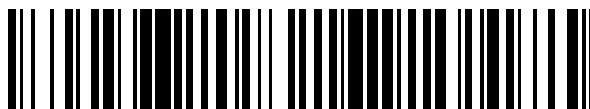


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 028**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

G01N 21/77 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

A61B 5/097 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 1/22 (2006.01)

G01N 1/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2002 E 02722430 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1377815**

54 Título: **Sistema de medición biológica y método de uso**

30 Prioridad:

11.04.2001 GB 0108993

31.08.2001 GB 0121039

24.09.2001 GB 0122881

30.10.2001 GB 0126001

08.01.2002 GB 0200265

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2016

73 Titular/es:

**RAPID BIOSENSOR SYSTEMS LIMITED (100.0%)
BRUNSWICK HOUSE, 61-69 NEWMARKET ROAD
CAMBRIDGE CB5 8EG, GB**

72 Inventor/es:

**MCCASH, ELAINE, MARIE;
WHEELER, GAVIN, VASHON;
COLBY, EDWARD, GRELLIER;
STORKEY, MATTHEW, EMMANUEL, MILTON;
STEWART, JAMES, NEIL;
MURRAY, NICOL, JOHN y
GLAUSER, ANTONY**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 566 028 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema de medición biológica y método de uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a sistemas de medición biológica; más particularmente, pero no exclusivamente, la invención se refiere a un sistema de medición biológica para proporcionar detección temprana de enfermedad respiratoria, por ejemplo tuberculosis inducida por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis*.

10 **Revisión de la técnica**

Se conocen en la técnica numerosos sistemas de medición biológica para detectar diversas formas de patógenos, por ejemplo bacterias, virus, mohos y hongos.

15 En el artículo titulado "Detection of Antibody-Antigen Reactions at a glass-liquid interface as a Novel Optical Immunoassay Concept", Proceedings of 2nd Optical Fibre Conference (Stuttgart 1984) págs. 75, R. M. Sutherland *et al.* describen un aparato de guía de ondas óptica en el que una especie de anticuerpo se inmoviliza covalentemente sobre una superficie de una guía de ondas plana o de fibra óptica. Se presenta a la superficie una disolución de muestra que comprende un antígeno, en la que el antígeno se inmoviliza mediante la especie de anticuerpo. Se examina el antígeno usando una componente de onda evanescente de un haz de luz, reflejada de manera totalmente interna muchas veces dentro de la guía de ondas. La componente evanescente presenta la característica de que penetra sólo una fracción de su longitud de onda en una fase acuosa en la superficie en la que el antígeno está inmovilizado; por tanto, la componente evanescente puede interaccionar ópticamente con sustancias, por ejemplo el antígeno inmovilizado, unido a o muy próximo a la superficie de contacto y sólo mínimamente con cualquier disolución a granel que pueda interactuar sobre la superficie.

Además, en el artículo publicado titulado "Sensitivity enhancement of evanescent wave immunoassay" (1993) Yoshida *et al.* Meas. Sci. Technol. 4, págs. 1077-9, se describe un fluoroinmunosensor adecuado para la detección de bajas concentraciones de patógenos en muestras de sangre y suero. El inmunosensor emplea un sistema de ensayo que incluye un ensayo de tipo sándwich en una célula de flujo. Para un ensayo de tipo sándwich convencional se requieren varias etapas de lavado. Estas etapas de lavado complican el sistema y hacen necesario que un operario relativamente cualificado lleve a cabo las pruebas.

35 En la patente publicada del Reino Unido n.º GB 2174802, se describe un biosensor de guía de ondas óptica para detectar y monitorizar especies moleculares de ensayo específicas en muestras de fluido de prueba que fluyen. El biosensor emplea una geometría óptica de reflexión múltiple compleja en la que la fluorescencia asociada con la unión de un antígeno a una superficie recubierta con anticuerpo se caracteriza por un aumento en la señal detectada en la misma dirección que la detectada para la luz incidente reflejada múltiple. Una desventaja de este sensor es que la dispersión en volumen mediante una guía de ondas óptica que forma parte del sensor puede afectar al nivel de señal detectado en la guía de ondas. Además, las configuraciones de construcción en múltiples capas de la guía de ondas óptica sirven para complicar adicionalmente el biosensor y la complejidad de los niveles de señal observados. De nuevo, el operario del biosensor debe estar relativamente cualificado.

45 En otra solicitud de patente publicada n.º GB 2227089, se describe un sistema para el análisis de especies moleculares de ensayo específicas en muestras de fluido de prueba. El sistema emplea un método de detección que implica el uso de detección de una componente de onda evanescente de un anticuerpo inmovilizado sobre la superficie de una guía de ondas plana o de fibra óptica. El acoplamiento de la longitud de onda resonante se facilita mediante una rejilla óptica ubicada o bien en la superficie de contacto entre el cuerpo dieléctrico y el medio o bien entre el cuerpo dieléctrico y el recubrimiento sensibilizado que puede dar como resultado potencialmente problemas de alineación. Además, la luz se refleja muchas veces dentro de la guía de ondas y como tal la intensidad observada experimenta pérdidas debido a la dispersión.

55 La solicitud de patente europea n.º EP 0519623 da a conocer un sistema de onda evanescente que comprende superficies de propagación de ondas primera y segunda. La primera superficie se usa para detectar la presencia de un primer analito y la segunda se usa para indicar la presencia de un segundo analito y/o una referencia. El sistema es complejo y, en una realización, hace uso de las superficies interior y exterior de las dos superficies de propagación de ondas.

60 En la solicitud de patente n.º EP 0239382, se describe otro dispositivo basado en fibra óptica que tiene una alta apertura numérica y no utiliza ningún revestimiento exterior en sus puntos de contacto. El dispositivo es de diseño complejo que emplea un divisor de haz y un sistema de lente susceptible de pérdidas por dispersión. De nuevo, el dispositivo incorpora una célula de flujo para el examen de ensayos detectables ópticamente. Este dispositivo es de complejidad y coste relativamente altos.

65 La solicitud PCT internacional n.º PCT/US01/21634 se refiere a un aparato y un método para fluoroensayos de luz

evanescente, destinados específicamente para su uso en fluidos corporales. El aparato está diseñado para detectar múltiples ensayos resueltos espacialmente que van a leerse simultáneamente usando sensores de detección tales como una cámara CCD, un fotodetector, una matriz de fotodiodos o sensores relacionados. Se usa presión de aire, vacío o acción capilar para mover la muestra sobre una zona de ensayo de un cartucho desechable. De nuevo, este aparato utiliza múltiples reflexiones y, en una realización, estas reflexiones se producen en una película muy fina, que mejora la sensibilidad de la medición. El aparato se basa en personal que realiza pruebas para transferir muestras sobre un elemento desechable del aparato y como tal, no es un método "seguro" de manipulación de muestras patógenas. Además, se requiere que el personal tenga un alto nivel de cualificación y el aparato realiza pruebas en múltiples condiciones, lo que no es el requisito de funcionamiento de principio del sistema de medición biológica de la presente invención.

La patente estadounidense n.º US 5922550 se refiere a un dispositivo sensible para la detección de inmunoensayos. La base del dispositivo es algo diferente a la de la presente invención porque el dispositivo sensible usa un patrón predeterminado de receptores específicos de analito que, en presencia del patógeno, producen un patrón de difracción de luz transmitida o reflejada. Una imagen de difracción generada de ese modo puede observarse a simple vista o mediante un dispositivo de lectura óptica.

En la patente estadounidense n.º US 4673657 se describe un sistema de tarjeta y varilla de microensayo. El sistema de tarjeta y varilla tiene como finalidad la detección simultánea de la presencia de numerosas sustancias biológicamente importantes diferentes en una única muestra pequeña. El dispositivo es rápido y hace uso de sistemas de inmunoensayo convencionales que están bien documentados en la bibliografía. La muestra debe colocarse sobre el sistema de tarjeta y por tanto no se proporciona un medio seguro de recogida. Además, no es deseable la detección de múltiples patógenos en las condiciones para las que está destinado el sistema de medición de la presente invención.

En la patente estadounidense n.º US 3992516, se describe una composición de anticuerpo fluorescente directo y un método para la detección de *Pneumocystis carinii*; el método de recogida de muestras no se presenta en la patente.

La solicitud de patente alemana n.º DE 3932784 se refiere a una prueba para analizar aerosoles, incluyendo el fluido de conductos respiratorios y saliva. Se recoge el aliento exhalado directamente en un espectrómetro de masas o se concentra antes del análisis mediante su recogida sobre una placa enfriada. El análisis mediante espectrometría de masas conduce a la determinación de las especies moleculares presentes en el gas/aerosol/líquido mediante la fragmentación de estas especies y la posterior determinación de sus masas. Un análisis de este tipo da como resultado un problema complejo de adición conjunta para determinar todas las especies moleculares presentes. La recogida en una placa enfriada es una técnica convencional en la bibliografía, concretamente aislamiento en matriz, y se ha utilizado desde la década de 1960. La prueba se basa en la medición directa de toda la muestra, en lugar de hacer uso de un método de evaluación químico/bioquímico. El uso de un espectrómetro de masas es caro y requiere la incorporación de equipo de vacío; por tanto esta prueba es de alto coste y no es portátil.

En la solicitud de patente del Reino Unido n.º GB 2311856, se describe un dispositivo de toma de muestras medioambientales para recuperar partículas que tienen diámetros en un intervalo de 0,1 µm a 20 µm. En el dispositivo de toma de muestras, se usa una alimentación para recubrir las superficies de perlas en un lecho de perlas con líquido, que entonces atrapa partículas de una muestra de aire. Entonces se recupera el líquido y se analiza para determinar los componentes que se han disueltos en el líquido. Un ensayo de este tipo no sería apropiado para la recogida de patógenos contenidos dentro de esputo/moco de la zona superior del pulmón.

En la solicitud PCT internacional n.º PCT/AU95/00540, se describe un filtro nasal/oral diseñado para atrapar partículas mediante inhalación o exhalación. El filtro comprende un sistema de recogida diseñado para encajar en la boca o los orificios nasales del usuario y tiene una trayectoria no lineal para capturar materiales particulados. En este filtro, las principales partículas diana para su captura son especies potencialmente alergénicas, pero existe la posibilidad de capturar virus y micobacterias. Las partículas pueden recuperarse lavando o soplando a través del sistema de recogida de muestras y posteriormente pueden analizarse mediante cultivo, análisis de ácido nucleico o procedimientos similares. Un enfoque de este tipo significa que la muestra se transfiere a otro sistema, lo que da lugar inmediatamente a problemas de seguridad relacionados con la manipulación segura de las muestras y la velocidad de pruebas de las muestras.

La solicitud de patente PCT internacional n.º PCT/SE96/00474 se refiere a un dispositivo que investiga uno o más componentes del aire exhalado para determinar la presencia del *Helicobacter pilori* patógeno en el estómago y los tractos intestinales de seres humanos. El dispositivo comprende un elemento tubular para conducir aire exhalado sobre una placa estanca al aire que incorpora una membrana porosa para la recogida de muestras. Antes de producir la muestra, el paciente traga una preparación de urea, preferiblemente radiactiva, marcada con isótopo, que se descompone en presencia de *Helicobacter pilori*. La realización preferida del dispositivo indica la presencia de dióxido de carbono radiactivo formado como producto de conversión de *Helicobacter pilori*. La placa absorbe el dióxido de carbono radiactivo y se retira posteriormente del dispositivo para el análisis radiactivo. En la detección de virus y bacterias, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, el dispositivo es inapropiado ya que no hay ninguna manera sencilla de marcar isotópicamente el patógeno ni hay ninguna manera sencilla de formar un producto

descompuesto sencillo.

En la patente estadounidense n.º US 4350507, se describe un aparato de toma de muestras de partículas para la recogida de partículas de polvo de la atmósfera. El aparato emplea una rejilla y un sistema de prefiltro para retirar las partículas más grandes no respirables y luego un filtro principal para recoger las partículas respirable. Esto limita la concentración de polvo en algunas situaciones industriales hasta límites tolerables. No se da a conocer que el aparato pueda realizar análisis de ensayo bioquímico.

En la patente estadounidense n.º US 5372126, se describe una cámara de toma de muestras pulmonares diseñada para la recogida segura de muestras pulmonares. El aparato encierra completamente al paciente y, como tal, no es portátil. El objetivo primario del sistema es recoger secreciones de muestra profundas de manera no invasiva de los pulmones de un paciente. Además, la cámara está equipada con una unidad de filtro de escape que puede reemplazarse para atrapar patógenos transportados por el aire y otras partículas perjudiciales; el filtro de escape puede retirarse posteriormente para su análisis y eliminación.

La patente estadounidense n.º US 3745991 describe un dispositivo para reducir la contaminación medioambiental durante el tratamiento y/o diagnóstico médico. El objetivo del dispositivo es suministrar y/o recoger de manera segura muestras de aerosol de un paciente encerrando la cara del paciente y haciendo pasar cualquier fluido generado por la exhalación del paciente a través de un sistema de filtro para recoger cualquier material peligroso para su eliminación/análisis posterior. El dispositivo no puede transportarse fácilmente.

El/los problema(s) que va(n) a resolverse en consecuencia

Cada vez se está haciendo más importante para las organizaciones, por ejemplo para agencias gubernamentales y agencias de ayuda humanitaria, tener a su disposición instalaciones para la detección e identificación rápidas de patógenos. Tales patógenos incluyen virus de reciente aparición y reaparición de enfermedades conocidas tales como peste bubónica, tuberculosis y cólera. Debido a que tales patógenos están volviéndose cada vez más resistentes a la medicación, hay una necesidad considerable de sistemas de medición que puedan usarse para la detección temprana de brotes de patógenos de modo que puedan aplicarse medidas de aislamiento y medicación dirigida para contener la diseminación adicional de los patógenos.

Además, debido a que los brotes de enfermedad a menudo se producen en regiones del mundo económicamente menos avanzadas y a que están diseminándose por vectores tales como la aviación a otras regiones del mismo, existe la necesidad de sistemas de medición que sean relativamente económicos, que sean sencillos de utilizar por personal no cualificado, que puedan proporcionar resultados en el punto de prueba/atención y que sean potencialmente menos propensos a la diseminación inadvertida de patógenos cuando los utiliza personal no cualificado.

En particular, la detección de infección bacteriana es de vital importancia en términos globales. Son particularmente deseables pruebas sobre el terreno de infección bacteriana, preferiblemente usando una prueba que responda rápidamente, debido a la prevalencia, virulencia y mayor impacto de infecciones importantes tales como neumonía, tuberculosis, malaria y otros patógenos. Las pruebas bacterianas actuales se basan principalmente en ensayos de laboratorio complejos y por tanto son potencialmente caras y no son especialmente adecuadas para su uso sobre el terreno. Además, muchas pruebas actuales requieren un periodo de tiempo sustancial, por ejemplo en un intervalo de 2 a 4 semanas, para proporcionar una identificación positiva de la presencia de patógenos. Más recientemente, se han desarrollado pruebas rápidas que ofrecen escalas de tiempo de identificación reducidas hasta horas/días. Estas pruebas rápidas se basan principalmente en el análisis de muestras de esputo/moco de regiones superiores del pulmón; sin embargo, la recogida y manipulación de tales muestras es peligrosa para el personal que realiza y/o supervisa tales pruebas. Por tanto, tanto los problemas de escala de tiempo como de posible transmisión de patógenos hacen que estas pruebas actuales sean difíciles de ejecutar en ubicaciones sobre el terreno.

Además, en el estado de la técnica actual para las pruebas sobre el terreno de tuberculosis (TB), la prueba cutánea "convencional" empleada se ve comprometida por el estado de VIH y por tanto el único método usado actualmente en el tercer mundo es el de la microscopía de frotis en muestras de esputo/moco. La precisión de estas pruebas depende de operarios cualificados y de la realización frecuente de nuevas pruebas.

En general, en estas circunstancias, se requiere un método significativamente más seguro de detección bacteriana pulmonar para abordar los problemas de transmisión de patógenos que son prevalentes cuando se recogen y se manipulan muestras para su análisis patológico posterior.

Además, también es altamente deseable la detección rápida y fiable de otros tipos de estados médicos, por ejemplo anomalías hormonales en el contexto del consumo de esteroides (hormonas) en el deporte profesional, marcadores para el cáncer, etc.

Ninguno de los sistemas conocidos revisados anteriormente aborda de manera adecuada estos problemas.

Técnica anterior conocida por el/los solicitante(s)

Se identificaron los siguientes documentos de la técnica anterior; US A 4 947 861 (HAMILTON LILE H); US A 5 573 009 (THIEME THOMAS *ET AL*); DE 197 18 924 A (MEDIUM-SENSOR GMBH); WO 01/84112 A (RESPIRATORY RESEARCH INC) Y MASAKAZU YOSHIDA *ET AL*: "SENSITIVITY ENHANCEMENT OF EVANESCENT WAVE IMMUNOASSAY" MEASUREMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY, IOP PUBLISHING, BRISTOL. GB, vol. 4, n.º 10, 1 de octubre de 1993 (01-10-1993), páginas 1077 - 1079, XP000399921 ISSN: 0957-0233.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de medición biológica para medir la concentración de componentes incluidos en una muestra según la reivindicación 1.

Preferiblemente, los medios de recogida comprenden además medios de nebulización para emitir una niebla para inducir emisión de aerosol a partir de un sujeto. Los medios de nebulización son beneficiosos porque pueden aumentar la cantidad de muestra obtenida cuando se realizan pruebas pulmonares.

Más preferiblemente, los medios de nebulización en uso están adaptados para generar una niebla de solución salina que comprende gotitas de solución salina que tienen diámetros en un intervalo de 6 µm a 20 µm. El intervalo es ventajoso porque tamaños de gotita menores de 6 µm son demasiado agradables como para inducir tos, mientras que tamaños de gotita mayores de 20 µm pueden ser desagradables de inhalar.

Lo más preferiblemente, las gotitas de solución salina tienen diámetros en un intervalo de 10 µm a 15 µm y comprenden solución salina que tiene una concentración de solución salina en un intervalo del 0,1% al 2% en peso.

Los medios de concentración comprenden además una característica para raspar superficies donde se deposita la muestra para concentrar espacialmente la muestra. La concentración espacial de la muestra puede potenciar la sensibilidad de medición del sistema.

Preferiblemente, la característica puede deformarse elásticamente para diseminar la muestra concentrada espacialmente sobre una región de examen óptico en la que la muestra concentrada se somete a examen óptico.

De manera beneficiosa, los medios de marcaje comprenden al menos uno de un ensayo de unión selectivo y un ensayo de desplazamiento competitivo para marcar ópticamente la presencia de los componentes mediante marcadores fluorescentes. Tales ensayos pueden proporcionar una superficie de contacto eficaz entre dominios bioquímicos y ópticos.

Preferiblemente, los marcadores fluorescentes se unen a anticuerpos para su uso en al menos uno del ensayo selectivo y el ensayo competitivo. Los anticuerpos, por ejemplo tal como se emplean en inmunoensayo, tienen la ventaja de que pueden hacerse altamente selectivos en relación con las agrupaciones moleculares o microbios a los que pueden unirse. Además, los anticuerpos están haciéndose en la actualidad relativamente económicos de fabricar a granel usando procedimientos de ingeniería genética actuales.

Preferiblemente, los marcadores fluorescentes son fluoróforos unidos a los anticuerpos mediante un portador intermedio de manera que una pluralidad de fluoróforos se asocian con cada anticuerpo. El uso de fluoróforos es ventajoso porque pueden excitarse mediante radiación óptica a una primera frecuencia de radiación y emitir radiación fluorescente a una segunda frecuencia de radiación, siendo las frecuencias primera y segunda diferentes entre sí, permitiendo de ese modo que la radiación de excitación y la radiación fluorescente emitida se aislen individualmente.

Más preferiblemente, el portador intermedio se implementa en forma de esferas de látex.

De manera beneficiosa, los medios de examen comprenden un detector evanescente óptico para detectar cambios en la respuesta óptica inducida por la presencia de los componentes. El examen por onda evanescente es especialmente ventajoso ya que permite una superficie óptica plana a través de la cual se disemina la muestra para seleccionarse como diana específicamente para el examen.

Preferiblemente, el detector evanescente incluye:

(a) uno o más de un láser de diodo y un LED como fuente de radiación de examen para examinar la muestra concentrada; y

(b) uno o más de un fotodiodo de avalancha, una matriz de fotodiodos y un tubo fotomultiplicador como detector óptico para detectar radiación fluorescente emitida desde la muestra concentrada en respuesta al examen óptico de la muestra, siendo el detector óptico para generar una señal de detección indicativa de cambios en la fluorescencia de la muestra que resultan de la presencia de los componentes en la muestra.

Tales fuentes y detectores de radiación óptica son ventajosos porque son potencialmente económicos, compactos y robustos.

5 Preferiblemente, el sistema comprende además medios estroboscópicos para radiación estroboscópica emitida desde la fuente de radiación de examen, y medios de desmodulación síncrona para desmodular la señal de
 10 detección en sincronía con el medio estroboscópico para hacer que el sistema sea menos sensible a la radiación óptica cuasi constante recibida en el detector óptico. Tales medios estroboscópicos pueden hacer que el sistema esté menos influido por los efectos de la iluminación ambiental parásita que penetra en el sistema. Además, un medio estroboscópico de este tipo también permite que se reduzcan significativamente los efectos de voltajes de compensación dentro de los componentes electrónicos de los medios de detección en la medición.

Preferiblemente, el sistema comprende además medios de computación para determinar cambios en la señal de
 15 detección cuando los componentes en la muestra se marcan ópticamente o desplazan marcadores ópticos.

Más preferiblemente, los medios de computación están dispuestos para monitorizar la muestra concentrada antes y después del marcaje fluorescente de la misma para calcular la medida de la concentración de los componentes en la muestra. Una medición doble de este tipo es beneficiosa para eliminar efectos de errores sistemáticos en el sistema, por ejemplo fluorescencia de fondo que se produce en los medios de examen.

20 De manera beneficiosa, los medios de computación comprenden además uno o más de:

(a) medios de visualización para visualizar la medida de la concentración de los componentes en la muestra, y

25 (b) medios de registro de datos para almacenar un registro de una medida de la concentración de los componentes.

