(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 493 265**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2007 E 11180769 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2436400**

(54) Título: **Detección del virus de la gripe en tiempo real**

(30) Prioridad:

10.05.2006 US 799442 P
16.05.2006 US 800939 P
09.05.2007 US 746535

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.09.2014

(73) Titular/es:

THERANOS, INC. (100.0%)
1601 S California Avenue
Palo Alto, CA 94304, US

(72) Inventor/es:

HOLMES, ELIZABETH A y
GIBBONS, IAN

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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

Detección del virus de la gripe en tiempo real.

Antecedentes de la invención

La gripe es una enfermedad infecciosa capaz de infligir a una amplia variedad de anfitriones, incluyendo aves y mamíferos. La gripe es producida por un virus con ARN de la familia *Orthomyxoviridae* (que comprende en general los virus de la gripe tipo A, B y C). La gripe aviar es producida por un virus de esta familia adaptado a las aves, por lo que también se denomina gripe de las aves. Una amenaza de pandemia actual se origina a partir de un brote sin precedentes de la cepa H5N1 del virus A de la gripe en Asia y Europa. Esta cepa tiene la capacidad de mutar y adaptarse a una amplia gama de anfitriones, incluidas las aves y los seres humanos. El Homeland Security Council emitió la "National Strategy for Pandemic Influenza" ("La estrategia") en noviembre de 2005 en respuesta a la amenaza de pandemia actual. Una parte fundamental de esta iniciativa se centra en la identificación rápida de la gripe aviar en pacientes y pájaros. La estrategia busca mejorar la vigilancia y la detección de la gripe aviar.

A partir de noviembre de 2005, el virus causante de la amenaza de pandemia la gripe aviar era conocido por haber infectado a 121 pacientes en cuatro países, produciendo 62 muertes en los últimos dos años. Los pacientes infectados con el virus H5N1 tenían, en casi todos los casos, mucho contacto físico con aves infectadas. Aunque el virus todavía no ha demostrado una capacidad para transmitirse de manera eficiente entre los seres humanos, como se ve con la epidemia anual del virus de la gripe humana, se plantea un problema grave que va a adquirir esta capacidad por mutación genética o intercambio de material genético con un virus de la gripe humana.

La gripe causa aproximadamente 36.000 muertes y más de 200.000 hospitalizaciones cada año en los EE.UU. solo y cuesta en los EE.UU. más de 10 mil millones de $ al año. Además, las tres últimas pandemias, en 1918, 1957 y 1968, murieron unos 40 millones, 2 millones y 1 millón de pacientes en todo el mundo, respectivamente.

Sigue habiendo una necesidad urgente de proporcionar dispositivos y procedimientos que pueden detectar con precisión y rapidez la presencia de la gripe aviar para proporcionar una alerta temprana de pandemia a fin de contener la propagación de la enfermedad. Un sistema ideal sería (1) permitir la recuperación, la transmisión y el análisis de los datos de dichos dispositivos, y (2) proporcionar un sistema de alerta en tiempo real a los funcionarios de sanidad y del gobierno. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas.

Yan *et al*., 2005, *Anal. Chem*., 77(23), 7673-7678 dan a conocer cartuchos microfluidos. Ello no implica que éstos no puedan utilizarse junto con un identificador o un dispositivo externo que comunica con el cartucho para permitir su utilización. Ello no implica la utilización para detectar una hemaglutinina y una neuraminidasa o un virus de la gripe.

La solicitud de patente US nº 2005/0100937 da a conocer un dispositivo microfluido para el seguimiento de analitos. Ello no implica la utilización de un dispositivo externo que comunica con el cartucho para permitir su utilización. Ello no implica la utilización para detectar una hemaglutinina y una neuraminidasa o un virus de la gripe.

Sumario de la invención

En su sentido más amplio, la presente invención se refiere al objeto tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación proporciona un sistema para la detección de un analito indicador de una infección por virus de la gripe en un fluido corporal de un paciente. El sistema normalmente comprende a) un dispositivo fluídico, comprendiendo dicho dispositivo fluídico una unidad de toma de muestras y un conjunto de ensayo, en el que dicha unidad de toma de muestras permite que una muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene dicho analito para reaccionar con los reactivos contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para producir una señal detectable indicadora de la presencia de dicho analito; b) un conjunto lector que comprende un conjunto de detección para detectar dicha señal detectable; y c) un conjunto de comunicación para transmitir dicha señal detectada a dicho dispositivo externo. El sistema es capaz de detectar una infección por virus de la gripe tipo A, B y/o C. En general, el analito puede comprender una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe, que puede ser hemaglutinina (por ejemplo, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16) y/o una neuraminidasa (por ejemplo, N1, N2, N3, N4 y N5). El fluido corporal puede extraerse de un paciente seleccionado de entre el grupo que consiste en seres humanos, aves de corral y aves silvestres.

La presente divulgación también proporciona un sistema para detectar una pluralidad de analitos, por lo menos dos de los cuales indican una infección por virus de la gripe en un fluido corporal de un paciente. El sistema comprende normalmente, a) un dispositivo fluídico, comprendiendo dicho dispositivo fluídico una unidad de toma de muestras y un conjunto de ensayo, en el que dicha unidad de toma de muestras permite que una muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene dicha variedad de analitos para reaccionar con los reactivos contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para producir una o más señales detectables indicadoras de la presencia de dichos por lo menos dos analitos; b) un conjunto lector que comprende un conjunto de detección para detectar dichas una o más

señales detectables; y c) un conjunto de comunicación para transmitir dicha señal detectada a dicho dispositivo externo.

La presente divulgación proporciona además un procedimiento de utilización de los sistemas del asunto. En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para detectar un indicador de analitos de una infección de la gripe en un fluido corporal de un paciente. El procedimiento implica las etapas siguientes a) proporcionar un sistema del asunto; b) permitir que una muestra de fluido corporal reaccione con los reactivos contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para dar un indicador con señal detectable de la presencia de dicho analito; y c) detectar dicha señal detectable. En otro aspecto, el procedimiento comprende las etapas siguientes a) proporcionar un dispositivo fluídico que comprende al menos una unidad de toma de muestras, un conjunto de inmunoanálisis que contiene reactivos de inmunoanálisis, una pluralidad de canales en comunicación fluídica con dicha unidad de toma de muestras y/o dicho conjunto de inmunoanálisis; b) accionar dicho dispositivo fluídico y dirigir dichos reactivos de inmunoanálisis dentro de dicho dispositivo fluídico; c) permitir que una muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene dicho analito reaccione con dichos reactivos de inmunoanálisis contenidos dentro de dicho conjunto de inmunoanálisis de ensayo para producir un indicador con señal detectable de la presencia de dicho analito indicador de una infección vírica de la gripe en dicha muestra; y d) detectar dicha señal detectable genera a partir de dicho analito en dicha toma de muestras de fluido corporal. Cuando se desee, la muestra de fluido corporal utilizado para dicha detección es inferior a aproximadamente 500 microlitros. Se puede detectar una variedad de infecciones víricas de la gripe. Ellas incluyen, pero no se limitan a la infección vírica tipo A, B, C de la gripe.

La presente divulgación proporciona además un procedimiento para detectar una pluralidad de analitos, por lo menos dos de los cuales son indicadores de una infección vírica de la gripe en un fluido corporal de un paciente. El procedimiento comprende las etapas que consisten en a) proporcionar un dispositivo fluídico que comprende por lo menos una unidad de toma de muestras, un conjunto de inmunoanálisis que contiene reactivos de inmunoanálisis, una pluralidad de canales en comunicación fluídica con dicha unidad de toma de muestras y/o dicho conjunto de inmunoanálisis; b) accionar dicho dispositivo fluídico y dirigir dichos reactivos de inmunoanálisis dentro de dicho dispositivo fluídico; c) permitir que una muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene dicha pluralidad de analitos reaccione con dichos reactivos de inmunoanálisis contenidos dentro de dicho conjunto analítico de inmunoanálisis para producir una o más señales detectables indicadoras de la presencia de por lo menos dichos dos analitos en dicha muestra; y d) detectar una o más de dichas señales detectables generadas a partir de dicha pluralidad de analitos recogidos en dicha muestra de fluido corporal.

También se proporciona en la presente divulgación un dispositivo fluídico para la detección de un tipo de infección vírica de la gripe. Los dispositivos fluídicos comprenden un cartucho que comprende una pluralidad de reactivos, al menos dos de los cuales son reactivos con diferentes analitos presentes en un fluido corporal de un paciente, en el que dichos diferentes analitos son indicadores del tipo de infección de la gripe. En un aspecto, cada uno de dichos por lo menos dos reactivos se une a una glucoproteína de superficie diferente de un virus de la gripe. La glucoproteína de superficie diferente puede un miembro seleccionado de entre el grupo que consta de hemaglutinina y neuraminidasa. Dos cualesquiera de los siguientes glucoproteínas de la superficie pueden ser los analitos diana de los por lo menos dos reactivos: hemaglutinina 1, hemaglutinina 2, hemaglutinina 3, hemaglutinina 4, hemaglutinina 5, hemaglutinina 6, hemaglutinina 7, hemaglutinina 8, hemaglutinina 9, hemaglutinina 10, hemaglutinina 11, hemaglutinina 12, hemaglutinina 13, hemaglutinina 14, hemaglutinina 15, hemaglutinina 16, neuraminidasa 1, neuraminidasa 2, neuraminidasa 3, neuraminidasa 4 y neuraminidasa 5. En una forma de realización preferida, uno por lo menos de los dos reactivos se une a hemaglutinina 5 y el otro se une a la neuraminidasa 1. Cuando se desea, el cartucho puede comprender además una unidad de toma de muestras y un conjunto analítico. En algunos aspectos, el conjunto analítico es un conjunto de inmunoanálisis que comprende reactivos inmunológicos.

Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone casos ilustrativos, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los que:

La figura 1 es un caso que muestra varios componentes del presente sistema.

La figura 2 muestra las diferentes capas de un dispositivo fluídico ilustrativo antes del conjunto.

Las figura 3 y 4 ilustran la red fluida dentro de un dispositivo fluídico ilustrativo.

La figura 5 muestra una vista superior, lateral e inferior de las cámaras de reactivos ilustrativas de la presente invención.

La figura 6 ilustra una vista lateral ilustrativa de una cámara de reactivo en comunicación fluídica con un dispositivo fluídico.

La figura 7 ilustra cámaras de reactivos ilustrativos que están rellenas de reactivos.

Las figuras 8 y 9 ilustran una vista lateral de un dispositivo fluídico ilustrativo en combinación con elementos de accionamiento del conjunto lector.

La figura 10 compara un ensayo de dos etapas con un ensayo de unión competitiva.

La figura 11 muestra un inmunoanálisis enzimático ilustrativo de quimioluminiscencia en dos pasos.

La figura 12 muestra el aumento de sensibilidad del inmunoanálisis enzimático de quimioluminiscencia en dos pasos.

La figura 13 muestra la capacidad de TOSCA para analizar menos de las muestras ideales y mantener la sensibilidad deseada.

La figura 14 muestra un ELISA ilustrativo.

La figura 15 muestra un ELISA ilustrativo para un virus.

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente divulgación es un sistema para la detección de un analito indicador de una infección vírica de la gripe presente en una muestra de fluido corporal. El analito puede ser indicador de una infección vírica de gripe tipo A, tipo B y/o tipo C. El analito puede comprender al menos una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe. Las glucoproteínas de superficie ejemplificativas son, de manera no limitativa, hemaglutininas y neuraminidasas. Las proteínas de superficie hemaglutinina incluyen, pero no se limitan a, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las proteínas de superficie neuraminidasa incluyen N1, N2, N3, N4 y N5. El analito puede comprender también un anticuerpo contra una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe que es generado por el anfitrión infectado.

Otro aspecto de la presente divulgación es un sistema para detectar una pluralidad de analitos, por lo menos dos de los cuales indican una infección vírica de la gripe presente en una muestra de fluido corporal. Del mismo modo, los analitos pueden ser indicadores de una infección vírica de gripe tipo A, tipo B y/o tipo C. Los analitos pueden comprender una pluralidad de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En algunos casos, la pluralidad de glucoproteínas de superficie comprende una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16, y la neuraminidasa se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En los casos preferidos, la hemaglutinina H5 y es la neuraminidasa es N1. Los analitos pueden asimismo ser una pluralidad de anticuerpos específicos para las glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. El sistema es capaz de detectar y/o cuantificar los analitos de interés específico.

Un aspecto adicional de la presente divulgación es un sistema para la detección de una pluralidad de analitos incorporados en una sola entidad tal como una partícula vírica o célula o fragmento celular. En este aspecto, la pluralidad de analitos es preferentemente una combinación de analitos, siendo por lo menos dos de los mismos indicadores de una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicadores de una infección vírica de gripe tipo A, tipo B o tipo C. La pluralidad de analitos puede comprender una combinación de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En algunos casos la pluralidad de analitos puede ser una combinación de glucoproteínas de superficie que comprende una combinación de una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16, y la neuraminidasa se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En los casos preferidos, la combinación de analitos se asocia con una cepa virulenta de la gripe, tal como la combinación H5N1. Este aspecto de la divulgación es específico para la detección de la combinación de la pluralidad de analitos. Se puede distinguir entre la infección con una cepa virulenta tal como una combinación de H5N1 y una supuesta infección con una combinación diferente de analitos. Una variación de este aspecto de la invención es utilizar uno o más reactivos que reaccionan con uno o más antígenos víricos (por ejemplo, anticuerpos antivíricos de glucoproteínas de superficie) para capturar las partículas víricas en un sitio de reacción y, a continuación, aplicar otro conjunto de reactivos (uno o varios reactivos) para detectar específicamente las partículas víricas unidas. Un conjunto ilustrativo utilizará anticuerpos anti-H2 como los anticuerpos de captura, y anticuerpos anti-N5, preferentemente anticuerpos anti-N5 marcados con enzima como reactivo de detección.

En algunos casos el sistema detecta una pluralidad de anticuerpos humanos para los antígenos víricos tales como los anticuerpos para las glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. Estos anticuerpos humanos pueden estar circulando en los sujetos infectados.

En algunos casos el analito de interés puede ser un complejo de un analito indicativo de una infección vírica de la

gripe en una muestra de fluido corporal y un anticuerpo humano para el analito. El analito puede ser cualquier analito indicativo de una infección vírica de la gripe descrita en la presente memoria, pero es preferentemente la hemaglutinina H5, la neuraminidasa N1, o el complejo H5N1 de las glucoproteínas de superficie H5 y N1.

Otro aspecto de la divulgación es un sistema para detectar una pluralidad de analitos, en el que por lo menos un analito resulta indicativo de una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal, y en el que por lo menos un analito es un biomarcador en la muestra de fluido corporal indicativo del estrés impuesto sobre el cuerpo humano por la infección vírica. Dicho por lo menos un analito indicativo de una infección vírica de la gripe puede ser cualquier analito indicativo de una infección vírica de la gripe descrito en la presente memoria. Los biomarcadores ejemplificativos indicativos del estrés impuesto sobre el cuerpo humano por la infección vírica incluyen, de manera no limitativa, CRP, TNFα, interleucinas y similares.

El sistema del asunto comprende normalmente un dispositivo fluídico que tiene uno o más de los siguientes componentes: una unidad de toma de muestras, un conjunto analítico, un conjunto lector y un conjunto de comunicación. La unidad de toma de muestras permite normalmente que una muestra de fluido corporal tomada en un paciente reaccione con los reactivos contenidos en el conjunto analítico para que genere una señal indicadora de la presencia del analito de interés. El conjunto lector detecta la señal, que se transmite a continuación a través del conjunto de comunicación a un dispositivo externo para su posterior tratamiento.

Cualquiera de los fluidos corporales que se sospeche que contiene un analito de interés puede utilizarse junto con el sistema o dispositivos del asunto. Los fluidos corporales frecuentemente empleados incluyen, pero no se limitan a sangre, plasma, suero sanguíneo, saliva, orina, fluidos gástrico y digestivo, lágrimas, heces, semen, fluido vaginal, fluidos intersticiales y el líquido cefalorraquídeo. En un caso preferido, los fluidos corporales se utilizan directamente para detectar los analitos presentes en los mismos con el dispositivo fluídico del asunto sin tratamiento adicional. Cuando se desee, sin embargo, los fluidos corporales pueden tratarse previamente antes de realizar el análisis con los dispositivos fluídicos del asunto. La elección de los pretratamientos dependerá del tipo de fluido corporal utilizado y/o de la naturaleza del analito investigado. Por ejemplo, cuando el analito está presente a baja concentración en una muestra de fluido corporal, la muestra se puede concentrar por cualquier medio convencional que enriquezca el analito. Los procedimientos de concentración de un analito incluyen, pero no se limitan a secado, evaporación, centrifugación, sedimentación, precipitación y ampliación. Cuando el analito es un ácido nucleico, puede extraerse utilizando diversas enzimas líticas o soluciones químicas según los procedimientos expuestos en Sambrook *et al*. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual "), o utilizando resinas aglutinantes de ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes. Cuando el analito es una molécula presente en una célula o dentro de la misma, la extracción puede realizarse utilizando agentes de lisis incluyendo pero sin limitarse a detergentes desnaturalizantes tales como SDS o detergentes no desnaturalizantes tal como Thesit®, desoxicolato de sodio, Triton® X-100 y Tween® 20. En algunos casos el pretratamiento de la muestra se lleva a cabo de forma automática dentro del dispositivo fluídico.

El volumen de fluido corporal que debe utilizarse con un dispositivo fluídico de la presente invención es generalmente inferior a aproximadamente 500 microlitros, normalmente entre aproximadamente 1 a 100 microlitros. Cuando se desee, se puede utilizar una muestra de 1 a 50 microlitros o de 1 a 10 microlitros para detectar un analito utilizando el dispositivo fluídico del asunto.

Una ventaja de la presente invención es que sólo se requiere un volumen de sangre muy pequeño para detectar un analito de interés en los animales. En algunos casos se extraen entre aproximadamente 1 microlitro y aproximadamente 50 microlitros. En un caso preferido se extraen entre aproximadamente 1 microlitro y 10 microlitros. En los casos preferidos se extraen del paciente aproximadamente 5 microlitros de sangre.

Un fluido corporal puede extraerse de un paciente y ponerse en el dispositivo fluídico de diferentes maneras, incluyendo pero sin limitarse a, punción, inyección o pipeteo. En un caso, una lanceta pincha la piel y extrae la muestra en el dispositivo fluídico utilizando, por ejemplo, la gravedad, la acción capilar, la aspiración o la fuerza de vacío. La lanceta puede formar parte del dispositivo fluídico, o parte de un conjunto lector, o como un componente independiente. Cuando sea necesario, la lanceta puede activarse mediante una variedad de mecanismos mecánicos, eléctricos, electromecánicos, o cualquier otro mecanismo de activación conocido o cualquier combinación de dichos procedimientos. En otro caso en el que no se requiere ningún mecanismo activo, un paciente simplemente puede proporcionar un fluido corporal al dispositivo fluídico, como por ejemplo, podría ocurrir con una muestra de saliva. El fluido recogido se puede colocar en la unidad de toma de muestras dentro del dispositivo fluídico. En otro caso todavía, el dispositivo fluídico comprende al menos una microaguja que perfora la piel. La microaguja se puede utilizar con dispositivo fluídico solo, o puede perforar la piel después de que el dispositivo fluídico se inserta en un conjunto lector.

