

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 646**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.1998** **E 10011461 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 2302368**

54 Título: **Método y aparato para detectar micropartículas en muestras de fluidos**

30 Prioridad:

09.06.1997 US 49012 P

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

25.07.2017

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US

72 Inventor/es:

GOIX, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 626 646 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

Método y aparato para detectar micropartículas en muestras de fluidos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un método y a un aparato para detectar micropartículas en muestras de fluidos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método y a un aparato que usa un sistema de suministro de fluido y un sistema de detección fluorescente láser para detectar micropartículas marcadas fluorescentemente en bajas concentraciones en muestras de fluidos.

15 Descripción de la técnica relacionada

La detección de microorganismos presentes a baja concentración en fluidos es crítica para proporcionar más rápidamente respuestas de contaminación microbiológica para tratar mejor las enfermedades del paciente, para prevenir los brotes mortales, para gestionar mejor los procesos de control de calidad en la comida, la bebida, y las plantas de fabricación de medicamentos, y para proporcionar a los científicos herramientas de investigación analítica potentes y fáciles de usar.

20 Los métodos de ensayo para microorganismos tales como *M. tuberculosis*, *Trichomonas vaginalis*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli*, y *Cyclospora* incluyen métodos de crecimiento de cultivo, métodos de PCR, visualizaciones microscópicas mejoradas con fluorescencia, técnicas de bioluminiscencia de ATP, y bacterímetros. Estos métodos suelen ser lentos y costosos, y tienen capacidades de detección limitadas.

30 Los dispositivos de ensayo incluyen microscopios epifluorescentes, fluorómetros, y citómetros de flujo. Los microscopios epifluorescentes están acoplados con cámaras de alta resolución CCD refrigeradas para permitir visualizaciones microscópicas epifluorescentes de partículas microscópicas. Los fluorómetros tienen capacidades de detección limitadas y tampoco son adecuados cuando se requiere una diferenciación espectral en una gran población de organismos. Éste es a menudo el caso cuando se requiere la diferenciación de organismos vivos contra muertos. Los citómetros de flujo pueden ser muy precisos en la detección y diferenciación de partículas etiquetadas muertas o vivas inmuno-fluorescentes. Sin embargo, los citómetros de flujo son caros y requieren de un técnico o un científico experimentado para operarles e interpretar los datos.

35 Los ooquistes de *Cryptosporidium* y los quistes de *Giardia* pueden detectarse usando un procedimiento de ensayo de inmunofluorescencia (IFA). Este método usa anticuerpos policlonales para teñir los quistes que a continuación pueden detectarse por microscopía epifluorescente. Este método es extremadamente laborioso, considerando el número de partículas a investigar bajo el microscopio epifluorescente por un técnico experimentado. También pueden usarse citómetros de flujo, pero son muy caros y requieren un técnico experimentado y bien entrenado para operarles. Además, los citómetros de flujo todavía requieren la confirmación microscópica de la identificación del ooquiste.

40 La monitorización de la calidad del agua es vital para la gestión del suministro de agua no contaminada para la agricultura, la industria y el consumo humano. La monitorización de la calidad del agua puede realizarse usando organismos de ensayo como indicadores de la toxicidad del agua dulce, por ejemplo, la carpa cabeza *Pimephales promelas*, el cladócer *Ceriodaphnia dubia*, y el alga verde *Selenastrum capricornutum*. Los organismos de ensayo se cultivan bajo condiciones estándares y se exponen durante un período de tiempo a sustancias tóxicas. La comparación de las tasas de supervivencia y reproducción de los organismos de ensayo con los organismos de control proporciona una indicación de la toxicidad del agua.

45 La actividad enzimática de las bacterias puede usarse para evaluar la calidad del agua usando un sustrato de enzima especialmente diseñado que se vuelve fluorescente cuando se escinde. Este sustrato se escinde por enzimas en las bacterias y emite luz fluorescente cuando se expone a la luz de la longitud de onda apropiada. La tasa de actividad enzimática puede medirse usando un fluorómetro, y proporciona una medición indirecta del nivel de estrés tóxico en las bacterias.

50 El comportamiento de alimentación del zooplancton puede usarse también para evaluar la calidad del agua. Se han realizado extensos estudios de toxicidad aguda usando plancton, en general, y varias especies de rotífero, en particular. Las tasas de alimentación y reproducción del rotífero pueden usarse como una herramienta de evaluación rápida de la toxicidad. El efecto de una amplia gama de productos químicos que incluyen xileno, cadmio, cobre, mercurio, y diazinón en las tasas de alimentación y reproducción del rotífero *Brachionus calyciflorus* para agua dulce y *Brachionus plicatilis* para aguas marinas se ha estudiado ampliamente. En el método de tasa de alimentación, los rotíferos se exponen durante varios minutos a agua que contiene un tóxico, y a continuación se les permite alimentarse con perlas etiquetadas fluorescentemente. A continuación, los rotíferos se anestesian, se lavan, se transfieren a un portaobjetos de microscopio y se examinan individualmente usando un microscopio fluorescente. La

tasa de alimentación se calcula cuantificando la intensidad fluorescente de las perlas ingeridas en el tracto digestivo de los rotíferos individuales usando una técnica de formación de imágenes. Este método requiere un operador entrenado, una cámara y un microscopio fluorescente, lo que lo hace lento y costoso.

- 5 Lo que se necesita son métodos y aparatos para detectar micropartículas tales como microorganismos nocivos y para evaluar la calidad del agua que sean rápidos, sensibles, reproducibles, sustancialmente automáticos, y rentables.

Sumario de la invención

10 La presente invención es un dispositivo para detectar una sustancia fluorescente marcada para una micropartícula, como se define en la reivindicación 1, y un método correspondiente, tal como se define en la reivindicación 7.

15 El dispositivo comprende un sistema portador de flujo capilar único para transportar la micropartícula más allá de una localización seleccionada, una fuente de radiación electromagnética para irradiar la sustancia marcada para la micropartícula y un sistema de detección para medir la luz fluorescente emitida desde la sustancia a la localización seleccionada.

Breve descripción de las figuras

- 20 La figura 1 muestra un sistema de preparación de muestras.
 La figura 2A muestra un sistema portador de flujo.
 La figura 2B muestra una vista detallada de un ejemplo de un tubo capilar.
 La figura 2C muestra una vista detallada de un tubo capilar de acuerdo con la invención.
 25 La figura 3A muestra un ejemplo de un montaje de medición fluorescente láser.
 La figura 3B muestra otro ejemplo de un montaje de medición fluorescente láser.
 La figura 3C muestra otro ejemplo más de un montaje de medición fluorescente láser.
 La figura 4A muestra una salida de muestra de una unidad de procesamiento digital.
 La figura 4B muestra otra salida de muestra de una unidad de procesamiento digital.
 30 La figura 5A muestra el espectro de emisión de diversos colorantes de cianuro fluorescentes usados para marcar micropartículas.
 La figura 5B muestra un diagrama de flujo de una estrategia de procesamiento de señales para detectar una micropartícula marcada Cy5 en presencia de otras micropartículas marcadas fluorescentemente.
 La figura 6A muestra una curva de calibración obtenida con una muestra de agua sembrada con una cantidad
 35 conocida de fluoesferas de 2 μm usando el dispositivo de la presente invención.
 La figura 6B muestra una gráfica de la dependencia de la concentración de partículas sobre las distribuciones de tasa de llegada de partículas (modelo estadístico de Poisson).
 La figura 6C muestra una gráfica de la evolución de la señal fluorescente detectada integrada frente a la concentración de *E. Coli* 60 SYTO™.
 40 La figura 7A muestra unas concentraciones de perlas normalizadas frente al tiempo de alimentación de acuerdo con un modelo analítico para tres concentraciones de organismos diferentes.
 La figura 7B muestra unas concentraciones de fluoesferas normalizadas frente al tiempo de alimentación para una muestra de ensayo que contiene 1 ppm de diazinón y una muestra de control, usando una concentración de rotífero de 500 rotíferos/ml.
 45 La figura 7C muestra unas concentraciones de fluoesferas normalizadas frente al tiempo de alimentación para una muestra de ensayo que contiene 1 ppm de diazinón y una muestra de control, usando una concentración de rotífero de 600 rotíferos/ml.
 La figura 7D muestra unas concentraciones de fluoesferas normalizadas frente al tiempo de alimentación para una muestra de 600 rotíferos/ml y una muestra de 1000 rotíferos/ml.

