



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 554**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02804671 .2**
96 Fecha de presentación : **30.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1456660**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54 Título: **Métodos para visualizar y analizar resultados de diagnósticos basados en la difracción.**

30 Prioridad: **11.12.2001 US 13972**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

73 Titular/es: **KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, Inc.**
401 North Lake Street
Neenah, Wisconsin 54956, US

72 Inventor/es: **Kaylor, Rosann, Marie;**
Yang, Difei;
Atanassov, Zdravko, Savov y
Knotts, Michael, Eugene

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 357 554 T3

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

DESCRIPCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está, en general, en el campo de la detección de analitos en un medio y, más en concreto, la presente invención se refiere a los métodos de examen y/o de análisis en dispositivos de diagnóstico basados en la difracción, que pueden indicar la presencia del analito en un medio.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Existen muchos sistemas y dispositivos que pueden detectar una amplia variedad de analitos en diversos medios. Por ejemplo, los documentos WO 01/71322 y WO 96/12962 dan a conocer métodos y aparatos para llevar a cabo ensayos de difracción. El documento WO 01/81921 da a conocer un proceso para fabricar biodetectores basados en la difracción, utilizando impresión por chorro de tinta. El documento GB 2273772 da a conocer un proceso para la detección de macromoléculas utilizando la difracción de la luz. Finalmente, el documento USA 5.089.387 da a conocer un ensayo de difracción de una sonda de DNA, con las características del preámbulo de la reivindicación 1.

La mayoría de estos sistemas y dispositivos son relativamente costosos y requieren un técnico cualificado para llevar a cabo la prueba. Existen muchos casos en los que sería ventajoso poder determinar de forma rápida y económica si está presente un analito. Lo que se necesita es un sistema que sea de fabricación sencilla y económica, y que pueda realizar una detección fiable y sensible de los analitos.

Sandstrom y otros, en 24 *Applied Optics* (Óptica aplicada)472, 1985, describen la utilización de un sustrato óptico de silicio con una capa de monóxido de silicio y una capa de silicio formadas como películas dieléctricas. Los autores indican que un cambio en el grosor de la película cambia las propiedades del sustrato óptico, produciendo diferentes colores relacionados con el grosor de la película. El grosor de la película está relacionado con el color observado, y una película dispuesta sobre un sustrato óptico puede producir un cambio de color visible. Los autores indican que se puede utilizar un modelo matemático para cuantificar el cambio de color, y que "los cálculos llevados a cabo utilizando el modelo informático muestran que es muy poco lo que puede ganarse en el comportamiento óptico a partir de la utilización de una estructura multicapa... pero una biocapa sobre la superficie cambia muy poco la reflexión de dichas estructuras puesto que las propiedades ópticas están determinadas principalmente por las interfaces en el interior de la estructura multicapa. El sistema más sensible para la detección de biocapas es un recubrimiento de una sola capa, mientras que en la mayoría de las otras aplicaciones el rendimiento puede mejorarse mediante capas dieléctricas adicionales".

Sandstrom y otros, prosiguen indicando que las placas formadas a partir de óxidos metálicos sobre metal tienen ciertos inconvenientes, y que la presencia de iones metálicos puede asimismo ser nociva en muchas aplicaciones bioquímicas. Indican que la película dieléctrica superior ideal es de un grosor de 2 a 3 nm de dióxido de silicio, que se forma espontáneamente cuando se deposita una capa de monóxido de silicio en la atmósfera ambiente, y que puede utilizarse una capa de 70 a 95 nm de dióxido de silicio sobre una capa de 40 a 60 nm de monóxido de silicio sobre un sustrato de vidrio o plástico. Describen asimismo la formación de una cuña de monóxido de silicio mediante el decapado selectivo del monóxido de silicio, el tratamiento de la superficie de dióxido de silicio con dimetildiclorosilano, y la aplicación de una biocapa de un antígeno y un anticuerpo. A partir de esta construcción de cuña consiguieron determinar el grosor de la película con un elipsómetro, y observaron que "el contraste máximo se encontró en la región de unos 65 nm, donde el color de interferencia cambió de violeta a azul."

La patente de EE.UU. 5.512.131, concedida a Kumar y otros, da a conocer un dispositivo que comprende un sustrato polimérico con un recubrimiento metálico. Se estampa sobre el sustrato recubierto una capa receptora específica de un analito. El dispositivo se utiliza en un proceso de estampado o como un conmutador. Cuando un analito se aglutina al dispositivo se genera una imagen de difracción. A continuación, se utiliza un dispositivo de visualización, tal como un espectrómetro, para determinar la presencia de la imagen de difracción.

Sin embargo, el dispositivo descrito por Kumar y otros tiene varias desventajas. Una desventaja consiste en que es necesario un aparato complejo de visualización para examinar cualquier imagen de difracción.

La patente de EE.UU. número 5 482 830, de Bogart y otros, describe un dispositivo que comprende un sustrato que tiene una superficie ópticamente activa que presenta un primer color como respuesta a la incidencia de luz sobre la misma. Este primer color se define como una distribución espectral de la luz emanada. El sustrato presenta asimismo un segundo color que es diferente al primer color (teniendo una combinación de longitudes de onda de la luz, que difiere de la combinación presente en el primer color, o teniendo una distribución espectral diferente). El segundo color se presenta como respuesta a la misma longitud de onda cuando el analito está presente sobre la superficie. El cambio entre un color y otro puede medirse mediante la utilización de un instrumento, o bien visualmente. Dicha detección de precisión es un avance sobre los dispositivos descritos por Sandstrom y Nygren, indicados más arriba, y permite la utilización de dispositivos de una manera viable y competitiva comercialmente.

Sin embargo, el método y el dispositivo descritos en la patente de Bogart y otros tiene varias desventajas. Una desventaja es el coste elevado del dispositivo. Otro problema del dispositivo es la dificultad para

controlar las diversas capas que están situadas en la oblea de manera que se obtenga una lectura fiable.

La patente WO 94/13835, concedida a Bogdanski y otros, describe un método y un sistema para detectar macromoléculas. El sistema comprende una sonda que es una sustancia formadora, de dimensiones predeterminadas de tal manera que difracta la luz en un patrón conocido. Tras aglutinarse mediante una macromolécula (por ejemplo, un analito), la posición de los picos de difracción cambiará debido a esta aglutinación.

Por lo tanto, el sistema debe comprender un detector y un analizador más complejos para detectar cambios en un patrón de difracción. Por comparación, el sistema actual descrito basado en la difracción, está detectando la formación de una imagen o patrón de difracción, de manera que debe ser detectada solamente la aparición de la luz difractada. Por lo tanto, una desventaja del método y sistema descritos por Bogdanski y otros es que se necesita un aparato más complejo para detectar cambios en el patrón de difracción. Otra desventaja consiste en los métodos más complejos necesarios para preparar la sonda, que incluyen una serie de etapas con etapas de fotoprotección y/o de decapado llevadas a cabo sobre una superficie frágil de dióxido de silicio; estos métodos no son aplicables a un proceso de fabricación a escala real debido a los costos de inversión a gran escala.

La patente de EE.UU. número 5.196.350, de Backman y otros, describe un método de detección óptica que utiliza un dispositivo de inmunoensayo junto con una máscara que produce un patrón de difracción. El dispositivo de inmunoensayo está dispuesto entre la máscara y la fuente luminosa, de manera que la aglutinación mediante el analito provoca un cambio en el patrón de interferencia o difracción provocado por la máscara. De este modo, esta patente tiene desventajas similares a la patente de Bogdanski, puesto que utiliza un método basado en detectar cambios en un patrón de difracción debidos a la aglutinación, en vez de la formación de un patrón. Esto hace el análisis más complejo, puesto que estos cambios son más sutiles que un simple sí/no de una imagen de difracción formada en presencia de un analito.

La patente de EE.UU. número 4 992 385, de Godfrey y otros, describe un método para preparar una rejilla de difracción con una película delgada polimérica, para su utilización posterior como dispositivo de detección. A continuación, el dispositivo de detección requiere la utilización de una técnica espectrofotométrica durante el ensayo, para detectar cambios en sus propiedades ópticas debidos a la aglutinación de un analito. De este modo, igual que con las dos patentes anteriores, esta patente implica asimismo un método de detección más complejo puesto que debe detectar cambios en un patrón de difracción, en vez de la simple formación de un patrón debida al analito.

Han sido utilizadas algunas tecnologías comerciales de flujo colateral que utilizan tecnología de gotas de látex. Estas tecnologías se utilizan actualmente en muchos de los kits domésticos de diagnóstico disponibles comercialmente (por ejemplo, kits de embarazo y ovulación). Estos kits utilizan gotas coloreadas que se acumulan en una "zona de captura" definida, hasta que la cantidad de gotas resulta visible visualmente sin ayuda. Sin embargo, estos sistemas carecen de la sensibilidad requerida para ensayar en el caso de muchos analitos puesto que, para ser visibles visualmente, tienen que aglutinarse un número de gotas de látex en la zona de captura mucho mayor que las que se requieren para provocar difracción en la zona del mismo tamaño. En teoría, el número de gotas necesarias es aproximadamente de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor que el número de gotas requeridas por los detectores de la presente invención.

Ha habido varias invenciones novedosas dirigidas a la utilización de dispositivos de biodetección para detectar analitos. Algunos de estos biodetectores tienen una monocapa de autoensamblaje y han sido utilizados para detectar analitos. Estos tipos de dispositivos están definidos en las patentes de EE.UU. de números 5 922 550 y 6 060 256. Otros dispositivos que tienen una monocapa de autoensamblaje y que utilizan tecnología de micropartículas han sido utilizados para detectar analitos menores, y están definidos en la patente de EE.UU. número 6 221 579 B1. Finalmente, se han dado a conocer algunos dispositivos de detección que incorporan materiales no de autoensamblaje, y de nuevo proporcionan una imagen de difracción que puede verse visualmente sin ayuda. Este tipo de dispositivos están definidos en la Solicitud de Patente de EE.UU. Número 09/213 713. Sin embargo, la presente invención mejora la facilidad de utilización y/o la precisión de estos dispositivos de biodetección, proporcionando en general una interpretación más rápida, más precisa de los resultados de estos dispositivos.

Por consiguiente, lo que se necesita es un analizador que pueda ser utilizado con diversos sistemas de diagnóstico basados en la difracción, para ayudar a determinar la presencia de un analito de manera rápida y precisa. Asimismo, lo que se necesita es un método de utilización de este analizador para determinar de forma rápida y precisa la presencia de un analito en una muestra dada.

BREVE RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención da a conocer un sistema y un método para examinar y analizar los resultados de sistemas de diagnóstico basados en la difracción que son más rápidos, más precisos y/o más sencillos de utilizar que los métodos y sistemas que requieren dispositivos complejos de visualización. La presente invención puede ser utilizada con una serie de métodos y sistemas de diagnóstico diferentes, para mejorar la eficacia y/o la utilidad de estos dispositivos en la detección de analitos menores que pueden no ser detectados utilizando solamente el sistema de diagnóstico.

Por consiguiente, la presente invención desea proporcionar un método de examen y análisis de resultados procedentes de un sistema de diagnóstico basado en la difracción.

Asimismo, la presente invención proporciona convenientemente un sistema para el examen y análisis de resultados procedentes de un sistema diagnóstico basado en la difracción.

5 Convenientemente, la presente invención proporciona asimismo un método de examen y análisis de resultados procedentes de un sistema de diagnóstico basado en la difracción, utilizando un dispositivo que proporciona resultados que son independientes de la vista del usuario.

10 Adicionalmente, la presente invención proporciona convenientemente un método de examen y análisis de resultados procedentes de un sistema de diagnóstico basado en la difracción, que proporciona resultados precisos de manera oportuna y reduce el error.

