertas de los subconjuntos internos pueden diseñarse para maximizar el enfriamiento de los subconjuntos internos maximizando el flujo de aire debajo de las cubiertas y minimizando el flujo de aire por encima de las cubiertas. Las cubiertas pueden ser desmontables por un técnico de servicio y pueden coincidir con el color y la textura de los recintos.

[000432] En algunos ejemplos, el sistema puede diseñarse para funcionar dentro de un intervalo de temperatura de alrededor de 15 °C a alrededor de 30 °C y en un intervalo de humedad relativa sin condensación (por ejemplo, alrededor de 15% a alrededor de 80% de humedad relativa). El analizador puede diseñarse para funcionar sin daño después de la exposición al almacenamiento a no menos de -20 °C durante 24 horas o menos, almacenamiento a no más de 60 °C durante 24 horas o menos, y/o almacenamiento a alrededor de 50.000 pies o menos (por ejemplo, 3,4 pulgadas de Hg) durante 24 horas o menos. El sistema puede diseñarse con disposiciones para evitar movimientos que puedan dañar el instrumento durante el envío. Puede cumplir con los estándares de envío establecidos en ASTM D 4169-05, DC 12 y puede diseñarse para permitir que la placa base se monte de forma segura en un palé de envío. Los portaobjetos y el recinto del instrumento están diseñados para no degradarse o dañarse por la limpieza diaria con una solución de lejía al 10%. La alimentación de los subconjuntos del sistema se puede suministrar mediante fuentes de alimentación internas. Los ejemplos de fuentes de alimentación pueden recibir, como entrada, alrededor de 1590 vatios a alrededor de 90 a alrededor de 264 Vac a entre alrededor de 47 y alrededor de 63 Hz y suministrar alrededor de 1250 vatios de salida a los subensamblajes.

[000433] En algunos ejemplos, el sistema puede incluir un interruptor de alimentación (por ejemplo, un interruptor tipo balancín), ubicado en el lado derecho del instrumento, uno o más componentes de interfaz y/o uno o más puertos de interfaz. Por ejemplo, el sistema puede incluir un monitor de pantalla LCD que mide 15 pulgadas (alrededor de 38 cm), tiene una resolución de 1280 x 1024 píxeles y un color de 16 bits. El sistema también puede incluir otros monitores de pantalla, como aquellos con mayor tamaño, resolución y/o profundidad de color. La pantalla LCD puede conectarse al sistema a través de una conexión VGA. El sistema puede incluir un ratón USB blanco de 2 botones, un teclado USB blanco, un cable de alimentación SJT negro y una fuente de alimentación ininterrumpida, con retroalimentación a través de USB. El sistema también puede incluir una impresora a color USB, 2 cables USB (por ejemplo, uno para la impresora y otro para el UPS). El sistema puede incluir ejemplos de puertos de interfaz, tales como 4 puertos USB (por ejemplo, para conectarse a un dispositivo apuntador, impresora, teclado, UPS, LIS), 1 puerto VGA (por ejemplo, para conectarse a la pantalla LCD) y 1 puerto DE Ethernet (por ejemplo, para conectividad de PC) ubicado en el lado izquierdo del recinto. Se puede incluir un puerto de alimentación IEC/EN 60320-11C14 en el lado derecho del recinto.

[000434] En algunos ejemplos, el sistema puede incluir características dirigidas a aumentar la seguridad de un usuario. Por ejemplo, pueden incluirse enclavamientos de puerta para evitar el acceso del usuario mientras el brazo está en movimiento y/o mientras otros procedimientos no interrumpibles están en marcha. El sistema puede diseñarse para minimizar o eliminar la presencia de esquinas y/o bordes peligrosos accesibles para el usuario en el instrumento y diseñarse de tal manera que las partes metálicas estén conectadas a tierra eléctricamente correctamente. Las cubiertas de lámina de metal o plástico pueden incluirse sobre los componentes mecánicos y eléctricos según sea necesario para proteger a un usuario de las partes móviles y/o las partes eléctricas activas y para proteger el sistema electrónico y los motores incluidos en el sistema de, por ejemplo, derrames.

Ejemplo 19: Óptica ejemplar

[000435] En esta solicitud, se describen ejemplos de especificaciones relacionadas con el diseño de la óptica utilizada en un analizador y/o sistema de PCR. En otra parte de esta solicitud, se describe información adicional relacionada con el sistema de PCR. El sistema de detección óptica incluido en el sistema de PCR puede ser un sistema de detección de dos colores de 12 carriles para monitorizar la fluorescencia de PCR en tiempo real desde un cartucho de PCR microfluídico de 12 carriles. El sistema puede incluir luces de excitación (por ejemplo, fuentes de luz LED azules y ámbar), uno o más filtros de paso de banda y una o más lentes de enfoque. La luz de fluorescencia emitida desde el reactor de PCR (por ejemplo, incluida en el cartucho microfluídico) se captura a través de una vía en una lente de enfoque, a través de un filtro y en un fotodiodo. En el sistema, para cada carril de PCR, se incluyen elementos ópticos individuales fijos y dedicados para cada uno de los dos colores interrogados.

[000436] En algunos ejemplos, el límite de detección es de 20 copias de ADN por reacción de mezcla de reacción de PCR de entrada con una señal mínima a valor base de 1,15. El sistema de fluorescencia de 2 colores puede usarse, por ejemplo, con FAM (o equivalente) y Cal Red (o equivalente). El sistema puede tener la capacidad de recopilar datos de fluorescencia en alrededor de 100 ms a alrededor de 600 ms a la velocidad máxima de un punto de datos cada alrededor de dos segundos. Al recopilar datos de un carril de PCR, los LED en carriles adyacentes aumentan la señal en el carril que se está muestreando en menos de alrededor de 1% (por ejemplo, 0,5%). El ruido de la detección puede ser inferior a alrededor del 1% de la señal máxima. La variabilidad de fluorescencia de carril a carril con un

estándar de fluorescencia (por ejemplo, pieza núm. 14000009) puede estar dentro de Cv de 30% tanto para FAM como Cal Red, cuando se mide utilizando la pendiente de fluorescencia de corriente oscura corregida. La pendiente de fluorescencia de corriente oscura corregida promedio para el bloque óptico con 12 carriles puede estar entre alrededor de 30 mV y alrededor de 90 mV/(% de potencia LED azul) para FAM utilizando el estándar de fluorescencia (pieza núm. 14000009). La pendiente de fluorescencia de corriente oscura corregida promedio para el bloque óptico con 12 carriles debe estar entre alrededor de 75 mV y alrededor de 300 mV/(% de potencia LED ámbar) para Cal Red utilizando el cartucho de fluorescencia estándar (Pieza núm. 14000009). La potencia de excitación media para cada canal puede variar independientemente por software de alrededor de 5% a alrededor de 100%. Es posible que no haya ninguna fuente de luz activada dentro del lector que afecte la lectura de fluorescencia. En algunas realizaciones, encender o apagar las luces de habitación no afecta a las lecturas ópticas.

[000437] En algunas realizaciones, el sistema puede incluir un bloque óptico con 12 repeticiones de unidades de detección de fluorescencia de 2 colores a un paso de alrededor de 8 mm. El bloque de detección óptica puede colocarse en la parte superior del cartucho microfluídico, con excitación y emisión que se desplazan a través de las ventanas de PCR del cartucho microfluídico. Las aberturas del bloque óptico pueden alinearse con el reactor de PCR dentro de alrededor de +/- 200 micrones. Una placa electrónica óptica que contiene los LED y fotodetectores puede acoplarse al ras con la parte superior del bloque óptico con cada uno de los fotodetectores empotrados en los orificios de su carril óptico correspondiente. Cuando el cartucho microfluídico se instala en el sistema, el bloque óptico puede usarse para suministrar una fuerza de alrededor de 20 a alrededor de 30 lb sobre el área activa del cartucho microfluídico con una presión promedio de al menos alrededor de 1 psi.

[000438] El bloque óptico puede estar hecho de aluminio y las superficies presentes en las longitudes de trayectoria óptica pueden estar anodizadas en negro, por ejemplo, para minimizar la autofluorescencia así como la dispersión de la luz. Una placa de abertura que tiene 12 hendiduras, cada hendidura de alrededor de 10 mm de longitud y 1 mm de ancho, puede utilizarse, por ejemplo, para limitar el tamaño de las manchas de luz de excitación, así como para reducir la fluorescencia de fondo. El espesor del bloque óptico puede ser de alrededor de 1,135 +/- 0,005 pulgadas. La superficie inferior del bloque óptico puede ser plana dentro de +/- 1 mil para proporcionar una presión uniforme sobre el cartucho microfluídico. Las aberturas deben mantenerse limpias y libres de escombros durante la fabricación del bloque óptico y el montaje del bloque óptico en el sistema.

[000439] En algunas realizaciones, el sistema puede incluir óptica de excitación con un ángulo de trayectoria de excitación igual a 55 +/- 0,5 pulgadas (alrededor de 140 +/- 1,3cm) con respecto a la normal de la superficie del cartucho de PCR. Un ejemplo de disposición de elementos ópticos en la trayectoria de excitación, en orden, es una muestra de LED, lente, filtro, abertura y PCR. El sistema puede utilizar una lente de excitación plano-convexa (por ejemplo, PCX, 6 X 9, MgF2TS) orientada con el lado plano hacia la muestra de PCR. En la óptica se incluyen una o más vías de excitación con encintadoras que pueden diseñarse de modo que la lente y el filtro puedan colocarse dentro del orificio para proporcionar una luz más grande que la placa de abertura. La ubicación del LED y la muestra puede fijarse ya que el diseño puede incluir un espesor de bloque óptico fijo disponible. La ubicación de la lente y el filtro puede determinarse para proporcionar un tamaño de punto de excitación de alrededor de 6 mm a lo largo de la longitud de un carril de PCR. La óptica de excitación puede incluir un LED tal como Luxeon Pieza núm LXK2-PB 14-NOO (por ejemplo, para excitación FAM) que incluye una longitud de onda central de alrededor de 470 nm (azul) con una anchura de media banda de alrededor de 75 nanómetros, o menos (por ejemplo, para excitación FAM). La óptica de excitación también puede incluir un LED tal como Luxeon Pieza núm. LXK2-PL12-Q00 (por ejemplo, para excitación Cal Red) que incluye una longitud de onda central de 575 nm (ámbar) con una anchura de banda media de alrededor de 75 nanómetros, o menos (por ejemplo, para excitación Cal Red). Los LED utilizados en la óptica de excitación pueden permanecer estables durante alrededor de 5 años o más o alrededor de 10.000 ciclos.

[000440] El sistema puede incluir ópticas de emisión con un ángulo de trayectoria de emisión igual a alrededor de 15 +/- 0,5 pulgadas (alrededor de 38 +/- 1,3 cm) con respecto a la normal de la superficie del cartucho de PCR. Un ejemplo de disposición de elementos ópticos en la vía de emisión, en orden, es muestra de PCR, abertura, filtro, lente y fotodetector. La lente de emisión puede ser planoconvexa (por ejemplo, PCX, 6 x 6 MgF2TS) con el lado plano hacia los fotodetectores. La óptica de emisión puede incluir uno o más orificios, para la trayectoria de emisión, con reducciones cónicas que pueden diseñarse para maximizar la luz detectada mientras se permite la colocación ajustada de los filtros y lentes. La ubicación de los fotodetectores con respecto a la muestra se puede fijar ya que el diseño puede incluir un espesor de bloque óptico fijo disponible. La ubicación de la lente y el filtro puede determinarse de modo que proporcione un tamaño de punto de emisión de 6 mm a lo largo de la longitud de un carril de PCR. Un ejemplo de fotodetector que se puede usar en la óptica de emisión es el fotodetector de silicio Hamamatsu con lente, S2386-18L.

[000441] En algunas realizaciones, el sistema puede incluir uno o más filtros con diámetros de alrededor de 6,0 +/- 0,1 mm, espesores de alrededor de 6,0 +/- 0,1 mm, aberturas transparentes con diámetros de menos o igual a alrededor de 4 mm. Los filtros pueden incluir un tratamiento de borde ennegrecido realizado antes de la colocación en un anillo de montaje. Si está presente solicitud, el anillo de montaje puede ser de metal y negro anodizado. Los filtros se pueden fabricar a partir de vidrio óptico con una calidad de superficie que cumple con F/F por Mil-C-48497A, un AOI de alrededor de 0 grados, un AOI de 1/2 cono de alrededor de +8 grados, y puede ser estable a humedad y

temperatura dentro del intervalo operativo recomendado del sistema. Se puede obtener un filtro ejemplar de Omega Optical Brattleboro, VT 05301.

[000442] El sistema puede incluir uno o más filtros excitadores FITC (por ejemplo, PN 14000001) con un número de pieza Omega 481AF30-RED-EXC (por ejemplo, dibujo # 2006662) utilizado, por ejemplo, en la excitación FAM. Estos filtros pueden tener una longitud de onda de corte de alrededor de 466 +/- 4 nm y una longitud de onda de corte de alrededor de 496 +0/-4 nm. La transmisión de filtros de este tipo puede ser mayor o igual a alrededor del 65% del pico. Estos filtros pueden tener una eficiencia de bloqueo mayor que o igual a OD4 para longitudes de onda de ultravioleta a alrededor de 439 nm, mayor que o igual a OD4 para longitudes de onda de alrededor de 651 nm a alrededor de 1000 nm, mayor que o igual a OD5 para longitudes de onda de alrededor de 501 nm a alrededor de 650 nm, y mayor que o igual a OD8, en teoría, para longitudes de onda de alrededor de 503 nm a alrededor de 580 nm.

[000443] El sistema puede incluir uno o más filtros excitadores ámbar (por ejemplo, PN 14000002) con un número de pieza 582AF25- RED-EXC (por ejemplo, dibujo # 2006664) utilizado, por ejemplo, en la excitación de Cal Red. Estos filtros pueden tener una longitud de onda de corte de alrededor de 569 +/- 5 nm y una longitud de onda de corte de alrededor de 594 +0/-5 nm. La transmisión de filtros de este tipo puede ser mayor o igual a alrededor del 70% del pico. Estos filtros pueden tener una eficiencia de bloqueo mayor o igual que OD8, en teoría, para longitudes de onda de alrededor de 600 nm a alrededor de 700 nm.

[000444] El sistema puede incluir uno o más filtros emisores FITC (por ejemplo, PN 14000005) con un número de pieza 534AF40- RED-EM (por ejemplo, dibujo # 2006663) utilizado, por ejemplo, en la emisión FAM. Estos filtros pueden tener una longitud de onda de corte de 514 +/- 2 nm y una longitud de onda de corte de 554 +/- 5 nm. La transmisión de filtros de este tipo puede ser mayor o igual a alrededor del 70% del pico. Estos filtros pueden tener una eficiencia de bloqueo mayor que o igual a OD5 para longitudes de onda de ultravioleta a alrededor de 507 nm, mayor que o igual a OD8, en teoría, de alrededor de 400 nm a alrededor de 504 nm, y mayor que o igual a OD4 promedio de alrededor de 593 nm a alrededor de 765 nm.

[000445] El sistema puede incluir uno o más filtros emisores ámbar (por ejemplo, PN 14000006) con un número de pieza 627AF30- RED-EM (por ejemplo, dibujo# 2006665) utilizado, por ejemplo, en la emisión de Cal Red. Estos filtros pueden tener una longitud de onda de corte de 612 +5/-0 nm y una longitud de onda de corte de 642 +/- 5 nm. La transmisión de filtros de este tipo puede ser mayor o igual a alrededor del 70% del pico. Estos filtros pueden tener una eficiencia de bloqueo mayor que o igual a OD5 para longitudes de onda de ultravioleta a alrededor de 605 nm, mayor que o igual a OD8, en teoría, de alrededor de 550 nm a alrededor de 600 nm, y mayor que o igual a OD5 promedio de alrededor de 667 nm a alrededor de 900 nm.

Ejemplo 20: Ejemplo de cartucho de 3 capas

[000446] En esta solicitud se describen ejemplos de especificaciones utilizadas para diseñar y ensamblar el cartucho microfluídico, así como instrucciones de ejemplo sobre el uso del cartucho en, por ejemplo, el sistema descrito en esta solicitud. En algunas realizaciones, el cartucho puede tener un límite máximo de detección igual a 20 copias por volumen de reacción (por ejemplo, 20 copias / 4m), con una detección objetivo de 10 copias por volumen de reacción. El cartucho puede realizar 45 ciclos de reacción en 40 minutos o menos (por ejemplo, 45 ciclos en 40 minutos, 45 ciclos en 20 minutos, 45 ciclos en 15 minutos o similares). El cartucho puede utilizar detección de dos colores usando, por ejemplo, los colorantes fluorescentes FAM (o equivalente) y CAL ROJO (o equivalente). Los resultados obtenidos utilizando el cartucho se han comparado con los resultados obtenidos utilizando instrumentos estándar de PCR en tiempo real.

[000447] En algunos ejemplos, el cartucho puede ser un cartucho desechable de uso único que se puede desechar de acuerdo con los procedimientos de laboratorio típicos. El cartucho puede ser de 4,375 pulgadas alrededor de (11,1 cm) de largo y 2,800 pulgadas (alrededor de 7,1 cm) de ancho, con un espesor de 0,094 +/- 0,005 pulgadas (alrededor de 0,239 +/- 0,013 cm). El cartucho puede incluir características que permiten que el cartucho interactúe, por ejemplo, con el sistema descrito en esta solicitud. Las características de interfaz ejemplar incluyen paredes de canal de PCR y la parte superior del microsustrato sobre el canal de PCR que están bien pulidas (SPI A1/A2/A3), lo que permite una transferencia fácil de luz de excitación y emisión entre el reactor de PCR (por ejemplo, contenido en el cartucho) y el sistema de detección (por ejemplo, el analizador). El cartucho puede incluir una interfaz térmica, ubicada en la parte inferior del cartucho, para interactuar con el analizador. La interfaz térmica puede tener un laminado delgado (por ejemplo, menos de 150 micrones de espesor, 100 micrones de espesor o similar) para fomentar la transferencia de calor desde la oblea del calentador a, por ejemplo, los canales de PCR del cartucho.

[000448] El cartucho puede incluir una o más interfaces mecánicas con, por ejemplo, el analizador. Por ejemplo, el cartucho puede tener una muesca en una o más de las esquinas que pueden acoplarse con una forma correspondiente en el módulo calentador del analizador. La muesca y la forma correspondiente pueden permitir que el cartucho se coloque solo de una manera en la bandeja de, por ejemplo, el sistema descrito en esta solicitud. En algunas realizaciones, el cartucho tiene una única muesca en una de las esquinas, con las tres esquinas restantes con un radio mínimo de 1 mm para facilitar la colocación del cartucho en el analizador. Durante el uso (por ejemplo,

cuando se coloca en un sistema descrito en esta solicitud y realiza una función tal como PCR), el cartucho puede ser presionado, en un lado, por el bloque óptico, contra la oblea del calentador (colocada contra el lado opuesto), con una presión de alrededor de 1 psi o mayor (por ejemplo, 0,99 psi, 1,2 psi o similares). Cuando se encuentra en la bandeja del analizador, el cartucho puede tener una pendiente de alineación de +/- 200 micrones para permitir que el usuario coloque y retire fácilmente el cartucho de la bandeja del analizador. El cartucho puede tener dos salientes, cada uno de 1 mm de ancho y ubicados a lo largo de los dos bordes largos del cartucho, para permitir que la superficie de calentamiento se extienda por debajo del plano de referencia de la bandeja.

[000449] En algunas realizaciones, el cartucho puede tener las siguientes especificaciones funcionales. El cartucho puede incluir un orificio de entrada que tiene, por ejemplo, forma de cono con una altura de 1 mm desde la superficie superior del cartucho. El cono puede tener un diámetro interno de 3 mm en la parte superior del cono y puede ahusarse hasta un diámetro que coincida con el ancho de un microcanal (por ejemplo, un canal de entrada) al que el cono de entrada está conectado de forma fluida. El canal de entrada puede conectar fluidamente el orificio de entrada a un reactor de PCR que tiene un volumen interior de, por ejemplo, alrededor de 4,25 ml a 4,75 ml (por ejemplo, 4,22 ml, 4,5 ml, 4,75 ml o similares). Un canal microfluídico de salida puede conectar fluidamente el reactor de PCR a una cámara de desbordamiento. El cartucho también puede incluir un orificio de ventilación de salida.

[000450] La muestra de PCR de entrada (por ejemplo, una mezcla de reacción) puede estar entre alrededor de 6,0 y 7,0 ml por carril de PCR (por ejemplo, 5,9 ml por carril, 6,4 m l por carril, 7,1 ml por carril o similares) y se puede introducir en el cartucho a través del orificio de entrada mediante, por ejemplo, una pipeta. La mezcla de reacción se puede transportar, a través del canal de entrada, al reactor de PCR donde la mezcla de reacción se puede aislar (por ejemplo, sellar mediante válvulas) para evitar la evaporación o el movimiento de la mezcla de reacción durante el termociclado. Una vez que la mezcla se sella dentro de la cámara, el analizador puede iniciar PCR multiplexada en tiempo real en parte o la totalidad de la mezcla de reacción (por ejemplo, 4,5 ml, una cantidad de fluido igual al volumen interno de la cámara de reacción, o similares).

[000451] El sustrato microfluídico del cartucho puede incluir una o más de las siguientes especificaciones. El material del microsustrato puede ser ópticamente transparente (por ejemplo, tener una transmisión óptica de alrededor de 90% o mayor, tener un espesor de 3 mm, cumplir con ASTMD1003 y similares), tener una autofluorescencia que es menor que la emitida por ZEONOR 1420R de 2 mm de espesor y tener un índice de refracción de alrededor de 1,53 (ASTM D542). El material del microsustrato puede ser susceptible al moldeo por inyección de características requeridas para la red microfluídica del cartucho. El material es preferentemente compatible con todos los agentes de PCR y puede soportar temperaturas de hasta alrededor de 130 °C durante alrededor de 5 minutos o más sin ceder o fundirse. El cartucho puede incluir elementos de referencia, reconocibles por el equipo de fabricación HandyLab, ubicados en una o más (preferentemente dos) de las esquinas del sustrato. El cartucho puede incluir componentes fluídicos (por ejemplo, microcanales, válvulas, conductos de ventilación de extremo, orificios de entrada de reactivo, cámaras de reacción y similares) necesarios para realizar las funciones del cartucho (por ejemplo, PCR).

[000452] Las características adicionales del material de sustrato pueden incluir uno o más de los siguientes. Se pueden diseñar holguras mínimas de alrededor de 1 mm entre las características funcionales para garantizar el éxito del sellado (por ejemplo, al analizador) y para permitir la fijación simplificada durante el montaje. El cartucho puede incluir tubos de tipo «dogbone» en los pequeños extremos de la vía de fluido para, por ejemplo, aumentar la vida útil del molde. La parte inferior de la superficie de la microherramienta puede ser rugosa (por ejemplo, por medio de un chorro de vapor, EDM o similares). El material de sustrato puede ser capaz de adherirse mediante una etiqueta.

[000453] En algunas realizaciones, la cinta de sellado utilizada en el cartucho puede incluir una o más de las siguientes especificaciones. El laminado se puede aplicar fácilmente al fondo del sustrato microfluídico. El material del laminado está preferentemente libre de orificios. El material y el adhesivo son preferentemente compatibles con los analitos químicos de reacción de PCR. El material laminado y el pegamento utilizados no deben ser autofluorescentes. El material puede soportar hasta 130 °C durante 5 minutos sin perder adherencia, ceder, derretirse o causar tensiones indebidas en el cartucho. Las burbujas no deben formarse en la capa adhesiva al calentarse (por ejemplo, a 130 ° C durante 5 minutos) después de la aplicación al microsustrato. El laminado debe tener menos de 5 milímetros de espesor para, por ejemplo, permitir una rápida transferencia de calor.

[000454] La cera de alta temperatura incluida en el cartucho puede tener las siguientes características. La cera debe tener un punto de fusión de alrededor de 90 +/- 3°C (por ejemplo, 87°C, 90°C, 93,1°C o similar), ser biocompatible con las reacciones de PCR, tener humectabilidad con el material de microsustrato y tener un intervalo de viscosidad de fusión, por ejemplo, de alrededor de Viscosidad a 100°C = 20 mm^2/s y Dureza a 25°C = 8dmm. La etiqueta principal del cartucho puede tener las siguientes características. Puede tener un espesor de 2-4 milésimas de pulgada, tener una capacidad de unión adecuada a las microcaracterísticas y sellar alrededor de las válvulas, incluir cortes para una o más ventanas de PCR y una lengüeta (libre de adhesivo) para ayudar a retirar el cartucho del analizador. La etiqueta principal también puede tener resistencia a la abrasión en la superficie superior y ser imprimible. La etiqueta principal puede tener un patrón de alineación superior e inferior para que la etiqueta cubra completamente los orificios de la válvula para el funcionamiento adecuado de las válvulas.

[000455] El cartucho puede incluir una etiqueta de código de barras aplicada a la parte superior del cartucho que es legible mediante un lector de código de barras (por ejemplo, el lector de código de barras incluido en el analizador) mientras el cartucho se instala en el analizador. La etiqueta del código de barras puede incluir el nombre del producto, el número de lote, la fecha de vencimiento, el código de barras (2D) y puede imprimirse. Además, o como alternativa, puede aplicarse un código de barras directamente a la etiqueta del cartucho principal usando una impresora láser o de tipo inyección de tinta.

[000456] El empaque en el que se incluye el cartucho puede incluir uno o más de los siguientes: etiqueta del empaque, caja de cartón, etiqueta de caja y/o instrucciones de funcionamiento. El empaque puede imprimirse o fijarse a la etiqueta, colocarse dentro de una bolsa de plástico, bolsa de envoltura retráctil/elástica o similares, y puede apilarse en grupos de 24. El empaque del cartucho sin un sello crítico debe mantenerse libre de contaminación por polvo.

[000457] El cartucho puede incluir una o más válvulas (por ejemplo, válvulas controladas por temperatura que contienen cera) para iniciar, detener y/o controlar el flujo de material dentro del cartucho. La cera contenida en las válvulas puede estar libre de burbujas de aire atrapadas que tienen un diámetro mayor que la mitad del ancho del canal de la válvula. El canal de la válvula puede tener una bolsa de aire. La cera no puede inmiscuirse en la vía de fluido antes de la activación. Se puede rellenar con cera hasta el inicio del engrosamiento de la vía de fluido.

[000458] El cartucho puede incluir microcanales y orificios de modo que los orificios sean de un tamaño y forma para permitir una interfaz fácil y sin fugas con una punta de pipeta de 175 ml. En algunos ejemplos, el tamaño de los orificios es de entre alrededor de 200 mm y alrededor de 4000 mm de diámetro. Los microcanales pueden tener entre alrededor de 50 mm y alrededor de 1500 m m de ancho y entre alrededor de 50 mm y 1000 mm de alto.

[000459] El cartucho puede incluir válvulas para controlar el flujo de fluido dentro del cartucho (por ejemplo, a través de los microcanales, cámaras de reactor y similares). Los bordes de la válvula, las etapas y la geometría general pueden diseñarse para fomentar el flujo exacto y/o la detención requerida durante la carga de cera. La geometría de la válvula puede diseñarse para adaptarse a las limitaciones del equipo dispensador de cera (por ejemplo, =/- 25% del volumen de 75 nL). En algunas realizaciones, las cámaras de aire descendentes en las válvulas tienen forma de embudo para ayudar a la carga de cera y la geometría restante disminuye desde la parte inferior del embudo hasta el punto terminal donde se detiene la cera. La trayectoria en la que las válvulas deben fluir y bloquearse, durante el uso, puede ser lo suficientemente estrecha (por ejemplo, 150 a 200 micrones de ancho y profundidad) y tener la longitud suficiente para sellarse eficazmente cuando las válvulas se activan durante el uso. La temperatura de la cera de la válvula puede ser de alrededor de 90 °C. Cuando se utilizan para bloquear una parte de un microcanal, las válvulas pueden sellarse para evitar la evaporación de fluido y/o la migración física de fluido desde el reactor de PCR durante el termociclado.

[000460] El cartucho puede incluir una o más regiones de PCR para realizar PCR en una muestra. El canal en la región de PCR (por ejemplo, el reactor de PCR) puede diseñarse de manera tal que la temperatura del contenido del canal se mantenga uniformemente dentro de alrededor 1°C de la temperatura de recocido. Las paredes del canal pueden tener un pulido de SPI A1/A2/A3.

[000461] En algunas realizaciones, el cartucho está diseñado para realizar pruebas diagnósticas dentro de un intervalo de temperatura de alrededor de 59°F a alrededor de 86°F (alrededor de 15°C a alrededor de 30°C) y un intervalo de humedad de alrededor del 15% de humedad relativa a alrededor del 80% de humedad relativa. El cartucho está diseñado para ser seguro y funcional cuando se usa en interiores, usado a una altitud de 2000 m o menos, y usado en condiciones de humedad sin condensación (por ejemplo, humedad relativa máxima de 80% para temperaturas de hasta 31°C que disminuyen linealmente a una humedad relativa del 50% a 40°C).

[000462] En uso, un producto de PCR producido en el cartucho puede permanecer en el cartucho usado para, por ejemplo, minimizar la probabilidad de contaminación cruzada. El cartucho puede diseñarse de manera tal que una caída del cartucho de 4 pies, durante el empaque, no dañe el cartucho. El cartucho está diseñado para funcionar sin daños después de la exposición a las siguientes condiciones. El cartucho debe almacenarse a 4°C a 40°C durante la vida útil prevista. La exposición a temperaturas entre -20°C y 4°C o 40°C y 60°C debe producirse durante no más de 24 horas. El cartucho puede soportar los cambios de presión de aire típicos del transporte aéreo.

[000463] El cartucho puede etiquetarse con la siguiente información (por ejemplo, para identificar el cartucho, cumplir con las regulaciones y similares). La etiqueta puede contener una etiqueta de "Solo uso de investigación", si corresponde, y una marca CE, si corresponde. La etiqueta puede contener el nombre y el logotipo de la empresa (por ejemplo, Handylab ®), un número de pieza (por ejemplo, 55000009), un nombre de pieza (12x cartucho no ventilado), un número de lote (por ejemplo, LOTE 123456), una fecha de vencimiento (por ejemplo, 06/2015), espacio para escribir, un código de barras según las especificaciones de código de barras (descritas en otra parte) y/o "Handylab, Inc., Ann Arbor, MI 48108 EE. UU.".

[000464] El cartucho puede incluirse en una caja que puede contener información tal como, un número de pieza

(por ejemplo, 55000009), un nombre de pieza (12x cartucho no ventilado), una cantidad (por ejemplo, 24), un número de lote (por ejemplo, LOTE 123456), una fecha de vencimiento (por ejemplo, 06/2015), un código UPC opcional, "Fabricado por Handylab, Inc., Ann Arbor, MI 48108 EE. UU.", una etiqueta de caja para indicar los límites de almacenamiento, una marca CE (si corresponde) y/o un nombre y dirección AR.

[000465] El empaque del cartucho puede incluir una envoltura de papel para fijar múltiples cartuchos juntos y relleno limpio en el paquete para evitar daños, por ejemplo, por vibración. El cartón de envío del cartucho puede incluir características tales como, cumplimiento con ASTM 6159, el cartón puede almacenarse en cualquier dirección, puede no requerirse refrigeración o etiquetado frágil del cartón, y puede no requerirse paquetes fríos adicionales. La vida útil del cartucho es de 12 meses o más.

[000466] El cartucho puede cumplir con IEC 61010 (probado por NRTL) y puede requerirse un listado de la FDA para la distribución clínica. Los cartuchos utilizados en un dispositivo de laboratorio clínico pueden cumplir con todos los requisitos del sistema de calidad. Los cartuchos utilizados solo para investigación en un dispositivo comercial pueden cumplir con todos los requisitos del sistema de calidad de HandyLab. Los cartuchos solo para uso de investigación (pruebas alfa o beta) pueden ser de diseño/fabricación rastreables a un DHR (registro de fabricación).

[000467] La descripción que antecede pretende ilustrar diversos aspectos de las presentes invenciones. No se pretende que los ejemplos presentados en esta solicitud limiten el alcance de las presentes invenciones. La tecnología que ahora se describe completamente, será evidente para un experto en la materia que se pueden realizar muchos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Sistema que comprende un cartucho microfluídico (200) y un aparato de diagnóstico para amplificar y llevar a cabo análisis de diagnóstico en nucleótidos a partir de muestras biológicas, donde el cartucho microfluídico (200) es un cartucho microfluídico de múltiples carriles desechable que contiene carriles de muestra en paralelo, incluyendo el cartucho microfluídico (200):
una capa de sustrato que tiene un lado superior y un lado inferior opuesto,
donde cada uno de la pluralidad de carriles de muestra comprende una red microfluídica configurada de forma independiente que tiene, en comunicación fluida entre sí:
una entrada (202);
una primera válvula (206) y una segunda válvula (204);
un reactor de PCR (210) configurado para llevar a cabo la amplificación por PCR de nucleótidos en una muestra;
un conducto de ventilación (208);
un primer canal (216) que va desde la entrada (202), a través de la primera válvula (206), al reactor de PCR (210); y
un segundo canal (218) que va desde el reactor de PCR (210), a través de la segunda válvula (204), hasta el conducto de ventilación (208),
una capa laminada unida al lado inferior de la capa de sustrato para sellar los componentes de la red microfluídica; y
una capa de etiqueta, estando dispuesto el lado superior de la capa de sustrato hacia la capa de etiqueta,
el aparato de diagnóstico configurado para llevar a cabo una PCR en tiempo real en muestras biológicas en el cartucho microfluídico (200), comprendiendo el aparato de diagnóstico:
una plataforma de instrumentos reutilizable para accionar las operaciones en cartucho, detectar y analizar los productos de amplificación por PCR en cada uno de los carriles de muestra por separado;
un compartimento configurado para recibir selectivamente el cartucho microfluídico;
al menos una fuente de calor situada en el compartimento y acoplada a un procesador, en el que la al menos una fuente de calor está configurada para calentar carriles de muestra individuales en el cartucho microfluídico, estando el procesador configurado para controlar la aplicación de calor a los carriles de muestra individuales por separado; y,
un sistema de detección para monitorizar la fluorescencia de reacciones bioquímicas que comprende un detector óptico, una fuente de luz que emite luz de forma selectiva en una banda de absorción de un colorante fluorescente, y un detector de luz que detecta luz de forma selectiva en una banda de emisión del colorante fluorescente, en el que el fluorescente colorante corresponde a una sonda de polinucleótido fluorescente o un fragmento de la misma, en el que el cartucho microfluídico incluye una ventana por encima del reactor de PCR, a través de la cual se permite la detección óptica, dispuesta de manera que el detector óptico se sitúa por encima de la ventana cuando el cartucho microfluídico está ubicado en el compartimento.

2. Sistema, según la reivindicación 1, en el que cada una de las entradas (202) está configurada para aceptar una cantidad de muestra de una punta de pipeta, y en el que la cantidad de muestra es de 1 a 20 µl.

3. Sistema, según la reivindicación 1, en el que la capa de sustrato es un sustrato rígido fabricado de un material que confiere rigidez a la capa de sustrato y al cartucho microfluídico, y es impermeable al aire o líquido, de modo que la entrada o salida de aire o líquido durante el funcionamiento del cartucho microfluídico solo es posible a través de una entrada (202) o un conducto de ventilación (208).

4. Sistema, según la reivindicación 1, en el que uno o más miembros de fuerza están configurados para aplicar fuerza para acoplar térmicamente al menos una fuente de calor a al menos una parte del cartucho microfluídico recibido en el compartimento.

5. Sistema, según la reivindicación 1, en el que el compartimento y el cartucho microfluídico tienen una forma complementaria, de modo que el cartucho microfluídico se recibe en una única orientación.

6. Sistema, según la reivindicación 1, en el que el cartucho microfluídico comprende además un canal de ventilación de eliminación de burbujas (208) en el primer canal (216) que va desde la entrada (202) hasta la primera válvula (206).

7. Procedimiento para amplificar y llevar a cabo un análisis de diagnóstico sobre nucleótidos de muestras biológicas utilizando un sistema, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el procedimiento:
recibir el cartucho microfluídico (200, 994) en el aparato de diagnóstico e introducir la pluralidad de muestras biológicas en el cartucho microfluídico (200, 994);
mover la pluralidad de muestras biológicas independientemente unas de otras a la respectiva pluralidad de reactores de PCR (210);
aislar la pluralidad de reactores de PCR (210); y
monitorizar la fluorescencia de las reacciones bioquímicas que son la base de la PCR.

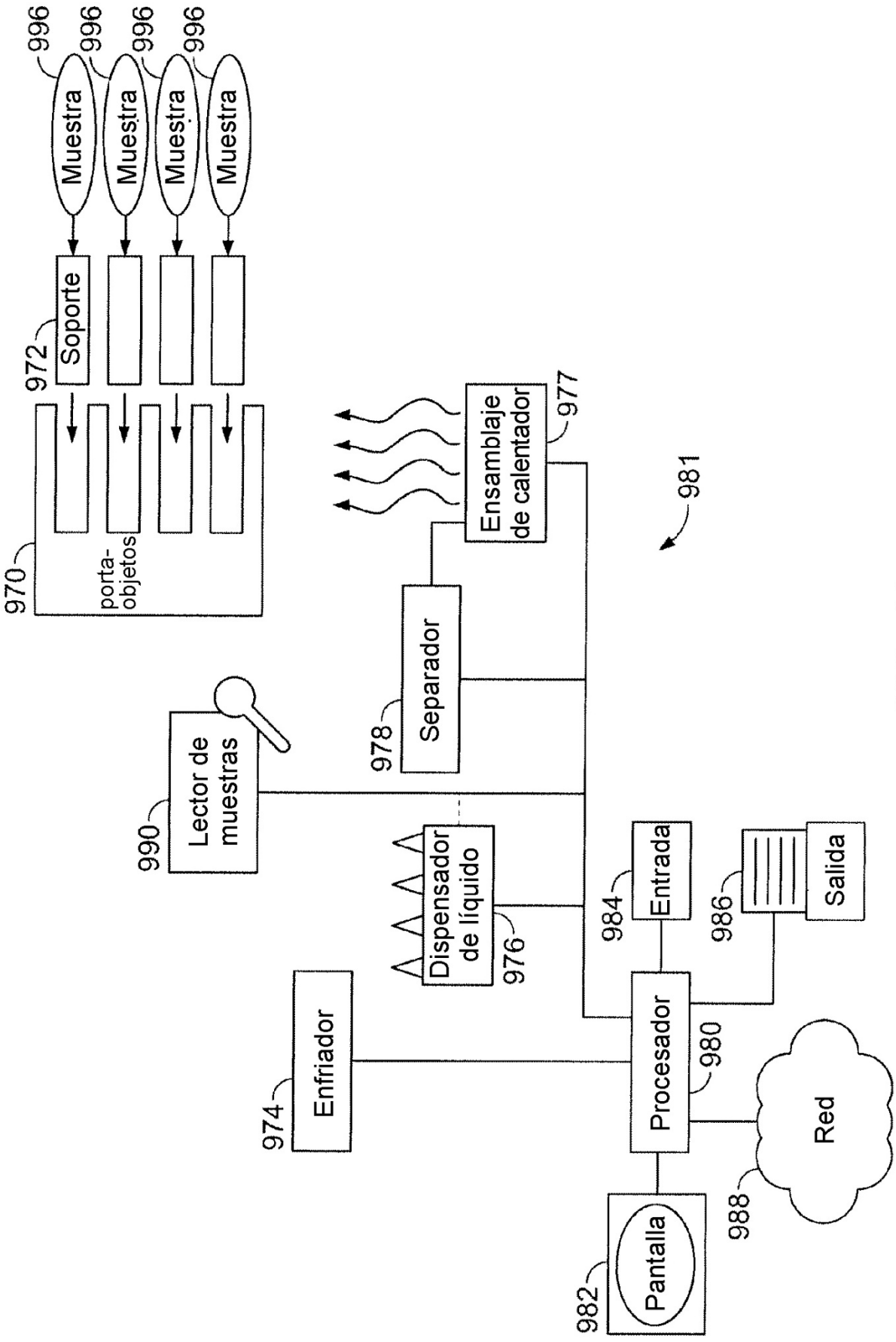

996
Muestra
996
Muestra
996
Muestra
996
Muestra
972
Soporte
970
porta-objetos
977
Ensamblaje de calentador
981
978
Separador
990
Lector de muestras
976
Dispensador de líquido
984
Entrada
986
Salida
974
Enfriador
980
Procesador
988
Red
982
Pantalla

FIG. 1A

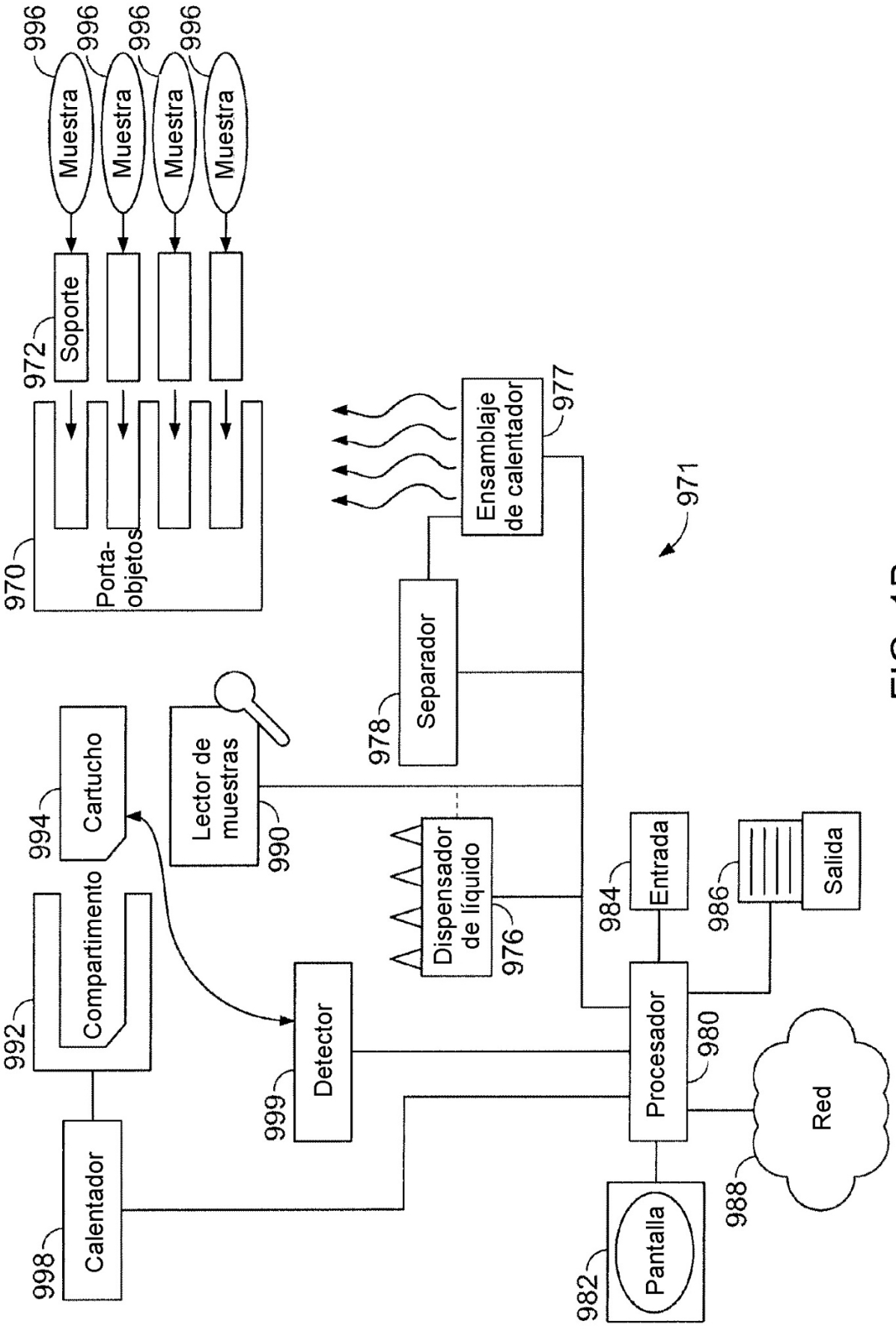

996
Muestra
996
Muestra
996
Muestra
996
Muestra
972
Soporte
970
Porta-objetos
977
Ensamblaje de calentador
971
978
Separador
994
Cartucho
990
Lector de muestras
992
Compartimento
976
Dispensador de líquido
984
Entrada
986
Salida
999
Detector
980
Procesador
988
Red
998
Calentador
982
Pantalla

FIG. 1B

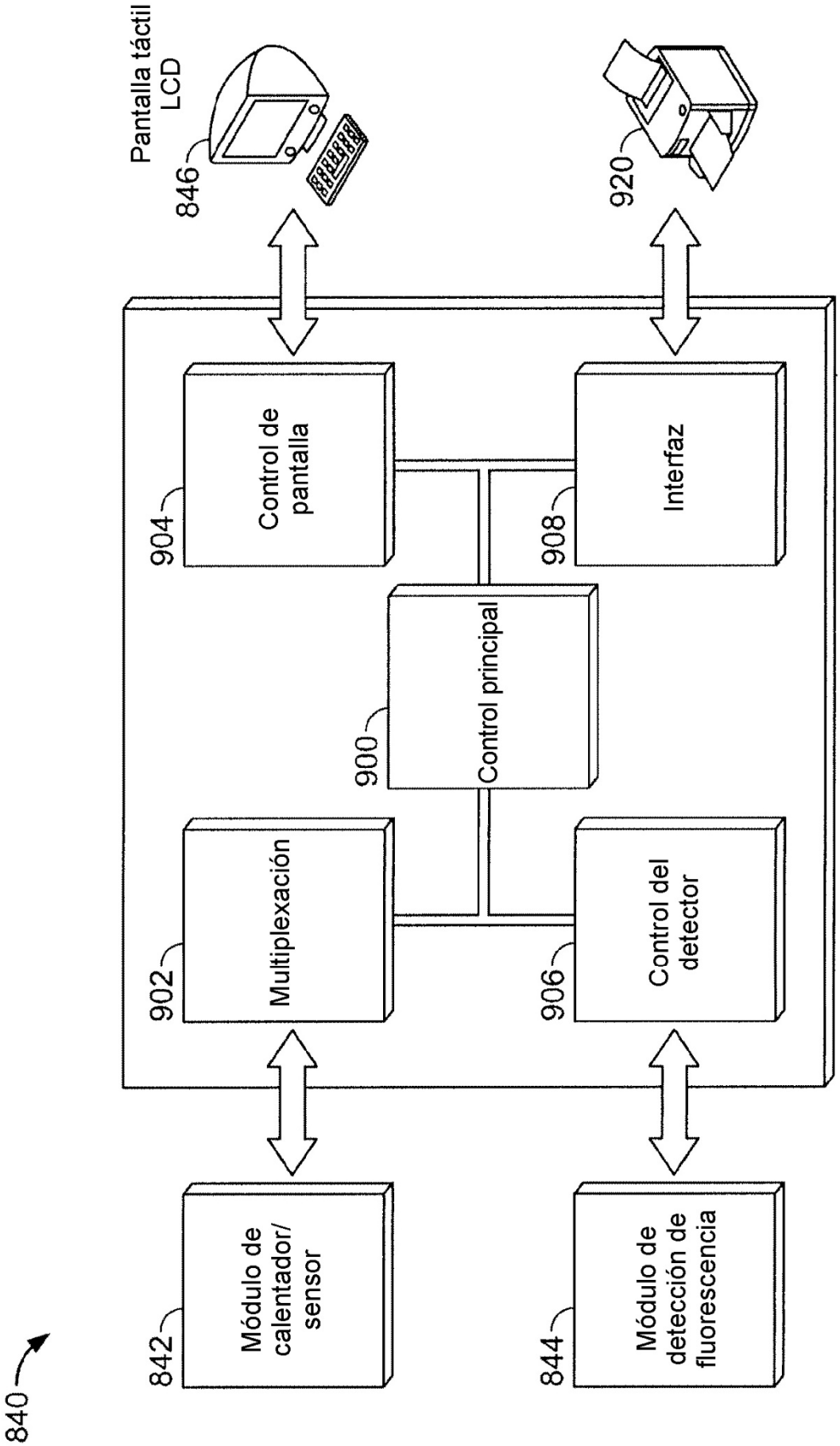

Pantalla táctil LCD
846
920
Control de pantalla
904
Interfaz
908
Control principal
900
Multiplexación
902
Control del detector
906
Módulo de calentador/ sensor
842
Módulo de detección de fluorescencia
844
840