En algunos casos una microaguja de aproximadamente el tamaño de un cabello humano y tiene una microdepósito o cubeta integrado. La microaguja puede penetrar la piel de un paciente sin dolor y extraer una pequeña muestra de sangre. Más preferentemente, la microaguja recoge aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 microlitro, preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 microlitros y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 microlitros de sangre capilar. En algunos casos puede construirse una

microaguja de silicio y tiene aproximadamente 10 a aproximadamente 200 micras de diámetro, preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 micras de diámetro, y aún más preferentemente de aproximadamente 100 micras de diámetro, por lo que su aplicación a la piel es prácticamente indoloro. Para asegurarse de que un capilar se ha encontrado en realidad con una aguja, puede utilizarse una pluralidad de microagujas para la toma de muestras. Dichas microagujas pueden ser del tipo comercializado por Pelikan (Palo Alto, Calif.) y/o Kumetrix (Union City, Calif.). La patente US nº 6.503.231 da a conocer microagujas que pueden utilizarse con la presente invención.

Los procedimientos de microfabricación que pueden utilizarse en la fabricación de las microagujas dadas a conocer en la presente memoria incluyen, sin limitación litografía; técnicas de grabado tales como extracción química en húmedo, en seco y fotorresistente; oxidación térmica de silicio; galvanoplastia y galvanoplastia química; procedimientos de difusión, tales como difusión de boro, fósforo, arsénico y antimonio; implantación iónica; deposición de película tal como evaporación (filamento, haces de electrones, flash y oscurecimiento y cobertura por etapas), erosión iónica, deposición de vapor químico (CVD), epitaxia (fase vapor, fase líquida y haces moleculares), galvanoplastia, serigrafía y laminación. Véase, en general Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988); Runyan, *et al*., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990); Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998; Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Washington, 1997). Alternativamente, las microagujas pueden moldearse en obleas de silicio y luego chaparse utilizando técnicas convencionales de corte de alambre con níquel, oro, titanio o varios otros metales biocompatibles. En algunos casos se puede modelar microagujas a partir de biopolímeros. En algunos casos pueden fabricarse microagujas y emplearse para los dispositivos reivindicados según los procedimientos de Mukerjee *et al*., Sensors and Actuators A:. Physical, Volumen 114, números 2-3, 1 de septiembre 2004, páginas 267-275 .

En los casos preferidos una microaguja sólo se utiliza una vez y a continuación se descarta. En algunos casos puede insertarse un actuador mecánico y retirar la microaguja del paciente, desechar la aguja utilizada, y volver a cargar una nueva microaguja. Las tecnologías mecánicas desarrolladas y fabricadas en muy grandes volúmenes para unidades de disco muy pequeñas tienen un conjunto similar de requisitos de movimiento y de bajo coste. En los casos preferidos, el actuador es un dispositivo MEMS (sistema electromecánico micromaquinado) fabricado utilizando procesos discontinuos similares a semiconductores. Dichos actuadores incluyen, sin limitación la aleación de níquel titanio, dispositivos fluídicos o piezoeléctricos. En algunos casos, las microagujas son de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 10 micras de espesor, preferentemente de aproximadamente 2 micras a aproximadamente 6 micras de espesor, y aún más preferentemente alrededor de 4 micras de espesor. En algunos casos, las microagujas son de aproximadamente 10 micras a aproximadamente 100 micras de altura, preferentemente de aproximadamente 30 micras a aproximadamente 60 micras de altura, y aún más preferentemente de aproximadamente 40 micras de altura.

La figura 1 ilustra un sistema ejemplificativo. Como se ilustra, un dispositivo fluídico proporciona un fluido corporal de un paciente y se puede insertar en un conjunto lector. El dispositivo fluídico puede tomar una variedad de configuraciones y en algunos casos el dispositivo fluídico puede estar en forma de cartucho. Un detector de identificador (ID) puede detectar un identificador en el dispositivo fluídico. El detector de identificador se comunica con un conjunto de comunicación a través de un controlador que transmite el identificador a un dispositivo externo. Cuando se desee, el dispositivo externo envía un protocolo almacenado en el dispositivo externo al conjunto de comunicación basado en el identificador. El protocolo a ejecutar en el dispositivo fluídico puede comprender instrucciones para el controlador del conjunto lector para llevar a cabo el protocolo en el dispositivo fluídico, incluyendo, pero sin limitarse a un ensayo específico que debe ejecutarse y un procedimiento de detección que debe realizarse. Una vez que el ensayo se realiza en el dispositivo fluídico, se genera una señal indicadora de un analito indicador de una infección vírica de la gripe en la muestra de fluido corporal y se detecta con un conjunto de detección. La señal detectada puede entonces comunicarse al conjunto de comunicaciones, en el que puede transmitirse al dispositivo externo para el tratamiento, incluyendo sin limitación, el cálculo de la concentración de analitos en la muestra o la determinación de la presencia del analito.

La figura 2 ilustra capas ejemplificativas de un dispositivo fluídico antes del conjunto del dispositivo fluídico que se describe con más detalle a continuación. Las figuras 3 y 4 muestran una vista superior e inferior, respectivamente, de un dispositivo fluídico ilustrativo una vez se ha montado el dispositivo. Las diferentes capas se diseñan y se ensamblan para formar una red de canales de fluido en tres dimensiones. Una unidad de toma de muestras 4 proporciona una muestra de fluido corporal de un paciente. Como se explicará en más detalle a continuación un conjunto lector comprende elementos de accionamiento (no mostrados) puede accionar el dispositivo fluídico para iniciar y dirigir el flujo de una muestra de fluido corporal y reactivos de ensayo en el dispositivo fluídico. En algunos casos los elementos de accionamiento en primer lugar hacen que el flujo de la muestra en el dispositivo fluídico 2 de la unidad de toma de muestras 4 a los lugares de reacción 6, desplazan hacia arriba la muestra en el dispositivo fluídico desde el punto G' al punto G, y a continuación a la cámara de residuos 8. Los elementos de accionamiento a continuación, inician la circulación de reactivos desde las cámaras de reactivos 10 al punto B', al punto C', y al punto D', a continuación hacia arriba a los puntos B, C y D, respectivamente, a continuación al punto A, hacia abajo al punto A', y a continuación a la cámara de residuos 8 de la misma manera que la muestra.

Una unidad de toma de muestras 4 en un dispositivo fluídico 2 puede proporcionar una muestra de fluido corporal de un paciente por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Si es necesario, la muestra en primer lugar se puede procesar diluyendo el fluido corporal en una cámara de dilución, y o puede filtrarse separando el plasma de los glóbulos rojos de la sangre en una cámara de filtración. En algunos casos la unidad de toma de muestras, la cámara de dilución y la cámara de filtración pueden ser el mismo componente, y en algunos casos pueden ser diferentes componentes, o cualquiera de los dos puede ser el mismo componente y el otro puede ser un componente diferente. En algunos casos puede haber más de una unidad de toma de muestras en el dispositivo fluídico.

En algunos casos puede ser deseable detectar la presencia de analitos en una célula o superficie vírica, dentro de una célula o membrana vírica, o dentro de una célula. La dificultad de detectar dichos analitos es que las células y otros elementos son en partículas y los componentes de las células no interactúan fácilmente con químicas analíticas tradicionales que están diseñadas para operar en los analitos en solución. Los analitos de la superficie celular reaccionan lenta e ineficazmente con las sondas unidas a la superficie, y los analitos dentro de la célula no pueden reaccionar en absoluto con sondas unidas. Para permitir la detección de dichos analitos, en algunos casos el dispositivo fluídico puede incluir un conjunto de lisis para lisar las células presentes en la muestra de fluido corporal. El conjunto de lisis puede estar incorporado a la unidad de toma de muestras, una cámara de dilución, y/o una cámara de filtración. En algunos casos la unidad de toma de muestras, la cámara de dilución y el componente de lisis se encuentran dentro del mismo elemento en el dispositivo fluídico. En algunos casos, el componente de lisis se puede incorporar con un reactivo analítico descrito a continuación.

Cuando se desee, agentes de lisis se pueden impregnar y después secar en almohadillas porosas, almohadillas de fibra de vidrio, fritas sinterizadas o partículas tales como Porex, papel u otro material similar. Los agentes de lisis pueden secarse sobre superficies planas. Los agentes de lisis también se pueden disolver en diluyentes líquidos u otros reactivos líquidos. En los casos preferidos se utilizan materiales porosos para almacenar los agentes de lisis, ya que pueden almacenar un agente de lisis en forma seca que probablemente sea muy estable. También facilitan la mezcla de la muestra de fluido corporal con el agente de lisis proporcionando una ruta tortuosa para la muestra medida que se desplaza a través del material poroso. En los casos preferidos dichos materiales porosos tienen forma de disco con un diámetro mayor que su espesor. En algunos casos agentes de lisis se pueden secar sobre materiales porosos utilizando liofilización, evaporación pasiva, exposición a gas seco caliente en circulación u otros procedimientos conocidos.

Una variedad de agentes de lisis están disponibles en la técnica y son adecuados para su utilización en relación con el dispositivo fluídico del asunto. Agentes de lisis preferidos no son desnaturalizantes, tales como detergentes no desnaturalizantes. Los ejemplos no restrictivos de detergentes no desnaturalizantes incluyen Thesit®, desoxicolato de sodio, Triton®X-100, y Tween®20. Los agentes son preferentemente no volátiles en los casos en los que los agentes se impregnan en materiales porosos sólidos. En algunos casos los agentes de lisis se mezclan. Se pueden mezclar otros materiales con los agentes de lisis para modificar los efectos líticos. Dichos materiales ilustrativos pueden ser, sin limitación, tampones, sales y proteínas. En los casos preferidos se utilizarán agentes de lisis en cantidades que están en exceso de la cantidad mínima requerida para lisar las células. En algunos casos se utilizan agentes de lisis que pueden lisar tanto los glóbulos blancos como los rojos.

Una de las ventajas de la presente divulgación es que algunos reactivos necesarios para llevar a cabo un ensayo en un dispositivo fluídico según la presente invención están preferentemente sobre cartón, o alojados dentro del dispositivo fluídico antes, durante y después del ensayo. De esta forma la única entrada o salida desde el dispositivo fluídico es preferentemente la muestra de fluido corporal inicialmente proporcionada por el dispositivo fluídico. Este diseño sobre cartón también ayuda a crear un dispositivo fluídico fácilmente desechable donde todos los fluidos o líquidos permanecen en el dispositivo. El diseño sobre cartón también evita la fuga del dispositivo fluídico en el conjunto lector que debe permanecer libre de contaminación del dispositivo fluídico.

En un caso preferido hay por lo menos una cámara de reactivo. En algunos casos puede estar previstas dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más, o cualquier número de cámaras de reactivos que sean necesarias para cumplir con los propósitos de la invención. Una cámara de reactivo está preferentemente en comunicación fluídica con al menos un sitio de reacción, y cuando el dispositivo fluídico se acciona como se describe en la presente memoria, los reactivos contenidos en dichas cámaras de reactivos se liberan en los canales de fluidos dentro del dispositivo fluídico.

Los reactivos incluyen sin limitación tampones de lavado, sustratos enzimáticos, tampones de dilución, conjugados, los conjugados enzimáticos marcados, diluyentes de muestras, soluciones de lavado, reactivos de pretratamiento de muestras, incluidos los aditivos, tales como detergentes, polímeros, agentes quelantes, reactivos de unión a la albúmina, inhibidores de enzimas, enzimas, anticoagulantes, agentes aglutinantes de glóbulos rojos, anticuerpos, u otros materiales necesarios para efectuar el ensayo en un dispositivo fluídico. Un conjugado enzimático puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima que puede producir una señal detectable tras la reacción con un sustrato apropiado. Ejemplos no restrictivos de dichas enzimas son la fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante. En algunos casos, los reactivos comprenden reactivos de inmunoanálisis.

En algunos casos una cámara de reactivo contiene aproximadamente unos 50 µl a aproximadamente 1 ml de fluido.

En algunos casos la cámara puede contener aproximadamente 100 µl de fluido. El volumen de líquido en una cámara de reactivo puede variar dependiendo del tipo de ensayo que se está realizando o la muestra de fluido corporal proporcionado. En algunos casos, los reactivos se almacenan inicialmente seco y se licuan (por ejemplo, se disuelven o se funden) al inicio del ensayo que se realiza en el dispositivo fluídico.

Las figuras 5 y 6 ilustran un caso ejemplificativo de una cámara de reactivo sellada. La figura 5 muestra una vista desde arriba, lateral y desde la parte inferior de una cámara de reactivo. Una capa superior 11 contiene una pluralidad de blísteres o bolsas 13. Una capa de fondo 15 tiene una superficie inferior que está unida a la base 17 del dispositivo fluídico como se muestra en la figura 6. La capa de fondo 15 tiene una pluralidad de canales de fluido 19 dispersados por toda la superficie, donde cada uno de los canales atraviesa la capa de fondo 15. El fluido en la cámara de reactivo está contenido dentro de la cámara por el sello rompible a presión 21 entre el canal de fluido 19 y la cámara 13. El sello rompible 21 está diseñado de tal manera que a una presión predeterminada el sello explota permitiendo que el fluido en la cámara 13 circule dentro de un canal de fluido 19.

La figura 7 muestra un ejemplo de proceso de llenado de las cámaras de reactivo 13 con, por ejemplo, reactivos. Las cámaras de reactivos 13 puede estar llenas de líquido utilizando un canal de llenado y un canal de extracción a vacío. El proceso de llenado de los reactivos implica en primer lugar la eliminación de todo el aire de la cámara. Esto se hace extrayendo a vacío a través del canal de extracción a vacío. Una vez que se extrae a vacío, se coloca un sello permanente entre el canal de llenado y el canal de extracción a vacío. A continuación, se distribuyen los reactivos necesarios en la cámara a través del canal de llenado. Después, se coloca un sello permanente entre la cámara y el canal de llenado. Esto asegura que cuando la cámara está comprimida, el fluido puede circular en una sola dirección, hacia el sello rompible. Si la compresión comunica una presión mayor que la presión de rotura del sello, el sello se rompe y el fluido circula en el canal del fluido.

Las figuras 8 y 9 ilustran un caso de un dispositivo fluídico en funcionamiento con elementos de accionamiento, como se describe en la presente memoria. El dispositivo fluídico 2 contiene una cámara de reactivo 10 y una capa de papel de aluminio rompible 12 que encierra la cámara de reactivo. Por encima del papel de aluminio rompible 12 hay una parte del circuito de microfluidos 14. Una cubierta superior 16 dura, pero elastómera actúa como capa superior del dispositivo fluídico 2. El conjunto lector incluye una placa de accionamiento de válvula 18. Acoplada con seguridad a la placa 18 hay una aguja sin núcleo 20 de forma que cuando se baja la placa, el filo de la aguja contacta con la cubierta elastómera 16. La cubierta superior también podría estar hecha de material de silicona flexible, que actuaría como un sello impermeable a la humedad. Este caso también proporciona una solución a la evaporación de líquido y fuga desde un dispositivo fluídico aislando cualquier reactivo líquido en el dispositivo fluídico de cualquier reactivo anhidro hasta que se inicie el ensayo.

En los casos preferidos, la cámara de reactivo y la unidad de toma de muestras se conectadas de forma fluida a los sitios de reacción donde las sondas unidas pueden detectar un analito de interés en la muestra de fluido corporal utilizando el ensayo. Un sitio de reacción a continuación, podría proporcionar una señal indicadora de la presencia del analito de interés, que puede detectarse con un dispositivo de detección descrito con detalle en la presente memoria a continuación.

En algunos casos, los sitios de reacciones son planos pero pueden tomar una variedad de configuraciones superficiales alternativas. El sitio de reacción forma un soporte rígido en el que es inmovilizado un reactivo. La superficie del sitio de reacción también se selecciona para proporcionar las características adecuadas de absorción de la luz. Por ejemplo, el sitio de reacción puede ser de vidrio funcionalizado, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO_2, SiN_4, silicio modificado, o de cualquiera de una amplia variedad de geles o polímeros, tales como (poli)tetrafluoroetileno, (poli)difluoruro de vinilideno, poliestireno, policarbonato, polipropileno, o combinaciones de los mismos. Pueden utilizarse otros materiales adecuados según la presente invención.

Un reactivo inmovilizado en un sitio de reacción puede ser cualquiera útil para detectar un analito de interés en una muestra de fluido corporal. Por ejemplo, dichos reactivos incluyen, sin limitación, anticuerpos, receptores de membrana celular, anticuerpos monoclonales y antisueros reactivos con un analito específico indicador de una infección vírica de la gripe. Se pueden utilizar varios reactivos que se pueden adquirir en el mercado, tales como un anfitrión de anticuerpos policlonales y monoclonales desarrollados específicamente para analitos específicos.

Una clase preferida de reactivos son los anticuerpos. Como se emplea en la presente memoria, un "anticuerpo" (empleado indistintamente en forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un analito en un fluido corporal, mediante por lo menos un sitio de reconocimiento de antígenos, situado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se emplea en la presente memoria, el término abarca no solamente los anticuerpos intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, cadena sencilla (ScFv), sus mutantes, proteínas de fusión, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida.

Los procedimientos y aparatos del asunto pueden utilizar reactivos de anticuerpos que se pueden adquirir en el mercado o generar de novo. Los procedimientos de laboratorio para la producción de anticuerpos policlonales y

anticuerpos monoclonales, son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988) y Sambrook *et al*. (1989). En resumen, los anticuerpos monoclonales útiles para la presente invención pueden ser producidos biológicamente introduciendo un antígeno de un virus de la gripe en un animal, por ejemplo, ratón o rata. Las células productoras de anticuerpos en el animal se aíslan y se fusionan con células de mieloma o las células de heteromieloma para producir células híbridas o hibridomas.

Se pueden preparar isotipos específicos de un anticuerpo monoclonal ya sea directamente seleccionando a partir de la fusión inicial, o prepararse indirectamente, a partir de un hibridoma original que segrega un anticuerpo monoclonal de isotipo diferente utilizando la técnica de selección sib para aislar variantes de cambio de clase utilizando el procedimiento descrito en Steplewski *et al*. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci*. 82:8653 o Spira *et al*. (1984) *J. Immunol. Methods* 74:307.

Los reactivos de anticuerpos se pueden unir (es decir, conjugar) a un marcador detectable adecuado dependiendo de la reacción de ensayo específica.

En algunos casos, un reactivo detecta un indicador de analitos una infección vírica tipo A, tipo B o tipo C de la gripe. El analito puede comprender por lo menos una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe. Las glucoproteínas de superficie ilustrativas son, sin limitación, una hemaglutinina y una neuraminidasa. Las proteínas de superficie hemaglutinina incluyen H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las proteínas de la superficie incluyen la neuraminidasa N1, N2, N3, N4 y N5.