Preferiblemente, los medios de recogida están dispuestos para encerrar la muestra, impidiendo de ese modo el contacto del personal con la muestra cuando el sistema está en uso. Un confinamiento de este tipo es ventajoso para ayudar a impedir la diseminación de patógenos peligrosos y también hace que el sistema sea más seguro en
 30 uso.

Más preferiblemente, los medios de recogida están dispuestos para que sean una pieza desechable de un solo uso. Un solo uso de este tipo es ventajoso adicionalmente para impedir la diseminación de patógenos potencialmente peligrosos. Lo más preferiblemente, los medios de recogida comprenden características que los hacen
 35 sustancialmente imposibles de desmontar tras la recogida de muestras en los mismos.

Preferiblemente, los medios de recogida comprenden medios de potenciación de torbellino para la deposición de la muestra dentro de los medios de recogida.

40 Los medios de recogida comprenden preferiblemente medios de filtración para inhibir al menos parcialmente la diseminación de los componentes de la muestra desde los medios de recogida. Preferiblemente, los medios de marcaje incluyen medios de lisis para producir la lisis de los componentes presentes en la muestra, potenciando de ese modo la sensibilidad de medición del sistema mediante el aumento del número de sitios de marcaje óptico
 45 potenciales disponibles.

El sistema según el primer aspecto puede usarse en un amplio intervalo de aplicaciones no limitadas al dominio biológico. En particular, pero no exclusivamente, el sistema está adaptado preferiblemente para identificar los componentes en forma de uno o más de los siguientes:

50 (a) anticuerpos;

(b) ácidos nucleicos;

(c) enzimas y/u otras proteínas;

55 (d) análogos de uno o más de (a) a (c); y

(e) un microorganismo.

60 Con respecto a los microorganismos, el sistema es especialmente apropiado para la detección de uno o más de los siguientes:

(a) un virus;

65 (b) esporas;

(c) mohos;

(d) polen; y

5 (e) un alérgeno microbiológico.

Además, el sistema también está adaptado preferiblemente para identificar los componentes en forma de uno o más de los siguientes:

10 (a) polvo tóxico;

(b) un explosivo;

(c) un fármaco; y

15 (d) un contaminante.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de detección de uno o más patógenos en una o más muestras de esputo de un sujeto usando un sistema según el primer aspecto de la invención según la reivindicación 13.

Preferiblemente, en las etapas (b) y (c), se emplea un ensayo marcado fluorescentemente para proporcionar la respuesta óptica.

25 Preferiblemente, en las etapas (b), (c) y (d), la detección de fluorescencia se realiza usando espectroscopía de ondas evanescentes.

Preferiblemente, cuando se ejecuta el método, dicho uno o más patógenos comprenden uno o más de:

30 (1) anticuerpos;

(2) ácidos nucleicos;

(3) enzimas u otras proteínas;

35 (4) analogías de (1) a (3); y

(5) un microorganismo.

40 El método está adaptado ventajosamente para la detección de bacterias asociadas con infecciones pulmonares y relacionadas con el pulmón.

Además, el método está adaptado preferiblemente para la detección de uno o más de los siguientes patógenos:

45 (1) un virus;

(2) una proteína y/o anticuerpo;

(3) otra partícula sintomática no incluida en (1) o (2);

50 (4) una espora;

(5) un moho;

55 (6) polen;

(7) un alérgeno;

(8) polvo tóxico;

60 (9) un explosivo;

(10) un fármaco; y

65 (11) un contaminante.

Preferiblemente, para potenciar la generación de aerosol, se usa la inhalación de uno o más de:

ésteres, vapor de agua, vapor de solución salina, expectorante y mentol para ayudar a liberar moco que contiene bacterias de la tráquea o de zonas superiores del pulmón de un sujeto que está sometándose a prueba.

De manera beneficiosa, se emplea una presión parcial negativa para ayudar a obtener dicha una o más muestras en forma de aerosol.

El método puede aplicarse para someter a prueba una variedad diversa de muestras. Por ejemplo, dicha una o más muestras comprenden preferiblemente un aerosol de sangre u otro fluido corporal o fluido corporal en forma líquida.

En el método, el análisis de dicha una o más muestras se realiza usando uno o más de:

(a) una reacción cromogénica de ELISA; y

(b) un biosensor de onda acústica de superficie (SAW) para detectar un antígeno en dicha una o más muestras.

Se apreciará que las características de la invención descritas anteriormente pueden combinarse en cualquier combinación factible que se encuentre dentro del alcance de la invención tal como se define mediante las reivindicaciones finales.

Descripción de los dibujos

Ahora se describirán realizaciones de la invención, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los siguientes diagramas en los que:

la figura 1 es un diagrama esquemático de un sistema de medición biológica según la invención;

la figura 2 es una ilustración esquemática del funcionamiento de una unidad de recogida de muestras del sistema de medición de la figura 1;

la figura 3 es una ilustración de un tubo de recogida de muestras del sistema de medición de la figura 1;

las figuras 4a a 4c son ilustraciones de un émbolo adecuado para su uso con el tubo de recogida de la figura 3;

la figura 5 es una ilustración de un módulo de componentes electrónicos de una unidad lectora del sistema de medición de la figura 1;

la figura 6 es una ilustración de tubos de recogida de muestras alternativos para el sistema de medición de la figura 1;

la figura 7 es un diagrama esquemático de un tubo de recogida de muestras alternativo todavía adicional para el sistema de medición de la figura 1;

las figuras 8a y 8b son ilustraciones de componentes ópticos incluidos dentro del módulo de componentes electrónicos de la figura 5;

la figura 9 es un diagrama esquemático de una tapa de sellado incluida dentro de la unidad de recogida de muestras de la figura 2;

la figura 10 es una representación esquemática de una configuración óptica empleada dentro del sistema de medición de la figura 1;

la figura 11 es una ilustración de una modificación al sistema de medición de la figura 1 para el análisis de muestras líquidas tales como sangre;

la figura 12 es un diagrama esquemático de un prisma de Dove compacto para su incorporación en el sistema de medición de la figura 1;

la figura 13 y 14 son representaciones de un ensayo de unión selectivo empleado en el sistema de la figura 1; y

la figura 15 es una representación de un ensayo de desplazamiento competitivo empleado en el sistema de la figura 1.

Descripción de realizaciones de la invención

En la siguiente descripción, se describirán inicialmente realizaciones de un sistema de medición biológica en una visión general. Más tarde, se describirán en más detalle las piezas componentes de las realizaciones y su bioquímica asociada. El sistema descrito en el presente documento emplea espectroscopía de ondas evanescentes y fluorimetría de ondas evanescentes para detectar la presencia de una sustancia patógena usando una técnica de inmunoensayo.

1. Visión general del sistema

En referencia en primer lugar a la figura 1, se muestra un sistema de medición biológica según la invención. El sistema se indica generalmente mediante 10 y comprende una unidad de recogida de muestras indicada mediante 30, y una unidad lectora complementaria correspondiente indicada mediante 50. Para visualizar los resultados de prueba, la unidad 50 lectora incluye una pantalla 60 de lectura. La unidad 30 de recogida está adaptada para recoger material exhalado de un usuario 40, proporcionando tal material muestras de prueba para el análisis posterior.

La unidad 30 de recogida está diseñada para engancharse mecánicamente en la unidad 50 lectora. Además, la unidad 30 de recogida es suficientemente compacta como para que pueda portarla el usuario 40. Además, la unidad 30 de recogida se implementa en forma de un tubo 70 de muestras hueco que comprende:

- (a) un orificio 80 de entrada para colocarse sobre una región de boca del usuario 40;
- (b) un orificio 90 intermedio para acoplarse a una región de recogida de gas, por ejemplo a una bolsa 100 inflable; y
- (c) un orificio de acceso para un émbolo 110 similar a un pistón que puede moverse de manera deslizante y rotacional dentro del tubo 70 de muestras.

Con el fin de reducir el riesgo de contaminación cruzada de un usuario a otro, la unidad 30 de recogida está diseñada para ser un elemento desechable; concretamente, la unidad 30 de recogida se usa sólo una vez para recoger la muestra para las pruebas y para presentar de manera segura la muestra a la unidad 50 lectora para el examen. La unidad 30 de recogida está moldeada preferiblemente de un material de plástico para que sea relativamente económica de fabricar, y también para que sea susceptible de incineración para reducir la diseminación de patógenos potencialmente peligrosos recogidos en la misma. Además, la unidad 30 de recogida está diseñada de modo que se impide que la unidad 50 lectora entre en contacto directo con las muestras recogidas dentro del tubo 70 que puede comprender patógenos potencialmente peligrosos.

2. Visión general del funcionamiento del sistema

Ahora se describirá el funcionamiento del sistema 10 de medición biológica en una visión general con referencia a las figuras 1 y 2.

Tras la fabricación incluyendo la deposición de biomateriales activos, la unidad 30 de recogida se sella preferiblemente dentro de un envase desecado sellado herméticamente para su almacenamiento antes del despliegue. Un envase de este tipo impide potencialmente que la humedad desnaturalice los biomateriales activos mencionados anteriormente y también reduce potencialmente el riesgo de que la unidad 30 de recogida llegue a contaminarse involuntariamente con patógenos antes de su uso; por tanto, un envase de este tipo ayuda a impedir que el sistema 10 produzca resultados de prueba no representativos.

Etapla 1: Inmediatamente antes del despliegue, el usuario 40, o una persona que supervisa las pruebas, retira la unidad 30 de recogida de su envase hermético. El usuario 40 coloca su boca en el orificio 80 de entrada del tubo 70 de muestras.

Etapla 2: A continuación, si se requiere ayuda en la producción de una muestra por parte del usuario 40, se genera una niebla de solución salina o bien desde dentro del tubo 70 de muestras, por ejemplo desde un atomizador de depósito de gas presurizado en miniatura acoplado al mismo, o dentro de un dispositivo de nebulización conectado a distancia a la unidad 30 de recogida; de manera conveniente, el dispositivo de nebulización es un dispositivo similar a una bomba accionada con el pie. El usuario 40 inhala la niebla de solución salina a través del orificio 80 de entrada, induciendo la niebla tos suficientemente vigorosa como para que el usuario 40 exhale esputo y/o moco en forma de un aerosol a través del orificio 80 al interior del tubo 70 de muestras. El aerosol pasa al interior del tubo 70 y se impulsa por el perfil aerodinámico interno del tubo 70 a circular y desacelerar en una trayectoria similar a un torbellino para depositar moco y/o esputo sobre las paredes internas del tubo 70. Preferiblemente, se incluye un volumen de recogida, por ejemplo la bolsa 100 inflable de material de plástico tal como polietileno o poli(cloruro de vinilo) (PVC), conectada al orificio 90 intermedio para alojar el aire exhalado por el usuario 40; cada tos puede equivaler a un volumen de dos litros de aire, por lo que la bolsa 100 está dimensionada convenientemente para adaptarse a varias toses. Más preferiblemente, la bolsa 100 de recogida está dotada de un orificio 105 de salida de gas que comprende un filtro fino que tiene un tamaño de poro que es suficientemente grande como para permitir que la bolsa 100 se desinfla a lo largo de un periodo de varias decenas de segundos, haciendo de ese modo que la

bolsa 100 tenga posteriormente un tamaño conveniente para manipularse cuando se desinfla, pero también suficientemente pequeño como para impedir sustancialmente la diseminación de patógenos potenciales exhalados por el usuario 40. Además, el orificio 90 intermedio es de resistencia al flujo moderada en relación con el orificio 80 de entrada y el orificio 105 de salida y se incluye preferiblemente entre el tubo 70 de muestras y su bolsa 100 asociada para potenciar la trayectoria del gas en torbellino mencionada anteriormente y promover la deposición eficaz de moco y/o esputo dentro del tubo 70 de muestras.

Alternativamente, puede recogerse una muestra de saliva del sujeto de prueba a través de la acción de escupir en el aparato de recogida de muestras.

Etapas 3: Cuando se recoge una muestra de esputo y/o moco suficientemente grande dentro de la unidad 30 de recogida, se coloca una tapa de sellado (no mostrada en la figura 1, pero indicada con 900 en la figura 2) sobre el orificio 80 de entrada. A continuación, se acciona el émbolo 110 para concentrar mecánicamente el esputo y/o moco dentro de una región de examen, por ejemplo una superficie 120 óptica del émbolo 110; en particular, el esputo y/o moco se concentra sobre la superficie 120 de examen óptico prevista en una cara de extremo del émbolo 110, pudiendo soportar la superficie 120 óptica la propagación de radiación de examen evanescente que se describirá en más detalle más adelante. Preferiblemente, el émbolo se empuja y se hace rotar dentro del tubo 70 de muestras para concentrar mecánicamente la muestra de prueba en la superficie 120. Más preferiblemente, el émbolo 230 se hace rotar al menos 360° para garantizar que se recoge la mayor cantidad de muestra posible sobre un saliente de recogida de muestras del émbolo.

Puede ser necesario un periodo de incubación antes de examinar ópticamente la muestra para generar una lectura de medición.

Etapas 4: Cuando se ha empujado el émbolo 110 de manera sustancialmente completa hacia el interior del tubo 70 de muestras para recoger completamente la muestra sobre la superficie 120 óptica, se presenta entonces la unidad 30 de recogida a la unidad 50 lectora de modo que un saliente 130 de la misma se acopla en el émbolo 110 para permitir el examen óptico de la superficie 120 óptica para determinar las propiedades ópticas de la muestra en la misma; un examen óptico de este tipo se logra preferiblemente mediante propagación de luz evanescente en la superficie 120. Los resultados del examen óptico se presentan en la pantalla 60 al usuario 40 y/o persona que realiza la prueba asociado para establecer si el usuario 40 está infectado o no con uno o más patógenos, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, al que el sistema 10 es sensible.

Esto completa una visión general del funcionamiento del sistema 10.

Uno o más de la tapa de sellado, el tubo 70 de recogida y su émbolo 110 pueden tener incorporado en el mismo uno o más depósitos de líquido para tratar la superficie 120 óptica antes del examen óptico de la misma. Tales depósitos perforables contienen preferiblemente disoluciones tampón o reactivos tales como, pero no exclusivamente:

- (a) agentes de lisis para hacer que se fragmenten los patógenos recogidos, por ejemplo *Mycobacterium*;
- (b) agentes de enjuagado para enjuagar los fluoróforos desplazados de la superficie 120 óptica y/o inundar la superficie 120 óptica con fluoróforos acoplados a anticuerpos selectivos de patógeno;
- (c) agentes de reducción para disgregar el moco; y
- (d) agentes de revelado para la muestra tal como anticuerpos marcados.

Los reactivos pueden estar en forma de sólidos tales como una esfera liofilizada para protegerlos durante el almacenamiento; tales reactivos sólidos pueden estar presentes en uno o más depósitos o en el tubo 70 de recogida de muestras.

Estos uno o más depósitos están dispuestos preferiblemente para poderse perforar por el usuario para suministrar su contenido tras la recogida de muestras pero antes del examen óptico. La construcción mecánica de los depósitos se describirá más tarde con referencia a la figura 9.

Tal como se describirá adicionalmente más adelante, la superficie 120 óptica es una cara óptica de un prisma configurado para soportar propagación de radiación de luz evanescente a lo largo del mismo. El prisma se implementa preferiblemente como un prisma de Dove, aunque pueden emplearse tipos alternativos de prisma.

3. Piezas componentes del sistema

Ahora se describirá el diseño detallado de componentes individuales del sistema 10.

3.1 Unidad de recogida de muestras

En referencia a continuación a la figura 3, se muestra el tubo 70 de muestras hueco implementado como un tubo 200 de muestras hueco sustancialmente cilíndrico. El tubo 200 comprende un primer extremo abierto indicado mediante 210 para alojar una muestra exhalada procedente del usuario 40; el primer extremo 210 abierto corresponde al orificio 80 de entrada en la figura 1. Además, el tubo 200 comprende además un segundo extremo 220 para alojar un émbolo 230 hueco; el émbolo 230 corresponde al émbolo 110 de la figura 1. El tubo 200 también incluye un tubo 240 lateral sustancialmente cilíndrico que sirve como orificio 90 intermedio, teniendo el tubo 240 lateral un eje central longitudinal asociado sustancialmente ortogonal al del tubo 200 de muestras. En una región en la que los tubos 200, 240 colindan, se incluye preferiblemente una malla o gasa 250 de filtro. El tubo 200 comprende además un anillo 260 periférico alrededor del primer extremo 210 de modo que este extremo 210 está desprovisto sustancialmente de cualquier borde afilado que pudiera lesionar al usuario 40 que manipula el tubo 200, por ejemplo cuando el usuario 40 manipula el tubo 200 hacia su boca.

El émbolo 230 hueco también tiene forma sustancialmente cilíndrica y se fabrica para poderse mover de manera deslizante y rotacional concéntricamente dentro del interior del tubo 200 de muestras tal como se ilustra, estando el tubo 200 y el émbolo 230 en ajuste mutuamente preciso. Preferiblemente, el émbolo 230 está dotado de un anillo de sellado deformable elásticamente (no mostrado) sustancialmente en un extremo del émbolo 230 presentado al tubo 200 de muestras cuando está en uso. El anillo de sellado se fabrica preferiblemente de un material de caucho de nitrilo, por ejemplo material Viton patentado, silicona o politetrafluoroetileno (PTFE). Además, el anillo de sellado está desprovisto ventajosamente de cualquier material lubricante, por ejemplo grasa de silicona, que podría contaminar potencialmente las muestras recogidas dentro del tubo 200, y comprometer de ese modo el funcionamiento del sistema 10. Adicionalmente, el vapor emitido desde un lubricante puede ser potencialmente perjudicial para el usuario 40 si lo ingiere.

El tubo 200 hueco está dotado adicionalmente de un conjunto de atomización de solución salina indicado generalmente mediante 300 en una región del tubo 200 cerca del primer extremo 210 abierto. El conjunto 300 está acoplado preferiblemente a un nebulizador, por ejemplo un dispositivo de bomba accionado con el pie, para forzar solución salina a presión hacia el conjunto 300 para generar un chorro 310 divergente de niebla de solución salina para su inhalación por el usuario 40; la niebla de solución salina es eficaz para promover tos vigorosa para inducir la expulsión por parte del usuario 40 de esputo y/o moco. Preferiblemente, el chorro 310 comprende gotitas de solución salina que tienen un diámetro en un intervalo de 6 μm a 20 μm . Más preferiblemente, las gotitas de solución salina tienen un diámetro en un intervalo de sustancialmente 10 μm a 15 μm . La solución salina a partir de la cual se generan las gotitas tiene preferiblemente una concentración en un intervalo del 0,1% al 2% en peso de cloruro de sodio en agua; más preferiblemente, la solución salina tiene una concentración en un intervalo del 0,7% al 1,1% en peso. El conjunto 300 incluye un tubo 320 capilar sustancialmente central que está formando un ángulo en su extremo de boquilla hacia el primer extremo 210 abierto para reducir la cantidad de niebla de solución salina barrida hacia el émbolo 230. Preferiblemente, el conjunto 300 está rebajado en relación con la perforación interior del tubo 200 hueco de modo que puede hacerse avanzar el émbolo 230 hacia el primer extremo 210 más allá de una región en la que el conjunto 300 está conectado al tubo 200 hueco tal como se ilustra. El conjunto 300 está moldeado preferiblemente de manera solidaria como parte del tubo 200 hueco; alternativamente, con el fin de simplificar las herramientas de moldeo requeridas, el conjunto 300 puede ser una pieza de inserción retenida mediante ajuste a presión que se monta en un acceso lateral que sobresale del tubo 200 hueco durante la fabricación. Si se requiere, el acceso lateral puede moldearse con su eje central orientado hacia el primer extremo 210 de modo que la pieza de inserción no requiere que su tubo 320 capilar esté conformado hacia este extremo 210.

La inducción de generación de muestra más eficaz puede lograrse alternativamente mediante la inhalación de uno o más de vapor de agua, ésteres, expectorante y/o mentol.

En funcionamiento, el émbolo 230 se retrae de modo que su superficie de extremo indicada mediante 270 en la figura 4 esté sustancialmente en el segundo extremo 220 del tubo 200. En un estado de recogida de este tipo, el tubo 200 tiene la mayor parte de su superficie interior, preferiblemente más del 80% de la misma, expuesta al primer extremo 210. Además, en el estado de recogida, se proporciona un trayecto para el flujo de gas desde el primer extremo 210 a través de la gasa 250 y a través del tubo 240 lateral hacia la bolsa 100 (no mostrada en la figura 3) o directamente al ambiente; se prefiere descarga directa al ambiente cuando, por ejemplo, están realizándose pruebas de examen para patógenos menos peligrosos.

En el estado de recogida, el usuario 40 coloca el primer extremo 210 en su boca de modo que el anillo 260 se sitúa y sella sobre los labios del usuario. El usuario 40 o la persona que realiza la prueba activa entonces el conjunto 300, por ejemplo apretando una bomba de pie asociada, para expulsar el chorro 310 de niebla de solución salina que inhala el usuario 40. La niebla de solución salina inhalada produce una respuesta automática en el usuario 40 para que exhale de manera forzada produciendo gotitas de aire, moco y/o esputo en forma de una niebla fina que va a transportarse desde los pulmones del usuario 40 al interior del tubo 200. Una región del tubo 200 alrededor del segundo extremo 220 forma una región de gas de baja velocidad en la que el aire exhalado por parte del usuario se inclina para fluir en una trayectoria de remolino y deposita de ese modo su carga de gotitas de moco y/o esputo sobre las paredes laterales internas del tubo 200. Además, el aire exhalado del usuario 40 se descarga a través del tubo 240 lateral a una velocidad relativamente alta.

Puede emplearse adicionalmente una presión parcial negativa para ayudar a obtener la muestra.

De ese modo se proporciona una muestra para el análisis sobre la superficie interior del tubo 200, especialmente en la región del segundo extremo 220. Entonces se acciona el émbolo 230 en relación con el tubo 200 para recoger la muestra de la superficie interior del tubo 200 y luego para depositar la muestra recogida sobre una superficie de examen óptico del émbolo 230 para su posterior análisis y examen óptico; un accionamiento de este tipo también incluye preferiblemente la rotación del émbolo 230 en relación con el tubo 200.