FIG. 2

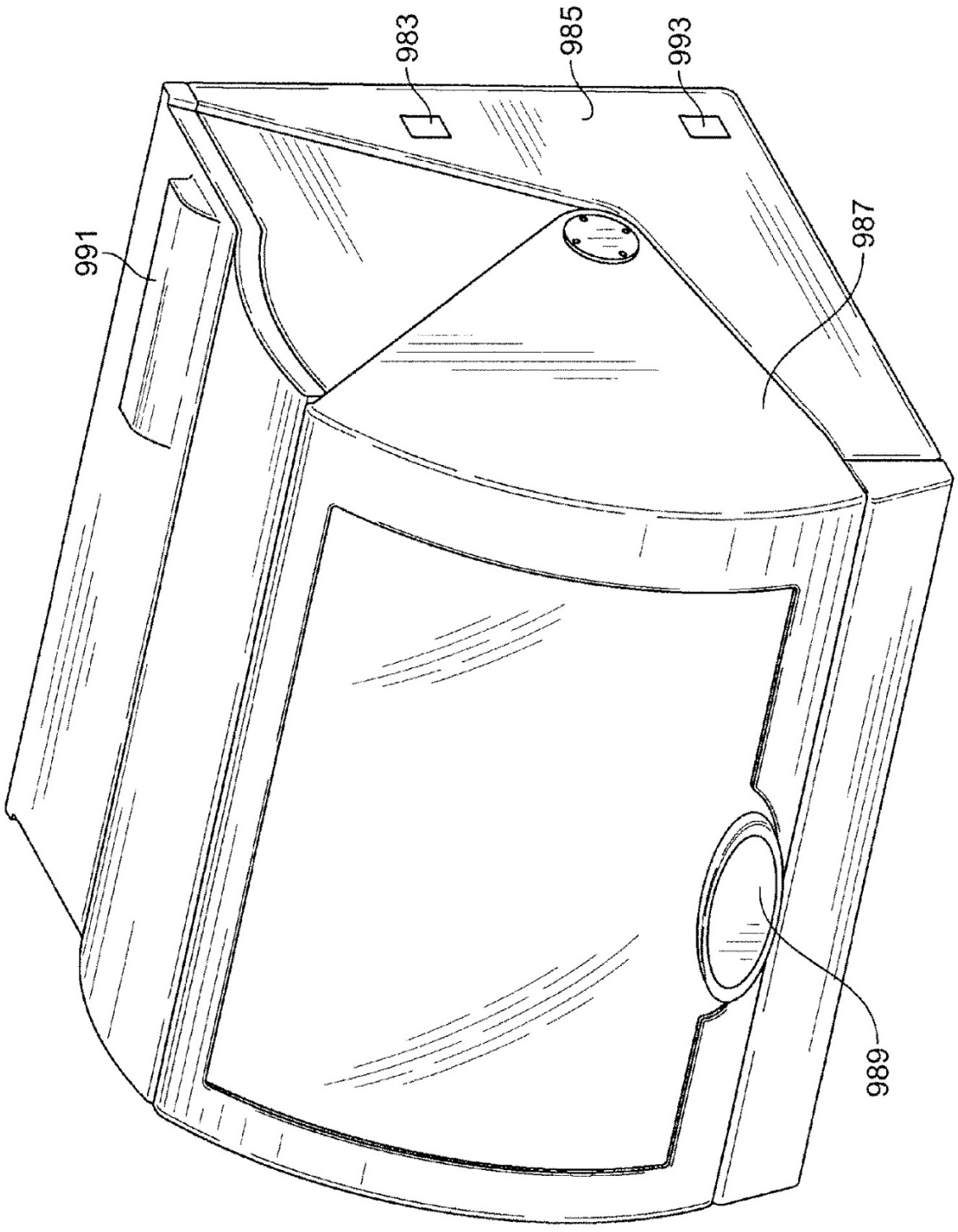


FIG. 3A

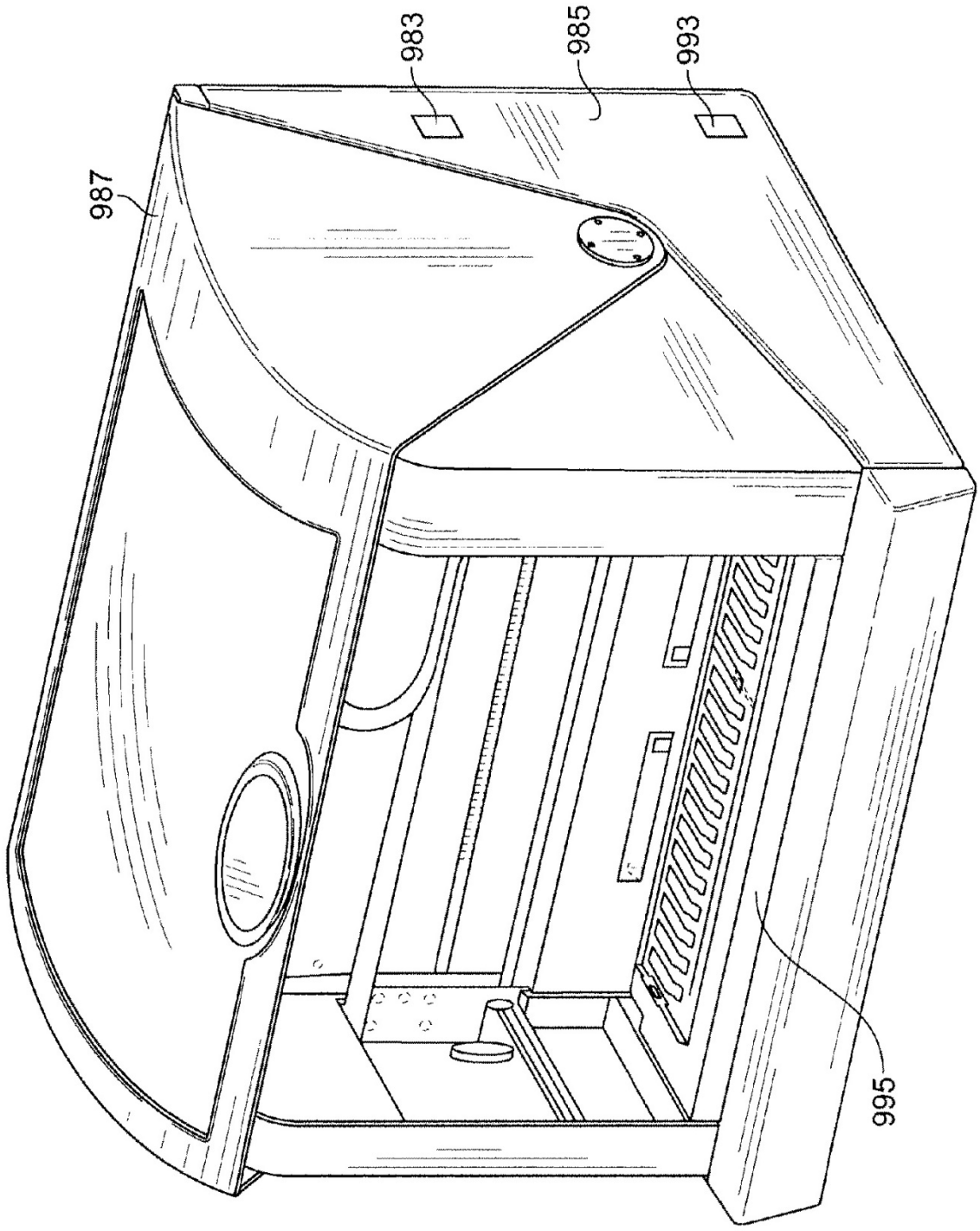


FIG. 3B

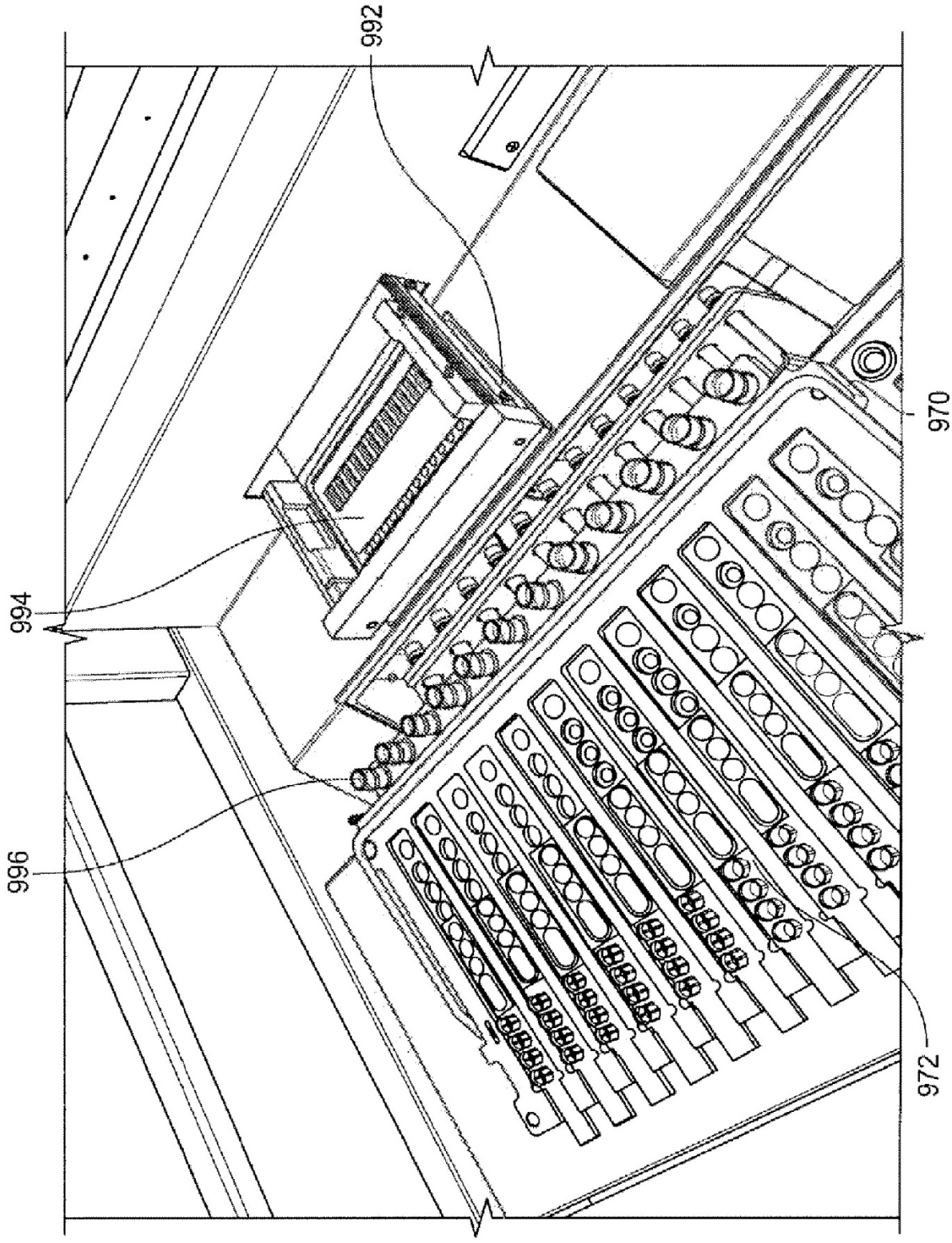


FIG. 4

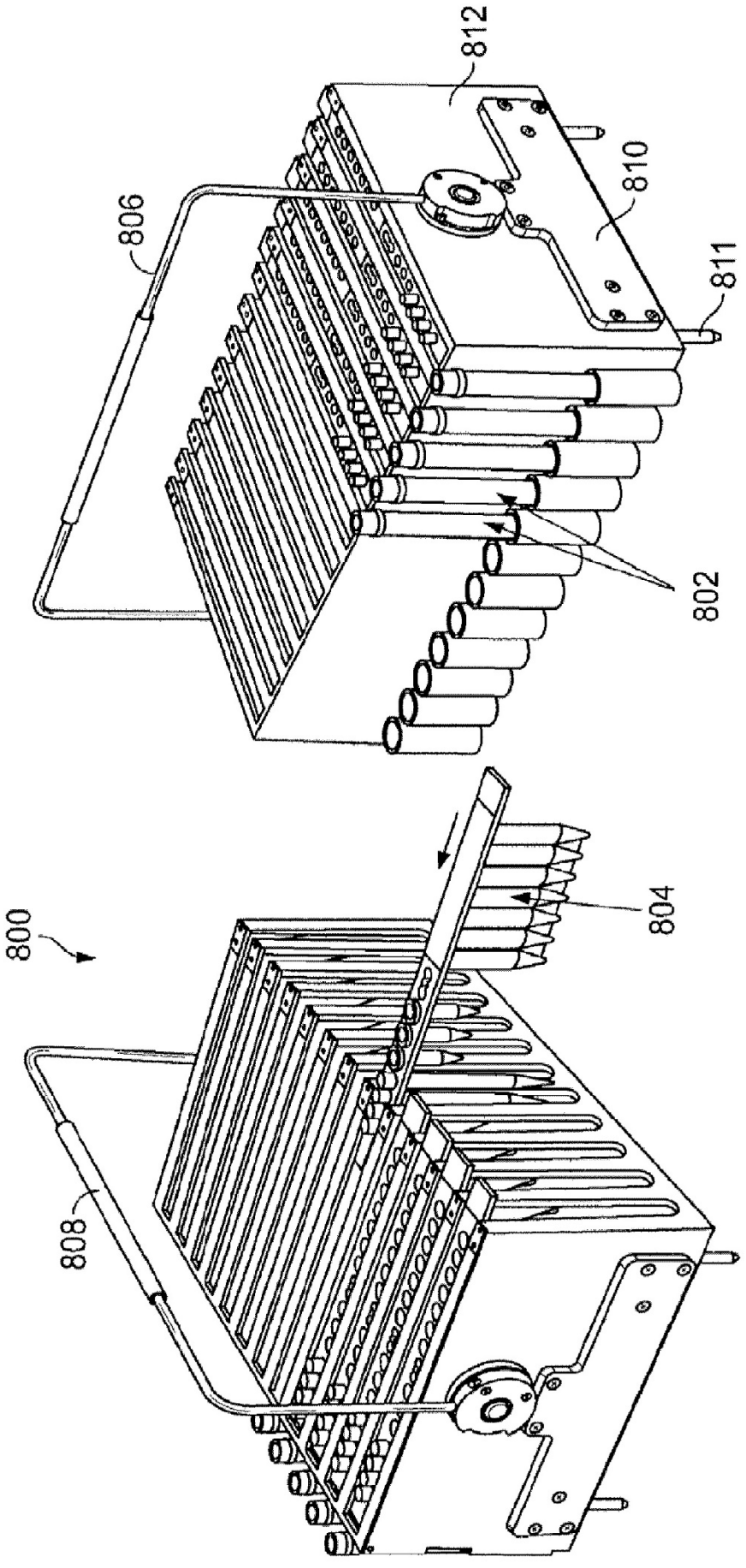


FIG. 5

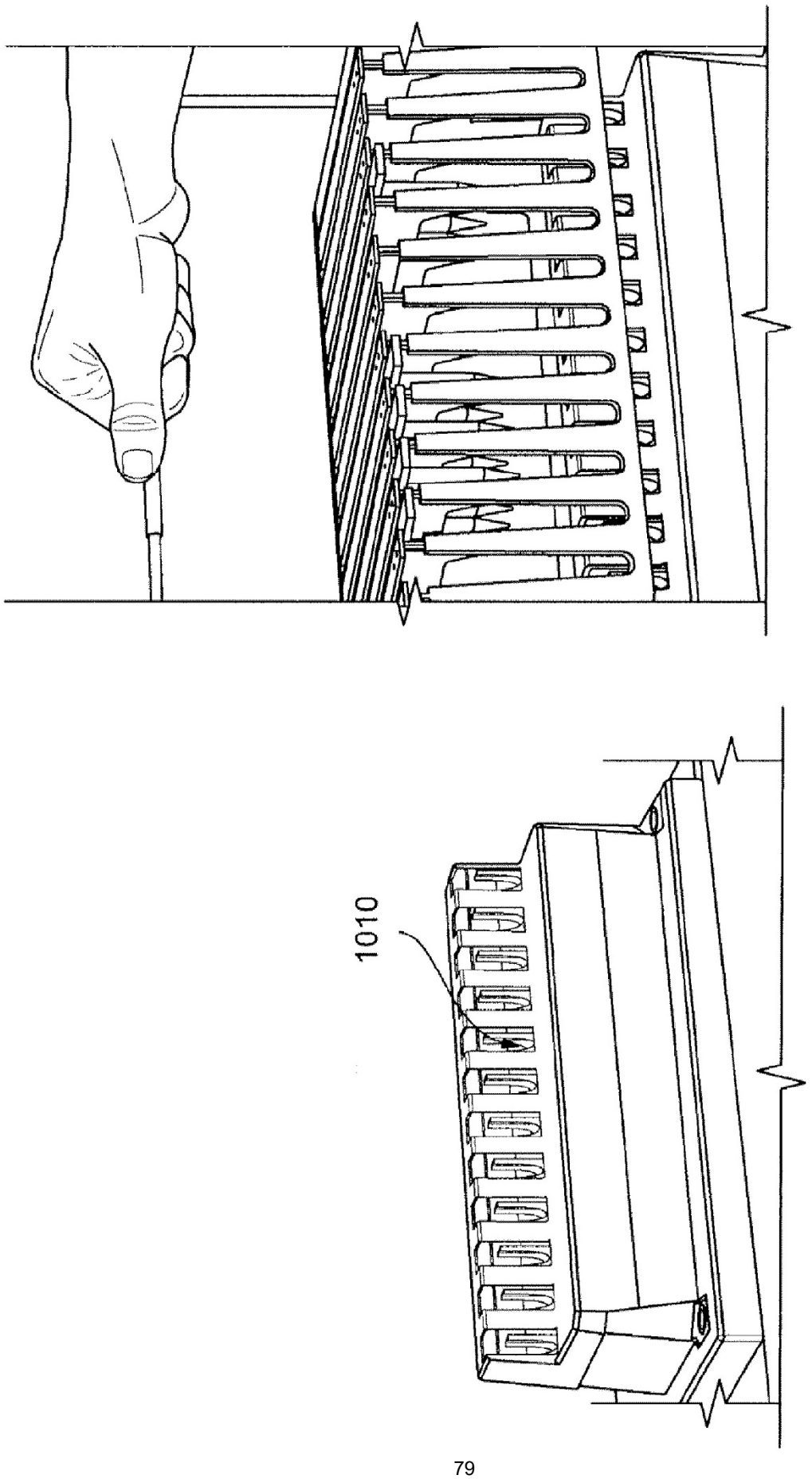


FIG. 6

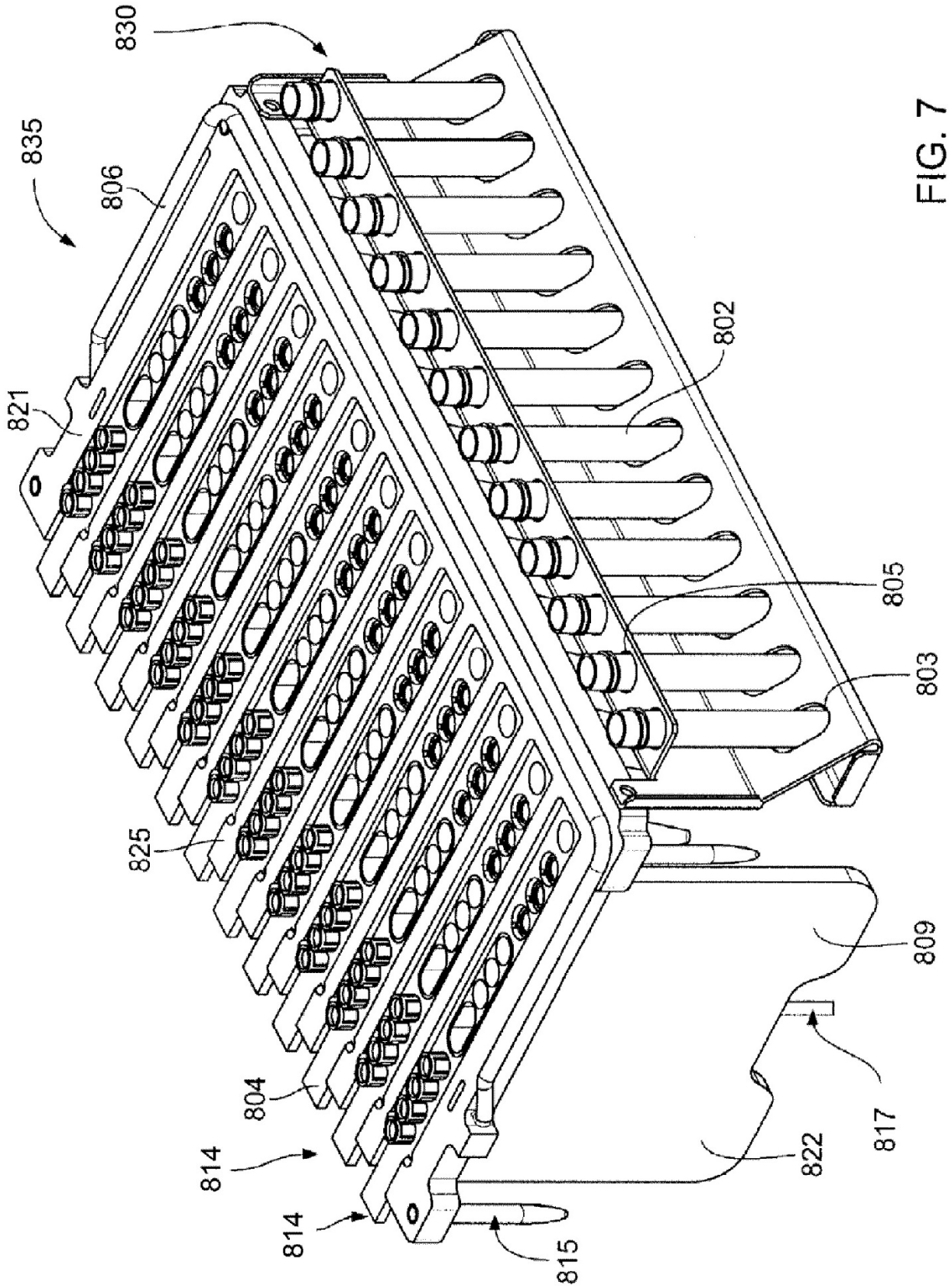


FIG. 7

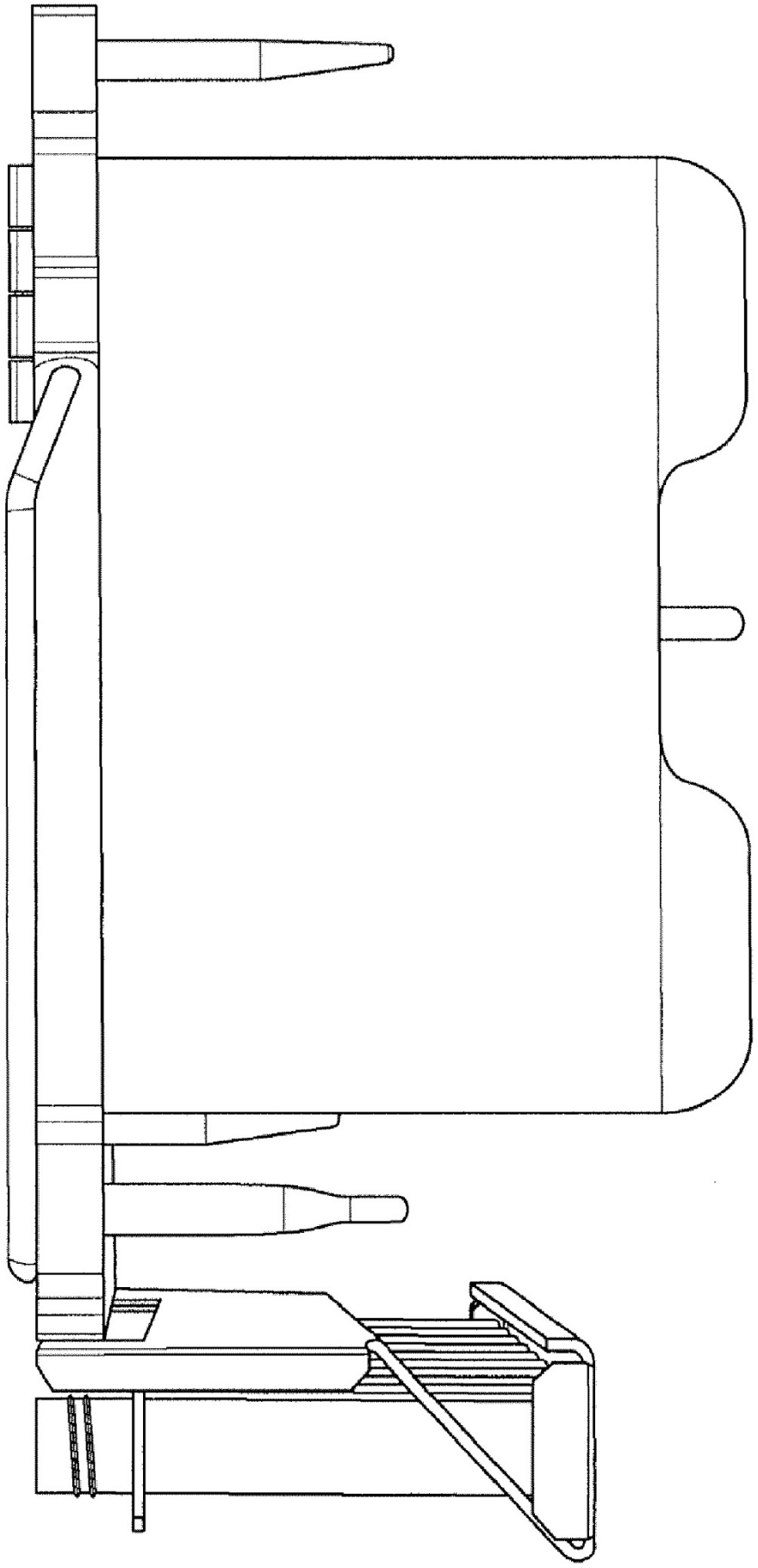


FIG. 8A

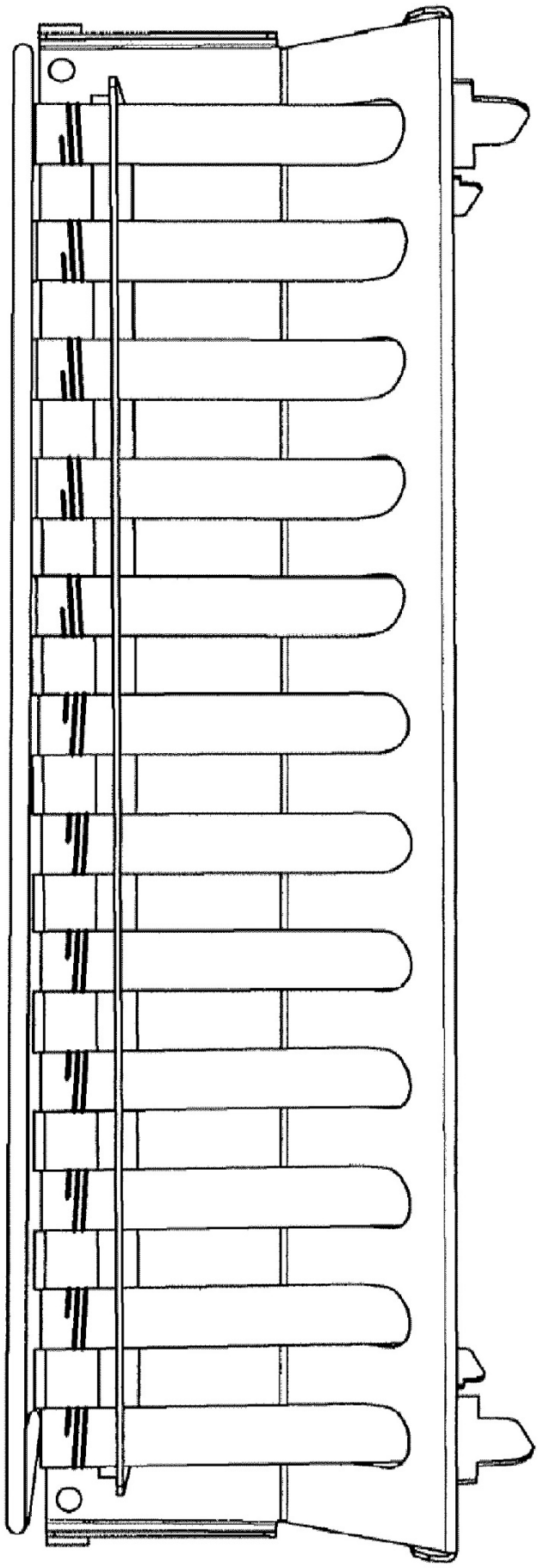


FIG. 8B

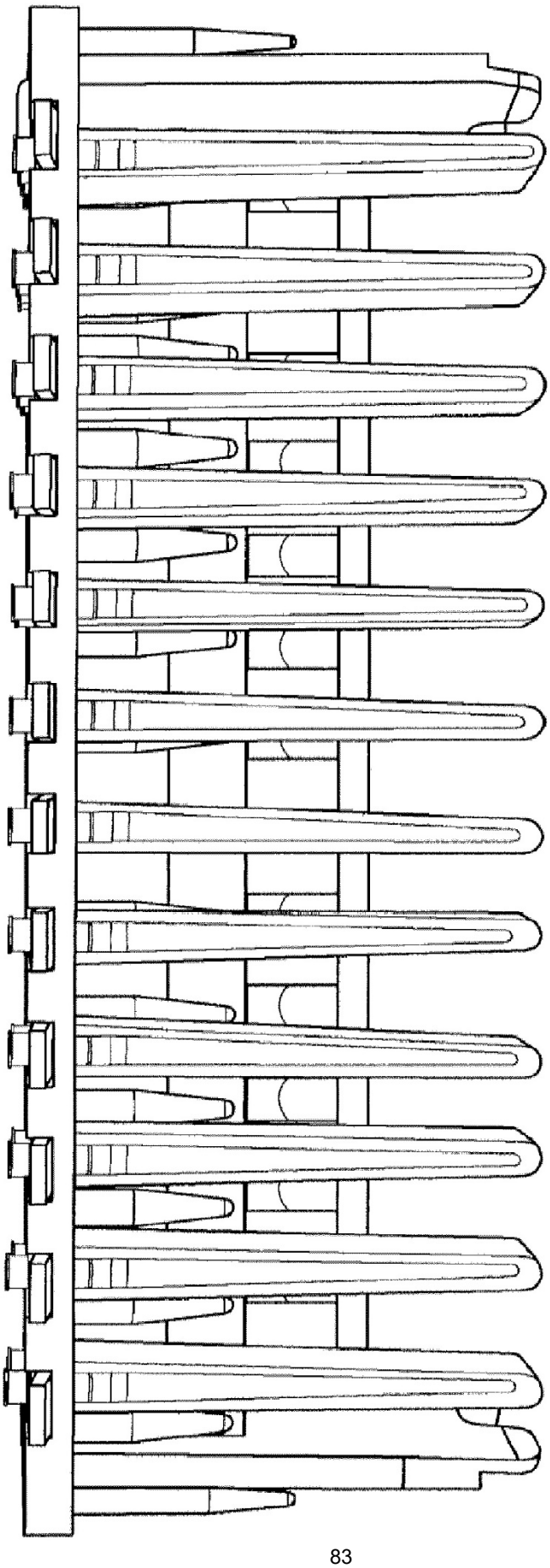


FIG. 8C

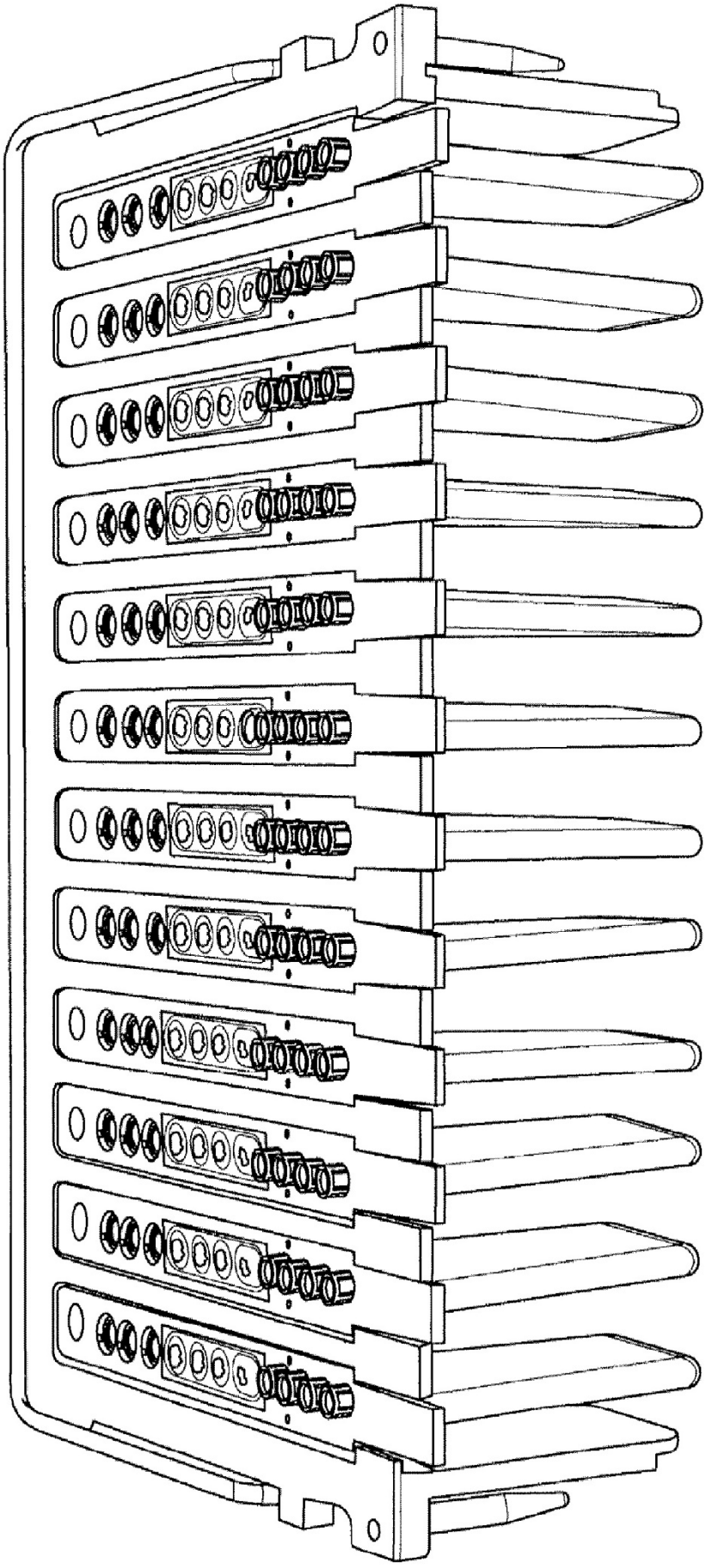


FIG. 8D

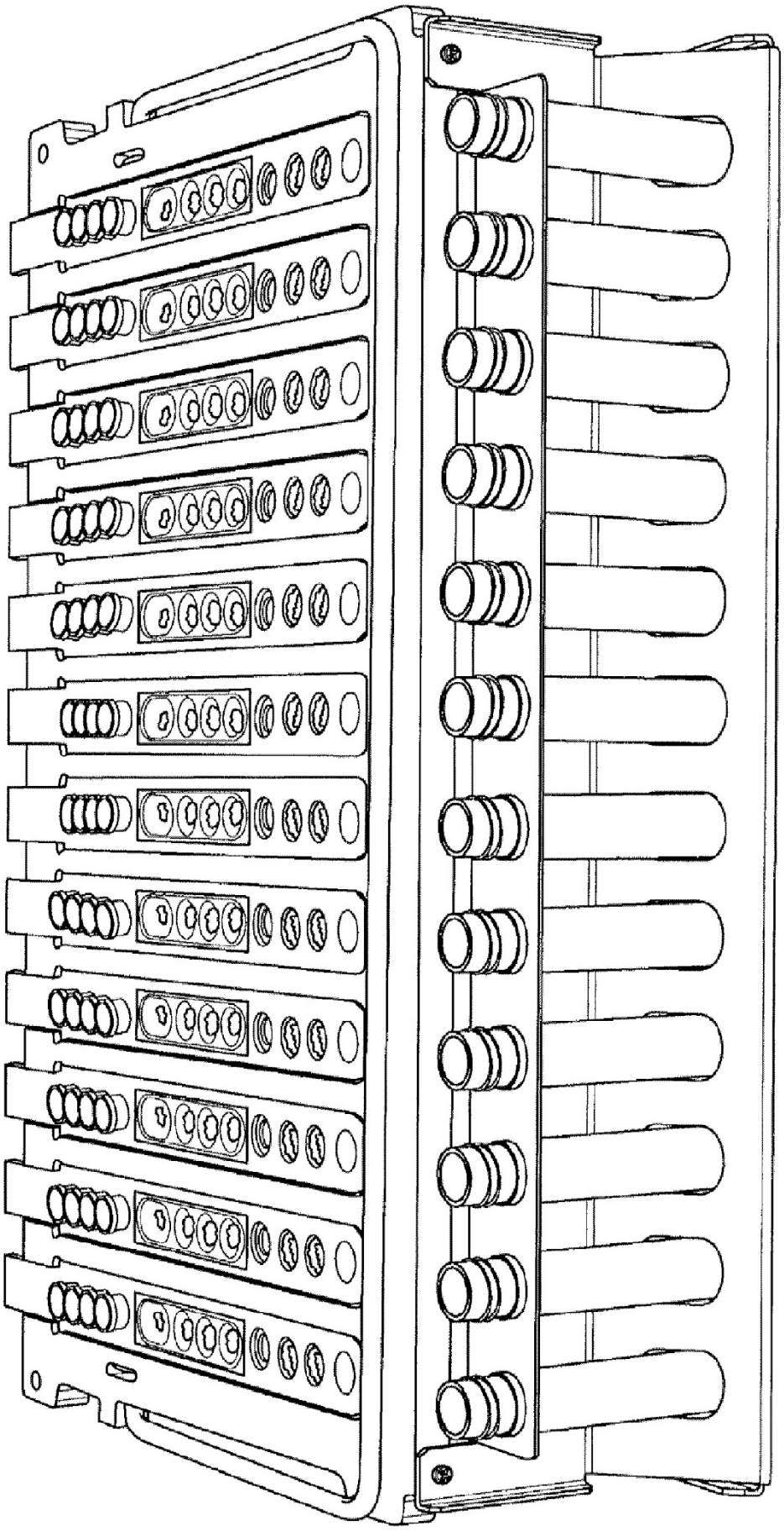


FIG. 8E

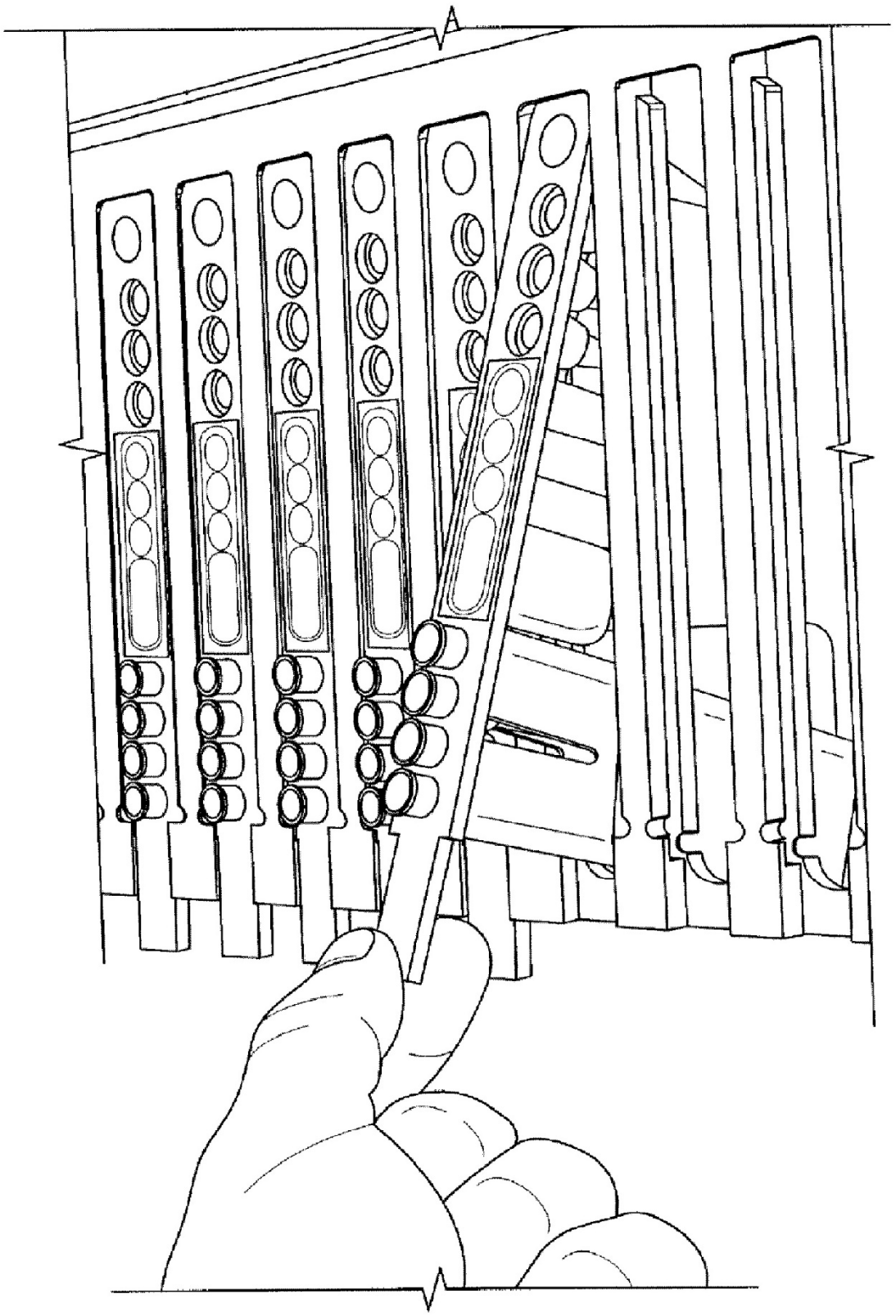


FIG. 8F

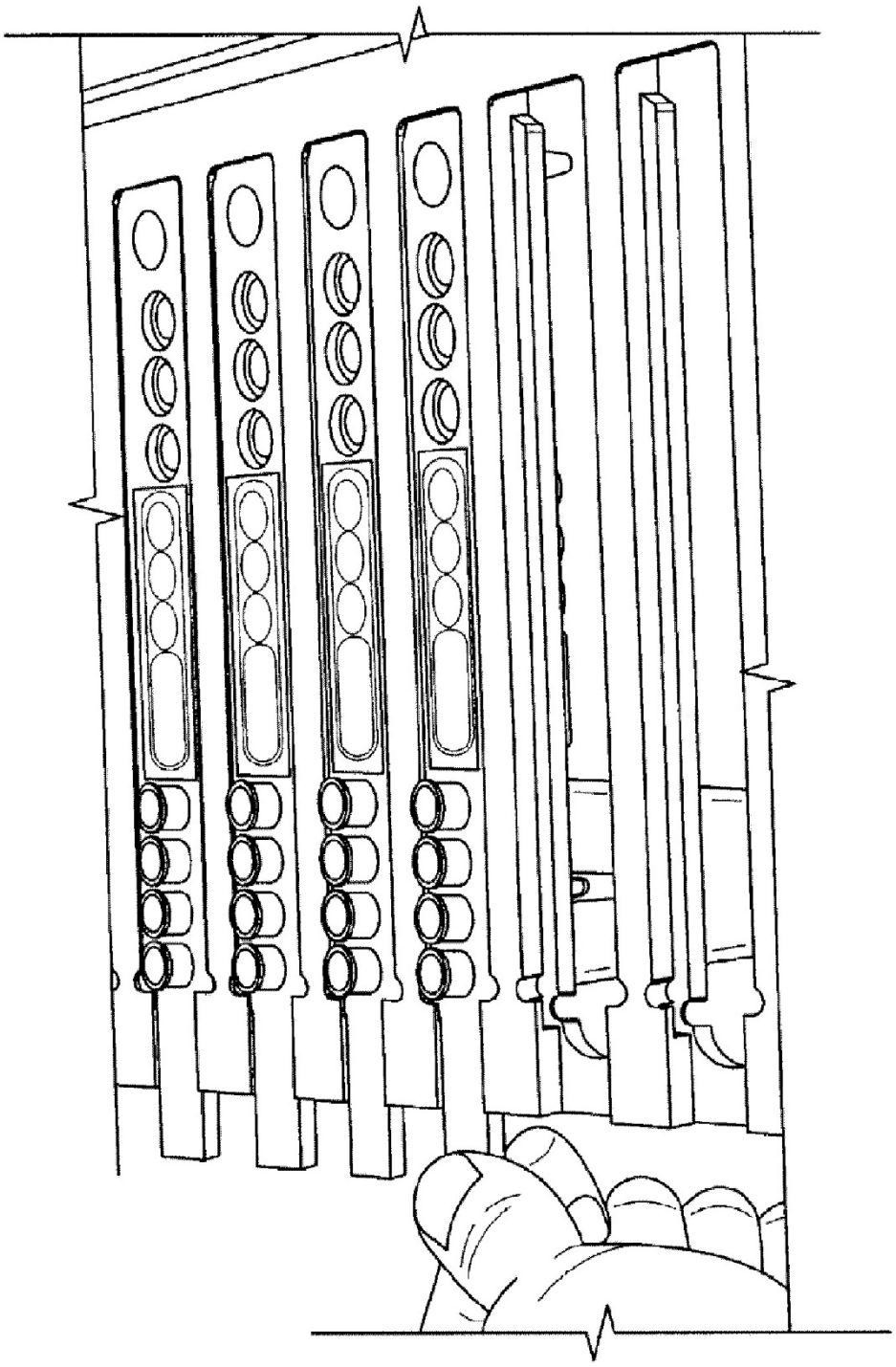


FIG. 8G

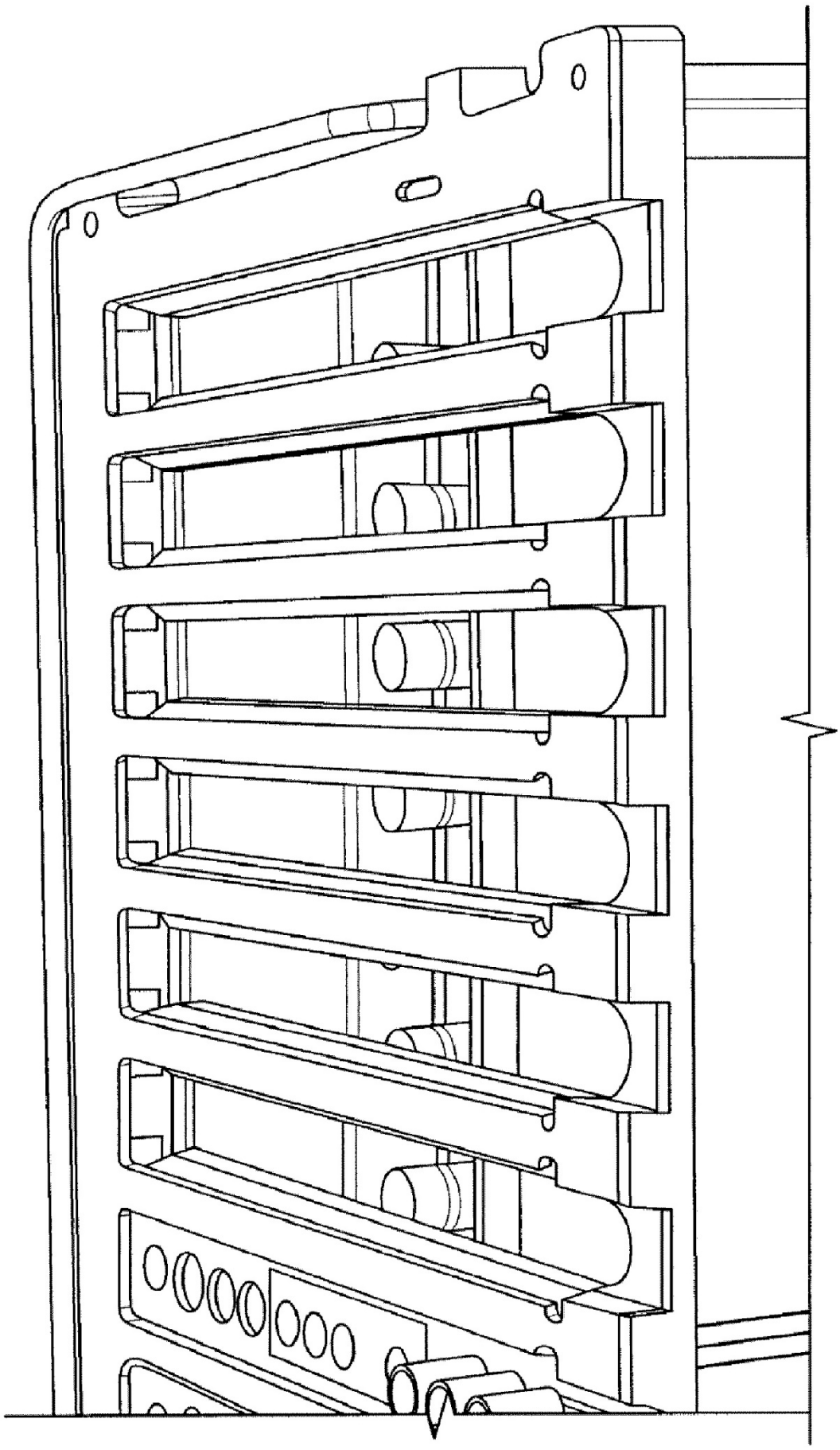


FIG. 8H

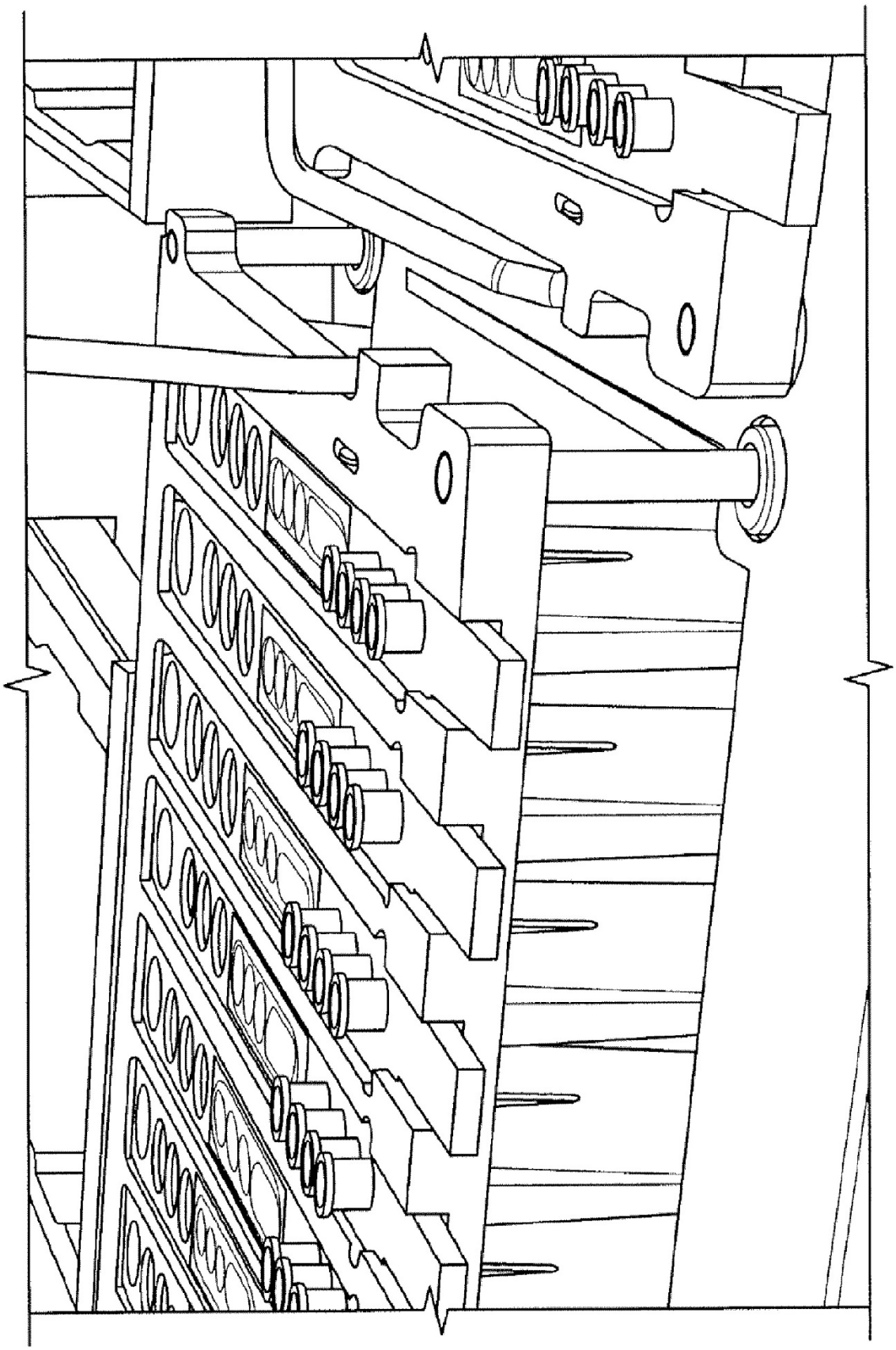


FIG. 8I

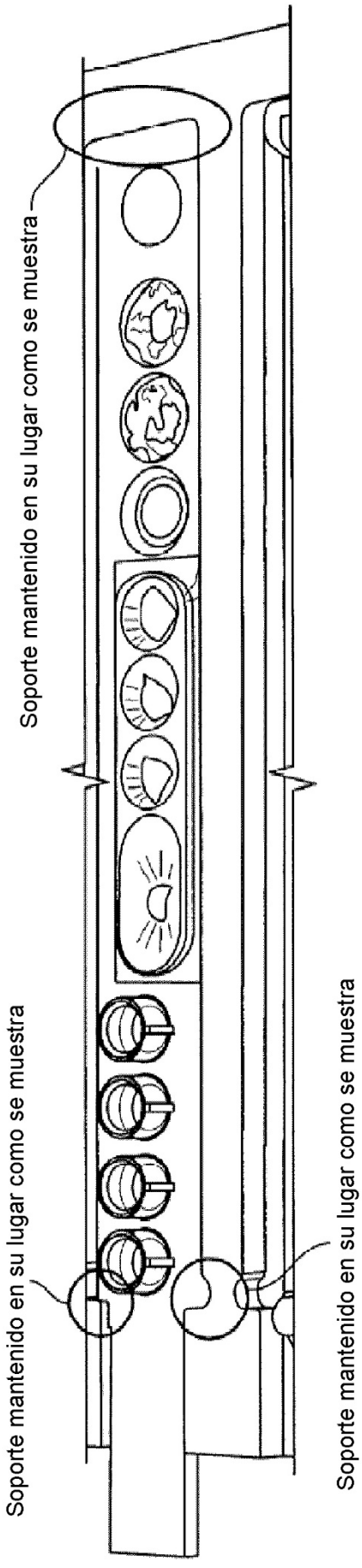

Soporte mantenido en su lugar como se muestra
Soporte mantenido en su lugar como se muestra
Soporte mantenido en su lugar como se muestra