En algunos casos los reactivos detectan una pluralidad de analitos, por lo menos dos de los cuales indican una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicadores de una infección vírica tipo A, tipo B o tipo C de la gripe. Los analitos pueden comprender una pluralidad de glucoproteínas de la superficie de un virus de la gripe. En la invención, una pluralidad de glucoproteínas de la superficie comprende una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina es seleccionada de entre el grupo que consta de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H 14, H 15 y H16, y la neuraminidasa es seleccionada de entre el grupo que consta de N1, N2, N3, N4 y N5. En los casos preferidos, la hemaglutinina es H5 y la neuraminidasa es N1.

Un experto en la materia apreciará que hay muchas maneras de inmovilización de diversos reactivos sobre un soporte, donde la reacción puede tener lugar. La inmovilización puede ser covalente o no covalente, a través de un resto enlazador, o atándoles a un resto inmovilizado. Estos procedimientos son bien conocidos en el campo de la síntesis en fase sólida y microchips (Beier *et al*., *Nucleic Acids Res*. 27:1970-1-977 (1999). Restos de unión ilustrativos no restrictivos para la fijación de cualquiera de los ácidos nucleicos o moléculas proteicas tales como anticuerpos a un soporte sólido incluyen enlaces de estreptavidina o avidina/biotina, enlaces carbamato, enlaces éster, amida, tioléster, tiourea (N)-funcionalizada, maleimida funcionalizada, amino, disulfuro, amida y enlaces hidrazona, entre otros. Además, un resto sililo puede acoplarse a un ácido nucleico directamente a un sustrato tal como vidrio usando procedimientos conocidos en la técnica.

En algunos casos existe más de un sitio de reacción que puede permitir la detección de varios analitos de interés a partir de la misma muestra de fluido corporal. En algunos casos existe 2, 3, 4, 5, 6, o más sitios de reacción, o cualquier otro número de sitios de reacción que pueden ser necesarios para llevar a cabo el propósito de la invención.

En los casos con varios sitios de reacción en un dispositivo fluídico, cada sitio de reacción se puede inmovilizar con un reactivo diferente de un reactivo en un sitio de reacción diferente. En un dispositivo fluídico con, por ejemplo, tres sitios de reacción, puede haber tres sondas diferentes, cada una unida a un sitio de reacción diferente para unirse a tres analitos diferentes de interés en la muestra. En algunos casos puede haber diferentes reactivos unidos a un solo sitio de reacción si, por ejemplo, un CCD con varias zonas de detección se utilizaban como dispositivo de detección, de tal manera que varios analitos diferentes podrían ser detectados en un único sitio de reacción. La capacidad de utilizar varios sitios de reacción además de varias sondas diferentes en cada sitio de reacción permite que las características de alto rendimiento de la presente invención.

En los casos preferidos de la invención, el dispositivo fluídico incluye al menos una cámara de residuos para atrapar o capturar todos los líquidos una vez que hayan sido utilizados en el ensayo. En los casos preferidos, hay más de una cámara de residuos, por lo menos uno de los cuales es para ser utilizado con un conjunto de calibración descrito en la presente memoria a continuación. Cámaras de desechos de cartón también permiten que el dispositivo sea fácilmente desechable. La cámara de residuos está preferentemente en comunicación fluídica con por lo menos un sitio de reacción.

Por lo menos uno de estos canales tendrán normalmente pequeñas dimensiones de la sección transversal. En algunos casos, las dimensiones son de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 5 mm, preferentemente de aproximadamente 0,03 mm a aproximadamente 3 mm, y más preferentemente de aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 2 mm. Los canales de fluidos en el dispositivo fluídico pueden ser creados por, por ejemplo sin

limitación, moldeo por inyección de precisión, grabado con láser, o cualquier otra técnica conocida en la técnica para llevar a cabo el propósito de la invención.

Para asegurarse de que una respuesta dada del ensayo (por ejemplo, un recuento de fotones) producido en un sitio de reacción se correlaciona con una concentración precisa de un analito de interés en una muestra, es preferentemente ventajoso calibrar el dispositivo fluídico antes de detectar la respuesta (por ejemplo, detección de fotones). La calibración de un dispositivo fluídico en el punto de fabricación, por ejemplo, puede ser insuficiente para asegurar una concentración precisa de analito se determina porque un dispositivo fluídico puede ser enviado antes de su utilización y puede experimentar cambios en la temperatura, por ejemplo, de manera que una calibración realizada en la fabricación no tenga efecto en los cambios posteriores en la estructura del dispositivo fluídico o de los reactivos contenidos en el mismo. En un caso preferido de la presente invención, un dispositivo fluídico tiene un conjunto de calibración que imita el conjunto analítico en los componentes y el diseño excepto que una muestra no se introduce en el conjunto de calibración. Haciendo referencia a las figuras 3 y 4, un conjunto de calibración ocupa aproximadamente la mitad del dispositivo fluídico 2 e incluye cámaras de reactivos 32, los sitios de reacciones 34, una cámara de residuos 36, y los canales de fluidos 38. Al igual que en el conjunto analítico, el número de cámaras de reactivos y los sitios de reacción puede variar dependiendo del ensayo que se ejecute en el dispositivo fluídico y el número de analitos que se están detectando.

Cuando se desee, se puede proporcionar un detector para la evaluación de la fiabilidad de un ensayo para un analito en un fluido corporal con la utilización del dispositivo fluídico del asunto junto con el dispositivo fluídico, el lector y/o dentro del envase del sistema del asunto. El detector es capaz de detectar un cambio en los parámetros de operación bajo los que funciona normalmente el sistema del asunto. Los parámetros de funcionamiento incluyen, pero no se limitan a la temperatura, la humedad y la presión, lo que puede afectar al rendimiento del presente sistema.

Un dispositivo fluídico y el conjunto lector pueden, después de la fabricación, ser enviados al usuario final, juntos o individualmente. A medida que un conjunto lector se utiliza repetidamente con varios dispositivos fluídicos, puede ser necesario tener detectores tanto en el dispositivo fluídico como en el conjunto lector para detectar dichos cambios durante el envío, por ejemplo. Durante el envío los cambios de presión o de temperatura pueden afectar al rendimiento de numerosos componentes del presente sistema, y como tal un detector situado ya sea en el dispositivo fluídico o en el conjunto lector puede transmitir estos cambios, por ejemplo, al dispositivo externo, de modo que se pueden realizar ajustes durante la calibración o durante el tratamiento de datos en el dispositivo externo. Por ejemplo, si la presión o la temperatura de un dispositivo fluídico alcanzó un determinado nivel durante el envío, un detector situado en el dispositivo fluídico podría detectar que este cambio se había producido y transmitir esta información al conjunto lector cuando el usuario lo inserta en el conjunto lector. Puede haber un dispositivo de detección adicional en el conjunto lector para llevar a cabo esto, o dicho dispositivo puede incorporarse en otro componente del sistema. En algunos casos, esta información puede transmitirse de forma inalámbrica ya sea al conjunto lector o al dispositivo externo. Del mismo modo, un detector en el conjunto lector puede detectar cambios similares. En algunos casos, puede ser deseable tener un detector también en el envase de envío, así, ya sea en lugar de en los componentes del sistema o además de ello.

La fabricación de los canales de fluido puede llevarse a cabo generalmente por alguna de las numerosas técnicas de microfabricación que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se emplean opcionalmente técnicas litográficas en la fabricación, por ejemplo, de sustratos de vidrio, cuarzo o silicio, utilizando procedimientos bien conocidos en las industrias de fabricación de semiconductores tales como grabado fotolitográfico, grabado con plasma o grabado químico húmedo. Alternativamente, se emplean opcionalmente procedimientos de micromecanizado, tales como perforación por láser, microfresadora y similares. Del mismo modo, para sustratos poliméricos, también se pueden utilizar técnicas de fabricación bien conocidas. Estas técnicas incluyen procedimientos de moldeo por inyección o de moldeo por sello donde una pluralidad de sustratos se producen opcionalmente utilizando, por ejemplo, sellos rodantes para producir hojas grandes de sustratos de microescala o técnicas de microfundición de polímero donde el sustrato se polimeriza dentro de un molde micromecanizado.

En algunos casos, por lo menos una de las diferentes capas del dispositivo fluídico puede construirse de sustratos poliméricos. Ejemplos no restrictivos de materiales poliméricos incluyen poliestireno, policarbonato, polipropileno, polidimetilsiloxanos (PDMS), poliuretano, cloruro de polivinilo (PVC) y polisulfona.

El dispositivo fluídico puede fabricarse por estampación, adhesión térmica, adhesivos o, en el caso de determinados sustratos, por ejemplo, de vidrio, o sustratos poliméricos semirrígidos y no rígidos, una adherencia natural entre los dos componentes. En algunos casos, el dispositivo fluídico se fabrica por soldadura por ultrasonidos o acústica.

La figura 2 muestra un caso de la invención en la que el dispositivo fluídico 2 se compone de 7 capas. Las características mostradas se cortan, por ejemplo, en el sustrato polimérico, de modo que cuando las capas están colocadas correctamente cuando el conjunto forme una red de fluido. En algunos casos más o menos capas pueden utilizarse para construir un dispositivo fluídico para llevar a cabo el propósito de la invención.

Uno de los objetivos de la presente invención es evitar que el fluido dentro de un dispositivo fluídico entre en

contacto con los componentes de un conjunto lector que puede necesitar permanecer seco y o no contaminada, y también para evitar la contaminación a un dispositivo de detección dentro del conjunto lector. Una fuga en el dispositivo fluídico podría producir líquidos, por ejemplo, reactivos o residuos, que escapan del dispositivo fluídico y que contaminan el lector. En otros casos, un material de absorción de líquido, tales como los materiales poliméricos que se encuentran en los pañales, podría colocarse dentro de una parte del canal de fluido o la cámara de residuos para absorber el líquido residual. Un ejemplo no restrictivo de un polímero de este tipo es el poliacrilato de sodio. Dichos polímeros pueden absorber cientos de veces su peso de fluidos. Por lo tanto, sólo pequeñas cantidades de tales materiales poliméricos pueden ser necesarios para lograr el objetivo de absorber los líquidos fugados. En algunos casos, una cámara de residuos está llena de un material superabsorbente. En algunos casos el líquido fugado puede convertirse en un gel u otra forma sólida o semisólida.

Otro objetivo del presente sistema es proporcionar un dispositivo fluídico que puede ejecutar una variedad de ensayos en un dispositivo fluídico. Un protocolo dependiente de la identidad del dispositivo fluídico puede transferirse desde un dispositivo externo, en donde se puede almacenar a un conjunto lector para permitir que el conjunto lector lleve a cabo el protocolo específico en el dispositivo fluídico. En los casos preferidos, el dispositivo fluídico tiene un identificador (ID) que es detectado o leído por un detector del identificador descrito en la presente memoria. El identificador puede comunicarse a continuación con un conjunto de comunicación, donde puede entonces transferirse o transmitirse a un dispositivo externo.

En algunos casos, el identificador puede ser un identificador de código de barras con una serie de líneas negras y blancas, que pueden ser leídas por un detector de identificador tal como un lector de código de barras, que son bien conocidos. Otros identificadores podrían ser una serie de valores alfanuméricos, colores, protuberancias o cualquier otro identificador que puede estar situado en un dispositivo fluídico y ser detectado o leído por un detector de identificador. En algunos casos, el identificador puede comprender un dispositivo de almacenamiento o memoria y puede transmitir información a un detector de identificación. En algunos casos se pueden utilizar ambas técnicas.

Una vez que se proporciona una muestra de fluido corporal a un dispositivo fluídico, éste se inserta en un conjunto lector. En algunos casos, el dispositivo fluídico está en parte insertado manualmente, y a continuación un interruptor mecánico en el conjunto lector automáticamente coloca correctamente el dispositivo fluídico en el interior del conjunto lector. Puede utilizarse también cualquier otro mecanismo conocido en la técnica para la inserción de un disco o cartucho en un dispositivo. En algunos casos puede requerirse sólo inserción manual.

En algunos casos el conjunto lector comprende un detector de identificador para la detección o la lectura de un identificador en el dispositivo fluídico, un controlador para controlar automáticamente el conjunto de detección y también componentes mecánicos del conjunto lector, por ejemplo, bombas y/o válvulas para controlar o dirigir fluidos a través del dispositivo fluídico, un dispositivo de detección para detectar una señal creada por un ensayo realizado en el dispositivo fluídico, y un conjunto para la comunicación con un dispositivo externo.

Un detector del identificador detecta un identificador en el dispositivo fluídico que se comunica con un conjunto de comunicación. En algunos casos, el detector del identificador puede ser un dispositivo similar a un escáner de código de barras, que lee un código de barras en un dispositivo fluídico. El detector del identificador también puede ser un LED que emite luz que puede interactuar con un identificador que refleja la luz y es medida por el detector del identificador para determinar la identidad de un dispositivo fluídico.

En los casos preferidos, el conjunto lector alberga un controlador que controla una bomba y una serie de válvulas para controlar y dirigir el caudal de líquido dentro del dispositivo fluídico. En algunos casos el conjunto del lector puede comprender varias bombas. La muestra y los reactivos son impulsados preferentemente a través de los canales fluidos por una fuerza de vacío creado por la apertura y cierre sucesivos de por lo menos una válvula, a la vez que activa una bomba dentro del conjunto lector. Los procedimientos de utilización de al menos una válvula y al menos una bomba para crear una fuerza de vacío son bien conocidos. Si bien se puede utilizar una fuerza de presión negativa, también puede generarse una fuerza de presión positiva por al menos una bomba y la válvula según la presente invención. En otros casos el movimiento del fluido en el dispositivo fluídico puede ser por la acción electroosmótica, capilar, piezoeléctrica o microaccionadora.

Las figuras 8 y 9 ilustran una secuencia ilustrativa para iniciar la circulación de un reactivo dentro del dispositivo fluídico. Una placa de accionamiento 18 en el conjunto lector comprende una aguja sin núcleo o pasador 20, que cuando baja flexiona la tapa superior 16, ya que está hecho preferentemente de material elastómero fuerte, flexible. Sin embargo, la lámina fácilmente rompible 12, se rompe a continuación debido a la tensión inducida por la flexión de la cubierta superior 16. Las válvulas situadas aguas abajo de la cámara de reactivos perforan diferentes áreas de la lámina en el dispositivo fluídico y después pueden trabajar en tándem con una bomba dentro del conjunto lector para crear una fuerza de vacío que impulse el reactivo fuera de la cámara de reactivo 6 en un canal fluido y a continuación dirigir el caudal del reactivo a un sitio de reacción. Al menos una válvula está preferentemente conectada fluidamente a una bomba alojada dentro del conjunto lector. La aguja sin núcleo o alfiler 20 se retira del dispositivo fluídico cuando el dispositivo se retira del conjunto lector. Una de las ventajas de este caso es que no se requiere ninguna bomba en un chip, que, por lo menos, disminuye el tamaño y el costo del dispositivo fluídico, y permite que el dispositivo sea desechable.

Un conjunto de reacción contiene preferentemente un conjunto de detección para detectar una señal producida por al menos un ensayo en el dispositivo fluídico. La figura 1 ilustra una posición ilustrativa de un dispositivo de detección de la presente invención en relación con el dispositivo fluídico que está por debajo del dispositivo fluídico. El conjunto de detección puede estar por encima del dispositivo fluídico o en una orientación diferente en relación con el dispositivo fluídico basado, por ejemplo, en el tipo de ensayo que se lleva a cabo y el mecanismo de detección que se emplea.

En los casos preferidos, se utiliza como dispositivo de detección un detector óptico. Los ejemplos no restrictivos incluyen un fotodiodo, tubo fotomultiplicador (PMT), detector de recuento de fotones, o dispositivo de carga acoplada (CCD). En algunas formas de realización se puede usar un diodo PIN. En algunos casos un diodo PIN puede acoplarse a un amplificador para crear un dispositivo de detección con una sensibilidad comparable a un PMT. Algunos ensayos pueden generar luminiscencia como se describe en la presente memoria. En algunos casos se detecta quimioluminiscencia. En algunos casos un conjunto de detección podría incluir una pluralidad de cables de fibra óptica conectados como un haz a un detector de CCD o a una matriz de PMT. El haz de fibra óptica podría estar construido de fibras discretas o de muchas pequeñas fibras fusionadas entre sí para formar un haz sólido. Dichos haces sólidos se pueden adquirir en el mercado y fácilmente interactuados con detectores CCD.

En algunos casos, el sistema de detección puede comprender detectores o sensores no ópticos para detectar un parámetro en particular de un paciente. Dichos detectores pueden incluir temperatura, conductividad, potenciométrico y amperométrico, para los compuestos que se oxidan o se reducen, por ejemplo, O_2, H_2O_2, y I_2 , o compuestos orgánicos oxidables/reducibles.

Un conjunto de comunicación está alojado preferentemente dentro del conjunto lector y es capaz de transmitir y recibir información de manera inalámbrica desde un dispositivo externo. Dicha comunicación inalámbrica puede ser tecnología bluetooth o RTM. Pueden utilizarse varios procedimientos de comunicación, tales como una conexión de acceso telefónico por cable con un módem, un enlace directo, tal como un T1, ISDN, o línea de cable. En los casos preferidos se establece una conexión inalámbrica mediante redes inalámbricas ilustrativas tales como redes celulares, satélite o de localizador, GPRS, o un sistema local de transporte de datos tal como Ethernet o Token Ring en una red de área local. En algunos casos, la información está encriptada antes de ser transmitida a través de una red inalámbrica. En algunos casos, el conjunto de comunicación puede contener un componente de comunicación inalámbrica por infrarrojos para enviar y recibir información.

En algunos casos, el conjunto de comunicación puede tener una memoria o dispositivo de almacenamiento, por ejemplo RAM localizada, en la que la información recogida se puede almacenar. Puede ser necesario un dispositivo de almacenamiento si la información no se puede transmitir en un momento dado debido a, por ejemplo, una incapacidad temporal para conectarse de forma inalámbrica a una red. La información puede estar asociada al identificador de dispositivo fluídico en el dispositivo de almacenamiento. En algunos casos, el conjunto de comunicación puede reintentar el envío de la información almacenada después de un cierto tiempo. En algunos casos, el dispositivo de memoria puede almacenar la información durante un período de diez días antes de que se borre.

En los casos preferidos un dispositivo externo se comunica con el conjunto de comunicación dentro del conjunto lector. Un dispositivo externo puede comunicarse de forma inalámbrica con un conjunto lector, pero también puede comunicarse con un tercer paciente, incluyendo sin limitación a un paciente, personal médico, médicos, personal de laboratorio, u otros en el sector de la atención sanitaria.