Por tanto, el émbolo 230 está especialmente adaptado para recoger y concentrar mecánicamente la muestra. Ahora se describirán implementaciones del émbolo 230 con referencia a las figuras 4a y 4b.

En las figuras 4a y 4b, el émbolo 230 tiene forma sustancialmente cilíndrica y comprende una región 400 hueca central. El émbolo 230 está abierto en su primer extremo e incluye un reborde 410 circular para hacer tope sobre el segundo extremo 220 del tubo 200 cuando el émbolo 230 está insertado completamente en el tubo 200, limitando de ese modo el grado en que puede empujarse el émbolo 230 dentro del tubo 200. El émbolo 230 comprende la superficie 270 de extremo cuyo plano es sustancialmente perpendicular al eje longitudinal central del émbolo 230. En una región excéntrica de la superficie 270 tal como se muestra, se incluye un prisma 420 ópticamente transmisivo que se extiende al interior de la región 400 y un saliente 430 similar a una cuchara que se extiende hacia el exterior desde la superficie 270 lejos de la región 400. El saliente 430 similar a una cuchara es susceptible en uso de recoger moco y/o esputo de la superficie interior del tubo 200 sobre el mismo. El saliente 430 similar a una cuchara se extiende radialmente en la superficie 270 hasta una extensión periférica de la superficie 270. Un borde 440 periférico del saliente 430 se dispone preferiblemente para hacer contacto de manera deslizante sobre la superficie interior del tubo 200. Una abertura 450 óptica, también conocida como ventana de prisma, se incluye en la superficie 270 de extremo de modo que el prisma 420 esté en comunicación óptica con la muestra de esputo y/o moco recogida sobre el saliente 430.

El saliente 430 está preferiblemente curvado hacia su borde alejado del borde 440 periférico tal como se muestra en la figura 3b para mejorar el rendimiento del saliente 430 para retener sobre el mismo esputo y/o moco recogido de la superficie interior del tubo 200.

Además, el saliente 430 se fabrica preferiblemente de un material de plástico amoldable y se dispone para poderse doblar para aplastar su carga de material de muestra eficazmente a través de la abertura 450 óptica cuando se hace avanzar el émbolo 230 completamente dentro del tubo 200 y se empuja elásticamente contra la tapa de sellado mencionada anteriormente (no mostrada); los materiales de plástico adecuados para el saliente 430 incluyen uno o más de poli(cloruro de vinilo) (PVC), nailon, politetrafluoroetileno (PTFE), polietileno, polipropileno, alquileño y caucho de silicona. Si se requiere, la tapa de sellado puede dotarse de un rebaje para albergar el saliente 430 de modo que una superficie de extremo no rebajada plana de la tapa de sellado adyacente al rebaje se extiende para empujar y diseminar una acumulación de material de muestra sobre una región lateral del saliente 430 orientada hacia la abertura 450 óptica de manera sustancialmente uniforme sobre la abertura 450, dotando de ese modo al sistema 10 de sensibilidad de detección potenciada. Si se requiere, puede reducirse el grosor del saliente 430 hasta obtener un cuello fino relativo donde se une sobre la superficie 270 de extremo para proporcionar una forma de bisagra de modo que el saliente 430 puede inclinarse como una solapa para aplastar el material de muestra sobre la abertura 450 óptica.

Con el fin de simplificar el diseño del saliente 130 de la unidad 50 lectora, el saliente 130 adaptado para su inserción en la región 400 hueca del émbolo 230, es deseable que el prisma 420 se monte excéntricamente pero lejos de la extensión periférica de la superficie 270. Cuando el prisma 420 y su abertura 450 óptica asociada se disponen de este modo, el saliente 430 tiene preferiblemente una forma generalmente de "V" tal como se ilustra en la figura 4c. Una forma de "V" de este tipo es especialmente eficaz para recoger y retener una masa sustancial de muestra recogida en la misma. Alternativamente, tal como se ilustra en la figura 4b, el saliente 430 puede tener forma continuamente curvada; preferiblemente, el saliente 430 en su borde alejado también está curvado hacia la abertura 450 óptica más cerca de un eje longitudinal central del émbolo 230.

El émbolo 230 se fabrica como un elemento hueco de modo que el émbolo 230 puede alojar el saliente 130 de la unidad 50 lectora en la región 400. El saliente 130 comprende un módulo de componentes electrónicos y tiene preferiblemente forma cilíndrica sólida tal como se ilustra en la figura 5 y se indica generalmente mediante 500. Mientras que, en uso, el tubo 200 de muestras y su émbolo 230 asociado están diseñados para ser elementos desechables, la unidad 50 lectora está dispuesta para reutilizarse ya que comprende piezas componentes moderadamente costosas en la misma, por ejemplo un tubo fotomultiplicador y un láser de diodo, que se describirán en más detalle más adelante. El saliente 130 tiene preferiblemente forma alargada que comprende un primer extremo 520 y un segundo extremo que interactúan sobre un módulo que incluye la pantalla 60. El primer extremo 520 comprende una región 510 óptica que interactúa dispuesta excéntricamente dispuesta para alinearse con la abertura 450, concretamente la ventana de prisma, cuando el saliente 130 se inserta en la región 400 hueca del émbolo 230 para examinar una muestra recogida sobre el saliente 430 similar a una cuchara.

El tubo 200 de muestras, el émbolo 230 y el saliente 130 son ventajosos porque pueden compactarse en

almacenamiento debido a su capacidad de montaje concéntrico entre sí. Además, el tubo 200 en combinación con el émbolo 230 puede recoger y concentrar mecánicamente de manera sustancial toda la muestra exhalada por el usuario 40. Además, el émbolo 230 puede permitir que la unidad 50 lectora examine la muestra sin entrar en contacto con la muestra, haciendo así que la unidad 50 lectora sea reutilizable; los costes de funcionamiento también se reducen de ese modo.

El tubo 200 de muestras con sus tubos laterales asociados, y el émbolo 230 se fabrican preferiblemente de materiales de plástico, por ejemplo uno o más de materiales de plástico de acrilato, polietileno, polipropileno, nailon, caucho de silicona, poli(cloruro de vinilo) (PVC), alquileño, policarbonato y politetrafluoroetileno (PTFE). Más preferiblemente, al menos uno del tubo 200 y el émbolo 230 se moldean por inyección. Alternativamente, uno o más del tubo 200 de muestras y sus tubos laterales asociados, y el émbolo 230 pueden fabricarse de lámina de metal extruida o incluso pueden fabricarse mediante técnicas de metal fundido a presión.

Lo más preferiblemente, el tubo 200 de muestras, el émbolo 230 y su acceso 240 asociado y el filtro 250 se moldean como una única pieza componente. Asimismo, el émbolo 230 con su saliente 430 asociado y el prisma 420 se moldean preferiblemente como un único componente de un material de plástico de manera sustancial ópticamente transparente, por ejemplo un material de plástico de policarbonato o acrílico. Alternativamente, el émbolo 230 puede fabricarse de un material de plástico sustancialmente negro, por ejemplo PVC, y el prisma 420 se monta posteriormente en el mismo; el uso PVC es ventajoso para la protección del prisma 420 de la iluminación ambiental parásita, y también para la protección del extremo remoto del saliente de la iluminación ambiental cuando se inserta en el émbolo 230 durante la medición.

En la superficie de extremo, el émbolo 230 puede incluir opcionalmente un pequeño orificio, por ejemplo un orificio sustancialmente redondo que tiene un diámetro en un intervalo de 0,1 mm a 2,5 mm. Este orificio es ventajoso para inyectar una niebla de pulverización atomizada, por ejemplo una niebla de solución salina, en el tubo 200 de muestras cuando se despliega para recoger una muestra de moco y/o esputo procedente del usuario 40. La inyección de una niebla de este tipo en el tubo 200 antes de que el usuario 40 exhale la muestra para su recogida sobre las superficies interiores del tubo 200 es beneficiosa para obtener cantidades sustanciales de gotitas de moco procedentes del usuario 40. Para otros tipos de bioensayo, se encuentra que es deseable la adición de una pequeña cantidad de líquido, por ejemplo una solución salina o una disolución tampón, porque ayuda en la difusión de microbios, por ejemplo bacterias, que van a someterse a prueba hacia la abertura 450 óptica. Tales líquidos pueden añadirse al sistema 10 o bien antes o bien después de la recogida de muestras, usando según sea apropiado, por ejemplo, un pulverizador de aerosol o gotitas desde una pipeta.

El tubo 200, el émbolo 230 y el saliente 130 se fabrican ventajosamente para estar dentro de intervalos de tamaño preferidos. Por ejemplo, el tubo 200 de muestras tiene preferiblemente un diámetro en un intervalo de 20 mm a 30 mm. Además, el tubo 240 lateral tiene preferiblemente un diámetro en un intervalo de 1 mm a 10 mm, más preferiblemente en un intervalo de 5 mm a 8 mm. Además, el tubo 200 de muestras tiene preferiblemente una longitud en un intervalo de 40 mm a 150 mm, más preferiblemente en un intervalo de 50 mm a 80 mm. La abertura 450 óptica tiene preferiblemente un área en un intervalo de 9 mm² a 64 mm². Se apreciará que estas dimensiones son apropiadas para el sistema 10 diseñado para su uso con sujetos humanos. Otras especies requerirán que se modifiquen apropiadamente estas dimensiones.

El tubo 200 de muestras y su émbolo 230 asociado están dotados preferiblemente de un mecanismo de bloqueo de manera que cuando la muestra de moco y/o esputo se ha concentrado mecánicamente dentro del tubo 200 y se ha suministrado eficazmente sobre la abertura 450 óptica y el émbolo 230 se ha movido a su posición de medición, el émbolo 230 se bloquea mecánicamente en su posición en relación con el tubo 200 de muestras. Un mecanismo de este tipo es ventajoso porque puede impedir que el tubo 200 de muestras y su émbolo 230 se reutilicen; en las partes más pobres del mundo, existe la tentación de reutilizar piezas médicas, por ejemplo jeringas. Más preferiblemente, inserción del saliente 130 de la unidad 50 lectora desencadena el enganche de tal mecanismo para impedir su reutilización. La tentación de reutilización puede producirse potencialmente cuando el sistema 10 muestra una indicación no positiva de la presencia de un patógeno. Un mecanismo de bloqueo de este tipo es ventajoso adicionalmente porque el bloqueo del tubo 200 de muestras al émbolo 230 junto con la tapa de sellado forma una región encerrada para aislar patógenos peligrosos. Todavía más preferiblemente, la tapa de muestra también encaja a presión sobre el tubo 200 de modo que los dos no pueden desengancharse posteriormente.

Con el fin de potenciar un torbellino generado dentro del tubo 70, 200 de muestras y mejorar de ese modo la deposición de esputo y/o moco en el mismo, el tubo 70, 200 puede estar dotado de características adicionales para modificar el flujo de aire en el mismo. En referencia a la figura 6, se muestra un tubo de recogida de muestras modificado indicado generalmente mediante 600, incluyendo el tubo 600 un orificio 610 de septo anular incluido entre el conjunto 300 de atomizador y el tubo 240 lateral. El septo 610 se incluye preferiblemente lo más cerca posible del extremo 210. Además, el orificio 610 de septo se moldea de manera preferible para que sea una parte solidaria de una pieza 620 cilíndrica del tubo 600. El saliente 430 del émbolo 230 se hace preferiblemente flexible de modo que el avance del émbolo 230 al interior del tubo 600 tras la recogida de muestras en el mismo hace que el saliente 430 se flexione contra el orificio 610 de septo para aplastar la muestra sobre la abertura 450 óptica.

El orificio 610 de septo ayuda a potenciar el arrastre periférico para generar remolinos y la formación de múltiples torbellinos complejos correspondiente, potenciando de ese modo la deposición de moco y/o esputo sobre una superficie interior de la pieza cilíndrica del tubo 600. Además, el orificio 60 también ayuda a impedir que la niebla de solución salina invada las regiones del tubo 600 más alejadas del usuario 40 en uso. Preferiblemente, el orificio 610 de septo está rebajado detrás del extremo 210 en una distancia del orden de 5 mm a 15 mm. Además, el orificio 610 de septo incluye preferiblemente un orificio central que tiene un diámetro en un intervalo de sustancialmente 3 mm a 20 mm. El orificio 610 de septo se fabrica preferiblemente de un material plegable (por ejemplo un plástico flexible) con el fin de que la muestra recogida sobre las paredes del tubo 200 de muestras, más próximo a la boca del usuario 40, pueda concentrarse sobre la abertura 450 óptica.

El tubo 200 de muestras puede modificarse alternativamente para incluir una curva direccional cerca de la abertura 210 para generar un tubo de recogida de muestras indicado generalmente mediante 650. El conjunto 300 se incluye preferiblemente en una parte de curva exterior del tubo 650 tal como se ilustra para inyectar niebla de solución salina hacia el extremo 210. La curva bidireccional produce un arrastre asimétrico espacialmente variable de aire que promueve la formación de remolinos.

Con el fin de obtener un rendimiento de recogida excelente, puede emplearse una combinación de las características de los tubos 600, 650.

Son posibles realizaciones alternativas adicionales de la unidad 30 de recogida de muestras.

Por ejemplo, en la figura 7, se muestra una cámara de recogida de muestras indicada generalmente mediante 700. La cámara 700 comprende un conducto 720 de entrada de sustancialmente 25 mm de diámetro para suministrar aliento exhalado procedente del usuario 40 a una caja 710 de recogida. Más preferiblemente, el conducto 720 de entrada tiene un diámetro en un intervalo de 18 mm a 30 mm. La caja 710 de recogida incluye en su periferia un prisma 750 susceptible de promover la propagación de radiación evanescente en una superficie expuesta de la misma orientada hacia el interior de la caja 710 donde se produce la deposición de moco y/o esputo procedente del aliento exhalado. La recogida de muestras sobre la superficie expuesta se promueve mediante un torbellino generado dentro de la caja 710; este torbellino se potencia especialmente cuando el conducto 760 de salida de la caja 710 tiene un diámetro que es menor que el del conducto 720 de entrada. Preferiblemente, el diámetro del conducto 760 de salida es sustancialmente 5 mm, aunque se prefiere especialmente un diámetro en un intervalo de 2 mm a 10 mm. El prisma 750 puede situarse en cualquier posición en las paredes de la caja 710 con el fin de recoger muestras en el mismo.

El aliento exhalado desde la caja 710 se transmite de manera beneficiosa a lo largo del conducto 760 de salida hacia la bolsa 100 y su orificio 105 de salida de gas asociado. Alternativamente, la salida del aliento exhalado de la caja 710 puede hacerse pasar inicialmente a través de un filtro para eliminar patógenos y luego descargarse al ambiente o a la bolsa 100. De manera beneficiosa, puede incorporarse un tubo de Venturi en los conductos de entrada y/o salida para ayudar con la formación de torbellinos dentro de la caja 710. El conducto 760 de salida y el conducto 720 de entrada pueden colocarse en cualquier posición uno en relación con el otro y el prisma 750, dentro de la caja 710.

Ahora se describirá adicionalmente el saliente 130 de la unidad 50 lectora en más detalle con referencia a las figuras 8a y 8b. Con el fin de obtener una lectura óptima del prisma 420, los componentes de examen óptico de la unidad 50 lectora se alojan preferiblemente dentro del conjunto. El saliente 130 comprende por tanto un tubo 800 fotomultiplicador (tubo PM) y un láser de diodo. Ventajosamente, el tubo 800 PM es un dispositivo patentado fabricado por Hamamatsu Photonics K.K. de Japón, teniendo el dispositivo el número de pieza R7400U-01. Una cara fotosensible del tubo 800 PM está orientada hacia la región 510 de superficie de contacto óptica, preferiblemente lo más cerca posible a la misma espacialmente. Además, el saliente 130 comprende además un láser 810 de diodo de estado sólido. La configuración representada en la figura 8a es la más preferida ya que da como resultado menos pérdidas ópticas cuando se acopla la radiación óptica a la abertura 450 óptica. Sin embargo, especialmente cuando el saliente 130 tiene un diámetro exterior relativamente pequeño, es conveniente que el láser 810 de diodo se acople a través de una guía 820 de luz, que comprende por ejemplo un haz paralelo de guías de ondas de fibra óptica. En una versión convencional relativamente mayor del saliente 130 ilustrada en la figura 8b, el láser 810 de diodo y el tubo 800 PM se montan adyacentes entre sí, requiriendo de ese modo que se emplee sólo una longitud relativamente más corta de guía de luz. Sin embargo, en una versión compacta relativamente más pequeña del saliente 130 representado en la figura 8b, el láser 810 de diodo se coloca detrás del tubo 800 PM tal como se ilustra y se emplea una sección relativamente más larga de conducto 830 de luz para transmitir la luz desde el láser 810 de diodo hacia la región 510 de superficie de contacto. Si se requiere, el saliente 130 puede fabricarse de metal fundido a presión, mecanizado o extruido y el láser 810 de diodo puede acoplarse térmicamente a la pared periférica del saliente 130 para fines de enfriamiento. Consideraciones térmicas similares están relacionadas con el tubo 800 PM aunque este dispositivo disipa una potencia relativamente insignificante en funcionamiento. El diseño de la unidad 50 lectora que comprende el saliente 130 y sus piezas asociadas se describirá en más detalle más adelante.

En referencia de nuevo a la figura 2, la tapa de sellado mencionada anteriormente aplicada al tubo 70 de recogida se indica mediante 900. La tapa 900 se ilustra en sección transversal en más detalle en la figura 9, comprendiendo la tapa 900 un componente 905 de cuerpo principal, depósitos 910, 920 de líquido primero y segundo que incluyen

masas 930, 940 de líquido, respectivamente, y una parte 950 superior de sellado unida herméticamente al componente 905 de cuerpo para sellar las masas 930, 940 de líquido dentro de la tapa 900. El componente 905 de cuerpo y la parte 950 superior de sellado se fabrican preferiblemente de un material de plástico altamente flexible, por ejemplo caucho de silicona blando. La parte 950 superior de sellado es sustancialmente una membrana flexible fina relativa que incluye regiones 960, 970 abovedadas alineadas con depósitos 920, 910 correspondientes, respectivamente. Unidos centralmente a las regiones 960, 970 abovedadas hay pasadores 980, 990 de acero, respectivamente. Los pasadores 980, 990 de acero tienen extremos ensanchados romos cuando se moldean en la parte 950 superior de sellado, y extremos puntiagudos afilados cuando están orientados hacia regiones de extremo de los depósitos 920, 910. La tapa 900 de sellado comprende además una característica 1000 de retención, por ejemplo una pieza de inserción dentada con dientes dirigidos hacia atrás que se unen en el tubo 70, 200 de recogida, para permitir que la tapa 900 se inserte fácilmente en el tubo 70, 200 pero no se retire del mismo de nuevo.

En funcionamiento, el usuario 40, o preferiblemente la persona que realiza la prueba, aprieta las regiones 960, 970 abovedadas para hacer que los pasadores 980, 990 perforen sus depósitos 920, 910 respectivos para liberar el contenido de sus masas 940, 930 de líquido respectivas dentro del tubo 70, 200 de muestras, para procesar químicamente el moco y/o esputo recogido en la abertura 450 óptica del émbolo 110, 230.

En la fabricación, el componente 905 de cuerpo se orienta de modo que su cara 1010 de extremo se oriente hacia abajo. Entonces se llenan los depósitos 910, 920 con sus masas 930, 940 de líquido respectivas y entonces la parte 950 superior de sellado que comprende sus pasadores 980, 990 se suelda ultrasónicamente, o se une herméticamente de otro modo, en un rebaje moldeado en el componente 905 de cuerpo tal como se ilustra.

Aunque en la figura 9 se muestran dos depósitos 910, 920, se apreciará que la tapa 900 de sellado puede fabricarse para que tenga uno o más depósitos. Además, la composición de las masas 930, 940 de líquido puede variarse dependiendo del tipo de patógeno que va a detectar el sistema 10. Por ejemplo, una de las masas de líquido puede ser un agente de lisis bacteriano biológico mientras que la otra de las masas de líquido puede ser un agente marcador fluorescente biológico. Estos agentes se describirán en más detalle más adelante.

3.2 Unidad lectora

La unidad 50 lectora ilustrada en la figura 1 se describirá ahora en más detalle.

En referencia a la figura 10, se muestra una configuración óptica indicada generalmente mediante 1100. Esta configuración 1100 se emplea en el sistema 10 y sus piezas se distribuyen entre la unidad 50 lectora y su saliente 130 asociado, y el émbolo 110, 130.

En particular, la unidad 50 lectora en su saliente 130 incluye el láser 810, la guía 820, 830 de luz (si se requiere), un filtro 1120 óptico, el tubo 800 PM (y fuente de alimentación asociada, no mostrado) y un detector 1130 de diodo de estado sólido en miniatura. Una pieza principal de la unidad 50 lectora incluye la pantalla 60, un microcontrolador 1150 para ejecutar cálculos, un desmodulador 1140 síncrono y un circuito 1160 estroboscópico.

El émbolo 110, 230 comprende un prisma 420; en particular, el prisma 420 preferido es un prisma de tipo Dove de forma trapezoidal de sección transversal tal como se ilustra. Una cara frontal principal del prisma proporciona la abertura 450 óptica que está recubierta con una capa 1110 biológicamente activa que se describirá en más detalle más adelante.