FIG. 8J

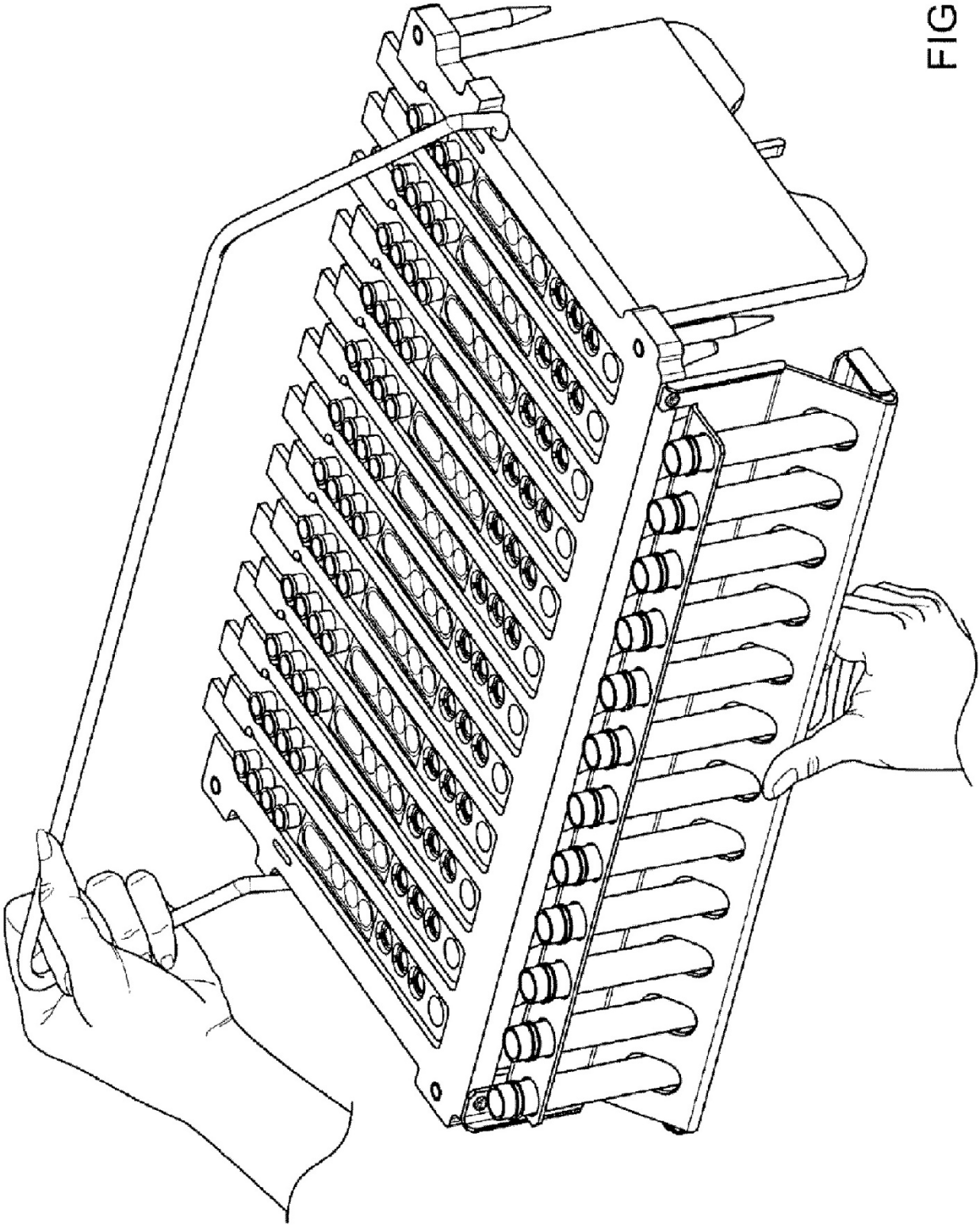


FIG. 8K

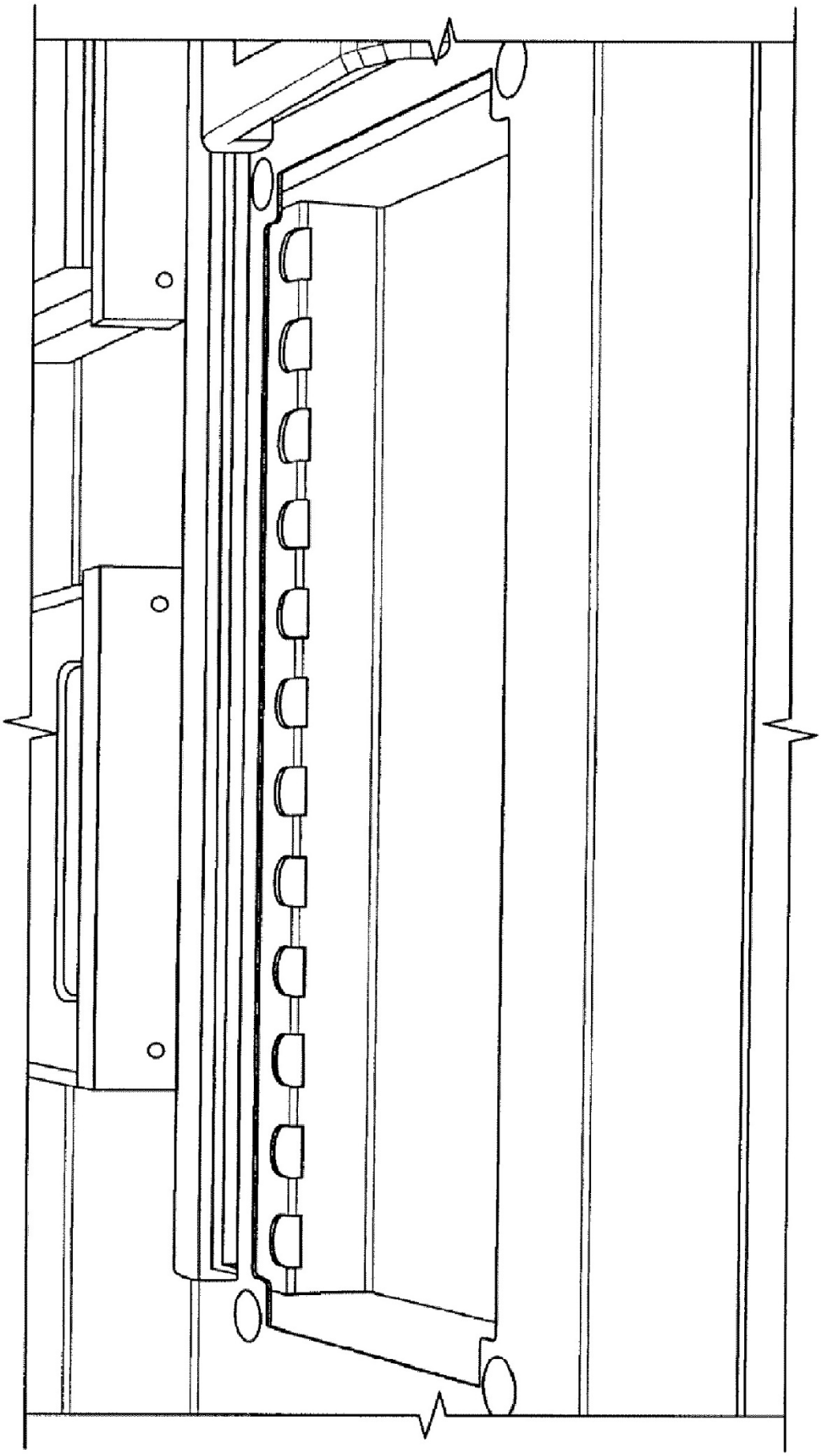


FIG. 9

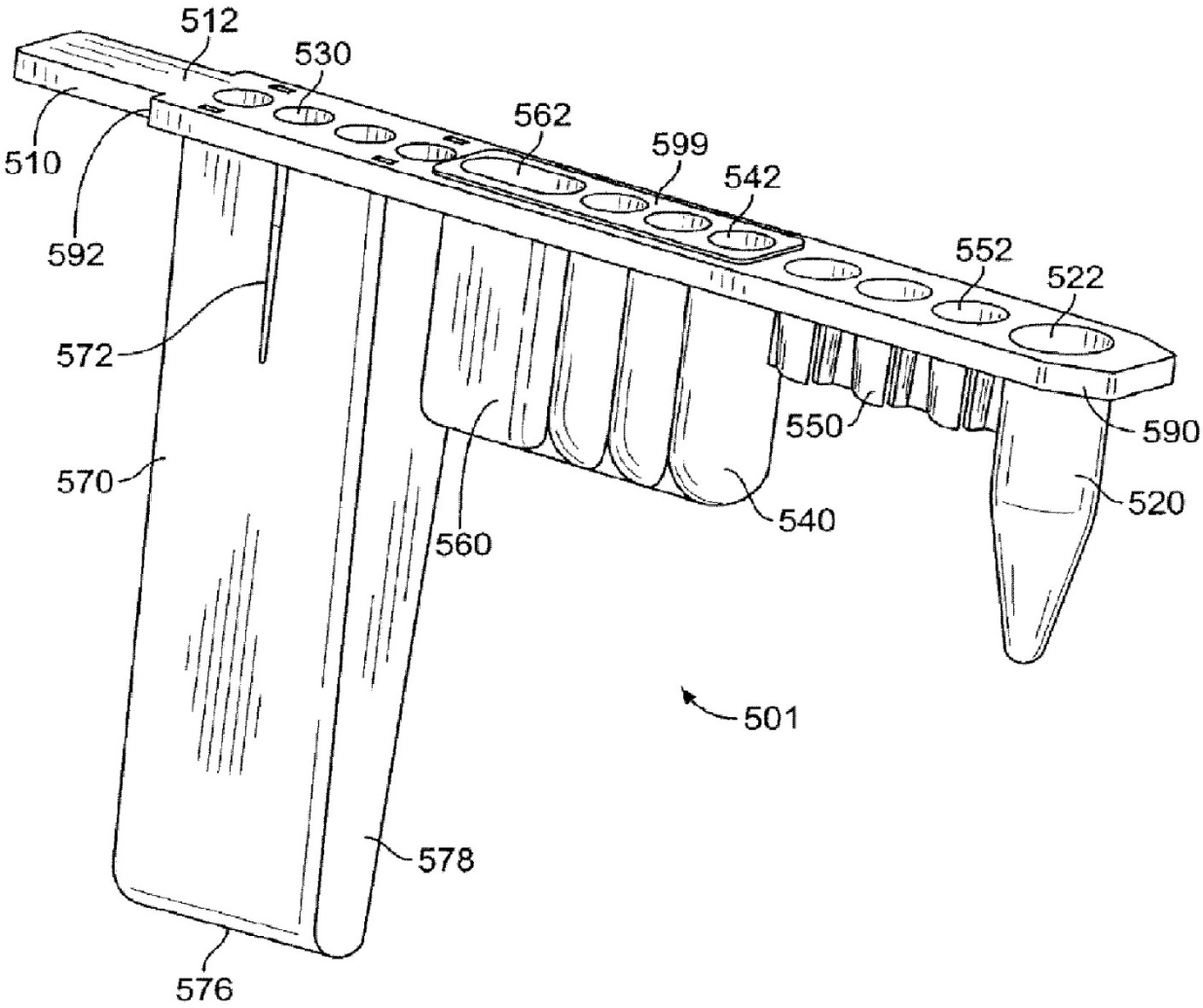


FIG. 10A

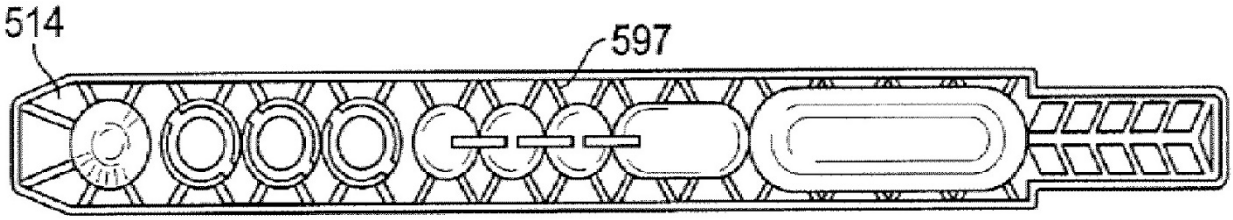


FIG. 10B

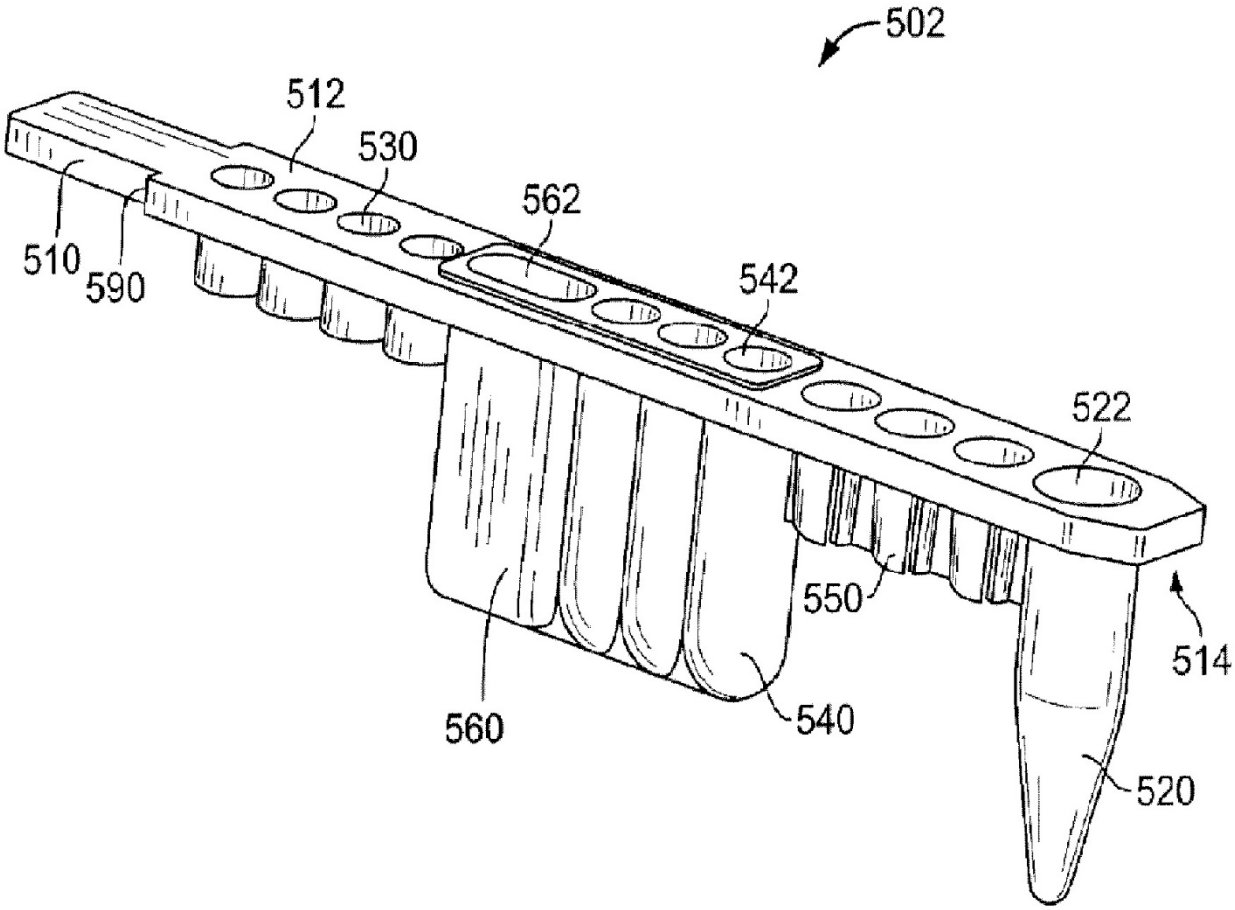


FIG. 11

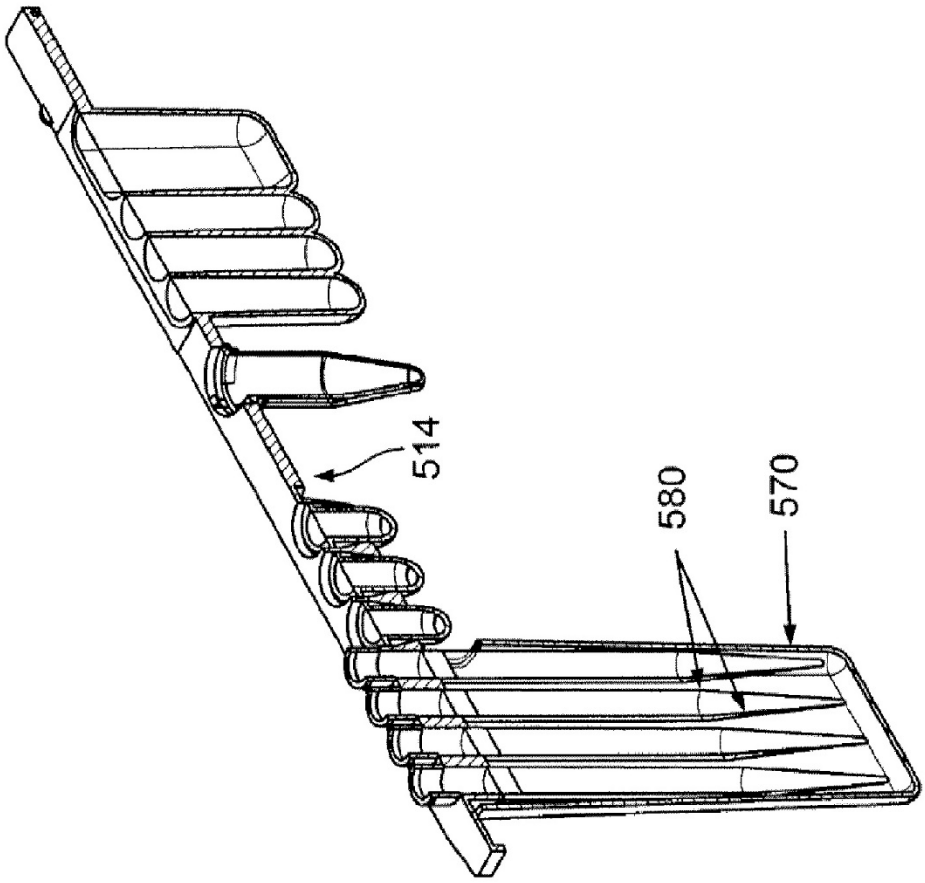


FIG. 12B

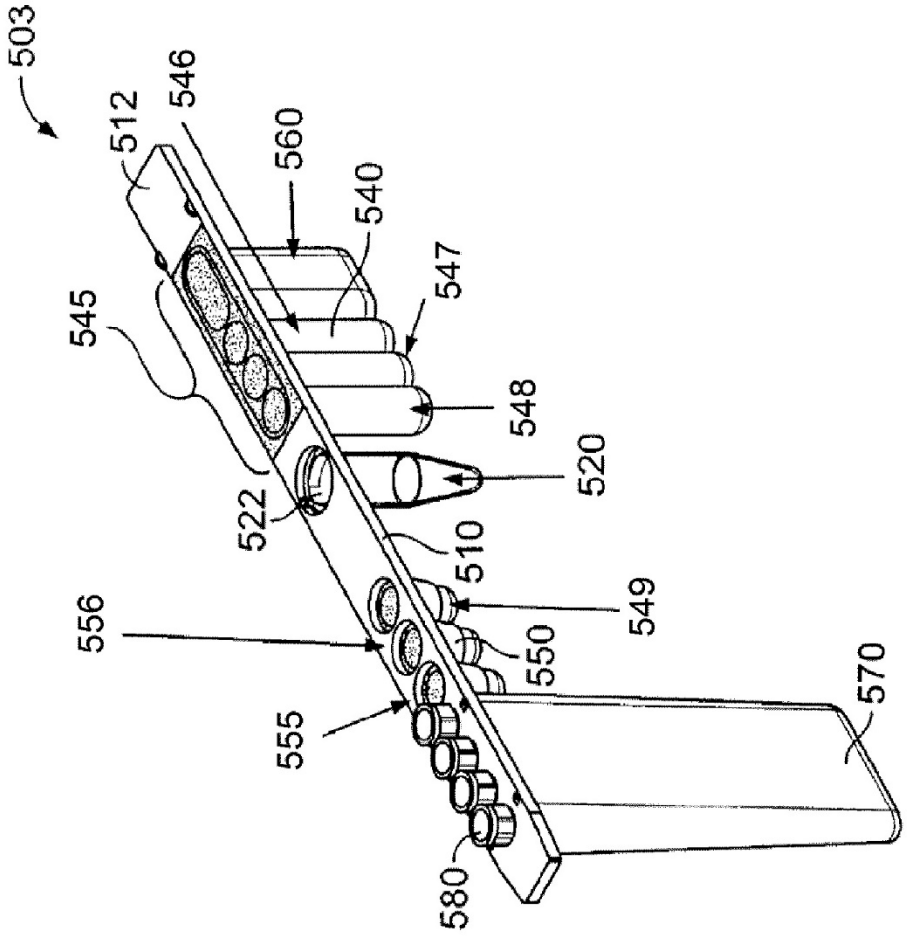


FIG. 12A

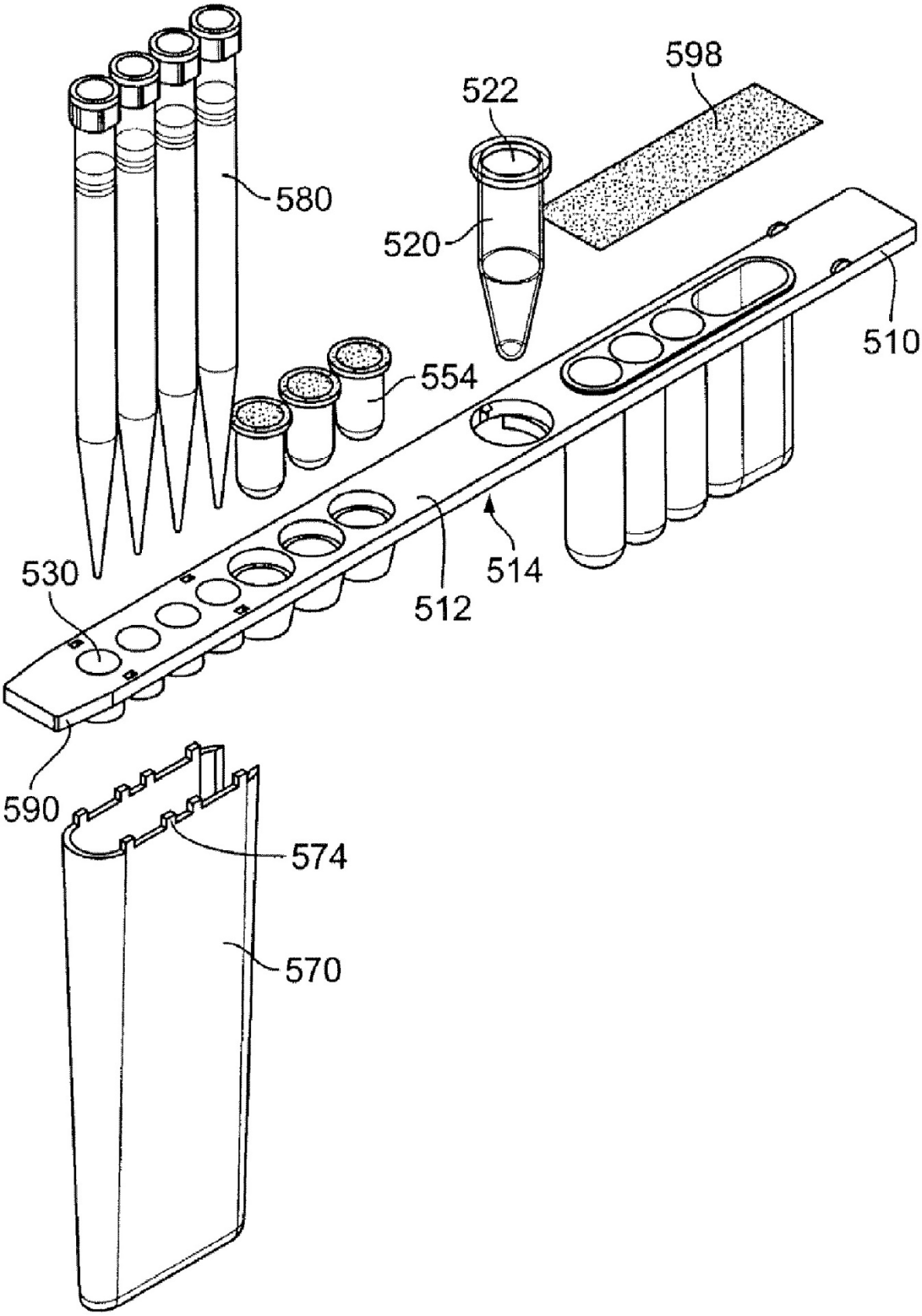


FIG. 12C

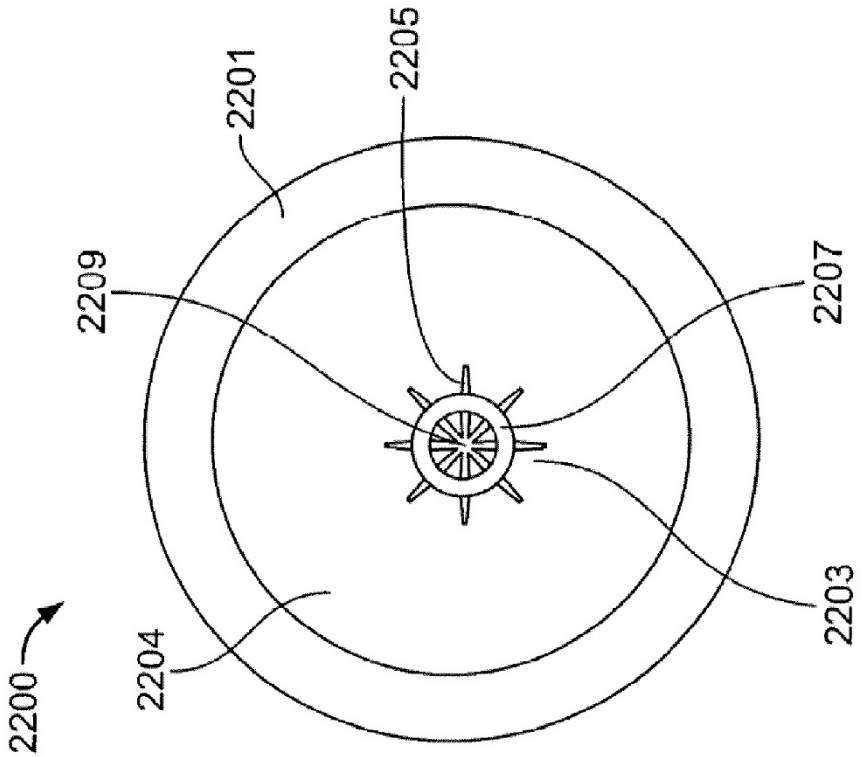


FIG. 13B

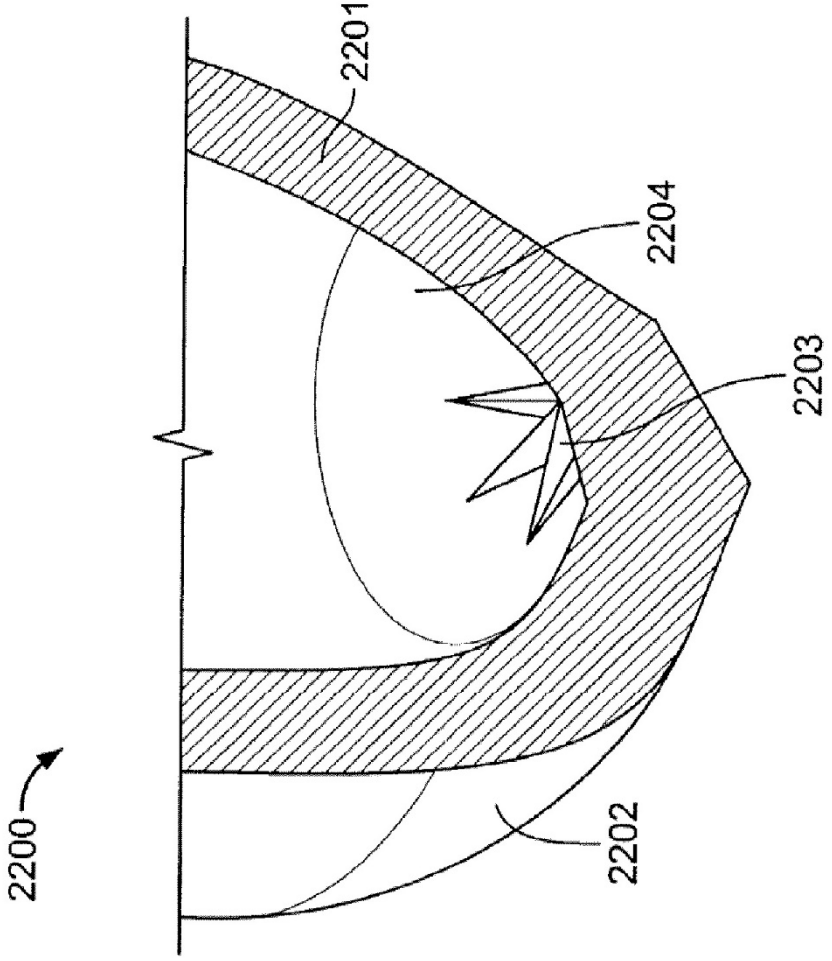


FIG. 13A

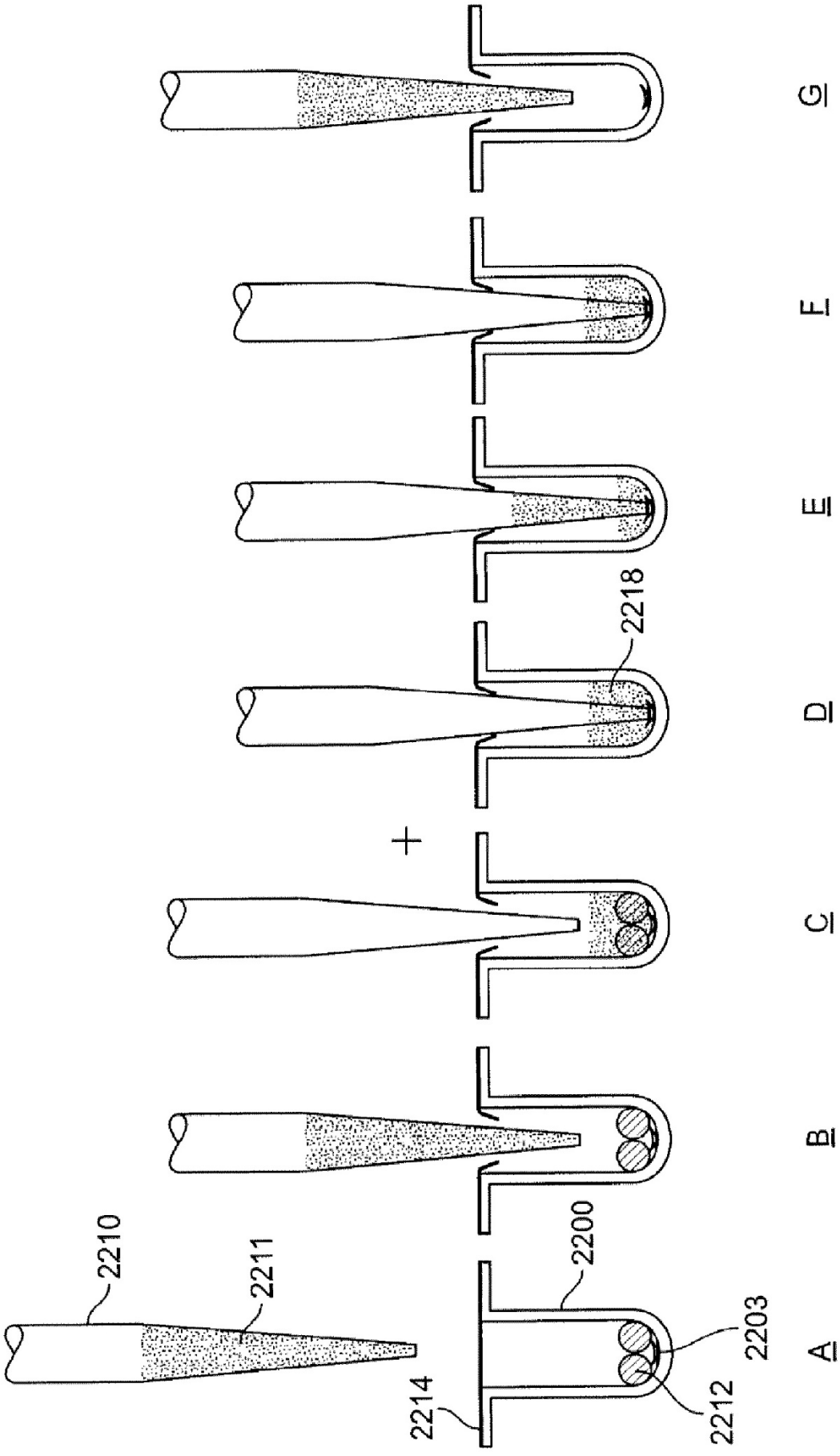


FIG. 14

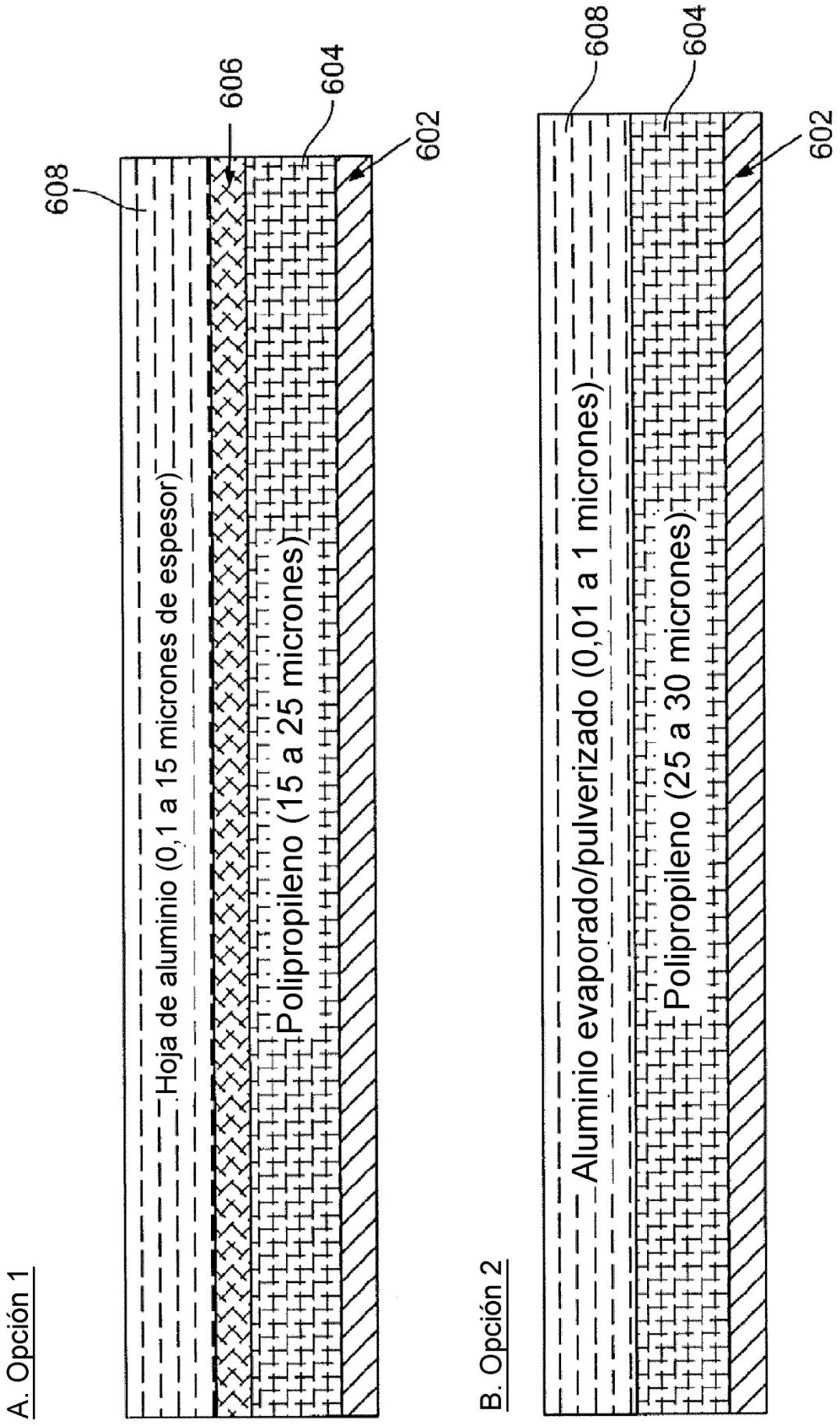

A. Opción 1
608
606
604
602
Hoja de aluminio (0,1 a 15 micrones de espesor)
Polipropileno (15 a 25 micrones)
B. Opción 2
608
604
602
Aluminio evaporado/pulverizado (0,01 a 1 micrones)
Polipropileno (25 a 30 micrones)

FIG. 15

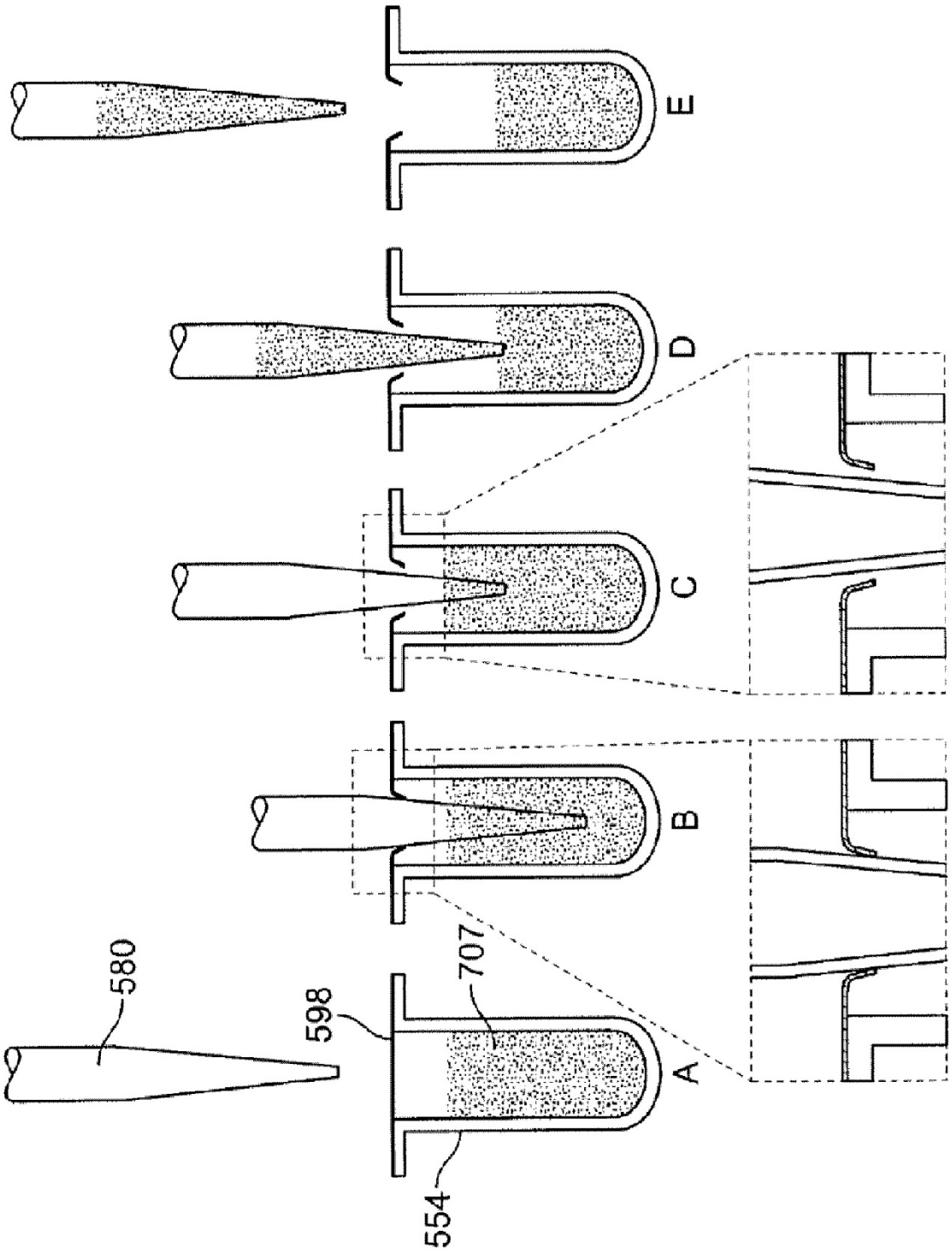


FIG. 16

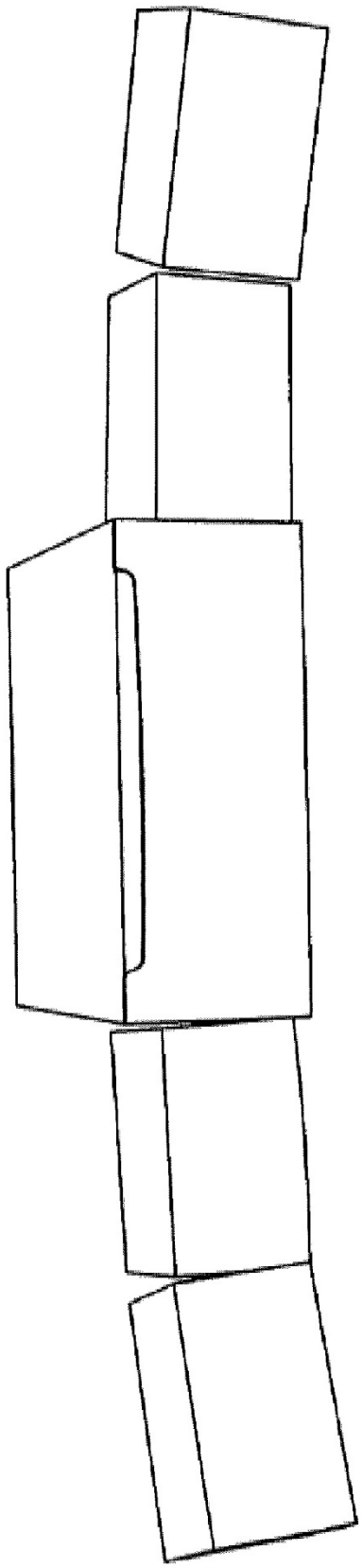


FIG. 17A

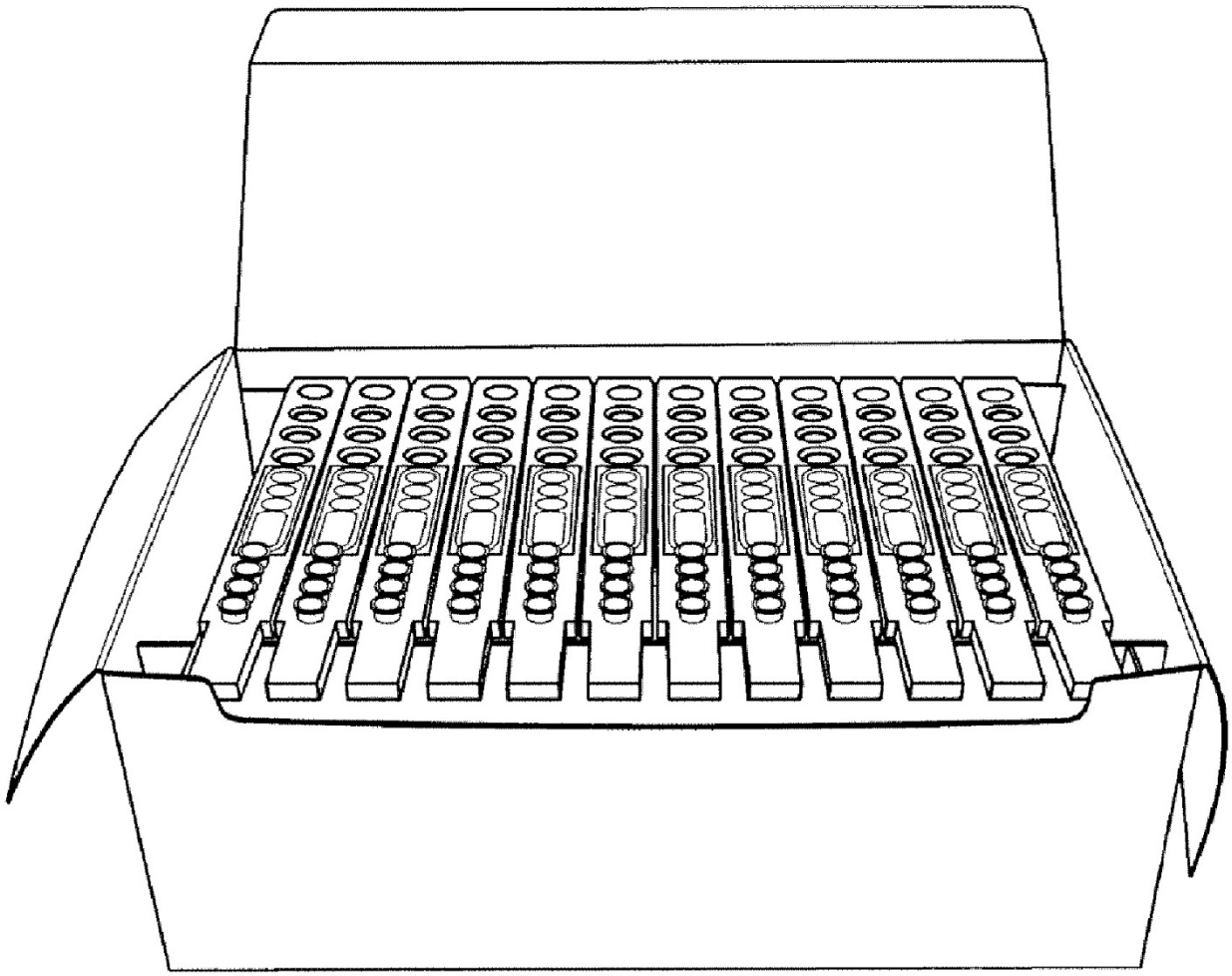


FIG. 17B

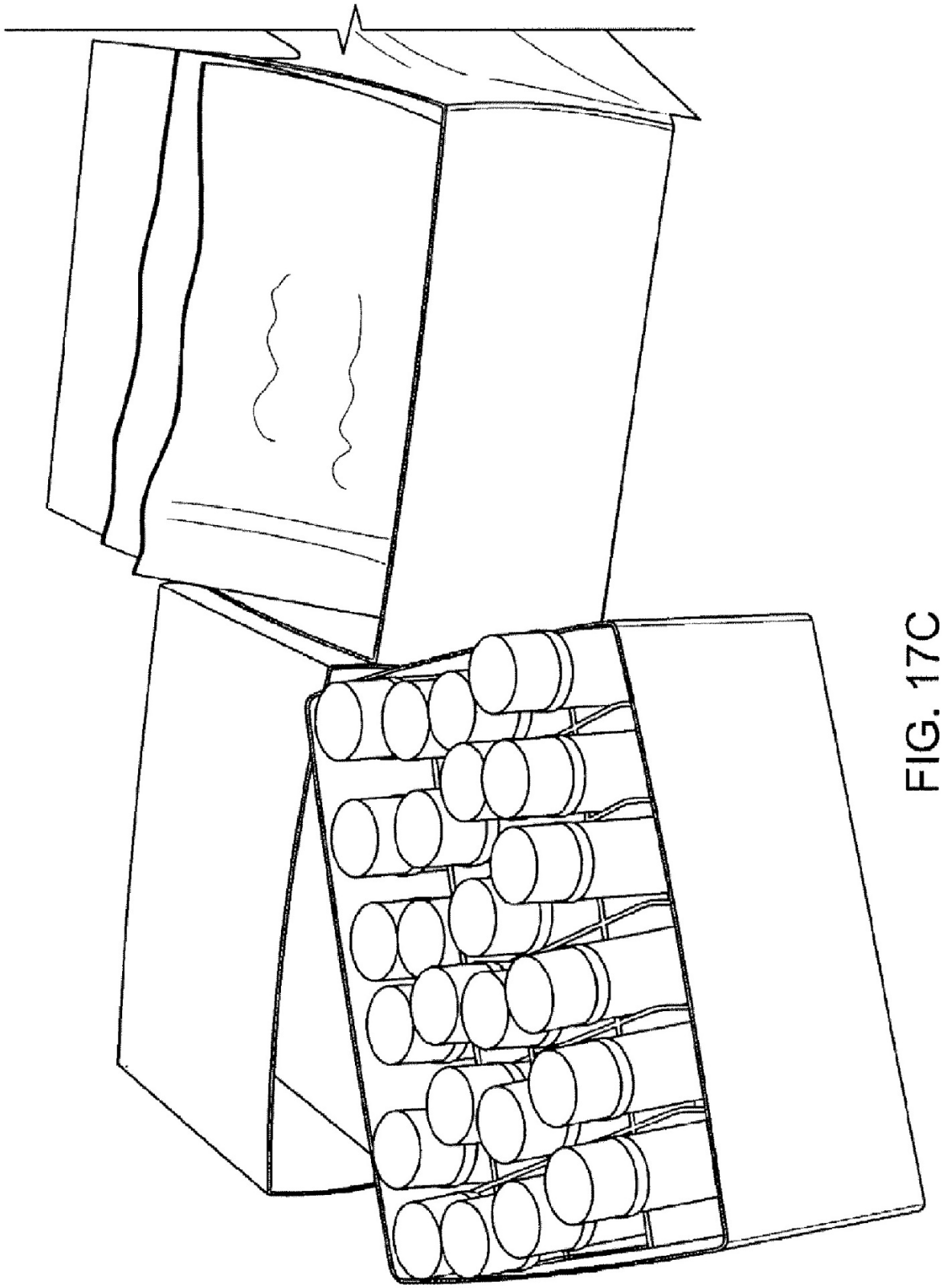


FIG. 17C

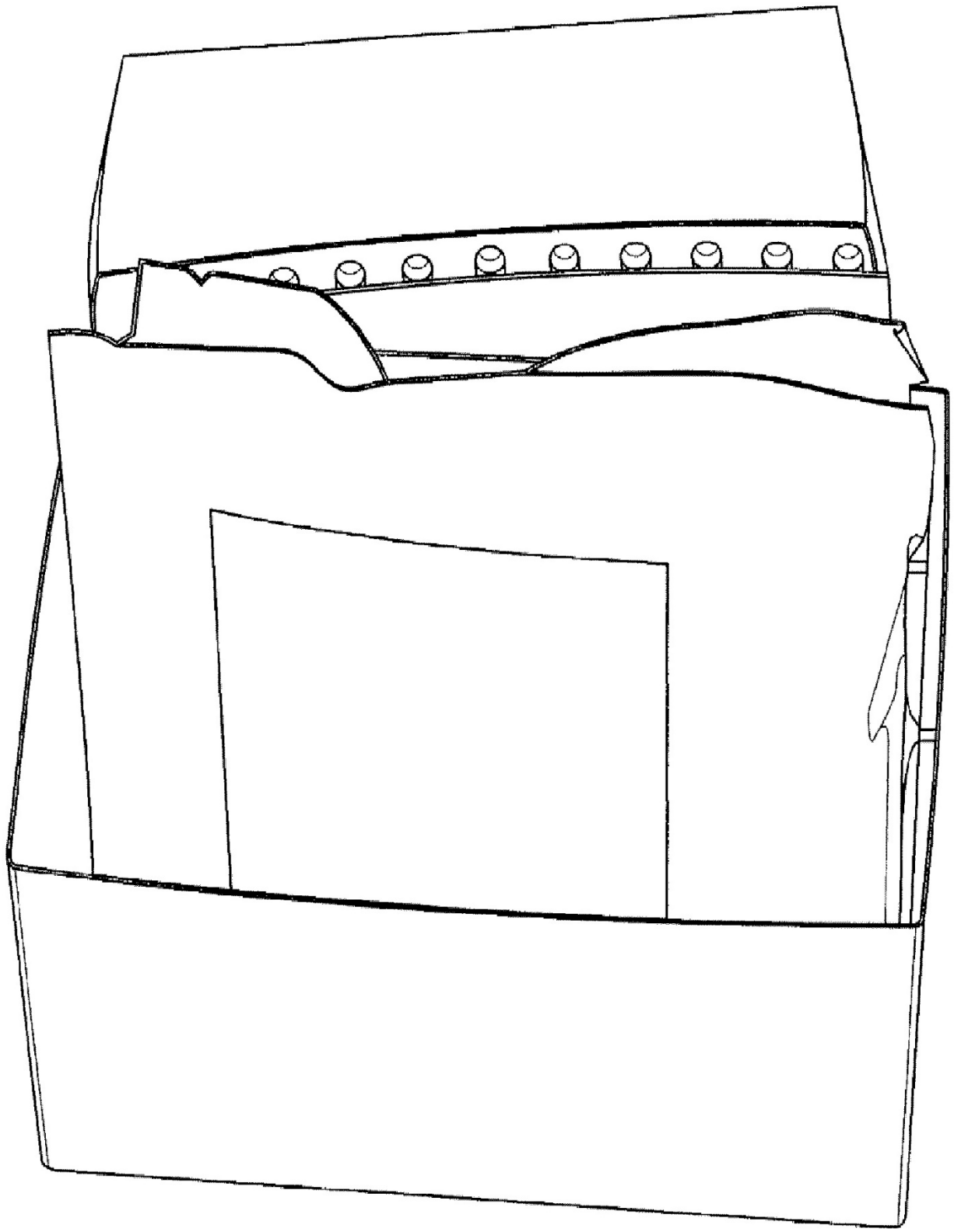


FIG. 17D

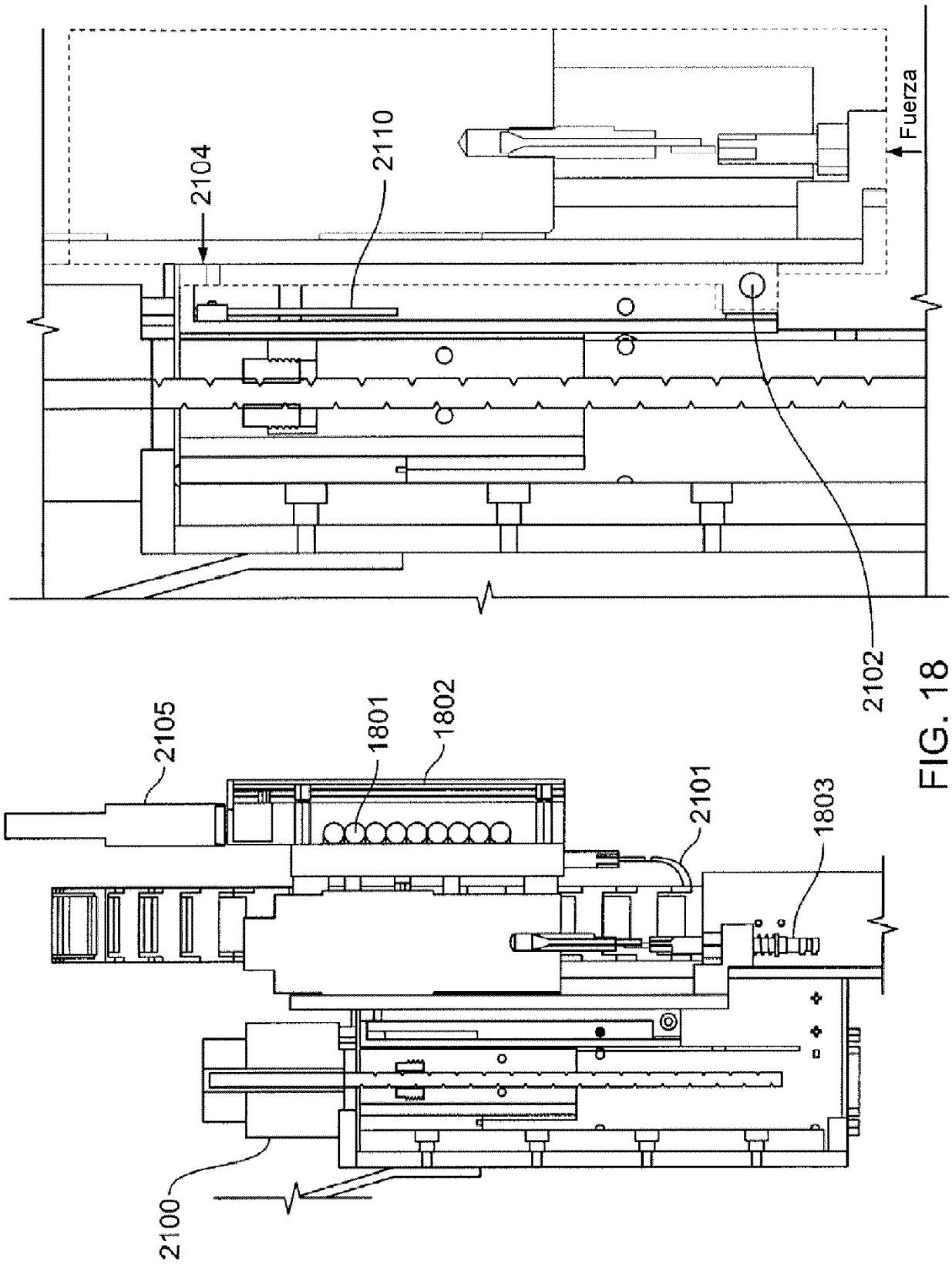


FIG. 18

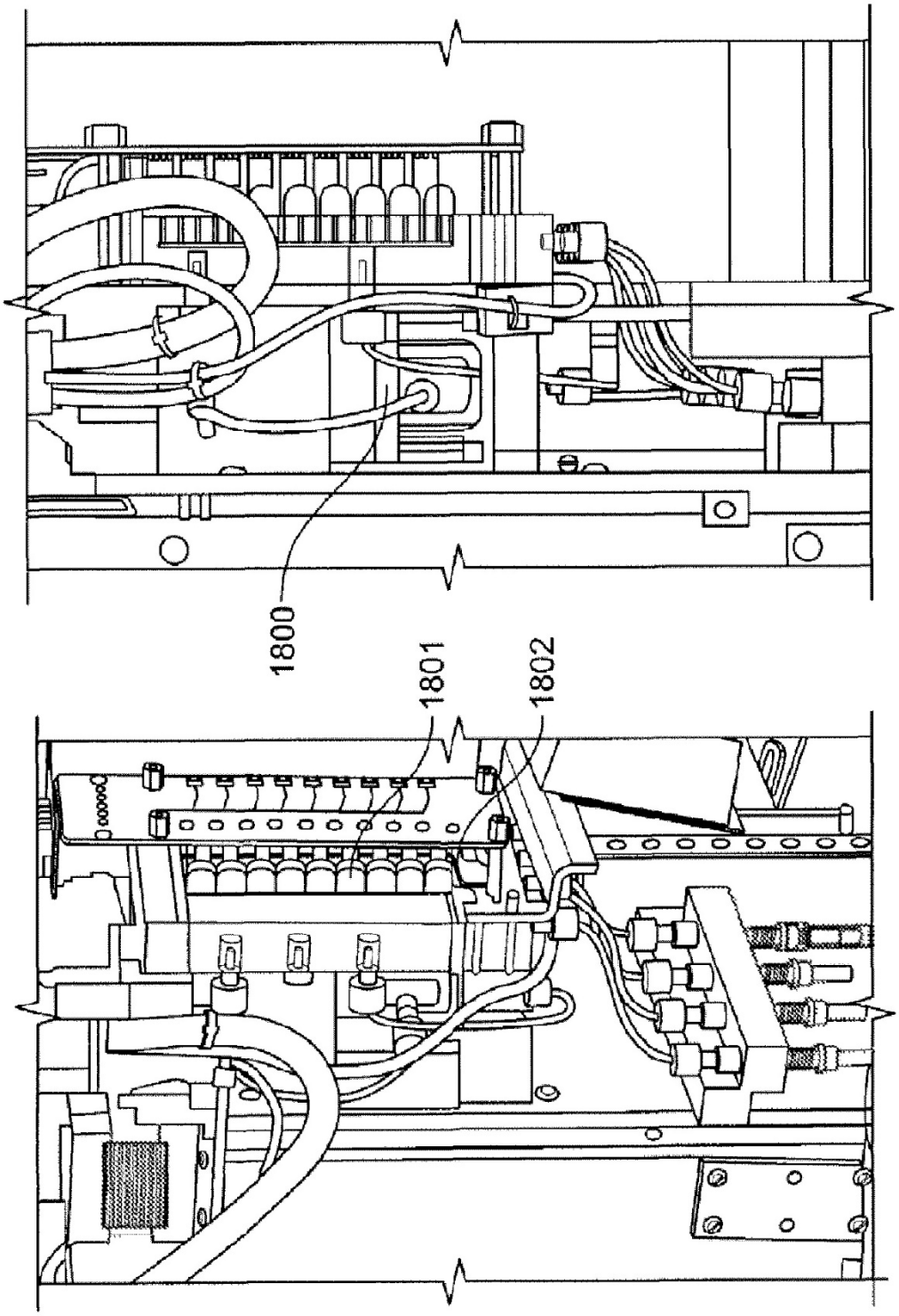


FIG. 19B

FIG. 19A

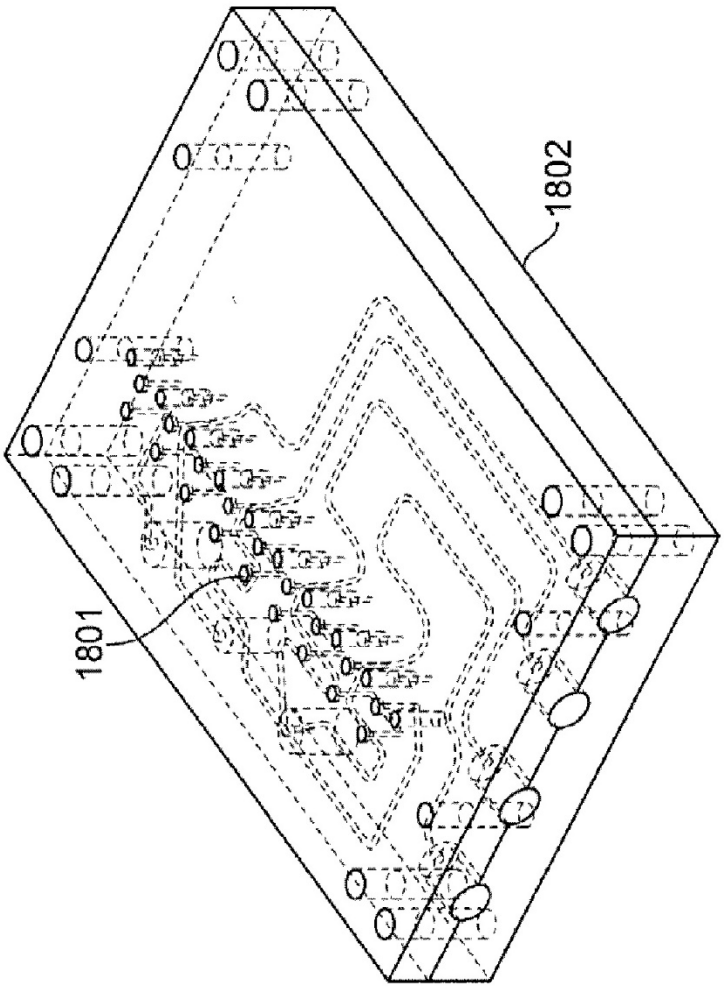


FIG. 20

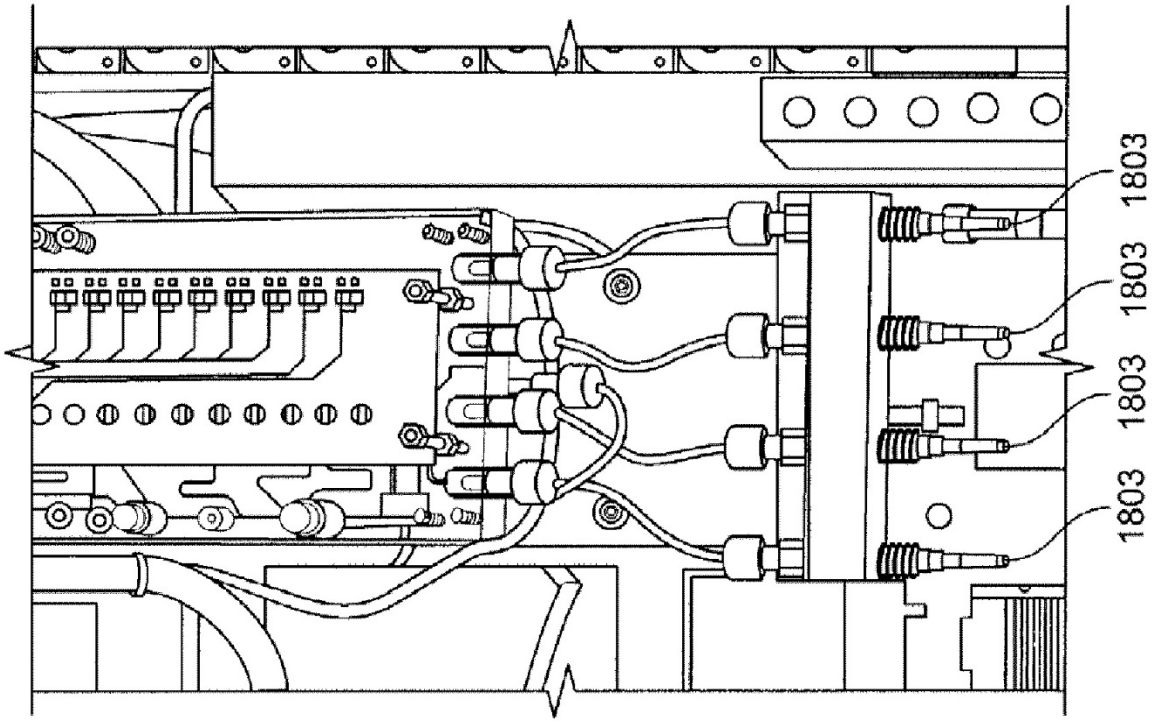


FIG. 19C

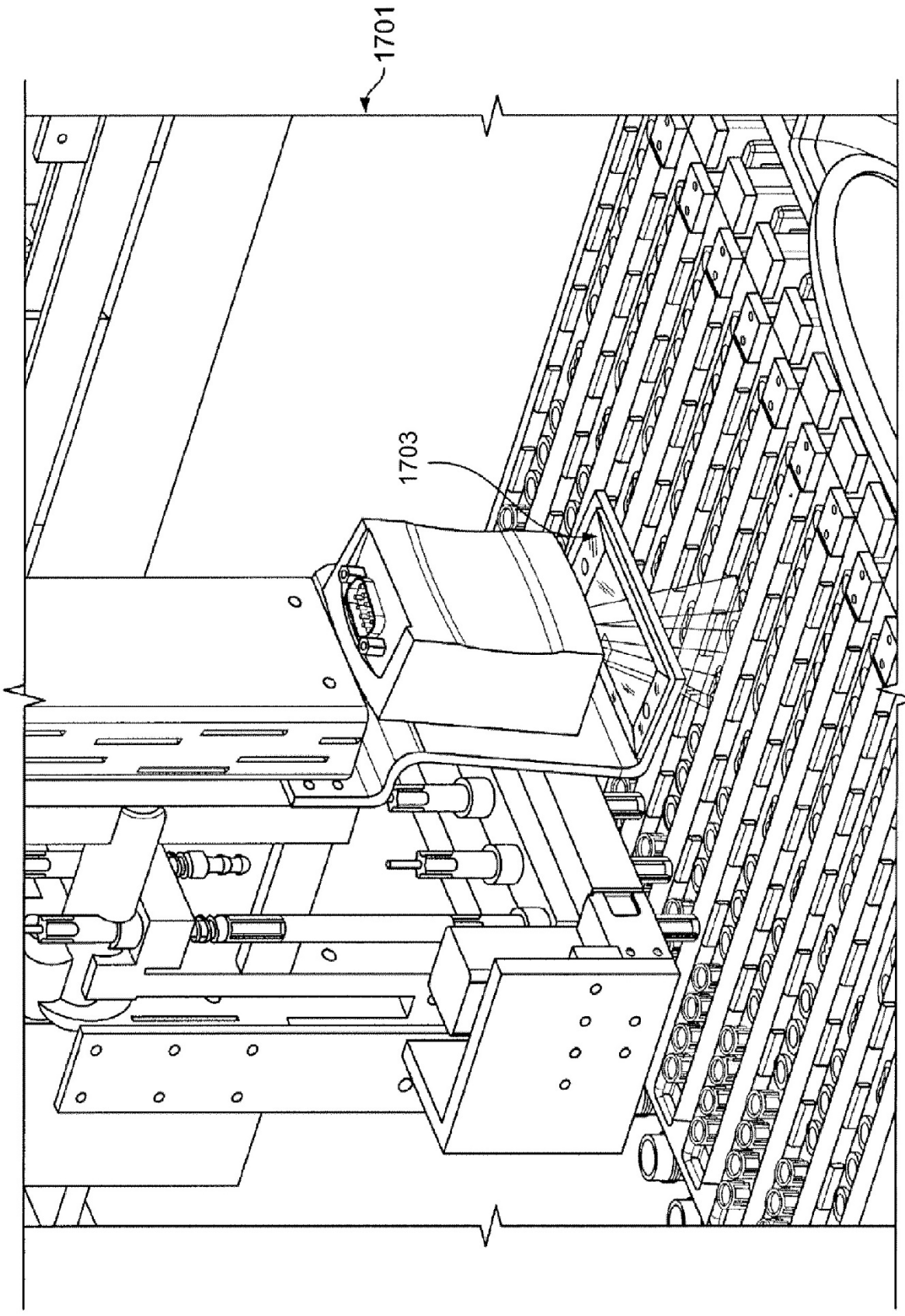


FIG. 21

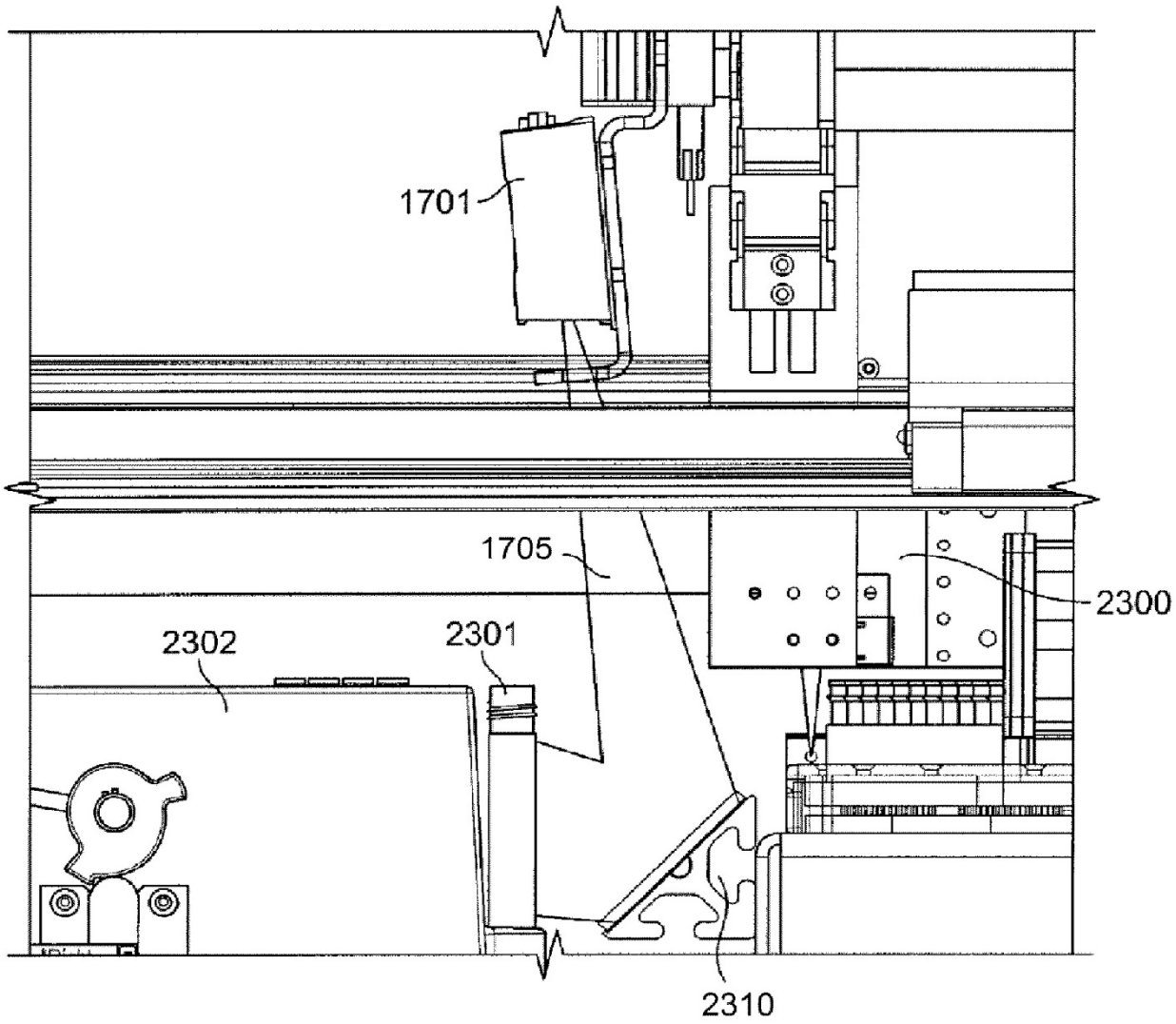
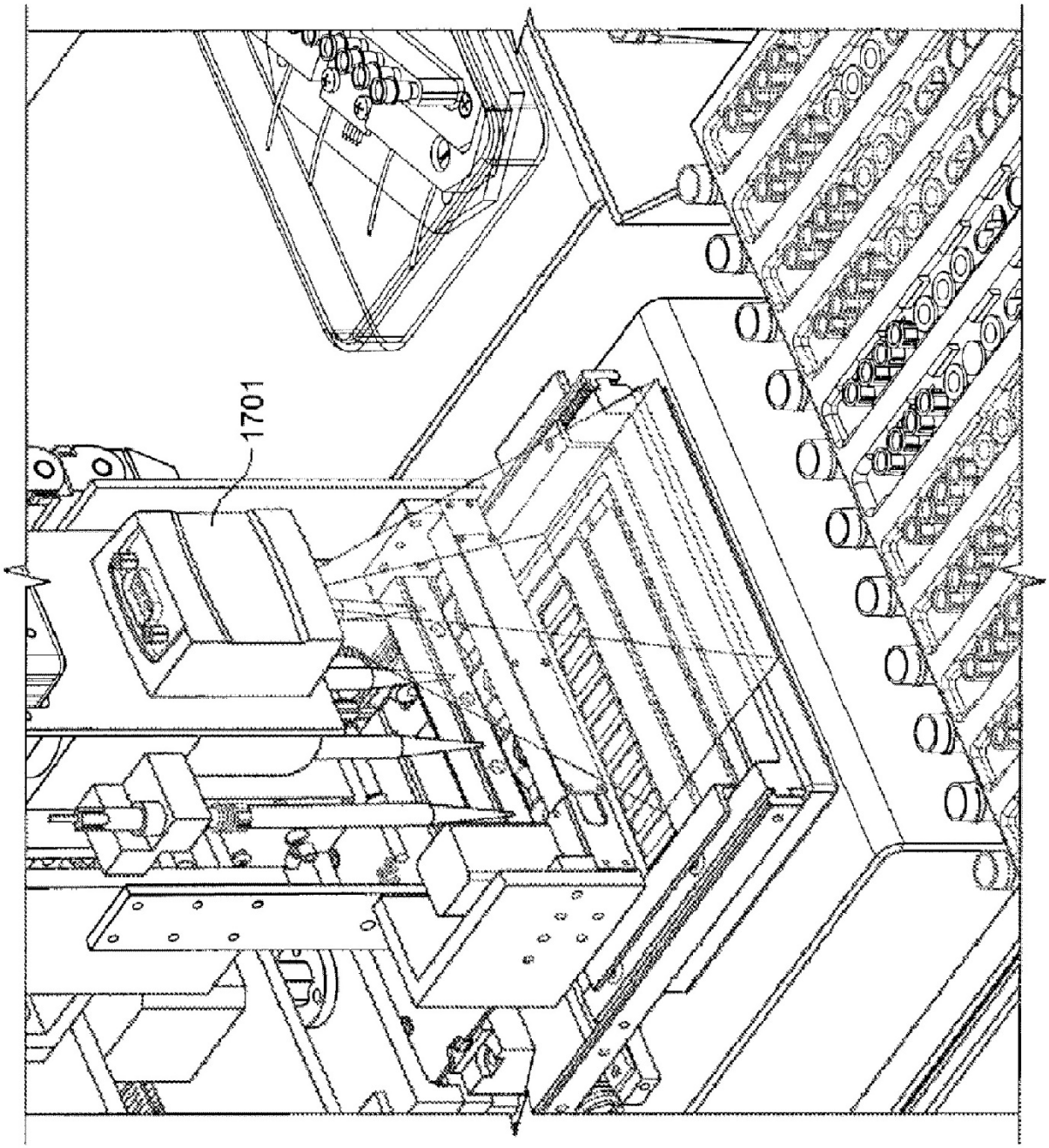