En algunos casos, el dispositivo externo puede ser un sistema de ordenador, servidor, u otro dispositivo electrónico capaz de almacenar información o procesar la información. En algunos casos, el dispositivo externo incluye uno o más sistemas informáticos, servidores u otros dispositivos electrónicos capaces de almacenar la información o procesar la información. En algunos casos un dispositivo externo puede incluir una base de datos de información del asunto, por ejemplo, pero no limitada a, registros médicos o antecedentes del asunto, registros de ensayos clínicos, o registros de ensayos preclínicos. En los casos preferidos, un dispositivo externo almacena los protocolos que se ejecutan en un dispositivo fluídico que pueden transmitirse al conjunto de comunicación de un conjunto lector cuando ha recibido un identificador que indica qué dispositivo fluídico ha sido insertado en el conjunto lector. En algunos casos un protocolo puede ser dependiente de un identificador de dispositivo fluídico. En algunos casos, el dispositivo externo almacena más de un protocolo para cada dispositivo fluídico. En otros casos, la información del asunto en el dispositivo externo incluye más de un protocolo. En los casos preferidos, el servidor externo almacena algoritmos matemáticos para procesar un recuento de fotones enviados desde un conjunto de comunicación y en algunos casos para calcular la concentración de analito en una muestra de fluido corporal.

En algunos casos, el dispositivo externo puede incluir uno o más servidores como son conocidos en la técnica y que se pueden adquirir en el mercado. Dichos servidores pueden proporcionar equilibrio de carga, gestión de tareas, y la capacidad de copia de seguridad en caso de fallo de uno o más servidores u otros componentes del dispositivo externo, para mejorar la disponibilidad del servidor. Un servidor también puede ser construido en una red distribuida de almacenamiento y unidades de procesador, como es conocido en la técnica, en el que el tratamiento de datos

según la presente invención reside en terminales, tales como ordenadores, eliminando de este modo la necesidad de un servidor.

Un servidor puede incluir una base de datos y procesos del sistema. Una base de datos puede residir en el servidor, o puede residir en otro sistema servidor que es accesible al servidor. Ya que la información en una base de datos puede contener información sensible, puede construirse un sistema de seguridad que impide que usuarios no autorizados tengan acceso a la base de datos.

Una de las ventajas de la presente invención es que la información puede transmitirse desde el dispositivo externo de nuevo a no sólo el conjunto lector, sino a otras partes u otros dispositivos externos, por ejemplo sin limitación, una PDA o un teléfono móvil. Dicha comunicación se puede conseguir mediante una red inalámbrica, como se da a conocer en la presente memoria. En algunos casos, una concentración de analito calculada u otra información de objeto se pueden enviar a, por ejemplo, pero sin limitarse a, personal médico o a paciente.

Procedimientos de utilización

El aparato y los sistemas objeto proporcionan un medio eficaz para la detección en tiempo real de analitos indicadores de una infección vírica de la gripe presente en un fluido corporal de un paciente.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento para detectar un analito indicador de una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal. El analito puede ser indicador de una infección vírica de la gripe tipo A, tipo B o tipo C. El analito comprende por lo menos una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe. Las glucoproteínas de superficie ejemplificativas son, de manera no limitativa, una glucoproteína y una neuraminidasa. Las proteínas de superficie hemaglutinina incluyen H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, 10H, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las proteínas de la superficie neuraminidasa incluyen N1, N2, N3, N4 y N5. El analito puede asimismo comprender un anticuerpo para una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento para detectar una pluralidad de analitos, por lo menos dos de los cuales indican una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicadores de una infección vírica de la gripe tipo A, tipo B o tipo C. Los analitos pueden comprender una pluralidad de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En la invención, la pluralidad de glucoproteínas de superficie comprende una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina es seleccionada de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16, y la neuraminidasa es seleccionada de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En la invención, el procedimiento detecta tanto la hemaglutinina H5 como la neuraminidasa N1. En un caso, el procedimiento proporciona la detección de H5 y N1 en la(s) misma(s) partícula(s) vírica (s) (véase la figura 15).

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para detectar una pluralidad de analitos incorporados en una sola entidad tal como una partícula vírica o célula o fragmento celular. En este aspecto, la pluralidad de analitos son preferentemente una combinación o complejo de analitos, al menos, dos de los cuales son indicadores de una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicadores de una infección vírica de la gripe tipo A, tipo B o tipo C. Una pluralidad de analitos puede comprender una combinación o complejo de glucoproteínas de la superficie de un virus de la gripe. En algunos casos, la pluralidad de analitos puede ser una combinación de glucoproteínas de la superficie que comprende una combinación de una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, 10H, H11, H12, H13, H14, H15 y H16, y la neuraminidasa puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de N1, N2, N3, N4 y N5. En los casos preferidos, la combinación de analitos se asocia a una cepa virulenta de la gripe, tal como la combinación H5N1. Este aspecto de la invención es específico para detectar la combinación de una pluralidad de analitos. Se puede distinguir entre la infección con una cepa virulenta tal como una combinación de H5N1 y una supuesta infección con una combinación diferente de analitos.

En algunos casos el procedimiento detecta una pluralidad de anticuerpos humanos para los antígenos víricos tales como los anticuerpos para las glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe.

En algunos casos el analito de interés puede ser un complejo de un analito indicativo de una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal y un anticuerpo humano para el analito. El analito puede ser cualquier analito indicativo de una infección vírica de la gripe descrito en la presente memoria, pero es preferentemente la hemaglutinina H5, la neuraminidasa N1 o el complejo H5N1 de las glucoproteínas de superficie H5 y N1.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para detectar una pluralidad de analitos, en el que por lo menos un analito es indicativo de una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal, y en el que por lo menos un analito es un biomarcador en la muestra de fluido corporal indicativo del estrés impuesto sobre el cuerpo humano por la infección vírica o un indicador de la respuesta corporal a la infección. Dicho por lo menos un analito indicativo de una infección vírica de la gripe puede ser cualquier analito indicativo de una infección vírica de la gripe descrito en la presente memoria. Los biomarcadores ejemplificativos indicativos del estrés impuesto sobre el cuerpo humano por la infección vírica incluyen, de manera no limitativa, CRP, TNFα, interleucinas y similares. Los

biomarcadores ejemplificativos indicativos de la reacción defensiva del cuerpo al virus incluyen anticuerpos para el virus, particularmente del isotipo IgM.

El aparato y los sistemas del asunto tienen un espectro de utilidad en, por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedades y la detección de enfermedades.

Por lo tanto, en un caso, la divulgación proporciona un procedimiento para detectar un analito indicador de una infección vírica de la gripe en un fluido corporal de un paciente que comprende proporcionar un dispositivo fluídico que comprende por lo menos una unidad de toma de muestras, un conjunto de inmunoanálisis que contiene reactivos de inmunoanálisis, una pluralidad de canales en comunicación fluídica con dicha unidad de toma de muestras y/o dicho conjunto de inmunoanálisis; actuando dicho dispositivo fluídico y dirigiendo dichos reactivos de inmunoanálisis dentro de dicho dispositivo fluídico; permitiendo a una muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene dicho analito reaccionar con dicho reactivos de inmunoanálisis contenidos dentro de dicho conjunto de inmunoanálisis de ensayo para producir una señal detectable indicadora de la presencia de dicho analito en dicho fluido corporal; y detectar dicha señal detectable generada a partir de dicho analito recogido inicialmente en dicha muestra de fluido corporal. Preferentemente, se utiliza una muestra de fluido corporal de menos de aproximadamente 500 µl para una o más de estas aplicaciones.

Como se usa en la presente memoria, los términos "persona" y "paciente", se emplean indistintamente, que se refieren a un animal, preferentemente una especie aviar (aves) o de mamífero (por ejemplo, ser humano). El término aviar, como se emplea en la presente memoria incluye las aves de corral. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, simios, seres humanos, animales de granja, animales para deporte, y animales de compañía.

Como se emplea en la presente memoria, en algunos aspectos los términos "reactivos" y "reactantes" se utilizan indistintamente.

En algunos casos, una muestra de fluido corporal se puede proporcionar en primer lugar al dispositivo fluídico por cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria. El dispositivo fluídico a continuación se puede insertar en el conjunto lector. Un detector de identificación alojado dentro del conjunto lector puede detectar un identificador del dispositivo fluídico y comunicar el identificador de un conjunto de comunicación, que se aloja preferentemente dentro del conjunto lector. El conjunto de comunicación a continuación transmite el identificador a un dispositivo externo que transmite un protocolo a ejecutar en el dispositivo fluídico basado en el identificador para el conjunto de comunicación. Un controlador preferentemente alojado dentro del conjunto lector controla elementos de accionamiento, incluyendo por lo menos una bomba y una válvula que interactúan con el dispositivo fluídico para controlar y dirigir el movimiento de fluidos dentro del dispositivo. En algunos casos, el primer paso del ensayo es un ciclo de lavado, donde todas las superficies dentro del dispositivo fluídico se humedecen utilizando un tampón de lavado. El dispositivo fluídico se calibra a continuación, utilizando un conjunto de calibración utilizando los mismos reactivos que se utilizarán en el ensayo a través de los sitios de reacción de calibración, y a continuación una señal de luminiscencia procedente de los sitios de reacciones es detectada por los medios de detección, y la señal se utiliza en la calibración del dispositivo fluídico. La muestra que contiene el analito se introduce en el canal de fluido. La muestra puede ser diluida y se separa aún más en el plasma u otro componente deseado en un filtro. La muestra separada ahora circula a través de los sitios de reacción y los analitos presentes en la misma se unirá a los reactantes unidos en la misma. El plasma de fluido de la muestra se descarga a continuación de los pocillos de reacción en una cámara de residuos. Dependiendo del ensayo que se ejecute, los reactivos apropiados se dirigen a través de los sitios de reacción para llevar a cabo el ensayo. Todos los tampones de lavado y otros reactivos utilizados en las diferentes etapas, incluyendo la etapa de calibración, se recogen en tanques de lavado. La señal producida en los sitios de reacción se detecta a continuación, por cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria.

Una variedad de ensayos puede llevarse a cabo en un dispositivo fluídico según la presente invención para detectar un analito de interés en una muestra. Una amplia diversidad de marcadores está disponible en la técnica que puede emplearse para la realización de los presentes análisis. En algunos casos los marcadores son detectables por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores de ácido nucleico útiles incluyen 32P, 35S, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas, biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Una amplia variedad de marcadores adecuados para el marcaje de los componentes biológicos son conocidos y se publicaron extensamente tanto en la bibliografía científica como de patentes, y son generalmente aplicables a la presente invención para el marcaje de los componentes biológicos. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores colorimétricos o partículas magnéticas. Los agentes de marcaje incluyen opcionalmente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, proteínas u otros polímeros tales como matrices de afinidad, carbohidratos o lípidos. La detección procede por cualquiera de los varios procedimientos conocidos, incluyendo el seguimiento espectrofotométrico u óptico de marcadores radiactivos o fluorescentes, u otros procedimientos que siguen el rastro de una molécula basándose en el tamaño, carga o afinidad. Un resto detectable puede ser de cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichos marcadores detectables han sido bien desarrollados en el campo de la electroforesis en gel, cromatografía

en columna, sustratos sólidos, técnicas espectroscópicas, y similares, y, en general, los marcadores útiles en dichos procedimientos pueden aplicarse a la presente invención. Por lo tanto, un marcador incluye sin limitación cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, térmicos o químicos.

En algunos casos el marcador está acoplado directa o indirectamente a una molécula para ser detectado como un producto, sustrato o enzima, según procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se indicó anteriormente, se utilizan una gran variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación del compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible, y las provisiones de eliminación. Los marcadores no radiactivos a menudo se unen por medios indirectos. En general, una molécula de ligando está unida por enlace covalente a un polímero. El ligando se une a continuación a una molécula anti-ligando que es intrínsecamente detectable o está unida por enlace covalente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Se pueden utilizar numerosos ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un antiligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina, y cortisol, puede utilizarse junto con antiligandos marcados. Alternativamente, cualquier compuesto hapténico o antigénico se puede utilizar en combinación con un anticuerpo.

En algunos casos, el marcador también se puede conjugar directamente a compuestos generadores de señal, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glucosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo y umbeliferona. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalazinadionas, tales como el luminol y los dioxetanos.

Los procedimientos de detección de marcadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, donde el marcador es un marcador radiactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, puede ser detectado excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante, por ejemplo, por microscopia, inspección visual, mediante película fotográfica, por la utilización de detectores electrónicos tales como cámaras digitales, dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y fototubos, u otro dispositivo de detección. Del mismo modo, los marcadores enzimáticos se detectan proporcionando sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Por último, los marcadores colorimétricos simples se detectan a menudo simplemente por observación del color asociado al marcador. Por ejemplo, el oro conjugado aparece a menudo rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

En algunos casos, la señal detectable puede ser proporcionada por las fuentes de luminiscencia."Luminiscencia" es el término comúnmente utilizado para referirse a la emisión de luz procedente de una sustancia por cualquier motivo que no sea un aumento de su temperatura. En general, los átomos o moléculas emiten fotones de energía electromagnética (por ejemplo, luz) cuando se trasladan de un "estado excitado" a un estado de menor energía (por lo general el estado fundamental). Hay muchas causas de la excitación. Si causa de la excitación es un fotón, el proceso de luminiscencia se conoce como "fotoluminiscencia". Si la causa de la excitación es un electrón, el proceso de luminiscencia se conoce como "electroluminiscencia". Más específicamente, la electroluminiscencia proviene de la inyección directa y la eliminación de electrones para formar un par de huecos de electrones, y posterior recombinación del par de huecos de electrones para emitir un fotón. La luminiscencia que proviene de una reacción química normalmente se conoce como "quimioluminiscencia". La luminiscencia producida por un organismo vivo normalmente se conoce como "bioluminiscencia". Si la fotoluminiscencia es el resultado de una transición de spin prohibido (por ejemplo, una transición triplete-singlete), el proceso de fotoluminiscencia se conoce generalmente como "fosforescencia". Por lo general, las emisiones de fosforescencia persisten mucho después de que la causa excitante se elimina como resultado de estados excitados de larga vida que pueden relajar solamente a través de dichas transiciones de spin-permitidos. Si la fotoluminiscencia es el resultado de una transición de spin prohibida (por ejemplo, una transición triplete-singlete), el proceso de fotoluminiscencia se refiere generalmente como "fosforescencia". Por lo general, las emisiones de fosforescencia persisten mucho después de que la causa excitante se elimina como resultado de estados excitados de larga duración que puede relajarse solamente a través de tales transiciones spin prohibidas. Un "marcador luminiscente" puede tener cualquiera de las propiedades descritas anteriormente.

Fuentes quimioluminiscentes adecuados incluyen un compuesto que llega a estar electrónicamente excitado por una reacción química y puede entonces emitir luz que sirve como la señal detectable, o dona energía a un receptor fluorescente. Se han encontrado un diverso número de familias de compuestos que proporcionan quimioluminiscencia en una variedad o las condiciones. Una familia de compuestos es 2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona. Un compuesto usado con frecuencia es el luminol, que es un compuesto de 5-amino. Otros miembros de la familia incluyen el 5-amino-6,7,8-trimetoxi- y el análogo de dimetilamino[ca]benzo. Estos compuestos se pueden preparar para producir luminiscencia con peróxido de hidrógeno alcalino o hipoclorito de calcio y una base. Otra familia de compuestos es la de los 2,4,5-trifenilimidazoles, con lofina como denominación común para el producto original. Análogos quimioluminiscentes incluyen sustituyentes para-dimetilamino y -metoxi. La quimioluminiscencia se puede

obtener también con oxalatos, por lo general ésteres activos de oxalilo, por ejemplo, p-nitrofenilo y un peróxido tal como peróxido de hidrógeno, en condiciones básicas. Otros compuestos quimioluminiscentes útiles que también son conocidos incluyen ésteres de N-alquilacridinio y dioxetanos. Alternativamente, se pueden utilizar luciferinas junto con luciferasa o lucigeninas para proporcionar bioluminiscencia.

En algunos casos los inmunoanálisis se ejecutan en el dispositivo fluídico. Mientras que los ensayos de unión competitivos, que son bien conocidos en la técnica, se pueden ejecutar en algunos casos, en determinados casos se utiliza un procedimiento en dos etapas lo que elimina la necesidad de mezclar un conjugado y una muestra antes de exponer la mezcla a un anticuerpo, lo que puede ser deseable cuando se utilizan volúmenes muy pequeños de muestra y el conjugado, como en el dispositivo fluídico de la presente invención. Un ensayo en dos etapas tiene ventajas adicionales sobre los ensayos de unión competitiva cuando se utiliza con un dispositivo fluídico como se describe en la presente memoria. Combina la facilidad de utilización y alta sensibilidad de un inmunoanálisis en sándwich (unión competitiva) con capacidad de pequeñas moléculas de ensayo.

En un ensayo ejemplificativo en dos etapas mostrado en la Figura 10, la muestra que contiene el analito ("Ag") circula en primer lugar a través de un sitio de reacción que contiene anticuerpos ("Ab"). Los anticuerpos se unen al analito presente en la muestra. Una vez que la muestra pasa sobre la superficie, se pasa una solución con el analito conjugado a un marcador ("Ag marcado") a una alta concentración sobre la superficie. El conjugado satura cualquiera de los anticuerpos que aún no se han unido al analito. Antes de que se alcance el equilibrio y se produzca cualquier desplazamiento de analito no marcado unido previamente, se lava la solución de conjugado de alta concentración. La cantidad de conjugado unido a la superficie se mide a continuación mediante la técnica apropiada, y el conjugado detectado es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Una técnica de medición ejemplificativa para un ensayo de dos etapas es un inmunoanálisis con enzima de quimioluminiscencia como se muestra en Figura 11. Como es conocido en el campo, el marcador puede ser un marcador que se puede adquirir en el mercado, tal como dioxitano-fosfato, que no es luminiscente, pero se hace luminiscente después de la hidrólisis, por ejemplo, mediante fosfatasa alcalina. Una enzima tal como fosfatasa alcalina se pasa también sobre el sustrato para hacer que el marcador dé luminiscencia. En algunos casos, la solución de sustrato se complementa con agentes potenciadores, tales como, sin limitación, fluoresceína en micelas mixtas, polímeros solubles, o de PVC que crean una señal mucho más brillante que el luminóforo solo. Por otra parte, se emplea un conjugado de fosfatasa alcalina con un número de recambio superior a la utilizada en el ensayo comercial. Esto permite que la generación de señales proceda mucho más rápidamente y se consigue una señal global mayor. El aumento de la sensibilidad del inmunoanálisis enzimático quimioluminiscente en dos etapas (TOSCA) se ilustra en la figura 12. La figura 12 demuestra que para analitos en la concentración picomolar, TOSCA es capaz de proporcionar una señal más robusta (mayor sensibilidad) que un ensayo de unión competitiva. La utilización de un ensayo de unión en dos etapas contribuye por lo tanto a capacidades de sensibilidad mayores de la presente invención.

Además, TOSCA es menos sensible a los efectos de matriz que otras metodologías. Esto permite trabajar con muestras que no han sido ampliamente pretratadas utilizando técnicas normales de laboratorio, tales como, por ejemplo, extracción en fase sólida y cromatografía. En la figura 13 se ilustra la capacidad de TOSCA para ensayar menos que las muestras ideales y mantener la sensibilidad deseada. En comparación con el ensayo de unión competitiva, para todos los preparados de la muestra (y diluciones), TOSCA tiene mejor sensibilidad que la unión competitiva.