Ahora se describirá la interconexión de las piezas componentes con referencia a la figura 10. El microcontrolador 1150 incluye una salida de datos que está acoplada a la pantalla 60. En su configuración más sencilla, la pantalla 60 incluye simplemente un indicador de sí/no para indicar si un patógeno dado está presente o no en la muestra de moco y/o esputo por encima de un umbral predefinido. En una configuración más compleja, la pantalla 60 proporciona una medida cuantitativa de la concentración de patógenos presentes en las muestras de moco y/o esputo que están examinándose; la pantalla 60 puede ser una más de una pantalla de cristal líquido (LCD), por ejemplo una pantalla LCD alfanumérica, una pantalla emisora de luz (LED) y una pantalla de plasma en miniatura. El microcontrolador 1150 también está conectado en su salida al circuito 1160 estroboscópico para modular la potencia aplicada al láser 810, modulando de ese modo temporalmente su haz 1200 de salida óptica lanzado a la guía 820, 830 de luz. Además, el microcontrolador 1150 también incluye una entrada S_3 para recibir una señal de salida desmodulada del desmodulador 1140 síncrono. El tubo 800 PM incluye una salida de señal S_1 que está conectada a una entrada de señal del desmodulador 1140 síncrono. Además, el detector 1130 de diodos incluye una salida de señal S_2 que está acoplada a una entrada estroboscópica del desmodulador 1140. El filtro 1120 óptico está incluido entre el tubo 800 PM y una cara 1170 de plano trasero principal más pequeña del prisma 420 tal como se ilustra; el filtro 1120 es eficaz en la transmisión de componentes de radiación que surgen de la interacción de ondas evanescentes en la capa 1110 activa y que reflejan y/o absorben la radiación dispersada generada directamente a partir de la dispersión de radiación primaria dentro del prisma 420.

Ahora se describirá el funcionamiento de la configuración óptica con referencia a las figuras 1 y 10. El usuario 40

activa el sistema 10, lo que provoca que el microcontrolador 1150 en combinación con el circuito 1160 estroboscópico genere una señal modulada para activar el láser 810 de diodo y de ese modo generar el haz 1200 estroboscópico correspondiente. Preferiblemente, la salida de longitud de onda de radiación del láser 810 se seleccionará para que coincida con la longitud de onda de excitación de los fluoróforos empleados para analizar la muestra de moco y/o esputo recogida sobre la abertura 450 óptica. Tales fluoróforos pueden seleccionarse para que sean sensibles de manera selectiva a diferentes longitudes de onda, por ejemplo longitudes de onda de radiación roja intensa, verde o azul. El uso de radiación de longitud de onda más larga del láser 810 correspondiente a radiación roja es preferible para reducir costes ya que los láseres de color rojo son muy económicos y están fácilmente disponibles. A la inversa, los diodos de láser de estado sólido que pueden producir radiación a longitudes de onda de radiación azul y verde relativamente más cortas en la actualidad son relativamente caros. Sin embargo, debe usarse un tubo PM que es sensible en la región espectral roja y estos son ligeramente más caros que los de la región azul/verde más sensibles. Sin embargo, la configuración 1100 óptica, por tanto, puede hacerse funcionar a diferentes longitudes de onda para coincidir con el tipo de fluoróforos empleados para analizar la muestra de moco y/o esputo, y el sistema 10 puede construirse para funcionar a cualquier frecuencia óptica deseada.

El haz 1200 es preferiblemente estroboscópico a una frecuencia en un intervalo de 100 Hz a 100 kHz. Más preferiblemente, el haz 1200 es estroboscópico a una frecuencia en un intervalo de 100 Hz a 1500 Hz. Lo más preferiblemente, el haz 1200 es estroboscópico a una frecuencia de sustancialmente 1030 Hz ya que esto hace que los circuitos amplificadores (no mostrados) asociados con el tubo 800 PM y el desmodulador 1140 síncrono sean más sencillos de diseñar usando componentes convencionales, ya que las restricciones de anchura de banda no son especialmente problemáticas a una frecuencia estroboscópica de este tipo. Además, 1030 Hz no es un armónico del suministro de red eléctrica de 50 Hz, haciendo de ese modo que el sistema 10 sea menos susceptible de resultar afectado por fuentes de luz fluctuantes de 50 Hz tales como cintas luminosas fluorescentes que funcionan con la red eléctrica frecuentemente encontradas en hospitales y clínicas.

Preferiblemente, el circuito 1160 estroboscópico puede hacerse funcionar para modular la corriente de inyección usada para excitar el láser 810 de modo que esta corriente se conmuta periódicamente por encima y por debajo del umbral de corriente de acción láser del láser 810. Alternativamente, el láser 810 puede hacerse funcionar a una intensidad de salida constante y un dispositivo modulador independiente, por ejemplo una célula de cristal líquido (LCD), se usa para modular temporalmente un haz de salida del láser 810 para generar el haz 1200 de radiación.

El láser 810 emite el haz 1200 estroboscópico que se propaga a través de la guía 820, 830 de luz para generar un haz 1210 de salida correspondiente que se propaga a una primera cara 1215 inclinada del prisma 420 y se refracta en la misma para generar un haz 1220 refractado correspondiente que subtiende a un ángulo θ en relación con una normal al plano de la abertura 450 óptica. Preferiblemente, el ángulo θ está en un intervalo de 62° a 80°. Más preferiblemente, el ángulo θ es sustancialmente 70°.

El haz 1220 refractado se propaga a la abertura 450 óptica y se refleja principalmente en la misma para generar un haz 1230 reflejado que entonces se propaga a una segunda cara 1235 inclinada del prisma 420 para surgir refractado de la misma como un haz 1240 que entonces se propaga al detector 1130. El haz 1240 da lugar a una señal estroboscópica en la salida S_2 que se usa como señal de referencia de modulación para el desmodulador 1140.

Cuando el haz 1220 incide sobre la abertura 450 óptica, una fracción de la radiación presente en el haz 1220 se acopla en el plano de la abertura 450 en forma de una onda 1245 evanescente. Esta onda 1245 evanescente se propaga en una región límite en la superficie de contacto de la capa 1110 biológicamente activa con el propio prisma 420. La región límite depende de la frecuencia y a las frecuencias en las que el sistema funciona ésta es eficaz solo en un grosor del orden de 100 - 200 nm. Por tanto, el acoplamiento del haz 1220 para formar la onda 1245 evanescente permite un examen óptico extremadamente eficaz de productos químicos presentes en la región límite. Si están presentes fluoróforos en la región límite, se excitan por la onda evanescente para generar radiación fluorescente. Preferiblemente, esta radiación fluorescente está a una frecuencia de radiación diferente de la del haz de modo que el filtro 1120 puede usarse para diferenciar la radiación dispersada del haz 1220 de la fluorescencia en la región límite mencionada anteriormente; concretamente, los fluoróforos presentes en la región límite pueden hacerse funcionar para proporcionar conversión de la longitud de onda de radiación.

La radiación fluorescente generada en la región límite se propaga desde la región límite a través del prisma 420 para salir de la cara 1170 de prisma y se propaga a través del filtro 1120 al tubo 800 PM haciendo que se genere una señal de detección correspondiente en la salida S_1 . La señal de detección pasa a la entrada de señal del desmodulador 1140 y se desmodula de manera síncrona en el mismo con respecto a la señal de la salida S_2 para proporcionar una señal desmodulada en la salida S_3 que pasa al microcontrolador 1150 para la posterior toma de muestras y la conversión a los correspondientes datos D. El microcontrolador 1150 procede entonces a comparar los datos D con un nivel umbral preprogramado T y determina de ese modo si están presentes o no patógenos en las muestras de moco y/o esputo recogidas sobre la abertura 450 óptica y examinadas por la radiación de onda evanescente que se propaga a lo largo de la misma.

Preferiblemente, el grado de fluorescencia, concretamente la magnitud de los datos D, puede determinarse antes de,

concretamente proporcionando los datos D1, y de nuevo después de, concretamente proporcionando los datos D2, recoger y concentrar mecánicamente la muestra de esputo y/o moco sobre la abertura 450 óptica. Se calcula entonces un valor de diferencia dado mediante la ecuación 1 (Ec. 1):

$$\Delta D = \text{módulo } (D_2 - D_1) \quad \text{Ec. 1}$$

en el microcontrolador 1140. Este valor de diferencia ΔD se compara entonces con el valor umbral T para determinar si están presente o no patógenos en la muestra. Un método de medición de diferencias de este tipo es eficaz en la eliminación de las contribuciones sistemáticas a la señal de detección proporcionada en la salida S₁; tales contribuciones sistemáticas pueden surgir de la dispersión dentro del prisma 420, de la fluorescencia residual dentro del prisma 420 especialmente si se fabrica de materiales de plástico y de la discriminación de longitud de onda de radiación finita proporcionada por el filtro 1120. Los materiales de plástico adecuados para fabricar el prisma 420 incluyen Perspex, acrilato, policarbonato y poli(metacrilato de metilo) (PMMA). Debe indicarse que siempre que sea posible se evita el uso de materiales de polímero que presentan fluorescencia.

Preferiblemente el valor umbral T se hace proporcional a la energía de radiación del examen óptico suministrada al haz 1210 a partir del láser 810. Más preferiblemente, el valor umbral T se hace proporcional a la energía de radiación en el haz 1240 recibida en el detector 1130 de modo que compensa la eficacia del acoplamiento óptico en el prisma 420 que puede variar posiblemente del émbolo 230 al émbolo 230, especialmente si las tolerancias mecánicas en la fabricación no se controlan estrechamente.

Aunque el uso del tubo 800 PM se describe en lo anterior, se apreciará que pueden emplearse posiblemente otros tipos de detectores ópticos, por ejemplo fotodiodos de avalancha, fototransistores o fotodiodos de ruido bajo. Si las consideraciones de señal-ruido lo permiten, el láser 810 se sustituye preferiblemente por un diodo emisor de luz (LED) de alto brillo y de bajo coste.

Si se requiere, el filtro 1120 puede comprender varios componentes de filtro óptico para potenciar su discriminación de longitudes de onda, por ejemplo utilizando varias capas de rejilla de difracción. Además, el microordenador 1150 puede programarse para compensar la deriva temporal estacionaria sistemática en la señal de detección por compensar las características de calentamiento del sistema 10 cuando se activa a partir de un estado frío. Puede hacerse una estimación de tal deriva examinando la abertura 450 óptica durante un periodo de algunos minutos antes de introducir la muestra concentrada mecánicamente en la misma.

Preferiblemente, el microcontrolador 1150 incluye un registrador de datos para registrar los resultados de prueba y códigos de referencia correspondientes para su descarga posterior a una base de datos desde la unidad 50 lectora. En una configuración de este tipo, la unidad 50 lectora incluye preferiblemente un teclado de introducción de datos de modo que a cada prueba realizada por la unidad 50 lectora puede asignarse una referencia de identificación. Cuando el microcontrolador 1150 está configurado para proporcionar una característica de registro de datos, el microcontrolador 1150 puede usarse posiblemente de manera eficaz durante una enfermedad epidémica para generar estadísticas de la tasa de infección por el patógeno.

Se apreciará que el sistema 10 puede adaptarse para examinar muestras líquidas de otras fuentes distintas del aliento exhalado. En referencia a la figura 11, se muestra una configuración alternativa para parte del sistema 10 para analizar un líquido, por ejemplo una muestra de sangre, que fluye o está estancada dentro de un tubo 1310. El prisma 420 es una pieza solidaria de, o está unido a, una región lateral del 1310. El haz 1210 pasa a través del prisma 420, al igual que los haces 1220, 1230, y excita los fluoróforos unidos a la cara principal del prisma 420 orientada en contacto hacia la muestra líquida dentro del tubo 1310. La fluorescencia de los fluoróforos en respuesta a la composición de la muestra líquida, por ejemplo sangre, la recibe el tubo 800 PM para generar una señal de detección estroboscópica en la salida S₁ para su posterior detección síncrona. El sistema 10 modificado según la figura 11 es por tanto susceptible de proporcionar una monitorización continua de sangre u otros fluidos corporales, por ejemplo orina, para detectar patógenos y por tanto tiene una posible aplicación generalizada en hospitales e instalaciones de procesamiento de fluidos corporales.

Además, si se requiere, una corriente de aire de muestra puede hacerse pasar de manera continua a través del tubo 1310 para detectar patógenos transportados por el aire, contaminantes tóxicos y vapores explosivos por ejemplo. Por tanto, el sistema 10 de medición biológica puede adaptarse posiblemente a otras aplicaciones distintas de simplemente detectar patógenos respiratorios tales como tuberculosis.

El prisma 420 de tipo Dove puede sustituirse en el émbolo 110, 230 por un prisma alternativo indicado generalmente por 1400 en la figura 12. El prisma 1400 tiene preferiblemente ángulos internos de 55°, 125°, 70° y 110° tal como se ilustra. Opcionalmente, una cara indicada por 1410 puede ser una superficie recubierta de espejo para potenciar el rendimiento de reflexión de la cara 1410 cuando refleja el haz 1210 para formar el haz 1220. Reduciendo las pérdidas de reflexión internas, el prisma 1400 puede conferir posiblemente una relación señal-ruido potenciada al sistema 10.

Además, pueden adoptarse primas de tipo Dove u otros en los que el ángulo de aceptación es tal que se inducen

múltiples reflexiones dentro del prisma. Por ejemplo, se describen prismas alternativos adecuados en un manual de C. N. Banwell y E.M. McCash, "Fundamentals of Molecular Spectroscopy" (1994) McGraw-Hill, 4ª edición que se incorpora al presente documento como referencia.

5 Debe apreciarse que se ha mostrado que la fluorimetría es de considerable importancia para la detección de materiales biológicos tales como proteínas y ADN, cuando se usan fluoróforos sobre anticuerpos como marcadores para la detección. La detección usando tal fluorimetría puede ejecutarse mediante o bien

(a) mediciones de fluorescencia en masa; o

10

(b) a través de la aplicación de técnicas de examen tales como detección de ondas evanescentes; o

c) espectroscopía de cavidad en anillo desplegable; o bien

15

(d) a través del uso de ensayos de desplazamiento.

Tal fluorimetría ofrece algunas posibles ventajas en cuanto a especificidad, simplicidad y sensibilidad. La detección de ondas evanescentes se conoce bien, pero no están disponibles comercialmente fluorímetros de ondas evanescentes de bajo coste para su uso en la detección de patógenos tal como se describe con respecto a la presente invención.

20

Debe apreciarse además que el análisis de muestras tras su recogida sobre una zona de examen óptico puede emprenderse usando medios distintos de fluorimetría, por ejemplo, pueden utilizarse marcadores radiactivos y fosforescentes o técnicas de quimioluminiscencia.

25

La detección también puede llevarse a cabo usando otras formas de espectroscopía, no asociadas con sistemas de inmunoensayo u ondas evanescentes. Por ejemplo, métodos de espectroscopía infrarroja pueden identificar la presencia de fragmentos moleculares específicos basándose en las "frecuencias de grupos" en regiones específicas del espectro infrarrojo; estos pueden realizarse usando geometrías tanto de transmisión como de reflexión en donde esta última detecta la absorción de radiación IR evanescente. Otras posibilidades son preferiblemente, pero no exclusivamente, detección de onda acústica de superficie (SAW) y resonancia de plasmón superficial (SPR) que pueden proporcionar una potenciación de la señal y por tanto aumentos en la sensibilidad.

30

4. Bioquímica del sistema

35

En lo anterior, el sistema 10 de medición se describe con respecto a su hardware. En la siguiente descripción, se esclarecerán ahora en más detalle los aspectos químicos del sistema 10.

4.1 Visión general de la bioquímica

40

El sistema 10 de medición puede hacerse funcionar según dos métodos de detección alternativos, concretamente o bien:

(a) mediante desplazamiento de fluoróforo que resulta de la presencia de un patógeno (concretamente ensayo de desplazamiento competitivo); o bien

45

(b) mediante unión a fluoróforo promovida por la presencia de un patógeno (concretamente ensayo de unión selectivo).

50

En el ensayo de desplazamiento competitivo, la señal de detección en la salida S₁ se reduce a medida que el patógeno se introduce en la unidad 30 de recogida de muestras. A la inversa, en el ensayo de unión selectivo, la señal de detección en la salida S₁ aumenta a medida que el patógeno se introduce en la unidad 30 de recogida. Ambos ensayos son pertinentes ya que determinados tipos de patógeno se detectan mejor mediante uno u otro de los ensayos.

55

En el ensayo de unión selectivo, la abertura 450 óptica se recubre durante la fabricación con un primer anticuerpo que se unirá al patógeno que va a detectarse. En funcionamiento, el patógeno se concentra mecánicamente sobre la abertura 450 óptica y se inmoviliza en la misma debido a su afinidad con el primer anticuerpo. A continuación, se liberan fluoróforos unidos a segundos anticuerpos que tienen afinidad por el patógeno en el tubo 70, 200 de muestras de modo que los fluoróforos se unen al patógeno inmovilizado a los primeros anticuerpos en la abertura 450 óptica. Si se requiere, los anticuerpos primero y segundo pueden ser idénticos, aunque esto no es esencial ya que los patógenos presentan frecuentemente varias regiones de superficie a las que pueden unirse diferentes anticuerpos. Los segundos anticuerpos y sus fluoróforos asociados pueden estar en forma de un líquido contenido en uno de los depósitos 910, 920 de la tapa 900 de sellado. Cuando el patógeno se ha inmovilizado directamente a los primeros anticuerpos en la abertura 450 óptica junto con los fluoróforos unidos a los segundos anticuerpos inmovilizados al patógeno, la radiación 1245 de ondas evanescentes puede interaccionar fuertemente con los

60

65

fluoróforos, generando de ese modo una fluorescencia significativa para su detección por el tubo 800 PM.

En el ensayo de unión competitivo, la abertura 450 óptica se recubre durante la fabricación con el primer anticuerpo que se unirá al patógeno que está investigándose. Además, durante la fabricación, se añaden fluoróforos unidos a análogos del patógeno que se unen débilmente al primer anticuerpo a la abertura 450 óptica. Cuando se aplica la muestra concentrada mecánicamente a la abertura 450, el patógeno en la misma desplaza los fluoróforos débilmente unidos y los análogos asociados y se une en sustitución a los primeros anticuerpos inmovilizados. Los fluoróforos débilmente unidos y los análogos asociados, cuando se desplazan, migran lejos de la región límite apoyando la propagación 1245 de ondas evanescentes provocando una disminución en la fluorescencia detectada por el tubo 800 PM. Preferiblemente, uno o más de los depósitos 910, 920 de la tapa 900 de sellado incluyen un agente de lavado para ayudar en la eliminación de los fluoróforos desplazados unidos a análogos asociados de la abertura 450 óptica de modo que se logra más rápidamente una lectura estable final.

Debe indicarse que los anticuerpos que pueden usarse para estas pruebas pueden ser de forma monoclonal o policlonal.

4.2 Inmovilización de anticuerpos

La inmovilización de anticuerpos a una superficie de vidrio o plástico, por ejemplo a la abertura 450 óptica, ya está bien estudiada, y existen muchos protocolos. Estos protocolos se derivan en gran medida del éxito de las pruebas de ELISA conocidas, en las que anticuerpos inmovilizados sobre una placa de 96 pocillos constituyen un componente crucial de tales pruebas. En el manual "Immobilized Biomolecules in Analysis: a practical approach", editado por T. Cass y F. S. Ligler (Oxford University Press), incorporándose dicho manual al presente documento como referencia, se proporciona una visión general exhaustiva de muchos protocolos de inmovilización.

Tales protocolos comprenden cada uno normalmente:

(a) una etapa de preparación, en la que se limpia una superficie y opcionalmente se activa;

(b) una etapa de incubación durante la cual se unen anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a la superficie; y luego

(c) una etapa de bloqueo para impedir la unión no específica de biomoléculas a la superficie.

Generalmente siguen etapas de enjuagado a las etapas de incubación y bloqueo. La superficie preparada se seca entonces y se almacena en una atmósfera seca. Los tiempos de incubación dependen en un grado significativo de la molécula (concretamente el patógeno) que va a capturarse y de la composición de la superficie.

La activación de la superficie se logra comúnmente irradiando la superficie, o exponiéndola a plasmas o productos químicos tales como silanos que incorporan un grupo activo al que pueden unirse anticuerpos. Una vez que existen grupos químicamente activos sobre la superficie, una etapa de incubación sencilla es suficiente habitualmente para unir los anticuerpos, denominándose también tales anticuerpos a continuación receptores.

4.3 Análogos para el ensayo de unión competitivo

Los análogos usados en el ensayo de desplazamiento competitivo mencionado anteriormente corresponden a moléculas o grupos moleculares que se unen a los receptores, por ejemplo anticuerpos, inmovilizados sobre la abertura 450 óptica del prisma 420, pero con una constante de asociación menor que la del patógeno que va a detectarse. Preferiblemente, la constante de asociación de análogo-receptor es menor del 10% de la constante de asociación de patógeno-receptor, y si es posible menor del 1%.

Estos análogos pueden ser moléculas similares de especies estrechamente relacionadas, por ejemplo hormona luteinizante de oveja que puede proporcionar un análogo de gonadotropina coriónica humana. Alternativamente, los análogos pueden ser moléculas sintetizadas para imitar la estructura del patógeno, especialmente el epítipo al que se une el anticuerpo, o una versión modificada del patógeno.

También es posiblemente ventajoso usar derivados del patógeno como análogos. Tales derivados pueden ser derivados artificiales tales como moléculas modificadas añadiendo grupos voluminosos o iónicos (que pueden reducir la energía de unión), añadiendo interferencia de carga o estérica, o uniéndose a un grupo voluminoso, que puede provocar un cambio conformacional en el sitio de unión del patógeno. En el caso de analitos que sean proteínas, la secuencia de aminoácidos correspondiente de la proteína puede modificarse cerca del sitio de unión al receptor mediante técnicas de biología molecular recombinante, tales como mutagénesis dirigida al sitio. Alternativamente pueden ser metabolitos naturales del analito diana.

Las técnicas requeridas para preparar tales análogos se conocen, y hay mucha técnica anterior sobre el diseño de tales análogos. Se conocen en la técnica modificaciones químicas de moléculas orgánicas, modificaciones bioquímicas de moléculas que se producen de manera natural y la síntesis de moléculas o miméticos estructurales.

La idoneidad de un análogo candidato puede determinarse mediante un ensayo ELISA competitivo entre el analito y el análogo candidato o mediante una medición de la constante de asociación con el receptor.

- 5 Están fácilmente disponibles anticuerpos policlonales y monoclonales reactivos contra patógenos tales como *Mycobacterium tuberculosis* de varios proveedores comerciales, por ejemplo Skybio Ltd. en el Reino Unido. Tales anticuerpos pueden adquirirse en lotes considerables y marcarse e inmovilizarse usando técnicas químicas conocidas convencionales.