50 Descripción detallada de la invención

La figura 1 muestra un sistema de preparación de muestras 100. El sistema de preparación de muestras 100
 55 contiene una muestra de fluido 102 sospechoso de contener unas micropartículas 104. El fluido de muestra 102 puede hacerse discurrir a través de un filtro o trampa para separar cualquier material particulado no deseado o macroscópico. Con el fin de preparar una muestra a ensayar, se permite que una sustancia fluorescente 106 reaccione con la muestra de fluido 102 y las micropartículas 104. La sustancia fluorescente 106 puede ser una o más tintes, colorantes o reactivos fluorescentes diseñados para teñir, marcar o de otro modo fijarse ellos mismos a una micropartícula 104. Se obtiene una muestra de ensayo 108 filtrando cualquier sustancia fluorescente restante
 60 libre 106 de la muestra de fluido 102. La muestra de ensayo 108 contiene, por lo tanto, la muestra de fluido 102 y la sustancia fluorescente 106 unidas a las micropartículas 104.

La muestra de fluido 102 puede ser una muestra de agua, una muestra de orina, una muestra de sangre, una muestra de producto alimenticio, o cualquier otro fluido a ensayar. La muestra de fluido 102 puede contener
 65 muestras amplificadas por PCR para la detección de virus tales como el HIV. Las micropartículas 104 pueden ser *M. tuberculosis*, *Trichomonas vaginalis*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli*, *Cyclospora*, ooquistes de *Cryptosporidium*,

quistes de *Giardia*, o cualquier otra bacteria, virus, hongo, o un microorganismo que pueda marcarse. Las micropartículas 104 pueden ser también células CD4 o CD8 para la monitorización de pacientes con SIDA. Pueden usarse diferentes sustancias fluorescentes 106 con las micropartículas 104 para permitir que se detecten y se distinguen diferentes tipos de microorganismos entre sí. Por ejemplo, para una bacteria, la sustancia fluorescente 106 puede ser unos tintes convencionales de ADN o de reactivos etiquetados en superficie. Para los oquistes de *Cryptosporidium* o los quistes de *Giardia*, la sustancia fluorescente 106 puede ser un colorante fluorescente conjugado con anti anticuerpos anti-*Cryptosporidium* o anti-*Giardia*, respectivamente. La sustancia fluorescente 106 también puede cargarse magnéticamente de manera que pueda verse afectada por un campo magnético.

Las micropartículas 104 también pueden ser perlas microscópicas que contienen una sustancia fluorescente 106. Para medir la concentración de una sustancia tóxica en la muestra de fluido 102, pueden añadirse unos microorganismos filtro-alimentadores tales como los rotíferos o el zooplancton a la muestra de fluido 102 en cantidades conocidas. Dichos microorganismos filtro alimentadores tienen una tasa de alimentación que es una función bien conocida de la concentración de sustancia tóxica. Después de un período de incubación conocido, se añaden micropartículas 104 a la muestra de fluido 102. Las micropartículas 104 pueden ser fluoesferas capaces de ser ingeridas por los organismos filtro alimentadores, tales como unas perlas de látex que contienen un colorante fluorescente disponible de Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón. Las fluoesferas pueden tener un diámetro uniforme de 2 μm o tener tamaños no uniformes. Pueden tener propiedades espectro-fotométricas uniformes, con una longitud de onda de absorción máxima de 624 nm, y una longitud de onda de emisión máxima de 645 nm, o tener unas propiedades espectro-fotométricas variables. A intervalos de tiempo conocidos, se extrae una muestra de ensayo 108 del sistema de preparación de muestras 100. La muestra de ensayo 108 se obtiene filtrando cualquier micropartícula no ingerida 104 de la muestra de fluido 102. La muestra de ensayo 108 contiene de este modo la muestra de agua 102 y los microorganismos 104 con micropartículas 104 en sus tractos digestivos.

La figura 2A muestra un sistema portador de flujo 200. El sistema portador de flujo 200 es un sistema de suministro de fluido que introduce la muestra de ensayo 108 en un tubo capilar 202. El tubo capilar 202 puede tener unas paredes muy delgadas y unas excelentes propiedades ópticas. El tubo capilar 202 puede tener un diámetro interior configurado para admitir las micropartículas 104 una cada vez. Una sección del tubo capilar 202 define un volumen de ensayo 204. El tubo capilar 202 puede estar al menos parcialmente acoplado a una mesa óptica 206, que sirve para mantener el tubo capilar 202 en su lugar. Múltiples tubos capilares 202 pueden estar dispuestos en paralelo para obtener rendimientos mayores.

El sistema portador de flujo 200 incluye un sistema de bomba 216 acoplado al tubo capilar 202. El sistema de bomba 216 puede ser una jeringa 208 que contiene la muestra de ensayo 108, e inyecta la muestra de ensayo 108 a través del tubo capilar 202 y del volumen de ensayo 204. Después de pasar a través del tubo capilar 202, la muestra 108 puede pasar a un vertedero 212. De esta manera, las micropartículas 104 en la muestra de ensayo 102 pueden pasarse una a la vez a través del tubo capilar 202. El sistema de bomba 216 puede incluir además una bomba de jeringa 214 acoplada a la jeringa 208. La bomba de jeringa 214 está configurada para un control preciso del flujo de la muestra de ensayo 108 a través del tubo capilar 202. El sistema de bomba 216 también puede ser una bomba peristáltica.

Las figuras 2B y 2C muestran unas vistas detalladas de dos realizaciones del tubo capilar 202. La figura 2B muestra unas micropartículas 104 fluyendo a través del tubo capilar 202 hacia el volumen de ensayo 204. La figura 2C muestra el tubo capilar 202 con un elemento magnético 220 colocado de una manera concéntrica alrededor del tubo capilar 202. El elemento magnético 220 puede ser un anillo continuo, o estar compuesto de uno o más elementos separados. El elemento magnético 220 se usa junto con las micropartículas 104 y la sustancia fluorescente 106 que están cargadas magnéticamente. Esta configuración puede ayudar a enfocar sustancialmente las micropartículas 104 marcadas con la sustancia fluorescente 106 en el centro del tubo capilar 202 a medida que fluyen a través del volumen de ensayo 204, mejorando de este modo la detección de las micropartículas 104.

La figura 3A muestra una configuración de medición fluorescente láser 300. Un láser 302 genera un rayo láser 304. El rayo láser 304 puede enfocarse a través de una o más lentes 306 sobre un volumen de ensayo 204. La longitud de onda y el tamaño de haz del láser 302 se seleccionan de acuerdo con la longitud de onda de absorción de la sustancia fluorescente 106 y el tamaño del tubo capilar 202.