Convenientemente, la presente invención proporciona asimismo un método de examen y análisis de resultados procedentes de un sistema de diagnóstico basado en la difracción, que puede ser controlado automáticamente.

15 Convenientemente, la presente invención proporciona asimismo un sistema de examen y análisis de resultados procedentes de un sistema de diagnóstico basado en la difracción, utilizando un analizador que puede almacenar en la memoria resultados anteriores, permitiendo por lo tanto al usuario recuperar los resultados de las muestras más recientes.

Adicionalmente, la presente invención proporciona convenientemente un sistema de examen y análisis de resultados procedentes de un sistema de diagnóstico basado en la difracción, que permite el acceso remoto a datos.

20 La presente invención consigue, por lo menos, uno de estos objetivos proporcionando un analizador novedoso que puede ser utilizado junto con sistemas de diagnóstico basados en la difracción, para determinar la presencia de un analito en una muestra dada. El analizador puede ser utilizado para determinar la presencia de un analito en una muestra examinando y analizando, con el sistema de diagnóstico, si una imagen de difracción ha sido generada por el analito cuando éste ha sido introducido.

25 Adicionalmente, el analizador puede ser utilizado para análisis cuantitativos o semicuantitativos. Los dispositivos descritos en los documentos aludidos anteriormente pueden ser fabricados imprimiendo una especie que aglutinará, reaccionará o se asociará de otro modo con un analito de interés en una superficie, y en el presente documento es denominada "binder" ("aglutinante"). La especie que se aglutina, reacciona o se asocia de otro modo con un analito de interés es denominada aglutinante y puede comprender cualquier especie química, compuesto, composición, parte de molécula, partícula, etc. que se aglutine, reaccione o se asocie de otro modo con el analito de interés.

30 Preferentemente, el aglutinante es específico para el analito de interés o para una clase de analitos de interés y no se aglutina apreciablemente, ni reacciona o se asocia de otro modo, con otras especies que puedan hallarse en la muestra de interés.

35 En general, el aglutinante se imprime sobre un sustrato, por ejemplo una película plástica, en un patrón definido de tal modo que la película impresa en el aglutinante no difracta la radiación electromagnética cuando esta es reflejada, o transmitida a través de la película impresa de aglutinante, pero difracta la radiación electromagnética después de que la película impresa con aglutinante es expuesta al analito y el analito se ha aglutinado, reaccionado o asociado de otro modo con el aglutinante. Alternativamente, la superficie o película impresa con aglutinante puede presentar un incremento o disminución en la difracción, medible tras la exposición al analito. Por ejemplo, una película puede estar impresa con un aglutinante de tal modo que la película impresa con aglutinante difracte la luz inicialmente, pero que no difracte la luz o la difracte menos cuando el analito se aglutina, se asocia o reacciona de otro modo con la superficie impresa con aglutinante. En otro ejemplo, la película puede estar impresa con un aglutinante de tal modo que la película impresa con aglutinante difracte inicialmente la luz, pero difracte la luz en mayor medida, apreciablemente, cuando el analito se aglutina, se asocia o reacciona de modo con la superficie impresa con aglutinante. La presencia del analito pueden ser determinada mediante un cambio medible en la difracción de la luz que es transmitida a través de la superficie del sustrato o reflejada desde la misma.

40 En general, un analito puede ser cualquier estímulo comprendiendo, de forma no limitativa, cualquier especie química o biológica, compuesto, composición, parte de molécula, partícula, etc. que se aglutine, reaccione o se asocie de otro modo con el aglutinante, o con las que el aglutinante reaccione. Los analitos que se considera son detectados comprenden, de forma no limitativa, los siguientes: bacterias; levaduras; hongos; virus; protozoos; o antígenos específicos de estos microbios; factor reumatoide; anticuerpos que comprenden, de forma no limitativa, anticuerpos de IgG, IgM, IgA y IgE; antígeno carcinoembrionario; antígeno del estreptococo del Grupo A; antígenos virales; antígenos asociados con la enfermedad autoinmune; alérgenos; antígenos tumorales; antígenos del estreptococo del Grupo B; antígenos de HIV I o HIV II; o respuesta del huésped (anticuerpos) a estos y otros virus; antígenos específicos a RSV o respuesta del huésped (anticuerpos) al virus; un antígeno; encima; hormona;

5 polisacárido; proteína; lípido; carbohidrato; droga o ácido nucleico; especies de Salmonela; especies de Cándida que comprenden, de forma no limitativa, Cándida albicans y Candida tropicalis; especies de Salmonela; grupos de Neisseria meningítics A, B, C, Y y W sub 135, Streptococcus pneumoniae, E. coli K1, Haemophilus influenzae tipo B; un antígeno derivado de microorganismos; un hapteno, una droga adictiva; una droga terapéutica; un agente ambiental; antígenos específicos de la hepatitis y así sucesivamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una vista, en perspectiva, de un visor según una realización.

La figura 2 es una vista, en perspectiva, de un visor según una realización.

La figura 3 es un esquema de un analizador según una realización de la presente invención.

10 La figura 4 es un esquema de una máscara útil para medir la intensidad de la luz de orden cero y de primer orden a partir de una imagen de difracción, que es una matriz x, y .

La figura 5 es un esquema de una máscara útil para medir la intensidad de la luz de segundo orden a partir de una imagen de difracción, que es una matriz x, y .

15 La figura 6 es un esquema de una máscara útil para medir la intensidad de la luz de tercer orden a partir de una imagen de difracción, que es una matriz x, y .

La figura 7 es un esquema de una máscara útil para medir la intensidad de la luz de cuarto orden a partir de una imagen de difracción, que es una matriz x, y .

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La presente invención da a conocer un analizador, un sistema y un método para examinar y analizar los resultados procedentes de sistemas de diagnóstico basados en la difracción. La presente invención puede ser utilizada con una serie de sistemas y dispositivos de diagnóstico diferentes, para mejorar la eficacia y/o la utilidad de estos dispositivos, detectando analitos de forma rápida y precisa, haciéndolo con un método que proporciona al usuario facilidad de utilización.

25 Se describe un visor que utiliza una fuente luminosa para transmitir o reflejar luz a través de una muestra que ha sido conectada al visor. Si un analito ha sido aglutinado al dispositivo de detección basado en la difracción, la luz transmitida o reflejada generará un patrón o imagen de difracción. Esta imagen puede verse directamente visualmente sin ayuda. O bien, la imagen puede ser proyectada en un visualizador que permite al usuario determinar si se ha producido la difracción.

30 La presente invención da a conocer un analizador que utiliza un algoritmo o una serie de algoritmos y/o un soporte lógico informático para analizar un dispositivo de detección basado en la difracción, con el objeto de determinar si uno o varios analitos están presentes en el dispositivo de detección y, por lo tanto, si están presentes en una muestra que está siendo verificada. Si bien el dispositivo de detección basado en la difracción puede ser utilizado sin el analizador, el analizador proporciona convenientemente resultados de forma más rápida, más sencilla y/o más precisa que sin la utilización del analizador.

35 El algoritmo o los algoritmos utilizados son desarrollados basándose en los parámetros del sistema en que se utilizará el analizador. Adicionalmente, si se utiliza un elemento de soporte lógico, éste puede ajustarse según sea necesario de manera que el analizador sea más simple y/o más preciso para determinar si el analito está presente en la muestra.

40 Convenientemente, el analizador convierte la imagen de difracción procedente de una muestra en un resultado sí/no para el usuario. Por lo tanto, el usuario podría no necesariamente ver la imagen de difracción, sino que vería un visualizador que proporciona la interpretación: por ejemplo, "analito presente", "analito no presente" o "error". Las opciones para el analizador comprenden generadores de tonos audibles, lámparas iluminadas, LEDs, o visualizadores LCD para indicar los resultados; una impresora para proporcionar una salida de resultados; memoria para almacenar resultados previos; u otras funciones tales como calentamiento o mezclado, que pueden ser utilizadas para mejorar los resultados, la fiabilidad y/o la comodidad de la prueba, entre otros.

45 Además del analizador, la presente invención comprende asimismo un método para detectar un analito utilizando un analizador. Tal como se ha comentado, el analizador utiliza uno o varios algoritmos y/o un elemento de soporte lógico, para determinar la presencia del analito en una muestra dada.

50 Asimismo, la presente invención comprende un sistema para detectar un analito utilizando un dispositivo de detección basado en la difracción y un analizador. Tal como se ha comentado, el analizador utiliza uno o varios algoritmos y/o un elemento de soporte lógico para determinar la presencia del analito en una muestra dada.

La presente invención comprende asimismo una sustitución para los dispositivos complejos de visualización de la técnica anterior, tales como los espectrómetros, que han sido utilizados en algunos sistemas basados en la difracción. El dispositivo analizador funciona utilizando un medio para recoger la luz procedente de muestras de difracción; si se difracta una cantidad de luz suficiente, esto provoca que el dispositivo indique la presencia de un analito. El pequeño dispositivo puede incrementar asimismo la precisión puesto que proporciona la capacidad de calibrar los resultados, de manera que pueden reducirse los falsos positivos. Esto puede conseguirse diseñando la unidad de manera que bloquee señales de difracción débil, cuando son visualizadas con ciertos controles. De este modo, se detectan los positivos verdaderos, difractados más intensamente.

La presente invención se basa en la utilización de dispositivos de detección basados en la difracción. Tanto en el sistema como en los métodos de la presente invención, se contempla el analizador utilizado con estos dispositivos de detección basados en la difracción, para ampliar la utilidad de estos dispositivos. Existe una gran cantidad de tipos de dispositivos de detección basados en la difracción, y se contempla que los analizadores de la presente invención pueden ser utilizados con cualquiera de estos dispositivos de detección basados en la difracción.

Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende que un "dispositivo de detección basado en la difracción" comprende cualquier dispositivo de detección que, tras la aglutinación de un analito con el dispositivo, difracta la luz transmitida o reflejada para formar una imagen de difracción. El dispositivo de detección basado en la difracción no difracta preferentemente la luz si el analito no está presente, pero difracta la luz cuando el analito está presente. Los expertos en la materia reconocerán que la medición de la diferencia entre dos o más imágenes de difracción puede ser utilizada, asimismo, para detectar la presencia de un analito en la presente invención. Los expertos en la materia reconocerán, asimismo, que el dispositivo de detección basado en la difracción puede comprender una primera imagen de difracción y, después de que el analito se ha aglutinado al dispositivo, una segunda imagen sin difracción.

Los dispositivos de detección basados en la difracción, utilizados en la presente invención, proporcionan en general un sustrato sobre el que está situado un material que se aglutina con el analito elegido. Pueden disponerse otras características para mejorar la eficacia de los dispositivos de detección basados en la difracción, tales como recubrimientos adicionales, capas bloqueantes, elementos de incremento de la difracción y así sucesivamente.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención comprende un método para detectar un analito en una muestra, tal como se define en la reivindicación 1.

Las figuras 1 y 2 ilustran dos posibles realizaciones de un visor según la presente invención. En la figura 1, el visor -100- comprende un cuerpo envolvente -110- que comprende una fuente luminosa (no mostrada). La fuente luminosa puede ser una luz láser, un LED, una bombilla, o cualquier otro medio que pueda generar luz. El cuerpo envolvente comprende un orificio -120- a través del cual puede mirar el usuario. El cuerpo envolvente -110- comprende una ranura -130-, u otros medios, en los que se sitúa la muestra a examinar. La muestra puede sujetarse asimismo en su posición utilizando una grapa, una bandeja u otros medios adecuados. Cuando la muestra es situada en la ranura -130-, la fuente luminosa puede ser activada automáticamente, o puede utilizarse un pulsador -140- u otros medios para activar la fuente luminosa. A continuación, la luz es transmitida o reflejada a través de la muestra. El usuario del dispositivo puede entonces mirar simplemente a través del orificio -120-. Si el analito está presente, el usuario verá una imagen de difracción, y si el analito no está presente, entonces el usuario verá solamente la fuente luminosa.