4.4 Fluoróforos

- 10 La selección de fluoróforos adecuados para su uso en el sistema 10 tiene una importante relación con el rendimiento técnico del sistema 10, por ejemplo su relación señal-ruido y por tanto su capacidad para identificar el comienzo temprano de una enfermedad.

- 15 Hay muchos fluoróforos disponibles comercialmente. Las cualidades más significativas de tales fluoróforos son:

(a) su banda de absorción, que limita el intervalo de longitudes de onda de radiación de examen a las que pueden excitarse; y

- 20 (b) su banda de emisión, concretamente el intervalo de longitudes de onda a lo largo del cual se emite radiación fluorescente a partir de los fluoróforos cuando se excitan.

La banda de absorción debe solaparse tanto como sea posible con el espectro de la fuente de luz de examen usada, concretamente el láser 810 en el sistema 10; además, la banda de emisión debe solaparse en el menor grado posible con la banda de absorción. Estas cualidades limitan la variedad de fluoróforos que pueden usarse en el sistema 10. Otros factores que pueden influir en la elección de un fluoróforo óptimo para el sistema 10 son:

- 25 (a) la facilidad con la que el fluoróforo puede acoplarse a una molécula diana correspondiente, por ejemplo un anticuerpo o análogo; y

- 30 (b) la separación entre las bandas de absorción y emisión del fluoróforo; y

(c) el brillo de la radiación fluorescente emitida desde el fluoróforo.

- 35 La empresa comercial Molecular Probes fabrica y suministra una variedad comercial de colorantes fluorescentes denominados la serie de colorantes Alexa. Esta serie incluye varios fluoróforos brillantes con longitudes de onda de excitación óptimas que oscilan entre 346 nm y 684 nm, incluyendo muchas moléculas específicamente diseñadas para funcionar bien con fuentes de luz comunes tales como diodos láser brillantes o LED rojos. Existen muchos otros colorantes y se usan ampliamente, por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC), BODIPY, ficoeritrina, alofocianina (APC), rodamina, rojo Texas y verde Oregon. Algunos de estos colorantes y sus parámetros relevantes se enumeran en la tabla 1; si se requiere, puede emplearse uno o más de estos colorantes en el sistema 10 o bien solo o bien en combinación.

Tabla 1: Ejemplos de fluoróforos típicos susceptibles de usarse en el sistema 10

45

Nombre del colorante	Abreviatura	Pico de absorción (nm)	Pico de emisión (nm)
Isotiocianato de fluoresceína	FITC	493	520
R-ficoeritrina	RPE	495, 536	576
B-ficoeritrina	BPE	546	576
Rodamina	-	550	573
Rodamina B	-	578	604
Alofocianina	APC	630, 645	655, 660
Alexa Fluor 350	-	346	442
Alexa Fluor 430	-	433	539
Alexa Fluor 488	-	495	519
Alexa Fluor 532	-	532	554
Alexa Fluor 594	-	590	617
Alexa Fluor 633	-	632	647
Alexa Fluor 680	-	684	707
BODIPY 493/503	-	500	506
BODIPY 665/676	-	665	676
Cy5	-	649	666, 670
Rojo Texas	-	595	620
Isotiocianato de tetrametilrodamina	TRITC	550	573

Con el fin de potenciar el rendimiento, pueden unirse esferas de látex que incluyen materiales fluorescentes a uno o más de los anticuerpos y análogos con el fin de dotar al sistema 10 de una sensibilidad de detección potenciada. Tales esferas de látex pueden presentar un grado potenciado de radiación fluorescente en respuesta a la excitación por la onda 1245 de radiación evanescente en la abertura 450 óptica.

Están disponibles comercialmente esferas de látex de empresas tales como Dynal Biotech con una amplia gama de técnicas químicas de superficie; tales técnicas químicas de superficie pueden incluir fluoróforos y también conferir a las esferas propiedades magnéticas. En el tubo 70, 200 de muestras, la atracción magnética de esferas de látex que comprenden fluoróforos cuando se concentra mecánicamente la muestra de esputo y/o moco sobre el saliente 430 es altamente ventajosa para lograr una sensibilidad de medición potenciada a partir del sistema 10. Las esferas de látex usadas para este sistema están preferiblemente en el intervalo de 50 nm a 1 µm de diámetro; más preferiblemente, las esferas están en el intervalo de 100 nm a 200 nm de diámetro, concretamente en línea con la profundidad límite de la penetración de ondas evanescentes en la abertura 450 óptica.

En el ensayo de unión selectivo, pueden liberarse esferas de látex fluorescentes marcadas magnéticamente de uno de los depósitos 910, 920 de la tapa 900 de sellado al interior del tubo 70, 200 de muestras antes de la concentración mecánica de la muestra en la abertura 450 óptica; preferiblemente, la abertura 450 y/o el saliente 430 están dotados de uno o más imanes pequeños, móviles, permanentes en los mismos para ayudar en la recogida de esferas de látex. Tras la recogida y la concentración de la muestra sobre la abertura 450 óptica, el/los imán/imanes puede(n) pueden alejarse para permitir que las esferas que no se han unido químicamente a la abertura 450 difundan lejos dentro del líquido a granel, dejando sólo las especies unidas que van a detectarse en la abertura 450.

4.5 Potenciación de la sensibilidad de lisis opcional

La sensibilidad del sistema 10 a la detección de patógenos puede potenciarse empleando un procedimiento conocido como lisis. La lisis es el procedimiento de rotura de las células, por ejemplo microbios patógenos, para dar sus fragmentos componentes. Fluoróforos marcados con anticuerpo pueden unirse a estos fragmentos. Además, los fragmentos son susceptibles de unirse a anticuerpos en la abertura 450 óptica.

Hay una amplia variedad de métodos usados para lisar microbios, por ejemplo bacterias. Tales métodos comprenden uno o más de procedimientos químicos, mecánicos y térmicos. El experto en la técnica conoce estos procedimientos. La lisis de los patógenos recogidos dentro del tubo 70, 200 de muestras es ventajosa porque los fragmentos de lisis son susceptibles de unirse a los primeros anticuerpos inmovilizados en la abertura 450 óptica y también a los segundos anticuerpos unidos a fluoróforos asociados. Por tanto, la lisis puede potenciar la eficacia de detección en el ensayo de unión selectivo mencionado anteriormente dentro del sistema 10, por ejemplo en al menos un orden de magnitud. Asimismo, la lisis puede dar lugar a más sitios de desplazamiento competitivo en la abertura 450 óptica en el caso del ensayo de desplazamiento competitivo mencionado anteriormente.

Los métodos químicos de lisis implican el uso de enzimas tales como lisozima, o detergentes tales como SDS para descomponer las paredes celulares. Los métodos mecánicos descomponen físicamente las membranas celulares; los ejemplos de métodos mecánicos incluyen bombas de cavitación de nitrógeno, prensa francesa o prensa de Hughes, sonicación, perlas de vidrio o técnicas de lisis osmótica. La lisis térmica emplea extremos de variaciones de temperatura para destruir las paredes celulares; tales variaciones de temperatura pueden comprender congelación y descongelación repetidas de un cultivo celular.

Las micobacterias, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, son especialmente difíciles de lisar. Los tampones de lisis adaptados específicamente para micobacterias comprenden reactivos adicionales tales como lisozima para descomponer las paredes celulares de las micobacterias.

Durante la lisis, las enzimas liberadas de las regiones interiores de la célula atacan a menudo a las moléculas de interés para fines de detección dentro del sistema 10. Sin embargo, los tampones de lisis pueden formularse para que incluyan componentes adicionales tales como inhibidores de proteasas para impedir que la molécula diana se digiera o se desnaturalice. La tabla 2 proporciona una lista protocolos de lisis susceptibles de su uso dentro del sistema 10 para potenciar su rendimiento de detección de patógenos.

Tabla 2: Ejemplos de protocolos de lisis

Referencia	Método	Principios usados	Clase de diana
Prospecto de Gen-Probe	Sonicar durante 15 minutos en tampón de lisis y perlas de vidrio	Mecánicos, químicos	<i>Mycobacterium</i>
Pierre <i>et al.</i> , J. Clin. Micro. 29 (4): 712-717 (1991)	15 minutos a 95°C con NaOH 0,1 M, NaCl 2 M, SDS al 0,5%	Térmicos, químicos	<i>Mycobacterium</i>
Hurley <i>et al.</i> Int. J. Systematic Bacteriology 38 (2):143-146	3 minutos en batidora de miniperlas con fenol destilado y perlas de zirconio	Mecánicos	<i>Mycobacterium</i>

(1988)			
Robson <i>et al.</i> , patente estadounidense 5376527	Calentar durante de 2 a 15 minutos a de 60°C a 100°C	Térmicos	<i>Mycobacterium</i>
Información de producto de Pierce	Agitar la muestra con reactivo de extracción de proteínas bacterianas B-PER durante 10 minutos	Químicos	<i>Mycobacterium</i>

La lisis se realiza preferiblemente en el aparato 30 de recogida o bien antes de que se haya producido la concentración mecánica de la muestra en el mismo o bien después de que se haya logrado la concentración mecánica.

Se apreciará que la sensibilidad del sistema 10 puede potenciarse adicionalmente utilizando muchas técnicas de amplificación conocidas empleadas en inmunoensayos convencionales. Tales técnicas de amplificación incluyen, pero no se limitan a, técnicas de tipo sándwich de biotina/axidina o biotina/estreptavidina y ensayos ligados a enzimas. Además, pueden usarse sustancias cromogénicas en sustitución, o además de, los fluoróforos, por ejemplo como en ensayos ELISA, que producen un cambio de color en disolución en vez de una señal fluorescente como en el sistema 10 descrito anteriormente. Tal cambio de color puede detectarse electrónicamente usando detectores electrónicos sensibles al color o usando la vista simplemente.

4.6 Descripción de las interacciones bioquímicas dentro del sistema

Con el fin de describir más completamente el funcionamiento del sistema 10, especialmente con respecto a las reacciones bioquímicas que se producen en el mismo, se hará referencia a las figuras 13 a 15.

4.6.1 Ensayo de unión selectivo

En referencia a la figura 13, se ilustra un proceso de unión que se produce en el funcionamiento dentro del tubo 200 de muestras en la abertura 450 óptica.

En la ETAPA A, los primeros anticuerpos indicados mediante 1500 se unen a la superficie 450 de abertura óptica, los primeros anticuerpos 1500 depositados durante la fabricación del émbolo 110, 230. La superficie óptica se examina ópticamente con radiación de ondas evanescentes y se mide un primer grado de fluorescencia.

En la ETAPA B, la muestra de moco y/o esputo se concentra mecánicamente dentro del tubo 70, 200 de muestras tal como se describió anteriormente y se deposita en la abertura 450 óptica mientras que patógenos 1520 de interés específicos se unen a los primeros anticuerpos 1500 tal como se ilustra.

En la ETAPA C, los segundos anticuerpos 1530, 1540 marcados con fluoróforo se liberan de uno o más de los depósitos 910, 920 de la tapa 900 de sellado rompiéndolos tal como se describió anteriormente con referencia a la figura 9; los anticuerpos 1530, 1540 marcados con fluoróforo se lavan sobre la superficie óptica 450 como en la ETAPA B y se unen a los patógenos 1520 específicos en la ETAPA C. La abertura 450 óptica con sus primeros y segundos anticuerpos, 1500, 1530, patógeno 1520 y fluoróforos 1540 unidos puede examinarse ópticamente entonces usando radiación de ondas evanescentes de magnitud idéntica a la usada para determinar el primer grado de fluorescencia, permitiendo de ese modo que se mida un segundo grado de fluorescencia. Una diferencia entre los grados de fluorescencia primero y segundo proporciona una indicación de la presencia de los fluoróforos 1540 a partir de los cuales puede deducirse la presencia del patógeno 1520.

Una variación en el procedimiento de la figura 13 es posible tal como se representa en la figura 14.

En la ETAPA 1 de la figura 14, el patógeno 1520 en forma de moco y/o esputo se deposita sobre las paredes interiores del tubo 70, 200 de muestras.

En la ETAPA 2, los segundos anticuerpos 1530 y sus fluoróforos 1540 asociados en forma de esferas de látex se liberan entonces de uno o más de los depósitos 910, 920 en la tapa 900 de sellado. Los segundos anticuerpos 1530 se unen al patógeno 1520 dentro del tubo 200 de muestras. El émbolo 230 se usa entonces para concentrar mecánicamente los patógenos 1520 unidos a sus segundos anticuerpos 1530 y esferas de látex relativamente grandes asociadas. Un orden de etapas de este tipo significa que hay una masa de fluido relativamente más grande para recoger que en la figura 13; esta masa relativamente más grande es beneficiosa cuando se deposita relativamente poco moco y/o esputo dentro del tubo 200.

En la ETAPA 3, los patógenos 1520 unidos a los segundos anticuerpos 1530 y sus fluoróforos 1540 cargados en esferas de látex se presentan entonces a la abertura 450 óptica mientras que se unen a los primeros anticuerpos 1500 inmovilizados sobre la abertura 450. Los patógenos 1520, los anticuerpos 1500, 1530 y las esferas de látex cargadas con fluoróforos se unen de ese modo a la abertura 450 y emiten fluorescencia cuando se examinan con radiación evanescente señalizando la presencia del patógeno 1520 en la muestra.

4.6.2 Ensayo de unión competitivo

El ensayo de unión competitivo se representa en la figura 15.

En la ETAPA 1, la abertura 450 óptica tiene unida a la misma durante la fabricación los primeros anticuerpos 1500. Además, los análogos 1600 del patógeno 1520 que van a detectarse se añaden a la abertura 450 para que se unan débilmente a los primeros anticuerpos 1500 inmovilizados. Los análogos 1600 tienen asociados estrechamente a los mismos terceros anticuerpos 1610 unidos a los fluoróforos 1540; los fluoróforos 1540, si se requiere, pueden ser fluoróforos unidos en las esferas de látex mencionadas anteriormente.

En funcionamiento, la abertura 450 óptica se examina usando radiación evanescente para obtener una primera medición de fluorescencia. A continuación, se recoge una muestra de moco y/o esputo en la superficie interior del tubo 200. La muestra se concentra entonces mecánicamente usando el émbolo 230 tal como se describió anteriormente y finalmente se deposita sobre la abertura 450 óptica.

En la ETAPA 2, los patógenos 1520 en la muestra concentrada mecánicamente tienen mayor afinidad por los primeros anticuerpos 1500 y desplazan de manera competitiva a los análogos 1600 que se desprenden y migran con sus fluoróforos asociados a regiones alejadas desde donde la radiación evanescente se propaga a la abertura 450 óptica. La abertura 450 óptica se examina entonces una segunda vez con radiación de ondas evanescentes de amplitud idéntica a la usada para obtener la primera medición; se obtiene de ese modo una segunda medición de fluorescencia. Una diferencia entre las mediciones primera y segunda es indicativa del número de fluoróforos desplazados y por tanto, por deducción, de la presencia del patógeno 1520 en la muestra recogida.

4.6.3 Métodos de detección de ensayo que no implican fluorescencia u ondas evanescentes

El sistema 10 de medición puede adaptarse para utilizar un esquema de detección y marcaje que no se basa en la excitación de ondas evanescentes de fluorescencia. Un ejemplo de un esquema de este tipo se explicará resumidamente:

Método convencional:

ETAPA 1: Incubar la muestra con IgG unida a la superficie; cualquier analito presente se inmoviliza en la superficie mediante IgG

ETAPA 2: Enjuagar

ETAPA 3: Incubar con IgG marcada. Si está presente cualquier analito inmovilizado, se inmoviliza IgG marcada en la superficie

ETAPA 4: Enjuagar para eliminar marcador e IgG no unidos

ETAPA 5: Añadir agente de revelado si se requiere

ETAPA 6: Medir el resultado

Con todos los esquemas de este tipo, si se usan anticuerpos monoclonales dirigidos a dos epítomos diferentes, es posible potencialmente realizar las dos etapas de incubación simultáneamente, evitando de ese modo la necesidad de enjuagar entre las ETAPAS 2 y 4.

Los posibles marcadores incluyen, pero no se limitan a, las sustancias enumeradas en la tabla 3.

Tabla 3: Marcadores químicos

Técnica	Marcador	Agente de revelado	Medición
ELISA cromogénico	Enzima cromogénica	Sustrato enzimático	Colorimetría en masa
ELISA fluorogénico	Enzima fluorogénica	Sustrato enzimático	Fluorescencia en masa
Ensayo quimioluminiscente	Molécula quimioluminiscente	Sustrato quimioluminiscente	Quimioluminiscencia en la superficie
Radioinmunoensayo (RIA)	Radioisótopo	Ninguno	Radiación en la superficie
Ensayo de oro coloidal	Oro coloidal	Disolución de chapado (opcional) para aumentar el tamaño de los coloides	Colorimetría en la superficie

5.0 Aplicaciones para el uso del sistema de medición

El sistema 10 de medición biológica puede usarse en aplicaciones en las que la muestra no es un esputo y/o moco. Otras posibles muestras para su análisis mediante el sistema 10 incluyen, por ejemplo, una o más de:

- (a) sangre;
- (b) orina;
- (c) sueros patógenos;
- (d) semen;
- (e) saliva;
- (f) lágrimas; y
- (g) sudor.

Además, el sistema 10 de medición también puede adaptarse para examinar partículas transportadas por el aire tales como microorganismos transportados por el aire, esporas, polen o polvo transportado por el aire (por ejemplo de plantas de procesamiento químico en las que se usan y/o fabrican productos químicos peligrosos).

El sistema 10 de medición descrito anteriormente puede adaptarse para su uso en la detección de muchas otras infecciones bacterianas y víricas incluyendo, pero sin limitarse a:

- (a) otras formas de neumonía tales como neumonía por influenza o neumonía vírica;
- (b) tuberculosis;
- (c) malaria;
- (d) difteria;
- (e) lupus eritematoso;
- (f) tos ferina;
- (g) otras enfermedades zoonóticas;
- (h) estreptococos; y
- (i) estafilococos.

El sistema 10 de medición también puede aplicarse para detectar partículas víricas, alérgenos o esporas, polen u otras partículas de naturaleza biológica, o partículas que no son orgánicas pero que pueden detectarse mediante anticuerpos, ácidos nucleicos u otros grupos de reconocimiento adecuados. Tales partículas no orgánicas pueden incluir partículas transportadas por el aire de compuestos tóxicos, narcóticos controlados, explosivos o cualquier otra partícula que esté presente en el aire, el agua y otros líquidos.

Además, el sistema 10 de medición puede adaptarse para detectar partículas simpáticas tales como indicadores de determinadas formas de cáncer.

Además, el sistema 10 de medición puede aplicarse para detectar partículas que no provocan enfermedad, tales como anticuerpos. Por tanto, el sistema 10 de medición puede adaptarse fácilmente para su uso en la detección temprana de VIH y SIDA, siendo de ese modo una tecnología potencialmente valiosa en países tales como Sudáfrica que tiene que hacer frente a tales enfermedades.

Se apreciará que el sistema 10 de medición biológica mencionado anteriormente puede modificarse. Por ejemplo, aunque se usan anticuerpos que reconocen y se unen a partículas que van a examinarse para detectar patógenos, pueden emplearse otros grupos de reconocimiento. Por ejemplo, puede usarse una o más de las siguientes sustancias:

- (a) proteínas tales como enzimas;
- (b) aptámeros de otras secuencias de ácido nucleico o análogos de ácido nucleico;

(c) análogos de proteínas;

(d) polipéptidos artificiales; y

(e) organismos completos.

Si las partículas en la muestra son por sí mismas fluorescentes, pueden examinarse directamente para generar la radiación; tales partículas evitan la necesidad de tratamiento con anticuerpos marcados fluorescentemente tal como se describió anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Sistema (10) de medición biológica para medir la concentración de componentes incluidos en una muestra en forma de aerosol, estando caracterizado el sistema (10) porque comprende:
 - medios (30, 50, 210) de recogida que tienen una superficie interior para recoger la muestra mediante deposición;
 - medios (200, 230, 430) de concentración para raspar la muestra de la superficie interior de dichos medios de recogida;
 - medios (1530, 1540) de marcaje para marcar ópticamente los componentes presentes en la muestra concentrada; y
 - medios (50, 450, 510) de examen para examinar ópticamente los componentes marcados y generar de ese modo una medida de la concentración de componentes presentes en la muestra;en el que dichos medios (200, 230, 430) de concentración están configurados para concentrar espacialmente dicha muestra contra una superficie (120, 420, 450) óptica dentro de dichos medios de recogida a través de la cual tiene lugar, en uso, el examen óptico.
2. Sistema (10) según la reivindicación 1, en el que los medios de concentración comprenden además una característica para raspar superficies donde se deposita la muestra para concentrar espacialmente la muestra.
3. Sistema (10) según la reivindicación 2, en el que la característica puede deformarse elásticamente para diseminar la muestra concentrada espacialmente sobre una región de examen óptico en la que la muestra concentrada se somete a examen óptico.
4. Sistema (10) según la reivindicación 1, en el que los medios de marcaje comprenden al menos uno de un ensayo de unión selectivo y un ensayo de desplazamiento competitivo para marcar ópticamente la presencia de los componentes mediante marcadores fluorescentes; los marcadores fluorescentes se unen a anticuerpos para su uso en al menos uno del ensayo selectivo y el ensayo competitivo; los marcadores fluorescentes comprenden fluoróforos unidos a los anticuerpos mediante un portador intermedio de manera que una pluralidad de fluoróforos se asocian con cada anticuerpo; y el portador intermedio se implementa en forma de esferas de látex.
5. Sistema (10) según la reivindicación 1, en el que los medios de examen comprenden un detector (50, 800, 810) evanescente óptico para detectar cambios en la respuesta óptica inducidos por la presencia de los componentes.
6. Sistema (10) según la reivindicación 5, en el que el detector evanescente incluye:
 - (a) uno o más de un láser de diodo y un LED como fuente de radiación de examen para examinar la muestra concentrada; y
 - (b) uno o más de un fotodiodo de avalancha, una matriz de fotodiodos y un tubo fotomultiplicador como detector óptico para detectar radiación fluorescente emitida desde la muestra concentrada en respuesta al examen óptico de la muestra, siendo el detector óptico para generar una señal de detección indicativa de cambios en la fluorescencia de la muestra que resultan de la presencia de los componentes en la muestra.
7. Sistema (10) según la reivindicación 1, en el que los medios (200, 230) de recogida están dispuestos para encerrar la muestra, mediante lo cual se impide el contacto del personal con la muestra cuando el sistema está en uso.
8. Sistema (10) según la reivindicación 7, en el que los medios (200, 230) de recogida pueden funcionar como una pieza desechable de un solo uso.
9. Sistema (10) según la reivindicación 8, en el que los medios de recogida comprenden características (1000) que lo hacen sustancialmente inutilizable tras la recogida de muestras en el mismo.
10. Sistema (10) según la reivindicación 1, en el que los medios (230) de recogida comprenden medios (610, 650) de potenciación de torbellino para la deposición de la muestra dentro de los medios de recogida.
11. Sistema (10) según la reivindicación 1, en el que los medios de recogida comprenden medios (105; 250) de filtración para inhibir al menos parcialmente la diseminación de los componentes de la muestra desde los

medios de recogida.