Cuando la muestra de ensayo 108 se hace pasar a través del volumen de ensayo 204, cualquier sustancia fluorescente 106 presente en la muestra de ensayo 108 se expone al haz láser 302. Como alternativa, una muestra de ensayo permanente 108 en el tubo capilar 202 puede moverse en relación con el haz láser 302 para exponer la muestra de ensayo 108. Una lente colectora 310 recoge y capta las imágenes de la luz fluorescente emitida por la sustancia fluorescente 106 sobre un fotomultiplicador 312. Un conjunto de filtros de interferencia 314 puede colocarse delante del fotomultiplicador 312 para filtrar la luz resonante de la luz fluorescente. Un fotodiodo 316 puede colocarse en el lado opuesto de la cámara de ensayo 308 para recoger la luz resonante. La salida del fotomultiplicador 312 puede enviarse a una primera unidad de procesamiento digital 318 para analizar los picos fluorescentes. La salida del fotodiodo 316 puede enviarse a una segunda unidad de procesamiento digital 320 para analizar los picos de dispersión de Mie.

La figura 3B muestra otra configuración de medición fluorescente láser 300. En este caso, las emisiones fluorescentes pasan a través de una rejilla de difracción 313 y se captan imágenes sobre una matriz de detectores múltiples 315. La longitud focal y la apertura de la lente de recogida 310, las características de dispersión de la rejilla 313 y el tamaño y la separación de los múltiples detectores en la matriz 315 están optimizados para detectar al menos dos o tres bandas de emisión fluorescentes específicas del espectro de emisión de la sustancia fluorescente 106 así como la luz resonante. Puede usarse un conjunto de filtros de interferencia 317 para individualizar la emisión fluorescente de la sustancia fluorescente 106 usada para marcar las micropartículas 104. Mediante la lectura de la emisión fluorescente en múltiples localizaciones espectrales que usa múltiples filtros interferenciales 317 con características de transmisión específicas, pueden detectarse y distinguirse la sustancia fluorescente 106 específica. La contribución de la señal fluorescente total a cada detector proporcionará los datos necesarios para diferenciar la sustancia fluorescente específica 106 de las emisiones fluorescentes de las partículas no marcadas. La salida de la matriz de detectores múltiples 315 puede alimentarse a una unidad de procesamiento digital 318, que procesa y digitaliza las múltiples señales suministradas por la matriz de detectores múltiples 315.

La figura 3C muestra otra configuración más de medición fluorescente láser 300. Una pluralidad de láseres 302 genera una pluralidad de haces láser 304. Los haces láser 304 puede enfocarse a través de una o más lentes 306 sobre un volumen de ensayo 204. El tamaño del haz láser 304 puede hacerse coincidir con el tamaño del tubo capilar 202. Las longitudes de onda de los láseres 302 se sintonizan a las bandas de absorción específicas de la sustancia fluorescente 106. Este sistema de láser y de detección múltiple puede ayudar a reducir los falsos resultados positivos y negativos asociados con un único sistema láser.

La figura 4A muestra una salida de ejemplo de la unidad de procesamiento digital 318. La señal de tensión que sale del foto-multiplicador 312 se digitaliza y se transfiere a un ordenador en el que puede manipularse y analizarse. La señal de tensión puede digitalizarse a una frecuencia de hasta 3000 Hz con una precisión de 8 bits.

Cada vez que la sustancia fluorescente 106 pasa a través del volumen de ensayo 204, se crea un pico fluorescente 402. Puede seleccionarse un valor umbral 404 de acuerdo con el nivel de señal de línea de base y su varianza. El número de picos fluorescente 402 detectados por encima del valor umbral 404, junto con el tamaño de los picos de tensión, proporcionan una medida de la cantidad de sustancia fluorescente 106. En el caso de la concentración tóxica, comparado estos datos con los datos de una muestra de control no contaminada permite la determinación de la concentración tóxica en la muestra de agua 102.

La figura 4b muestra otra salida de ejemplo de la unidad de procesamiento digital 318. Cuando una micropartícula 104 que se ha marcado por una sustancia fluorescente 106 pasa a través del volumen de ensayo 204, genera una ráfaga de luz fluorescente con una firma de tiempo 406 y una firma espectral 408. La firma de tiempo 406 y la firma espectral 408 se procesan a continuación por la unidad de procesamiento de señales digitales 318 y se comparan con el tiempo y las firmas espectrales esperados de la micropartícula 104 y la sustancia fluorescente 106 a detectar.

Debido a que una amplia gama de partículas y organismos son naturalmente fluorescentes en un amplio intervalo de longitudes de onda, es crucial diferenciar espectralmente una micropartícula para detectarla de manera fiable. Pueden usarse múltiples fuentes láser y detectores en estrecha proximidad de longitud de onda para localizar espectralmente el patrón fluorescente del colorante unido a la micropartícula marcada para su detección. Las técnicas de análisis de señales electrónicas pueden adaptarse a la comprensión de la forma predefinida y a las propiedades espectrales de la micropartícula objetivo antes de la detección.

El uso de múltiples señales proporciona la normalización y la mejora de selectividad. Las mediciones en más de una longitud de onda de emisión fluorescente y/o en más de una longitud de onda de excitación proporcionan una selectividad espectral que puede distinguir diferentes fuentes de colorantes. Debido a que los colorantes usados para la inmunofluorescencia tienen comúnmente unos picos de emisión relativamente estrechos en comparación con las fuentes fluorescentes de fondo, las relaciones de señales de pico a valle pueden distinguir de manera fiable las partículas etiquetadas con tinte a partir de eventos de fondo de similar fluorescencia absoluta.

Las señales de partículas de fondo se rechazan través de un filtrado electrónico, permitiendo de este modo una tasa de datos de muestreo sostenida y muy alta. El filtrado electrónico implica el uso de diversos detectores y se hace posible la singularidad de una firma de dispersión de luz de la partícula y la presencia de al menos dos firmas de longitudes de onda fluorescentes. Basándose en el análisis de señal diferencial de cada una de las señales amplificadas de registro detectadas, puede conseguirse la capacidad de singularizar la micropartícula marcada a una tasa de frecuencia de datos de hasta 50 kHz.

La figura 5A muestra el espectro de emisión de diversos colorantes de cianuro fluorescentes que pueden usarse para marcar las micropartículas 104: Cy5, Cy5.5, y Cy7, con picos de absorción máxima de 650 nm, 675 nm, y 743 nm, respectivamente. La matriz de detectores múltiples 318 puede usarse para registrar primero el espectro fluorescente del colorante específico. Los espectros fluorescentes emitidos por las micropartículas marcadas 104 en la muestra se comparan a continuación con el espectro fluorescente registrado del colorante. De esta manera, las micropartículas marcadas 104 pueden identificarse y distinguirse de otras micropartículas marcadas con

fluorescencia 104. Además, debido a que el caudal está controlado, la anchura de la señal de traza puede considerarse proporcional al diámetro de la micropartícula 104 que cruza el volumen de ensayo 204.

La figura 5B muestra un diagrama de flujo de una estrategia de procesamiento de señal para detectar una micropartícula marcada Cy5 104 en presencia de otras micropartículas marcadas con fluorescencia. Se usan cuatro detectores. El detector D1 está centrado en la excitación láser resonante, en este caso 635 nm. Los detectores D2, D3 y D4 están centrados en 650 nm, 670 nm y 690 nm, correspondientes a las funciones de la emisión fluorescente Cy5.