FIG. 22

FIG. 23



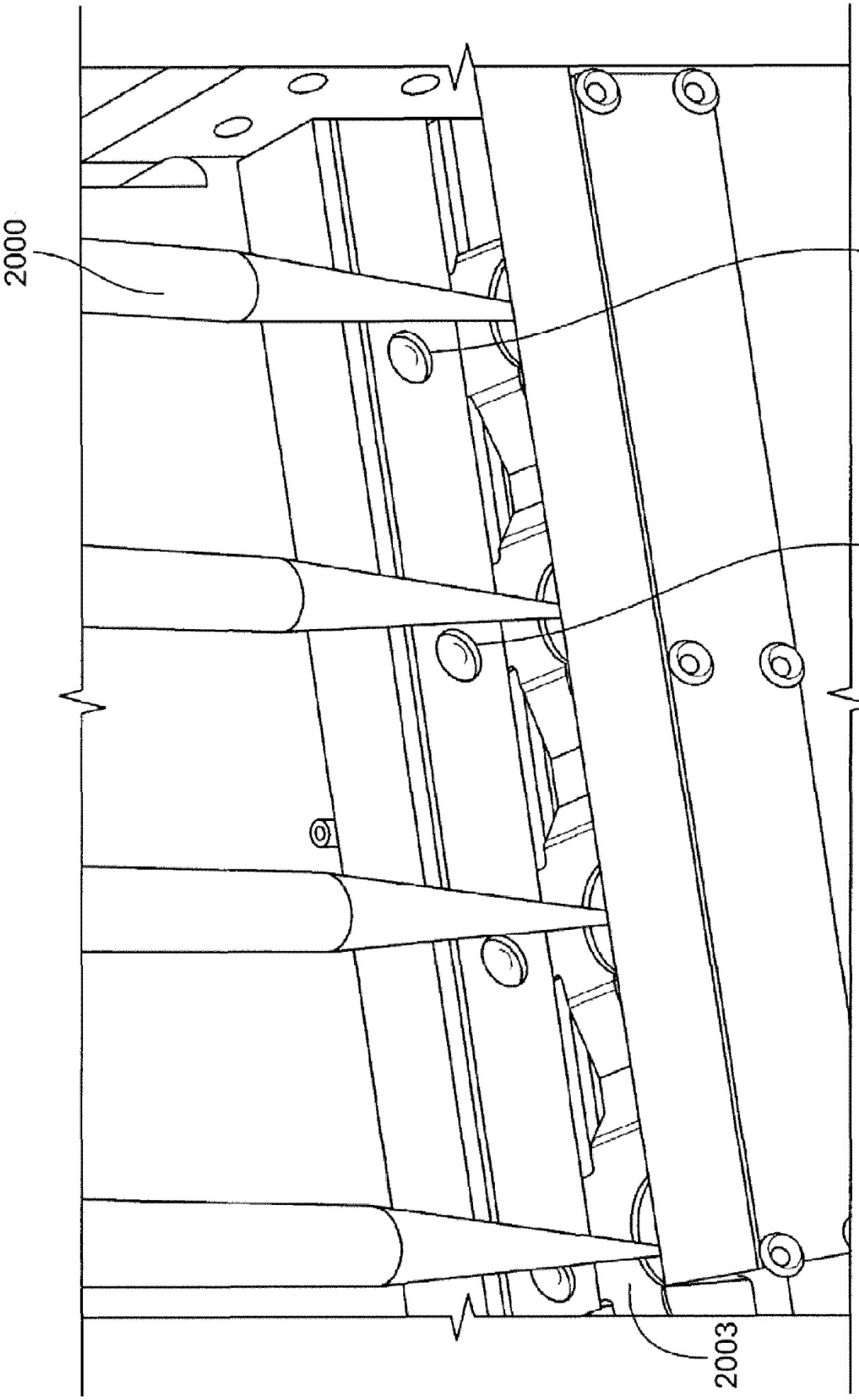


FIG. 24

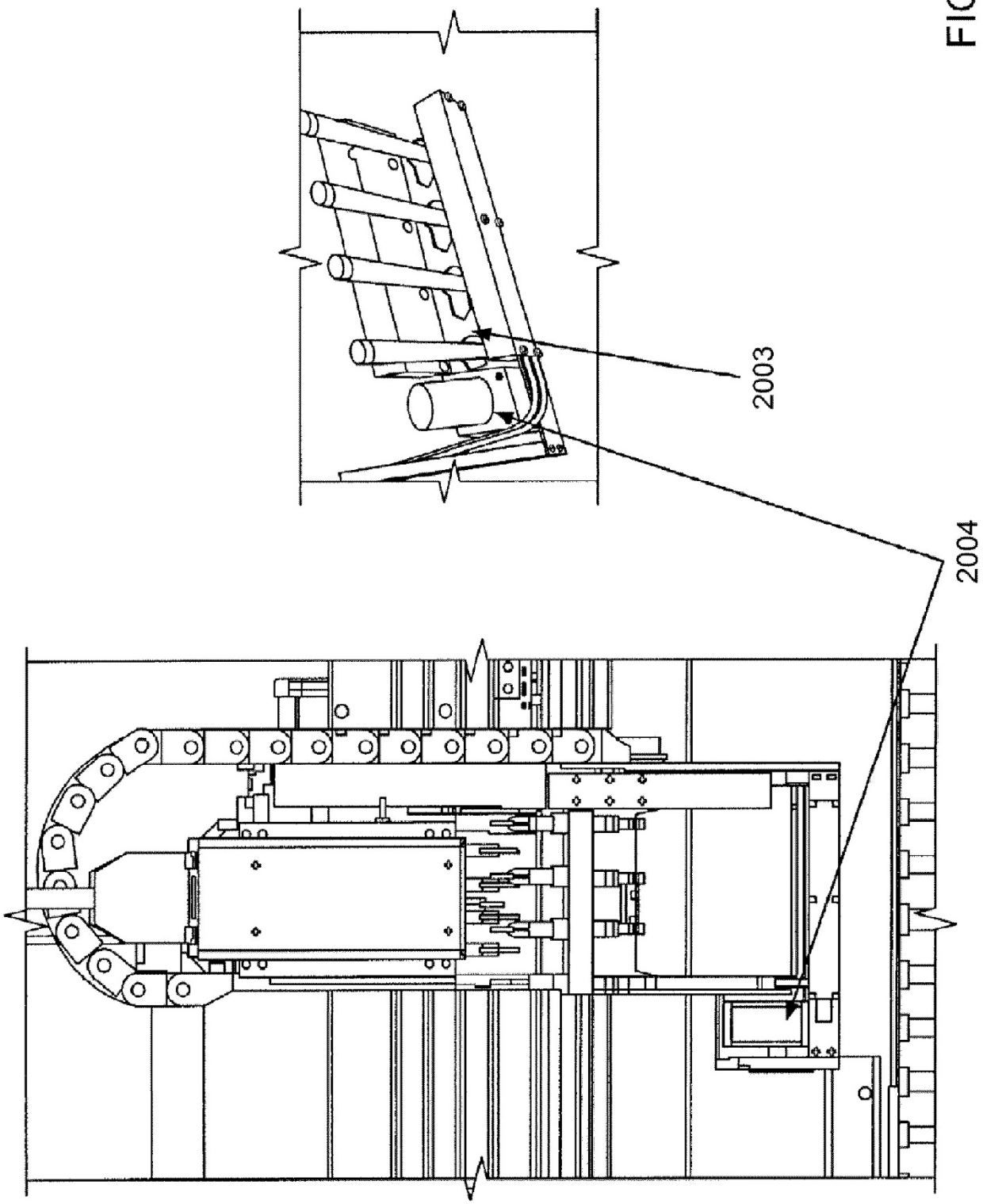


FIG. 25A

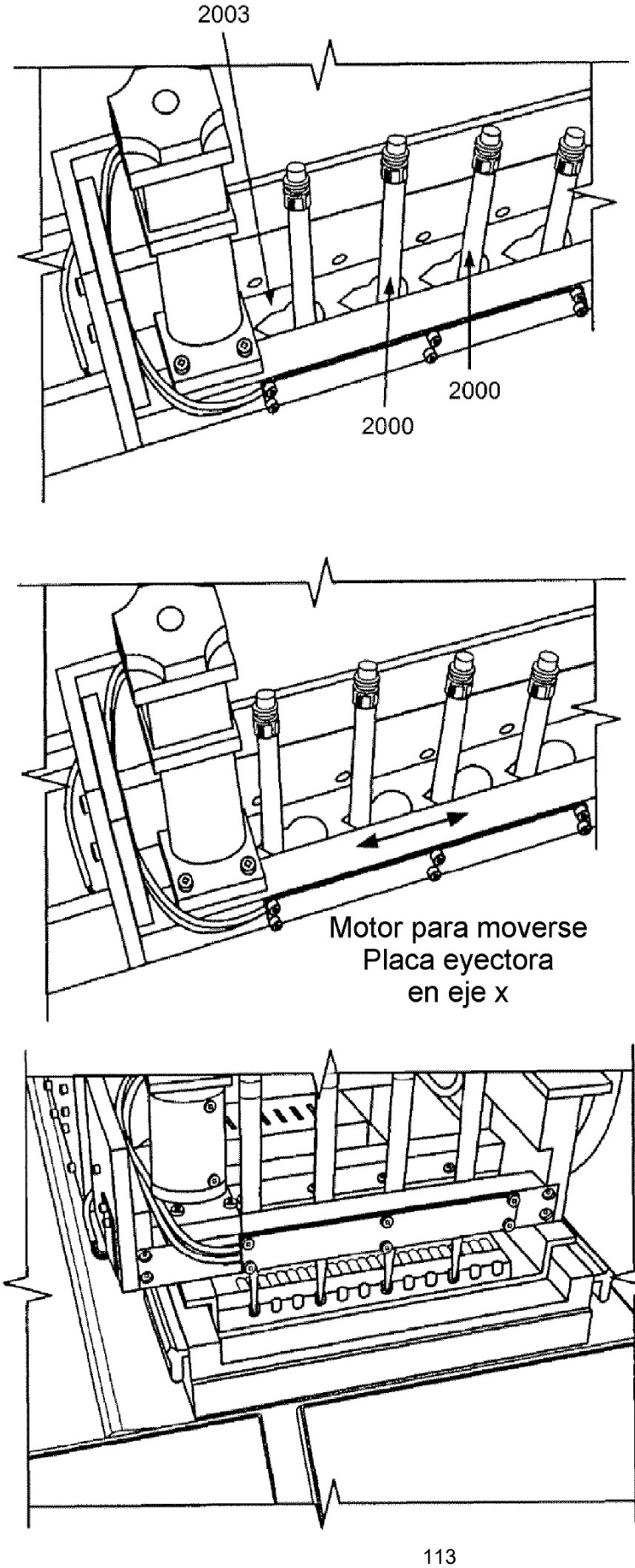


FIG. 25B

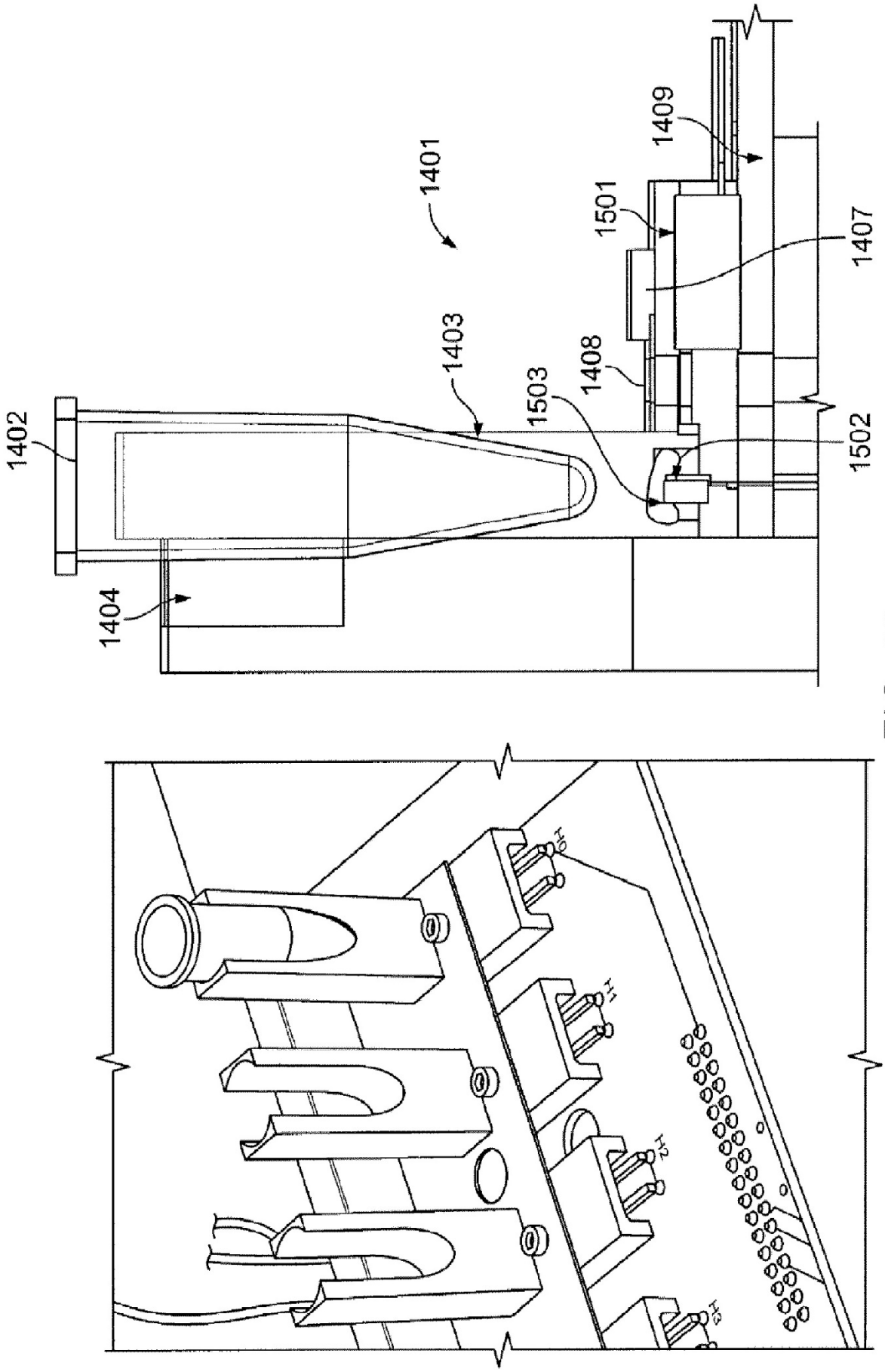


FIG. 26

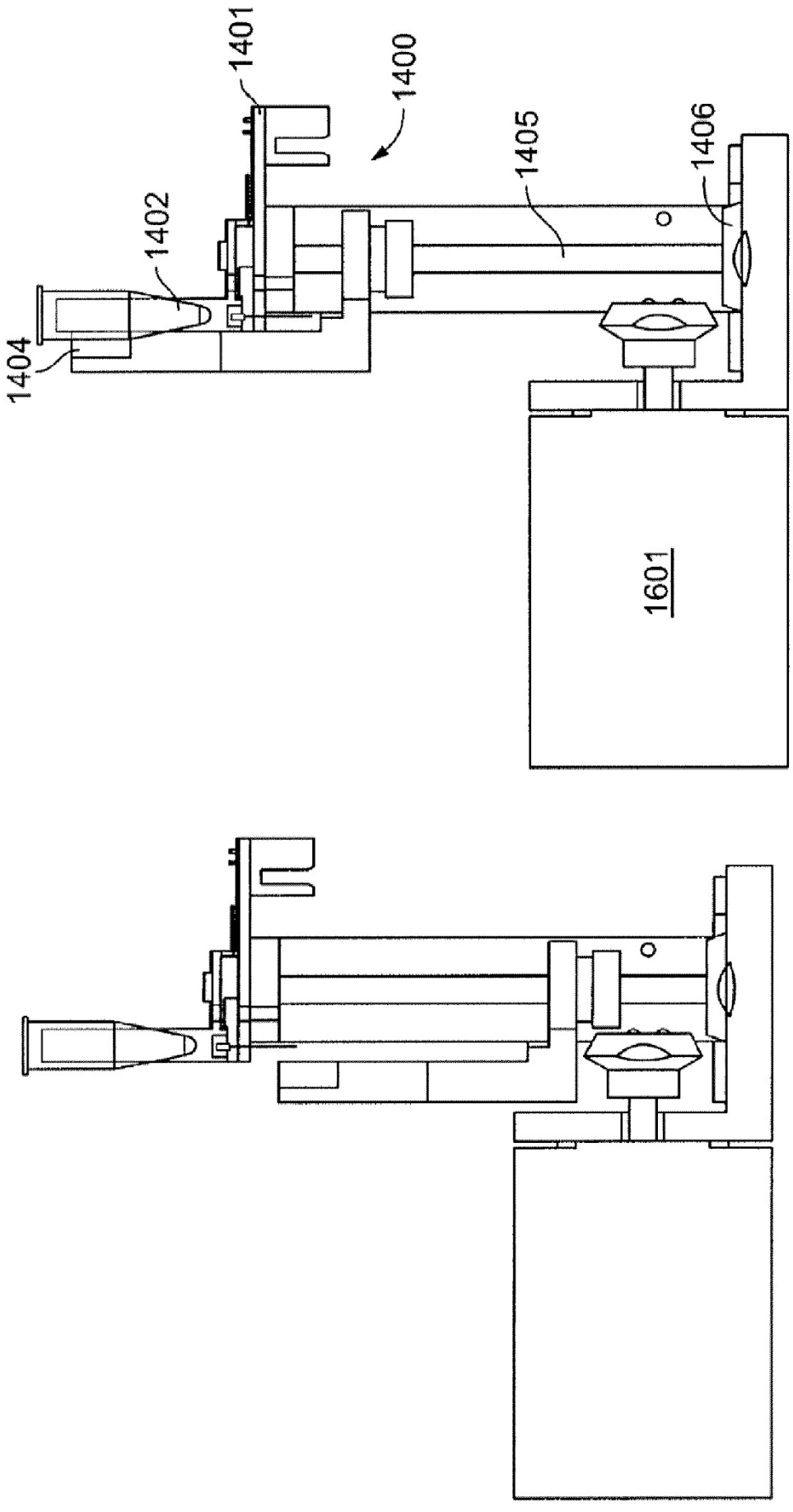


FIG. 27

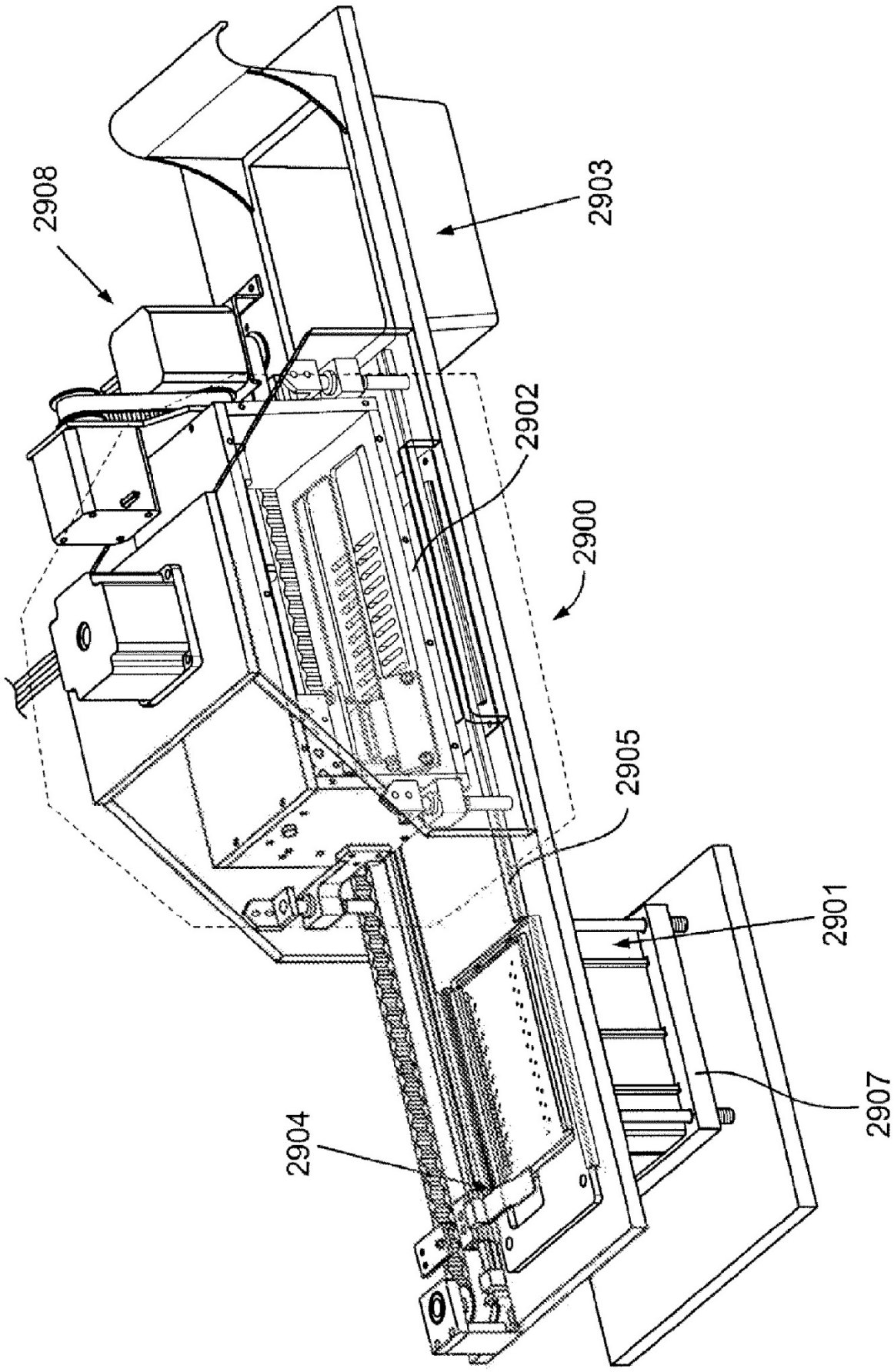


FIG. 28

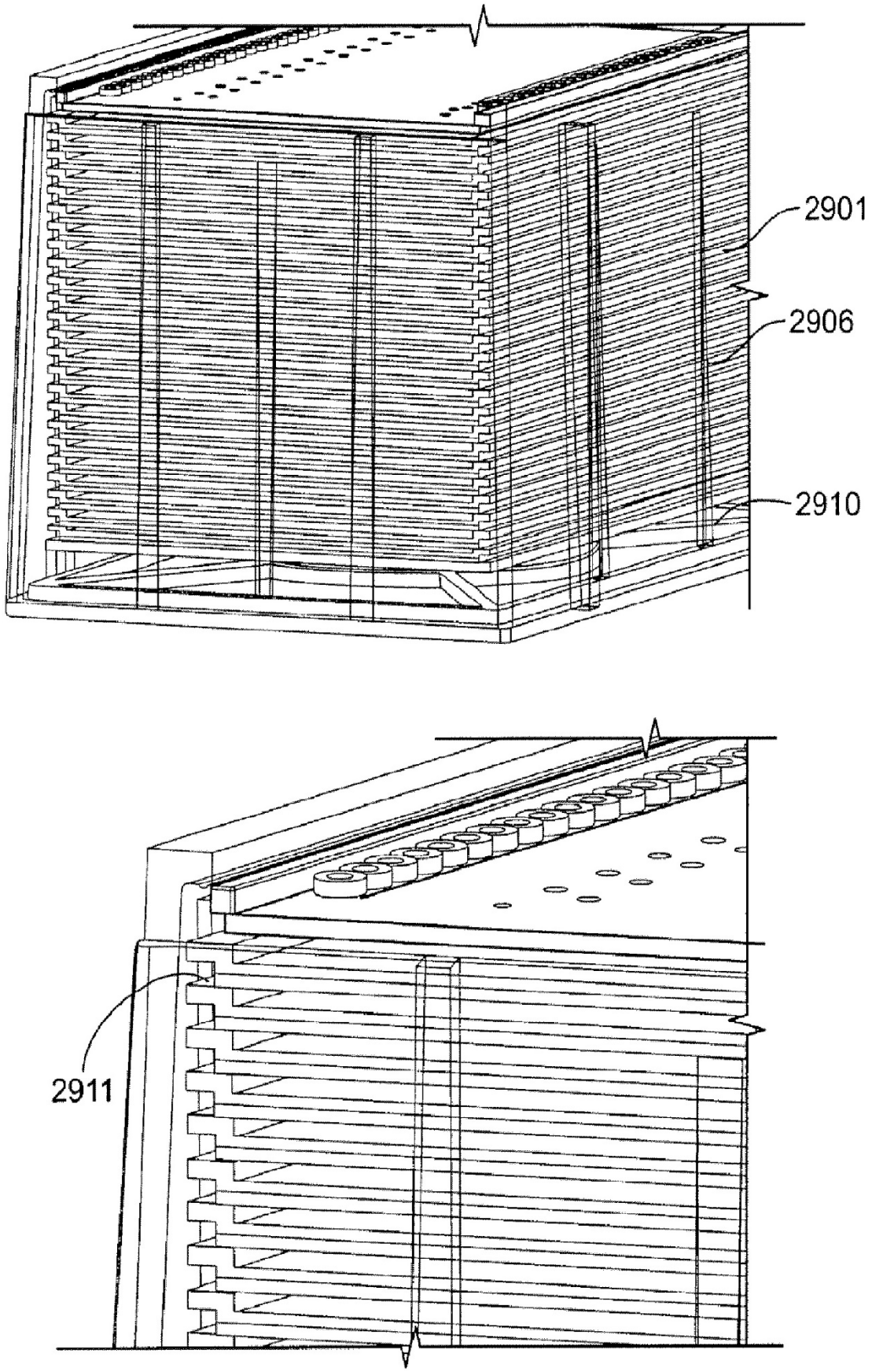


FIG. 29

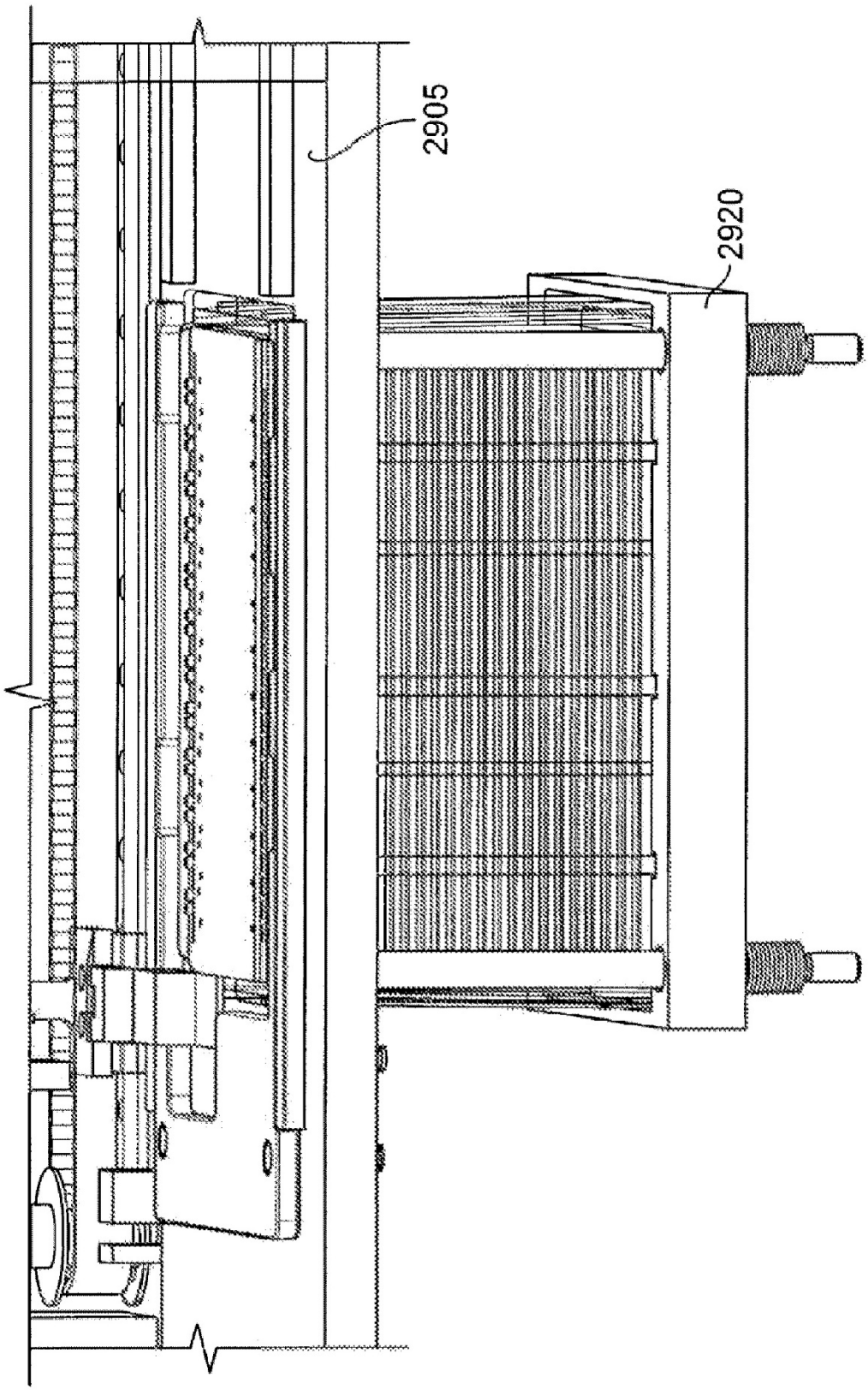


FIG. 30

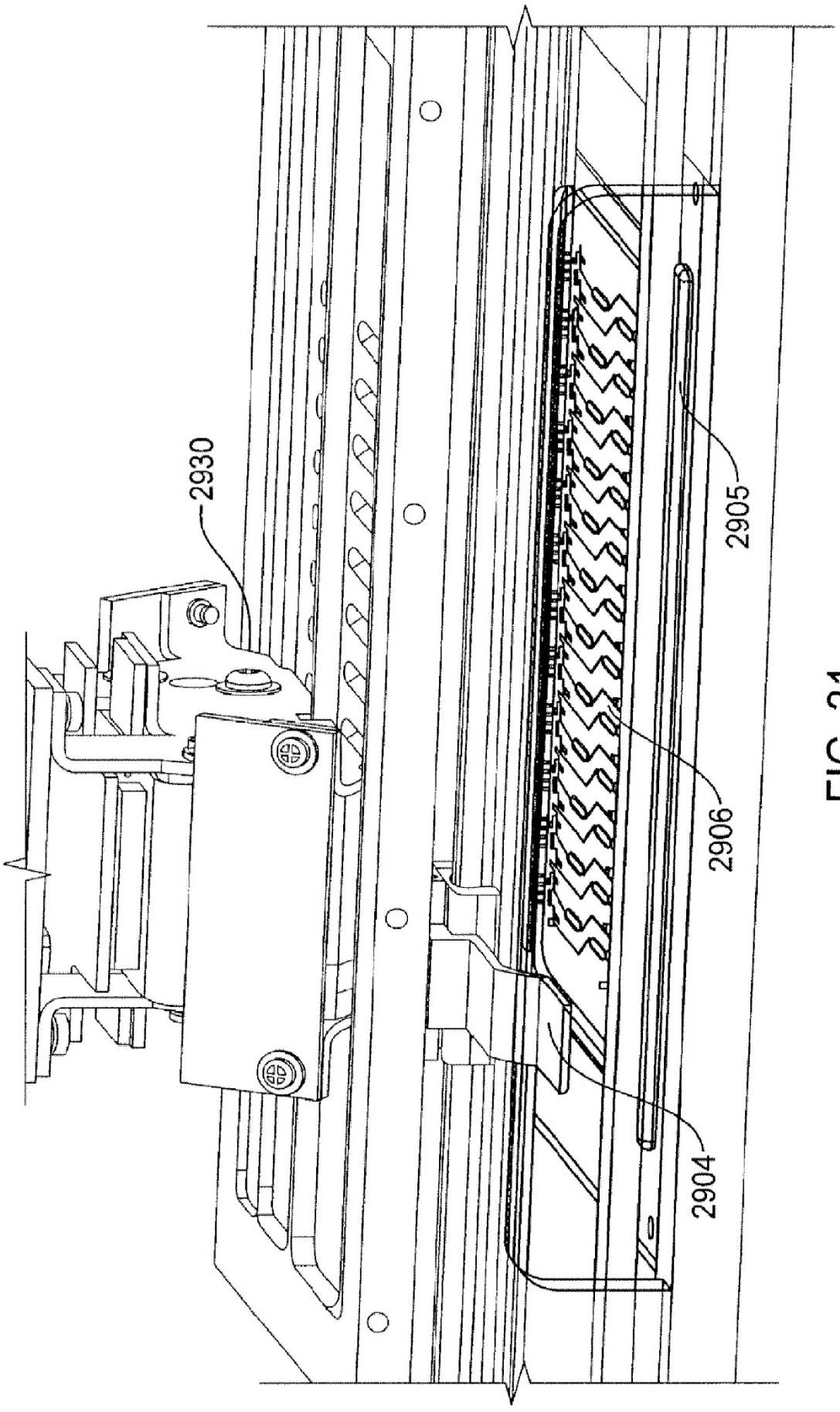


FIG. 31

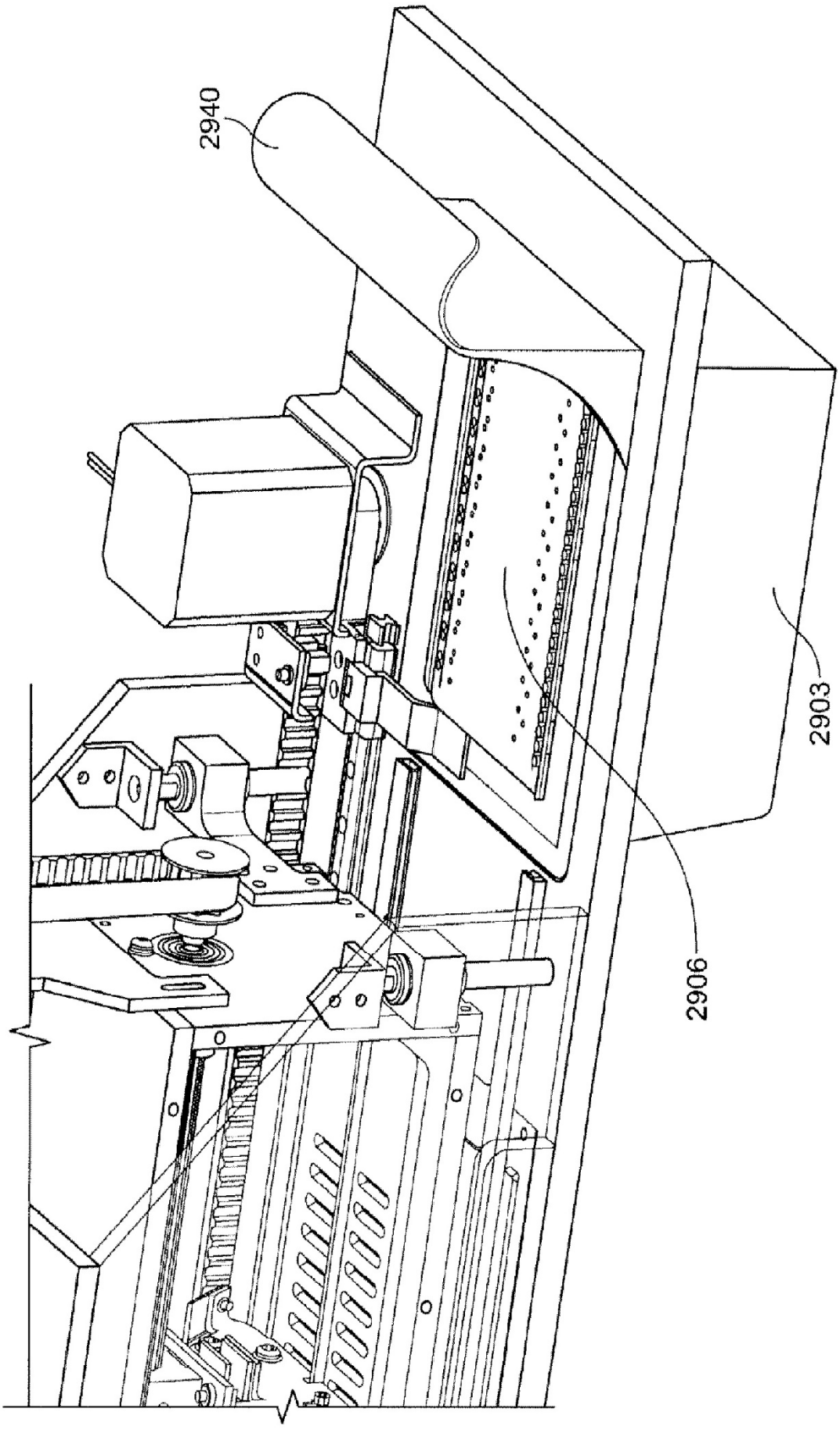


FIG. 32

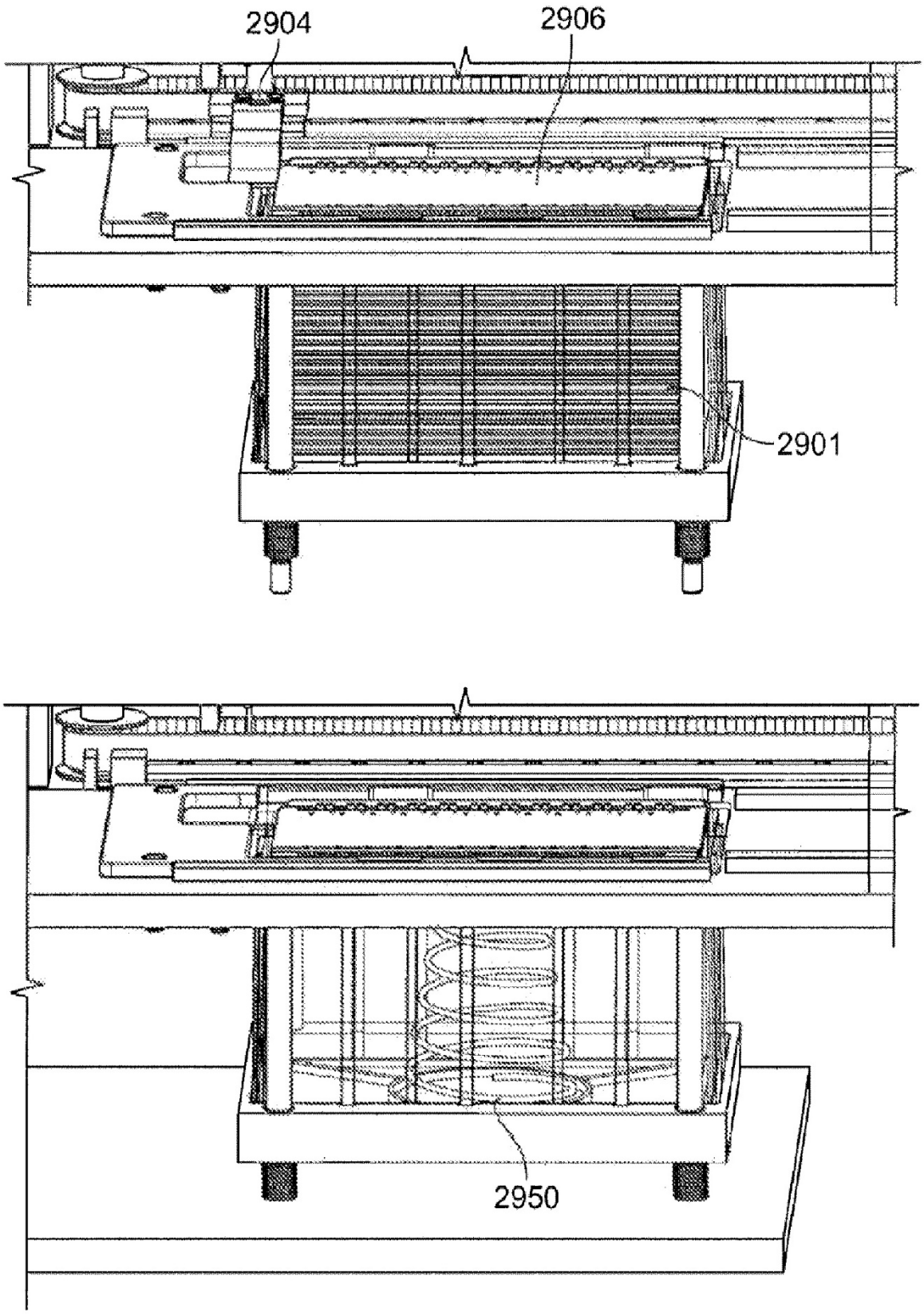


FIG. 33

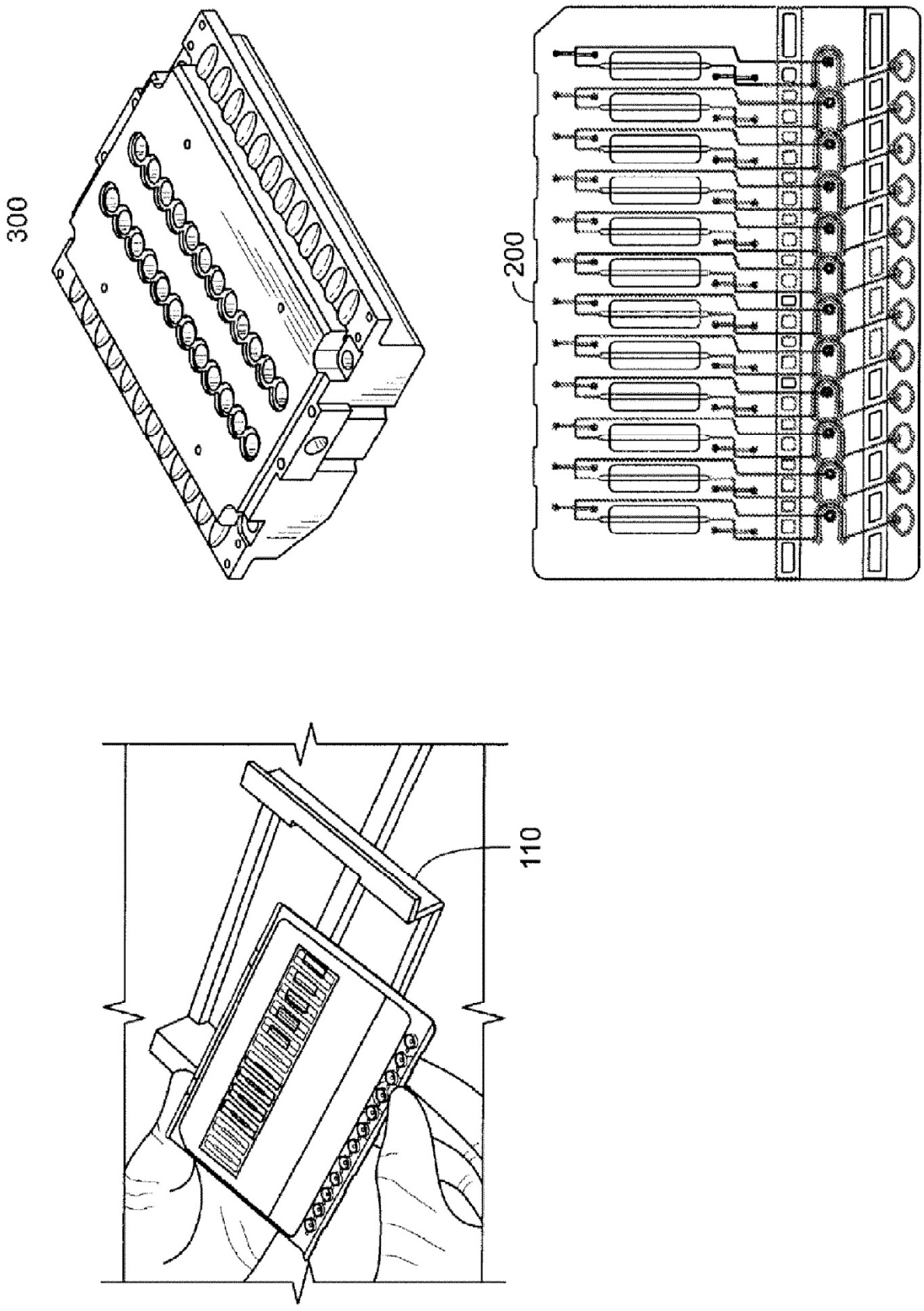


FIG. 34

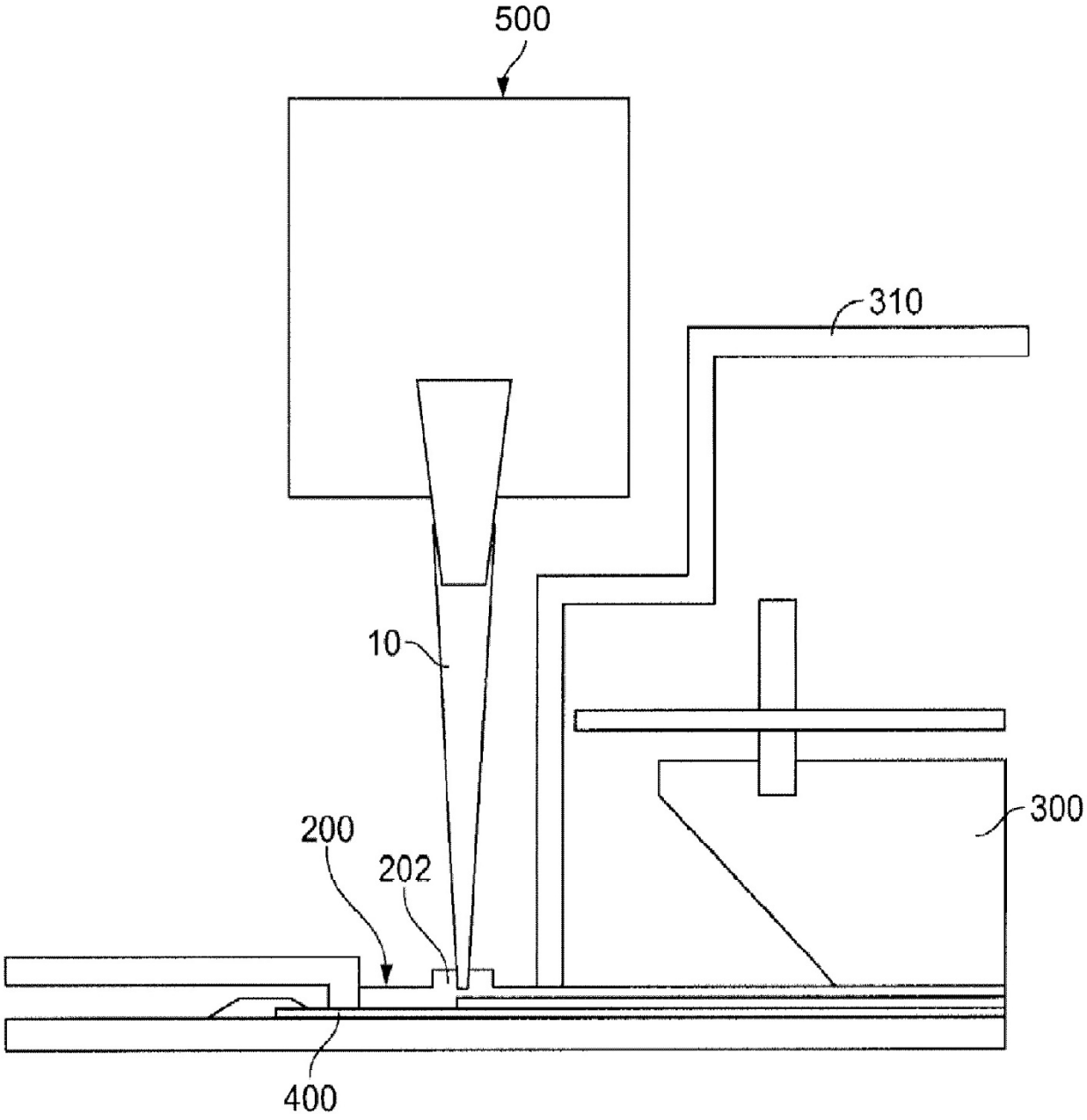


FIG. 35

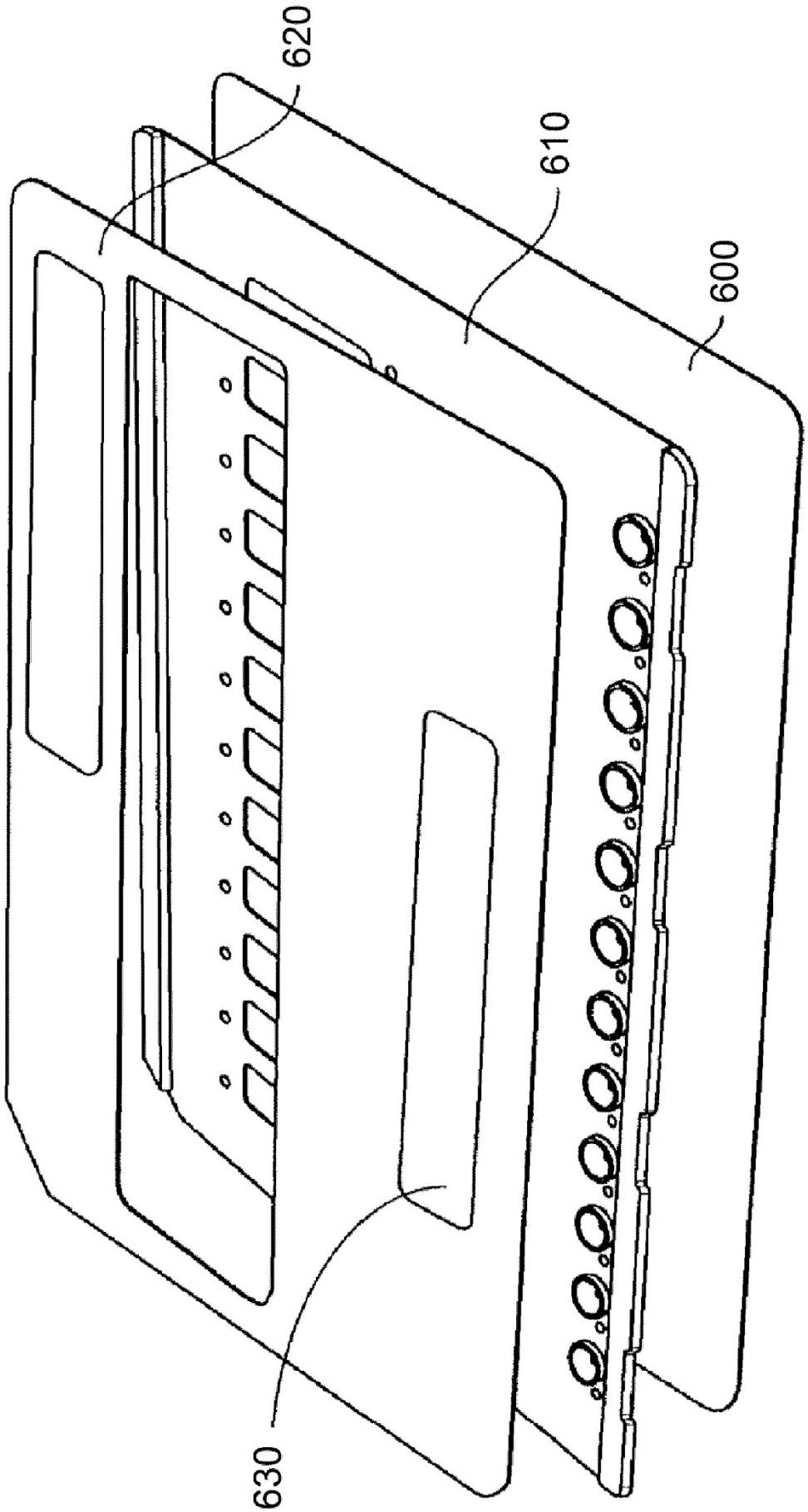


FIG. 36

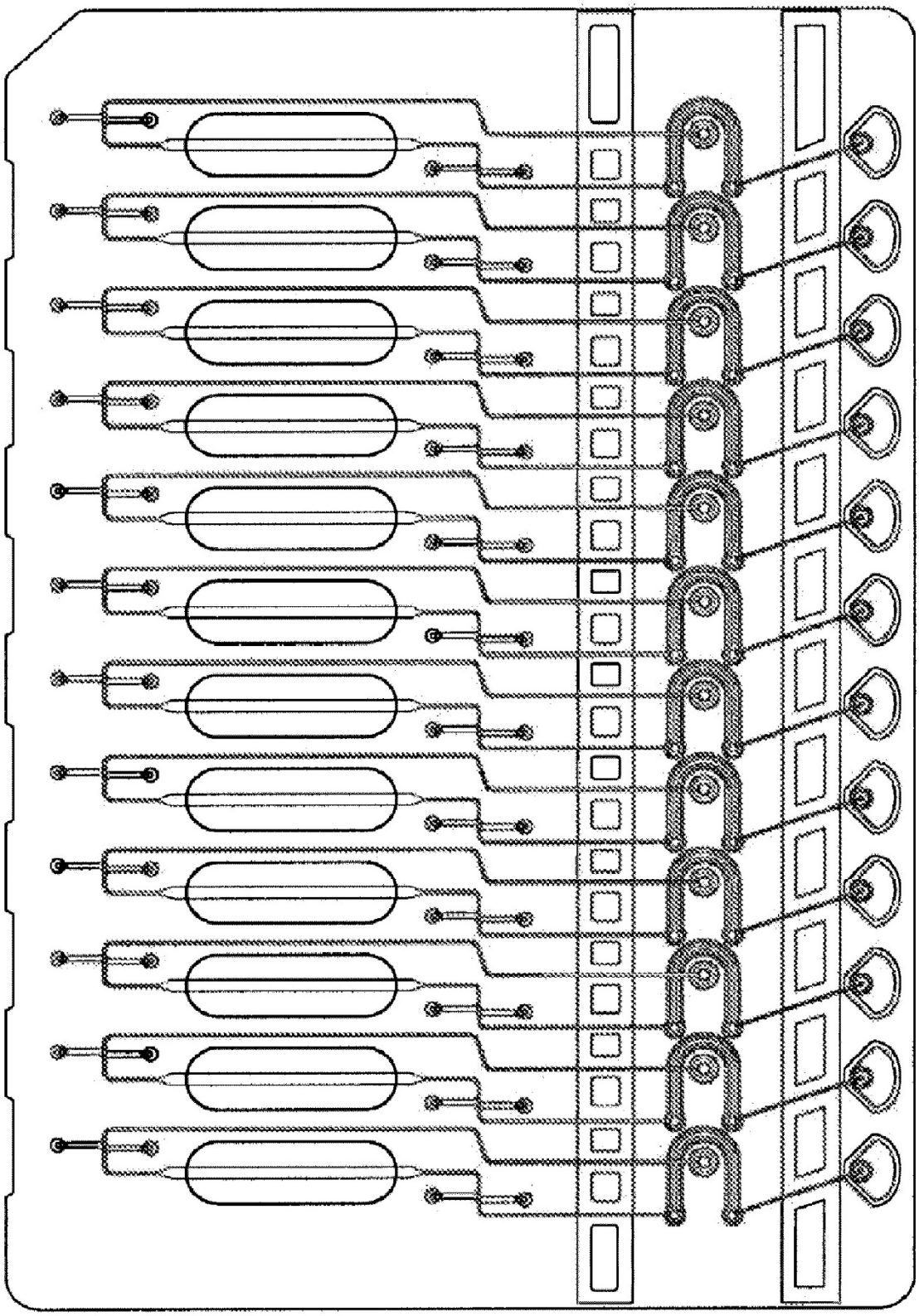


FIG. 37

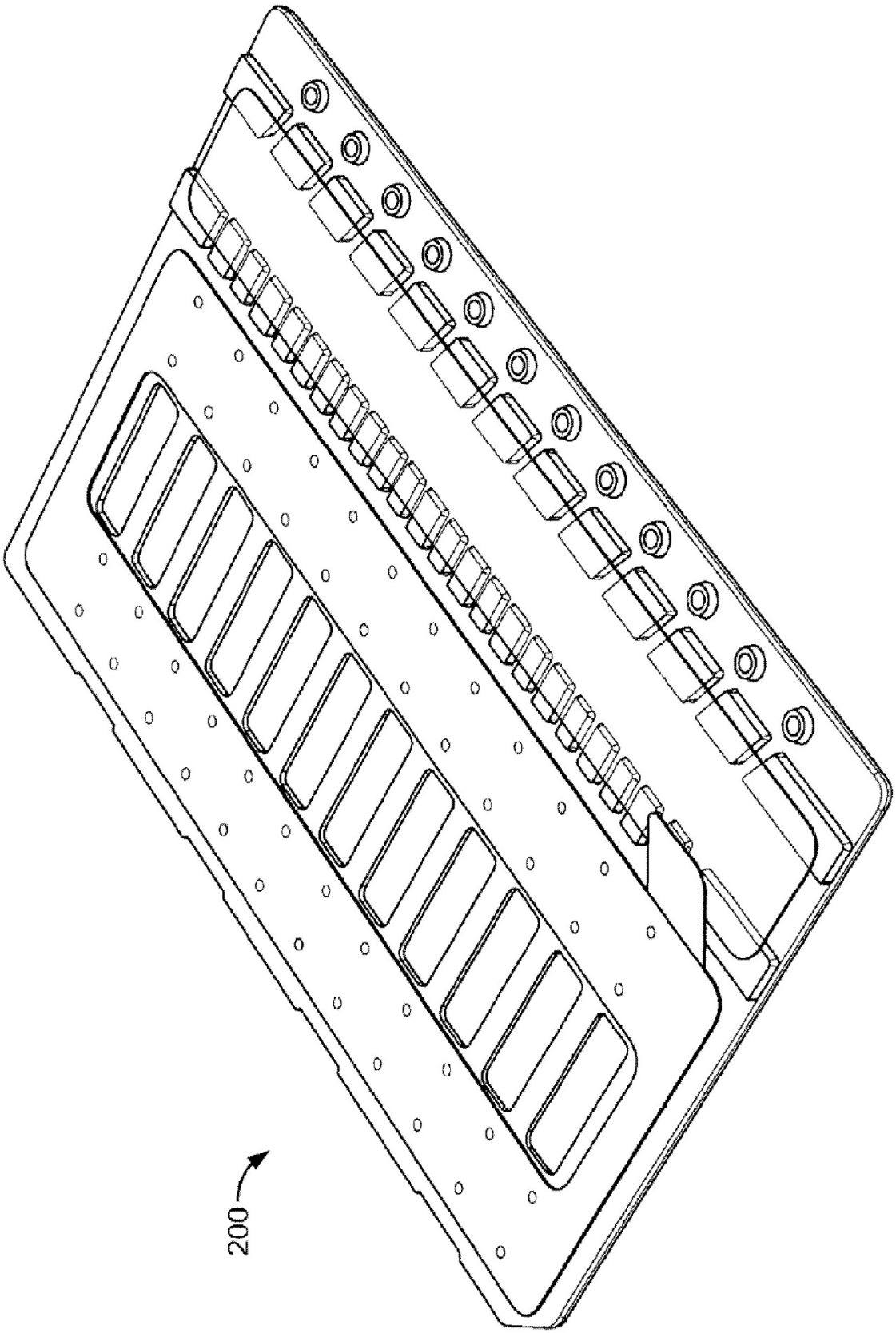


FIG. 38A

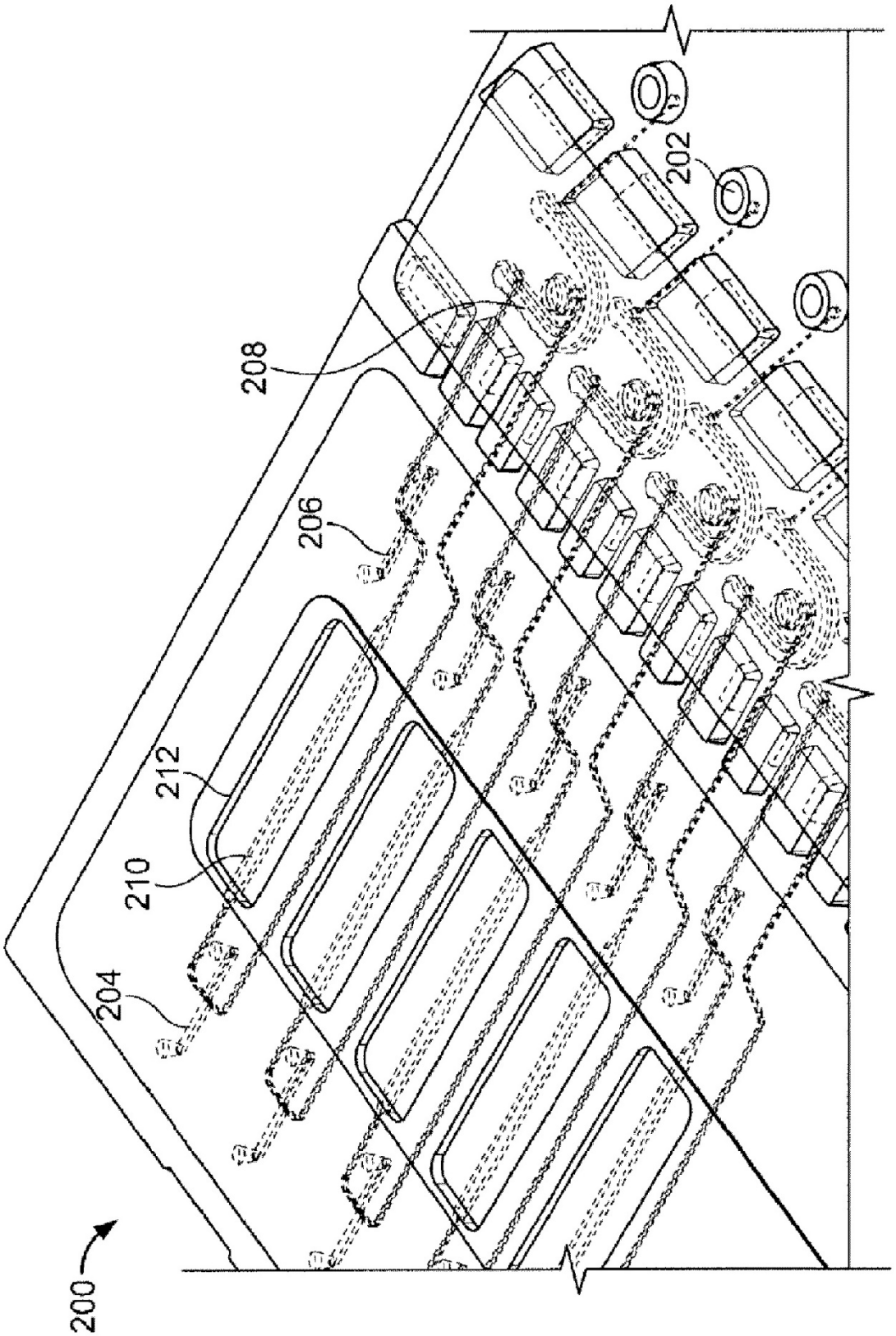


FIG. 38B

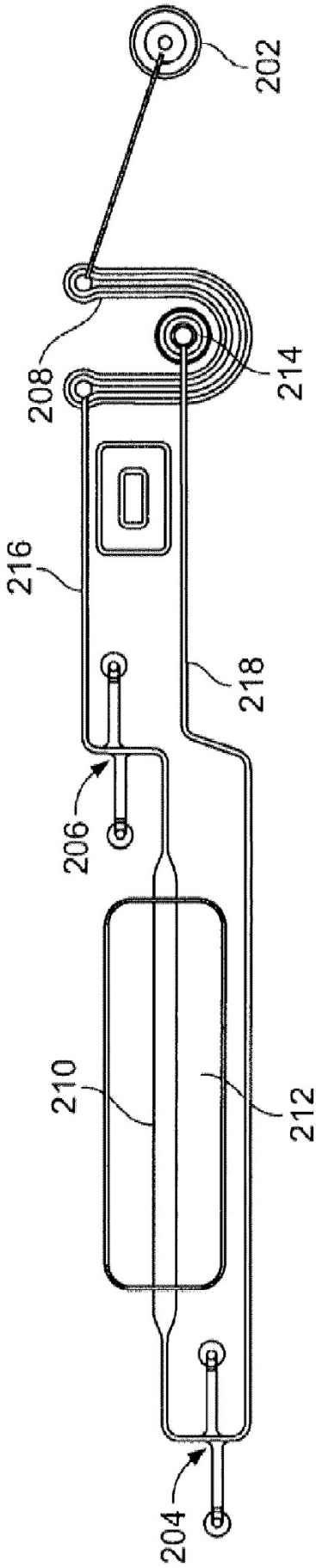
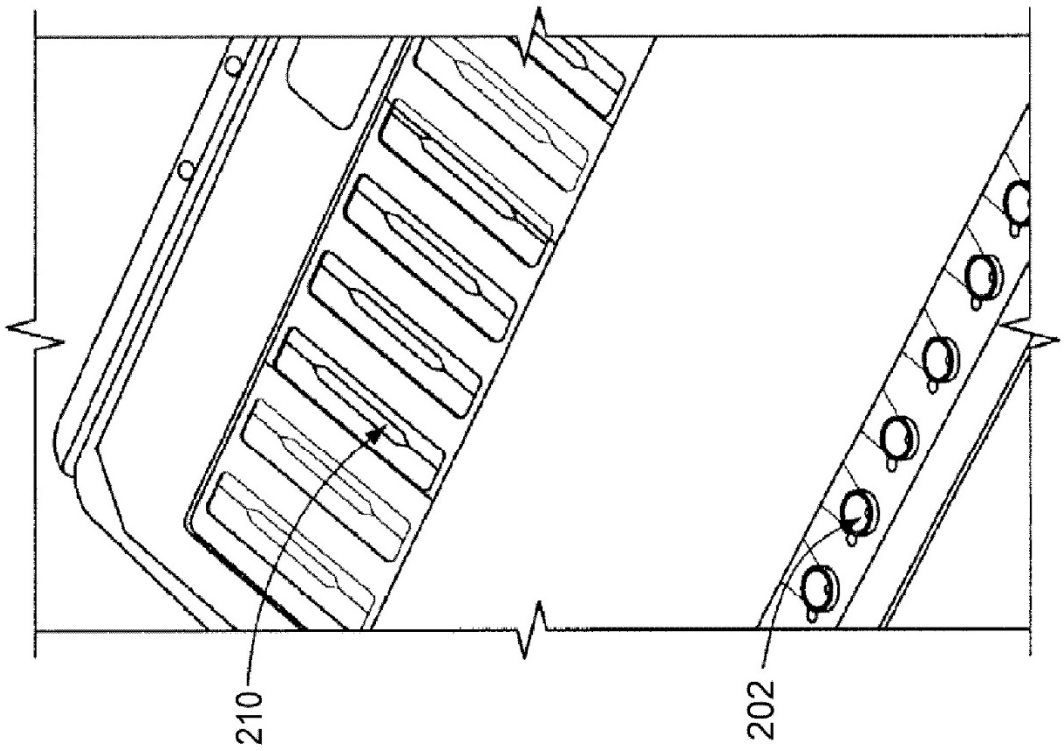