La figura 2 ilustra una realización alternativa de un visor. El visor -200- comprende un cuerpo envolvente -210-, una fuente luminosa (no mostrada) y una ranura -230- u otro medio para soportar la muestra, junto con un pulsador -240- u otro medio para activar la fuente luminosa. Sin embargo, en vez del orificio -120- utilizado en la figura 1, el visor -200- comprende un visualizador -250- en el que se proyecta la luz transmitida o reflejada. Durante su utilización, la fuente luminosa es activada y a continuación la luz es transmitida a través de la muestra, o reflejada desde la misma. Si el analito está presente, el usuario verá una imagen de difracción proyectada en el visualizador -250-, y si el analito no está presente, entonces el usuario verá solamente la fuente luminosa proyectada en el visualizador -250-.

Un componente opcional para los visores descritos anteriormente, sería utilizar un objeto opaco (por ejemplo, una máscara) para bloquear el haz de luz de orden cero o no difractado. De este modo, un usuario vería solamente los órdenes difractados si el analito está presente, y no vería luz en absoluto si el analito no está presente.

En vez de utilizar un visor que permita al usuario examinar, visualmente sin ayuda, si se ha generado una imagen de difracción, la presente invención proporciona un analizador que permite a un usuario del dispositivo de detección basado en la difracción, determinar de forma más rápida y eficiente la presencia de un analito en una muestra dada. Mientras que el usuario del dispositivo de detección basado en la difracción puede ser capaz de determinar la presencia de un analito visualmente sin ayuda y un visor, el analizador está concebido para confirmar la determinación realizada por el usuario, o bien para ser utilizado para realizar la determinación inicial con el usuario confirmándola posiblemente visualmente sin ayuda, dependiendo de las capacidades del usuario y/o del tipo de imagen de difracción generada.

Si se utiliza el analizador solo o éste se utiliza para realizar una determinación inicial de la presencia del analito en la muestra, se utilizarán entonces generalmente algoritmos de difracción para establecer los estándares

5 mediante los que se determina un resultado positivo, que indica la presencia del analito, o se determina un resultado negativo, que indica la falta de presencia del analito. El tipo de algoritmo utilizado puede basarse en una variedad de factores, ya sea en solitario o en combinación comprendiendo, de forma no limitativa, el analito a detectar, el tipo de dispositivo de detección basado en la difracción utilizado, la muestra a verificar, la imagen de difracción generada, el tamaño de las características en la imagen de difracción, la imagen de difracción y/o los tamaños y las formas característicos en dicho patrón, el tipo de analizador utilizado, el nivel deseado de sensibilidad, y el sistema global en que se utiliza el dispositivo, entre otros. Por consiguiente, los algoritmos dados a conocer en el presente documento pretenden solamente ser ejemplos representativos de algoritmos que pueden utilizarse en la presente invención. Se prevé que pueden utilizarse otros algoritmos, siempre que sean capaces de determinar la presencia de un analito utilizando un dispositivo de detección basado en la difracción, de manera precisa y fiable. Adicionalmente, se desea que los algoritmos puedan determinar rápidamente la presencia del analito, si bien es más deseable la precisión adecuada.

10 La estructura del analizador puede variar a la vista de uno o más factores que comprenden, de forma no limitativa, el analito a detectar, el tipo de dispositivo de detección basado en la difracción utilizado, la muestra a verificar, la imagen de difracción generada, el nivel de sensibilidad deseado, y el sistema global en el que se utiliza el dispositivo, entre otros. Generalmente, el analizador comprende un cuerpo envolvente para contener los componentes internos, un medio para iluminar el dispositivo de detección basado en la difracción de manera que genere una imagen de difracción, un medio para medir la cantidad de luz difractada y/o no difractada, un medio para convertir la medición procedente de los medios para medir la cantidad de luz difractada en un resultado indicativo de la presencia o ausencia del analito, y/o un medio para informar a un usuario de si el analito está presente en la muestra.

15 El medio para iluminar el dispositivo de detección basado en la difracción, de manera que genere una imagen de difracción, puede comprender una fuente luminosa o algunas fuentes de iluminación relacionadas. Convenientemente, se utiliza una fuente luminosa. La fuente luminosa puede ser interna (LED, diodo láser o lámpara halógena, por ejemplo) o externa (luz ambiental, por ejemplo) respecto al cuerpo envolvente. Adicionalmente, la fuente luminosa puede estar en el espectro visible o ser invisible al ojo humano. La fuente luminosa es escogida de tal modo que el analizador puede detectar si la difracción de la fuente luminosa se ha producido debido a la presencia del analito en el dispositivo de detección basado en la difracción. Se considera que un LED, un láser o cualquier fuente luminosa enfocada serán las fuentes luminosas más útiles en la presente invención, aunque pueden utilizarse otras fuentes luminosas. Adicionalmente, la fuente luminosa puede ser transmitida directamente a través del dispositivo de detección basado en la difracción, o la luz procedente de la fuente luminosa es iluminada sobre la superficie del dispositivo, usualmente en cierto ángulo, de tal modo que se refleja la imagen de difracción desde la superficie.

20 El analizador puede utilizar uno o más fotodetectores como medio para medir la cantidad de luz difractada y/o no difractada. Los posibles fotodetectores comprenden uniones de semiconductor fotovoltaico o fotoconductor (fotodiodo), bolómetros o detectores piroeléctricos. Los detectores pueden disponerse individualmente o en formaciones multiplexadas (tales como dispositivos acoplados por carga o formaciones de detectores interconectadas por CMOS).

25 En una realización conveniente, el analizador incorpora un microprocesador o un dispositivo similar, como medio para convertir la medición procedente del medio para medir la cantidad de luz difractada en un resultado que indica la presencia o ausencia del analito.

30 Una vez determinado un resultado, tanto positivo como negativo, este resultado puede ser indicado al usuario a través de un medio para informar a un usuario de si el analito está presente en la muestra. Preferentemente, este medio comprende un visualizador o un medio similar que pueda informar al usuario. El visualizador puede ser cualquier visualizador estándar, tal como un visualizador de cristal líquido (LCD, liquid crystal display). El visualizador podría mostrar posiblemente la imagen de difracción, permitiendo de ese modo al usuario ver si se ha producido difracción. O el visualizador podría simplemente proporcionar un mensaje, tal como "sí" o "no" o "analito presente" o "analito no presente" o un mensaje similar que permita al usuario saber si el analito estaba presente en la muestra, sin que el usuario tenga que interpretar si se ha producido la difracción, reduciendo de ese modo el error humano. En otra realización, en caso de error o si el analizador no es capaz de determinar la presencia del analito, puede entonces mostrarse un mensaje para este propósito.

35 Alternativamente, puede utilizarse por lo menos una luz para señalar si el analito estaba presente. Por ejemplo, puede utilizarse una lámpara y la lámpara podría iluminarse solamente cuando el analito estuviera presente o no presente, dependiendo de la configuración deseada. Alternativamente, pueden utilizarse dos o más lámparas con una lámpara marcada con un "sí" y otra lámpara marcada con un "no", y el analizador iluminaría la lámpara apropiada. O las lámparas podrían estar codificadas por colores de manera que un color, tal como el verde, podría ser utilizado para indicar que el analito está presente mientras que un segundo color, por ejemplo rojo, podría ser utilizado para indicar que el analito no está presente.

40 El analizador puede comprender, además, una o más características adicionales para ayudar al usuario a determinar de forma más precisa y/o rápida la presencia del analito. Por ejemplo, el analizador puede comprender un medio para sostener la muestra en posición, de manera que puede obtenerse un resultado más preciso o puede determinarse más rápidamente si está presente el analito. El medio puede comprender una bandeja, una

grapa, una ranura o cualquier otro medio similar que pueda soportar la muestra en posición.

El analizador puede comprender asimismo medios para dirigir, enfocar y/o intensificar la fuente luminosa. Los medios pueden reflejar la luz, tal como se ha comentado previamente, o pueden intensificar la luz, incrementando de ese modo el nivel de difracción y, por lo tanto, incrementando la sensibilidad y/o la precisión del dispositivo. Los medios para dirigir y/o intensificar la luz pueden comprender espejos y/o lentes o cualquier medio similar. Utilizando estos tipos de medios, puede ser posible evitar la utilización de un microprocesador o similar, puesto que el incremento de la difracción de la luz puede permitir a un usuario determinar la presencia del analito visualmente sin ayuda.

Adicionalmente, la presente invención puede utilizar una máscara para ayudar a eliminar la posibilidad de un falso positivo como resultado de que el fotodiodo detecte luz difundida o dispersada en vez de luz difractada cuando se hace pasar la luz a través del dispositivo de detección o ésta es reflejada desde el mismo. La máscara comprende un objeto opaco que tiene orificios que se alinean con la imagen de difracción o, como alternativa, orificios que se alinean con alguna parte de la imagen de difracción de interés. La máscara puede ser utilizada para bloquear toda la luz excepto la luz difractada, detectada mediante el medio para medir la cantidad de luz difractada, tal como el fotodiodo. El conjunto o soporte de la máscara puede comprender asimismo medios para hacer girar la máscara en función del medio de detección basado en la difracción utilizado, o por cualquier otra razón deseada.

Durante la utilización, la máscara está situada entre el dispositivo de detección basado en la difracción y el fotodiodo, u otro medio para medir la luz. La máscara comprende una parte maciza y orificios que permiten que la luz los atraviese. La disposición de los orificios se escoge para corresponderse con la imagen de difracción generada por el dispositivo de detección basado en la difracción, si el analito está aglutinado al dispositivo de detección. De este modo, la máscara bloquea la luz no difractada permitiendo al mismo tiempo que la luz difractada la atraviese; de este modo, puede medirse la intensidad de luz difractada solamente.

A continuación, se hace girar la máscara de manera que se bloquea la luz difractada, y se mide de nuevo la intensidad de la luz. Parte de la luz difundida o dispersada, si está presente, pasará a través de los orificios en la máscara, mientras que la luz difractada será bloqueada. De este modo, cuando se toma una segunda lectura de la intensidad de la luz, una comparación de la cantidad de luz detectada con la máscara en posición frente a la cantidad de luz detectada cuando la máscara está girada, determinará si el analito está presente en la muestra. El analizador comparará las lecturas y, en función del algoritmo utilizado, proporcionará un resultado. Si se utiliza una máscara en el analizador, la máscara puede estar incluida en el cuerpo envolvente del analizador junto con un medio para hacer girar la máscara en la cantidad deseada, con el objeto de medir tanto la luz difractada como la no difractada.

Si se utiliza un microprocesador como medio para convertir la medición procedente del fotodiodo o dispositivo similar, en un resultado que indique la presencia o ausencia del analito, entonces el microprocesador puede incluir capacidad de memoria para permitir que el usuario pueda recuperar los últimos resultados desde el analizador. El número de resultados recuperados puede variar según se desee. Sin embargo, en general la memoria podría recuperar por lo menos unos cinco resultados. Los expertos en la materia apreciarán que los dispositivos de memoria adecuados legibles por ordenador comprenden RAM, ROM, EPROM, EEPROM, tarjetas de memoria flash, discos de video digital, cartuchos de Bernoulli, etcétera. Es más, cualquier tipo de chip informático que incluya una memoria puede acoplarse, o asociarse de otro modo con el analizador.