- 5 12. Sistema (10) según la reivindicación 1, en el que los medios de marcaje incluye medios de lisis para producir la lisis de los componentes presentes en la muestra, potenciando de ese modo la sensibilidad de medición del sistema (10) mediante el aumento del número de sitios de marcaje óptico potenciales disponibles.
- 10 13. Método de detección de uno o más patógenos en una o más muestras del esputo/moco de un sujeto usando un sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, implicando el método las etapas de:
 - (a) recoger dicha una o más muestras en forma de aerosol mediante deposición sobre una superficie interior de los medios de recogida;
 - 15 (b) concentrar espacialmente la una o más muestras en los medios de concentración raspando la muestra sobre la superficie interior de los medios de recogida contra una superficie óptica ubicada dentro de los medios de recogida;
 - 20 (c) marcar ópticamente uno o más patógenos presentes en dicha una o más muestras;
 - (d) examinar ópticamente los patógenos a través de dicha superficie óptica para lograr una respuesta óptica; y
 - 25 (d) determinar a partir de la respuesta óptica de dicha una o más muestras si dicho uno o más patógenos están presentes o no en dicha una o más muestras.
- 30 14. Método según la reivindicación 13, en el que en las etapas (b), (c) y (d), se realiza detección de la presencia de un patógeno usando espectroscopía de ondas evanescentes.
- 35 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14 adaptado para la detección de bacterias asociadas con infecciones pulmonares y relacionadas con el pulmón.
16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que se emplea una presión parcial negativa para ayudar a obtener dicha una o más muestras en forma de aerosol.
17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que dicha una o más muestras comprenden un aerosol de sangre u otro fluido corporal o fluido corporal en forma líquida.
- 40 18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que el análisis de dicha una o más muestras se realiza usando uno o más de:
 - (a) una reacción cromogénica de ELISA; y
 - 45 (b) un biosensor de onda acústica de superficie (SAW) para detectar un antígeno en dicha una o más muestras.

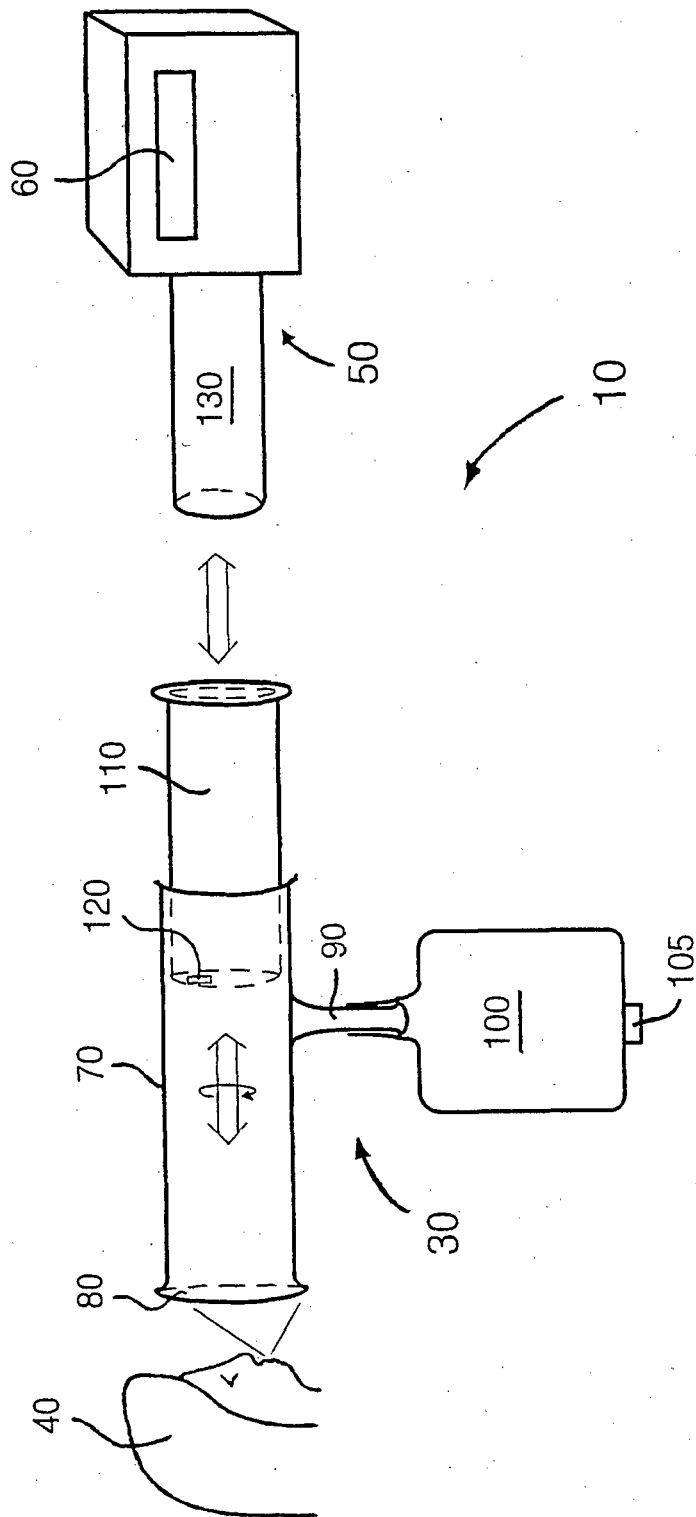


Fig. 1

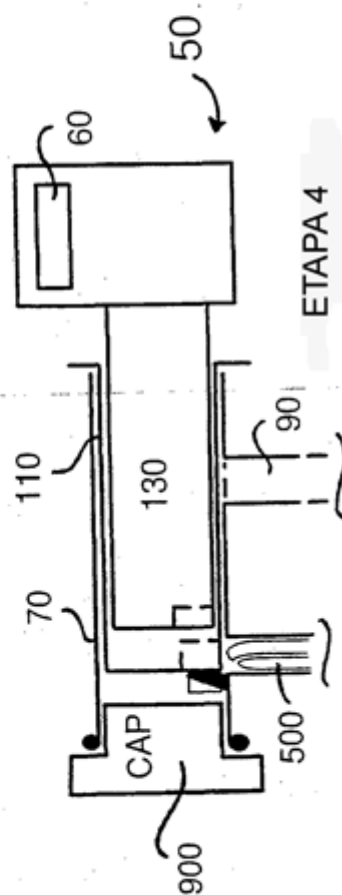
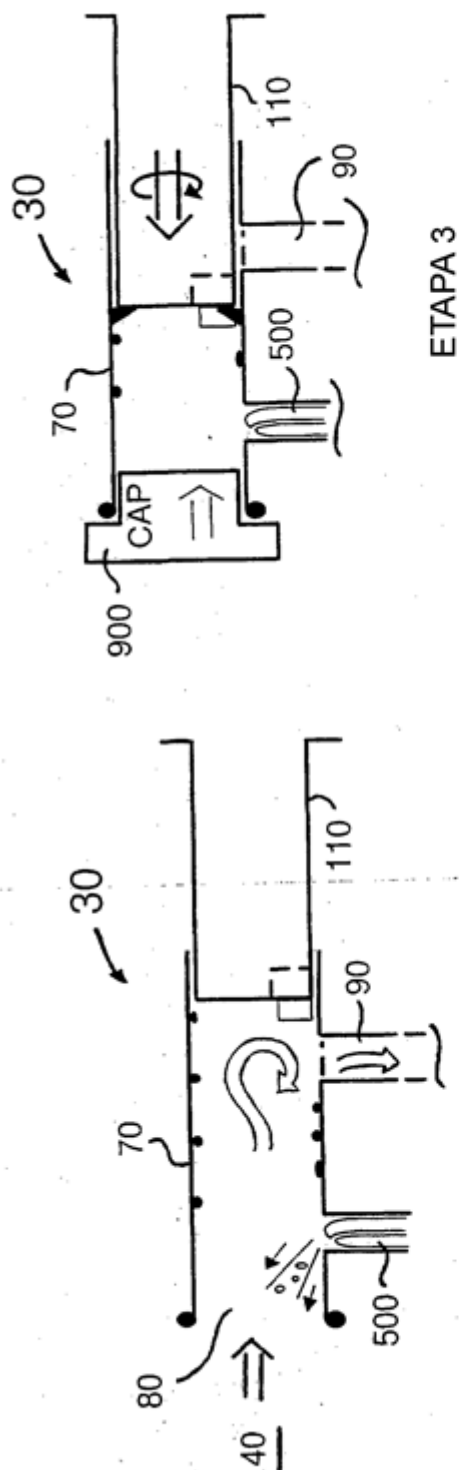
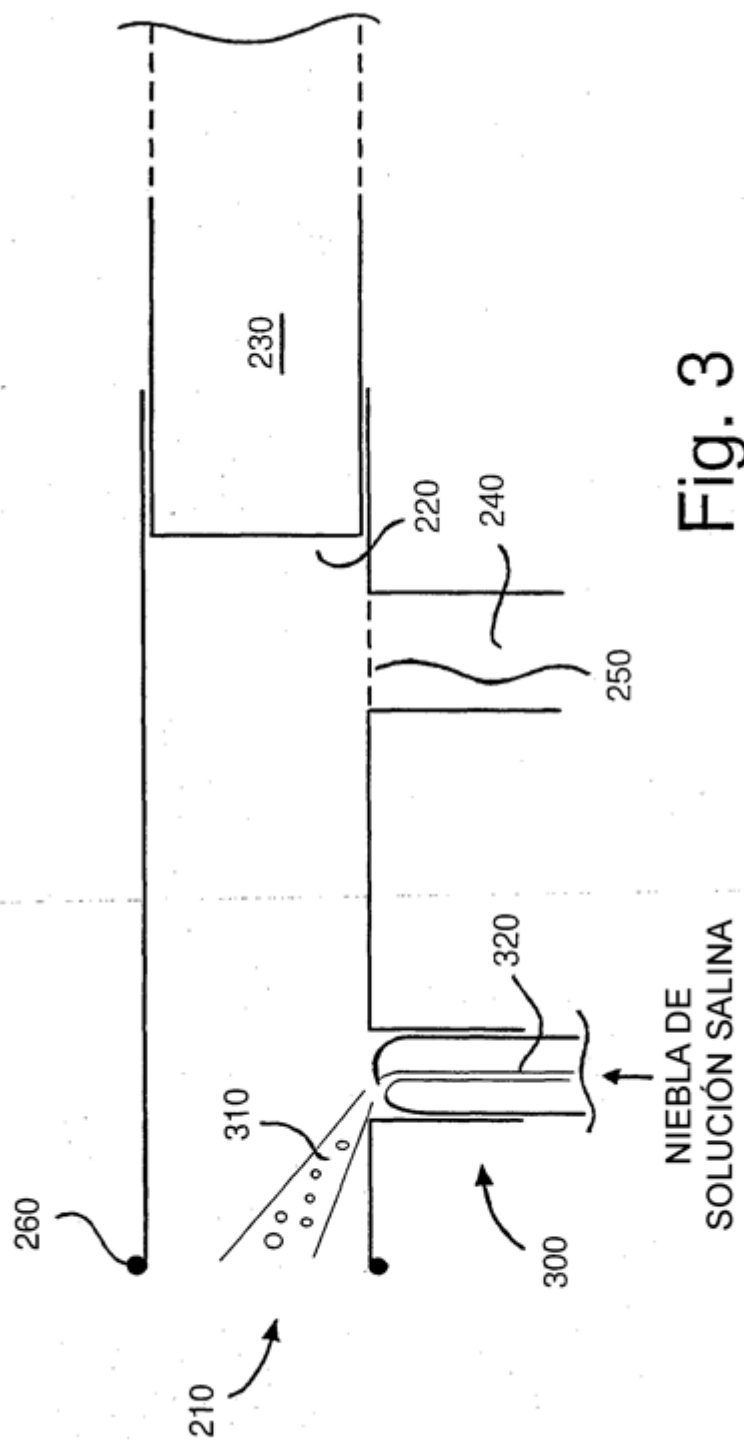
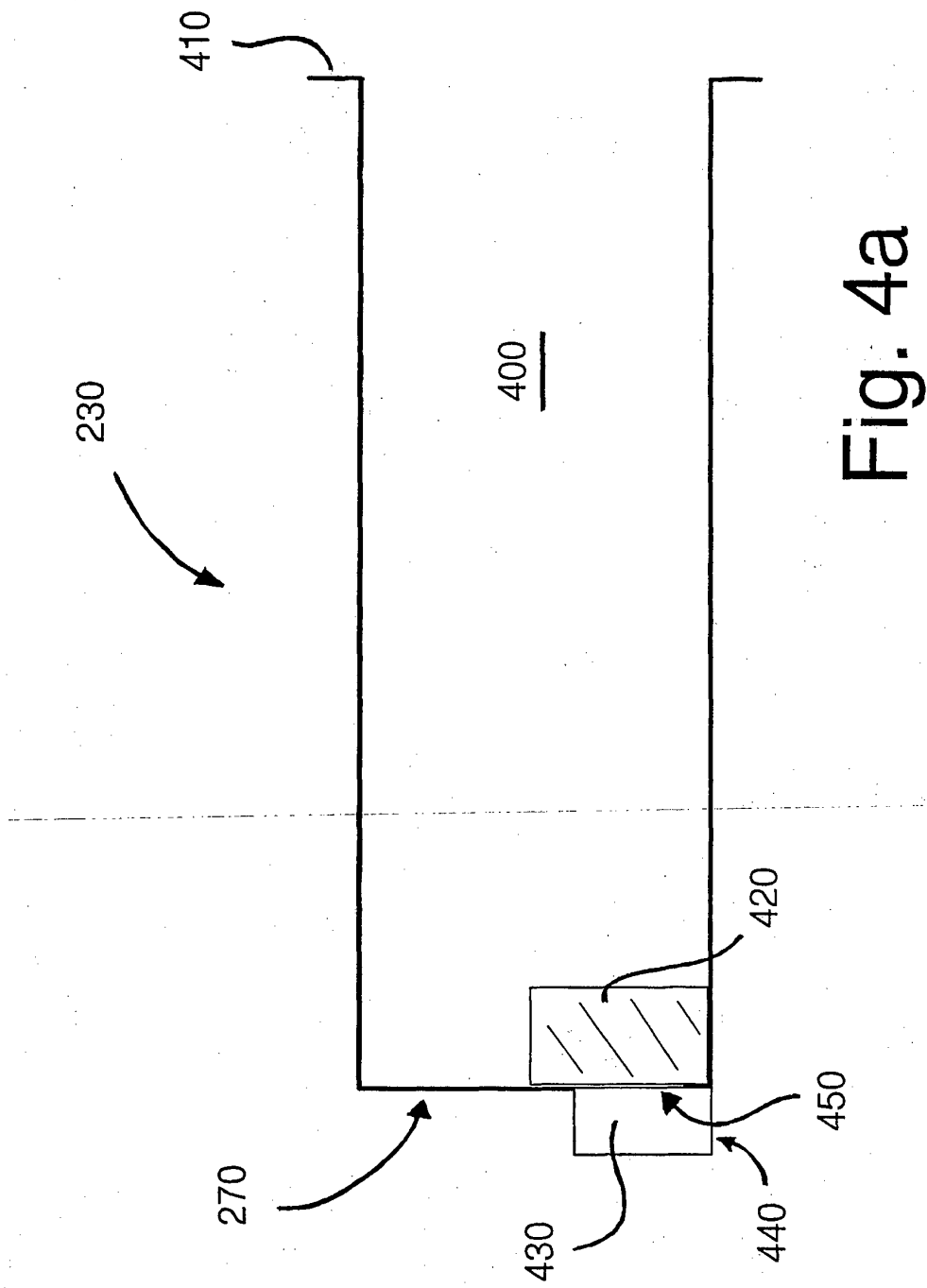
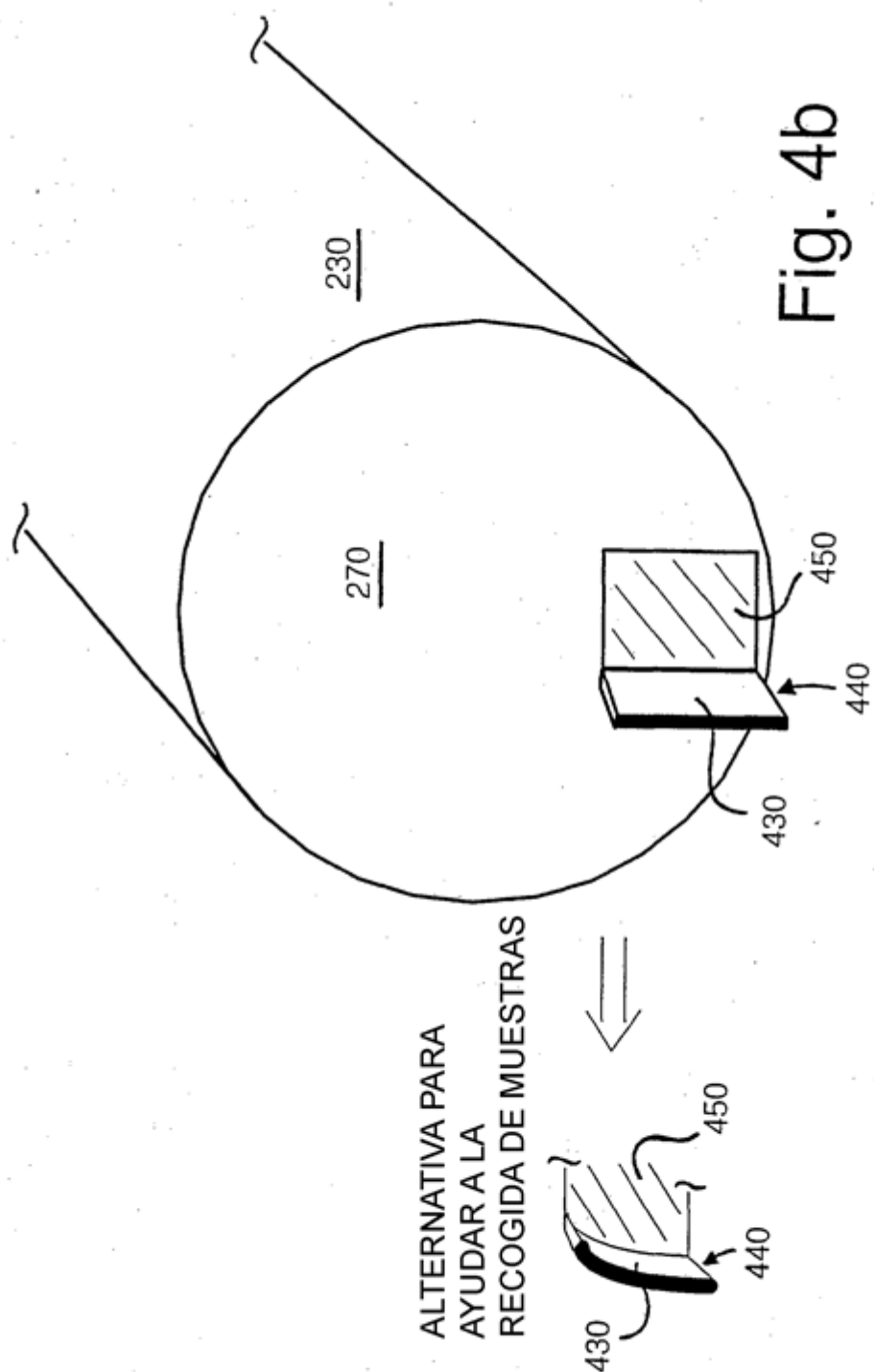