FIG. 39A



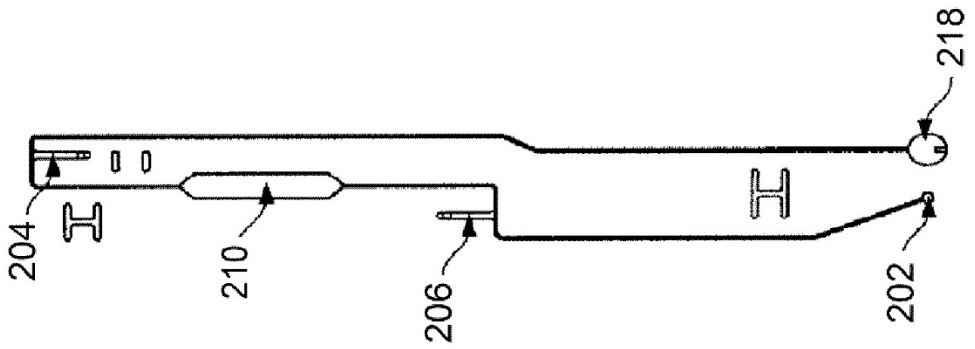
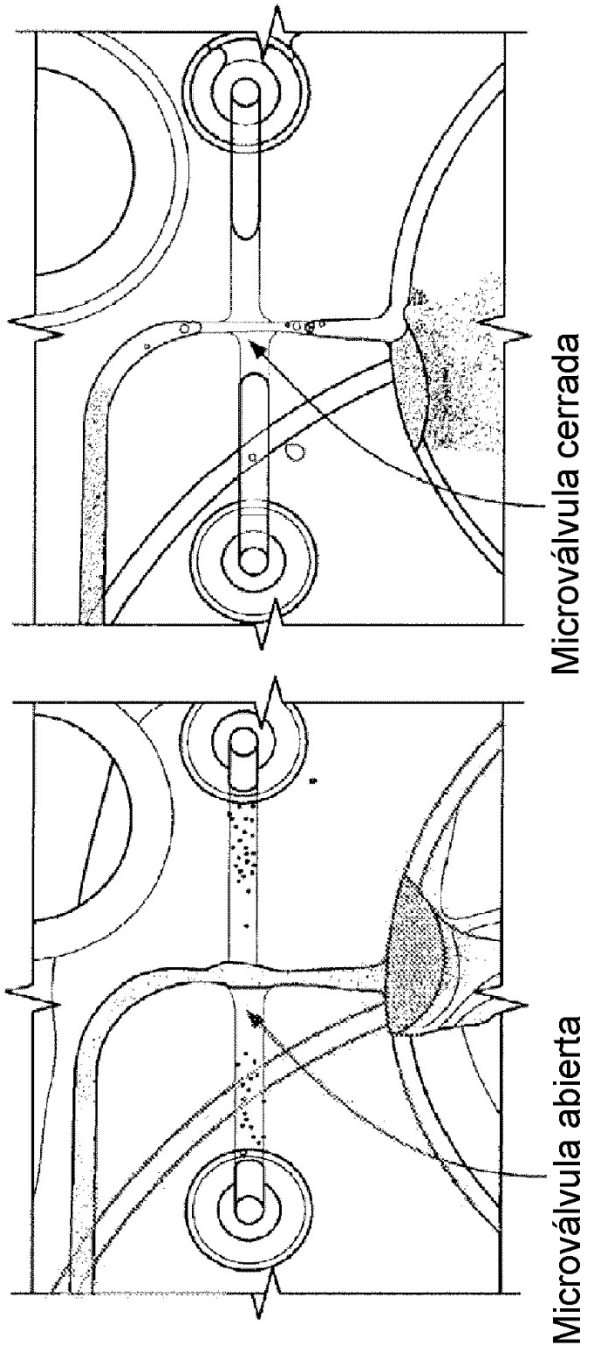