La figura 3 da a conocer a otra realización de un analizador de la presente invención, teniendo esta realización varias características opcionales. Esta realización da a conocer una forma de dirigir la luz de tal modo que ésta puede ser utilizada en un dispositivo lector compacto. Tal como se muestra en la figura 3, una muestra -310- está situada en un soporte -312- para soportar la muestra -310- en posición. Una fuente luminosa -314- es transmitida a través de la muestra -310-. Si la muestra contiene el analito, entonces la luz es difractada y sale de la fuente luminosa como una serie de luces -316- que comprenden tanto luz difractada como no difractada. La luz difractada -316- es reflejada con un espejo -318-, y puede utilizarse una máscara -320- para bloquear cualquier luz -322-, que consiste esencialmente en luz sin difractar, que no está difractada. La luz restante -324-, que consiste esencialmente en luz difractada, es reflejada de nuevo con otro espejo -326- y recogida por un fotodiodo -328-, y un microprocesador (no mostrado) interpreta el resultado y proporciona el resultado apropiado en el visualizador -330-, que en esta realización consiste en una serie de luces.

En una realización, se utiliza una máscara -320- para bloquear la luz -322- que no está difractada. De este modo, la máscara permite el paso sobretodo de luz difractada al fotodiodo, que mide la intensidad de la luz. En otra realización, la intensidad de la luz medida es transmitida a un microprocesador que utiliza un algoritmo. A continuación, el resultado procedente del algoritmo es alimentado al visualizador -330-, tal como un conjunto de lámparas que podrían encenderse como una forma simple de indicar al usuario si la muestra es positiva o negativa (por ejemplo, luz roja = negativo; luz azul o verde = positivo). Si no hay luz difractada, entonces toda la luz podría ser bloqueada y el fotodiodo -328- no detectaría luz y, por lo tanto, el analizador indicaría que el analito no está presente en la muestra. De este modo, si el analito está o no presente en el sistema determinará la cantidad de luz detectada por el fotodiodo -328-. Sin embargo, puesto que en caso de error, tal como con una entrada de polvo en el sistema, puede producirse una pequeña cantidad de difracción, el fotodiodo -328- puede detectar algo de luz incluso aunque el analito no esté presente en la

muestra -312-. Por consiguiente, cuando se utiliza el analizador, puede tenerse en cuenta el grado de difracción al determinar si el fotodiodo y el microprocesador indican la presencia o ausencia del analito en la muestra.

En una realización opcional, el método para analizar las muestras de difracción utiliza asimismo una máscara. Sin embargo, se toman dos mediciones para la intensidad de la luz. La primera medición es de la luz difractada que atraviesa la máscara. A continuación, se gira la máscara de manera que la luz difractada es bloqueada; esto tiene como resultado que solamente la luz difundida, si la hay, pasa a través de la máscara y es medida. A continuación, se utiliza la relación entre las dos mediciones para determinar si una muestra es positiva ("sí", el analito está presente) o negativa ("no", el analito no está presente). De este modo, el método permite que se tenga en cuenta la luz difundida, de manera que una muestra "sucia", que se define como una muestra que difunde o dispersa la luz pero no la difracta, no provoca una lectura positiva.

Los tipos de algoritmos que pueden ser utilizados son muchos y pueden variar en función de uno o más factores que comprenden, de forma no limitativa, el analito a detectar, la muestra utilizada, los componentes del analizador, el grado de sensibilidad deseado, el sistema en que se utiliza el analizador, y otros. En una realización de la presente invención, el algoritmo deseado para el sistema permitirá al usuario manipular los datos (datos de intensidades de la luz difractada en varios órdenes de difracción), de manera que se cuentan solamente los orden de difracción mayores como una muestra de difracción. Esto podría incrementar la precisión del sistema.

El algoritmo tendrá dos componentes básicos: 1) el método mediante el que se mide la intensidad de la luz y 2) el cálculo utilizado para disparar un "positivo" o lectura afirmativa, o un "negativo" o lectura negativa. El algoritmo es uno de los componentes deseados de la presente invención, puesto que proporciona una forma de incrementar la precisión, especialmente eliminando falsos positivos.

El algoritmo la presente invención comprende:

$(\text{Intensidad de la luz difractada de segundo orden y superiores})/(\text{Intensidad de la luz entrante})$

En un caso, la luz entrante podría ser medida antes de atravesar la muestra. En una realización deseada, la luz entrante se midió después ser transmitida a través de la muestra y de reunirse el haz difractado y el de orden cero para la lectura de esta intensidad. El algoritmo podría establecer un valor de corte para esta relación, de manera que las mediciones de muestras por encima de este valor se consideren "positivas" y las mediciones de muestras por debajo de este valor se consideren "negativas". Un ejemplo de un valor de corte podría ser de unos 0,3. De nuevo, el valor de corte puede variar en función del analito a detectar, del tipo de dispositivo de detección utilizado basado en la difracción, de la muestra a verificar, de la imagen de difracción generada, del tamaño de las características en la imagen de difracción, de la imagen de difracción y/o de los tamaños y/o las formas característicos en dicho patrón, del tipo de analizador utilizado, del nivel de sensibilidad deseado y/o del sistema global en que se utiliza el dispositivo.

Pueden utilizarse otros algoritmos, y más adelante se dan a conocer ejemplos de algunos que pueden ser utilizados.

La presente invención comprende asimismo sistemas y métodos para determinar la presencia de un analito en una muestra. En estos sistemas y métodos, se utiliza un dispositivo de detección basado en la difracción junto con el analizador. Una muestra a verificar es colocada en el dispositivo de detección basado en la difracción. Dependiendo del tipo de dispositivo de detección utilizado basado en la difracción, la muestra puede necesitar asentarse durante varios minutos para dar tiempo a que el analito, si está presente, se aglutine con el dispositivo de detección basado en la difracción. O bien, el dispositivo de detección basado en la difracción y la muestra pueden ser examinados inmediatamente.

A continuación la luz es transmitida directamente a través del dispositivo de detección basado en la difracción, o bien es reflejada desde el mismo. Si el analito a detectar está presente en la muestra, entonces el analito difracta la luz. Si el analito no está presente, entonces la luz no es difractada. Sin embargo, se contempla que el dispositivo de detección basado en la difracción podría asimismo estar construido y dispuesto de manera que la luz no se difracte si el analito está presente, pero que se difracte si el analito no está presente. Asimismo, el dispositivo de detección basado en la difracción puede estar diseñado de manera que si el analito no está presente la luz se difractará en una primera cantidad, y si el analito está presente la luz se difractará en una segunda cantidad, y el analizador puede medir la diferencia y determinar si el analito está presente.

Después de que la luz ha sido transmitida o reflejada través de la muestra y difractada, la luz difractada es medida utilizando un detector adecuado, tal como un fotodiodo. El detector mide la intensidad de la luz difractada. Opcionalmente, el detector puede medir la intensidad de la luz incidente antes de que la muestra sea situada en el instrumento, o bien después de que la muestra sea extraída. Alternativamente, puede utilizarse un segundo detector y una disposición de divisor del haz, para medir la intensidad de la luz incidente al mismo tiempo que la luz difractada. A continuación, se utiliza un medio para determinar si el analito está presente, tal como un microprocesador, con el objeto de determinar si la muestra es positiva o negativa. Si se utiliza un microprocesador, entonces para analizar la entrada procedente del fotodiodo se utiliza convenientemente un código o un programa de soporte lógico que incorpora un algoritmo. Para ejecutar el algoritmo, puede estar instalado un elemento de soporte lógico para llevar a

cabo los cálculos necesarios y determinar el resultado final. A continuación, se proporciona este resultado al usuario utilizando un medio para informar al usuario de si el analito está presente en la muestra, tal como un visualizador LCD o una serie de lámparas.

5 Si se utiliza un elemento de soporte lógico en la presente invención, éste proporciona convenientemente instrucciones informáticas ejecutables para interpretar la cantidad de luz medida por el fotodiodo y generar una salida que indica si el analito está presente en la muestra. El microprocesador ejecuta las instrucciones informáticas ejecutables del elemento de soporte lógico.

10 El sistema proporciona asimismo un interfaz de entrada y un interfaz de salida. Utilizando el interfaz de entrada, el microprocesador puede recibir datos relativos a la cantidad de luz procedente del fotodiodo. La utilización del interfaz de salida permite al microprocesador, controlado por el elemento soporte lógico, comunicar con el medio para informar al usuario de si el analito está presente en la muestra, con el objeto de proporcionar un resultado al usuario.

Los expertos en la materia apreciarán que el elemento de soporte lógico puede ser ejecutado asimismo mediante un sistema diferente, tal como un sistema informático de sobremesa, portátil o manual, que está en comunicación con el analizador y funciona conjuntamente con el mismo.

15 Los dispositivos de detección basados en la difracción pueden comprender una serie de características diferentes, dependiendo de factores descritos previamente.

20 En general, el dispositivo de detección basado en la difracción utilizará un sustrato. El sustrato puede comprender cualquier material que sea sustancialmente ópticamente transparente incluyendo, de forma no limitativa, vidrio y plástico. Sin embargo, el sustrato deseado es una película polimérica. Adicionalmente, para ayudar a la aglutinación sobre el sustrato, el sustrato tiene convenientemente una película delgada de un metal u óxido metálico recubierta sobre la película. Sin embargo, si se utiliza luz reflejada, pueden utilizarse materiales ópticamente no transparentes.

25 Cualquier película sobre la que pueda ser depositado un recubrimiento metálico es adecuada para la presente invención. Éstas comprenden, de forma no limitativa, polímeros tales como: tereftalato de polietileno (MYLAR®), acrilonitrilo butadieno estireno, copolímero de acrilato de metilo-acrilonitrilo, celofán, polímeros celulósicos tales como etilcelulosa, acetato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, propionato de celulosa, triacetato de celulosa, polietileno, copolímeros de polietileno-acetato de vinilo, copolímeros de ionómeros de polietileno (polímeros de etileno)-nailon, polipropileno, polímeros de metil penteno, fluoruro de polivinilo, y polisulfonas aromáticas. Preferentemente, la película plástica tiene una transparencia óptica de más del 80%. Pueden encontrarse otros plásticos adecuados y proveedores, por ejemplo, en los trabajos de referencia tales como el documento *Modern Plastics Encyclopedia* (enciclopedia moderna de plásticos) (McGraw-Hill Publishing Co. , Nueva York 1923 - 1996).

35 En una realización de la invención, la película con el recubrimiento metálico sobre la misma tiene una transparencia óptica comprendida aproximadamente entre el 5% y el 95%. Una transparencia óptica más deseable para la película con el recubrimiento metálico sobre la misma, utilizada en la presente invención, está comprendida aproximadamente entre el 20% y el 80%. En una realización deseada de la presente invención, la película tiene por lo menos una transparencia óptica aproximadamente del 80%, y el grosor del recubrimiento metálico es tal que mantiene una transparencia óptica mayor aproximadamente del 20%, de tal modo que pueden ser producidas imágenes de difracción mediante luz reflejada o bien transmitida. Sin embargo, en otras realizaciones de la invención, el grosor metálico puede estar comprendido aproximadamente entre 1 nm y 2000 nm.

40 Los metales que pueden ser utilizados para deposición sobre la película comprenden oro, plata, aluminio, cromo, cobre, hierro, circonio, platino y níquel, así como óxidos de estos metales.

45 Además del sustrato, los dispositivos de detección basados en la difracción comprenden asimismo un material receptor en el mismo, que es específico para el analito o analitos de interés. Este material receptor está situado, en general, en un patrón sobre el sustrato, de tal manera que cuando el analito se aglutina con el material receptor, se forma una imagen de difracción específica.

50 En una realización posible, el material receptor está acoplado a una capa de acoplamiento que está situada en el sustrato. En algunos casos, el material receptor puede estar adherido pasivamente a la capa de acoplamiento. Si se desea, los grupos funcionales libres introducidos en la superficie de prueba mediante la capa de acoplamiento pueden ser utilizados para el acoplamiento covalente del material receptor a la superficie de prueba. Los compuestos químicos disponibles para el acoplamiento de los materiales receptores son bien conocidos por los expertos en la materia.