Cuando se detecta una micropartícula 104 en el volumen de ensayo 204, en primer lugar, se analiza la traza de tiempo de la señal detectada por el detector D1 (bloque 502) y se comparan la intensidad de señal S1 y la anchura de pulso W1 con la traza de tiempo prevista (S_c , W_c) generada por el paso de la micropartícula específica en el volumen de ensayo (bloque 504). Si la señal detectada no cumple este criterio, entonces se rechazan los datos (bloque 506). Si la señal detectada pasa este primer ensayo, entonces se analiza la relación de intensidad fluorescente de los detectores D2, D3 y D4 (bloque 508). La relación fluorescente de S2/S3 y S2/S4 se compara con las relaciones fluorescentes esperadas correspondientes a los espectros fluorescentes de Cy5 Sca y Scb, respectivamente (bloque 510). Si estos dos ensayos son positivos, se cuenta una micropartícula (bloque 512); si los ensayos son negativos, se rechazan los datos (bloque 514).

EJEMPLO 1

El sistema portador de flujo 100 se calibró usando unas muestras de agua con concentraciones de fluoesferas conocidas. Una solución de referencia de 3×10^9 perlas/ml se diluyó 1000 veces. A continuación, se prepararon unas muestras de agua que contenían 0, 3, 500, 7000, 14000 y 28000 perlas/ml con un intervalo de confianza del 10 % usando una micropipeta de 20 μ l. Estas muestras de agua se pasaron a través del dispositivo. La figura 6A muestra los recuentos de picos fluorescentes detectados frente a los recuentos esperados para las muestras de calibración. Se obtuvo consistentemente una excelente correlación.

Una muestra de referencia de 10^7 *E. Coli* 60 SYTO™ de ADN tintado se preparó matando primero a la bacteria usando una exposición de isopropanol al 70 % durante una hora y a continuación, siguiendo con tres lavados estériles. A continuación, la población de bacterias de *E. coli* se tiñó con una concentración de 5 μ mol de colorante 60 SYTO™. Las características espectrales del colorante 60 SYTO™ (Abs = 650 nm, Em = 678 nm) son muy adecuadas para el sistema basado en láser de la presente invención.

Se prepararon cinco muestras de concentración graduadas de 10^7 a 0 *E. coli* por ml tintadas usando una micropipeta de 20 μ l y 2 μ m de agua filtrada desionizada. Se extrajo una solución de 100 μ l de cada muestra usando una jeringa de 1 ml. La jeringa se colocó sobre una bomba de jeringa y se inyectó un caudal de 10 μ l/min de la solución en un solo capilar de 70 μ m hacia el volumen de ensayo. El volumen de ensayo fluorescente se definió mediante un haz láser enfocado de 20 μ m usando un diodo láser de 635 nm, 5 mW y una sola lente focal de 10 mm. El volumen de ensayo se visualizó en una hendidura de 3 mm x 3 mm usando un microscopio de objetivo 40x. La señal de fotodetector se digitalizó a 3000 Hz y un intervalo dinámico de 8 bytes. La señal digitalizada se transmitió a través de un solo cable serie a un ordenador portátil. La señal se visualizó en línea en una pantalla de ventana usando un software propietario. Se registró una serie de tiempo correspondiente a una inyección de cada muestra a un caudal de 10 μ l/min durante 30 segundos. Se realizó un experimento por triplicado para cada muestra, que corresponde a una inyección de 90 segundos. Controlando el caudal, el tiempo de inyección y la concentración esperada, se calculó un recuento de pico fluorescente esperado y se comparó con el recuento medido real. Para cada muestra, también se calculó el tiempo medio de residencia de pico, la intensidad de pico y la potencia de pico (integral de pico).

El proceso de llegada de la partícula a través del volumen de ensayo se supone que sigue un proceso de llegada aleatorio y por lo tanto sigue un proceso de Poisson. El número de recuento esperado se corrigió en consecuencia, para tener en cuenta la probabilidad de que más de una partícula llegue al volumen de ensayo durante una ventana de tiempo equivalente al tiempo de tránsito de partícula a través del haz láser, teniendo en cuenta el hecho de que un único recuento detectado podría atribuirse a más de una partícula.

La figura 6B representa la distribución de tasa de llegada de partículas en el volumen de ensayo para la concentración de organismo investigado. Para concentraciones mayores que 10^5 p/ml a una caudal de 10 μ l/min, es necesaria una corrección estadística de Poisson. En particular, a una concentración de 10^7 *E. coli* por ml, hay más de un *E. coli* cruzando el volumen de ensayo el 80 % del tiempo.

La figura 6C representa una correlación entre la concentración esperada y la señal fluorescente detectada integrada correspondiente al paso del individuo *E. coli* tintado a través del volumen de ensayo láser. La señal integrada se calculó como el producto del número de picos detectados corregidos por las estadísticas de Poisson y la potencia media de pico (V/ms). La correlación es excelente, con una pendiente del 98 %. Sin embargo, cuando no había una *E. coli* presente en la muestra, se detectó un ruido de fondo integrado de 4 picos cada 30 segundos. Estos picos de

fondo se atribuyen a las burbujas que desvían la reflexión del haz en la hendidura de fotodetector o a las partículas fluorescentes de manera natural. El uso de múltiples matrices de detección de longitud de onda y un detector de dispersión de luz pueden eliminar estos recuentos positivos falsos.

5 EJEMPLO 2

La monitorización de la calidad del agua usando rotíferos se realizó usando un tubo capilar con un diámetro interior de 70 µm, una banda estrecha, 635 nm, se usó un láser de diodo de 3 mW con un diámetro de haz de 40 µm. Se seleccionaron unos filtros de interferencia para transmitir el 12 % a 670 nm (20 nm FWM), y 10⁻⁶ en todas las otras longitudes de onda.

10 Método

15 1. Un cultivo de rotíferos *B. plicatilis* vivo se obtuvo de Aqua-Farms, Florida. Estos rotíferos fueron elegidos debido a que son fáciles de criar y la influencia de las muestras tóxicas en sus tasas de alimentación, reproducción y muerte se han estudiado de manera muy amplia. La concentración media de rotíferos en un vial de 100 ml se contó usando cinco muestras de 20 µl examinadas en un microscopio de 50x. Se midió un recuento medio de 10 rotíferos por muestra de 20 µl, o aproximadamente 500 rotíferos/ml.

20 2. Se usaron dos muestras de 8 ml cada una para realizar las mediciones de tasa de alimentación, una muestra de referencia y una muestra de ensayo. Estos dos viales se llenaron con la solución de referencia de 500 rotíferos/ml.

3. Una solución de diazinón de 2000 ppm se preparó usando la solución media de rotíferos, con el fin de mantener los parámetros de calidad del agua tales como el pH, O₂, alcalinidad, salinidad, y la temperatura lo más constantes posible. Se añadió una cantidad de 20 µl de la solución de diazinón a la muestra de ensayo.

25 4. Después de una incubación de 5 minutos, se añadieron 20 µl de una solución de 40 x 10⁶ perlas/ml de fluoesferas carmesí tanto a la muestra de referencia como de ensayo. El tiempo se anotó como t = 0.

5. Usando dos jeringas idénticas conectadas con una unión luer a una pieza de 100 µm de tubo de nylon terminada con un filtro de plancton de 20 µm, se extrajo una muestra de 50 µl de las muestras de referencia y de ensayo. En ambos casos, los organismos se filtraron de la solución de perlas.

30 6. Las muestras de referencia y de ensayo se hicieron pasar sucesivamente a través de la cámara de ensayo usando la bomba de jeringa a un caudal de 15 µl/min. Los datos de la adquisición de datos se almacenaron para su posterior análisis.