FIG. 39B


Microválvula cerrada
Microválvula abierta

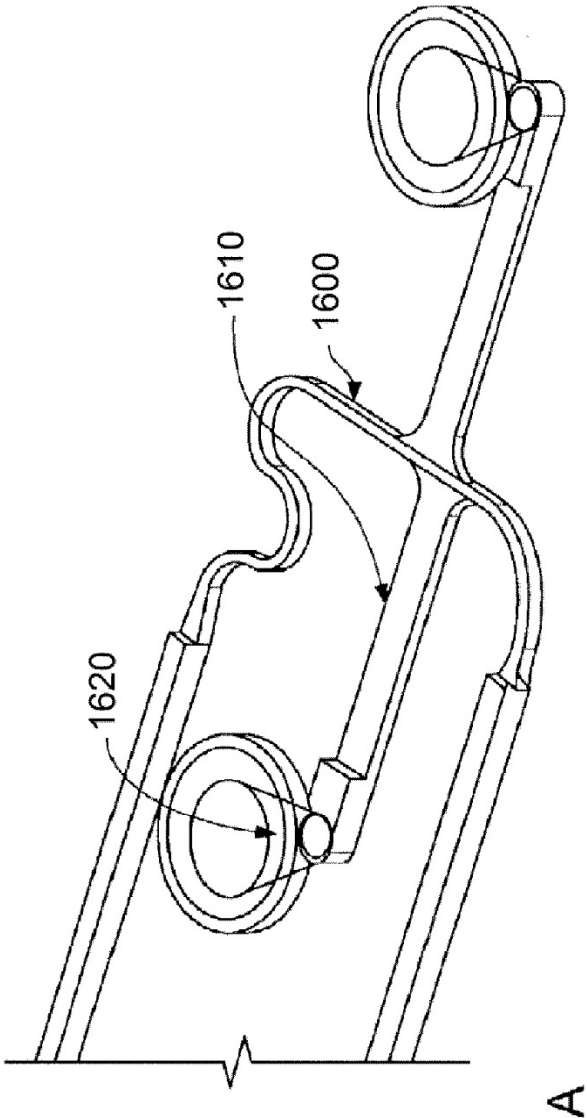

1610
1600
1620

FIG. 40A

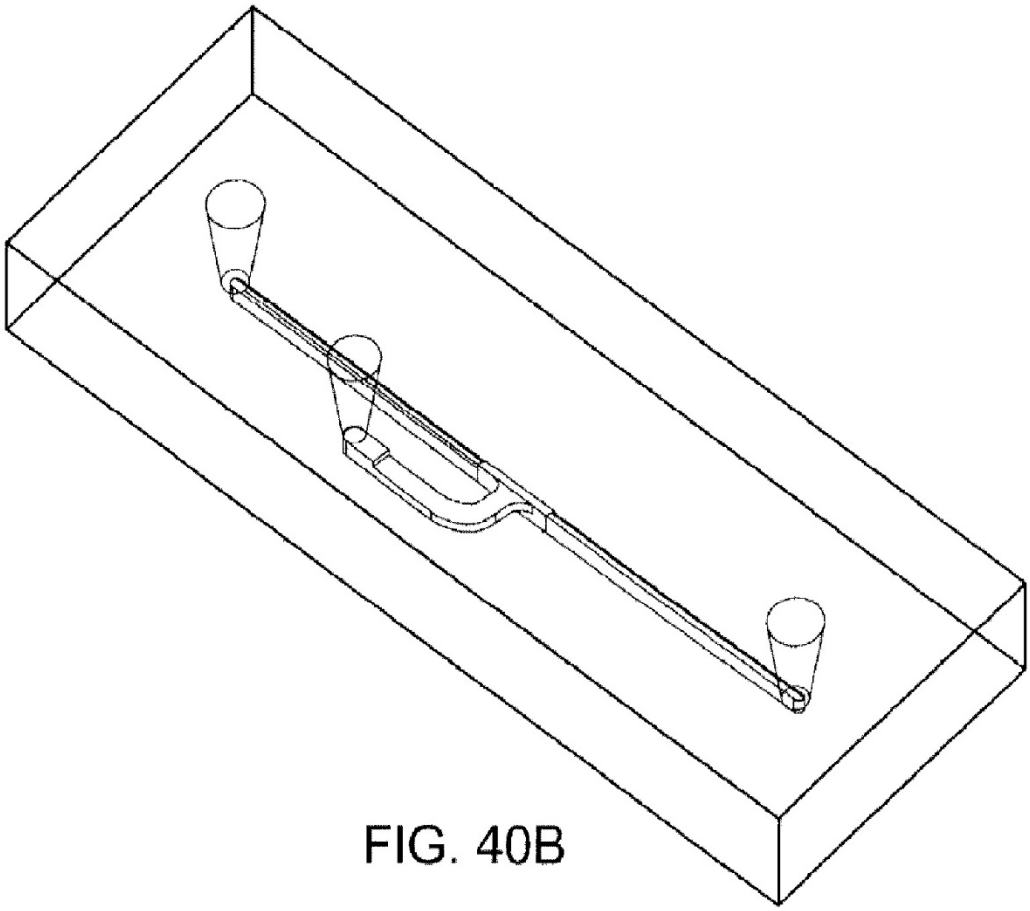


FIG. 40B

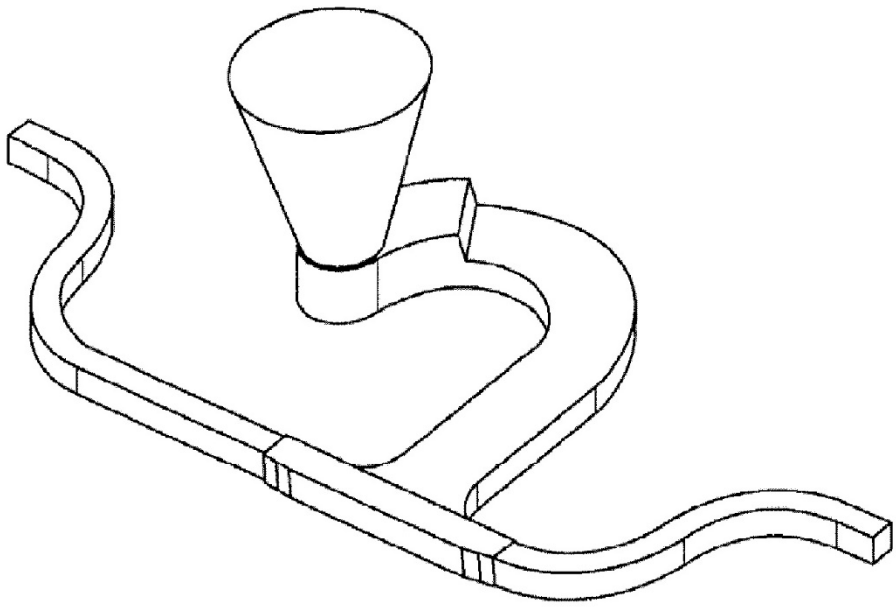


FIG. 40C

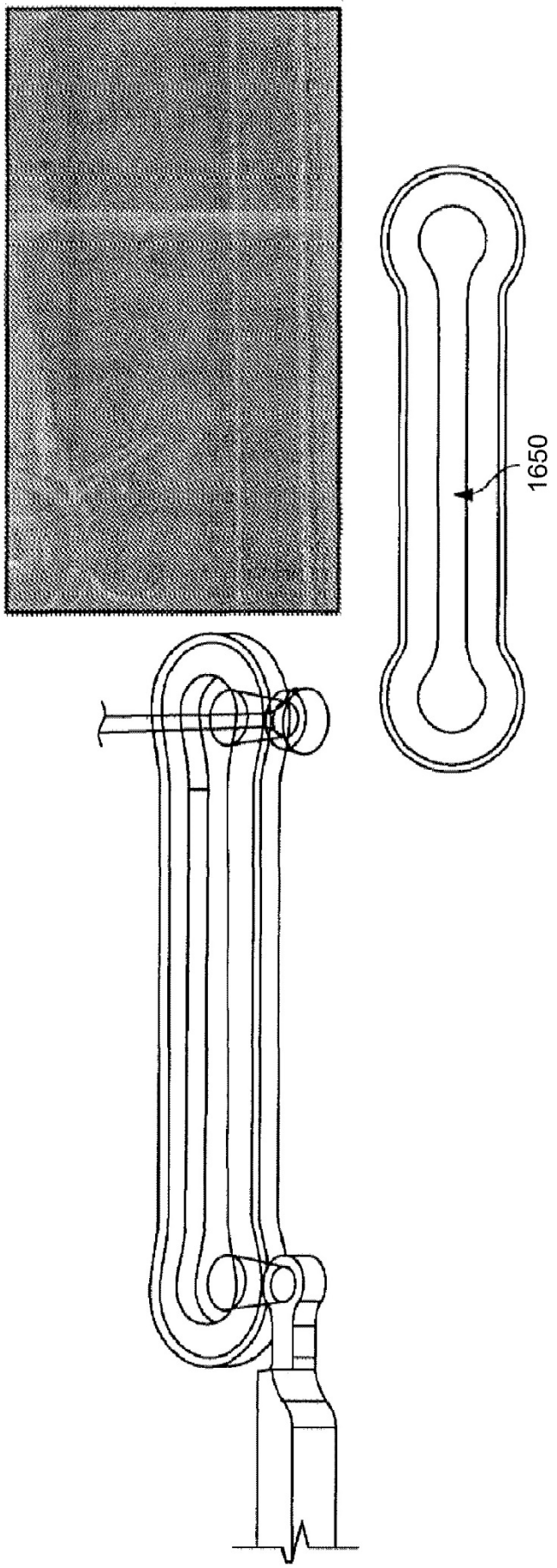


FIG. 41

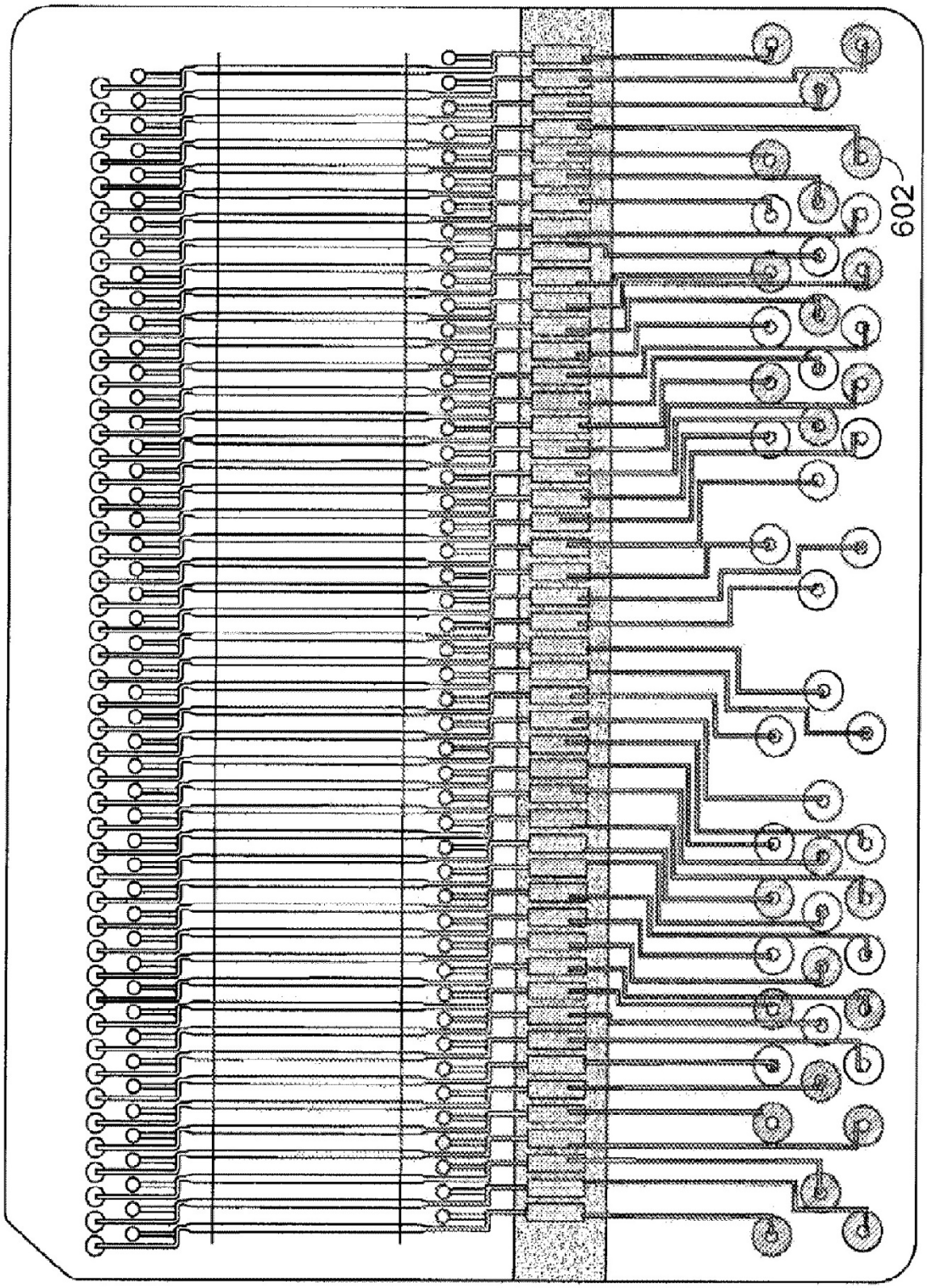


FIG. 42

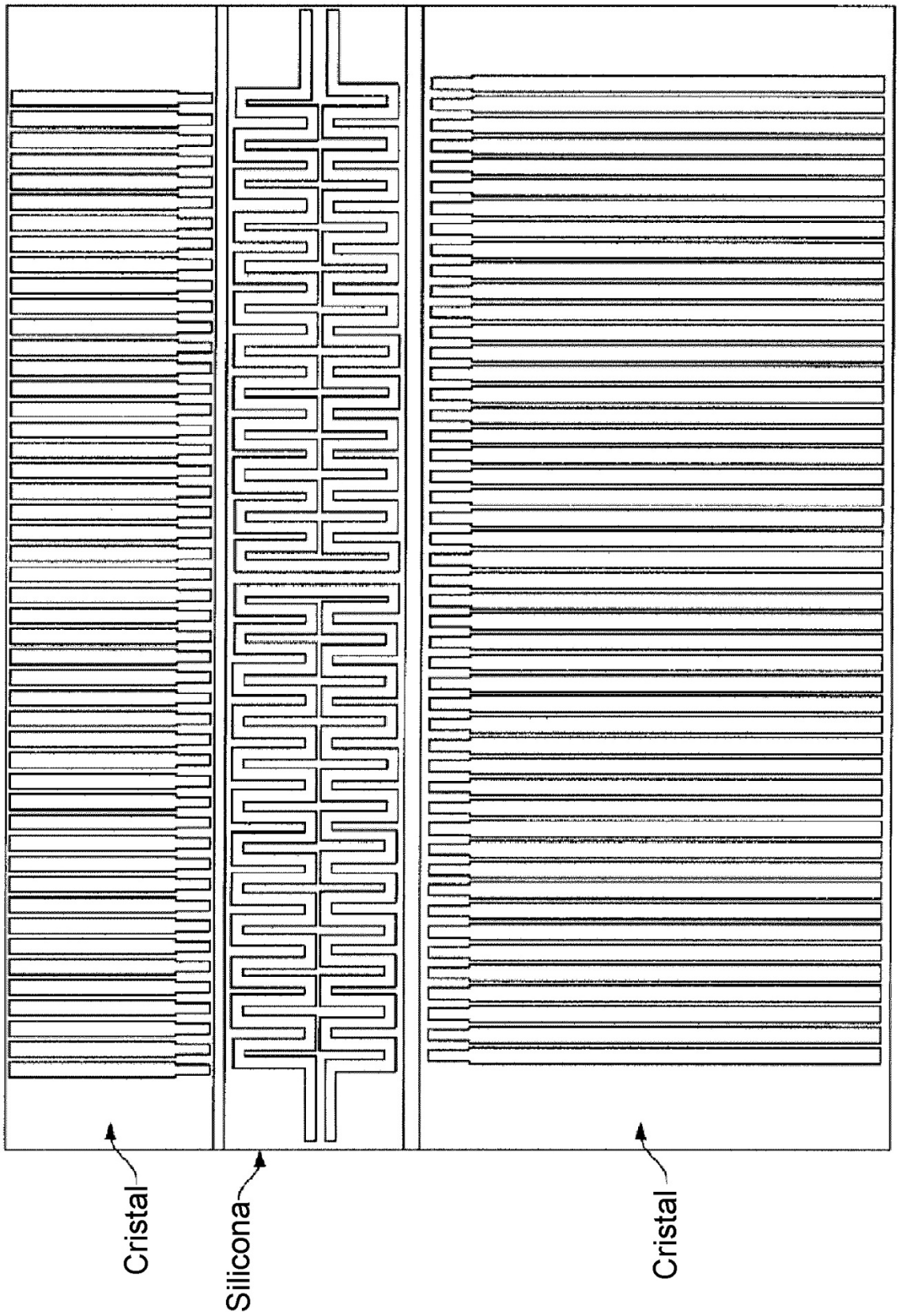


FIG. 43

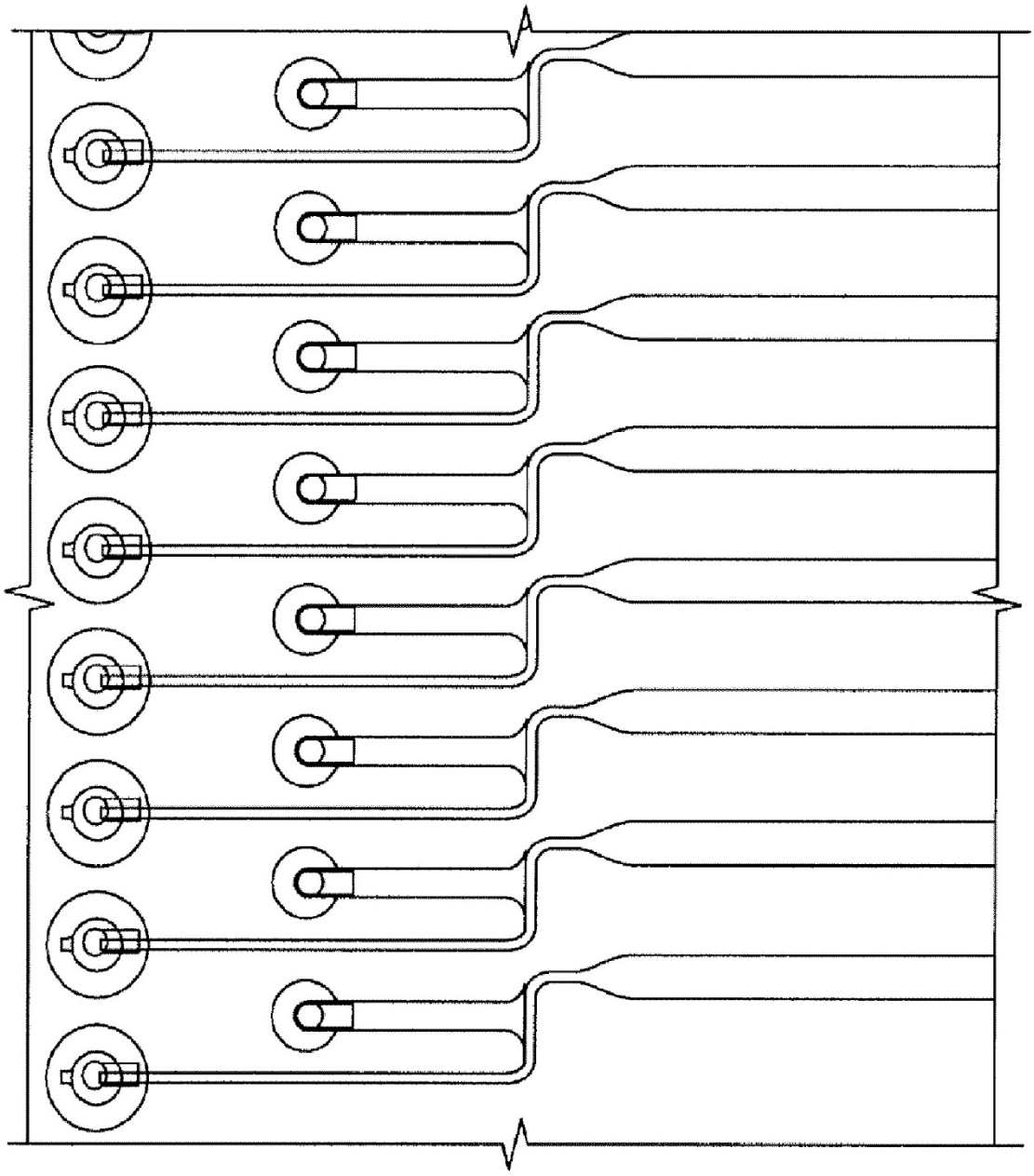


FIG. 44

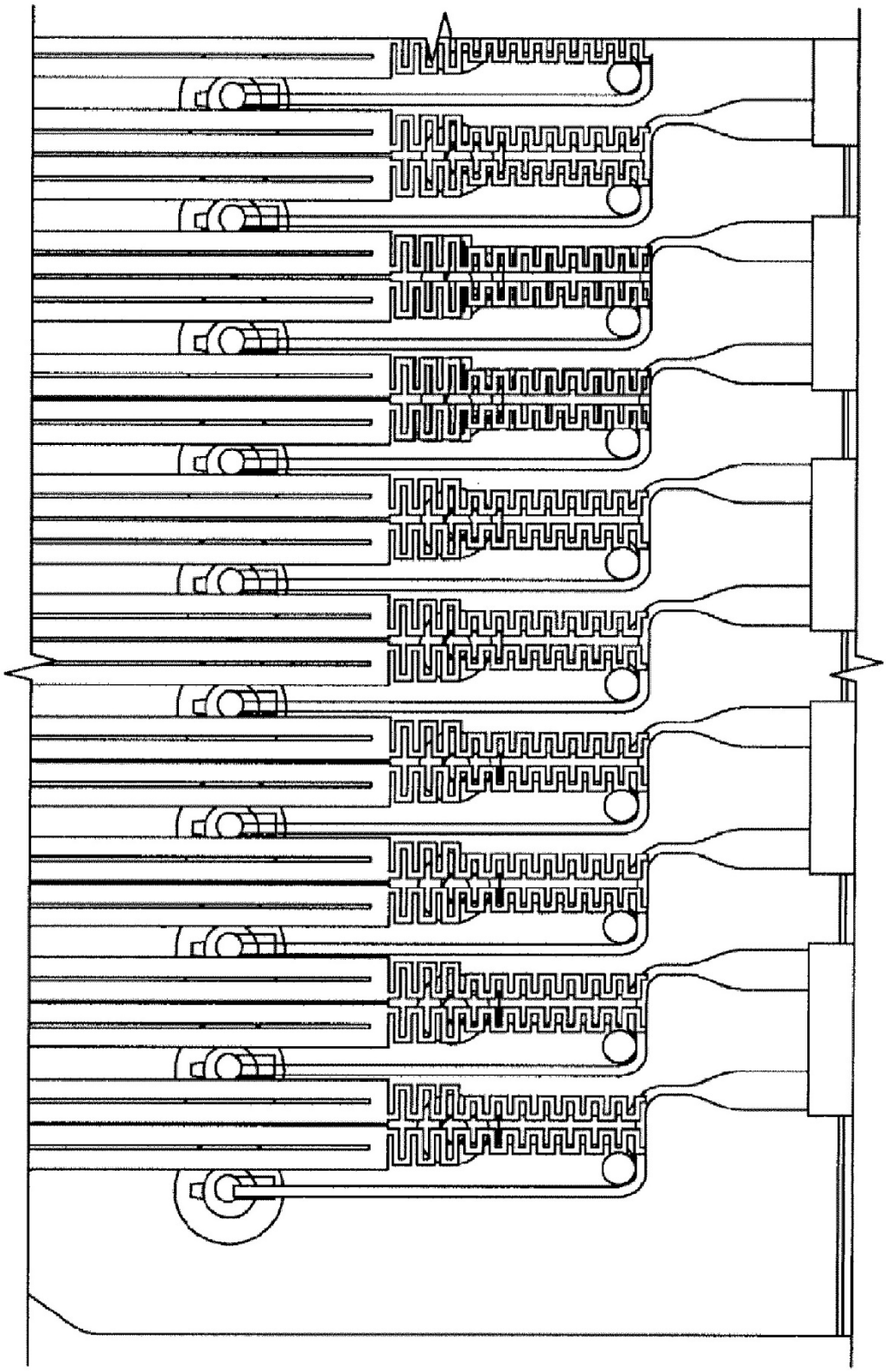


FIG. 45

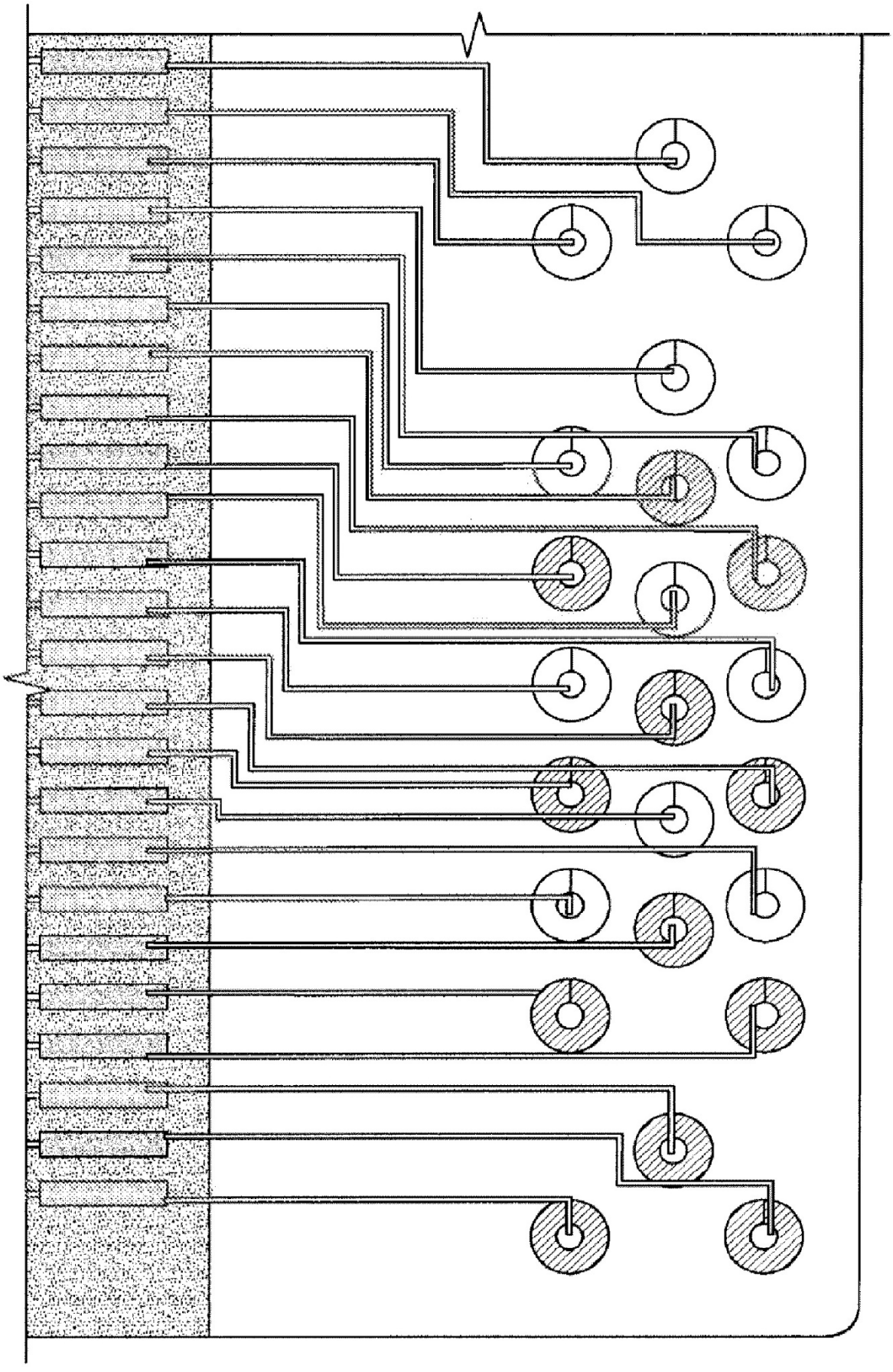


FIG. 46

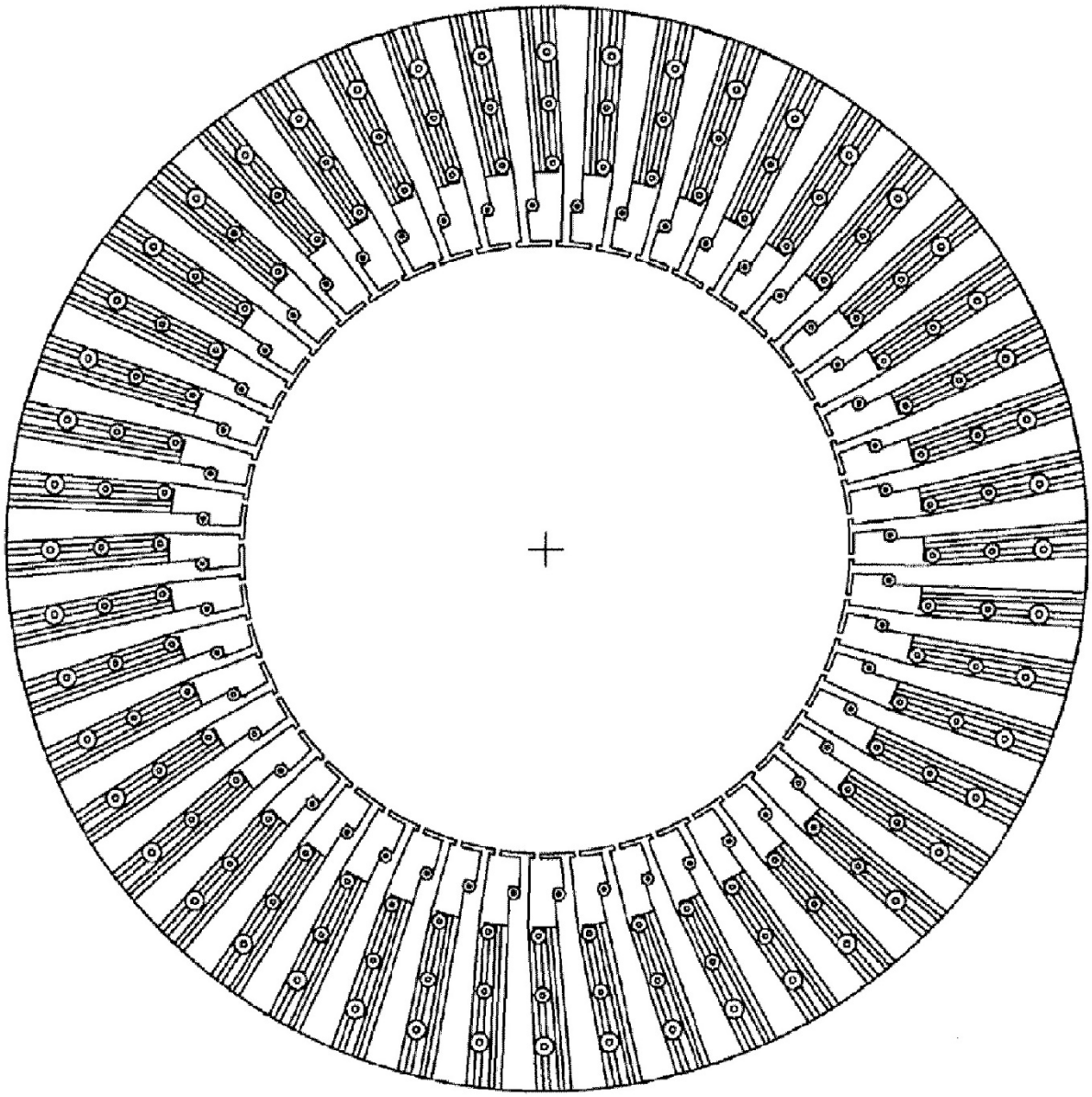


FIG. 47A

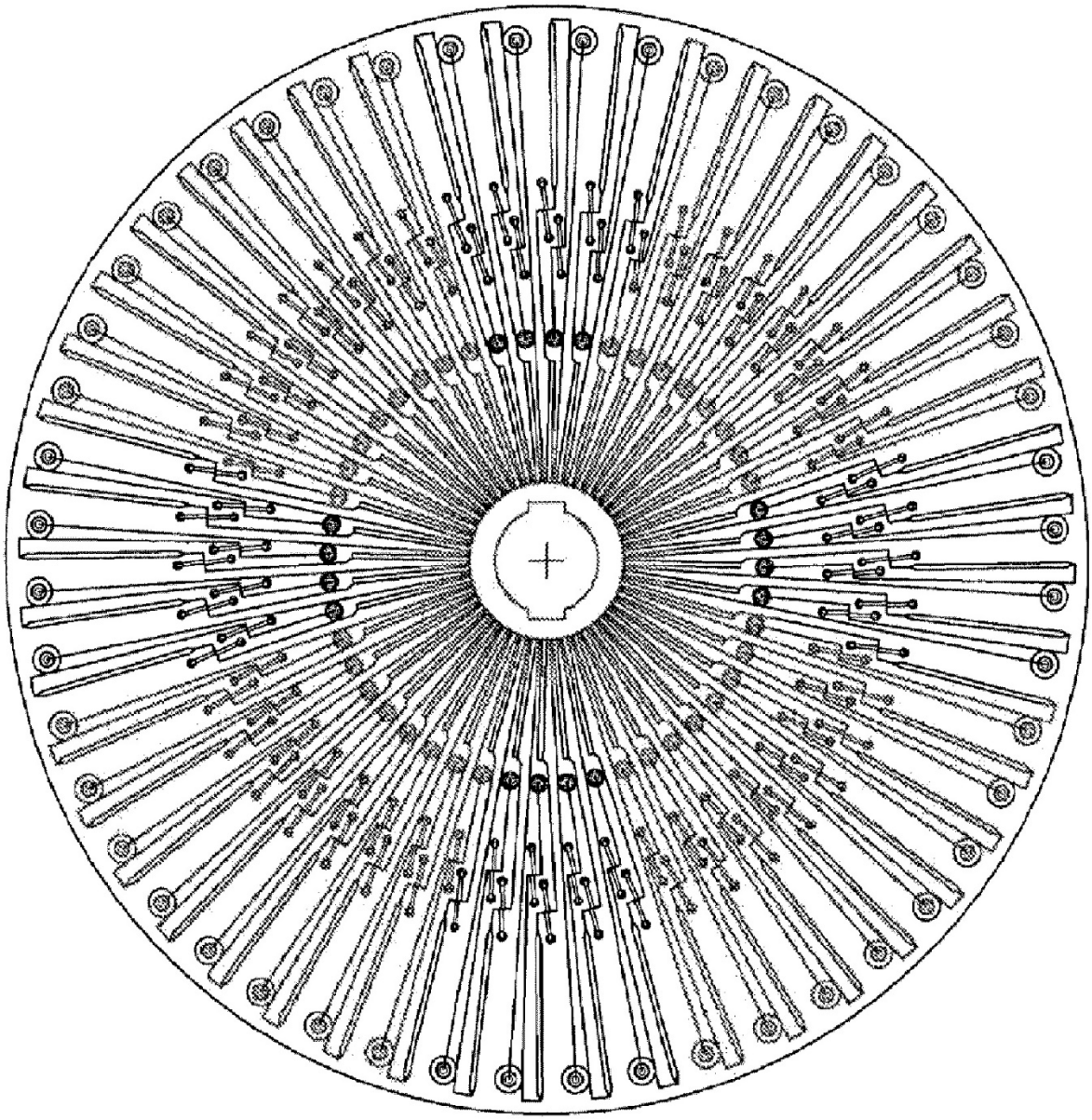


FIG. 47B

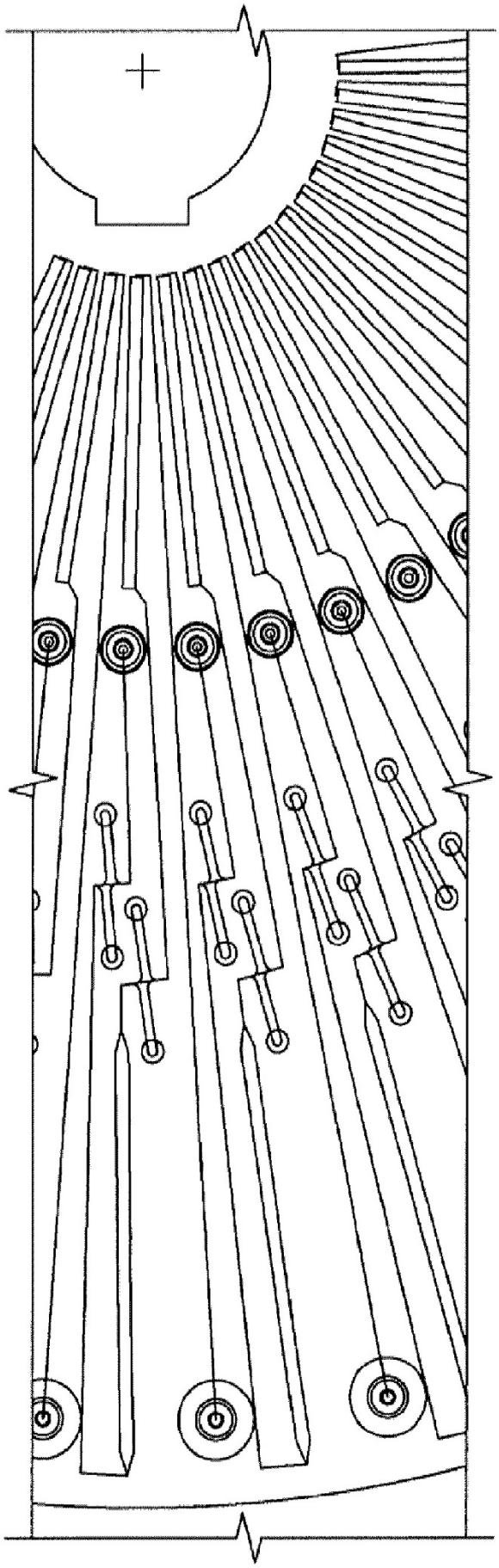


FIG. 47C

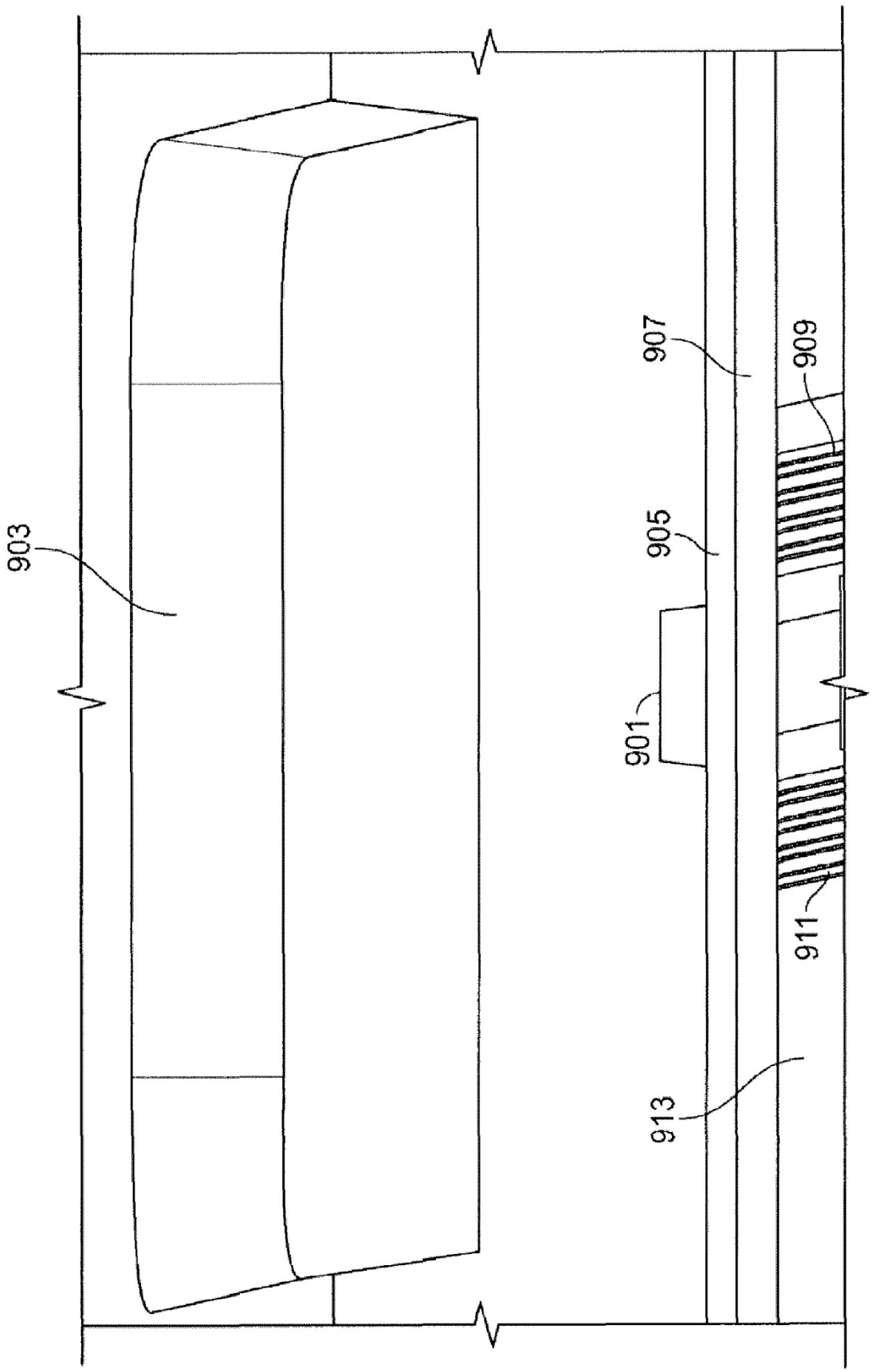


FIG. 48

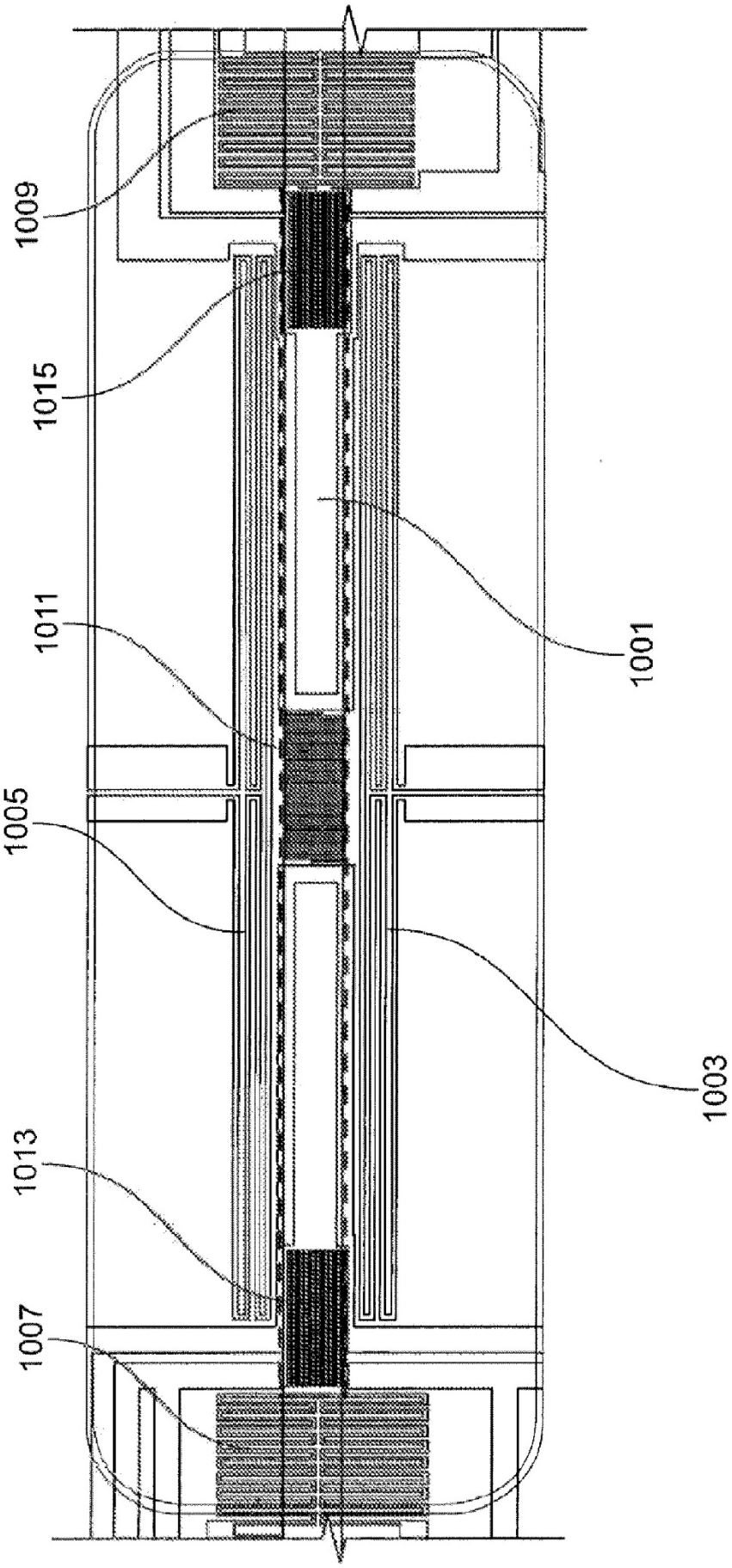


FIG. 49A

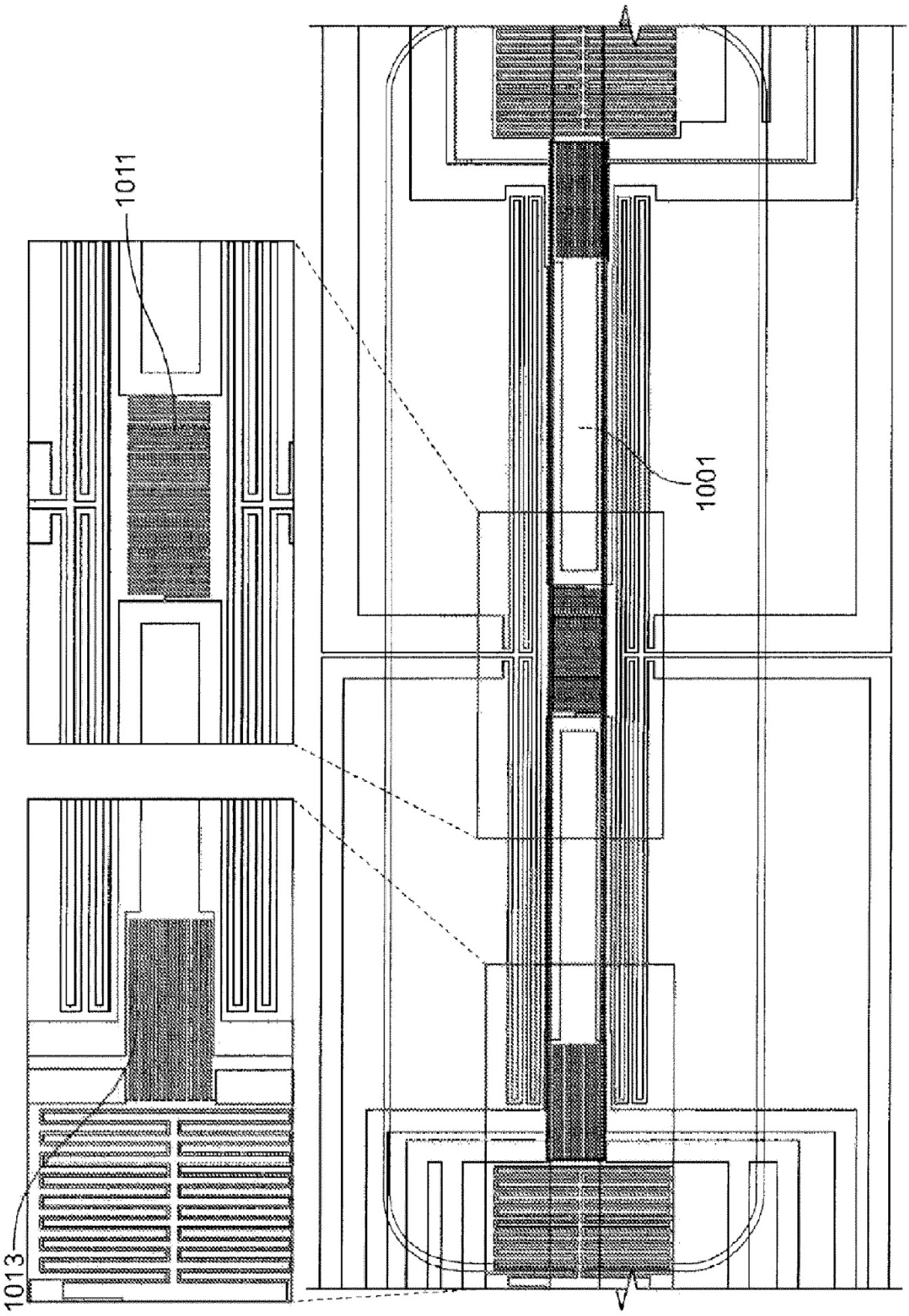


FIG. 49B

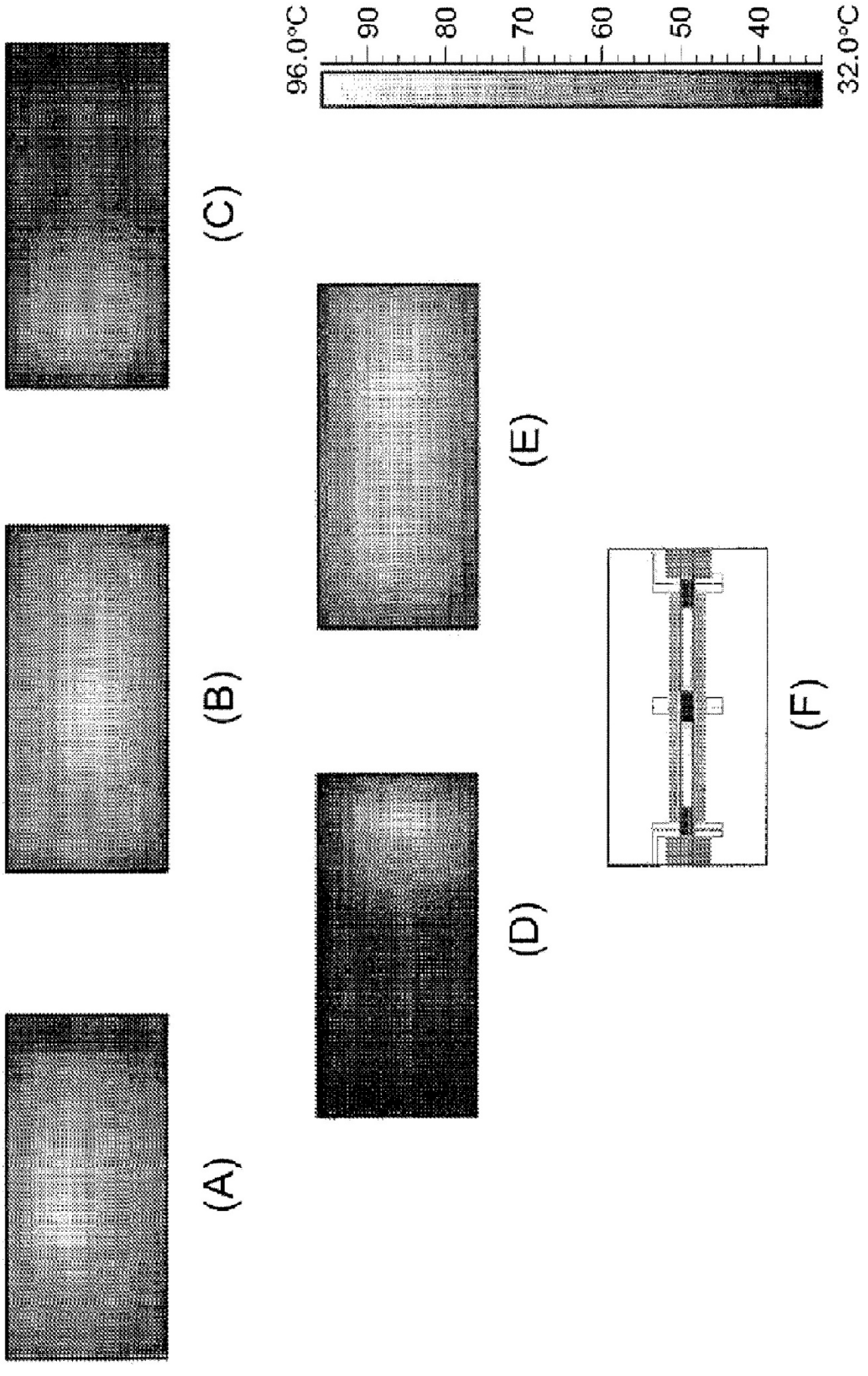


FIG. 50

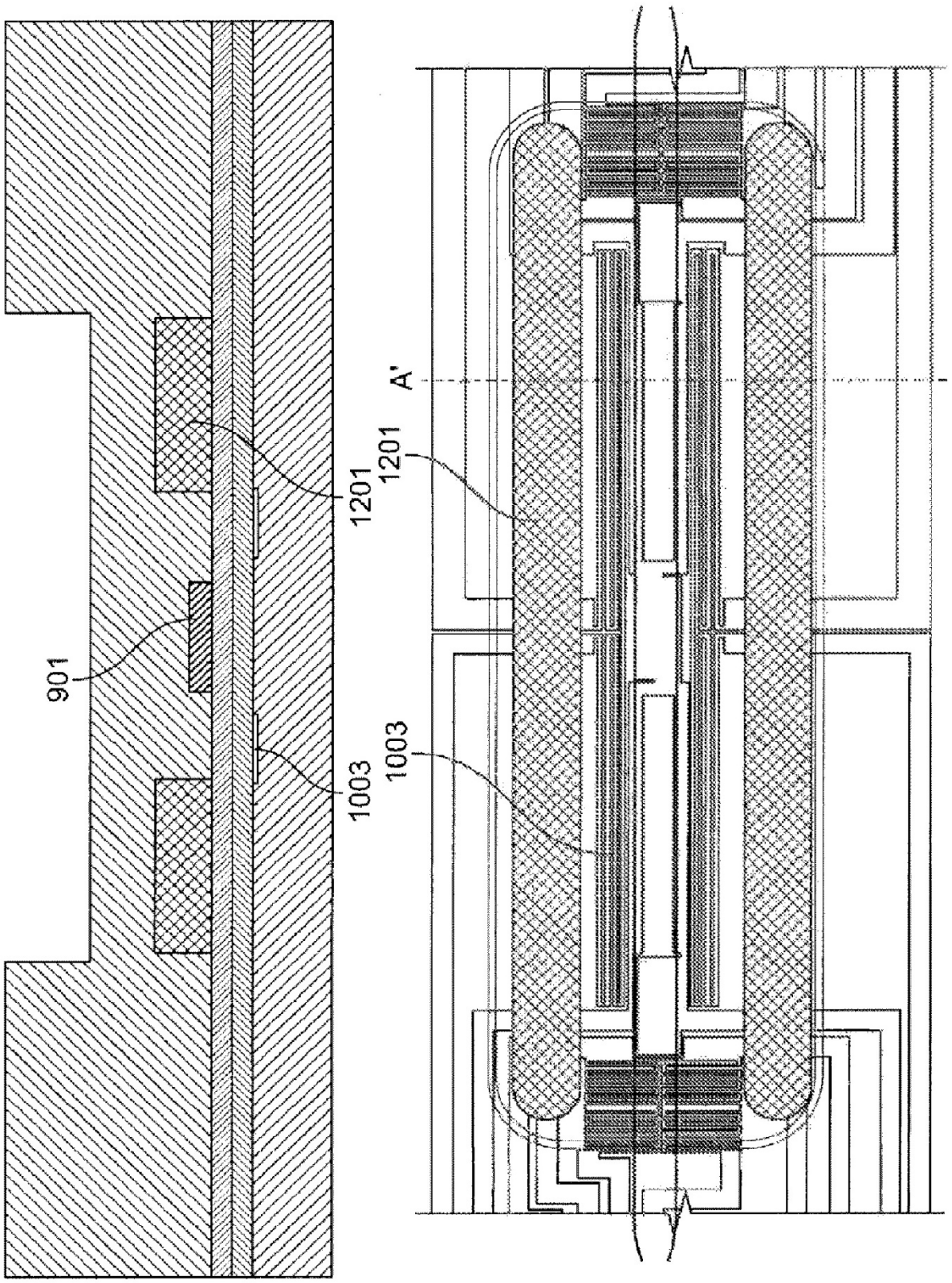


FIG. 51A

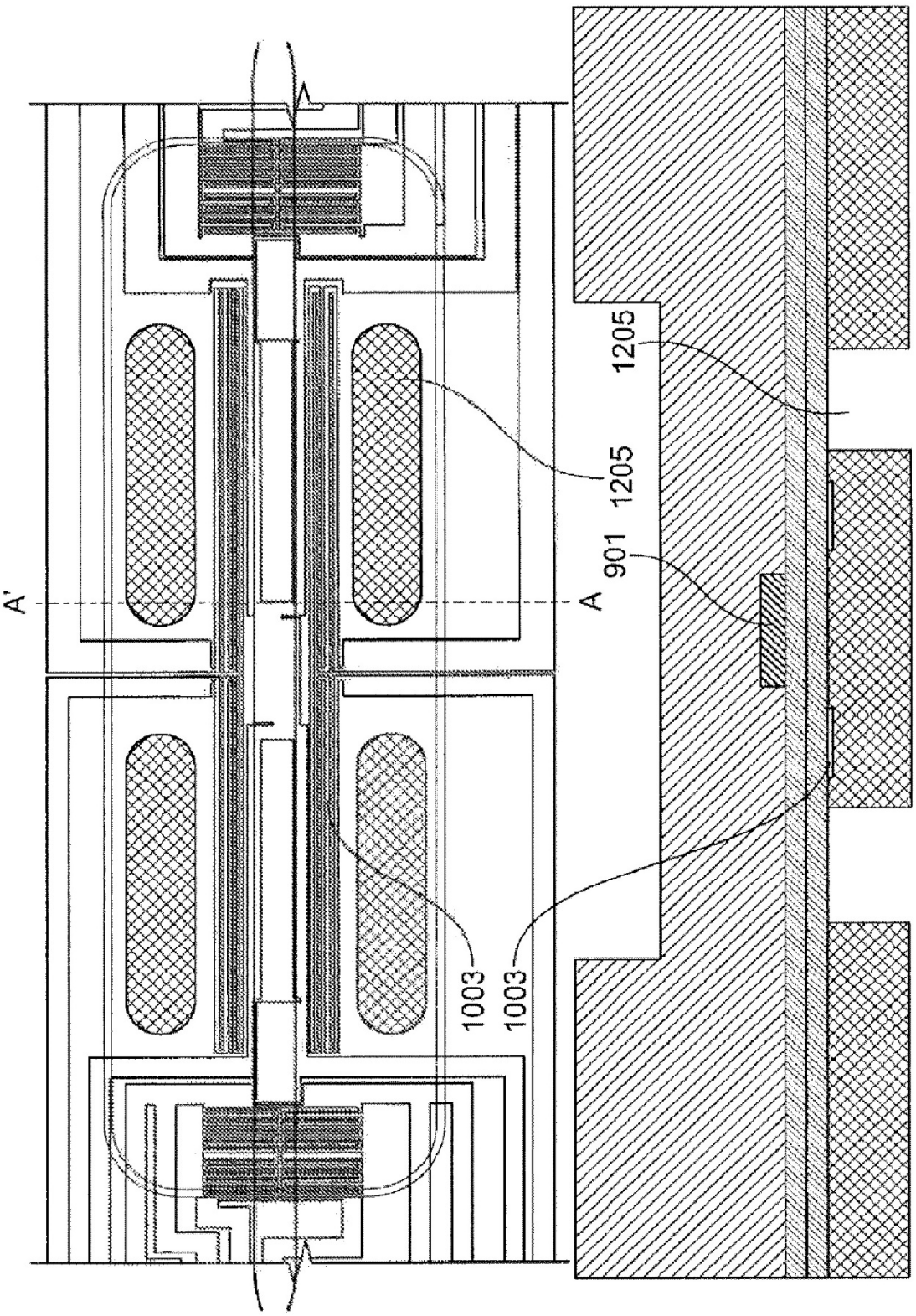


FIG. 51B

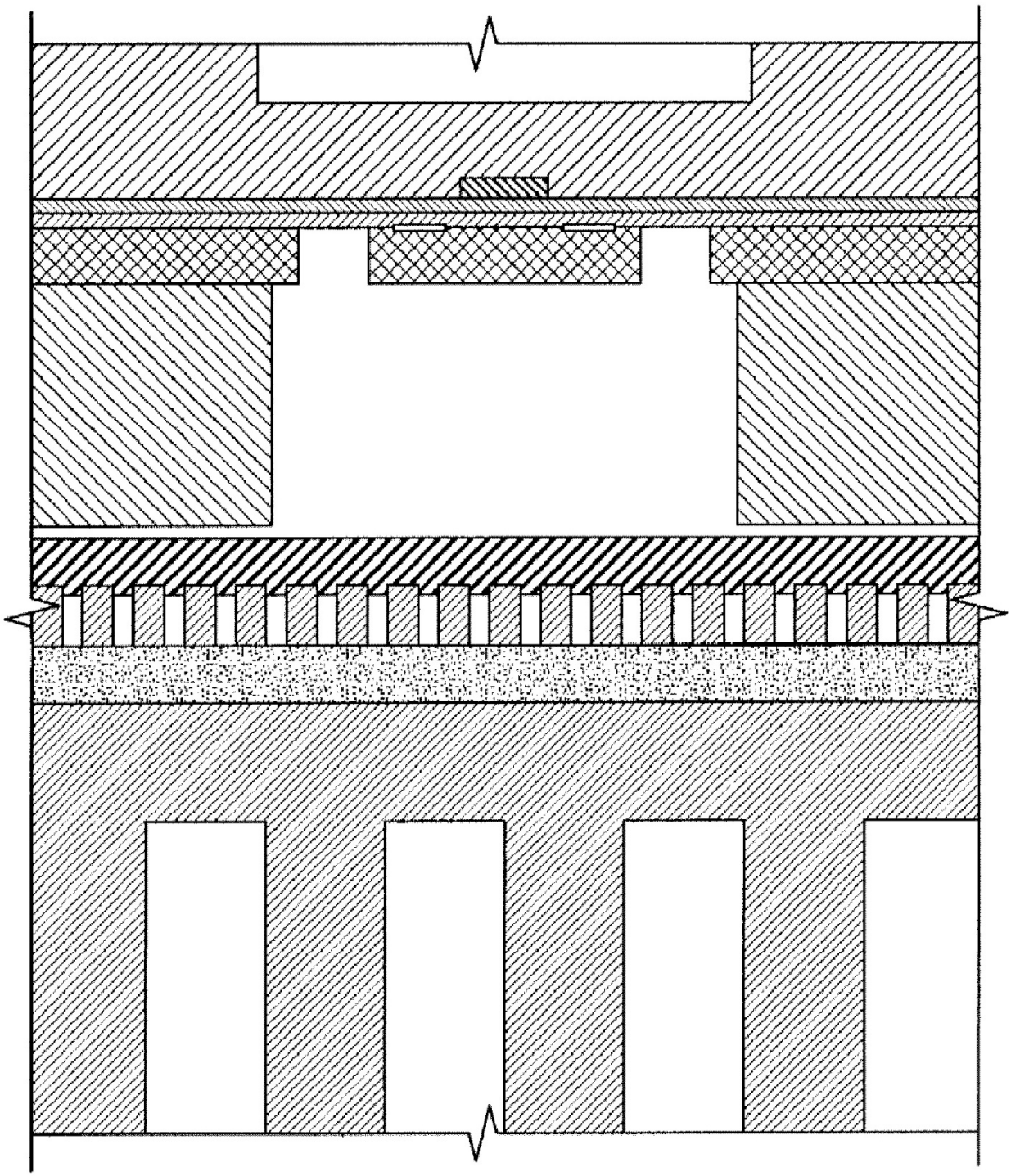


FIG. 51C

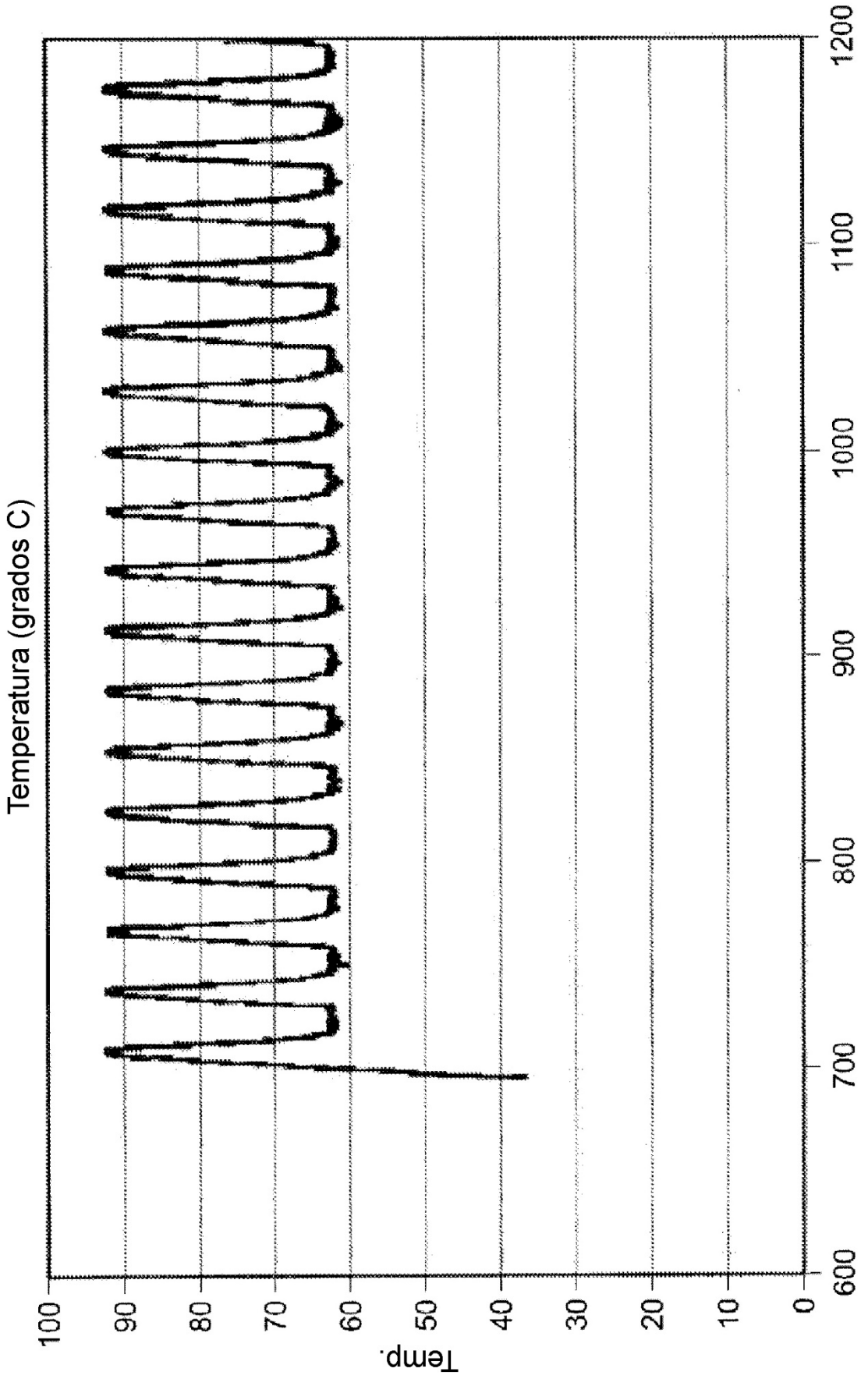

Temperatura (grados C)
Temp.
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
600
700
800
900
1000
1100
1200
Tiempo

FIG. 52

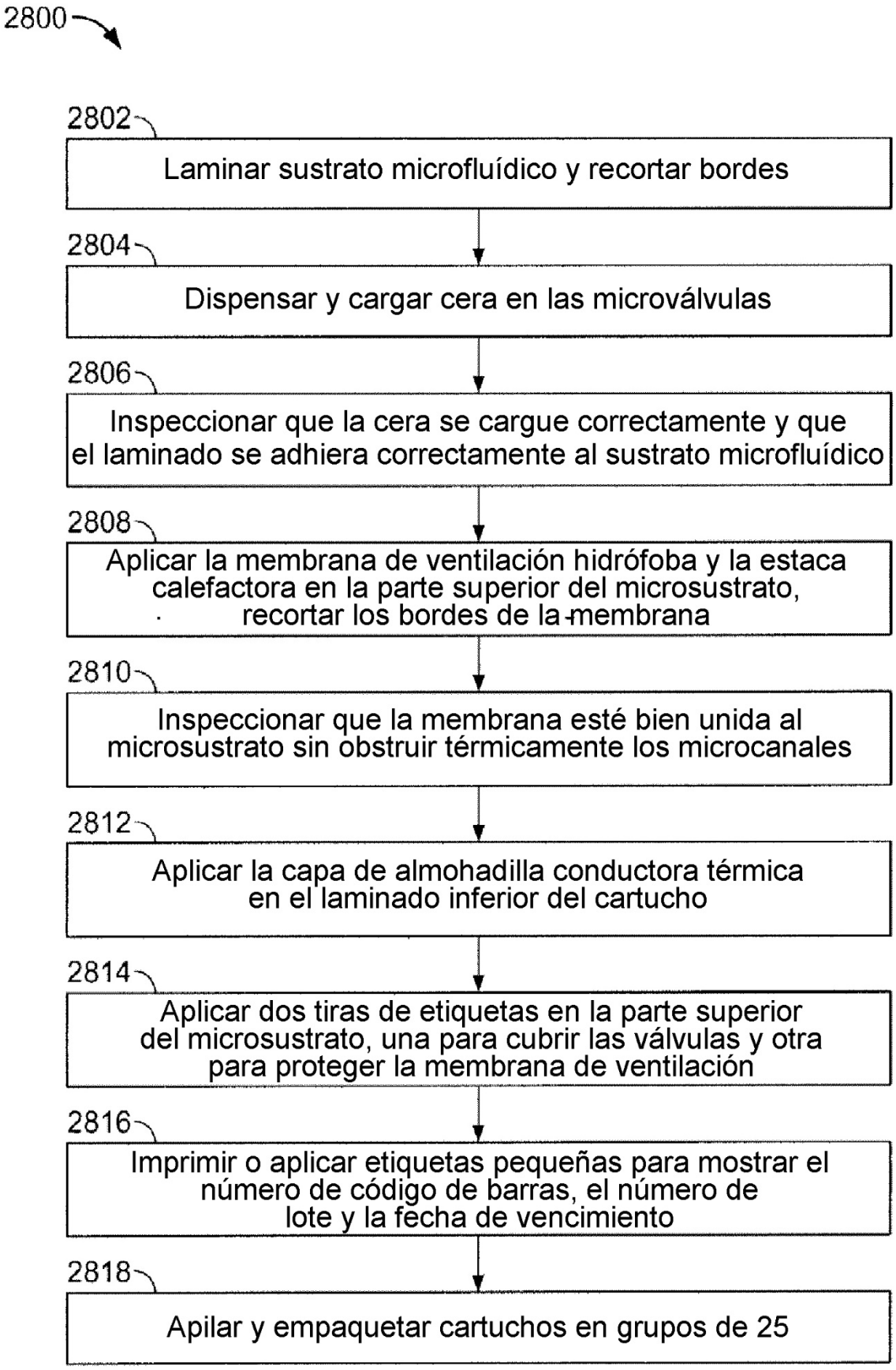

2800
2802
Laminar sustrato microfluídico y recortar bordes
2804
Dispensar y cargar cera en las microválvulas
2806
Inspeccionar que la cera se cargue correctamente y que el laminado se adhiera correctamente al sustrato microfluídico
2808
Aplicar la membrana de ventilación hidrófoba y la estaca calefactora en la parte superior del microsustrato, recortar los bordes de la membrana
2810
Inspeccionar que la membrana esté bien unida al microsustrato sin obstruir térmicamente los microcanales
2812
Aplicar la capa de almohadilla conductora térmica en el laminado inferior del cartucho
2814
Aplicar dos tiras de etiquetas en la parte superior del microsustrato, una para cubrir las válvulas y otra para proteger la membrana de ventilación
2816
Imprimir o aplicar etiquetas pequeñas para mostrar el número de código de barras, el número de lote y la fecha de vencimiento
2818
Apilar y empaquetar cartuchos en grupos de 25

FIG. 53

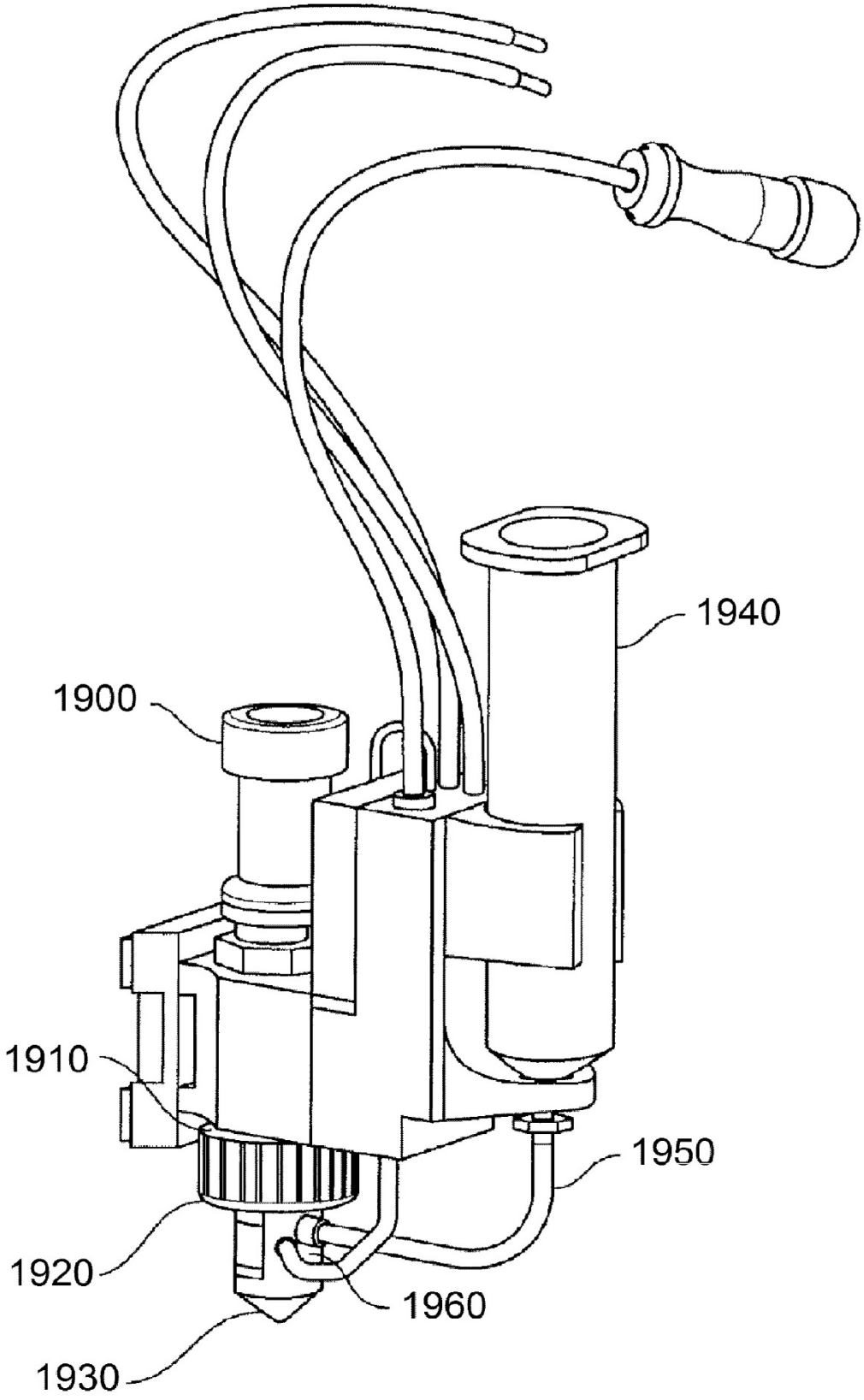


FIG. 54A

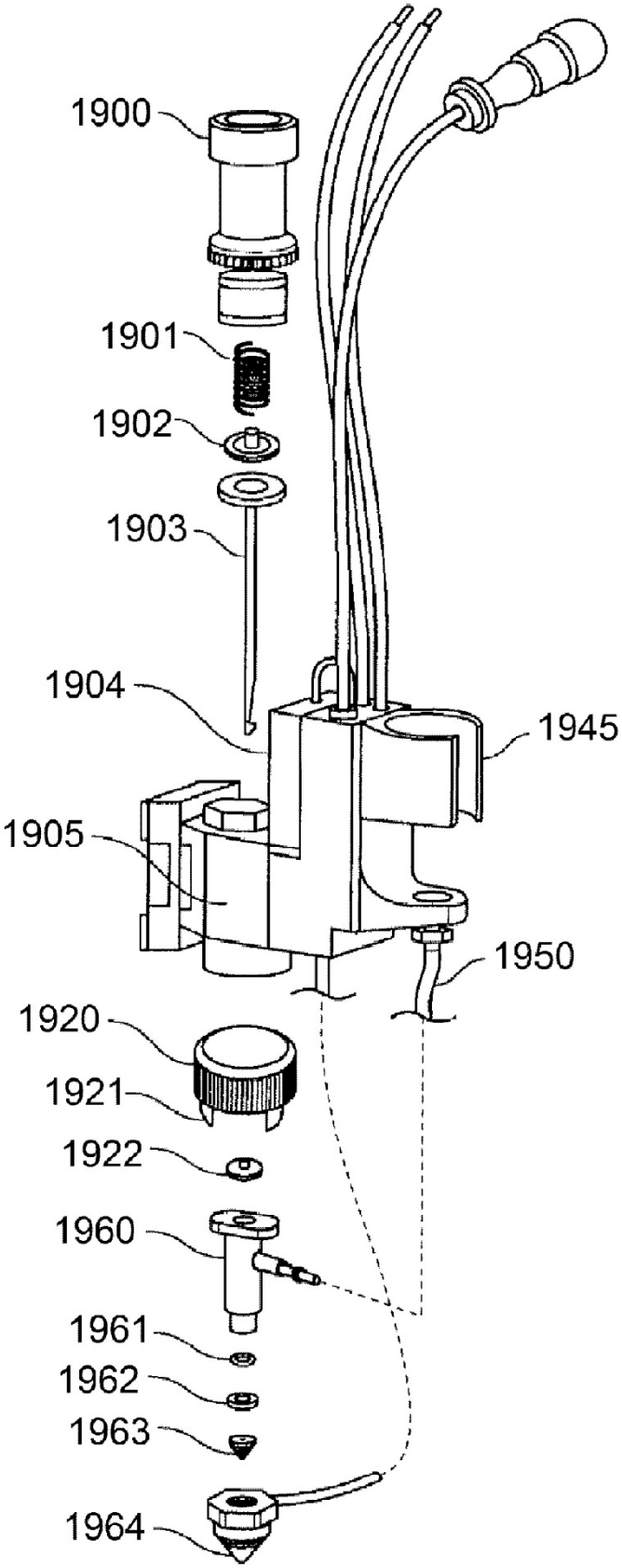

1900
1901
1902
1903
1904
1945
1905
1950
1920
1921
1922
1960
1961
1962
1963
1964

FIG. 54B

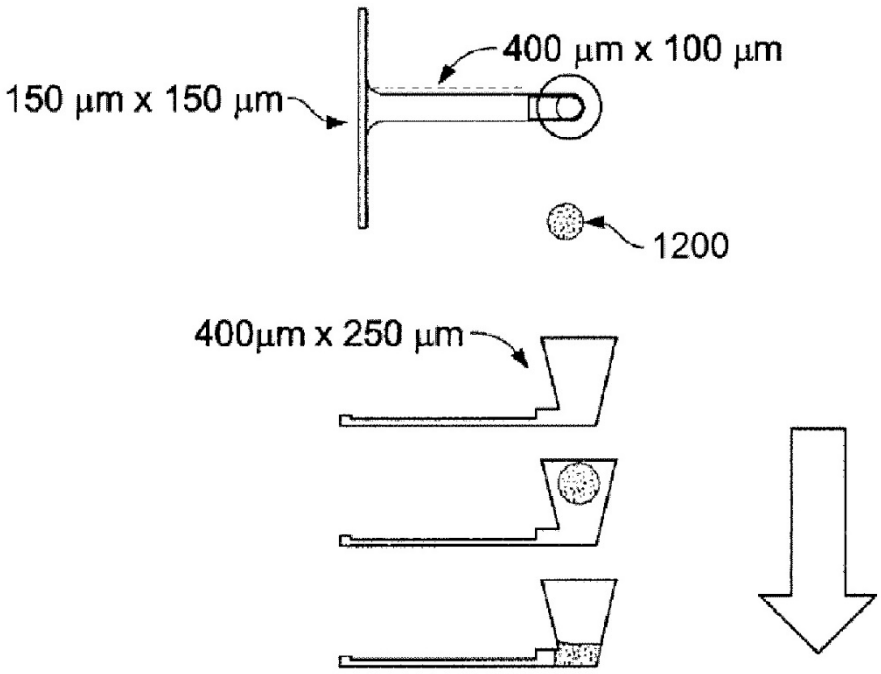


FIG. 55A

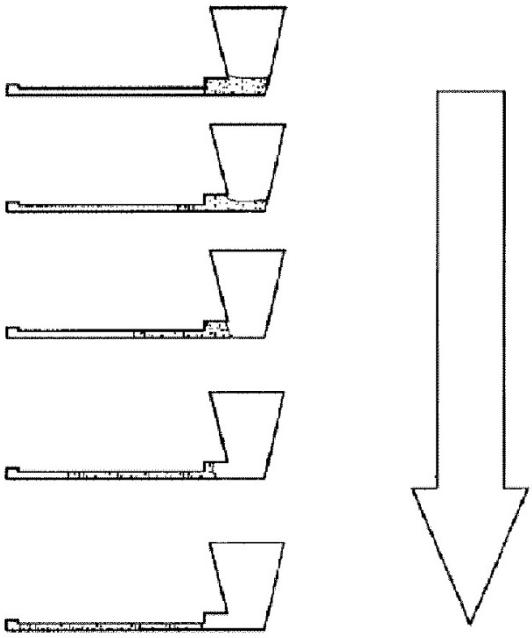


FIG. 55B

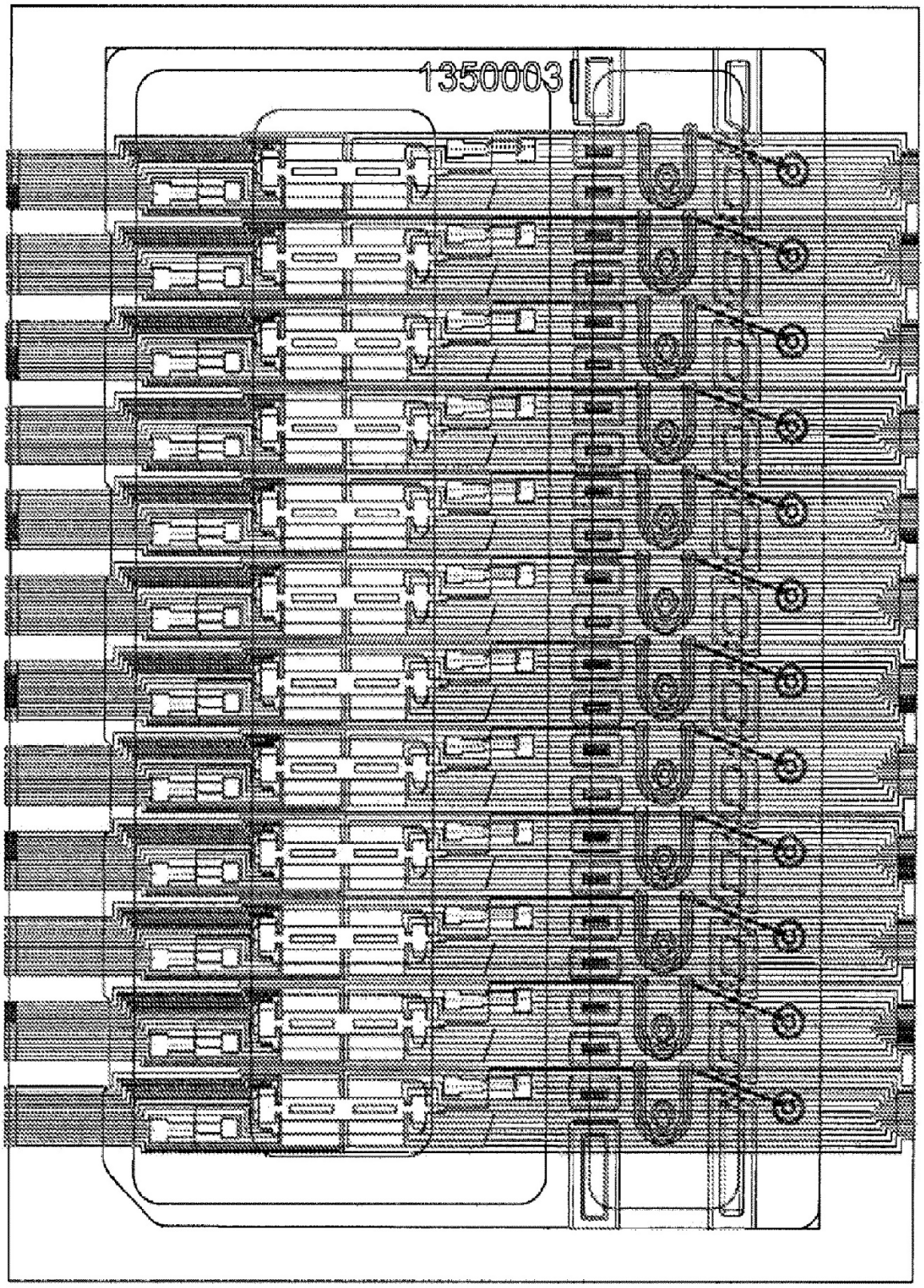


FIG. 56

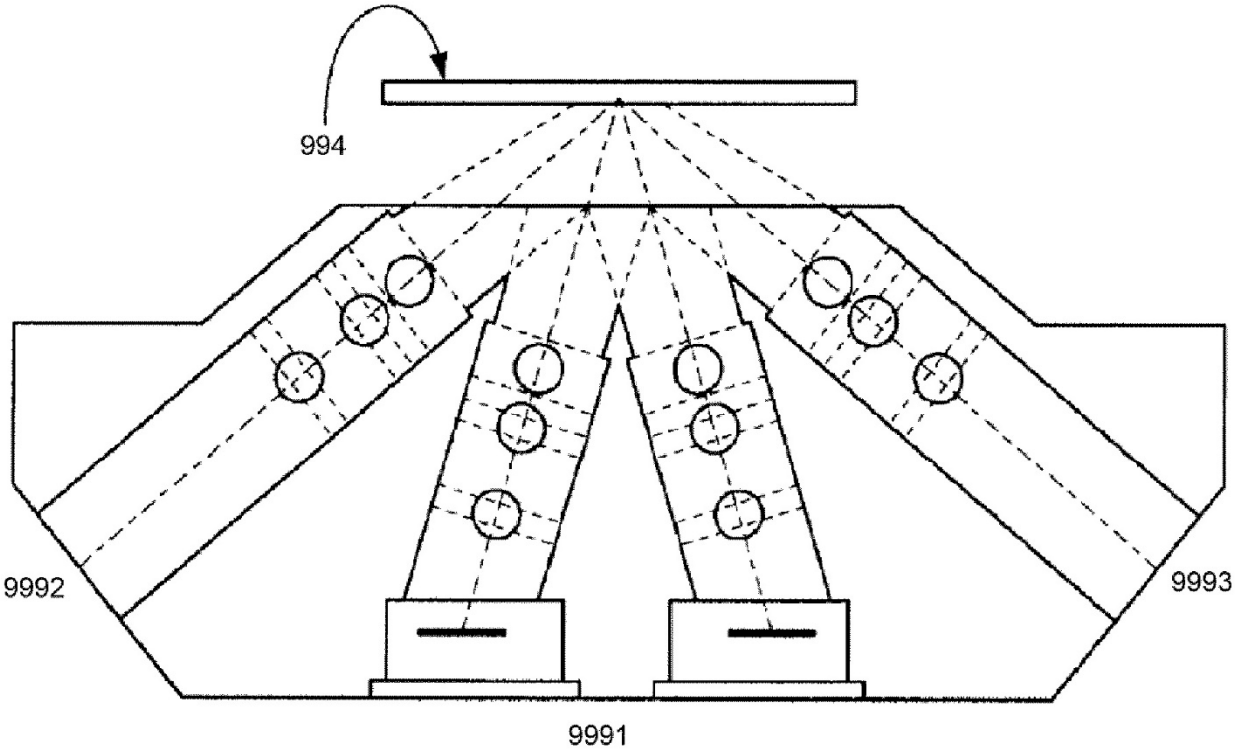


FIG. 57

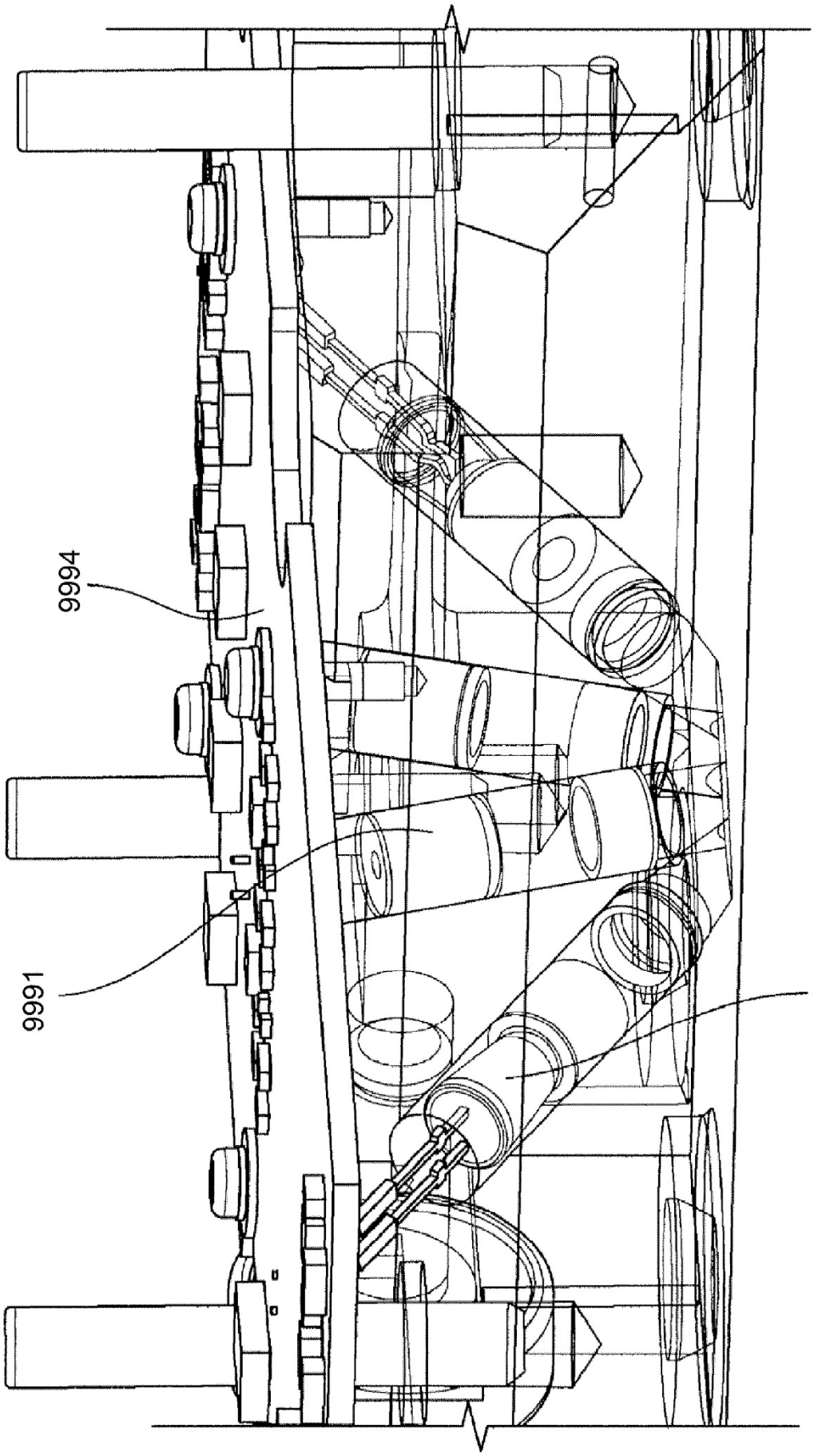


FIG. 58

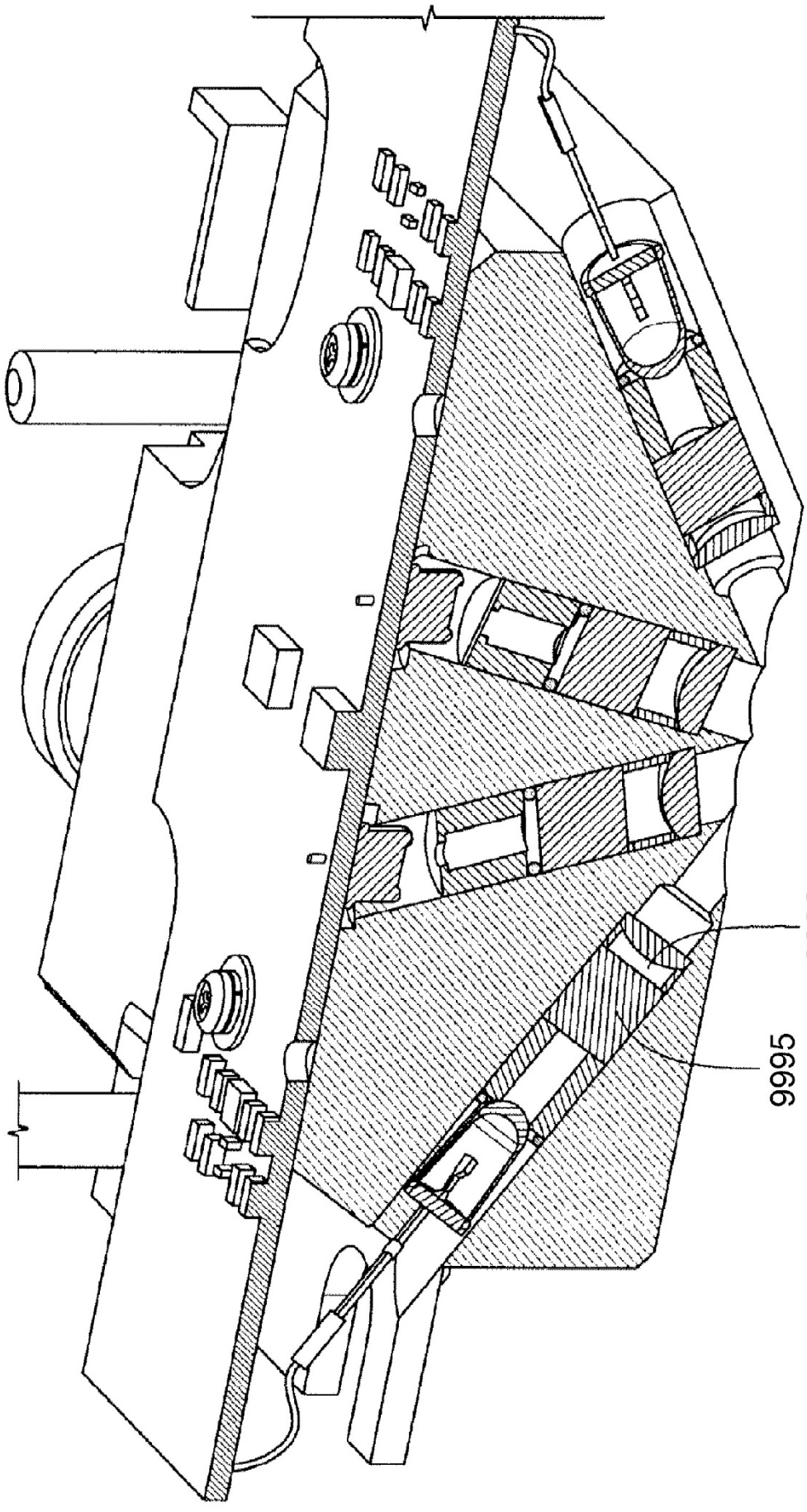


FIG. 59

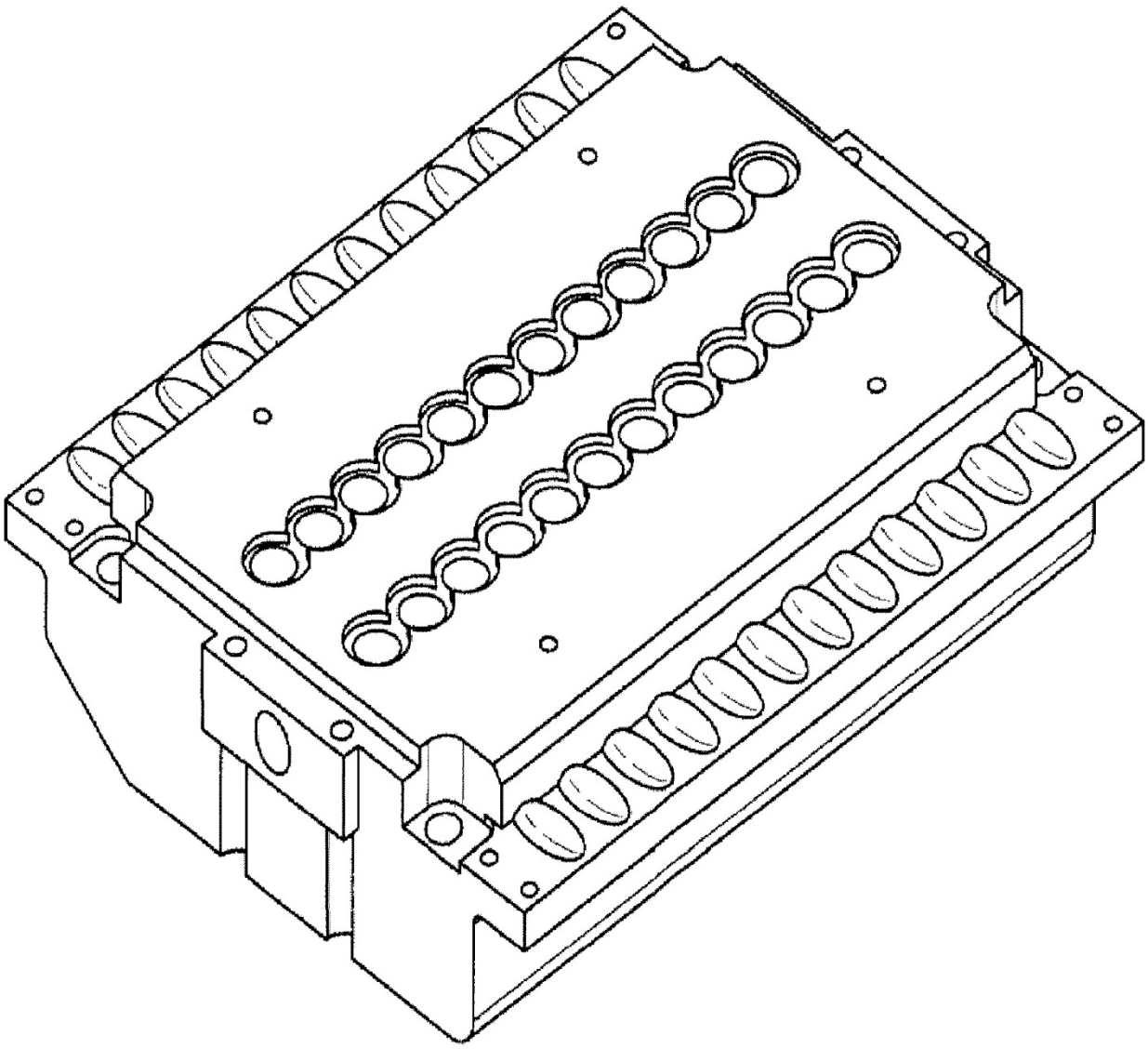


FIG. 60

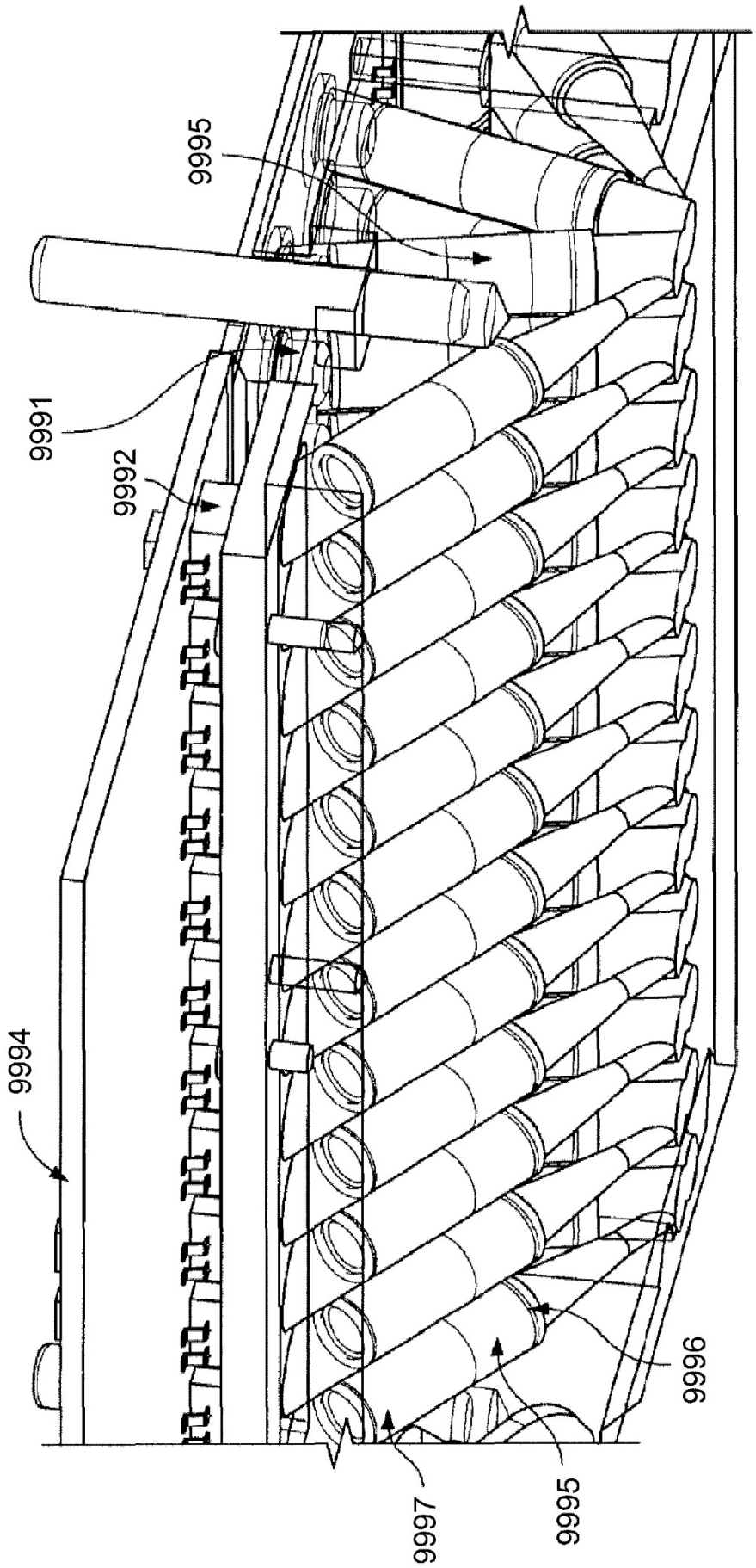


FIG. 61

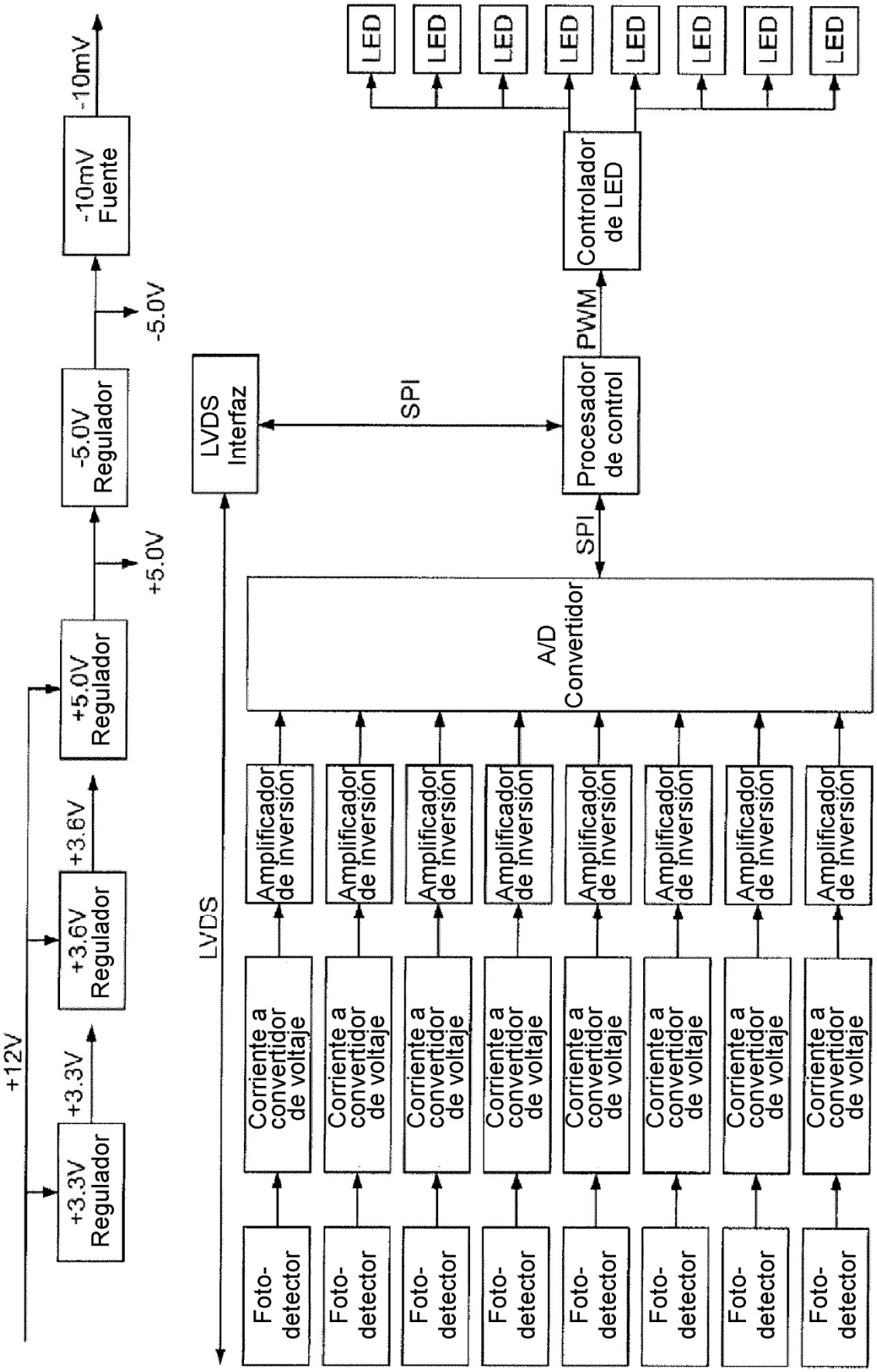

+12V
+3.3V Regulador
+3.3V
+3.6V Regulador
+3.6V
+5.0V Regulador
+5.0V
-5.0V Regulador
-5.0V
-10mV Fuente
-10mV
LED
Controlador de LED
PWM
LVDS Interfaz
SPI
Procesador de control
SPI
A/D Convertidor
LVDS
Amplificador de inversión
Corriente a convertidor de voltaje
Foto-detector