Fig. 2







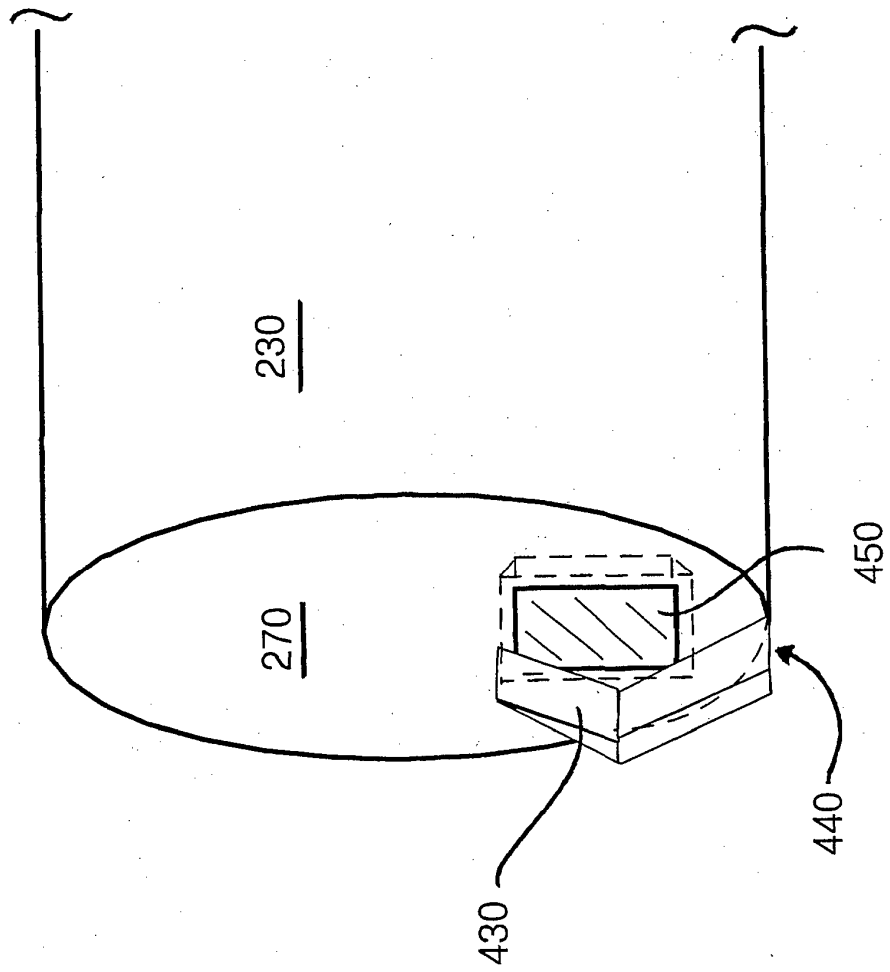


Fig. 4c

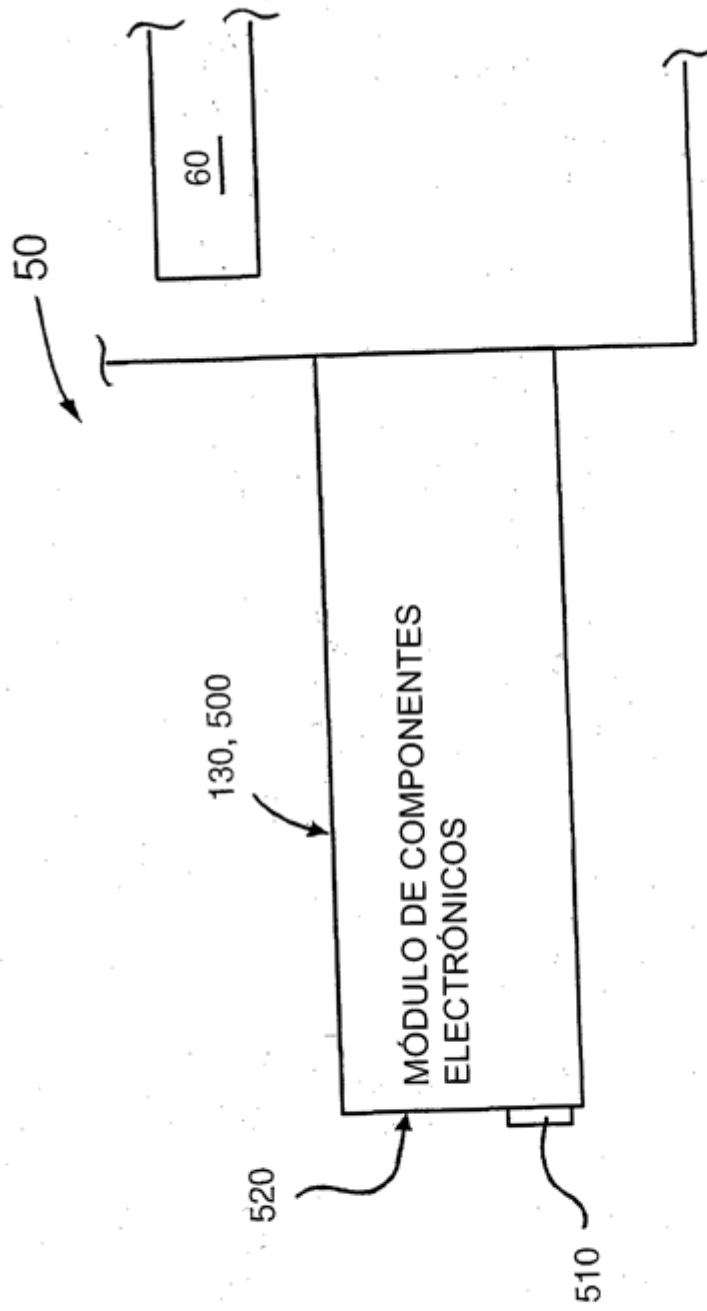


Fig. 5

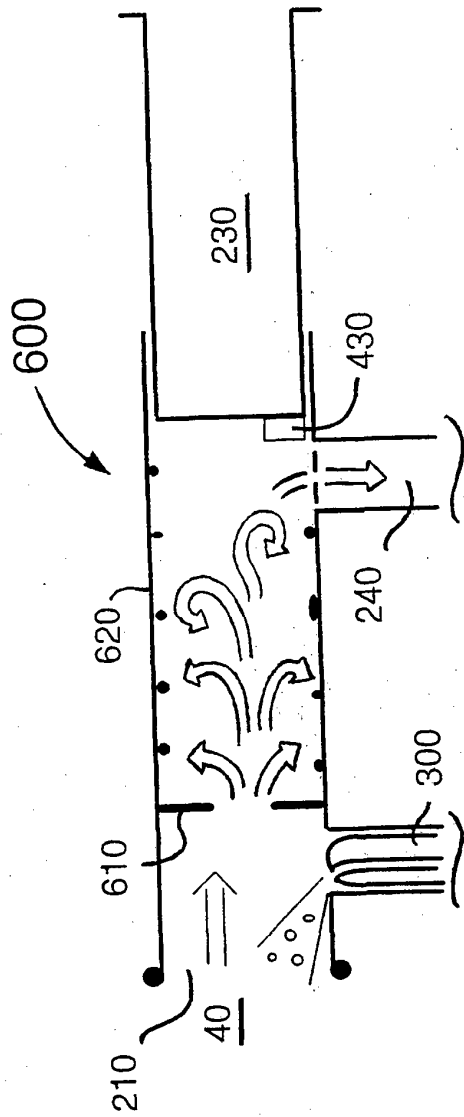
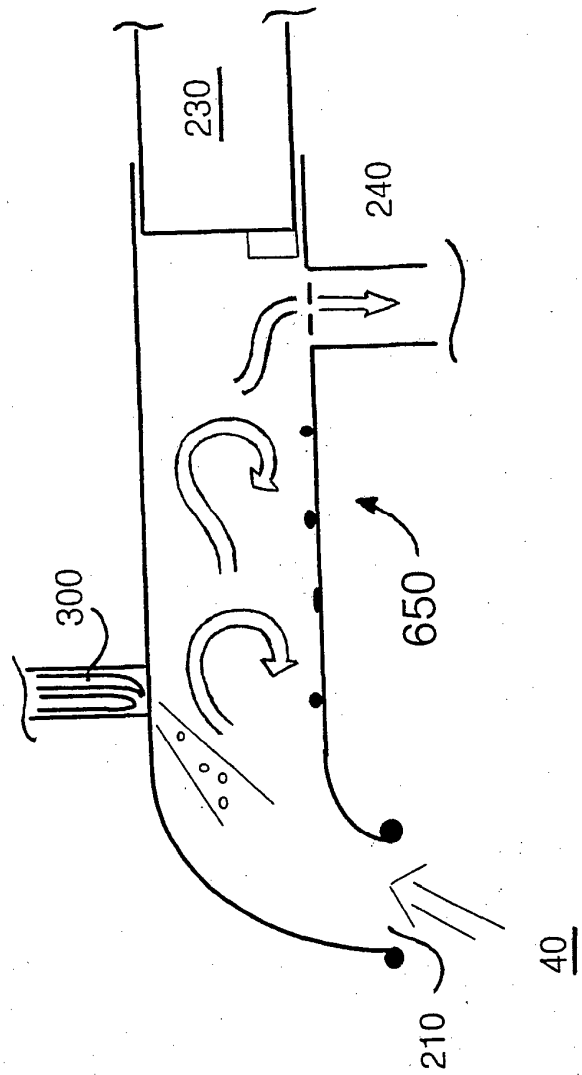