7. Se repitieron las etapas 5 y 6 para t = 5, 10, 15 y 20 minutos.

35 Análisis de los datos

Cada archivo de datos se ha recuperado, usando TOXANATM, un programa de software de análisis de datos de series de tiempo. Este programa permite la visualización de la señal de traza del fotomultiplicador digitalizada en una escala de 0-5 V para cada archivo de datos. Se realizó una evaluación de los valores de varianza y media de línea base de señal (donde no se detectó un pico) para cada archivo. A partir de esta medición, un umbral de detección de pico, T_d, se calcula de la siguiente manera:

$$T_d = media + 2\sqrt{varianza}$$

45 Se calcularon para cada archivo el número de picos con una intensidad por encima de T_d, así como la intensidad media de pico, la anchura media de pico, y el área media de pico.

Modelo Analítico

50 El volumen de eliminación V_{Cl} para un organismo con una motilidad media Ω y un diámetro de eliminación d se puede suponer que sea:

(Ec. 1)
$$V_{Cl} = \Omega \cdot \pi \cdot \frac{d^2}{4}$$

55 El número de perlas presentes en el volumen de eliminación por unidad de tiempo es igual a:

(Ec. 2)
$$\frac{dN_b}{dt} = C_b(t) \cdot V_{Cl}$$

60 Se asume que un volumen V contiene organismos con una motilidad media Ω. En este volumen la concentración de partículas o perlas de alimentos es C_b(t).

El cambio en la concentración de perlas varía por unidad de tiempo:

$$(Ec. 3) \quad \frac{d(C_b(t))}{dt} = -\frac{dN_b(t)}{dt} \cdot \frac{N_0}{V}$$

5 Sustituyendo (1) y (2) en (3), la tasa a la que la concentración de perlas varía con el tiempo se rige por la ecuación diferencial:

$$(Ec. 4) \quad \frac{d(C_b(t))}{dt} = -C_b(t) \cdot \pi \cdot \frac{d^2}{4} \cdot \Omega \cdot \frac{N_0}{4}$$

Se define la constante K como:

10

$$(Ec. 5) \quad K = \pi \cdot \frac{d^2}{4} \cdot \Omega \cdot \frac{N_0}{4}$$

A continuación 1/K es una constante de tiempo que refleja la tasa a la que disminuye la concentración de perlas. A continuación (5) se convierte en:

15

$$(Ec. 6) \quad \frac{d(C_b(t))}{dt} = -K \cdot C_b(t)$$

La integración (6) proporciona:

20

$$(Ec. 7) \quad C_b(t) = \lambda \cdot e^{-Kt}$$

Cuando $t = 0$ y $C_N(t = 0) = C_{B0}$, (7) se convierte en:

25

$$(Ec. 8) \quad C_b(t) = C_{B0} \cdot e^{-Kt}$$

La tasa de alimentación se define como el número de perlas ingeridas por organismo y por unidad de tiempo. Esto puede expresarse por:

30

$$(Ec. 9) \quad FR = \frac{dN_b}{dt} \cdot \frac{1}{N_0} = \frac{d(C_b)}{dt} \cdot \frac{V}{N_0}$$

Combinando (8) y (9), F puede expresarse de la siguiente manera:

$$(Ec. 10) \quad FR = K \cdot C_b(t) \cdot \frac{V}{N_0}$$

35 Suponiendo que $d(C_b)/dt$ es pequeña en comparación con $C_b(t)$, F se convierte en una constante que puede expresarse como:

$$(Ec. 11) \quad FR = K \cdot C_b \cdot \frac{V}{N_0}$$

40 La figura 7A muestra las concentraciones de perlas normalizadas frente al tiempo de alimentación de acuerdo con el modelo proporcionado en la Ec. 8 para tres concentraciones de organismos diferentes: 100 rotíferos/ml, 250 rotíferos/ml y 1000 rotíferos/ml. El valor analítico usado para modelar la tasa de alimentación (FR) en este caso es 2,7 perlas/min.

45 Este valor se calcula basándose en las siguientes suposiciones: el organismo es un rotífero y su tasa de eliminación es proporcional a una sección de diámetro de 150 μm con una motilidad de 15 cm/s. Es importante señalar que la sensibilidad de la técnica depende fuertemente de la concentración del organismo.

Resultados

5 La figura 7B muestra las concentraciones de fluoesfera normalizadas frente al tiempo de alimentación para una muestra de ensayo que contiene 1 ppm de diazinón y una muestra de control. Para comparar los resultados experimentales con el modelo, se usó una concentración de 500 rotíferos/ml.

10 Para la muestra de control la correlación entre el modelo y el experimento es excelente durante los primeros 600 segundos. En esta región, la tasa de alimentación media es de 29×10^{-3} perlas/s. La desviación del experimento a partir del modelo después de 900 segundos puede atribuirse a dos factores. En primer lugar, el modelo asume que la variación de C_b sigue siendo pequeña en comparación con C_b y por lo tanto la tasa de alimentación es una constante. De hecho, la tasa de alimentación depende de la concentración de alimento, que después de 900 segundos se ha reducido en un 50 %. Esta variación no puede descuidarse. En segundo lugar, los rotíferos tienen un tiempo medio de tránsito de digestión de 1200 segundos. Ya que las fluoesferas no se metabolizan por los rotíferos, se expulsan de nuevo en la muestra por los rotíferos después de 1000 segundos, lo que puede contribuir a un aumento en la concentración de perlas.

20 Para la muestra de ensayo, la concentración de fluoesferas disminuye ligeramente con una pendiente correspondiente a una tasa de ingestión por organismo de 10^{-3} perlas/s. En este caso, la tasa de alimentación se redujo en un factor de 30 desde la exposición a 1 ppm de diazinón.

25 La figura 7C muestra las concentraciones de fluoesferas normalizadas frente al tiempo de alimentación para una muestra de ensayo que contiene 1 ppm de diazinón y una muestra de control. La concentración de organismos es ahora de 600 rotíferos/ml.

30 De nuevo, para la muestra de control, el acuerdo entre el modelo y el experimento es excelente durante los primeros 600 segundos. La tasa de alimentación es ahora de 3 perlas/min por organismo, en comparación con el valor obtenido anteriormente de 1,7 perlas/min por organismo. Para la muestra de ensayo, la concentración de perlas permanece casi sin cambios con el tiempo e indica una tasa de alimentación de menos de 0,05 perlas/min. Esta medición es coherente con los experimentos anteriores.

35 La figura 7D muestra las concentraciones de fluoesferas normalizadas frente al tiempo de alimentación para una muestra de 600 rotíferos/ml y una muestra de 1000 rotíferos/ml. Las dos muestras se expusieron a unas fluoesferas de $2 \mu\text{m}$ concentradas durante 1700 segundos. Las concentraciones de fluoesferas se monitorizaron continuamente y las concentraciones normalizadas se informaron y compararon con el modelo de tasa de eliminación descrito anteriormente. El acuerdo entre el modelo y el experimento es óptimo para una tasa de alimentación promedio por organismo igual a 4,8 perlas/min.

40 Para expresar la tasa de alimentación en términos de masa, puede usarse la siguiente ecuación:

$$(Ec. 12) \quad \dot{M} = FR \cdot \rho \cdot V_{\text{fluo}}$$

45 donde FR, ρ , y V_{fluo} son la tasa de alimentación media por rotíferos individuales, la densidad de fluoesfera, y el volumen de fluoesfera individual, respectivamente. En este caso, para una tasa de alimentación de 4,8 perlas/min y unas fluoesferas esféricas con una densidad de 1,055 g/ml y un diámetro de $2 \mu\text{m}$, el punto $M = 21 \times 10^{-12}$ g/min por organismo.

50 La descripción anterior de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción. No se pretende que sea exhaustiva o que limite la invención a las formas precisas desveladas. Obviamente, muchas modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Se pretende que el alcance de la invención esté definido por las reivindicaciones adjuntas.

Otros ejemplos se definen en los siguientes párrafos numerados.