FIG. 62

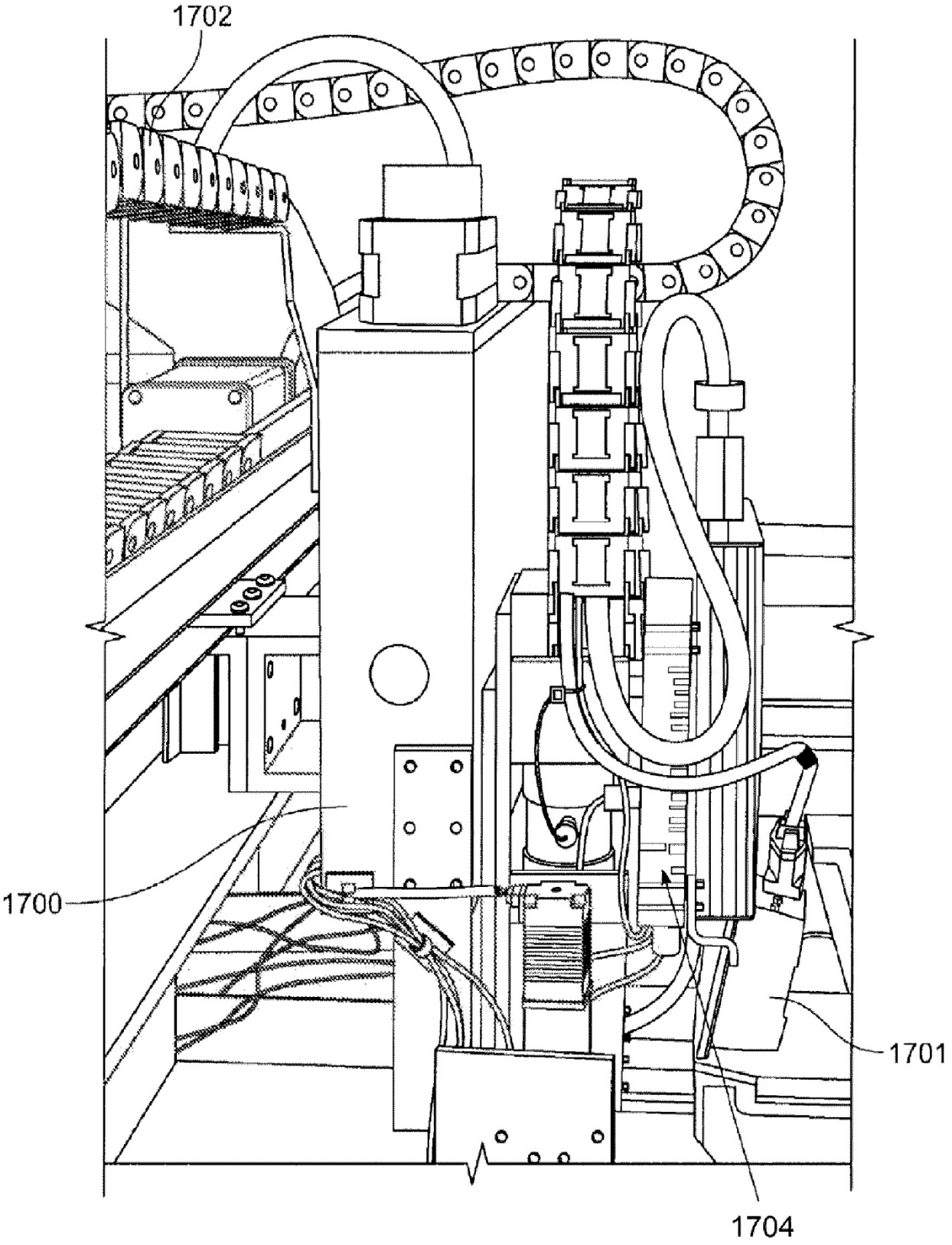


FIG. 63

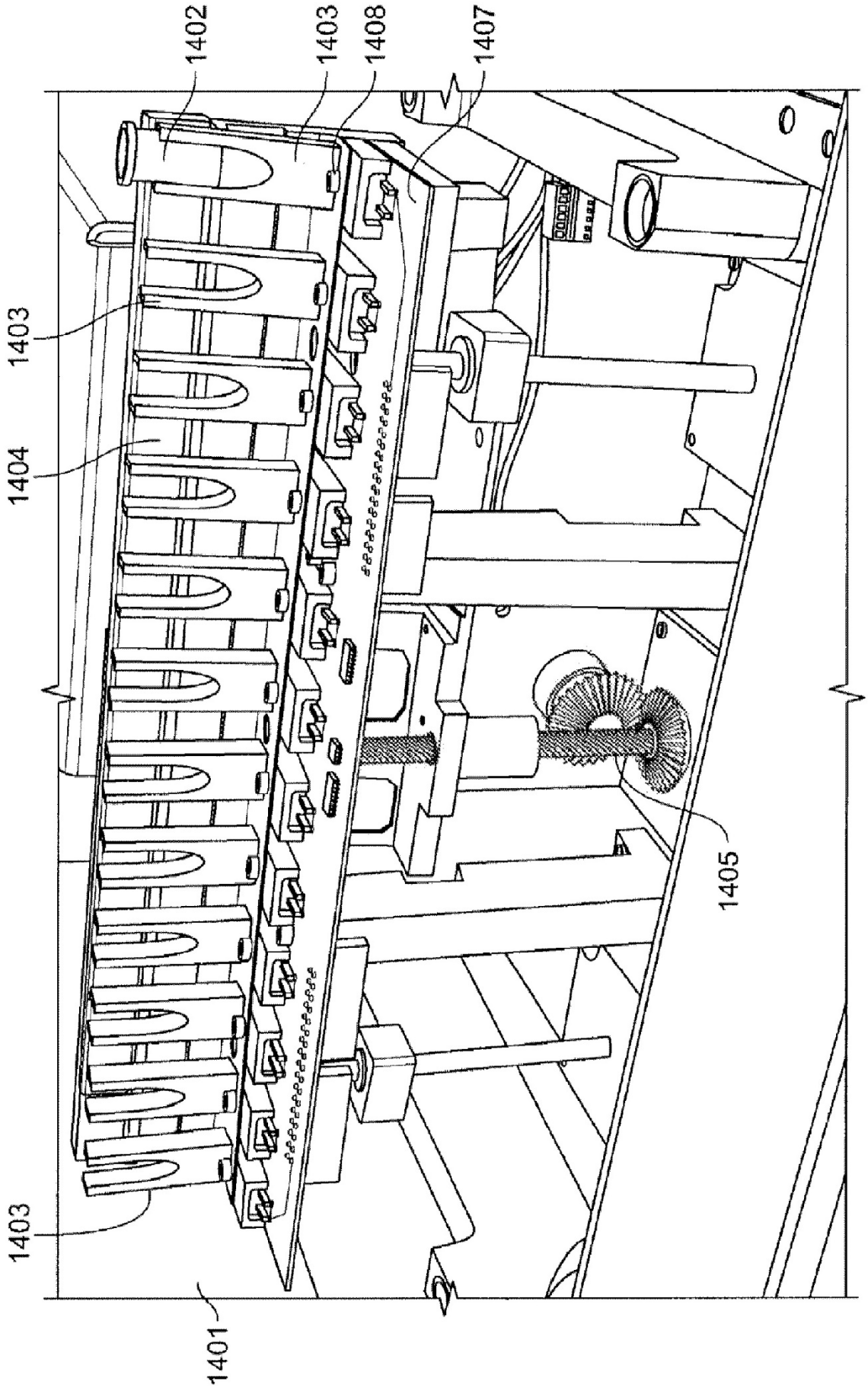


FIG. 64

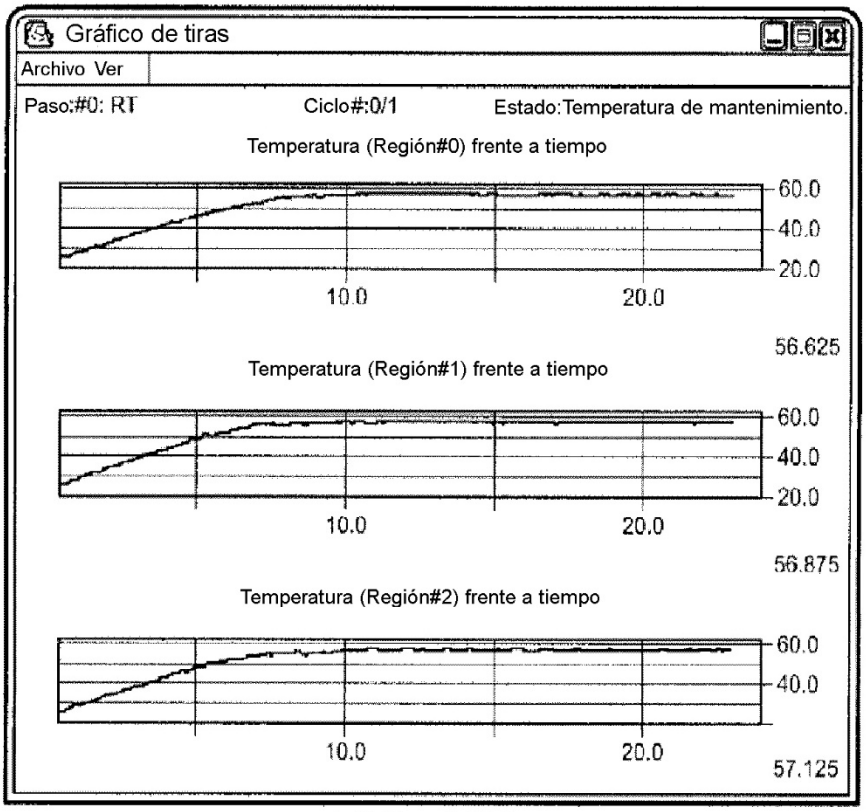


FIG. 65A

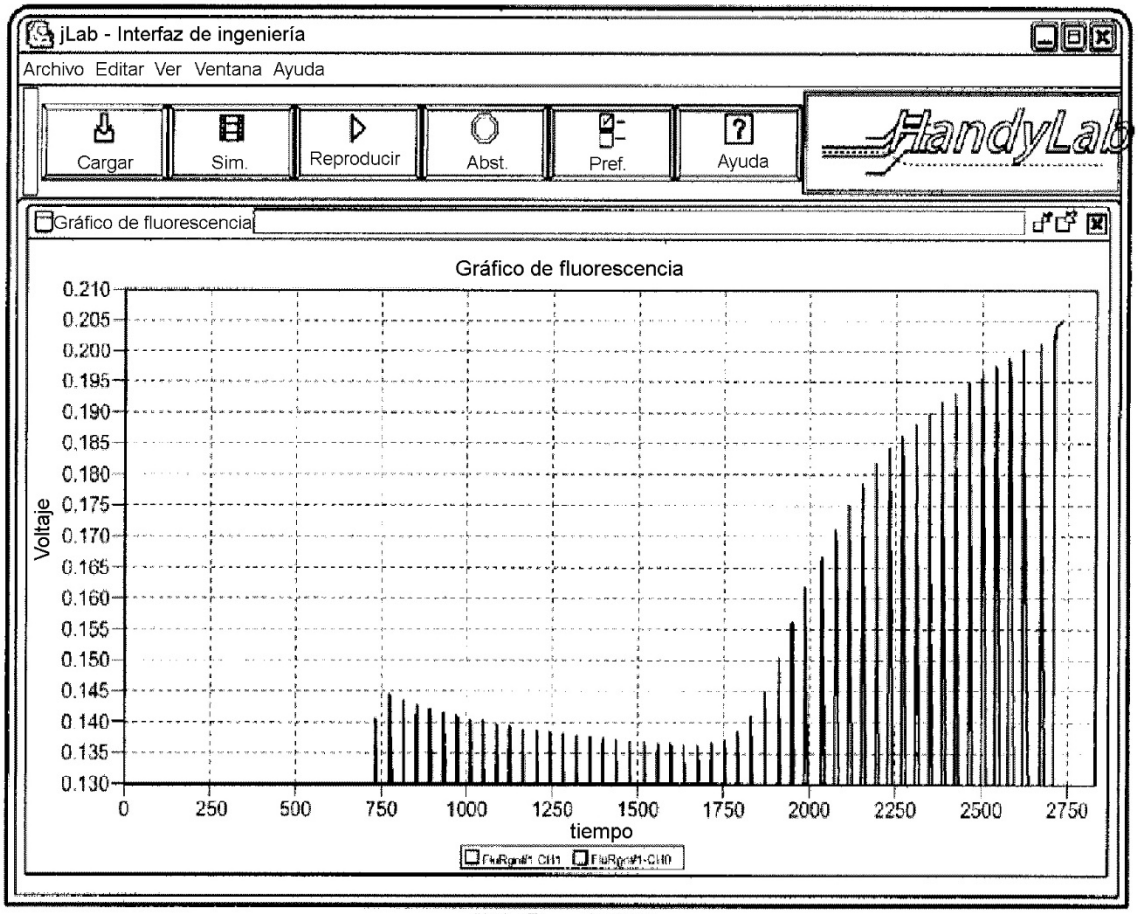


FIG. 65B

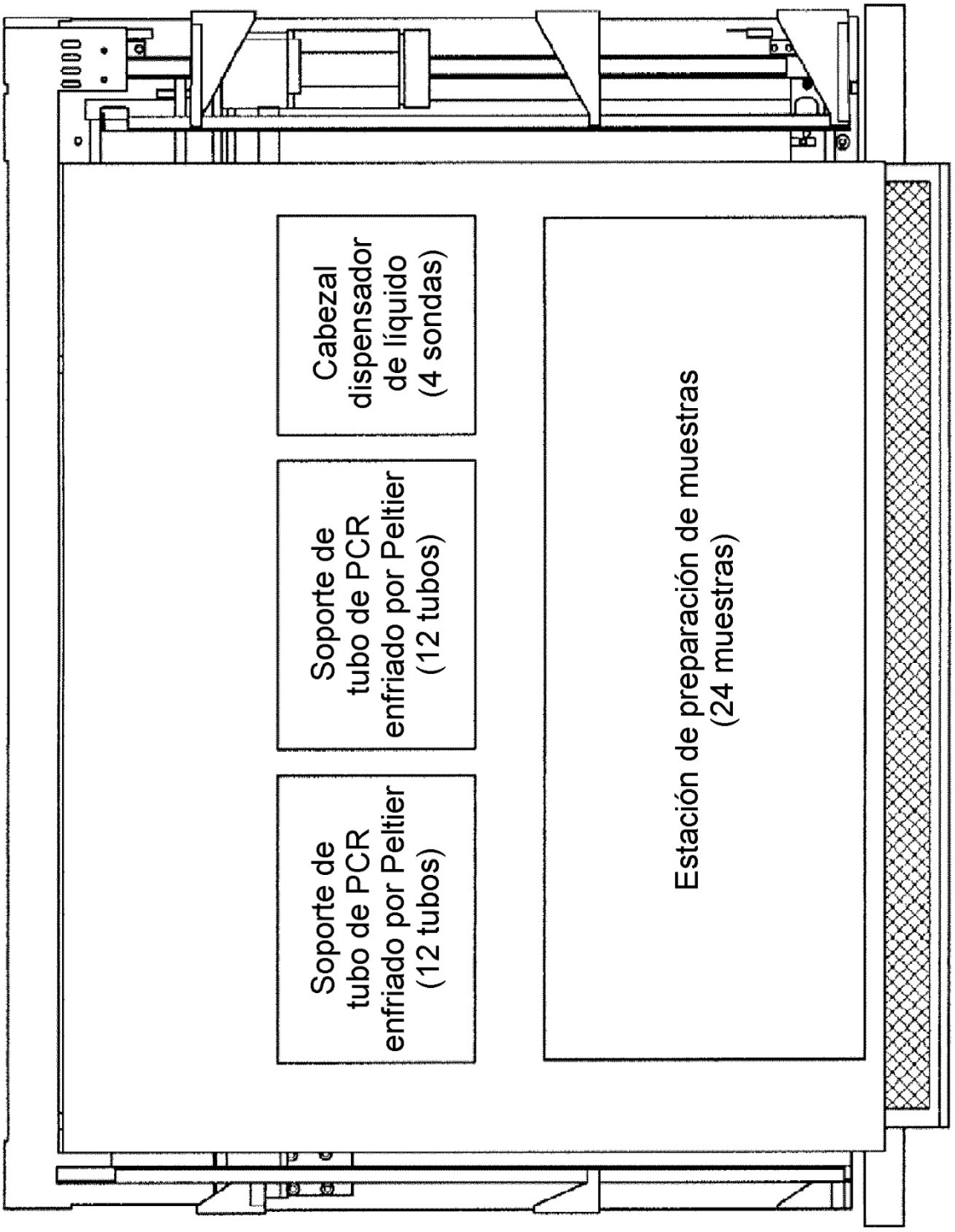

Cabezal dispensador de líquido (4 sondas)
Soporte de tubo de PCR enfriado por Peltier (12 tubos)
Soporte de tubo de PCR enfriado por Peltier (12 tubos)
Estación de preparación de muestras (24 muestras)

FIG. 66

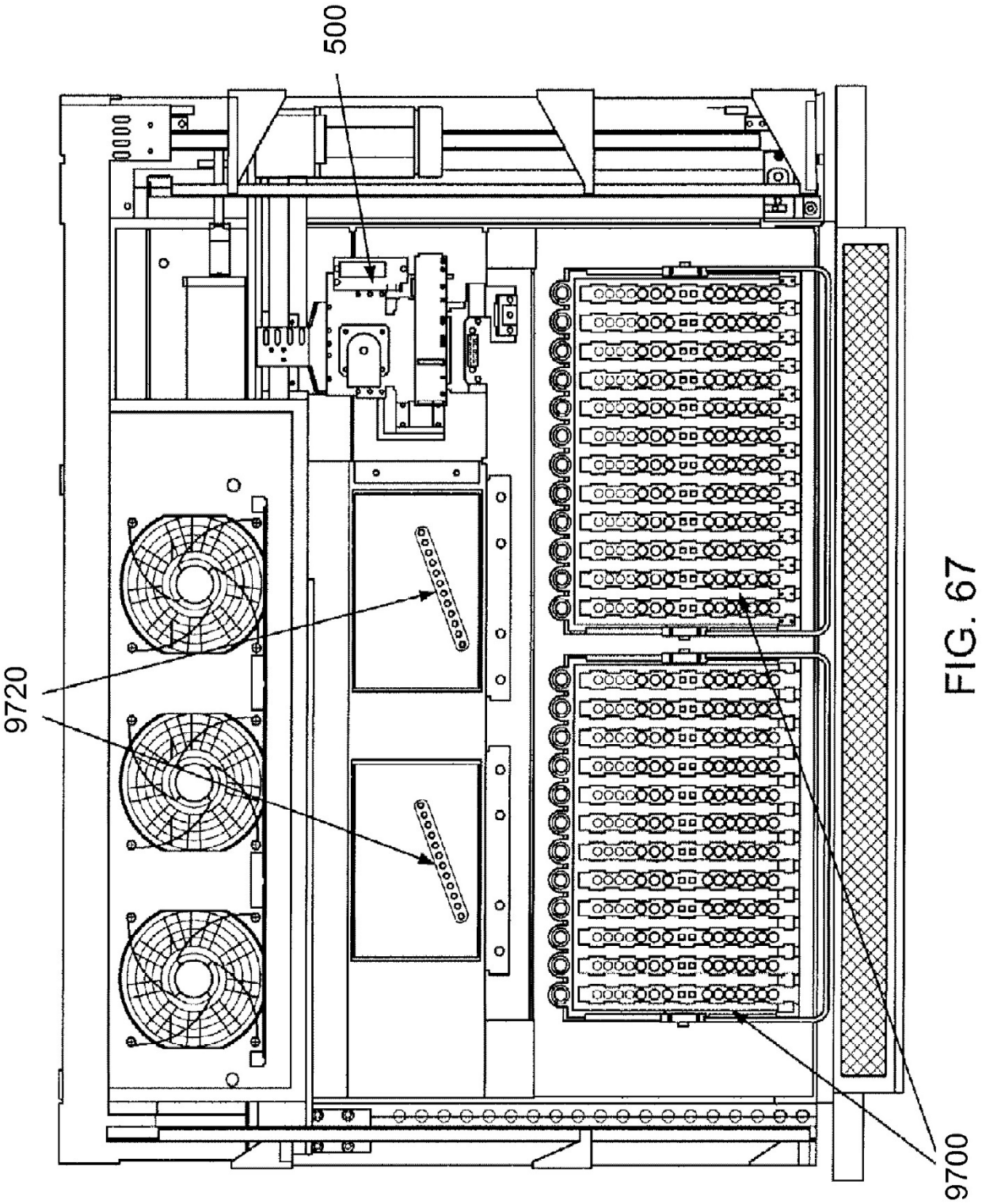


FIG. 67

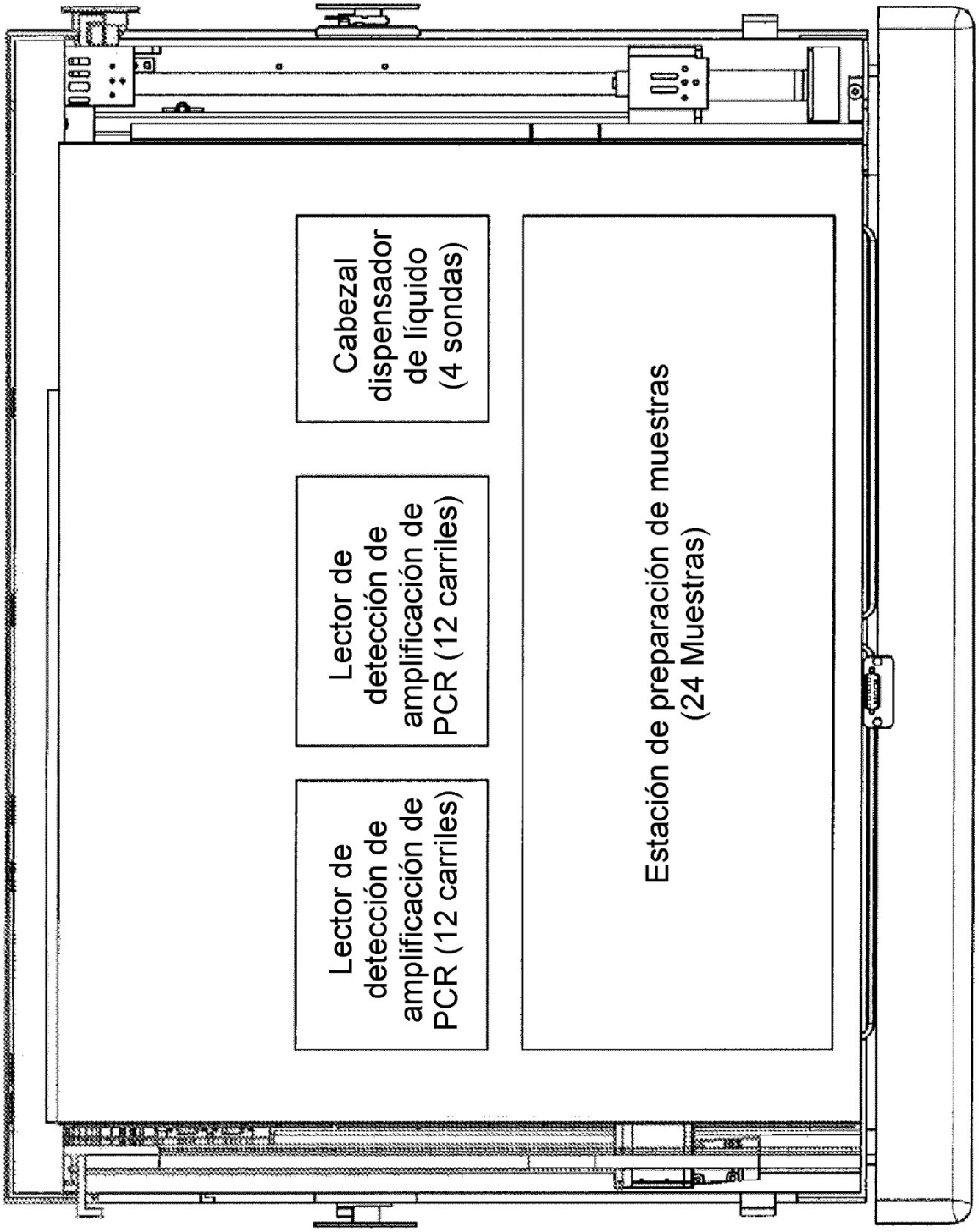

Cabezal dispensador de líquido (4 sondas)
Lector de detección de amplificación de PCR (12 carriles)
Lector de detección de amplificación de PCR (12 carriles)
Estación de preparación de muestras (24 Muestras)

FIG. 68

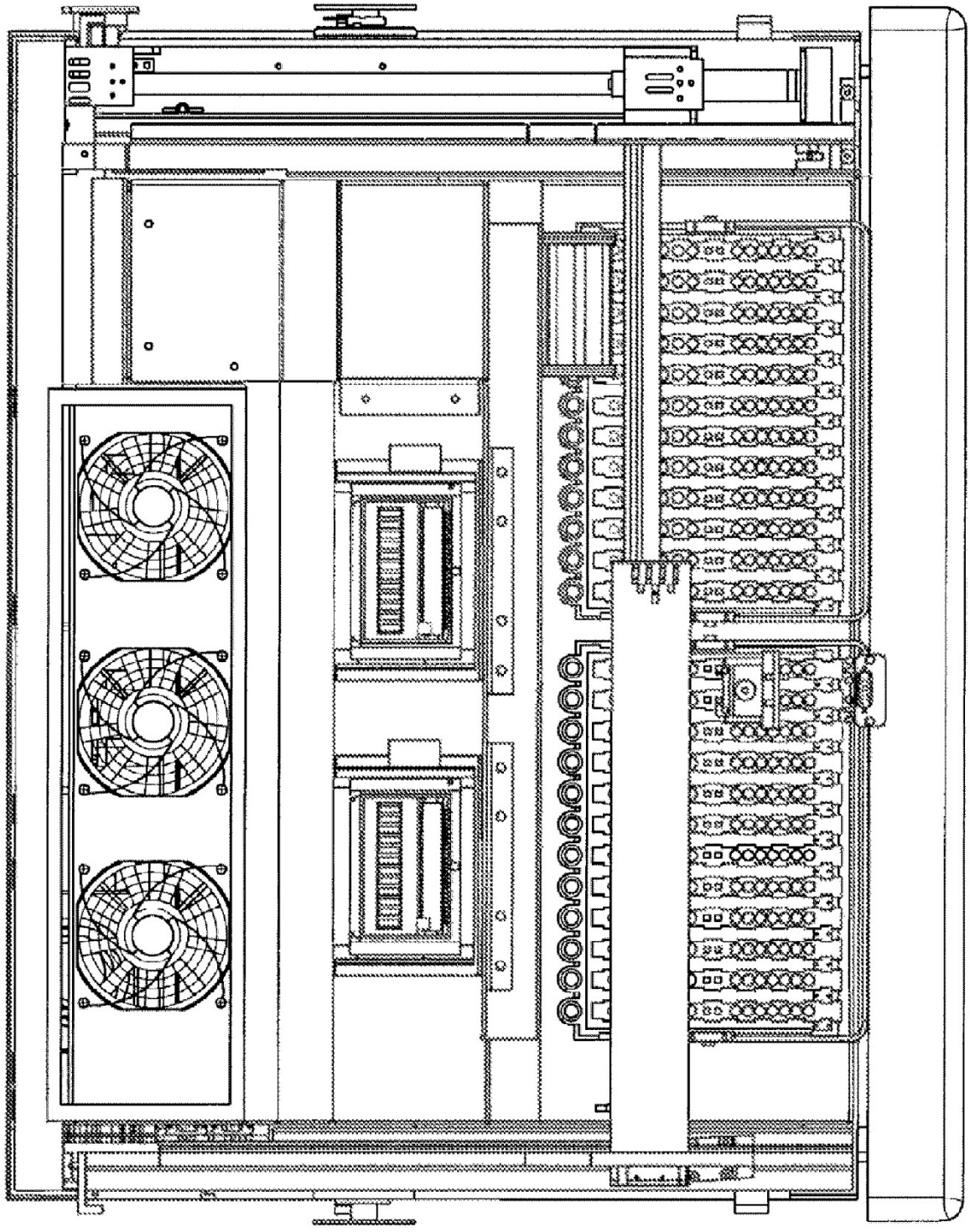


FIG. 69

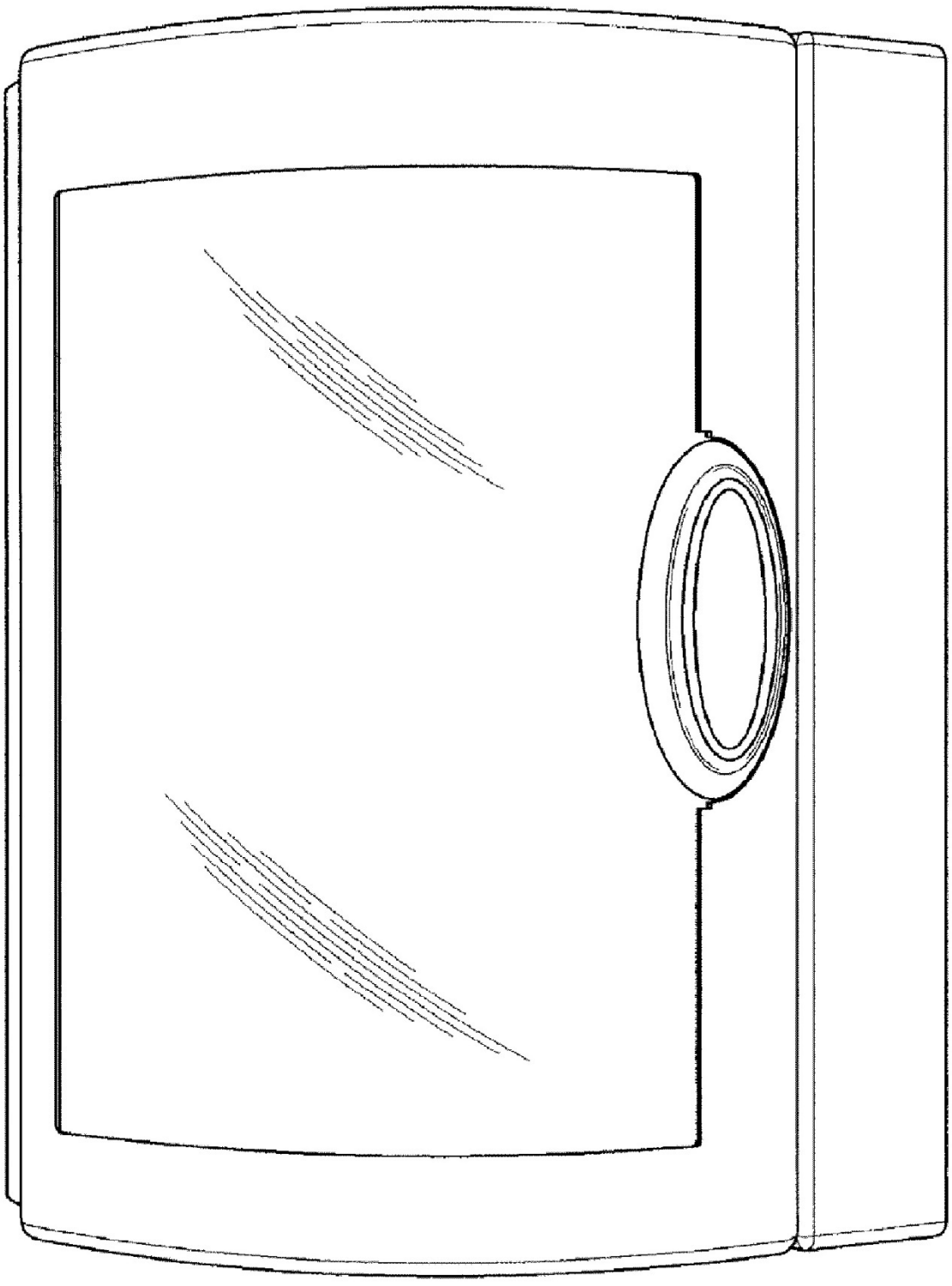


FIG. 70

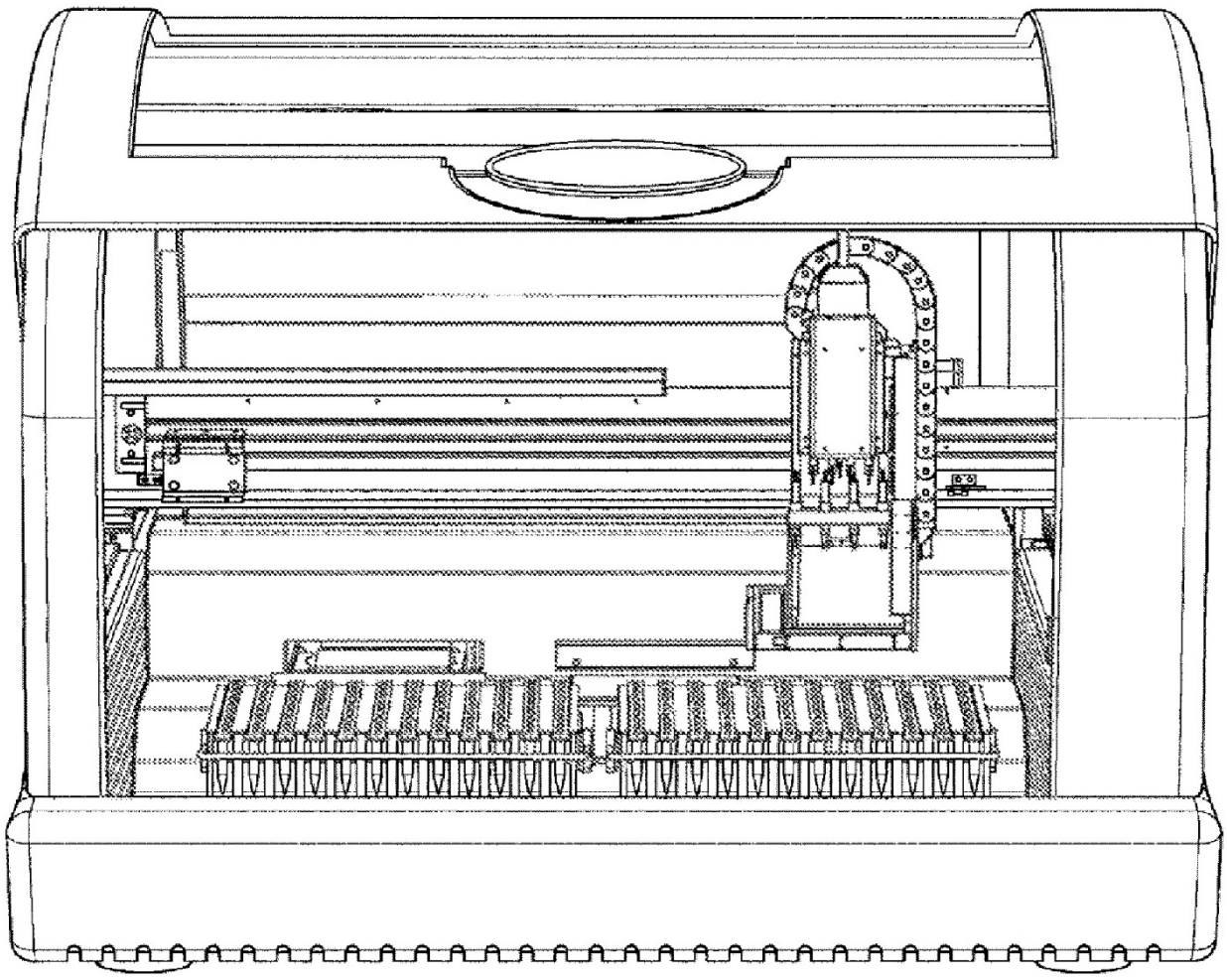


FIG. 71

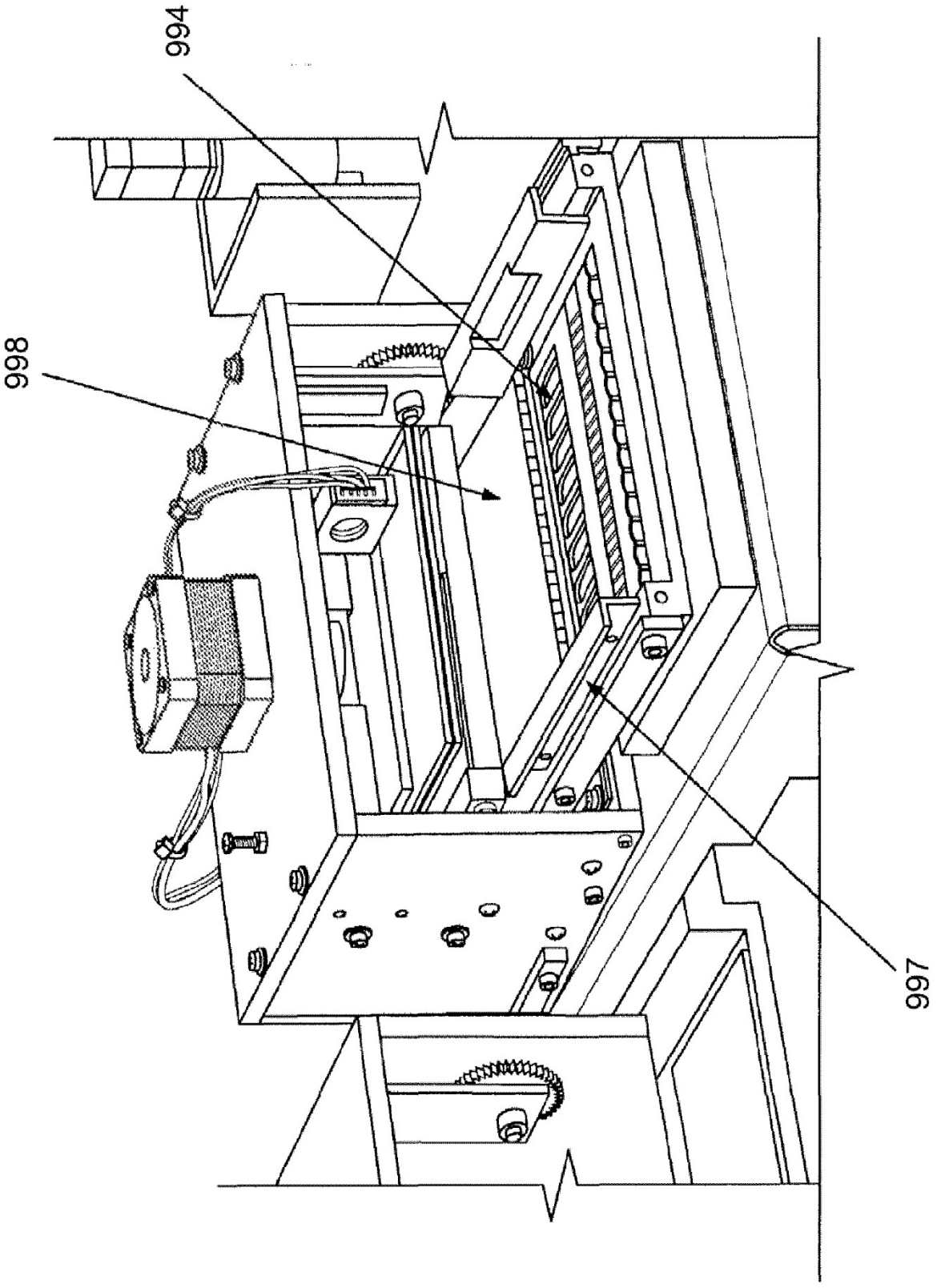


FIG. 72A

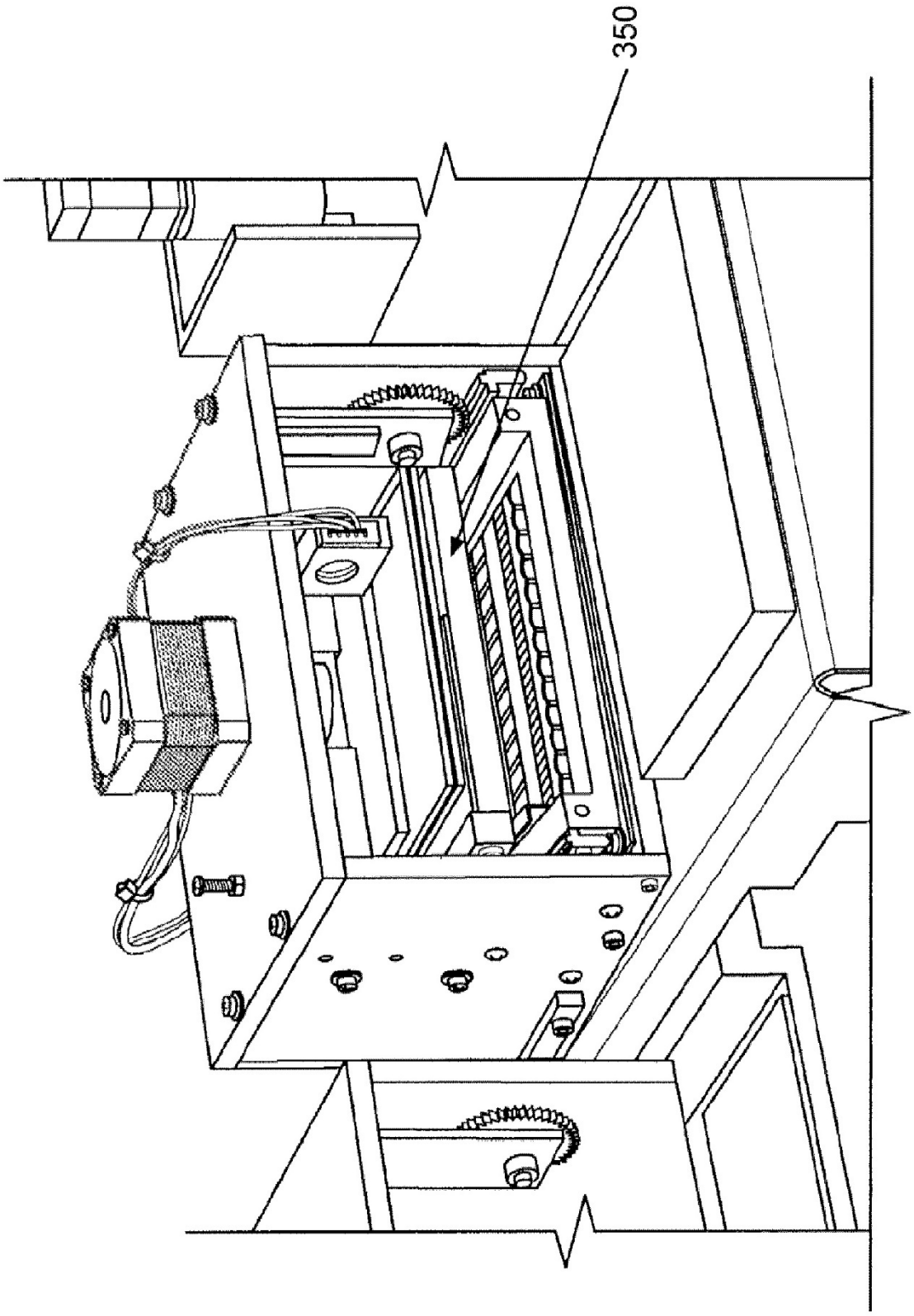


FIG. 72B

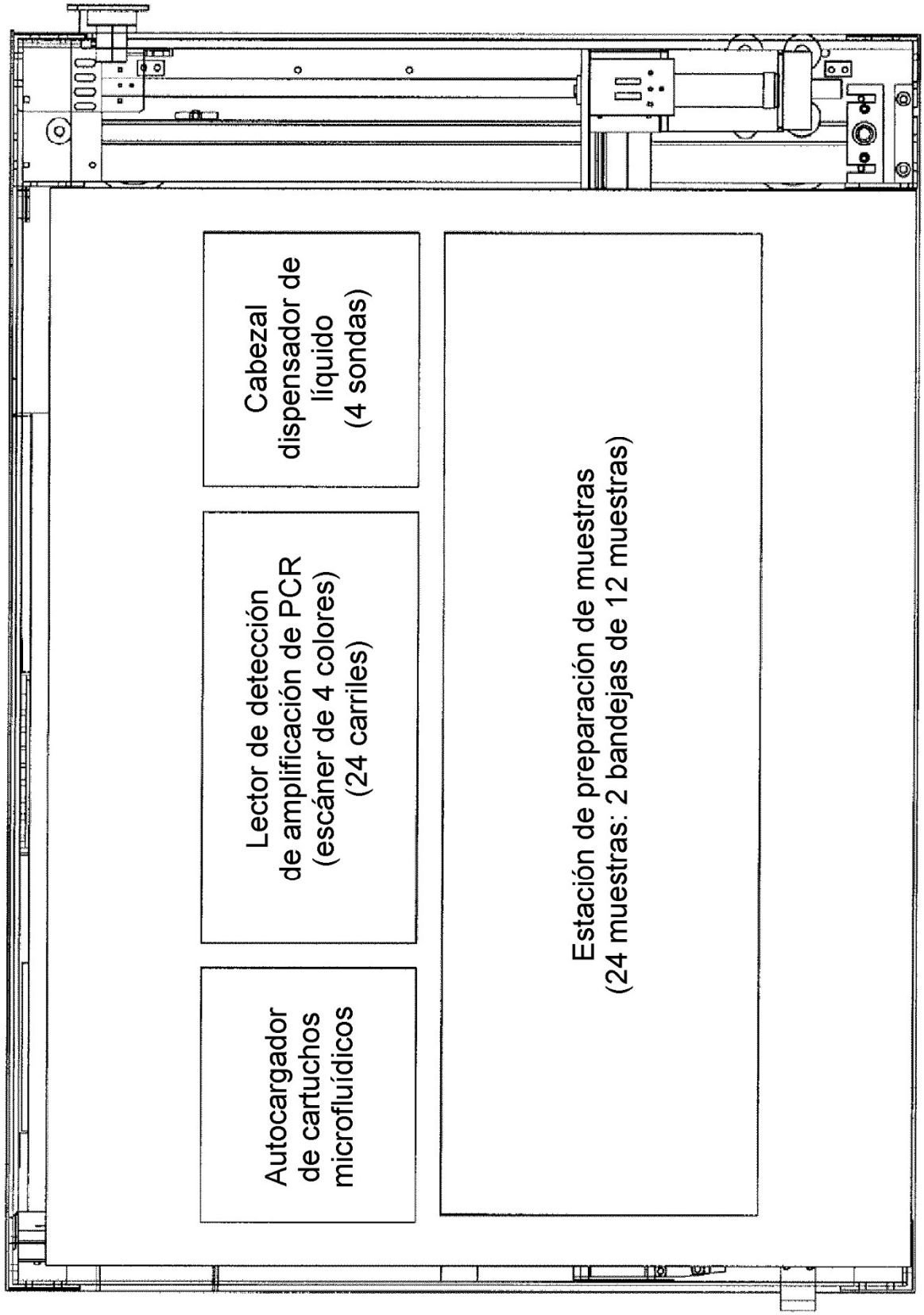

Cabezal dispensador de líquido (4 sondas)
Lector de detección de amplificación de PCR (escáner de 4 colores) (24 carriles)
Autocargador de cartuchos microfluídicos
Estación de preparación de muestras (24 muestras: 2 bandejas de 12 muestras)

FIG. 73

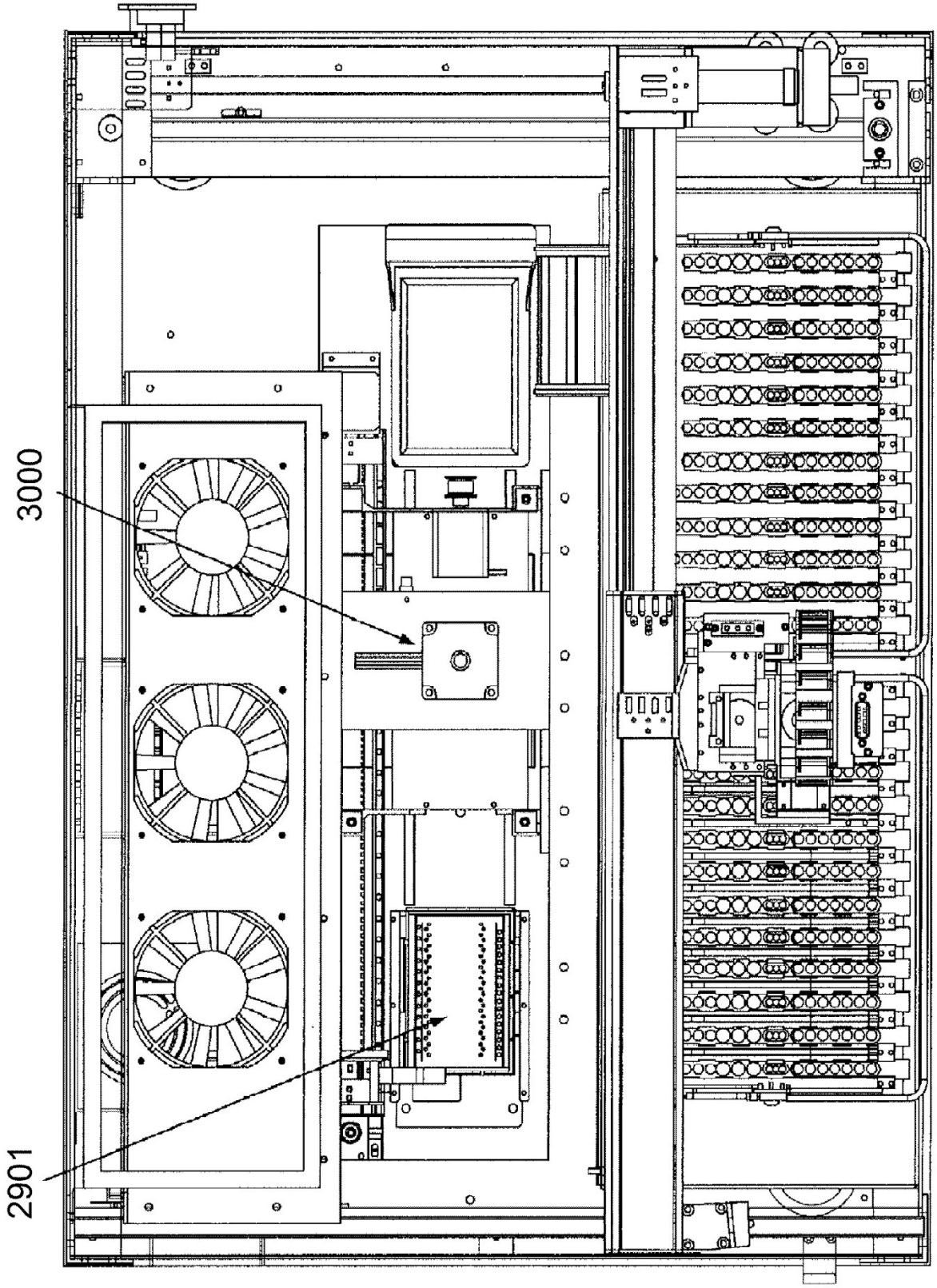


FIG. 74

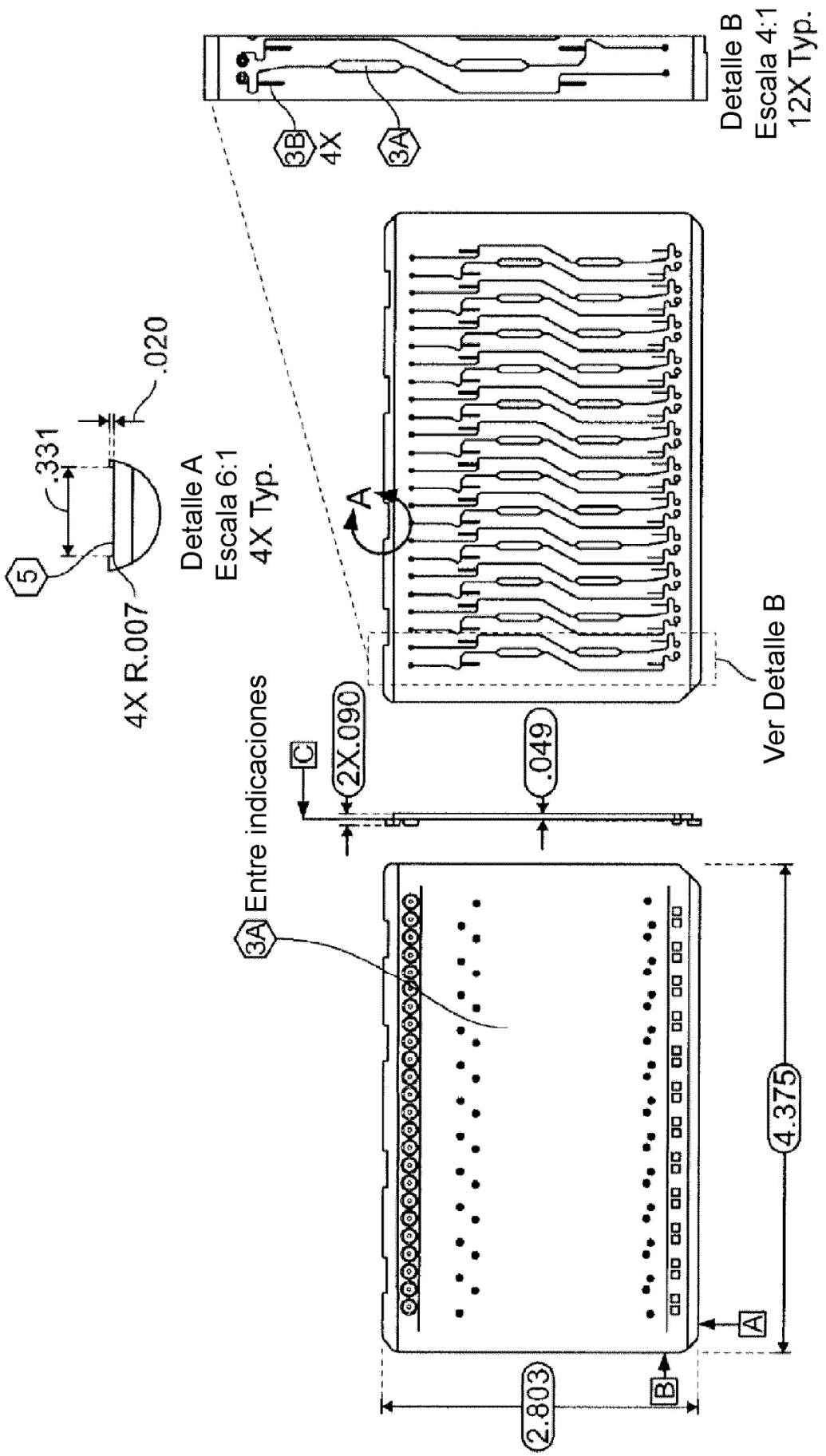

Detalle B
Escala 4:1
12X Typ.
3B
4X
3A
.020
.331
5
4X R.007
Detalle A
Escala 6:1
4X Typ.
A
Ver Detalle B
2X.090
C
.049
3A Entre indicaciones
4.375
A
2.803
B