Un inmunoanálisis útil que se puede ejecutar en el dispositivo fluídico es ELISA (ensayo inmunosorbente con enzima ligada). La realización de un ELISA implica generalmente al menos un anticuerpo capaz de unir un antígeno de interés (es decir, un analito que es indicador de la infección por virus de la gripe). Una muestra que contiene o se sospecha que contiene el antígeno de interés se inmoviliza sobre un soporte (por ejemplo, una placa de microvaloración, un pocillo u otro soporte que tiene una superficie para la inmovilización), ya sea de forma no específica (por ejemplo, por adsorción a la superficie) o específicamente (por ejemplo, por captura por otro anticuerpo específico para el mismo antígeno, en un "sándwich" ELISA). Una vez inmovilizado el antígeno se añade el anticuerpo de detección, formando un complejo con el antígeno. El anticuerpo de detección puede conjugarse con una enzima, o puede ser detectado por un anticuerpo secundario que a su vez está conjugado con una enzima. Tras la adición de un sustrato para la enzima conjugada, se genera una señal detectable que indica la presencia y/o cantidad de antígeno en la muestra. La elección de sustratos dependerá de la enzima conjugada. Los sustratos adecuados incluyen sustratos fluorógenos y cromógenos. Un experto en la técnica sería experto en cuanto a los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISA conocidos en la técnica.

La figura 14 ilustra un ELISA típico. Como se muestra, una superficie de captura en fase sólida puede incluir un primer anticuerpo unido al que se puede añadir plasma diluido (muestra). Los analitos si están presentes en la muestra se puede unir al primer anticuerpo y llegar a inmovilizarse. Se puede añadir un reactivo enzimático que incluye, por ejemplo, un anticuerpo acoplado o conjugado con una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina). Si la porción de anticuerpo del reactivo enzimático se puede unir el analito, a continuación, el reactivo de enzima también llega a inmovilizarse en la superficie de captura. La adición de un sustrato para la enzima puede dar lugar a un

producto que produce un efecto, por ejemplo, la luz que se puede medir y representar gráficamente como se muestra. De esta manera se puede medir la cantidad de analito presente en una muestra.

La figura 15 ilustra un ELISA ilustrativo para su utilización con el dispositivo fluídico de la invención. Como se muestra, una superficie de captura en fase sólida del dispositivo puede incluir un primer anticuerpo, "anticuerpo 1 en fase sólida", que es la superficie inmovilizada y específica para un antígeno de prueba (por ejemplo, un anticuerpo específico para la neuraminidasa en un virus). Si el antígeno de prueba está presente en una muestra de ensayo (por ejemplo, sangre) expuesta al anticuerpo 1 en fase sólida a continuación, el antígeno de prueba puede llegar a estar inmovilizado (capturado) en la superficie de captura. Posteriormente se proporciona un segundo anticuerpo que es específico para un segundo antígeno de prueba e incluye un compuesto conjugado detectable, mostrado como "anticuerpo 2 marcado con enzima" (por ejemplo, anticuerpo marcado con enzima específico para una hemaglutinina en un virus), que puede añadirse después de la muestra de prueba (por ejemplo, sangre). La unión y la posterior detección del segundo anticuerpo conjugado a la superficie de captura puede indicar la presencia del primer y segundo antígenos de prueba en la muestra de prueba. En la utilización, el primer y el segundo antígenos de prueba pueden incluir cualquiera de los tipos de neuraminidasa o hemaglutinina descritos en la presente memoria.

Aunque se utilizan diferentes primer y segundo antígenos (y anticuerpos) en el ejemplo ilustrado, se prevé que un solo tipo de antígeno de prueba puede detectarse utilizando dos formas del mismo anticuerpo (es decir, una forma inmovilizada en fase sólida para la captura de antígeno y un forma marcada con enzima para la detección).

El término “analitos” según la divulgación incluye de manera no limitativa fármacos, profármacos, agentes farmacéuticos, metabolitos de fármacos, biomarcadores tales como proteínas expresadas y marcadores celulares, anticuerpos, antígenos, virus, proteínas séricas, colesterol, polisacáridos, ácidos nucleicos, analitos biológicos, biomarcador, gen, proteína, u hormona, o cualquiera de sus combinaciones. A un nivel molecular, los analitos pueden ser glucoproteína polipeptídica, polisacárido, lípido, ácido nucleico, y una combinación de los mismos.

Son de interés los biomarcadores asociados a una enfermedad particular o a un estadio de enfermedad específico. Dichos analitos incluyen de manera no limitativa los asociados a las enfermedades autoinmunitarias.

Son asimismo de interés los analitos que resultan indicativos de un microorganismo. Los microorganismos ejemplificativos incluyen de manera no limitativa bacteria, virus, hongo y protozoos.

El analito puede resultar indicativo de una infección vírica por gripe de tipo A, tipo B, o tipo C. El analito puede comprender por lo menos una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe. Las glucoproteínas de superficie ejemplificativas son, de manera no limitativa, una hemaglutinina y una neuraminidasa. Las proteínas de superficie de hemaglutinina incluyen H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las proteínas de superficie de neuraminidasa incluyen N1, N2, N3, N4 y N5.

Un aspecto de la presente invención es un sistema para detectar una pluralidad de analitos, por lo menos dos de los cuales son indicadores de una infección vírica de la gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicadores de una infección por el virus de la gripe tipo A, tipo B o tipo C. Los analitos pueden comprender una pluralidad de glucoproteínas de la superficie de un virus de la gripe. En algunos casos la pluralidad de glucoproteínas de la superficie comprende una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16, y la neuraminidasa se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En los casos preferidos, la hemaglutinina es H5 y la neuraminidasa es N1. El sistema es capaz de detectar y/o cuantificar los analitos de especial interés.

Mediante la detección de la presencia de los antígenos víricos o anticuerpos para los antígenos, por ejemplo, el dispositivo fluídico puede detectar la presencia de un tipo de virus de la gripe en la muestra de fluido corporal del paciente.

Los analitos que pueden ser detectados por el procedimiento objeto incluyen asimismo patógenos de transmisión hemática seleccionados de entre un grupo no limitativo que consiste en *Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* (MSRA) resistente a la meticilina, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus hominis, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus capitis, Staphylococcus warneri, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influnzae, Staphylococcus simulans, Streptococcus pneumoniae* y *Candida albicans.*

Los analitos que pueden ser detectados mediante el procedimiento objeto comprenden asimismo una variedad de enfermedades de transmisión sexual seleccionadas de entre las siguientes: gonorrea (*Neisseria gorrhoeae*), sífilis (*Treponena pallidum*), clamidiosis (*Chlamydia trachomatis*), uretritis agonocócica (*Ureaplasm urealyticum*), infección por hongo levaduriforme (*Candida albicans*), chancro (*Haemophilus ducreyi*), tricomonosis (*Trichomonas vaginalis*), herpes genital (HSV tipo I & II), VIH I, VIH II y hepatitis A, B, C, G, así como la hepatitis causada por TTV.

Se concibe que en algunos casos la divulgación proporciona el seguimiento de una infección por un patógeno ya sea

directamente por detección del patógeno o indirectamente, por ejemplo, por detección de un analito asociado al patógeno (por ejemplo, un antígeno vírico) o incluso por detección de un anticuerpo para un componente o producto asociado a un patógeno (por ejemplo un anticuerpo contra un antígeno vírico). Se prevé además que puede detectarse indirectamente un patógeno mediante una respuesta inmunitaria al patógeno. La detección del patógeno puede realizarse en una muestra de prueba de un paciente que es asintomático o sintomático para el paciente. La detección del patógeno puede realizarse en una muestra de prueba de un paciente antes, durante o después de la infección con el patógeno. Como tal, se prevé que una infección en fase inicial (por ejemplo, en algunos casos una infección asintomática), o en alguna fase posterior de la infección puede controlarse para el patógeno de interés.

Puede ser detectada directa o indirectamente una gama amplia de concentraciones de patógenos en una muestra de un sujeto como se ha expuesto anteriormente utilizando la invención. La cantidad de patógenos presentes en una muestra de ensayo puede ser expresada en cualquiera de entre diversas maneras bien conocidas en la técnica. A título de ejemplos no limitativos, puede expresarse el número de patógenos como carga vírica (por ejemplo, cuando la infección es una infección vírica), unidades infecciosas (IU), y/o unidades infecciosas por millón de células o mililitro (IUPM). En un ejemplo, se concibe que pueden detectarse los patógenos en una muestra de ensayo a una concentración de 100 IU por ml de muestra hasta 1 x 10^9 IU por ml de muestra utilizando la invención. En otro ejemplo pueden detectarse los patógenos desde 100 IU por ml de muestra hasta 1.000 IU por ml de muestra utilizando la invención. Todavía en otro ejemplo pueden detectarse los patógenos desde 1.000 IU por ml de muestra hasta 1 x 10^6 IU por ml de muestra utilizando la invención.

En un caso diferente, la divulgación proporciona un procedimiento de seguimiento de más de un parámetro farmacológico útil para evaluar la eficacia y/o toxicidad de un agente terapéutico contra la gripe. El procedimiento comprende someter una muestra de fluido corporal de un paciente administrado con el agente terapéutico contra la gripe a un dispositivo fluídico para controlar dichos más de un parámetro farmacológico, comprendiendo dicho dispositivo fluídico por lo menos una unidad de toma de muestras y un conjunto analítico que comprende reactivos de la reacción; accionar dicho dispositivo fluídico y dirigir dichos reactivos para inmunoanálisis dentro de dicho dispositivo fluídico; permitir a dicha muestra de fluido corporal reaccionar con reactivos de inmunoanálisis para producir señales detectables indicadoras de los valores de más de un parámetro farmacológico de dicha muestra; y detectar dicha señal detectable generada en dicha muestra de fluido corporal. Cuando se desee, el procedimiento implica además repetir las etapas en un intervalo de tiempo provocadas por una señal inalámbrica comunicada al paciente.

Para los fines de esta divulgación, un "agente terapéutico" está destinado a incluir cualquier sustancia que tenga utilidad terapéutica y/o potencial. Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a compuestos biológicos o químicos tales como moléculas orgánicas o inorgánicas simples o complejas, péptidos, proteínas (por ejemplo, anticuerpos) o polinucleótidos (por ejemplo, complementarios). Una amplia gama de compuestos se puede sintetizar, por ejemplo, polímeros, tales como polipéptidos y polinucleótidos, y compuestos orgánicos sintéticos basados en diversas estructuras nucleares, y estos también están incluidos en la expresión "agente terapéutico". Además, varias fuentes naturales pueden proporcionar compuestos para identificación, tales como extractos de plantas o animales y similares. Se debe entender, aunque no se indique siempre explícitamente que el agente se utiliza solo o en combinación con otro agente, que tiene la misma o diferente actividad biológica que los agentes identificados por la pantalla de la invención. Los agentes y procedimientos también están destinados a combinarse con otras terapias.

Los parámetros farmacodinámicos (PD) según la presente invención incluyen, sin limitación parámetros físicos tales como la temperatura, la frecuencia cardíac/pulso, presión arterial y frecuencia respiratoria, y biomarcadores tales como proteínas, células, y marcadores celulares. Los biomarcadores pueden ser indicadores de la enfermedad o pueden ser el resultado de la acción de un fármaco. Los parámetros farmacocinéticos (PK) según la presente invención incluyen, sin limitación fármaco y la concentración de metabolitos en los fármacos. Es sumamente deseable para la seguridad apropiada y eficacia de los fármacos identificar y cuantificar los parámetros PK en tiempo real en un volumen de muestra. Si el fármaco y las concentraciones de metabolitos están fuera de un intervalo deseado y/o se generan metabolitos inesperados debido a una reacción inesperada al fármaco, puede ser necesaria acción inmediata para garantizar la seguridad del paciente. Del mismo modo, si alguno de los parámetros farmacodinámicos (PD) cae fuera del intervalo deseado durante un régimen de tratamiento, puede tener que tomarse también acción inmediata.

En los casos preferidos datos de parámetros físicos se almacenan o se comparan para almacenar perfiles de datos de parámetros físicos en un sistema bioinformático que puede estar en un dispositivo externo que incorpora datos farmacogenómicos y farmacocinéticos en sus modelos para la determinación de la toxicidad y la dosificación. Esto no sólo genera datos para ensayos clínicos años antes de los procesos actuales, sino que también permite la eliminación de las disparidades actuales entre eficacia aparente y toxicidad real de los fármacos mediante el seguimiento continuo en tiempo real. Durante el proceso de decisión ir/no ir en los estudios clínicos, los estudios comparativos de población a gran escala se pueden llevar a cabo con los datos almacenados en la base de datos. Esta recopilación de datos y seguimiento en tiempo real permite a más pacientes entrar en ensayos clínicos de forma segura antes de lo actualmente permitido. En otro caso los biomarcadores descubiertos en estudios de tejidos humanos pueden ser dirigidos por el dispositivo para una mayor precisión en la determinación de las rutas de los fármacos y la eficacia en estudios del cáncer.

En otro caso, la presente divulgación proporciona un procedimientos para detectar por lo menos dos analitos distintos indicadores de una infección vírica de la gripe de diferentes concentraciones en un líquido corporal de un paciente comprende proporcionar un dispositivo fluídico que comprende una unidad de toma de muestras, un conjunto analítico, y una pluralidad de canales en comunicación fluídica con dicha unidad de toma de muestras y/o dicho conjunto analítico; lo que permite que una muestra de fluido corporal reaccione con una pluralidad de reactivos contenidos en dicho conjunto analítico para producir señales indicadoras de las concentraciones de dichos al menos dos analitos; y la detección de dichas señales que son indicadoras de la presencia o ausencia de por lo menos dos analitos distintos, en el que dichas señales son detectables en un intervalo de 3 órdenes de magnitud.

Actualmente, hay necesidad de detectar más de un analito indicador de una infección vírica de gripe, donde los analitos están presentes en intervalos de concentración muy variables, por ejemplo, un analito está en la concentración del orden de pg/ml y otro está en la concentración del orden de ng/ml Quimioluminiscencia-ELISA tiene la capacidad de analizar simultáneamente analitos que están presentes en la misma muestra en un amplio intervalo de concentración. Otra ventaja para poder detectar concentraciones de diferentes analitos presentes en un amplio intervalo de concentración es la capacidad de relacionar las proporciones de la concentración de estos analitos con la seguridad y eficacia de múltiples fármacos que se administran a un paciente. Por ejemplo, las interacciones inesperadas fármaco-fármaco pueden ser una causa común de reacciones adversas a los medicamentos. Una técnica de medición simultánea, en tiempo real, para medir diferentes analitos ayudaría a evitar las consecuencias potencialmente desastrosas de las interacciones fármaco-fármaco adversas.

Ser capaz de supervisar el ritmo de cambio de una concentración de analito o PD o PK durante un período de tiempo en un solo paciente, o de realizar análisis de tendencias de la concentración, PD o PK, si son concentraciones de medicamentos o sus metabolitos, puede ayudar a evitar situaciones potencialmente peligrosas. Por ejemplo, si la glucosa fuera el analito de interés, la concentración de glucosa en una muestra en un momento dado, así como el ritmo de cambio de la concentración de glucosa durante un período dado podría ser muy útil para predecir y evitar, por ejemplo, episodios de hipoglucemia. Dicho análisis de tendencias tiene implicaciones beneficiosas generalizadas en el régimen de administración de fármacos. Cuando se trata de múltiples fármacos y sus metabolitos, la capacidad de detectar una tendencia y tomar medidas proactivas a menudo es deseable.

Así, la divulgación proporciona un procedimiento para realizar un análisis de tendencias de la concentración de un analito indicador de una infección vírica de la gripe en un paciente. El procedimiento comprende a) proporcionar un dispositivo fluídico que comprende por lo menos una unidad de toma de muestras, un conjunto de inmunoanálisis que contiene reactivos de inmunoanálisis, una pluralidad de canales en comunicación fluídica con dicha unidad de toma de muestras y/o dicho conjunto de inmunoanálisis; b) accionar dicho dispositivo fluídico y dirigir dichos reactivos de inmunoanálisis dentro de dicho dispositivo fluídico; c) permitir que una muestra de fluido corporal reaccione con dichos reactivos de inmunoanálisis contenidas dentro de dicho conjunto de ensayo de inmunoanálisis para producir una señal detectable indicadora de la presencia de dicho analito en dicha muestra; d) detectar dicha señal detectable generada a partir de dicho analito en dicha toma de muestra de fluido corporal; y e) repetir las etapas a) hasta d) para un único paciente durante un período de tiempo para detectar concentraciones de dicho analito, realizando de ese modo dicho análisis de tendencias.

En algunos casos está previsto un procedimiento para detectar un analito indicador de una infección vírica de la gripe en un fluido corporal de un paciente utilizando un ensayo transmitido desde un dispositivo externo. El procedimiento comprende proporcionar un dispositivo fluídico que comprende por lo menos una unidad de toma de muestras y un conjunto de inmunoanálisis que contiene reactivos de inmunoanálisis; detectar dicho dispositivo fluídico y transmitir de manera inalámbrica un protocolo de inmunoanálisis a dicho dispositivo; permitir que una muestra de fluido corporal reaccione con reactivos de inmunoanálisis para producir un señal detectable indicadora de la presencia de dicho analito utilizando dicho protocolo de inmunoanálisis transmitido; y detectar dicha señal detectable.

La comunicación entre un conjunto lector y un dispositivo de almacenamiento externo permite a un conjunto lector de la presente invención descargar un protocolo específico del dispositivo fluídico para ejecutar en el dispositivo fluídico basado en la identidad del dispositivo fluídico. Esto permite que un conjunto lector se utilice indistintamente con cualquier dispositivo fluídico apropiado descrito en la presente memoria. Además, el dispositivo externo puede almacenar una pluralidad de protocolos asociados a un dispositivo fluídico dado, y en función de, por ejemplo, un régimen o plan de tratamiento de un paciente, diferentes protocolos pueden ser comunicados desde el dispositivo externo al conjunto lector para ser ejecutados en el dispositivo fluídico para detectar una variedad de analitos indicadores de una infección vírica de la gripe. El dispositivo externo también puede almacenar una pluralidad de protocolos asociados no sólo con un dispositivo fluídico, sino también con un paciente o pacientes específicos, de tal manera que un protocolo puede estar asociado con un paciente así como con un dispositivo fluídico.

La presente invención permite la cuantificación automática de un parámetro farmacológico de un paciente, así como la comparación automática del parámetro con, por ejemplo, los registros médicos del paciente que pueden incluir un historial del parámetro controlado, o de los registros médicos de otro grupo de pacientes. El seguimiento del acoplamiento del analito en tiempo real con un dispositivo externo que puede almacenar los datos, así como realizar

cualquier tipo de procesamiento de datos o algoritmo, por ejemplo, proporciona un dispositivo que puede contribuir con la asistencia al paciente típica que puede incluir, por ejemplo, la comparación de los datos actuales del paciente con los últimos datos del paciente. Por consiguiente, la presente invención crea un procedimiento comercial que lleva a cabo eficazmente por lo menos parte del seguimiento de un paciente que actualmente realiza el personal médico.