55 1. Un dispositivo para detectar una micropartícula en un fluido, marcándose la micropartícula con una sustancia fluorescente, emitiendo la sustancia fluorescente una luz fluorescente cuando se expone a la radiación electromagnética, comprendiendo el dispositivo:

60 una cámara capilar;
un sistema de suministro de fluido acoplado a la cámara capilar, siendo el sistema de suministro de fluido capaz de introducir la micropartícula y el fluido en la cámara capilar;
una fuente de radiación electromagnética colocada en la proximidad de la cámara capilar para exponer la sustancia fluorescente a la radiación electromagnética; y
65 un dispositivo de detección configurado para medir la luz fluorescente emitida desde la sustancia fluorescente cuando la micropartícula está en la cámara capilar.

2. El dispositivo del párrafo 1, en el que la micropartícula es un microorganismo.
- 5 3. El dispositivo del párrafo 1, en el que la micropartícula es una bacteria, un virus, o un parásito.
4. El dispositivo del párrafo 1, en el que la micropartícula es una célula CD4.
5. El dispositivo del párrafo 1, en el que la micropartícula es una fluoesfera.
- 10 6. El dispositivo del párrafo 5, en el que el fluoesfera se ha ingerido por un filtro alimentador.
7. El dispositivo del párrafo 6, en el que el filtro alimentador tiene una tasa de alimentación sensible a un nivel tóxico en la muestra de fluido.
- 15 8. El dispositivo del párrafo 1, en el que la sustancia fluorescente es un anticuerpo conjugado colorante.
9. El dispositivo del párrafo 1, en el que la sustancia fluorescente es un colorante de ADN.
- 20 10. El dispositivo del párrafo 1, en el que la sustancia fluorescente tiene una carga magnética.
11. El dispositivo del párrafo 10, que comprende además:
- un elemento magnético colocado en una relación circundante al capilar, teniendo el elemento magnético una carga magnética que repele la sustancia fluorescente.
- 25 12. El dispositivo del párrafo 1, en el que el sistema de suministro de fluido es una jeringa acoplada a una bomba de jeringa.
13. El dispositivo del párrafo 1, en el que el sistema de suministro de fluido es una bomba peristáltica.
- 30 14. El dispositivo del párrafo 1, en el que la fuente de radiación electromagnética es al menos un láser.
15. El dispositivo del párrafo 1, en el que el dispositivo de detección es una matriz de detectores.
- 35 16. Un dispositivo para detectar una sustancia fluorescente marcada en una micropartícula, que comprende:
- un único sistema portador de flujo capilar para transportar la micropartícula más allá de una localización seleccionada;
- 40 una fuente de radiación electromagnética para irradiar la sustancia marcada en la micropartícula; y
- un sistema de detección para medir la luz fluorescente emitida desde la sustancia en la localización seleccionada.
17. El dispositivo del párrafo 16, en el que la fuente de radiación electromagnética comprende una fuente de luz.
- 45 18. El dispositivo del párrafo 17, en el que la fuente de luz comprende un láser.
19. El dispositivo del párrafo 16, en el que una pluralidad de micropartículas se transportan individualmente más allá de la posición deseada a una velocidad sustancialmente uniforme.
- 50 20. El dispositivo del párrafo 16, en el que la micropartícula es un organismo.
21. El dispositivo del párrafo 16, en el que la micropartícula es una fluoesfera.
22. El dispositivo del párrafo 21, en el que el fluoesfera se ingiere por un filtro alimentador.
- 55 23. El dispositivo del párrafo 22, que comprende además un dispositivo para exponer el filtro alimentador a una sustancia tóxica.
24. El dispositivo del párrafo 23, en el que la sustancia fluorescente se ingiere por el filtro alimentador, y la exposición del filtro alimentador a la sustancia tóxica afecta a la tasa de ingestión de la sustancia fluorescente por el filtro alimentador.
- 60 25. El dispositivo del párrafo 24, que comprende además medios para calcular la tasa de ingestión como una función de la cantidad de luz fluorescente emitida desde la sustancia fluorescente a la localización seleccionada.
- 65 26. El dispositivo del párrafo 16, en el que la sustancia fluorescente tiene una carga magnética.

27. El dispositivo del párrafo 26, que comprende además:
- 5 un elemento magnético colocado en una relación circundante adyacente a la localización seleccionada, teniendo el elemento magnético una carga magnética que repele la sustancia fluorescente.
28. Un método para detectar una micropartícula marcada con una sustancia fluorescente, que comprende:
- 10 transportar la micropartícula a una localización seleccionada;
irradiar la sustancia fluorescente marcada en la micropartícula; y
medir la luz fluorescente emitida desde la sustancia fluorescente a la localización seleccionada.
29. El dispositivo del párrafo 28, en el que la micropartícula es una bacteria.
- 15 30. El dispositivo del párrafo 28, en el que la micropartícula es un virus.
31. El dispositivo del párrafo 28, en el que la micropartícula es un quiste parasitario.
- 20 32. El dispositivo del párrafo 28, en el que la micropartícula es una célula CD4.
33. El dispositivo del párrafo 28, en el que la micropartícula es una fluoesfera.
34. El dispositivo del párrafo 33, en el que el fluoesfera se ha ingerido por un filtro alimentador.
- 25 35. El dispositivo del párrafo 34, en el que el filtro alimentador tiene una tasa de alimentación sensible a un nivel tóxico en la muestra de fluido.
36. El dispositivo del párrafo 28, en el que la sustancia fluorescente es un anticuerpo conjugado colorante.
- 30 37. El dispositivo del párrafo 28, en el que la sustancia fluorescente tiene una carga magnética.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo citómetro de flujo capilar (200, 300) para detectar micropartículas (104) en un fluido de muestra (102), marcándose las micropartículas (104) con una sustancia fluorescente (106) que tiene una carga magnética, emitiendo la sustancia fluorescente (106) luz fluorescente cuando se expone a la radiación electromagnética, comprendiendo el dispositivo:
- 5 un tubo capilar (202) que proporciona un pasaje para el fluido de muestra (102);
 un sistema de suministro de fluido (216) acoplado al tubo capilar (202), siendo el sistema de suministro de fluido (216) capaz de hacer que el fluido de muestra (102) fluya a través del tubo capilar (202);
 10 una fuente de radiación electromagnética (302) para proyectar un haz de radiación electromagnética a través del tubo capilar (202) para exponer la sustancia fluorescente (106) a la radiación electromagnética;
 un primer dispositivo de detección (312) configurado para detectar la luz fluorescente emitida desde la sustancia fluorescente (106) cuando las micropartículas (104) están expuestas al haz de radiación electromagnética; y
 15 un segundo dispositivo de detección (316) configurado para detectar la luz de resonancia de las micropartículas (104);
 caracterizado por que el dispositivo comprende además uno o más elementos magnéticos (220) colocados en una relación concéntrica con el tubo capilar (202), de tal manera que, en uso, las micropartículas (104) marcadas con la sustancia fluorescente (106) se enfocan en el centro del tubo capilar (202) a medida que fluyen a través
 20 del mismo.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el sistema de suministro de fluido (216) comprende una jeringa (208) acoplada a una bomba de jeringa (214).
- 25 3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el sistema de suministro de fluido (216) comprende una bomba peristáltica.
4. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la fuente de radiación electromagnética (302) es al menos un láser.
- 30 5. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el primer dispositivo de detección (312) es una matriz de detectores (315).
6. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el sistema de suministro de fluido (216) comprende al menos una bomba para bombear el fluido (102) y las micropartículas (104).
- 35 7. Un método para detectar micropartículas (104) marcadas con una sustancia fluorescente (106) que tiene una carga magnética, que comprende:
- 40 proporcionar un tubo capilar (202) que tiene un pasaje para las micropartículas (104) contenidas en un fluido de muestra (102);
 transportar el fluido de muestra (102) a una localización seleccionada en el tubo capilar (202);
 irradiar la sustancia fluorescente (106) marcada a las micropartículas (104) que pasan a través de la localización seleccionada;
 45 medir la luz fluorescente emitida desde la sustancia fluorescente (106) en la localización seleccionada; y
 medir la luz de resonancia dispersada de las micropartículas (104),
- caracterizado por que las micropartículas (104) marcadas con la sustancia fluorescente se enfocan en el centro del tubo capilar (202) a medida que fluyen a través del mismo, usando uno o más elementos magnéticos (220) colocados en una relación concéntrica con el tubo capilar (202).
- 50 8. El método de la reivindicación 7, en el que la micropartícula (104) es una bacteria, un virus, o un parásito.
9. El método de la reivindicación 7, en el que las micropartículas (104) son ooquistes de *Cryptosporidium* o quistes de *Giardia* y la sustancia fluorescente (106) es un colorante fluorescente conjugado con anticuerpos anti-*Cryptosporidium* o anti-*Giardia* respectivamente.
- 55 10. El método de la reivindicación 7, en el que el tubo capilar (202) tiene un diámetro interior configurado para admitir las micropartículas (104) sustancialmente una a la vez.