En otra realización, se utiliza una proteína de aglutinación a anticuerpos dispuestos con patrón como capa de acoplamiento. Las capas de proteína de aglutinación a anticuerpos dispuestos con patrón con anticuerpos aglutinados, provocan la colocación o aglutinación con patrón de analitos en las mismas.

55 En una realización de la presente invención, la capa de acoplamiento es una capa de autoensamblaje.

Las monocapas autoensambladas de compuestos orgánicos sobre superficies inorgánicas o metálicas son un aspecto de una realización de la presente invención. Aunque existen muchos sistemas diferentes de monocapas de autoensamblaje basados en diferentes soportes y compuestos orgánicos, los sistemas deseados son los de alcanotiolatos, $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{R}$, sobre películas de oro. Típicamente, una película de oro, de 1 a 2000 nm de grosor, está soportada sobre una lámina de vidrio u oblea Si/SiO_2 estabilizada con titanio. El titanio sirve como promotor de la adhesión entre el oro y el soporte. Los alcanotioles se adsorben químicamente en la superficie del oro desde una solución en la que es sumergida la película de oro, y forman alcanotiolatos adsorbidos con pérdida de hidrógeno. La adsorción puede producirse asimismo a partir de vapor. Pueden incorporarse una amplia variedad de grupos funcionales (R) a la superficie o al interior de la monocapa.

Por lo tanto, las monocapas de autoensamblaje pueden estar configuradas para proporcionar una amplia variedad de propiedades materiales: tales como la humectabilidad y la protección frente a la corrosión por decapantes químicos. Adicionalmente, los grupos funcionales pueden ser reactivos para permitir el acoplamiento covalente del material receptor a la monocapa de autoensamblaje.

En otra realización, el material receptor puede estar aplicado directamente al sustrato. En una realización concreta de este principio, el material receptor es un anticuerpo. El material receptor está caracterizado por la capacidad de aglutinar específicamente uno o varios analitos de interés. La variedad de materiales que pueden ser utilizados como material receptor está limitada solamente por los tipos de material que combinarán selectivamente (con respecto a cualquier muestra elegida) con un asociado secundario. Las subclases que puede ser incluidas en las clases globales de materiales receptores comprenden toxinas, anticuerpos, antígenos, receptores hormonales, parásitos, células, haptenos, metabolitos, alérgenos, ácidos nucleicos, materiales nucleares, autoanticuerpos, detritos celulares, enzimas, proteínas de tejido, sustratos de enzimas, coenzimas, transmisores neuronales, virus, partículas virales, microorganismos, proteínas, polisacáridos, quelantes, drogas y cualquier otro miembro de un par de aglutinación específico. Esta lista incorpora solamente parte de los muchos materiales diferentes que pueden ser utilizados como material receptor para producir un sistema de ensayo de película delgada. Cualquiera que sea el analito de interés seleccionado, el material receptor está diseñado para aglutinarse específicamente con el analito de interés.

Los dispositivos de detección basados en la difracción con receptores con patrón fabricados de ese modo, pueden ser utilizados en una de dos formas, dependiendo del tamaño del analito. En el caso de los analitos que pueden provocar difracción por sí mismos, tales como son los microorganismos, el sistema se utiliza exponiendo primero el dispositivo de detección basado en la difracción a un medio que contiene el analito elegido y a continuación, después de un periodo de incubación apropiado, transmitiendo una luz, tal como un láser, a través de la película o reflejándola desde la película. Si el analito está presente en el medio y está aglutinado a la capa receptora, la luz se difracta de manera que produce una imagen visible.

Opcionalmente, en el caso de analitos muy pequeños tales como las proteínas, el sistema puede utilizar "elementos aumentadores de la difracción" que pueden aglutinarse al analito objetivo, y pueden producir un cambio sustancial en la altura y/o el índice de refracción, incrementando de ese modo la eficiencia de la difracción del biodetector y permitiendo la detección de analitos menores. Durante la utilización, un analito objetivo se acopla bien al elemento aumentador de la difracción, el cual se acopla a continuación al dispositivo de detección basado en la difracción, o bien directamente a zonas seleccionadas de la película polimérica sobre la que está impreso el receptor, aglutinándose a continuación el elemento aumentador de la difracción al analito. A continuación, se produce la difracción de la luz transmitida y/o reflejada por medio de las dimensiones físicas y de la ubicación definida, precisa, del analito y/o del elemento aumentador de la difracción. Se produce una imagen de difracción que puede apreciarse fácilmente visualmente, u opcionalmente con un dispositivo de detección.

Otra opción para la utilización de este detector implica la detección de analitos que son anticuerpos. El dispositivo de detección comprendería solamente las proteínas de aglutinación a anticuerpos con patrón, y a continuación sería expuesto al medio con partículas aumentadoras de la difracción, que tienen un anticuerpo específico para el anticuerpo a detectar. La selección del anticuerpo sobre la partícula se realiza preferentemente de manera que no se aglutine de manera no específica a la proteína de aglutinación al anticuerpo con patrón, sino que por el contrario se aglutine solamente cuando el anticuerpo del analito está asimismo aglutinado. De este modo, los elementos aumentadores de la difracción provocarían un cambio sustancial en la altura y/o el índice de refracción si está presente el anticuerpo del analito, provocando de ese modo la formación de la imagen de difracción.

Las partículas del elemento aumentador de la difracción que pueden ser utilizadas en la presente invención comprenden, de forma no limitativa, vidrio, celulosa, plásticos o polímeros sintéticos, látex, poliestireno, policarbonato, partículas metálicas (por ejemplo micropartículas de oro, nanopartículas de oro, agente de precipitación de plata, o micropartículas de plata), células bacterianas o micóticas, etcétera. Las partículas son preferentemente de forma sustancialmente esférica, pero la configuración estructural y espacial de la partícula no es crítica para la presente invención. Por ejemplo, las partículas podrían ser cintas, elipsoides, cubos, etcétera. Los tamaños de partícula varían desde un diámetro de unas 0,1 μm hasta unas 100,0 μm , convenientemente aproximadamente entre 0,3 μm y 1 μm . La composición del elemento de partícula no es crítica para la presente invención. Preferentemente, la diferencia en el índice de refracción entre el medio y el elemento aumentador es mayor de 0,1.

El dispositivo de detección basado en la difracción puede comprender asimismo la utilización de un agente de transporte capilar, que se utiliza para extraer de la muestra micropartículas marcadas no aglutinadas, así como cualquier líquido residual. El agente de transporte capilar evita la necesidad de cualquier enjuague adicional. Adicionalmente, puede perforarse un pequeño orificio en el centro del agente de transporte capilar, de manera que una vez que la muestra y el exceso de partículas han sido apartadas, el orificio permite al usuario verificar inmediatamente una imagen de difracción sin extraer el material de transporte capilar. Ejemplos de agentes de transporte capilar comprenden membranas de nitrocelulosa, membranas de acetato de celulosa, membranas de PVDF, polipropileno, y estructuras de microfibra de vidrio.

Además, puede modificarse el tamaño del poro de la membrana de transporte capilar, para controlar la velocidad y la fuerza del transporte capilar. Esto puede afectar a la precisión del dispositivo de diagnóstico, y asimismo puede proporcionar una ventaja para crear un dispositivo de una etapa. Para conseguir esto, el dispositivo de una etapa comprende un anticuerpo de captura impreso por contacto en un sustrato, tal como oro/MYLAR®, que tiene a continuación partículas marcadas desecadas previamente en su superficie. Adicionalmente, una membrana de transporte capilar lento con un orificio recortado es situada en la parte superior del dispositivo, para completarlo. El usuario simplemente añade la muestra a verificar, y a continuación examina una imagen de difracción una vez que se ha producido el transporte capilar. La utilización de tamaños de poro pequeños y/o de recubrimientos o de materiales hidrófobos puede retardar el transporte capilar lo suficiente para permitir la incubación adecuada, tal como se requiere para que tengan lugar las interacciones anticuerpo-antígeno. Alternativamente, puede retardarse el transporte capilar utilizando un reactivo erosionable en la periferia del círculo del agente de transporte capilar. El reactivo eventualmente se disolvería o se alteraría químicamente, de manera que permitiría el transporte capilar después de un periodo de tiempo específico.

Pueden aplicarse una amplia gama de técnicas para aplicar el material receptor al sustrato. Las superficies de prueba pueden recubrirse con el material receptor mediante la aplicación de solución en patrones o matrices diferenciados; rociado, chorro de tinta, u otros métodos de impresión; o mediante impresión por contacto. La técnica seleccionada debe minimizar la cantidad de material receptor necesario para recubrir un gran número de superficies de prueba y mantener la estabilidad/funcionalidad del material receptor durante la aplicación. La técnica debe, asimismo, aplicar o adherir el material receptor al sustrato de manera muy uniforme y reproducible.

En una realización en este tipo, el material receptor es impreso utilizando una impresión por microcontacto. Se utiliza un sello elastomérico para transmitir por contacto "tintando" el material receptor a una superficie; si el sello tiene un patrón, se forma una capa de material receptor con patrón. El sello puede fabricarse vaciando polidimetilsiloxano (PDMS) en una pieza maestra con el patrón deseado. Las piezas maestras se preparan utilizando técnicas fotolitográficas estándar, métodos de decapado, o fabricadas a partir de materiales existentes con características superficiales de microescala.

En otra realización, el material receptor es impreso sobre el sustrato, tal como un sustrato de oro/MYLAR®, en un patrón definido, utilizando una impresora de chorro de tinta. Una resolución de 720 dpi proporciona una matriz que puede producir una imagen de difracción tras la aglutinación mediante un analito objetivo y micropartículas marcadas. Sin embargo, pueden utilizarse igualmente otras resoluciones. Incluso una impresora de chorro de tinta proporciona tamaños característicos adecuadamente pequeños (diámetro de 40 a 100 micras) para proporcionar una imagen de difracción.

Los analitos cuya detección se contempla utilizando la presente invención comprenden, de forma no limitativa, bacterias; levaduras; hongos; virus; factor reumatoide; anticuerpos que comprenden, de forma no limitativa, anticuerpos de IgG, IgM, IgA y IgE; antígeno carcinoembrionario; antígeno del estreptococo del Grupo A; antígenos virales; antígenos asociados con la enfermedad autoinmune; alérgenos; antígenos tumorales; antígenos del estreptococo del Grupo B; antígenos de HIV I ó HIV II; o respuesta del huésped (anticuerpos) a éstos y otros virus; antígenos específicos a RSV o respuesta del huésped (anticuerpos) al virus; un antígeno; encima; hormona; polisacárido; proteína; lípido; carbohidrato; droga o ácido nucleico; *especies de Salmonella*; *especies de Cándida* que comprenden, de forma no limitativa, *Cándida albicans* y *Cándida tropicalis*; *especies de Salmonella*; *grupos de Neisseria meningitides* A, B, C, Y y W sub 135, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli K1*, *Haemophilus influenzae* tipo B; un antígeno derivado de microorganismos; un hapteno, una droga adictiva; una droga terapéutica; un agente ambiental; y antígenos específicos de la hepatitis.

Esta invención se ilustra en mayor detalle mediante los ejemplos siguientes:

EJEMPLOS

EJEMPLOS 1 a 3

En los ejemplos 1 a 3, se determinaron un algoritmo y un método para proporcionar una respuesta sí/no, a través de una o varias mediciones directas de la intensidad de los haces difractados.

La configuración experimental incluyó lo siguiente: un haz de láser como fuente luminosa, una muestra de detección basada en la difracción, una máscara, un fotodiodo y varias lentes. Cuando la muestra satisfizo las

condiciones necesarias para la difracción (por ejemplo, el analito estaba presente), los órdenes de los haces de luz difractada fueron transmitidos a través de las máscaras en su posición de 0° (sin giro) y se midió la intensidad utilizando el fotodiodo. A continuación, se giró la máscara para bloquear los haces difractados por la máscara, de manera que éstos no fueron registrados por el fotodiodo; de este modo, se midió la luz difundida o dispersada. La medición de la intensidad de la luz en ambas posiciones de la máscara permitió que fuera excluida la parte de la luz difundida y los haces dispersados, teniendo en cuenta estos valores.