Una de las ventajas significativas de la red prevista se ilustra en la Figura 20. Como toda la información se canaliza de forma segura a través de Internet, esto permite el intercambio simultáneo de la información con las distintas partes interesadas, al tiempo que satisface las necesidades clínicas, normativas y comerciales adecuadas.

En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento de transmisión de un parámetro farmacológico de un paciente a través de un dispositivo portátil comprende proporcionar un dispositivo fluídico que comprende por lo menos una unidad de toma de muestras y un conjunto analítico; lo que permite una muestra de fluido corporal reaccionar con los reactantes contenidos dentro de dicho conjunto analítico para producir una señal detectable indicadora de la presencia de dicho analito indicador de un virus de la gripe; detectar dicha señal detectable; transmitir dicha señal a un dispositivo externo; procesar dicha señal en dicho dispositivo externo y transmitir dicha señal procesada mediante un dispositivo portátil.

Una ventaja de la presente invención es que los resultados del ensayo pueden ser sustancialmente comunicados inmediatamente a alguna tercera paciente que puede beneficiarse de la obtención de los resultados. Por ejemplo, una vez que la concentración del analito se determina en el dispositivo externo, puede transmitirse a un paciente o al personal médico quien puede necesitar tomar más medidas. La etapa de comunicación a un tercero, se puede realizar sin cables tal como se describe en la presente memoria, y mediante la transmisión de los datos a un dispositivo portátil del tercer paciente, el tercer paciente puede ser informado de los resultados del ensayo prácticamente en cualquier momento y en cualquier lugar. Por lo tanto, en un escenario sensible al tiempo, un paciente puede ser contactado inmediatamente en cualquier lugar si puede ser necesaria una acción médica urgente.

En algunos casos un procedimiento de selección automática de un protocolo para ser ejecutado en un dispositivo fluídico comprende proporcionar un dispositivo fluídico que comprende un detector de identificador y un identificador; detectar dicho identificador con dicho detector de identificador; transferir dicho identificador a un dispositivo externo y seleccionar un protocolo para ser ejecutado en dicho dispositivo fluídico de una pluralidad de protocolos en dicho dispositivo externo asociado con dicho identificador.

Mediante la detección de cada dispositivo fluídico basado en un identificador asociado con el dispositivo fluídico una vez está insertado en el conjunto lector, el sistema de la presente invención permite descargar protocolos específicos del dispositivo fluídico desde un dispositivo externo y ejecutar en el dispositivo fluídico. En algunos casos, el dispositivo externo puede almacenar una pluralidad de protocolos asociados con el dispositivo fluídico o asociados con un paciente o grupo de pacientes determinados. Por ejemplo, cuando el identificador se transmite al dispositivo externo, el programa informático en el dispositivo externo puede obtener el identificador. Una vez obtenido, el programa informático en el dispositivo externo, tal como una base de datos, puede utilizar el identificador para identificar protocolos almacenados en la base de datos asociada al identificador. Si sólo un protocolo está asociado con el identificador, por ejemplo, la base de datos puede seleccionar el protocolo y el programa informático en el dispositivo externo pueden transmitir a continuación el protocolo al conjunto de comunicación en el conjunto lector. La capacidad de utilizar protocolos asociados específicamente con un dispositivo fluídico permite utilizar cualquier dispositivo fluídico apropiado con un único conjunto lector, y por lo tanto prácticamente cualquier analito de interés se puede detectar con un solo conjunto lector.

En algunos casos múltiples protocolos pueden estar asociados con un único identificador. Por ejemplo, si es beneficioso para detectar en el mismo paciente un analito una vez a la semana, y otro analito dos veces a la semana, los protocolos en el dispositivo externo asociado al identificador cada uno puede también estar asociado a un día diferente de la semana, de modo que cuando se detecta el identificador, el programa informático en el dispositivo externo puede seleccionar un protocolo específico que está asocia al día de la semana.

En algunos casos, un paciente puede estar provisto de una pluralidad de dispositivos fluídicos a utilizar para detectar una variedad de analitos. Un paciente puede, por ejemplo, utilizar diferentes dispositivos fluídicos en diferentes días de la semana. En algunos casos el programa informático en el dispositivo externo que asocia el identificador a un protocolo puede incluir un proceso para comparar el día de hoy con el día que el dispositivo fluídico se debe utilizar sobre la base de un ensayo clínico, por ejemplo. Si, por ejemplo, los dos días de la semana no son idénticos, el dispositivo externo puede enviar de forma inalámbrica notificación al paciente utilizando alguno de los procedimientos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica para notificarles que un dispositivo fluídico incorrecto está en el conjunto lector y además del dispositivo de fluido correcto para utilizar ese día. Este ejemplo es sólo ilustrativo y se puede extenderse fácilmente a, por ejemplo, notificar a un paciente que un dispositivo fluídico no se está utilizando en el momento correcto del día.

En algunos casos, la divulgación proporciona un procedimiento de obtención de datos farmacológicos útiles para

evaluar la eficacia y/o la toxicidad de un agente farmacéutico contra la gripe a partir de un animal de ensayo. El procedimiento implica las etapas de a) proporcionar un dispositivo fluídico que comprende por lo menos una unidad de toma de muestras, un conjunto de ensayo, y una pluralidad de canales en comunicación fluídica con dicha unidad de toma de muestras y/o dicho conjunto de ensayo; b) permitir que una muestra de fluido biológico de menos de aproximadamente 50 µl reaccione con los reactivos contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para producir una señal detectable generada a partir de un analito indicador de una infección vírica de la gripe recogido inicialmente en dicha muestra que es indicadora de un parámetro farmacológico; y c) detectar dicho señal detectable; y d) repetir la reacción y detectar las etapas con una segunda muestra de fluido biológico desde el mismo animal de ensayo. En un caso relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento que comprende a) proporcionar un dispositivo fluídico que comprende por lo menos una unidad de toma de muestras, un conjunto analítico y una pluralidad de canales en comunicación fluídica con dicha unidad de toma de muestras y/o dicho conjunto analítico; b) permitir que una muestra de fluido corporal reaccione con los reactantes contenidos dentro de dicho conjunto analítico produzca una señal detectable generada a partir de un analito recogido inicialmente en dicha muestra que es indicadora de un parámetro farmacológico; y c) detectar dicha señal detectable; y d) repetir la reacción y etapas de detección con una segunda muestra de fluido biológico del mismo animal de ensayo, en el que el animal no está sometido a anestesia.

Cuando se utilizan animales de laboratorio en ensayos preclínicos de un agente farmacéutico contra la gripe, a menudo es necesario matar el animal de la prueba para extraer suficiente sangre para realizar un ensayo para detectar un analito de interés. Esto tiene implicaciones económicas y éticas, y como tal, puede ser ventajoso poder extraer una cantidad de sangre de un animal de ensayo de tal manera que no se necesita matar el animal. Además, esto también puede permitir que el mismo animal de ensayo se ensaye con múltiples agentes farmacéuticos en diferentes momentos, lo que permite un ensayo preclínico más eficaz. De promedio, el volumen total de sangre en un ratón, por ejemplo, es de 6 a 8 ml de sangre por cada 100 gramos de peso corporal. Una ventaja de la presente invención es que sólo se requiere un volumen muy pequeño de sangre para llevar a cabo los ensayos preclínicos en ratones u otros pequeños animales de laboratorio. En algún caso se extraen entre aproximadamente 1 microlitro y aproximadamente 50 microlitros. En un caso preferido se extraen entre aproximadamente 1 microlitro y aproximadamente 10 microlitros. En los casos preferidos se extraen aproximadamente 5 microlitros de sangre.

Una ventaja adicional de mantener el animal de prueba vivo es evidente en un estudio en tiempo preclínico. Cuando se utilizan varios ratones, por ejemplo, para controlar las concentraciones de un analito en un fluido corporal del animal de ensayo a lo largo del tiempo, la variable adicional de la utilización de múltiples animales se introduce en la prueba. Cuando, sin embargo, puede utilizarse un solo animal de ensayo como su propio control a lo largo del tiempo, se puede realizar un ensayo preclínico más preciso y beneficioso.

Aunque se han presentado y descrito en la presente memoria unos casos preferidos de la presente invención, resultará evidente para los expertos en la materia que dichos casos son proporcionados únicamente a título de ejemplo. Debe apreciarse que pueden utilizarse en la puesta en práctica de la invención diversas alternativas a los casos de la invención descritos en la presente memoria. Se pretende que las reivindicaciones siguientes definan el alcance de la invención y que los procedimientos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén comprendidos dentro del mismo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de una partícula vírica de la gripe en un fluido corporal de un sujeto, que comprende:

a) permitir que una muestra de dicho fluido corporal sospechoso de contener dicha partícula vírica de la gripe reaccione con un primer reactivo de inmunoanálisis y un segundo reactivo de inmunoanálisis, estando ambos contenidos dentro de un conjunto de inmunoanálisis de un cartucho, en el que dicho primer reactivo de inmunoanálisis se une específicamente a una molécula de hemaglutinina seleccionada de entre el grupo constituido por H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 para formar un primer inmunocomplejo sobre dicha partícula vírica de la gripe, y en el que dicho segundo reactivo de inmunoanálisis se une específicamente a una molécula de neuraminidasa seleccionada de entre el grupo constituido por N1, N2, N3, N4 y N5 para formar un segundo inmunocomplejo sobre dicha partícula vírica de la gripe, proporcionando dichos inmunocomplejos una o más señales detectables que indican la presencia simultánea de la hemaglutinina y la neuraminidasa sobre dicha partícula vírica de la gripe en el que el primer o el segundo reactivo de inmunoanálisis es inmovilizado sobre dicho soporte sólido; y

b) detectar dichas una o más señales detectables generadas desde dichos inmunocomplejos, en el que dicha presencia simultánea de hemaglutinina y neuraminidasa resulta indicativa de la presencia de dicha partícula vírica de la gripe.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de fluido corporal es inferior a aproximadamente 500 microlitros.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de dichas hemaglutinina y neuraminidasa resulta indicativa de una infección vírica de la gripe de tipo A.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha hemaglutinina es la hemaglutinina 5 (H5).

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha hemaglutinina es la H5 y dicha neuraminidasa es la N1.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es humano, animal, o ave de corral.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho cartucho comprende por lo menos una unidad de recogida de muestras, un conjunto de inmunoanálisis que contiene unos reactivos de inmunoanálisis, y una pluralidad de canales en comunicación fluídica con dicha unidad de recogida de muestras y/o dicho conjunto de inmunoanálisis.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de fluido corporal sospechosa de contener dicha partícula vírica de la gripe reacciona con dichos reactivos de inmunoanálisis contenidos dentro de dicho conjunto de inmunoanálisis basándose en un protocolo transmitido desde un dispositivo externo a un conjunto de comunicación basándose en un identificador.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, que comprende además la etapa de transmitir dicha señal detectable a un dispositivo externo mediante un controlador.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el cartucho comprende una pluralidad de canales que proporcionan una comunicación fluídica entre dicha unidad de recogida de muestras y dicho conjunto de inmunoanálisis.

11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el dispositivo externo es un servidor.

12. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el protocolo es transmitido de manera inalámbrica desde dicho dispositivo externo.

13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos biomarcadores indicativos de la reacción defensiva del cuerpo al virus comprenden un anticuerpo para el virus, preferentemente del isotipo IgM.

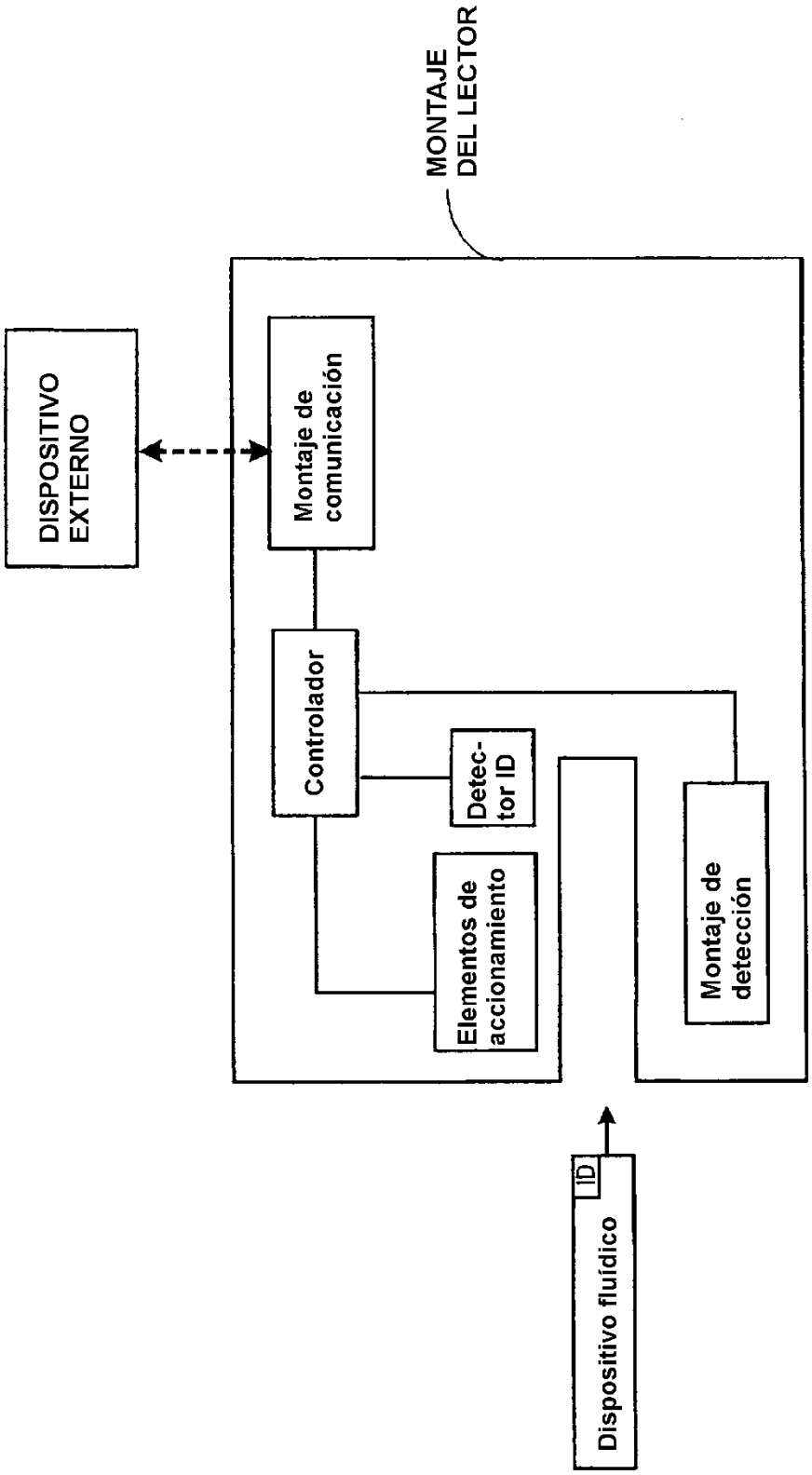

MONTAJE DEL LECTOR
DISPOSITIVO EXTERNO
Montaje de comunicación
Controlador
Detec-tor ID
Elementos de accionamiento
Montaje de detección
ID
Dispositivo fluídico