100

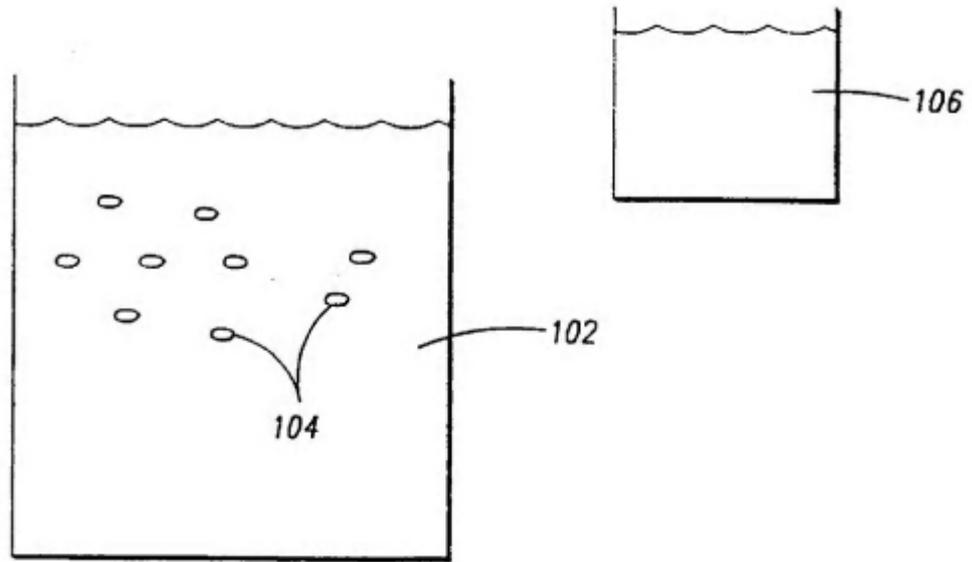


FIG. - 1

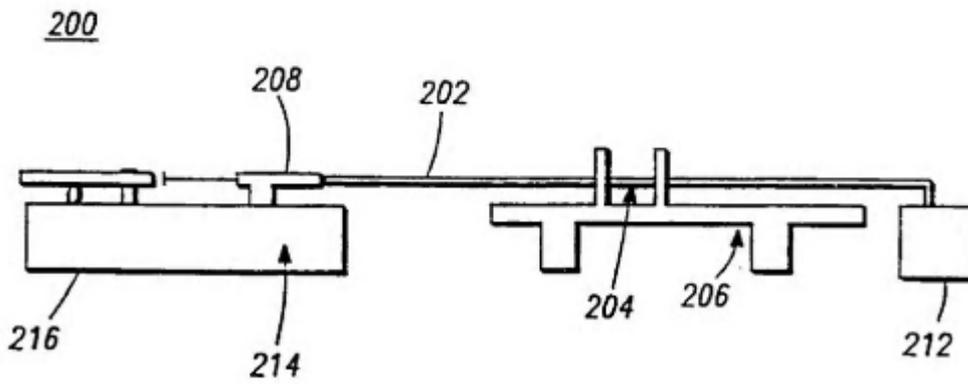


FIG. - 2A

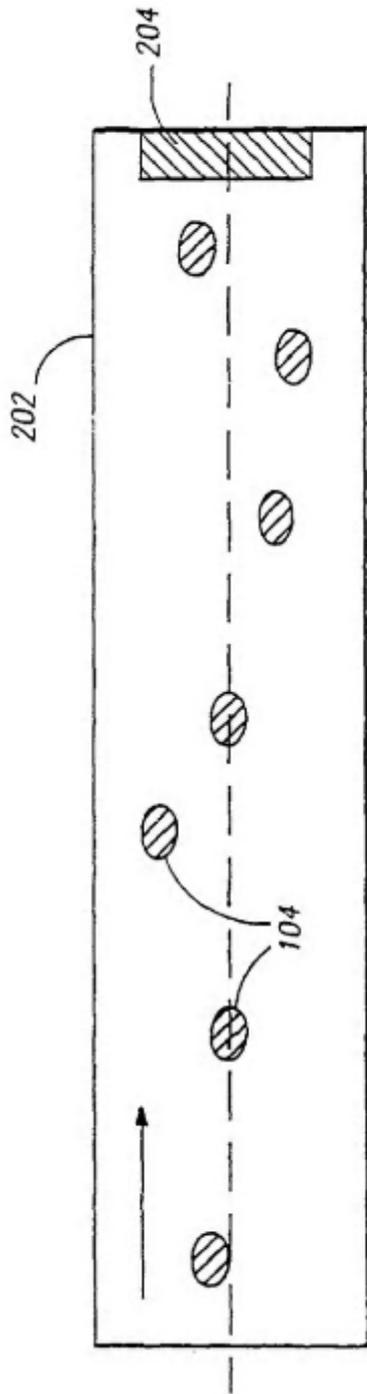


FIG. - 2B

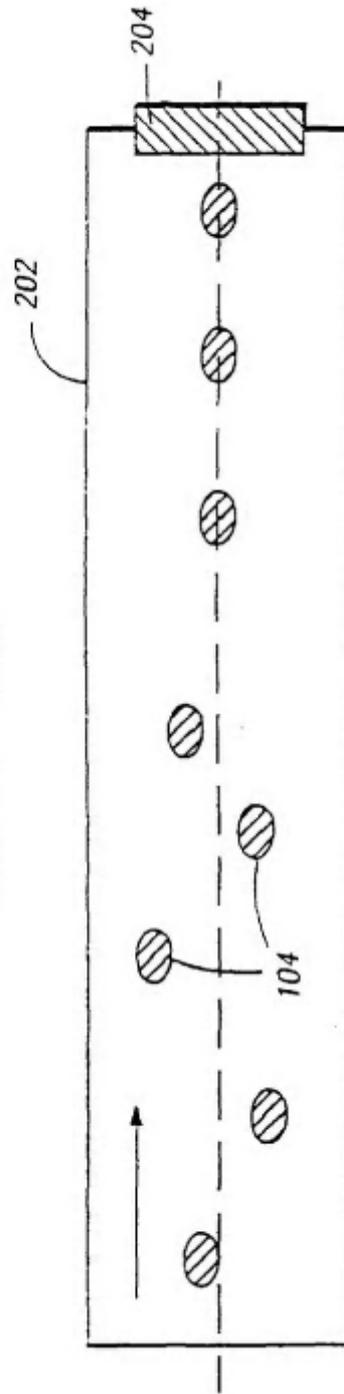


FIG. - 2C