Se evaluó la precisión de diversos algoritmos con cientos de muestras. Se midió cada uno de los órdenes de difracción, comenzando con el primer orden (el más próximo al haz principal, no difractado (haz de orden cero)), y subiendo (segundo orden, tercer orden, etc.). Puesto que algunas muestras de control mostraron el primer orden de difracción, esto se tuvo en cuenta dando más peso a la intensidad de la luz difractada a partir de los órdenes segundo y superiores. En función de los datos reunidos a partir de cientos de muestras estudiadas, se seleccionó una pérdida específica de intensidad con la rotación de la máscara para el nivel de corte para una decisión sí/no precisa. Podría realizarse una corrección artificial para proporcionar una zona neutral entre los resultados positivo y negativo. Una fórmula genérica incluiría la relación entre M y R, donde M es la intensidad de la luz difractada y R es la intensidad de la luz no difractada; por lo tanto, podrían utilizarse las fórmulas genéricas $X = (M - R)$ ó $X = (M - R) / M$, donde un valor para 'X' por debajo de cierto nivel umbral indicaría una muestra con analito positiva, que difracta la luz.

Un ejemplo más específico tendría M representando la intensidad de la luz difractada de órdenes segundo y superiores de la luz difractada en la posición a 0° de la máscara, y R es la intensidad de la luz no difractada. Esta luz no difractada podría ser medida a través de la rotación de la misma máscara utilizada para reunir los órdenes segundo y superiores, de manera que la luz difractada es bloqueada por la máscara, y a través de la máscara girada se mide solamente la luz difundida. De nuevo, la fórmula podría ser $X' = (M - R)$ ó $X' = (M - R) / M$. Asimismo, podría medirse la pérdida de intensidad (X) de la fuente luminosa global debida a la rotación de la máscara.

En una realización, en la que se utilizó una pérdida de intensidad del 30%, se utilizó la siguiente fórmula:

si $X > 30\% - (M - R)^{1,6}$, el resultado es "positivo",
 si $X \leq 30\% - (M - R)^{1,6}$, el resultado es "negativo".

En otra realización, se utilizó la siguiente fórmula:

si $((M - R) > 0,027 - (M - R)^{1,6})$, el resultado es "positivo",
 si $((M - R) < 0,027 - (M - R)^{1,6})$, el resultado es "negativo".

Otras realizaciones utilizaron algoritmos de perfeccionamiento constante, que incluían factores basados en la desviación estándar de los promedios de lectura de la intensidad.

Un ejemplo es:

Si $((M - R) > 0,014 - ((-1)(0,12 - X)^{1,7}))$ para $X \leq 0,12$, el resultado es "positivo".

Si $((M - R) > 0,014 - X^3)$ para $X > 0,12$, el resultado es "positivo".

Si no se satisfacen los criterios anteriores para $(M - R)$, el resultado es "negativo".

EJEMPLO 4

Tal como se muestra en la figura 3, se preparó un analizador manual con los componentes siguientes: un diodo láser como fuente luminosa; un medio para sostener una muestra de detección basada en la difracción de tal manera que se transmite luz a su través; una máscara que bloqueó toda la luz excepto para los órdenes de difracción 1° , 2° , 3° y 4° ; un fotodiodo; lentes y/o espejos para dirigir la luz; un microprocesador con capacidad de memoria; un conjunto de lámparas para indicar resultados; una LCD. Todos estos componentes estaban contenidos en el interior de un pequeño cuerpo envolvente manual.

En cuanto el analizador es encendido, la LCD solicita al usuario las etapas necesarias, tales como "Insertar muestra" y después "Oprimir pulsador de prueba". Si se insertaba una muestra de difracción en el soporte de muestras, a continuación la intensidad de la luz difractada era recogida por el fotodiodo, y un microprocesador convertía el resultado en un "positivo".

El microprocesador se programó con el algoritmo siguiente:

$A = \text{lectura del canal 1} / \text{lectura del canal 2}$

donde el canal 1 midió la intensidad de los órdenes 2° y superiores de la luz difractada, mientras que el canal 2 midió la intensidad de la luz difractada de primer orden.

En una realización, en la que se estableció un corte de 2,0, se utilizó la siguiente fórmula:

Si $X > 2,0$, el resultado es "positivo",

si $X \leq 2,0$, el resultado es "negativo".

5

En un conjunto de muestras, se encontró que este valor de corte de 2,0 proporciona resultados precisos para muestras sembradas con 1 $\mu\text{g/mL}$ de IgE (lectura = "positivo"), y controles con 0 $\mu\text{g/mL}$ de IgE (lectura = "negativa"). Una lectura positiva se indicó mediante una luz roja que se encendía, así como con el mensaje "Muestra positiva" en la LCD. Una lectura negativa se indicó mediante una luz verde que se encendía, así como con el mensaje de "Muestra negativa" en la LCD. Las lecturas pudieron obtenerse unos 5 segundos después de colocar la muestra en el soporte.

10

Por supuesto, el microprocesador del analizador podría asimismo estar programado para registrar muestras con difracción como "negativas", si estuviera configurado el tipo opuesto de biodetector.

15

Los analizadores, métodos y sistemas de la presente invención pueden ser utilizados como una sola prueba para detectar un analito, o pueden ser formateados como un dispositivo de múltiples pruebas. Pueden utilizarse para detectar contaminación en productos absorbentes, tales como pañales, y para detectar contaminación por microorganismos.

20

En la presente invención, el dispositivo de detección basado en la difracción puede ser acoplado a una pegatina o calcomanía con adhesivo en el dorso, que a continuación puede ser situada en una superficie dura o en la pared de un recipiente. El dispositivo de detección basado en la difracción puede estar situado en la superficie interior de un recipiente, tal como un envase de comida o una ampolla de vidrio. A continuación, el dispositivo de detección basado en la difracción puede ser analizado para determinar la presencia de un analito.

Tal como puede verse, la presente invención da a conocer un sistema y un método mejorados de detección de un analito, incrementando la precisión del sistema por medio del análisis de la imagen de difracción generada y proporcionar una lectura positiva o negativa, dependiendo de si el analito está presente en la muestra.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de:

introducir la muestra en un dispositivo de detección basado en la difracción;

5 transmitir una fuente luminosa a través del dispositivo de detección basado en la difracción o reflejar una fuente luminosa desde el mismo, para generar una imagen de difracción; y

examinar la imagen de difracción con un analizador;

en el que el analizador está adaptado para transmitir o reflejar la fuente luminosa; medir la intensidad de la luz procedente de la imagen de difracción; y utilizar un algoritmo para determinar si el analito está presente en la muestra;

10 caracterizado porque dicho algoritmo comprende:

(intensidad de la luz difractada a órdenes segundo y superiores)/(intensidad de la luz entrante).

2. Método, según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de detección basado en la difracción comprende:

una película polimérica; y

15 una capa receptora con patrón impresa sobre la película polimérica, en el que la capa receptora tiene un material receptor en la misma, que se aglutina específicamente a un analito.

3. Método, según la reivindicación 2, en el que el material receptor está seleccionado entre antígenos, anticuerpos, nucleótidos, quelantes, enzimas, bacterias, levaduras, hongos, virus, pili bacterianos, material flagelar bacteriano, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, proteínas, carbohidratos, metales, hormonas y receptores para dichos materiales.

4. Método, según la reivindicación 2, en el que se utilizan elementos aumentadores de la difracción específicos para el analito.

5. Método, según la reivindicación 1, en el que el analizador comprende:

una fuente luminosa;

25 un fotodetector;

un microprocesador;

un sistema de visualización; y

un cuerpo envolvente para contener la fuente luminosa, el fotodetector, el microprocesador y el sistema de visualización.

30 6. Método, según la reivindicación 5, en el que la fuente luminosa está en el espectro visible.

7. Método, según la reivindicación 5, en el que la fuente luminosa se selecciona entre una luz LED, una luz láser, un diodo láser, a través de fibra óptica, luz natural a través de un poro, o una bombilla basada o no en un filamento.

8. Método, según la reivindicación 5, en el que la fuente luminosa comprende luz reflejada.

35 9. Método, según la reivindicación 5, en el que el microprocesador comprende además un elemento de soporte lógico para hacer funcionar el algoritmo con el objeto de determinar si está presente un analito en la muestra en función de la medición procedente del fotodiodo.

40 10. Método, según la reivindicación 5, en el que el sistema de visualizador es seleccionado entre un visualizador de cristal líquido (LCD), generadores de tonos audibles, lámparas iluminadas, LEDs, una impresora para proporcionar una salida de resultados, materiales fotosensibles, o por lo menos una lámpara para indicar los resultados.

11. Método, según la reivindicación 10, en el que por lo menos dicha lámpara comprende dos o más lámparas.

12. Método, según la reivindicación 5, que comprende además un soporte para sujetar una muestra en posición.

13. Método, según la reivindicación 12, en el que el soporte se selecciona entre una bandeja, una grapa, una ranura, o una combinación de las mismas.

14. Método, según la reivindicación 5, que comprende además medios para dirigir o reforzar la luz, seleccionados entre espejos, lentes, guías de onda, fibras ópticas, o una combinación de estos.

5

15. Método, según la reivindicación 5, que comprende además una máscara específica para la imagen de difracción, y utilizada para bloquear una luz específica.

16. Método, según la reivindicación 15, en el que la máscara está construida y dispuesta para permitir principalmente el paso sólo de luz difractada a su través.

10

17. Método, según la reivindicación 15, en el que la máscara comprende asimismo medios para hacer girar la máscara.

18. Método, según la reivindicación 15, en el que la rotación de la máscara la dispone de manera que permite que la atraviese principalmente la luz no difractada, y la luz difractada es bloqueada.