Figura 1

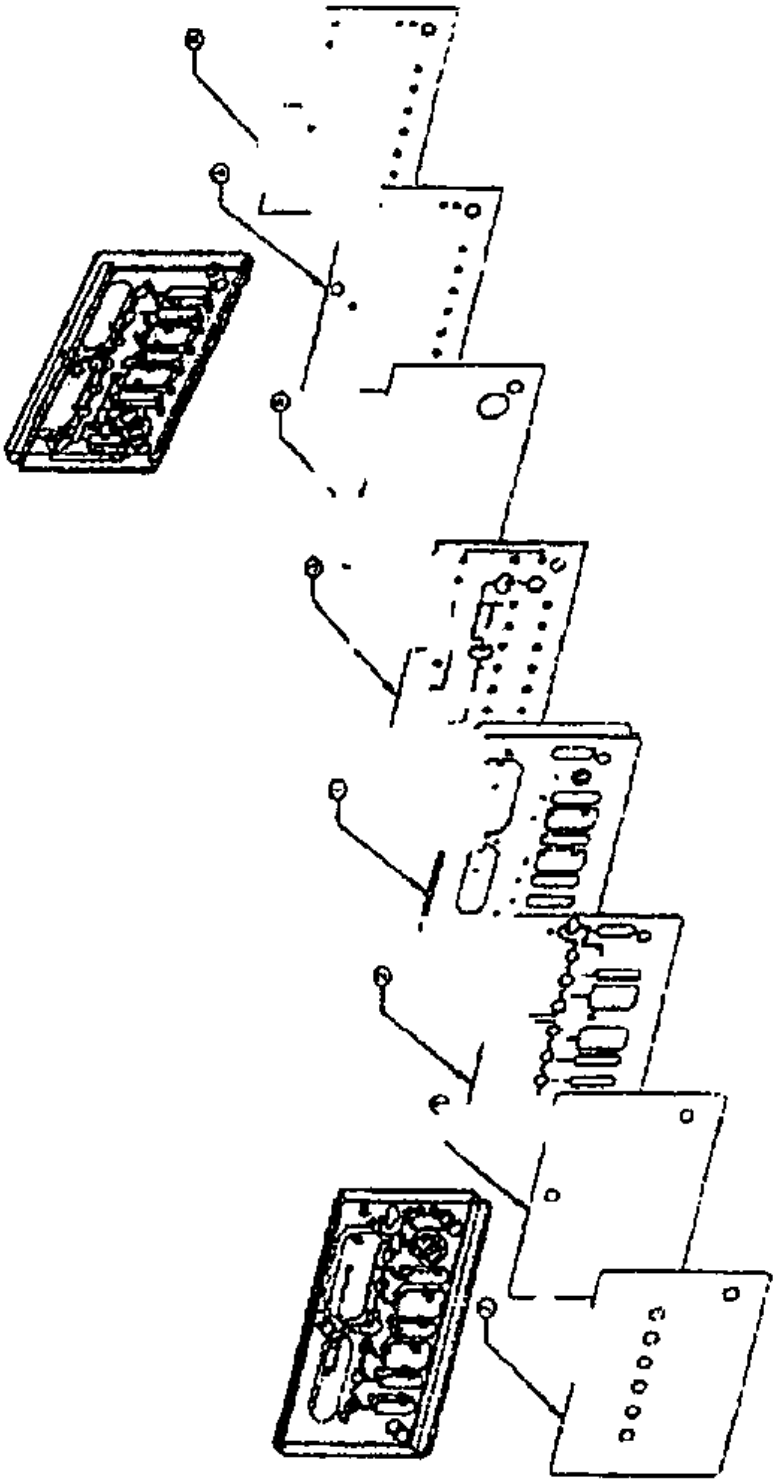


Figura 2

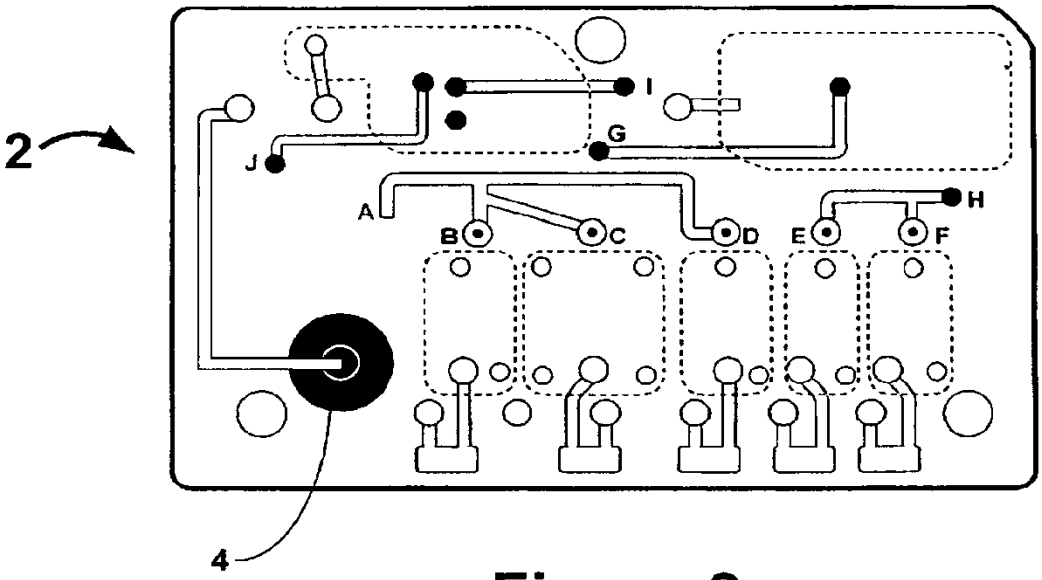


Figura 3

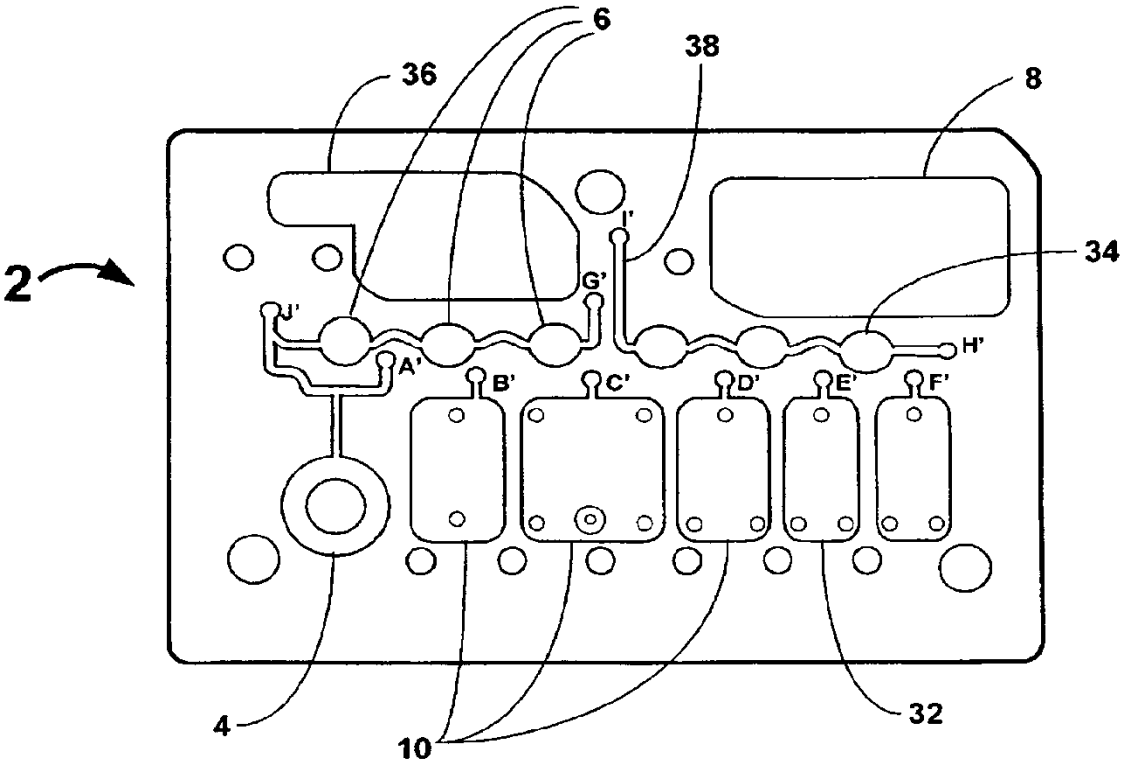


Figura 4

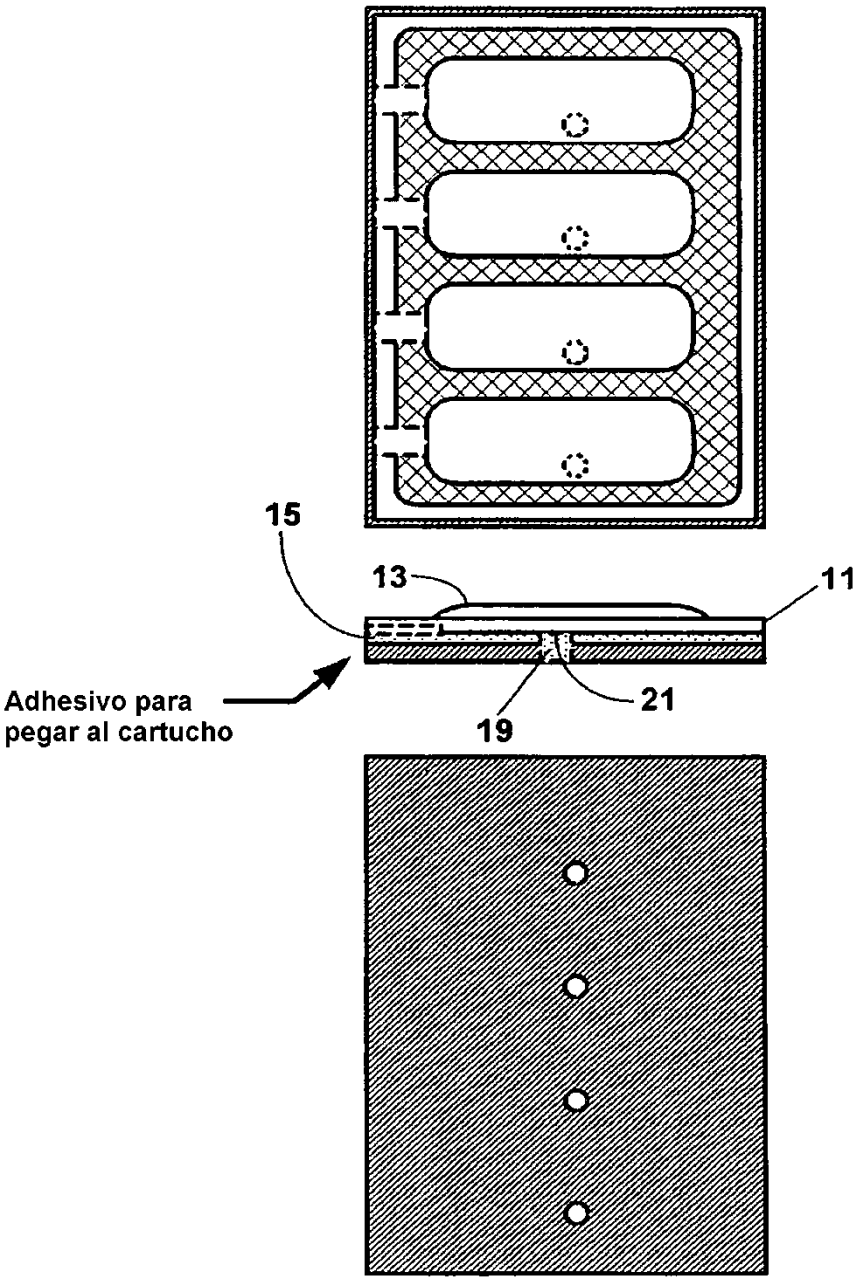


Figura 5

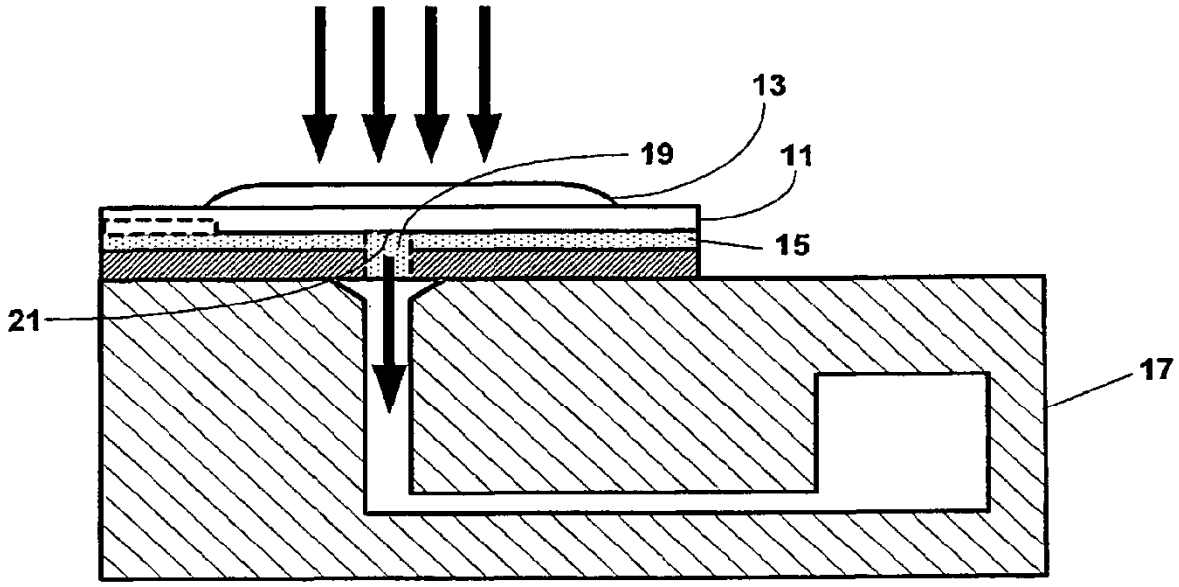


Figura 6

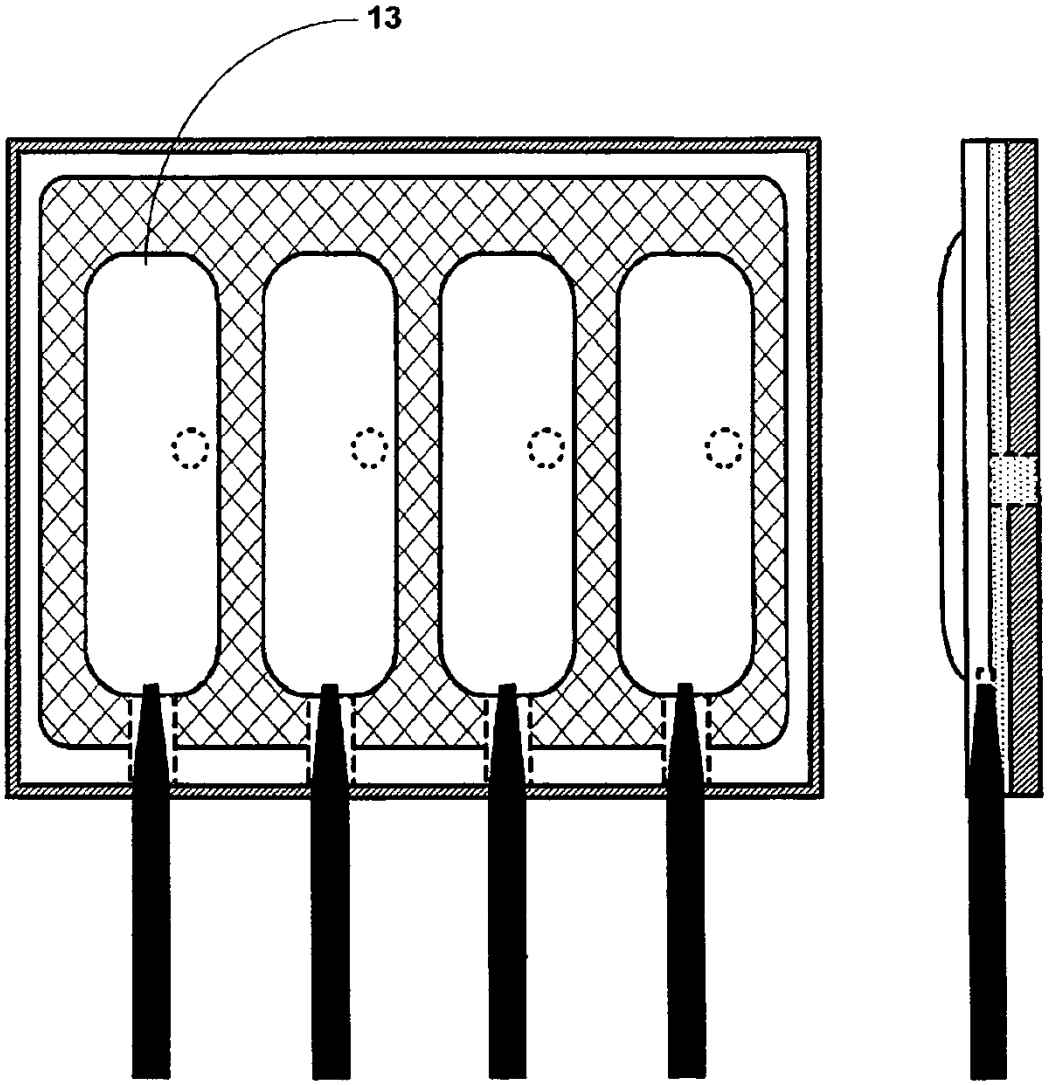


Figura 7

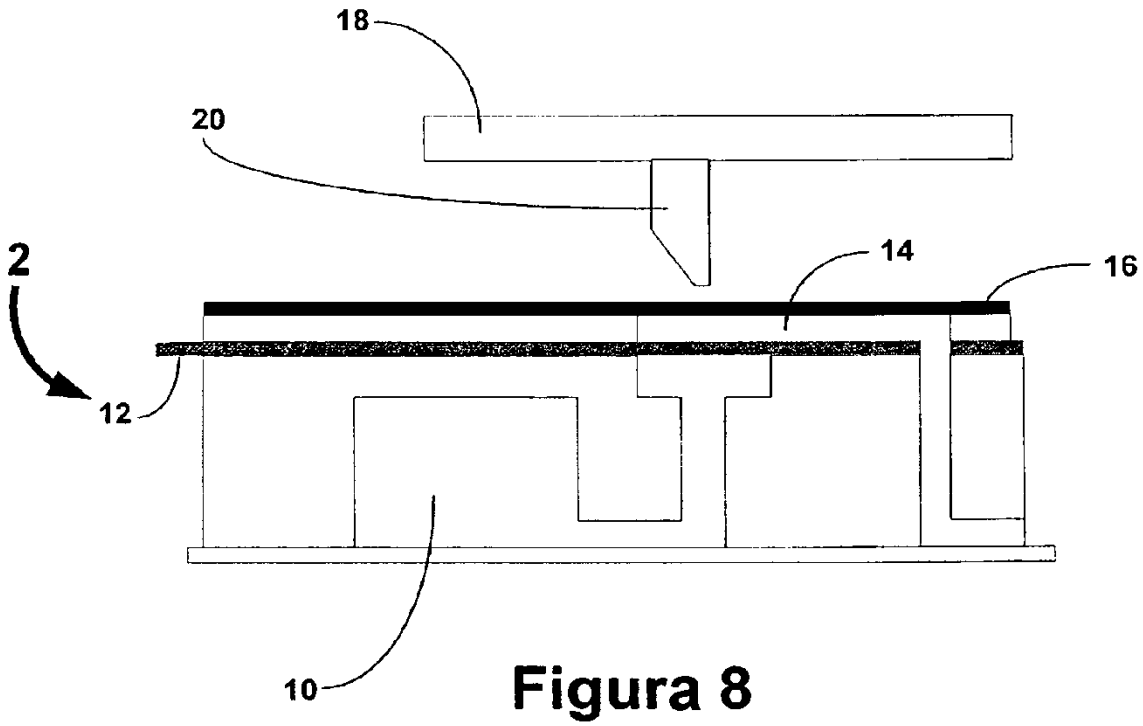


Figura 8

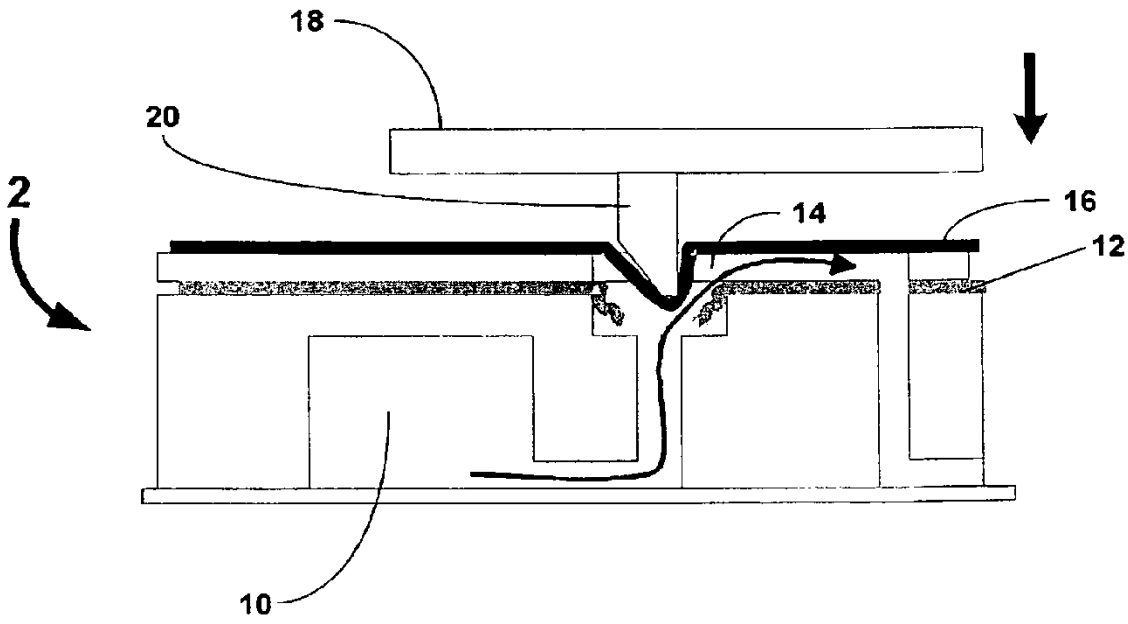


Figura 9

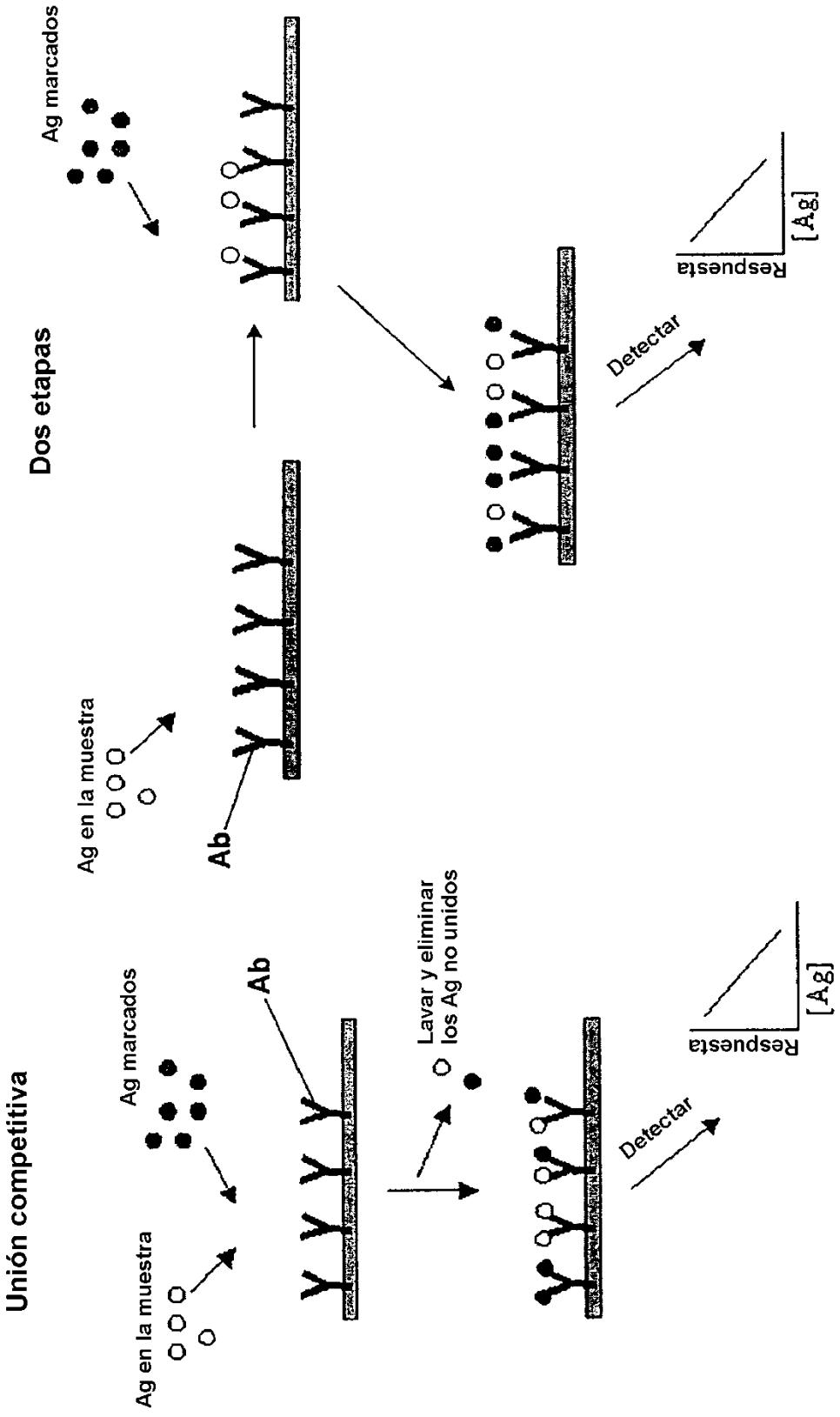

Unión competitiva
Ag en la muestra
Ag marcados
Ab
Lavar y eliminar los Ag no unidos
Detectar
Respuesta
[Ag]
Dos etapas
Ag en la muestra
Ab
Ag marcados
Detectar
Respuesta
[Ag]

Figura 10

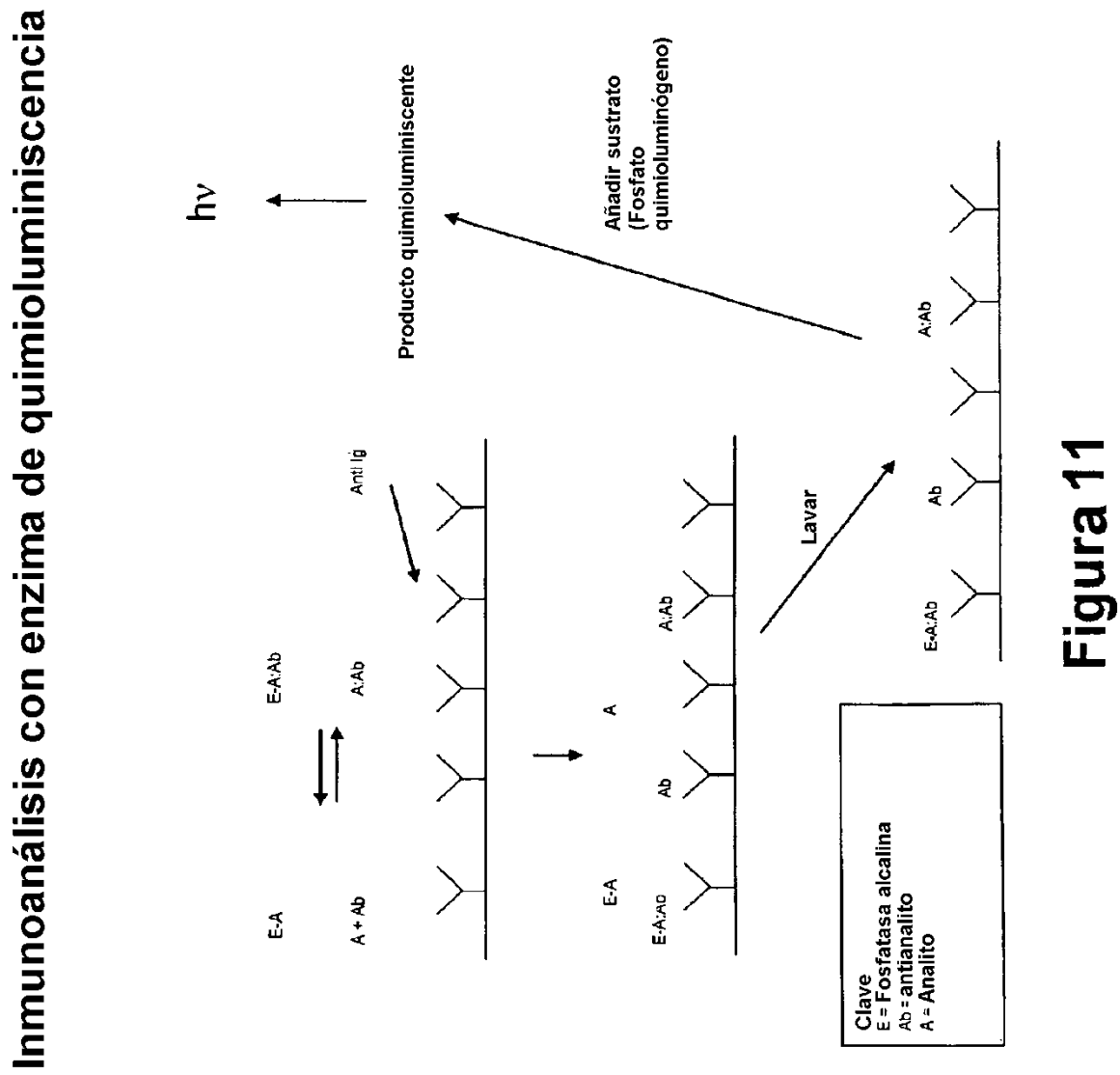

Inmunoanálisis con enzima de quimioluminiscencia
hν
Producto quimioluminiscente
Añadir sustrato
(Fosfato
quimioluminógeno)
Anti Ig
E-A:Ab
A:Ab
E-A
A + Ab
A
E-A
E-A:Ab
Ab
A:Ab