FIG. 75

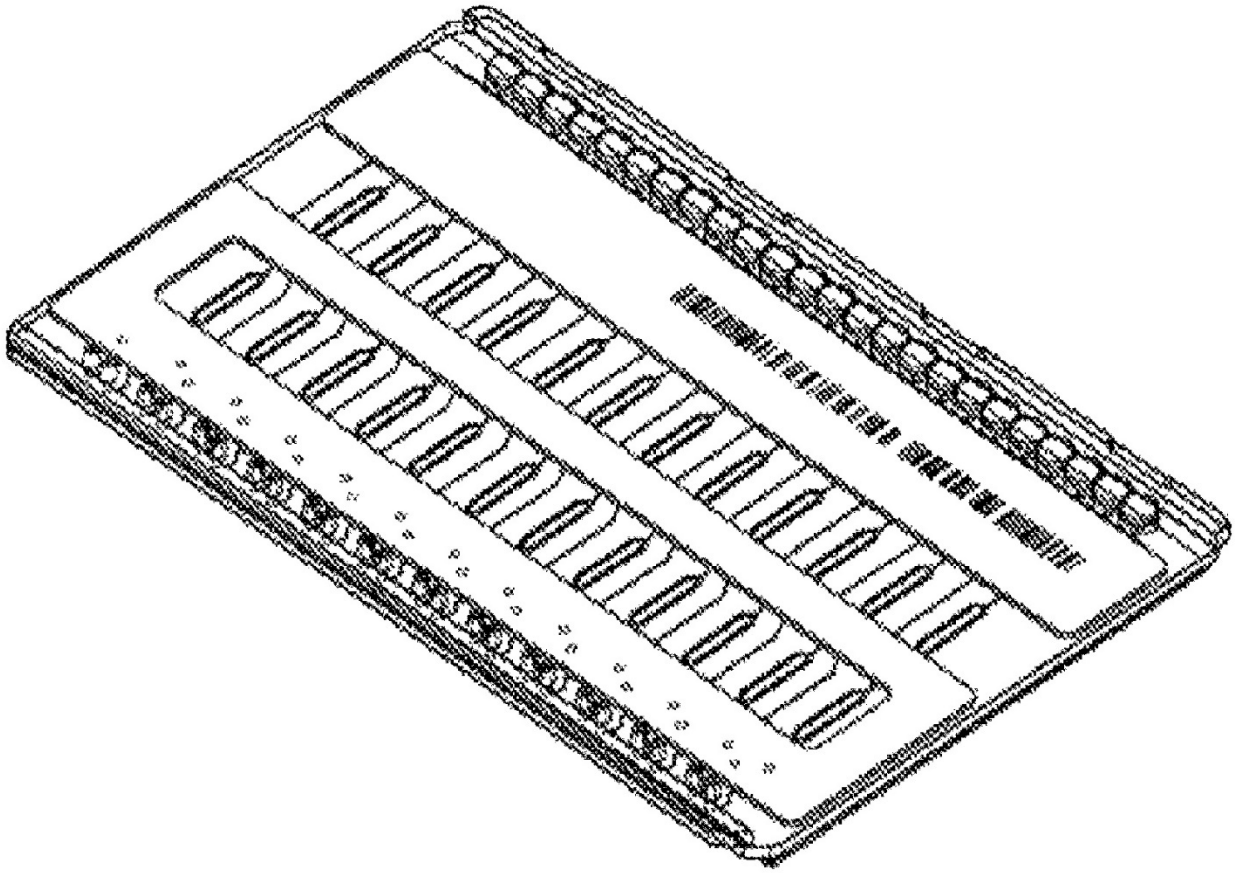


FIG. 76

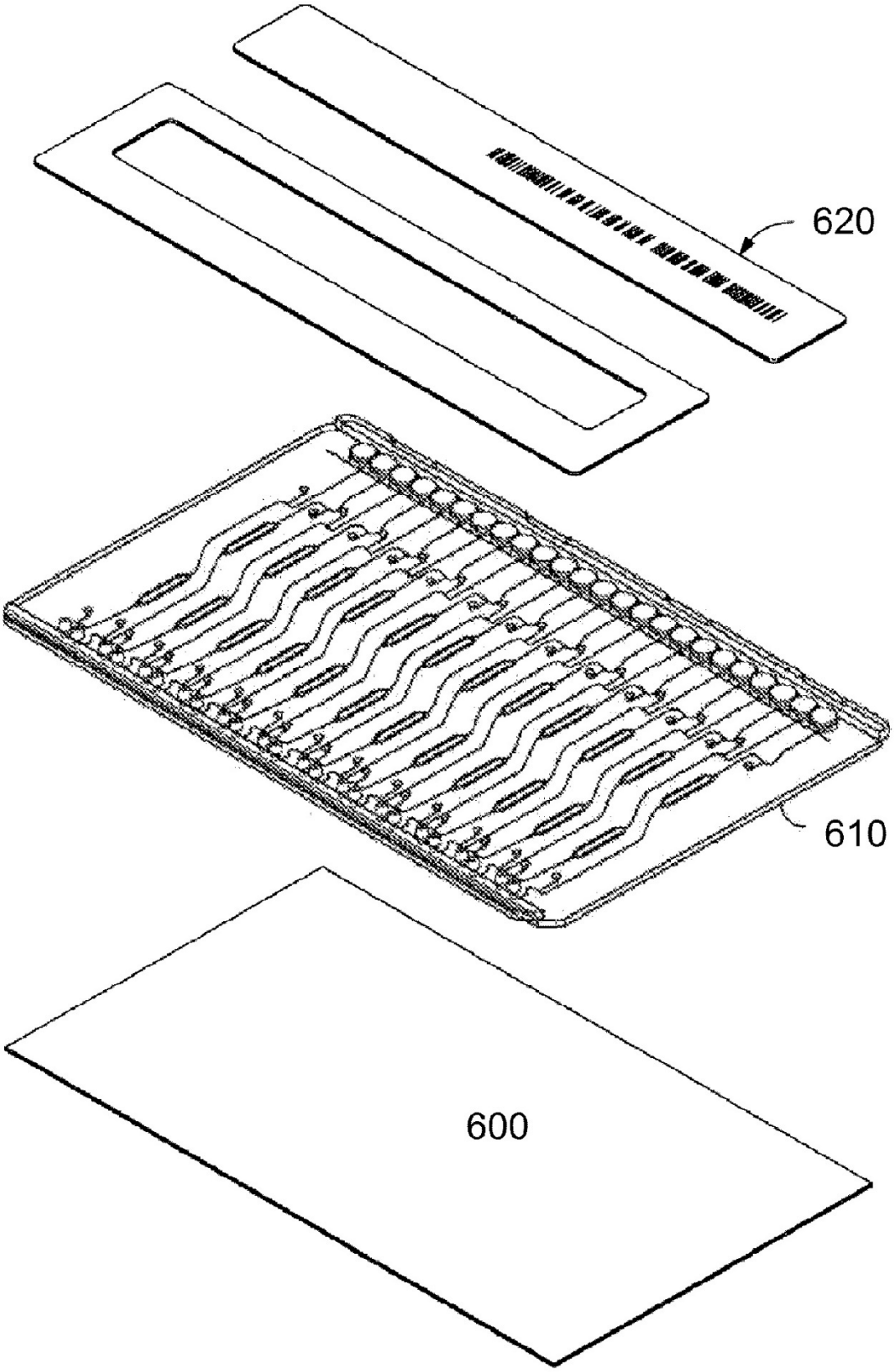


FIG. 77

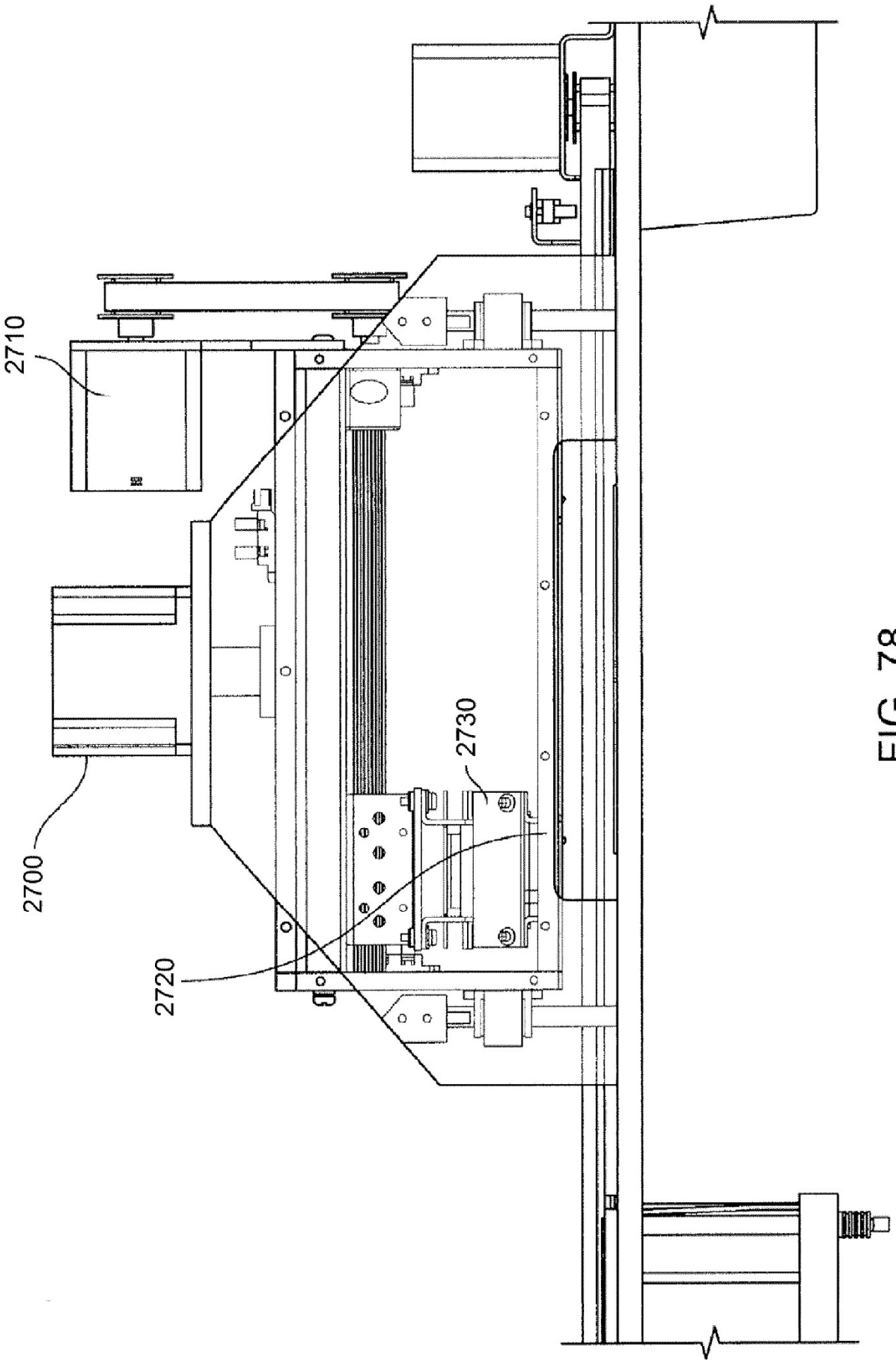


FIG. 78

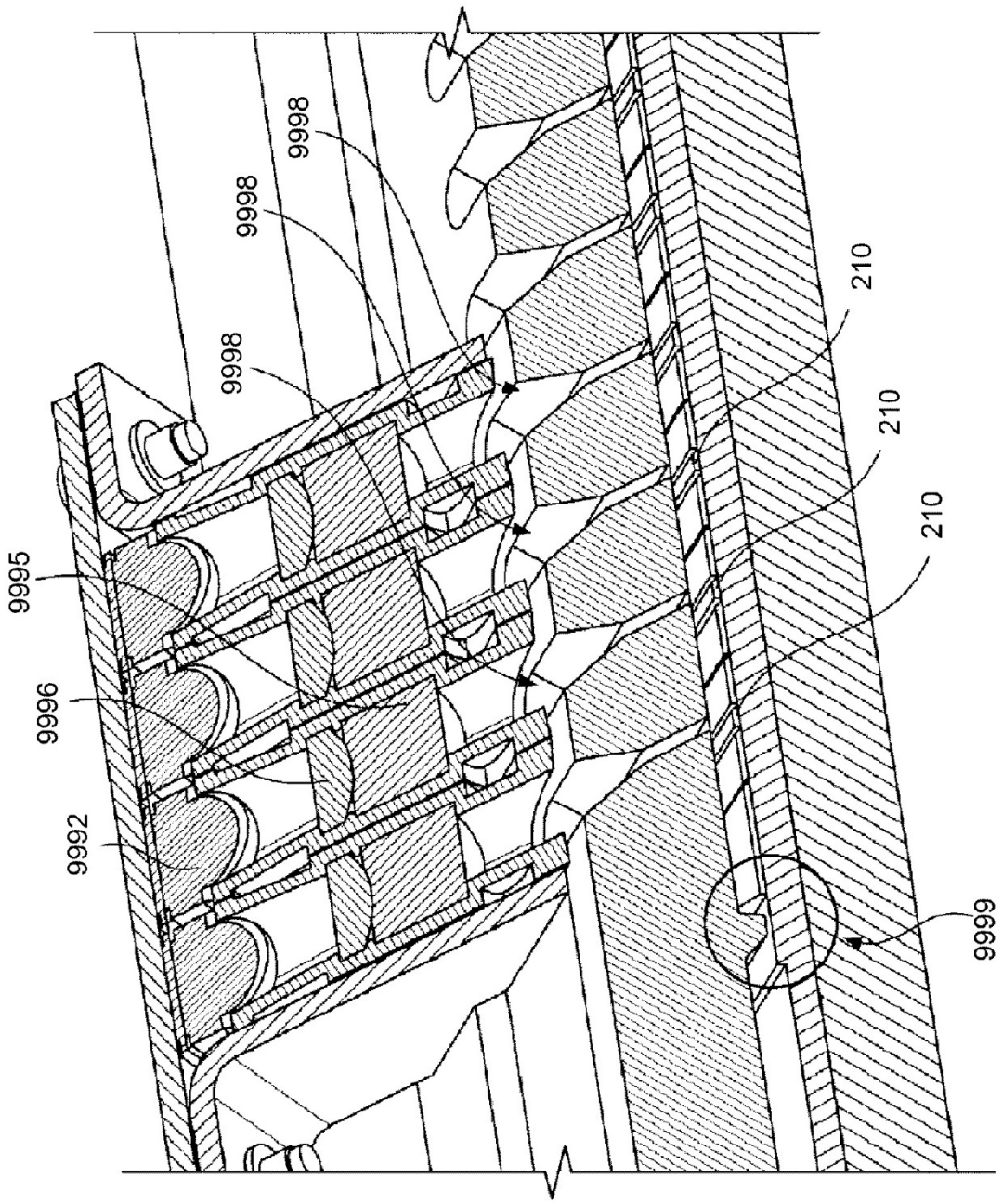


FIG. 79A

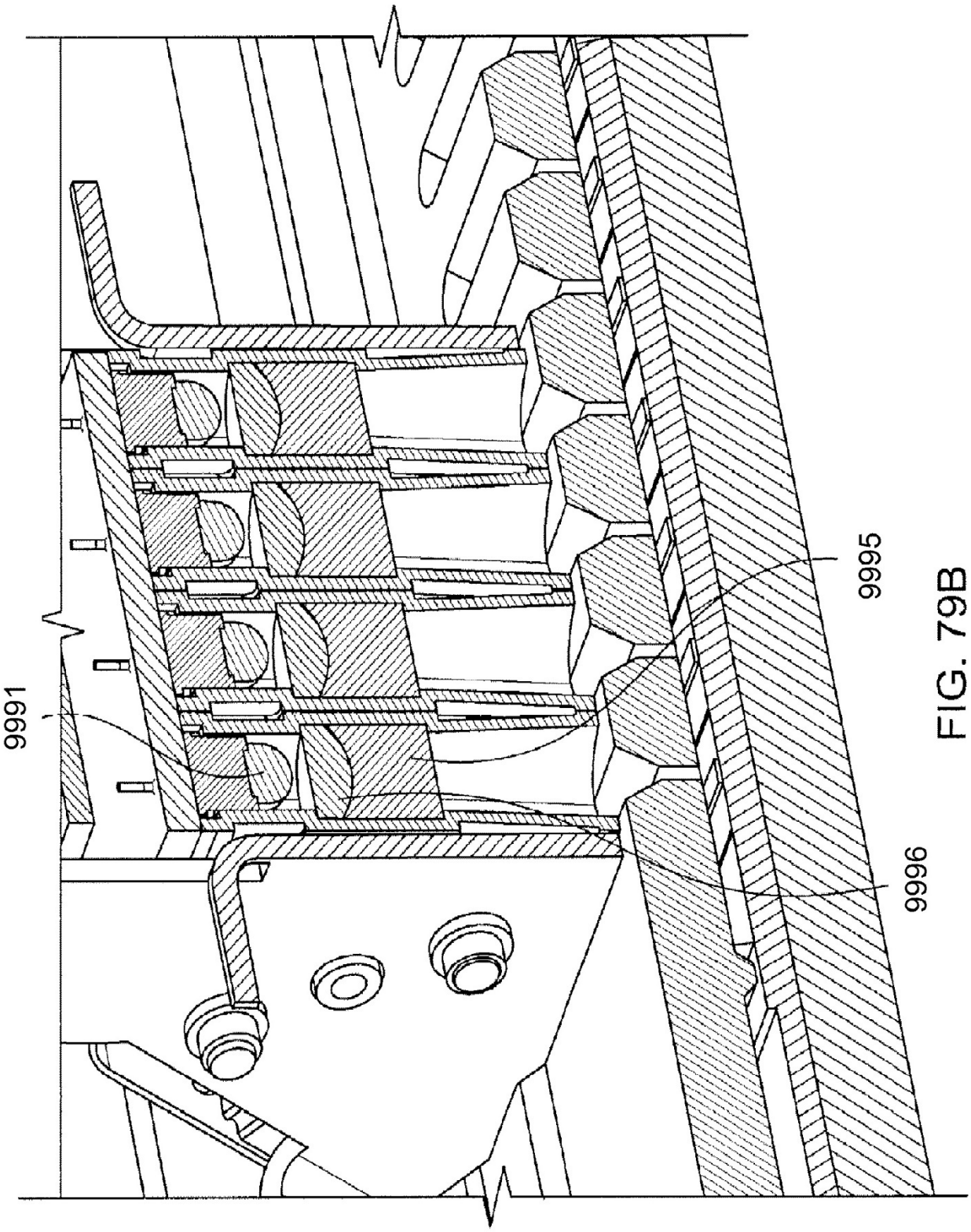


FIG. 79B

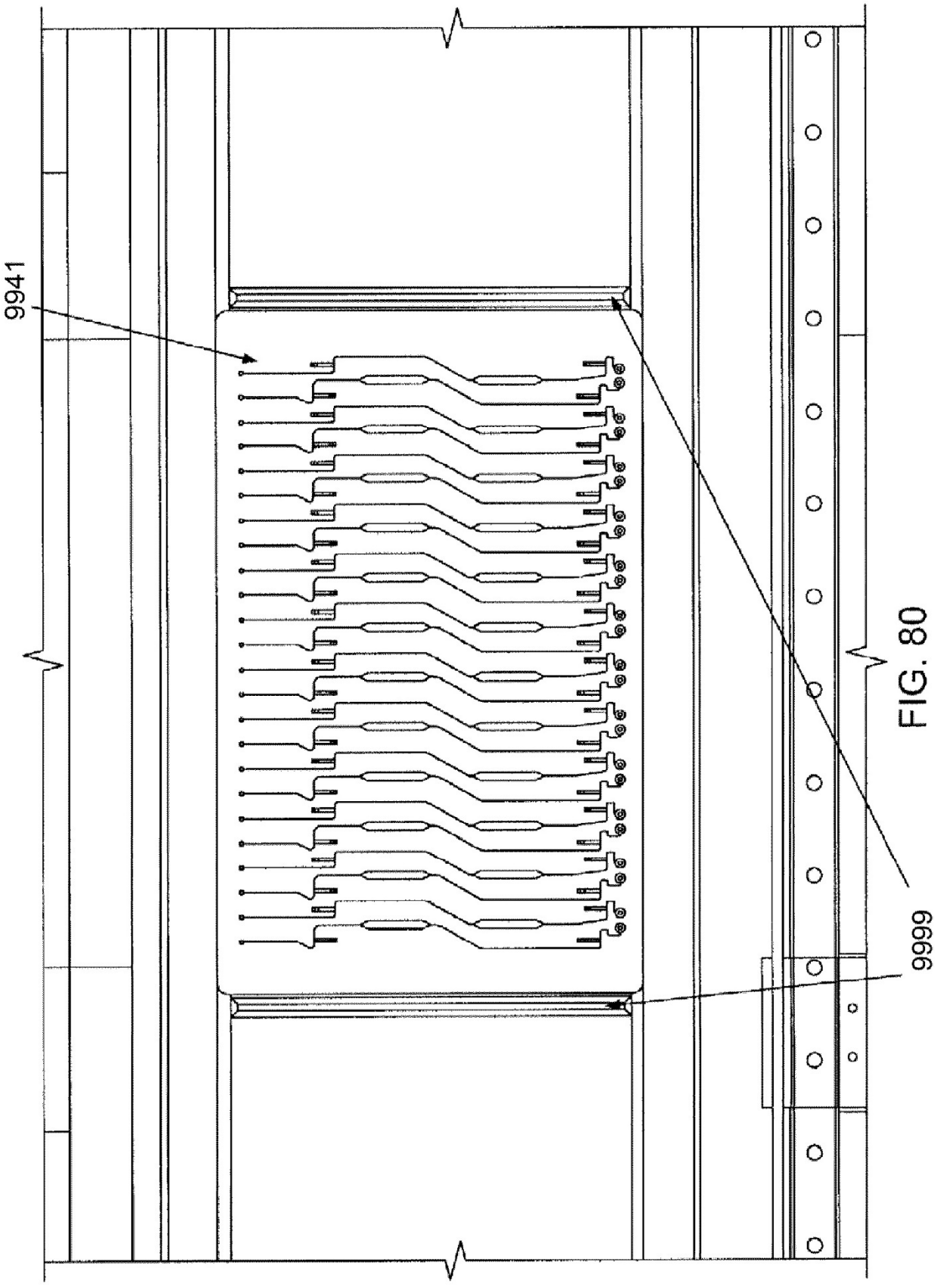


FIG. 80

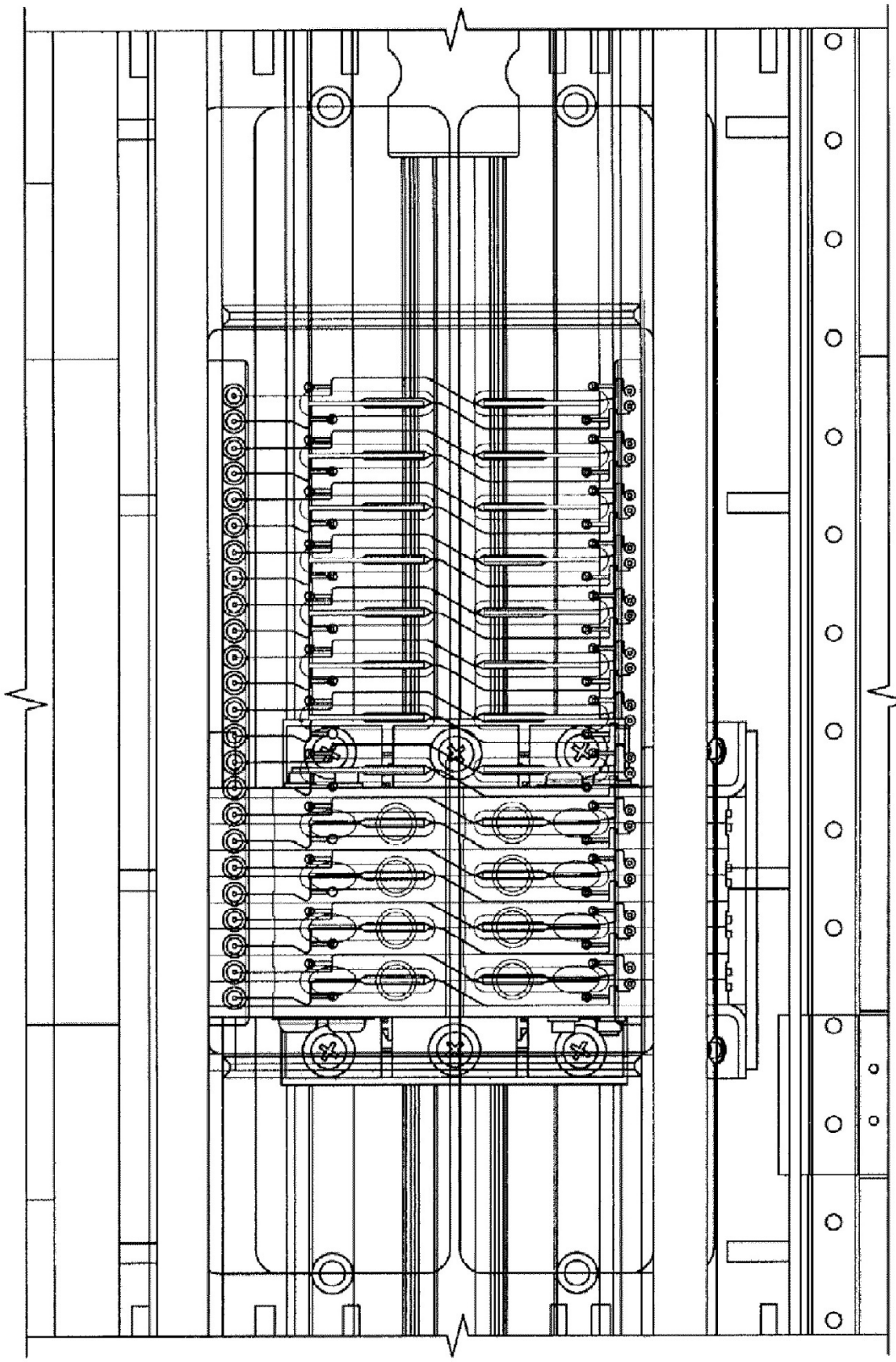


FIG. 81

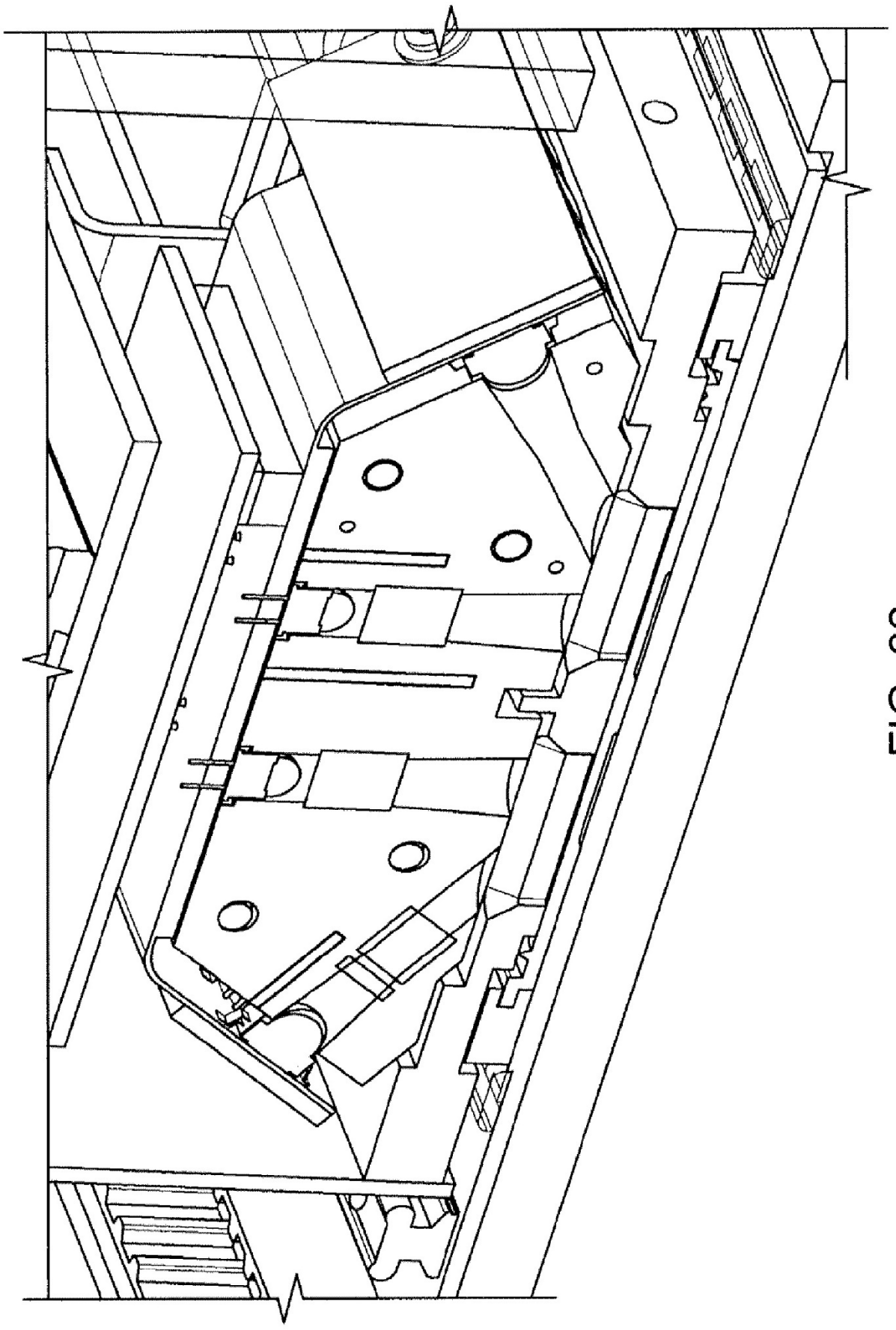


FIG. 82

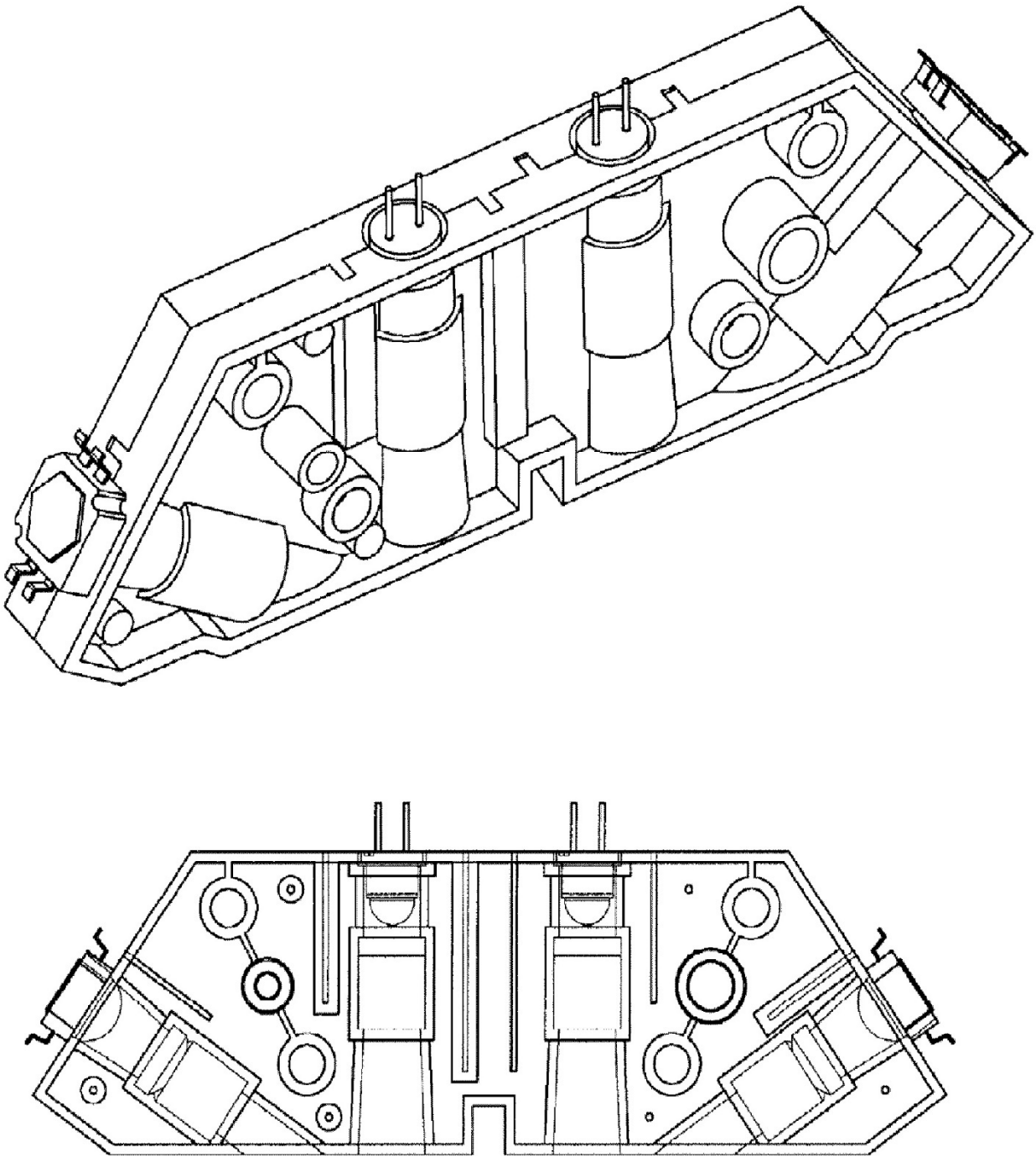


FIG. 83

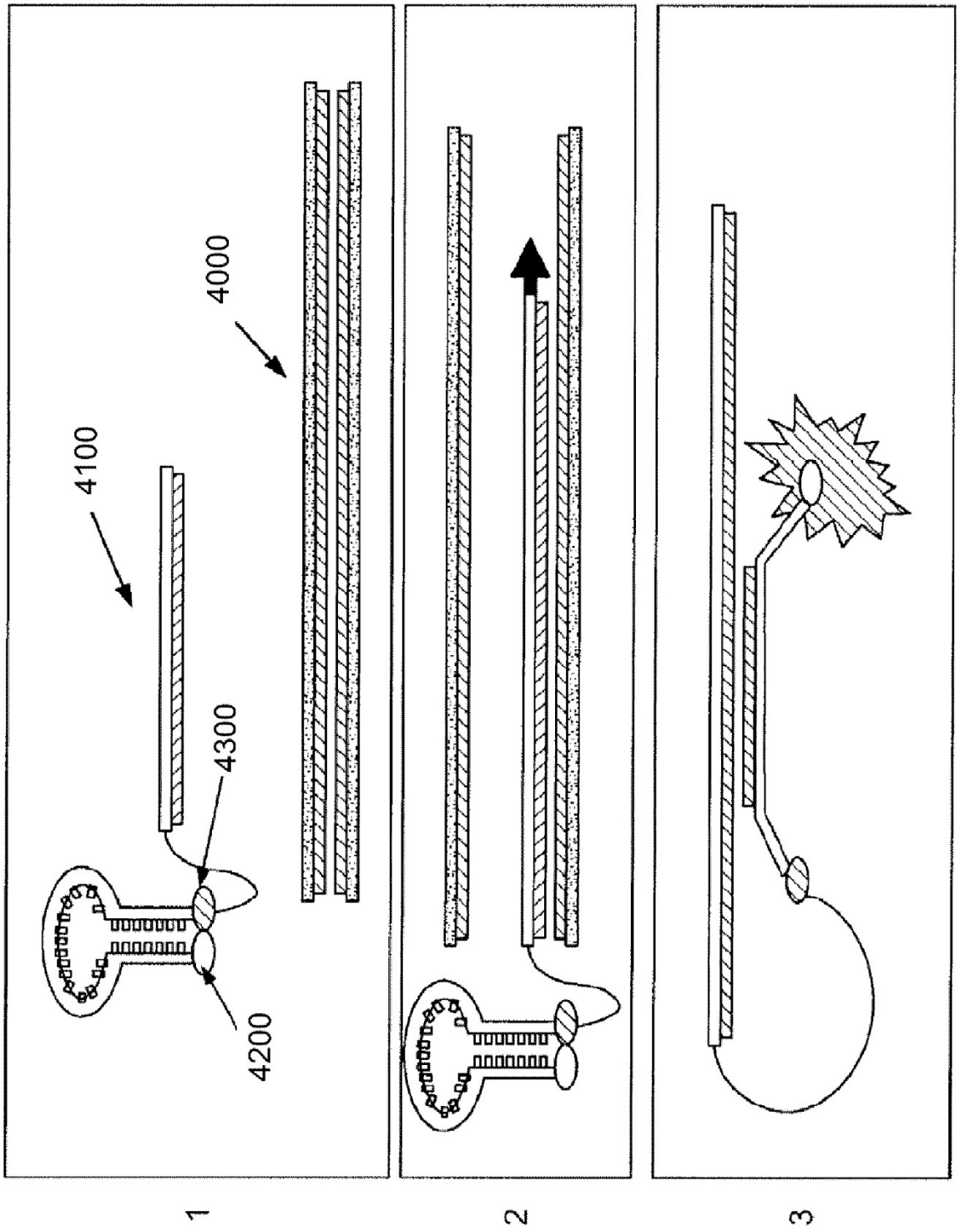


FIG. 84

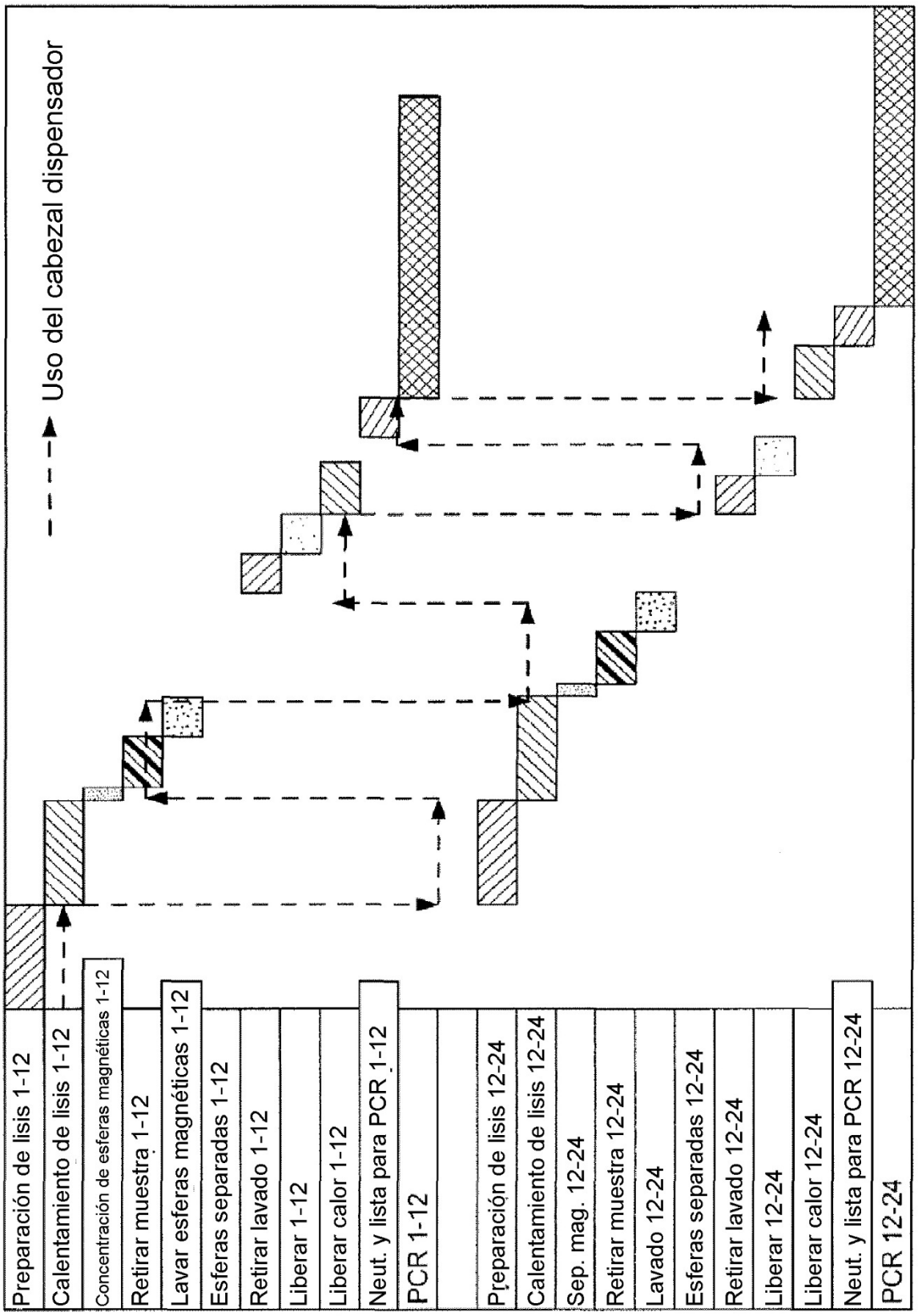

Uso del cabezal dispensador
Preparación de lisis 1-12
Calentamiento de lisis 1-12
Concentración de esferas magnéticas 1-12
Retirar muestra 1-12
Lavar esferas magnéticas 1-12
Esferas separadas 1-12
Retirar lavado 1-12
Liberar 1-12
Liberar calor 1-12
Neut. y lista para PCR 1-12
PCR 1-12
Preparación de lisis 12-24
Calentamiento de lisis 12-24
Sep. mag. 12-24
Retirar muestra 12-24
Lavado 12-24
Esferas separadas 12-24
Retirar lavado 12-24
Liberar 12-24
Liberar calor 12-24
Neut. y lista para PCR 12-24
PCR 12-24

FIG. 85A

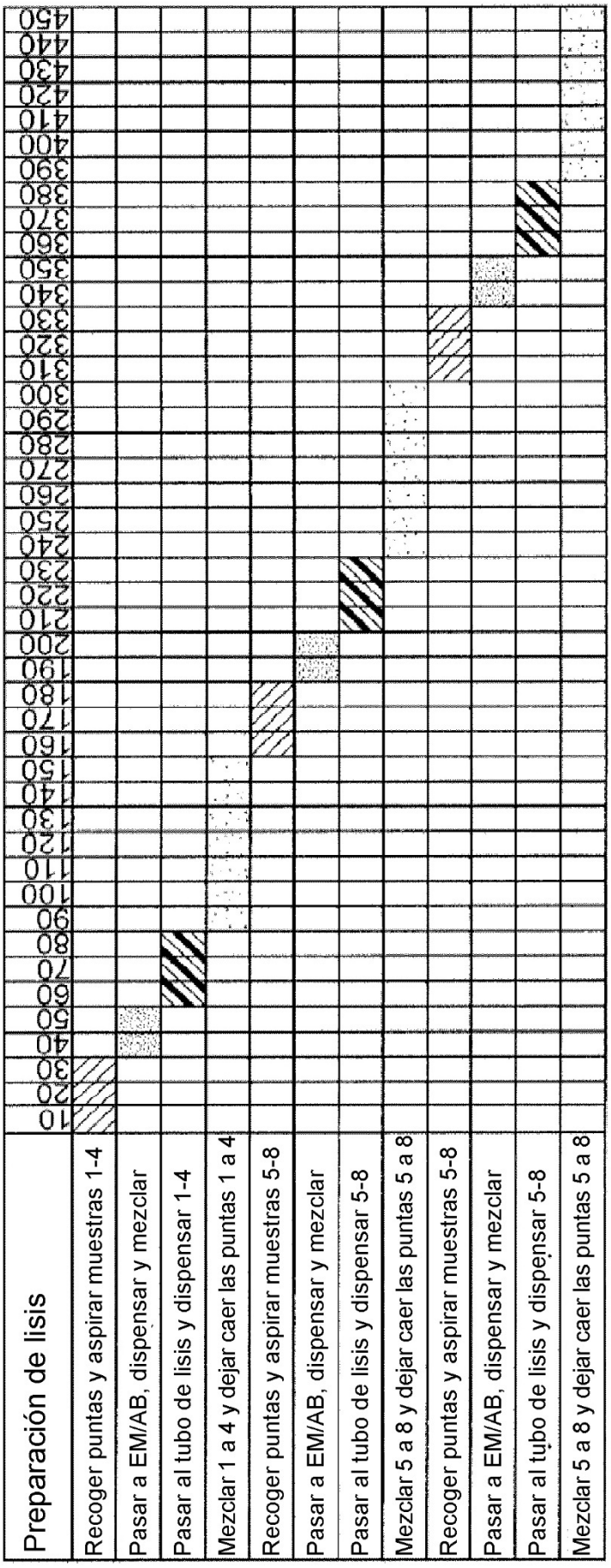

Preparación de lisis
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
Recoger puntas y aspirar muestras 1-4
Pasar a EM/AB, dispensar y mezclar
Pasar al tubo de lisis y dispensar 1-4
Mezclar 1 a 4 y dejar caer las puntas 1 a 4
Recoger puntas y aspirar muestras 5-8
Pasar a EM/AB, dispensar y mezclar
Pasar al tubo de lisis y dispensar 5-8
Mezclar 5 a 8 y dejar caer las puntas 5 a 8
Recoger puntas y aspirar muestras 5-8
Pasar a EM/AB, dispensar y mezclar
Pasar al tubo de lisis y dispensar 5-8
Mezclar 5 a 8 y dejar caer las puntas 5 a 8

FIG. 85B

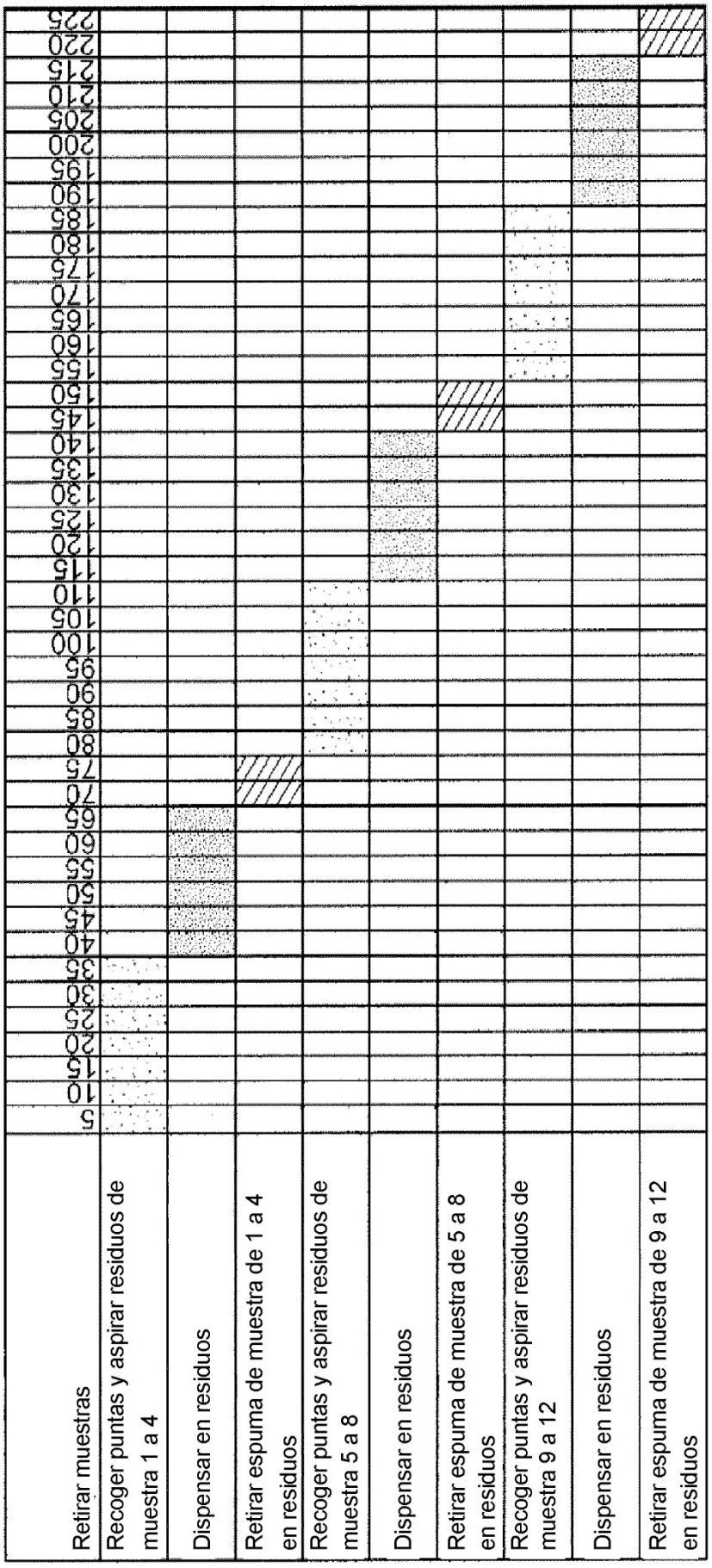

Retirar muestras
Recoger puntas y aspirar residuos de muestra 1 a 4
Dispensar en residuos
Retirar espuma de muestra de 1 a 4 en residuos
Recoger puntas y aspirar residuos de muestra 5 a 8
Dispensar en residuos
Retirar espuma de muestra de 5 a 8 en residuos
Recoger puntas y aspirar residuos de muestra 9 a 12
Dispensar en residuos
Retirar espuma de muestra de 9 a 12 en residuos
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225

FIG. 85C

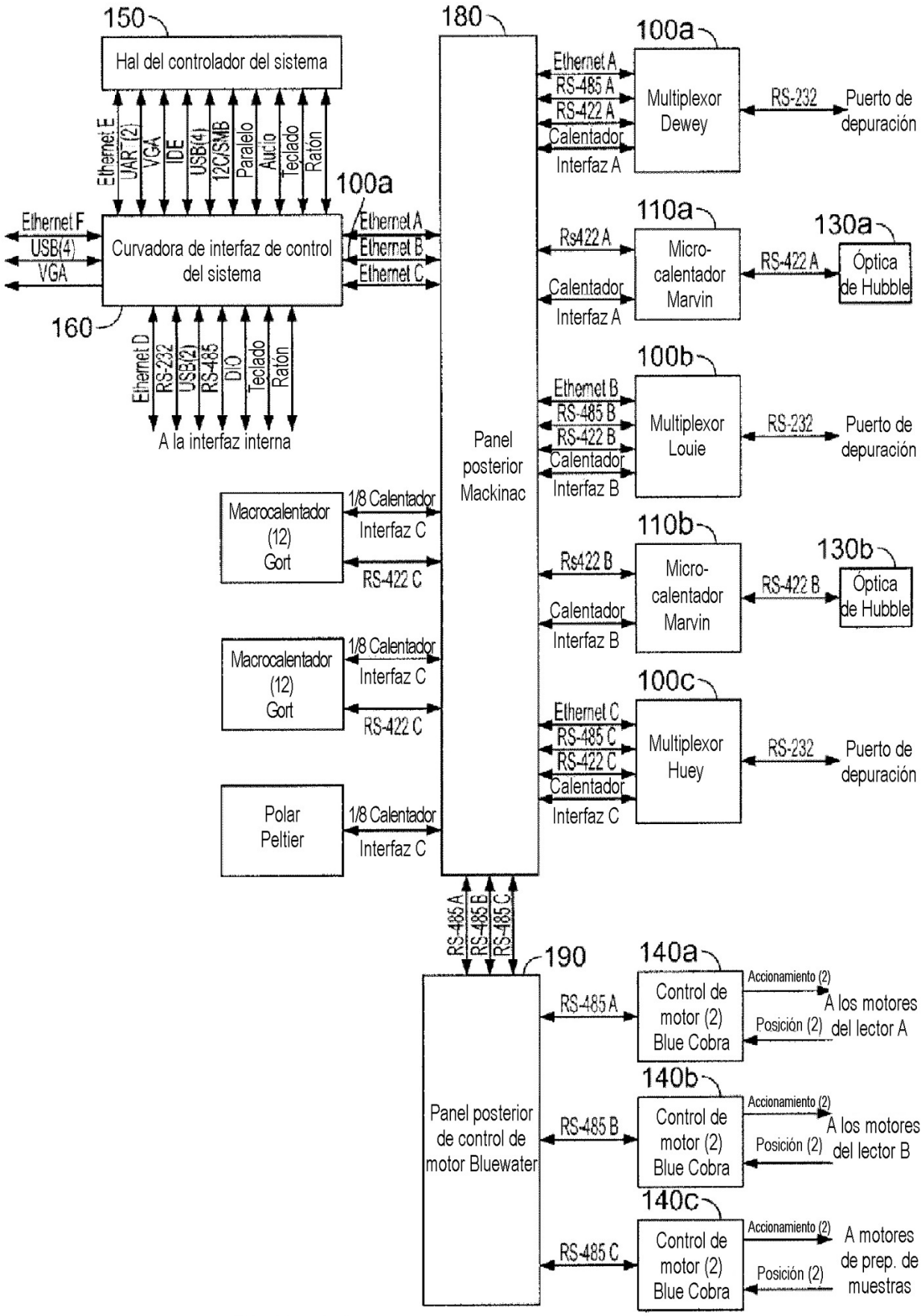


FIG. 86 Diagrama de bloques electrónicos

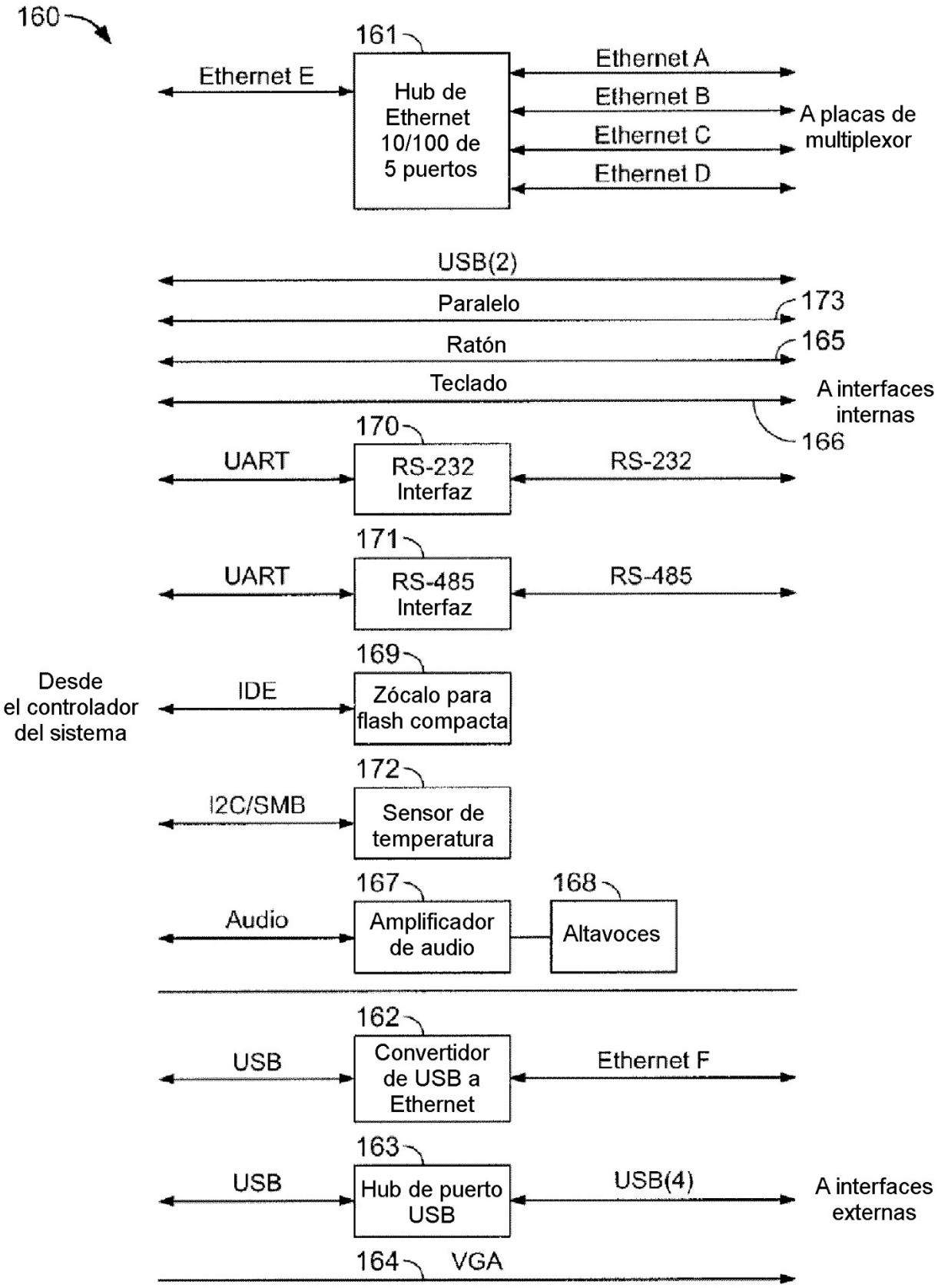


FIG. 87 Diagrama de bloques de la placa base del procesador

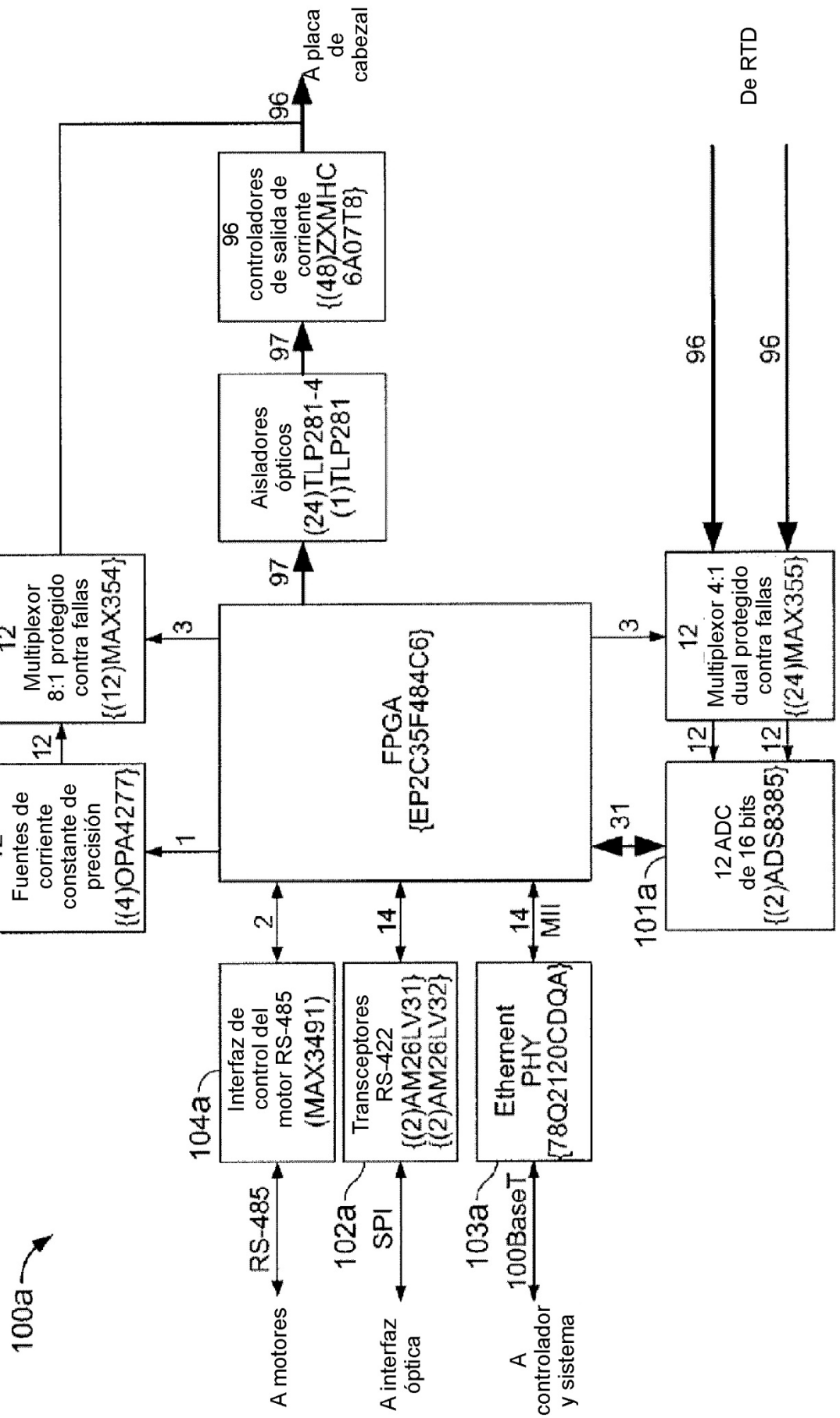


FIG. 88 Diagrama de bloques de placa de multiplexor

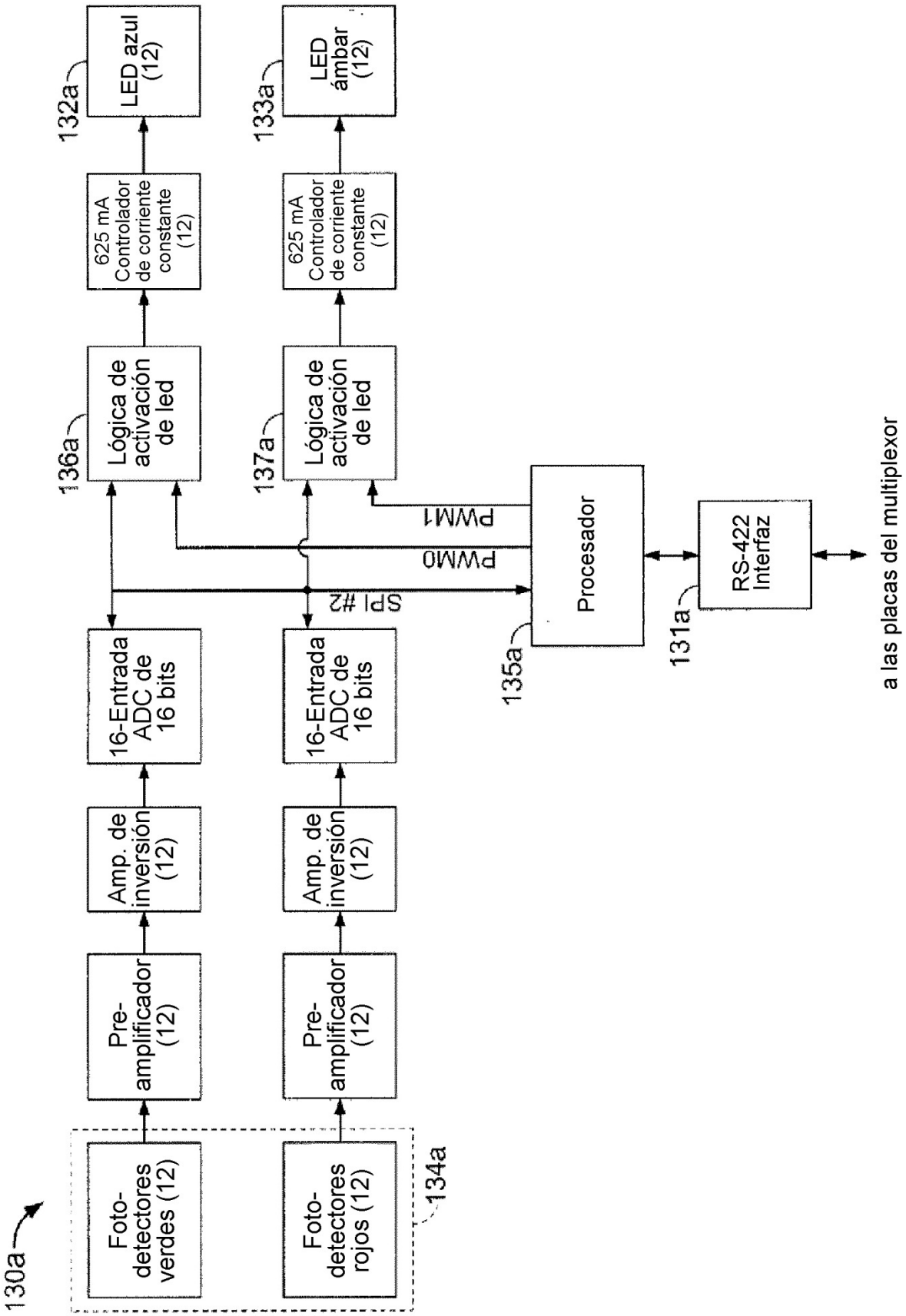


FIG. 89 Diagrama de bloques de placa de multiplexor

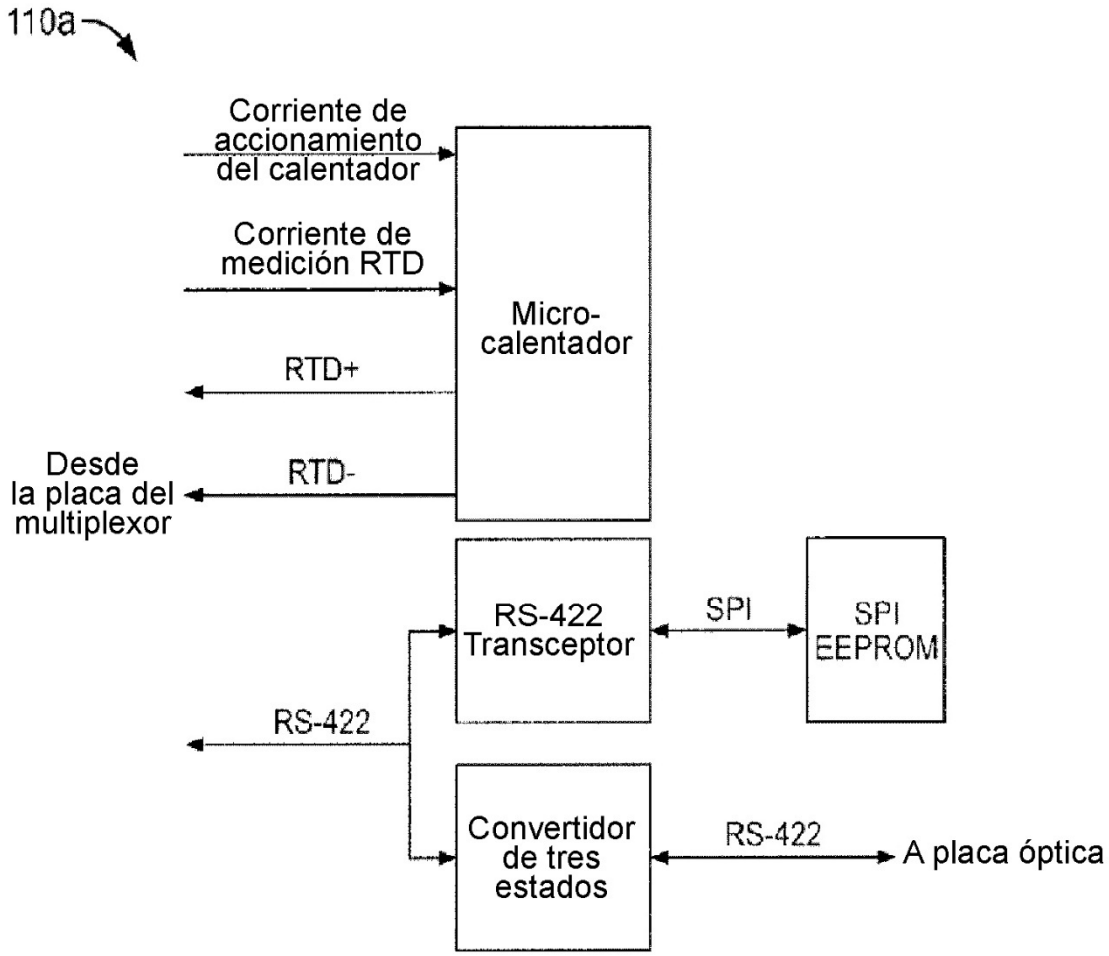


FIG. 90 Diagrama de bloques de placa de microcalentador

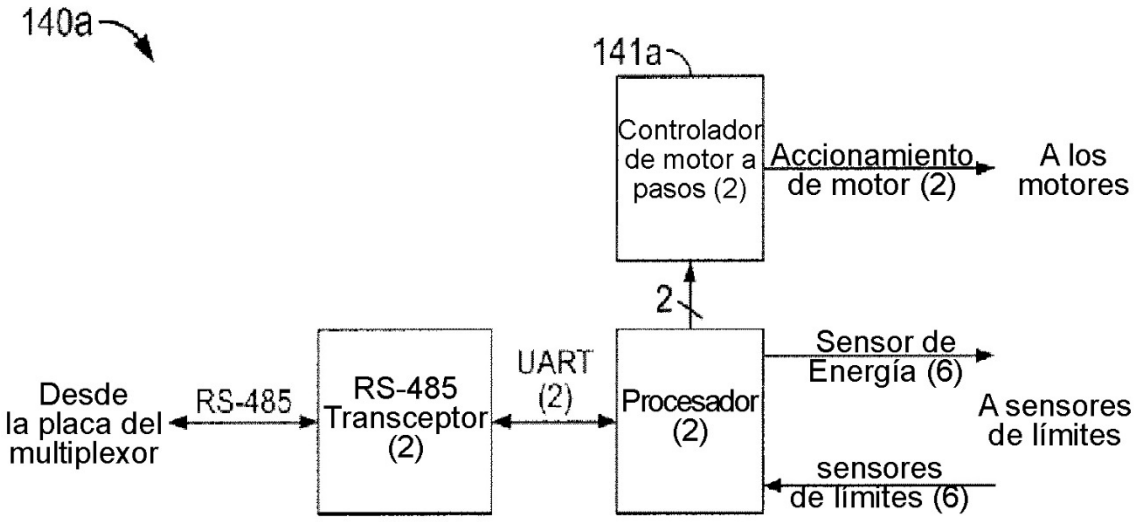


FIG. 91 Diagrama de bloques del tablero de control del motor