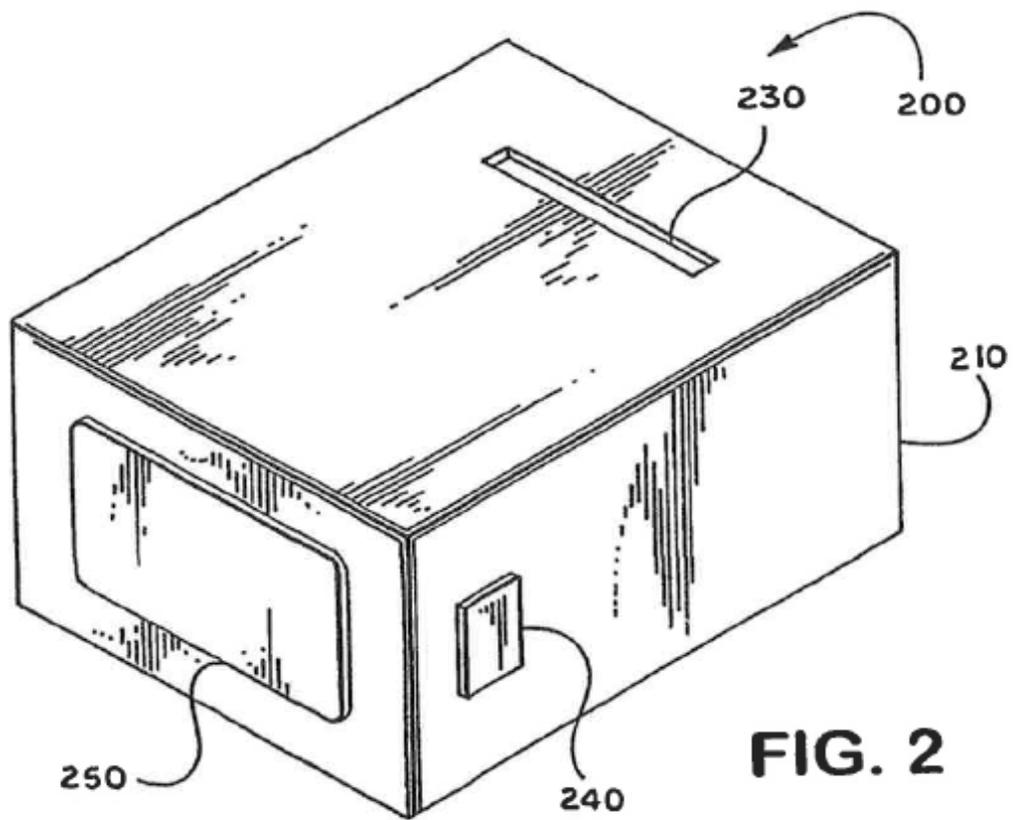
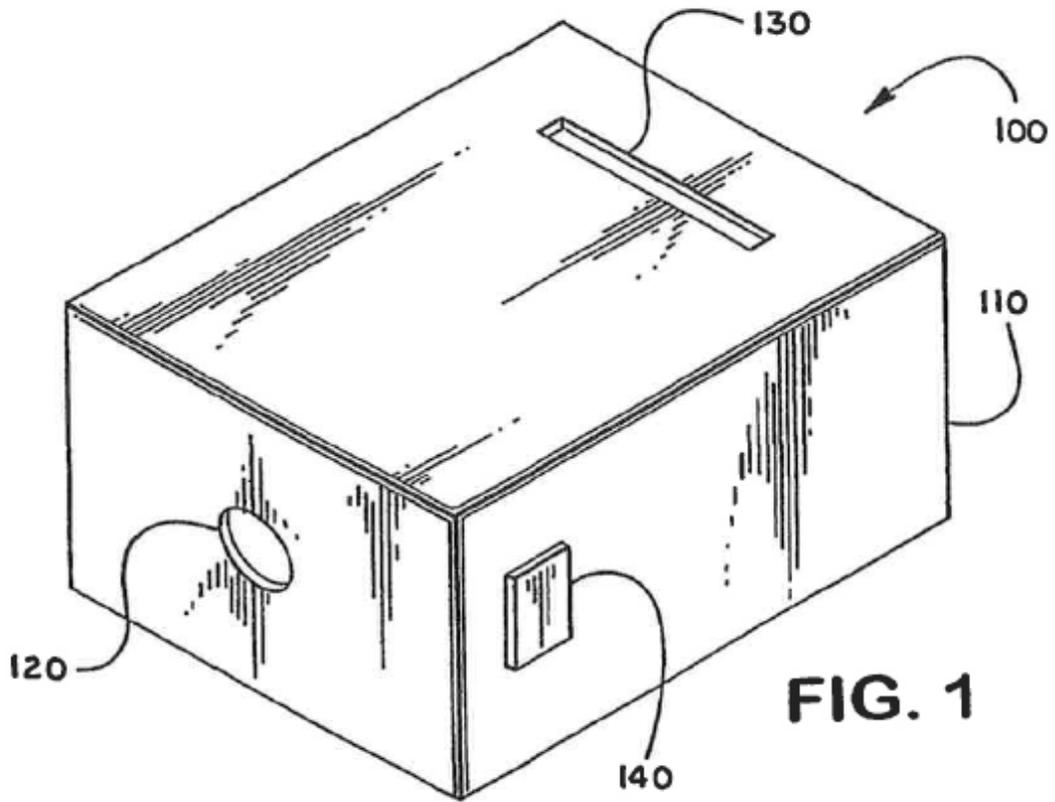
15

19. Método, según la reivindicación 15, en el que la máscara tiene por lo menos dos orientaciones, en el que en una primera orientación, puede pasar a través de la máscara principalmente luz difractada y en una segunda orientación, puede pasar a través de la máscara principalmente luz no difractada, en el que una relación o una diferencia entre las intensidades de la luz difractada y no difractada indica si el analito está presente.

20. Método, según la reivindicación 19, en el que una cantidad de la luz difractada mayor que de la luz no difractada indica la presencia del analito.

20

21. Método, según la reivindicación 19, en el que una cantidad de la luz no difractada mayor que de la luz difractada indica la presencia del analito.