Lavar
E-A:Ab
Ab
A:Ab
Clave
E = Fosfatasa alcalina
Ab = antianalito
A = Analito

Figura 11

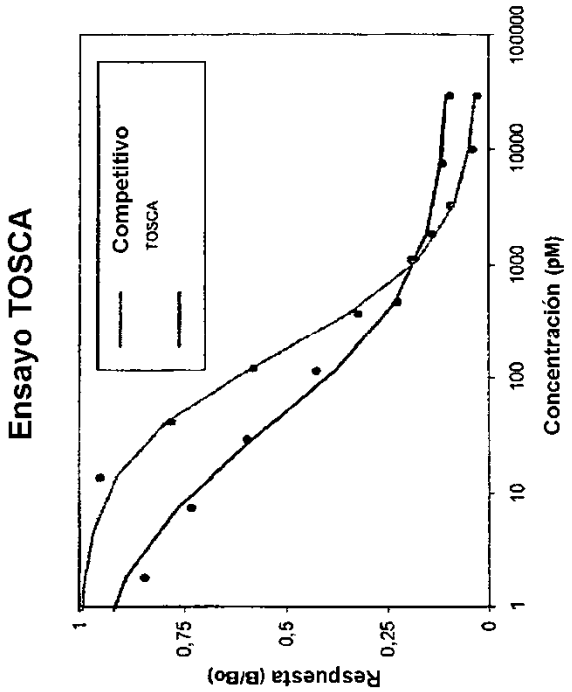
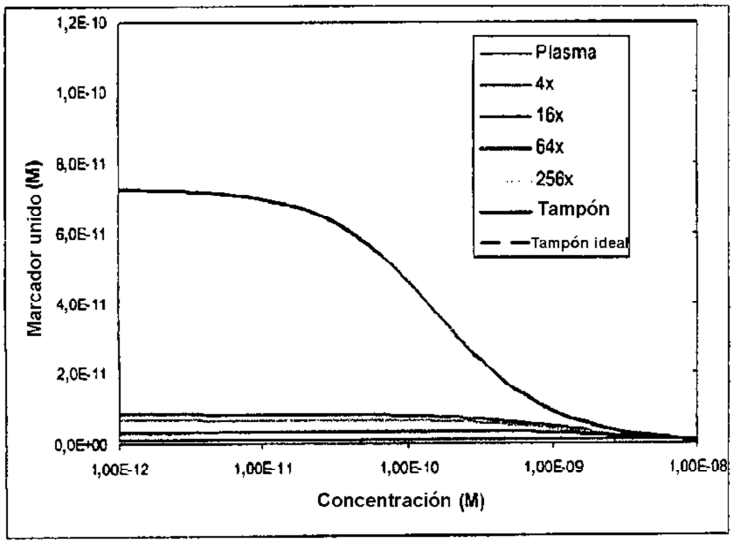

Ensayo TOSCA
Competitivo
TOSCA
Respuesta (B/Bo)
1
0,75
0,5
0,25
0
1
10
100
1000
10000
100000
Concentración (pM)

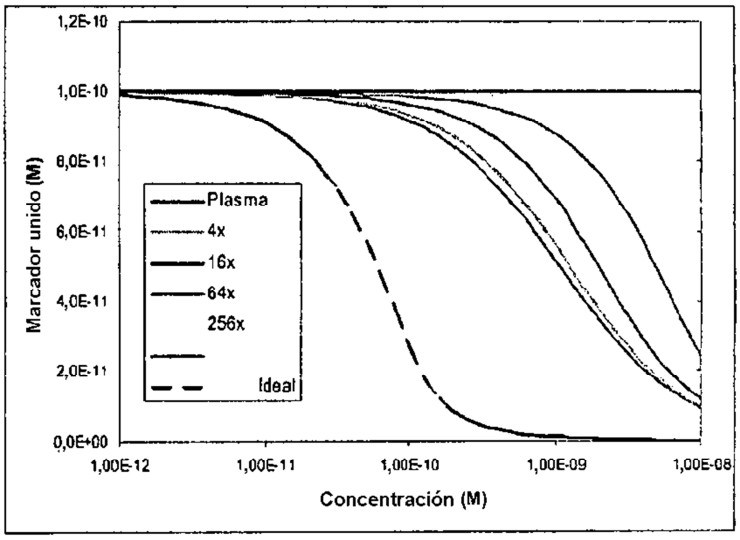
Figura 12

Efecto del plasma

Unión competitiva



Dos etapas



Figuras 13

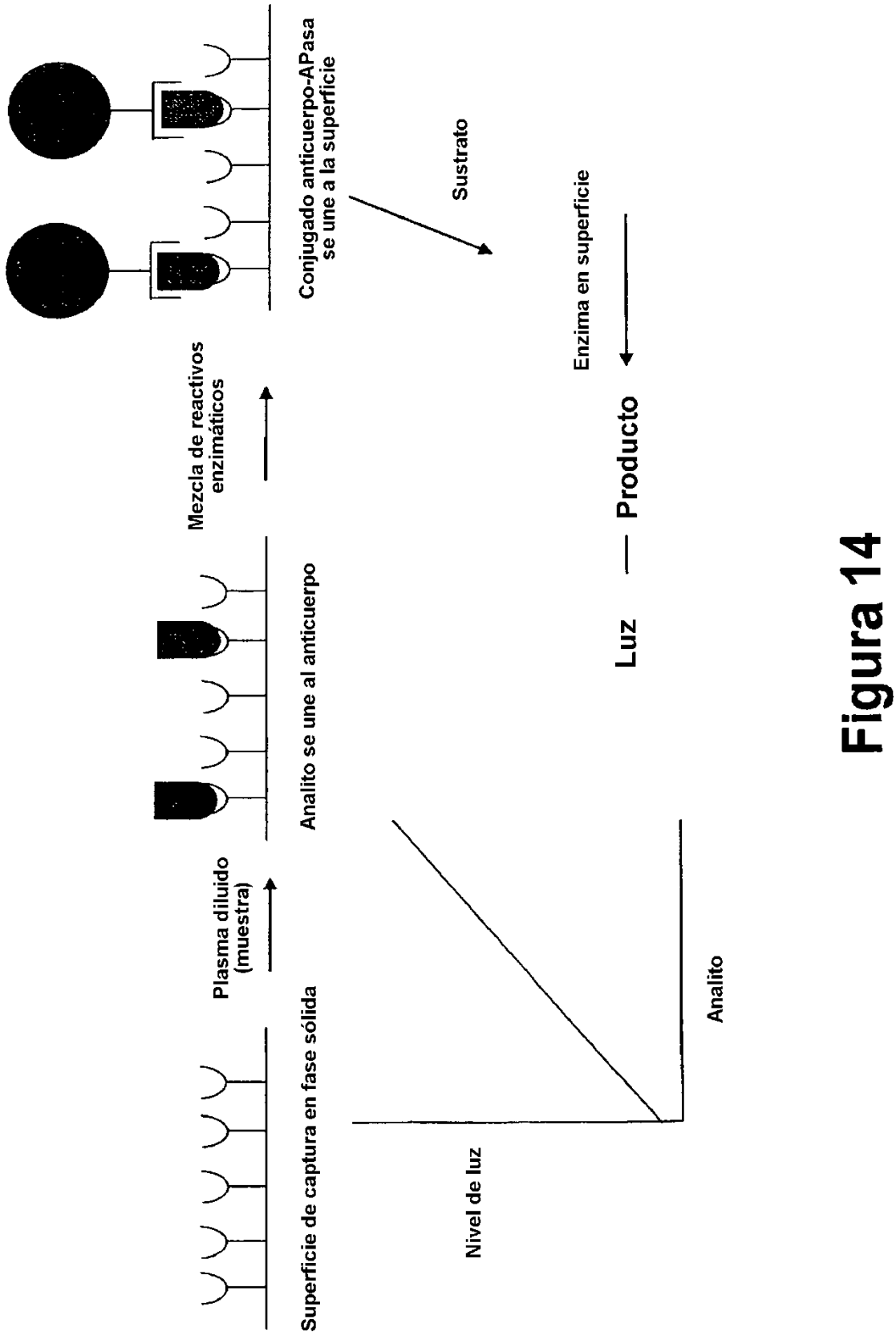

Superficie de captura en fase sólida
Plasma diluido (muestra)
Analito se une al anticuerpo
Mezcla de reactivos enzimáticos
Conjugado anticuerpo-APasa se une a la superficie
Sustrato
Enzima en superficie
Luz — Producto
Nivel de luz
Analito

Figura 14

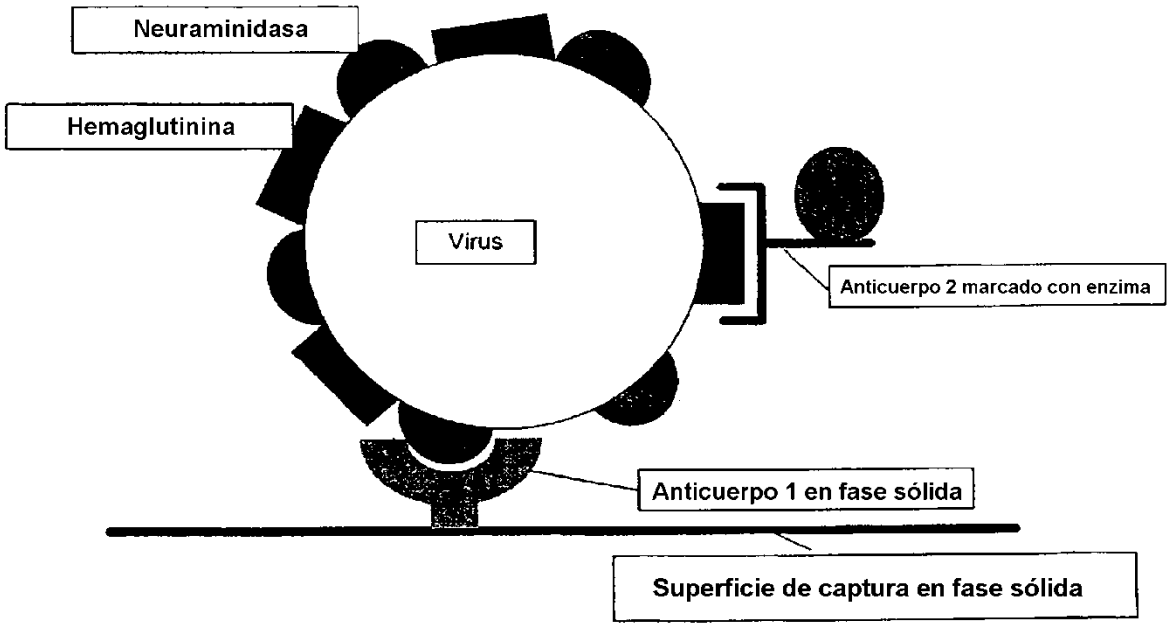

Neuraminidasa
Hemaglutinina
Virus
Anticuerpo 2 marcado con enzima
Anticuerpo 1 en fase sólida
Superficie de captura en fase sólida

Figura 15