Fig. 6



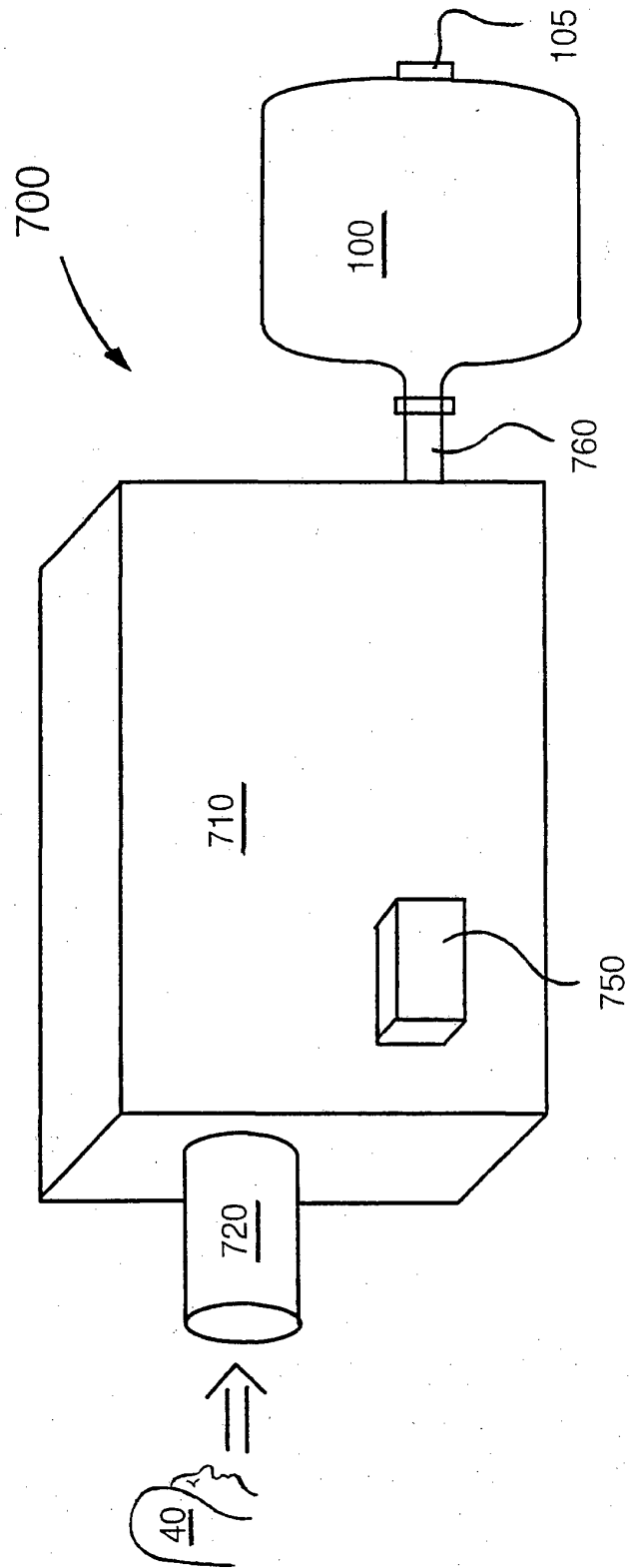


Fig. 7

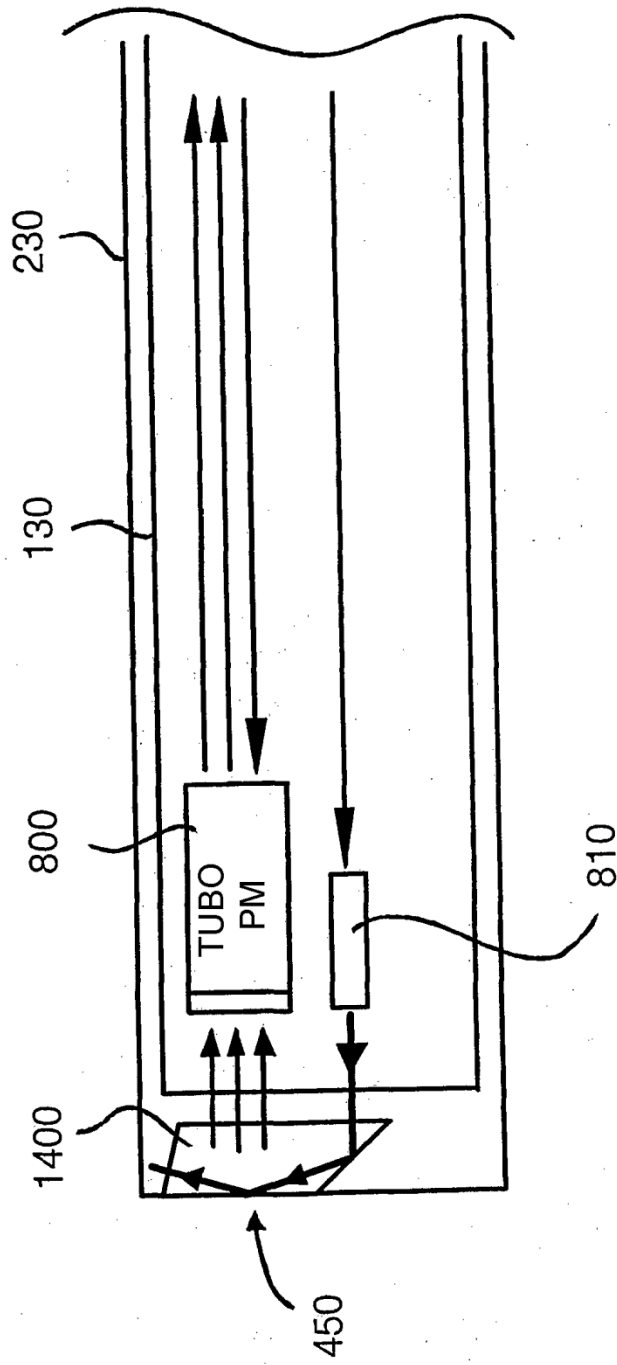


Fig. 8a

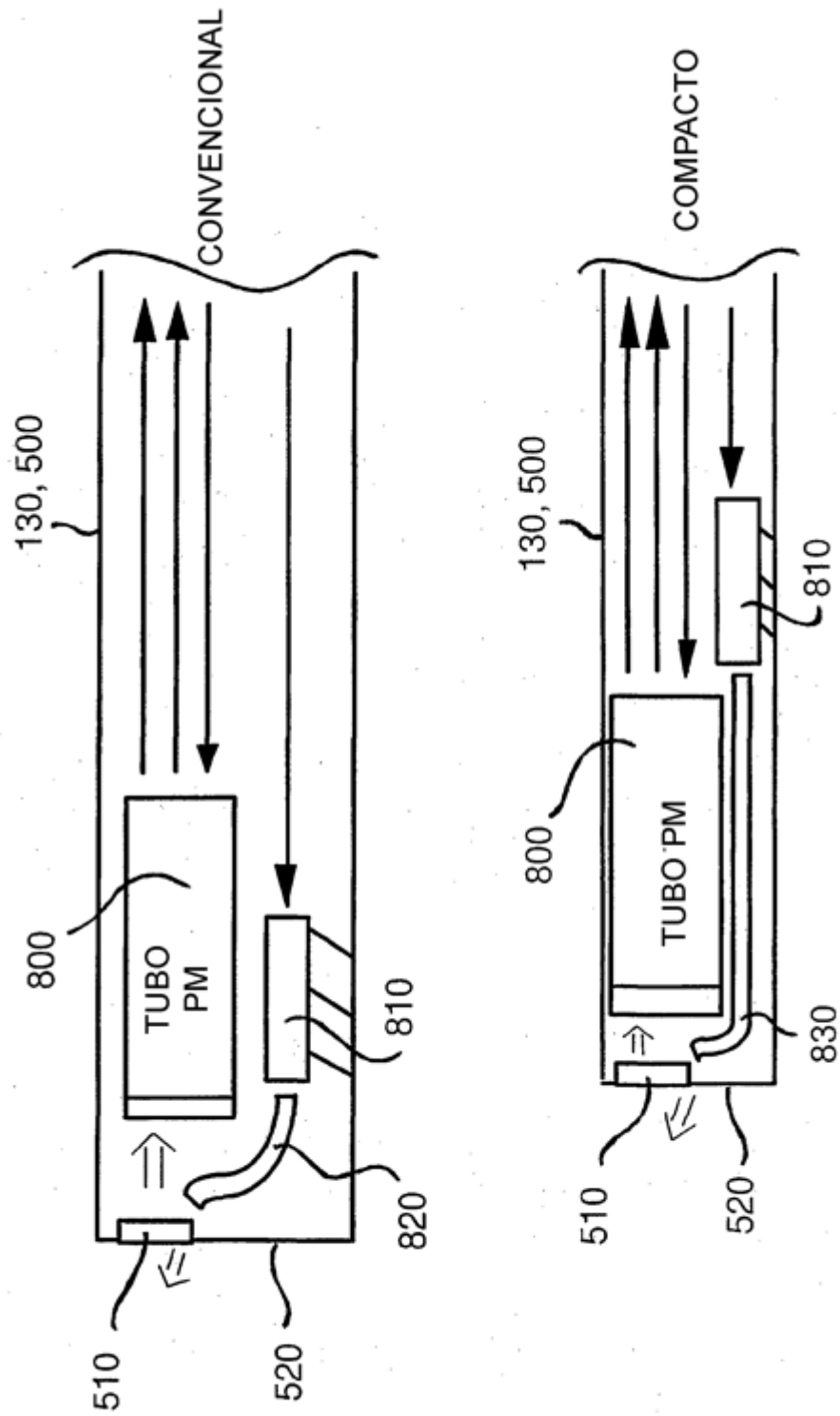


Fig. 8b

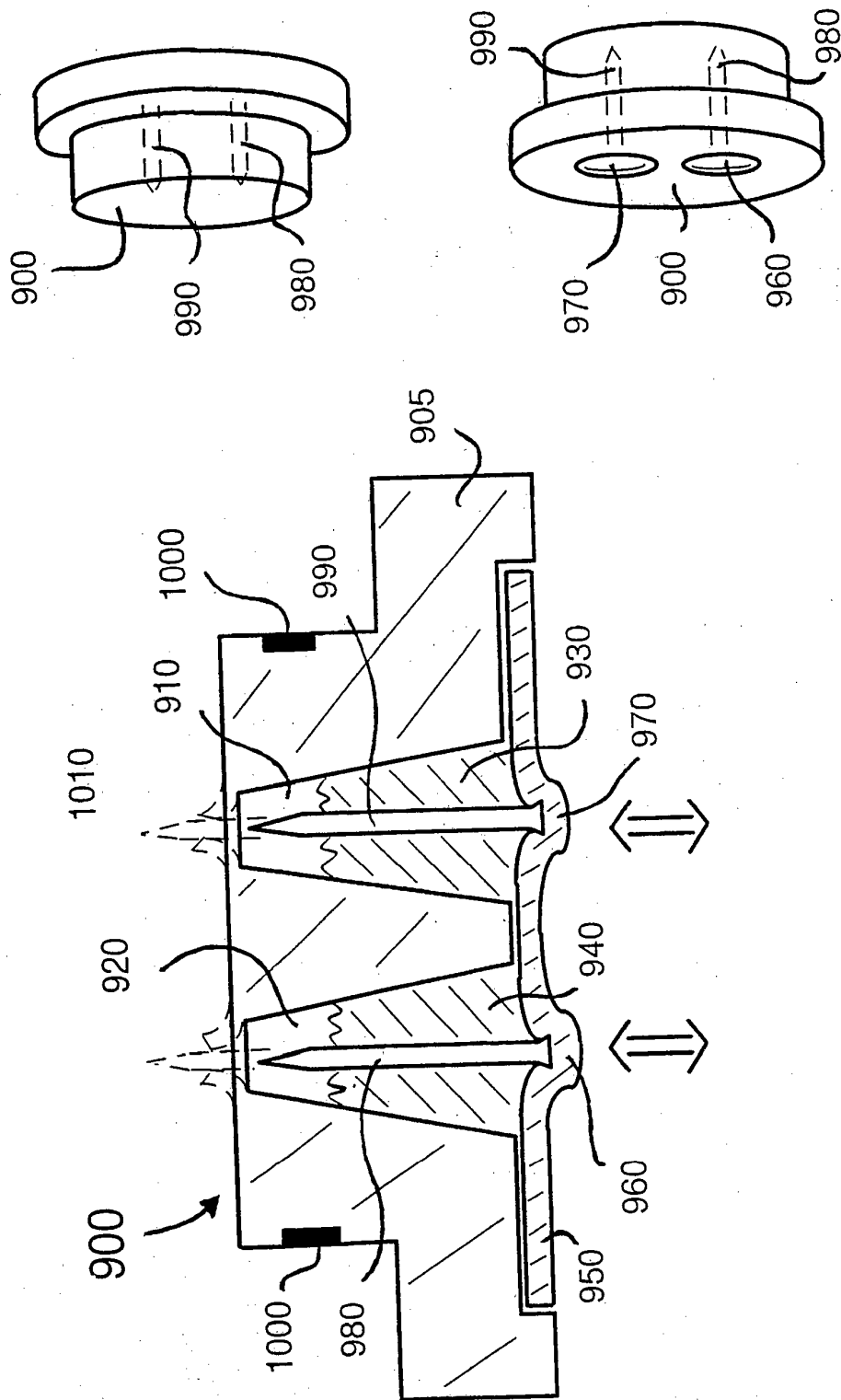


Fig. 9

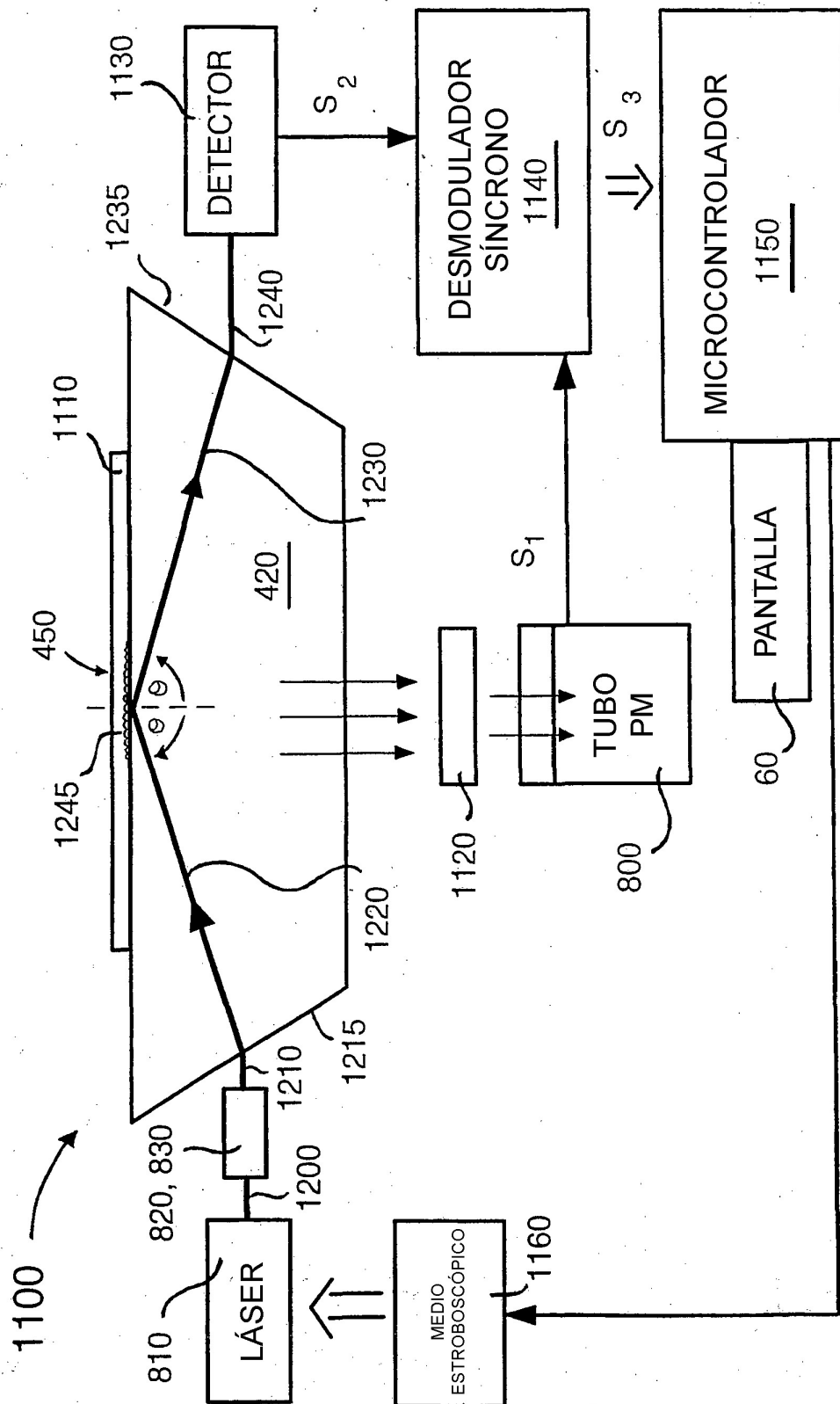


Fig. 10

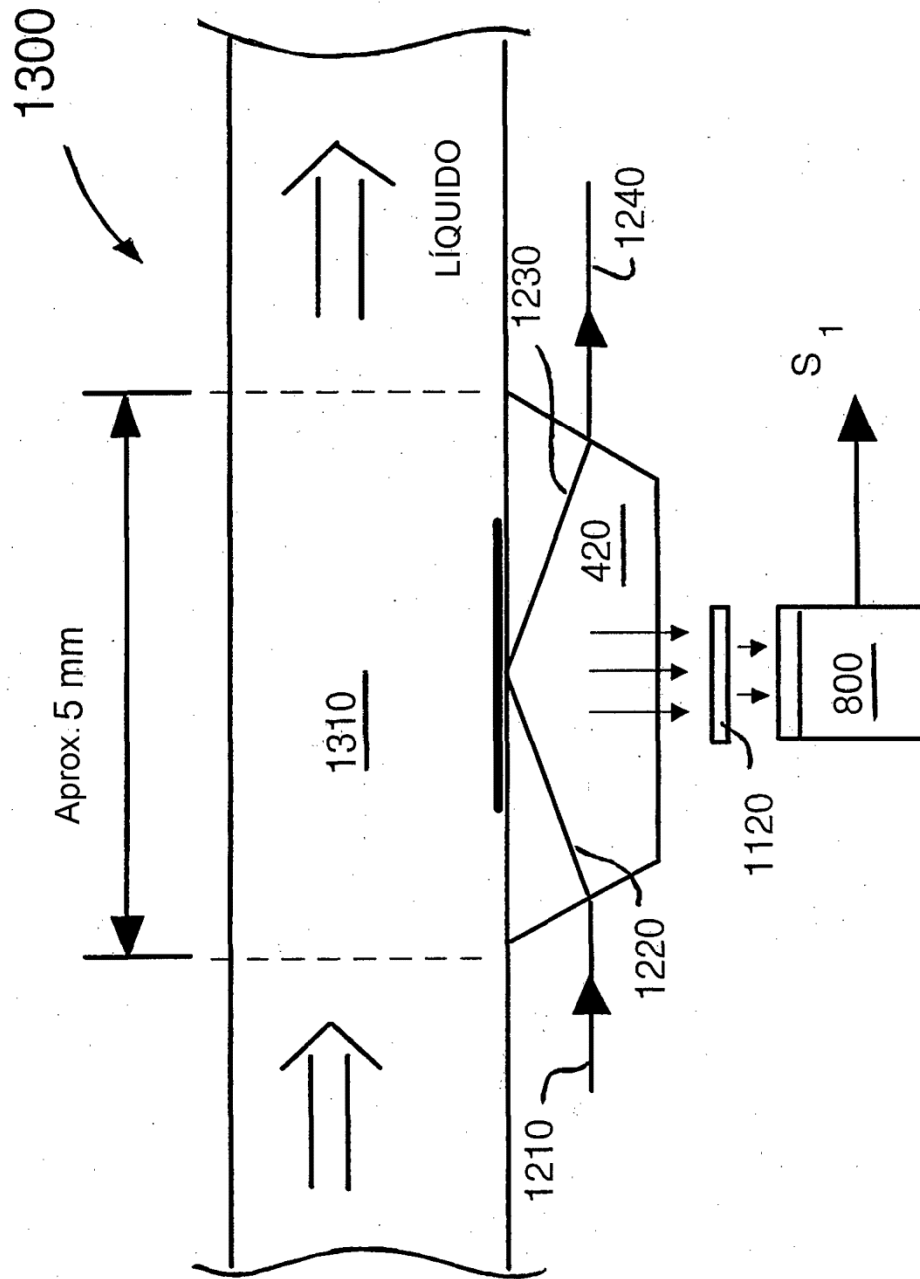


Fig. 11

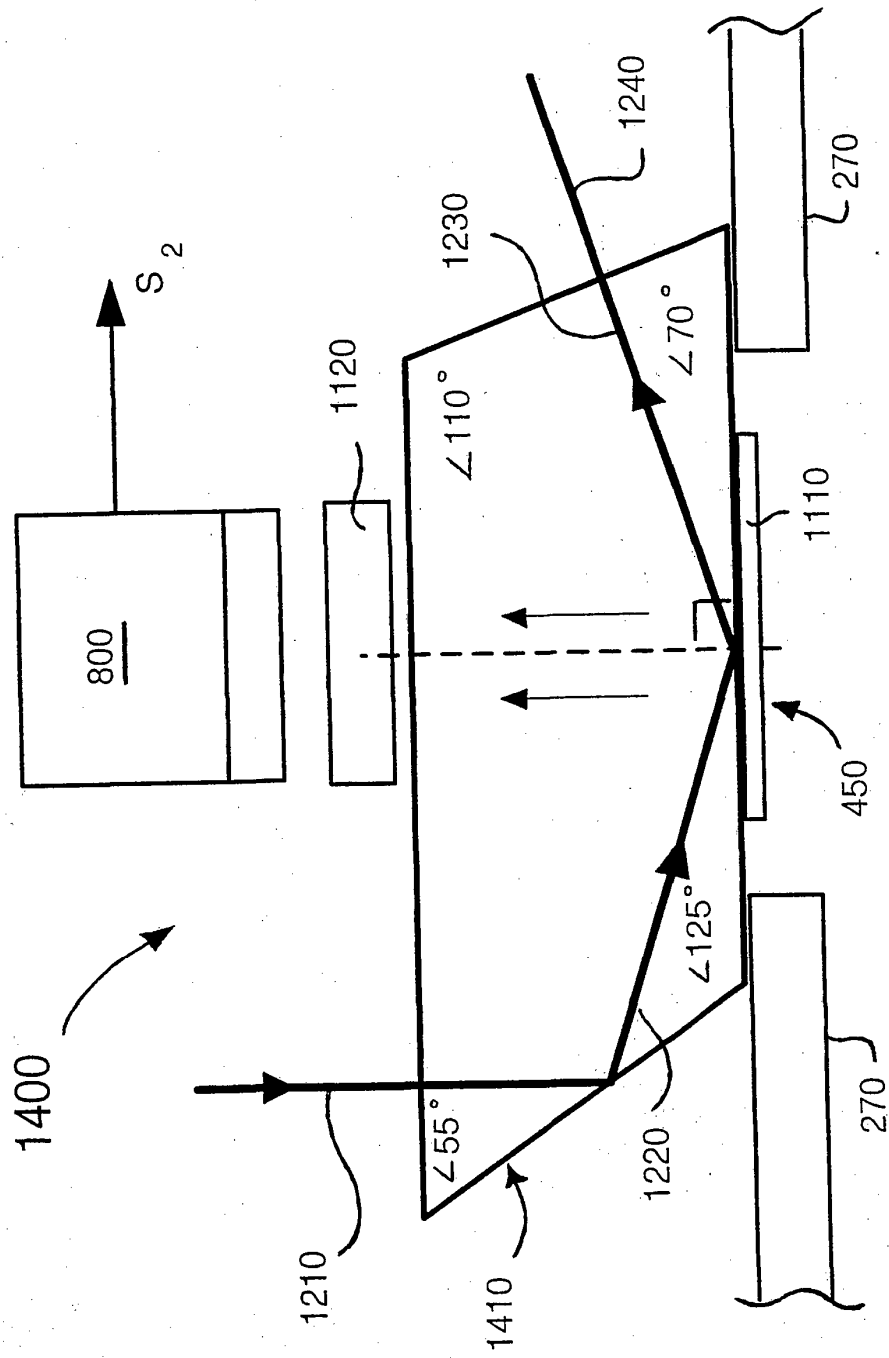
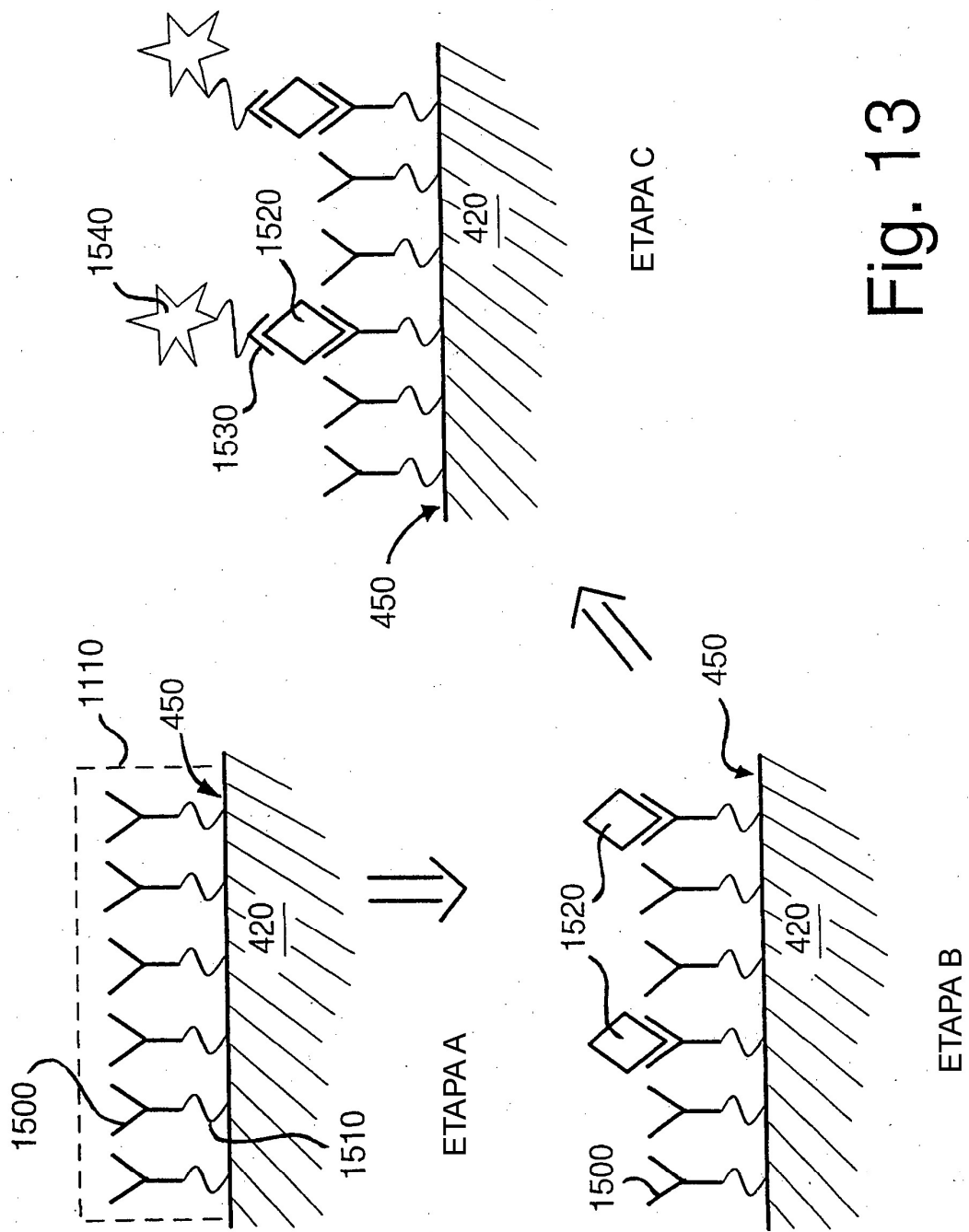


Fig. 12



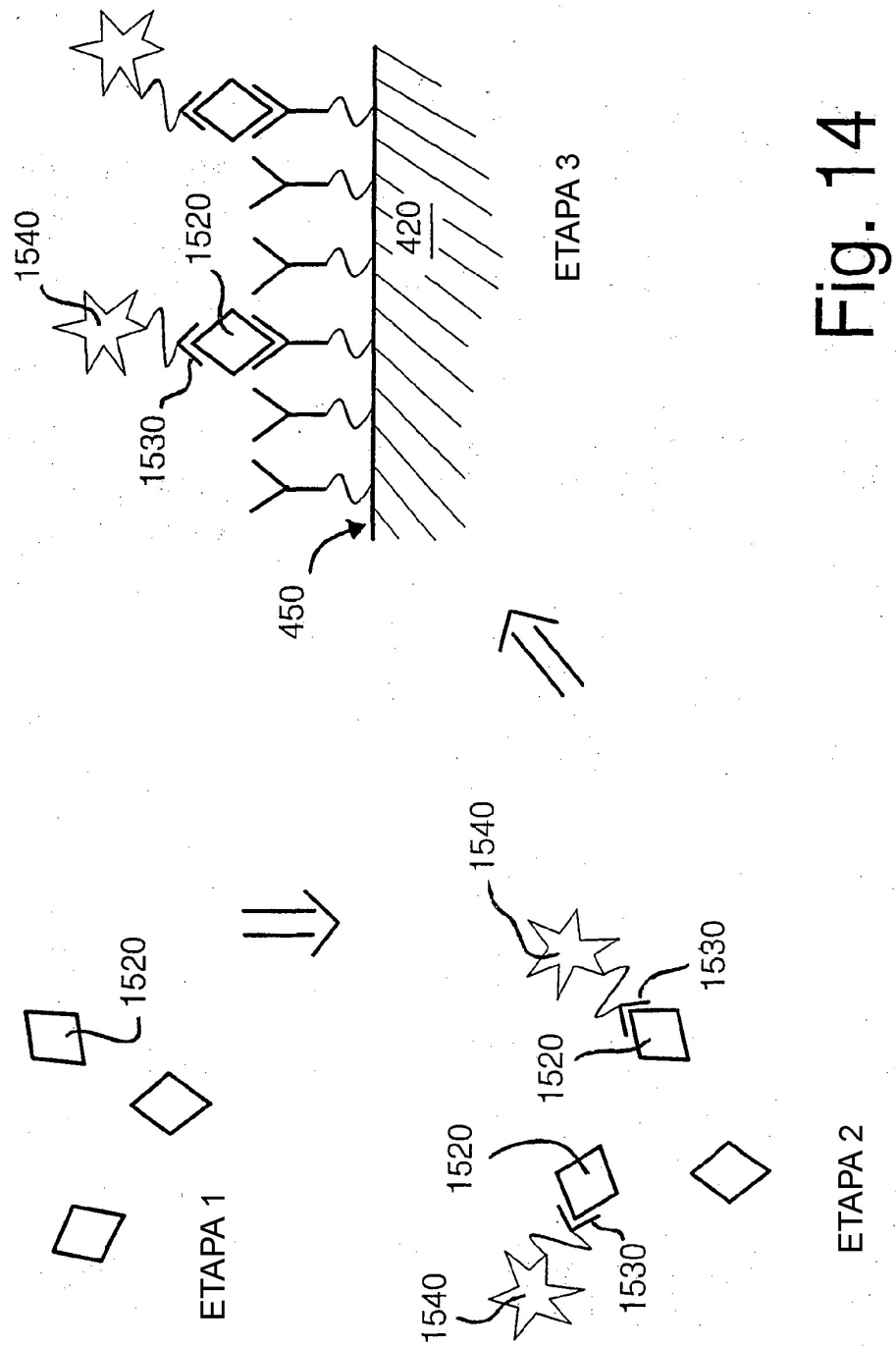


Fig. 14

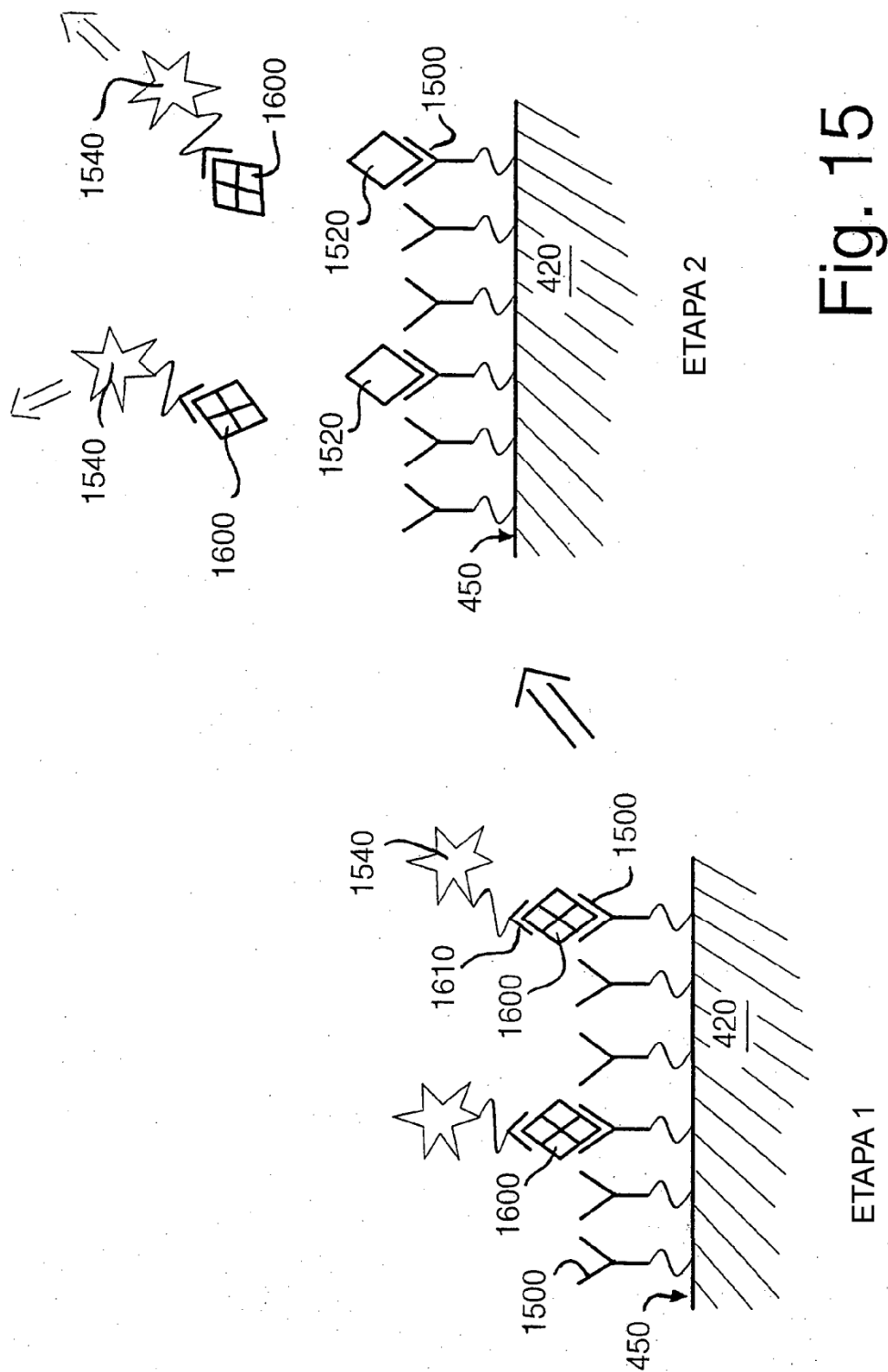


Fig. 15