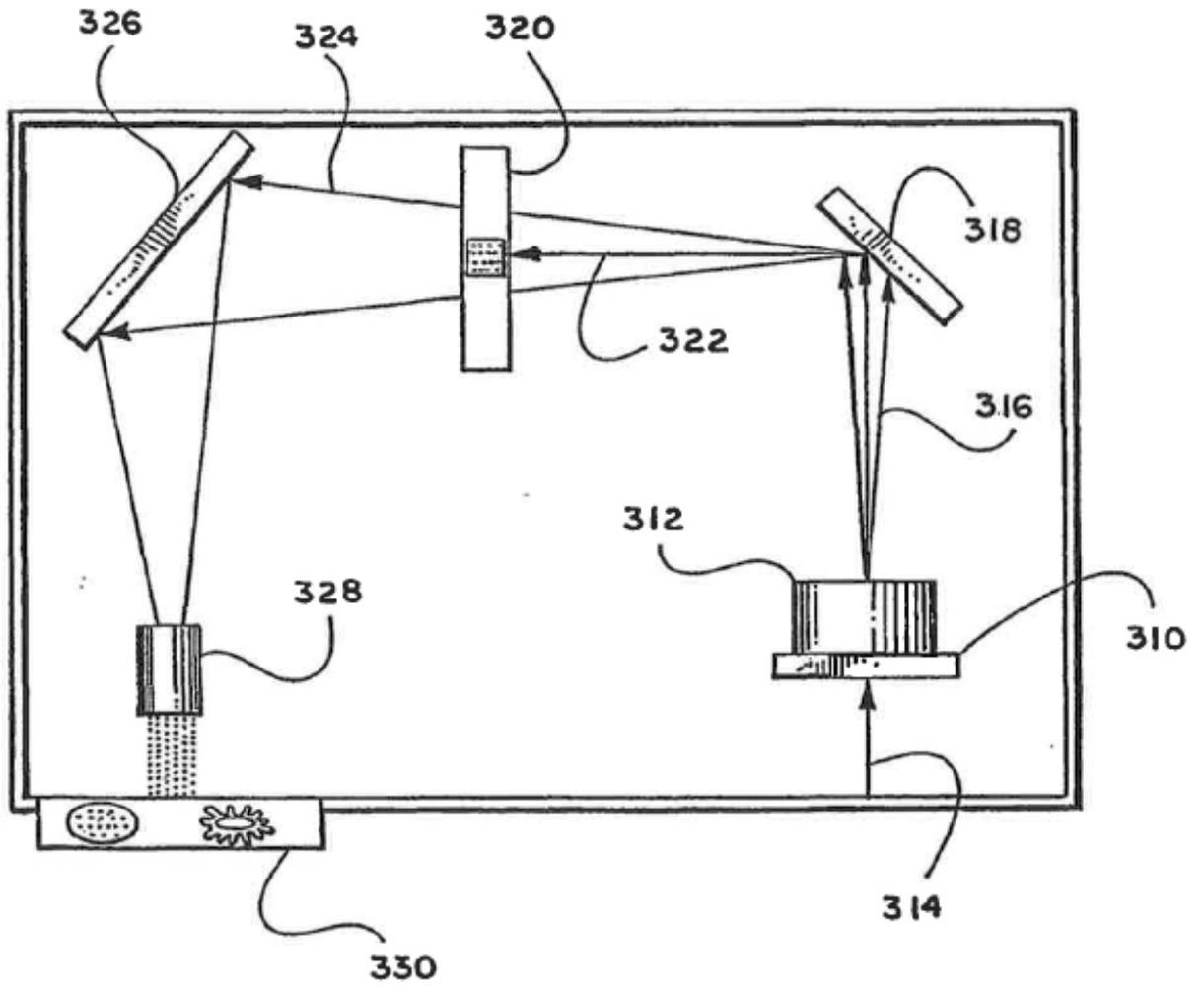


FIG. 3

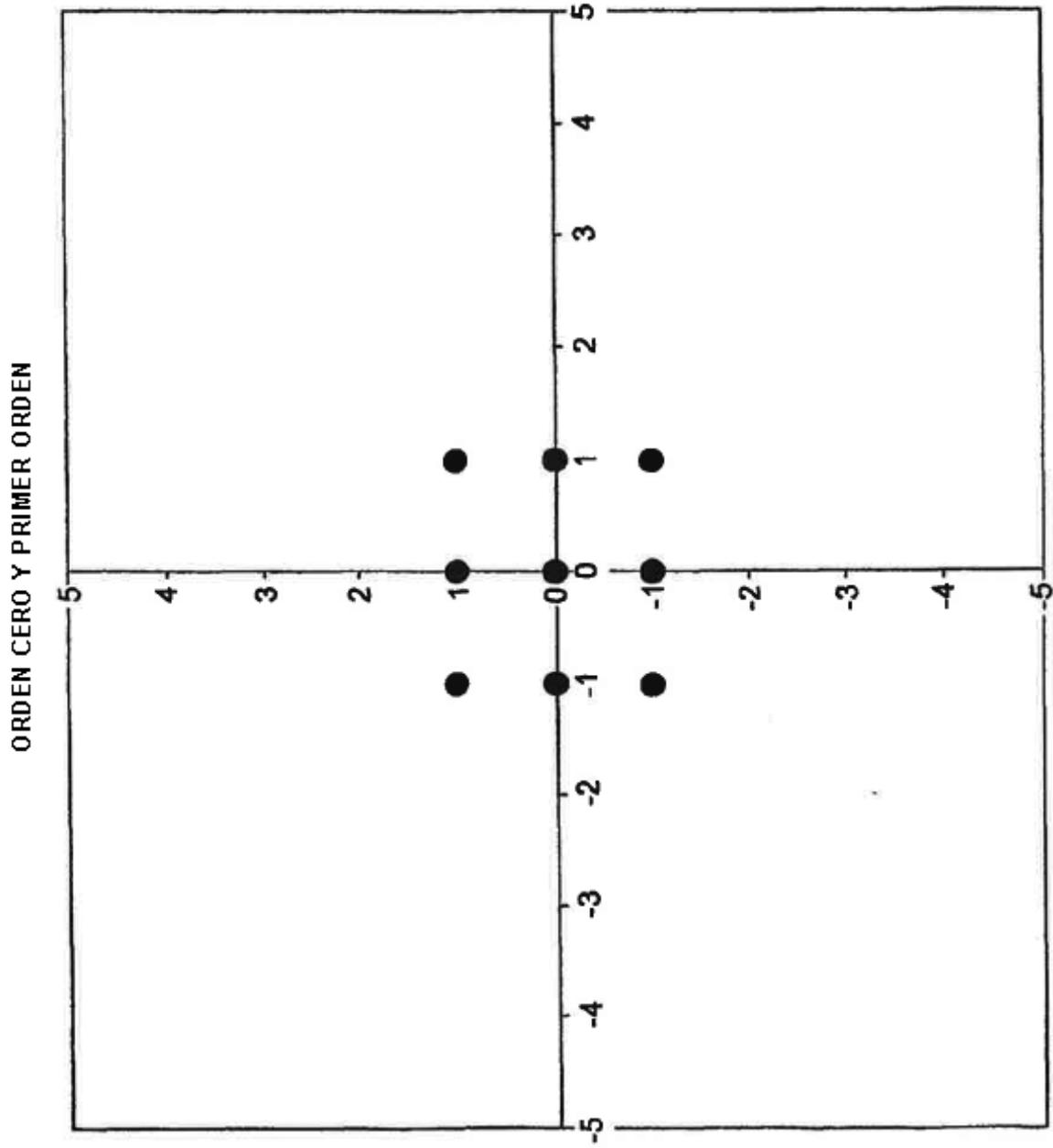


FIG. 4

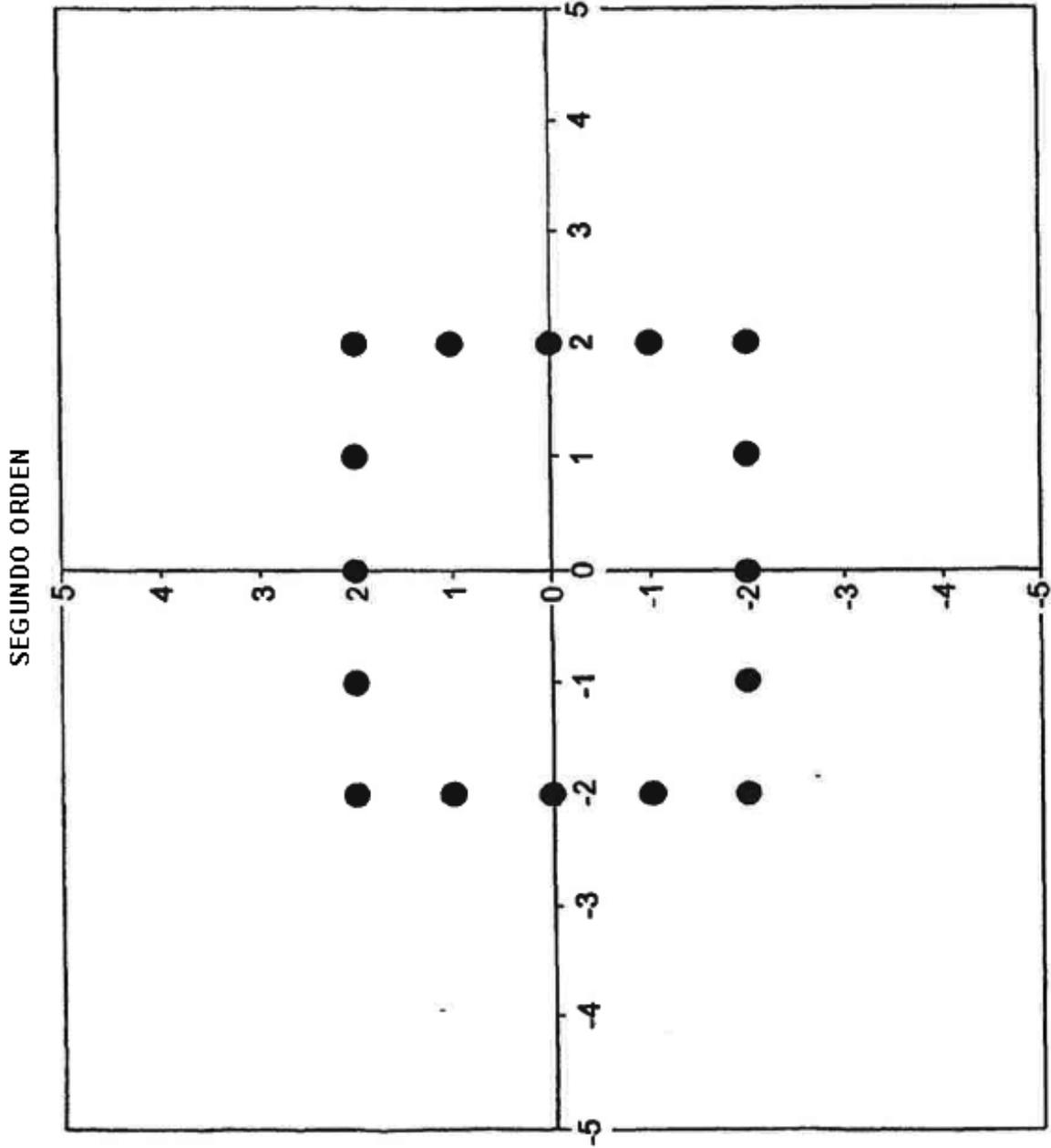


FIG. 5

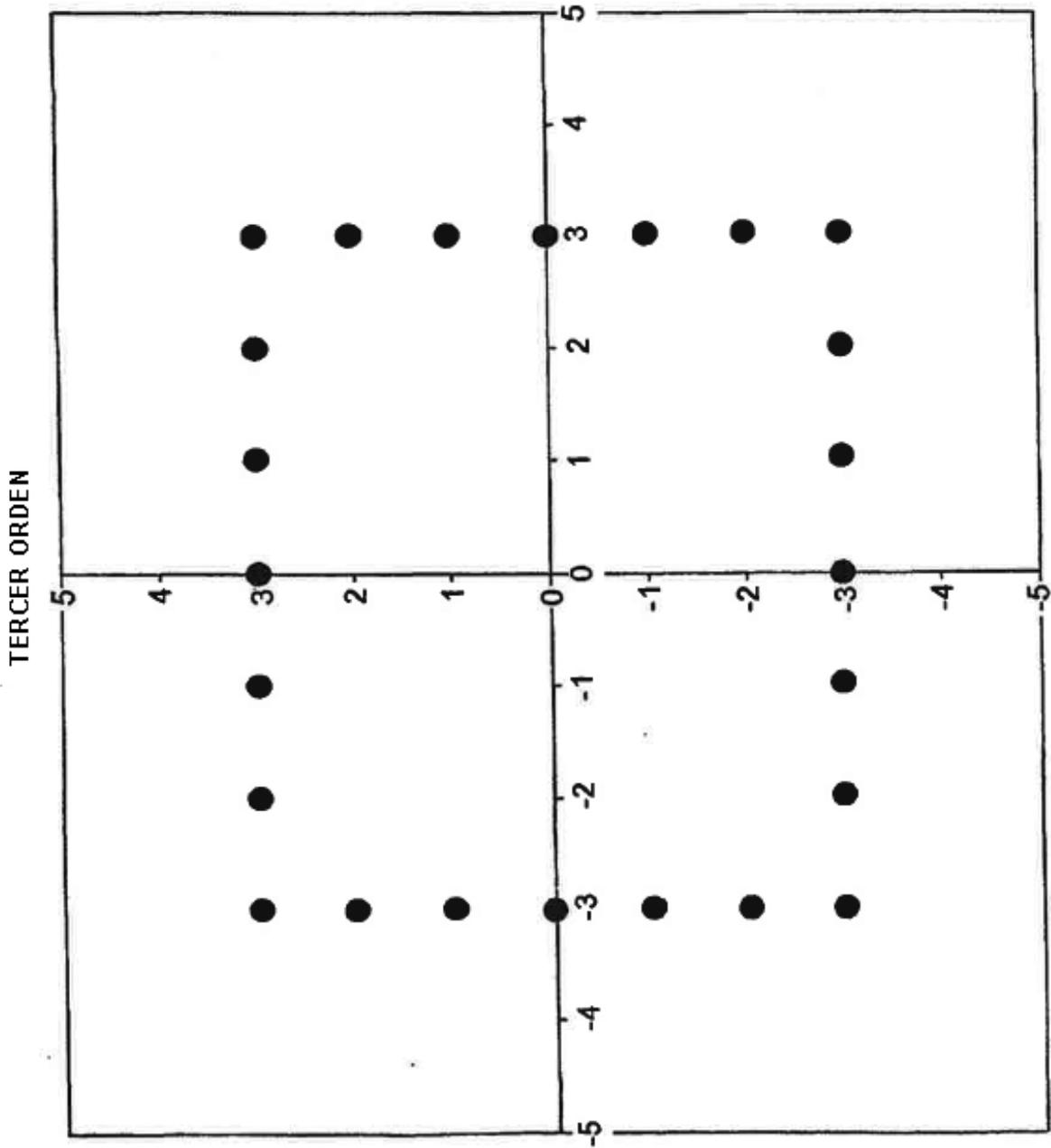


FIG. 6

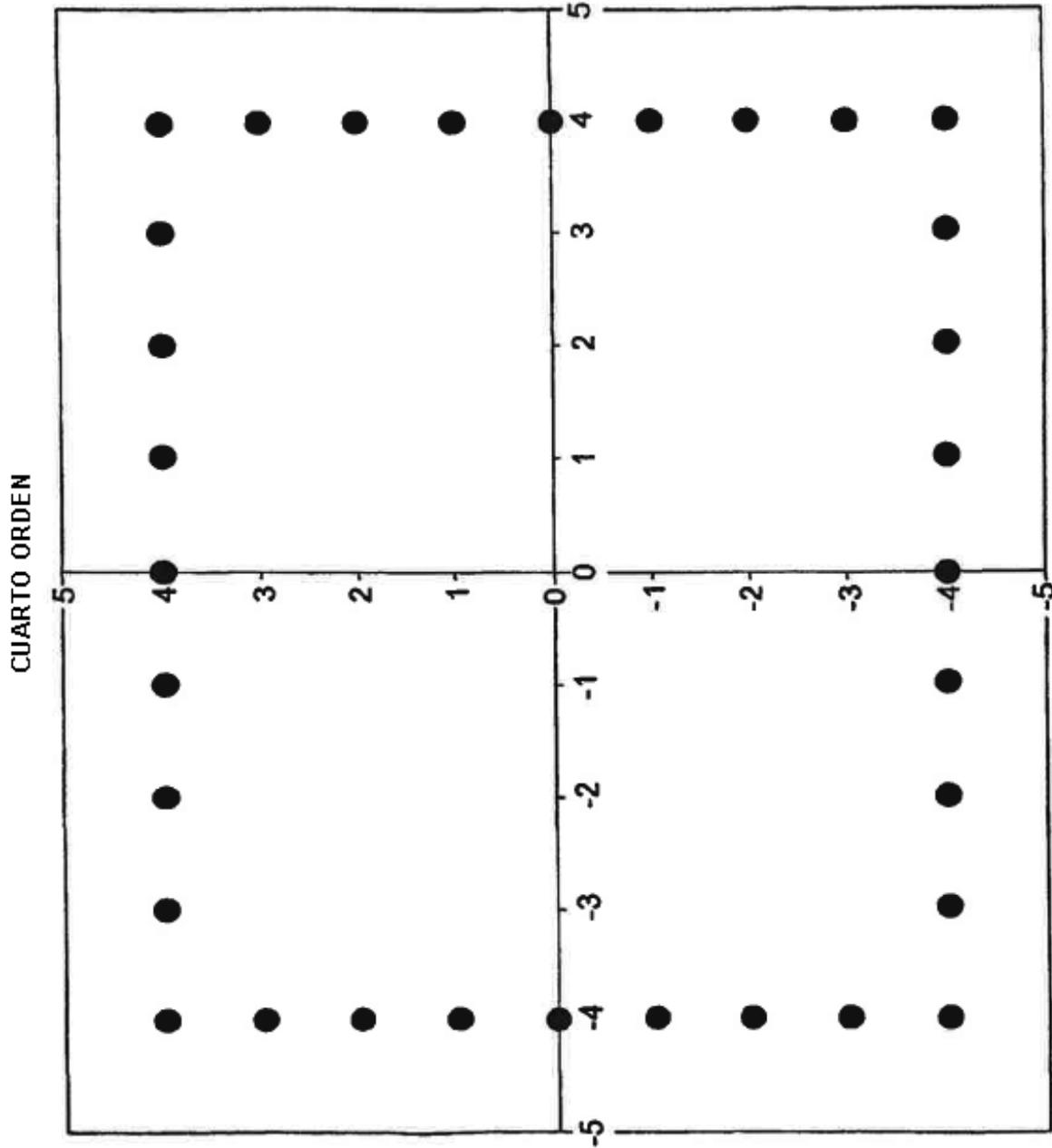


FIG. 7