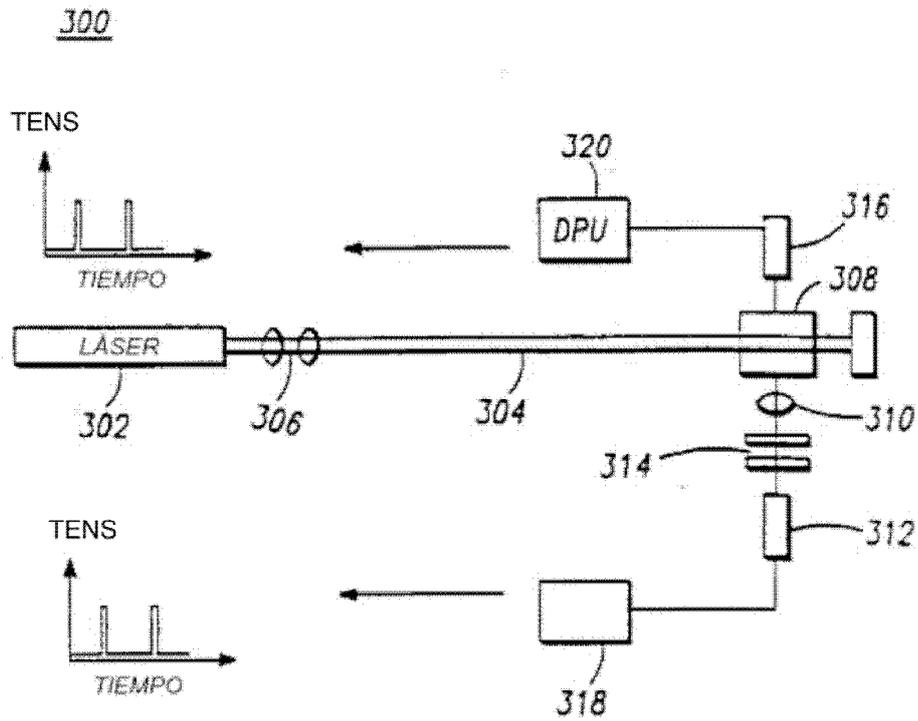


FIG. - 3A

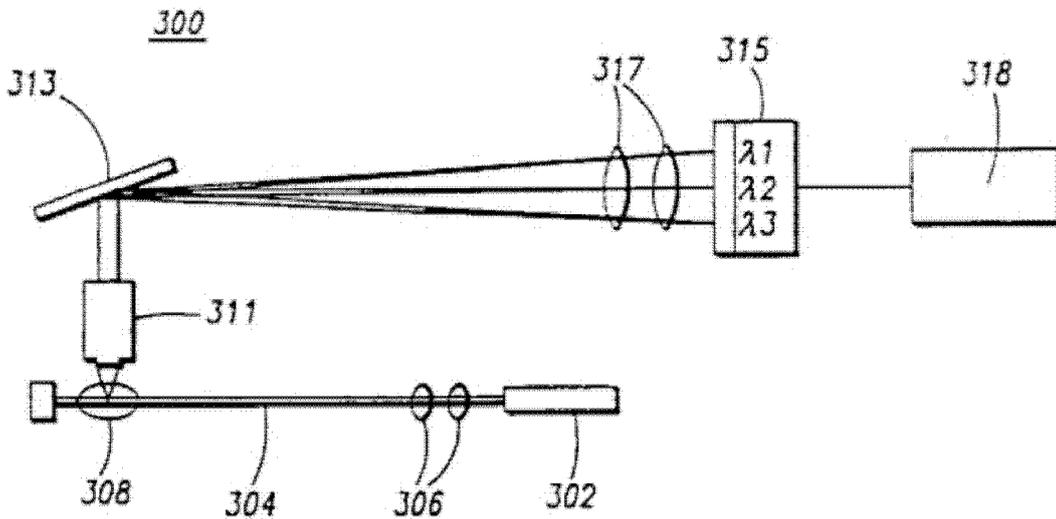


FIG. - 3B

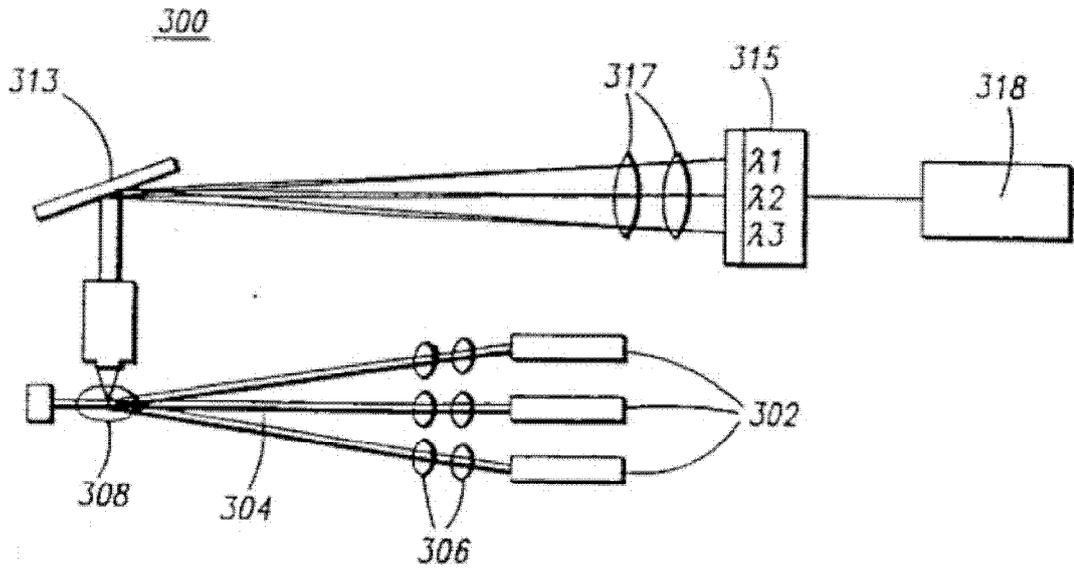


FIG. - 3C

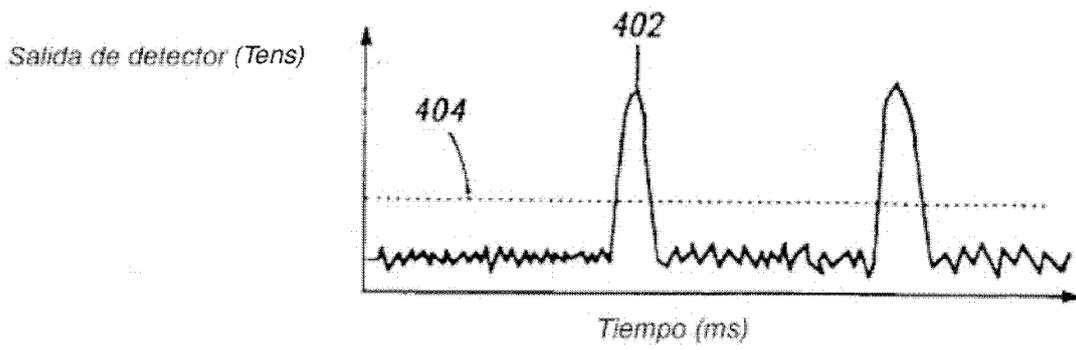


FIG. - 4A

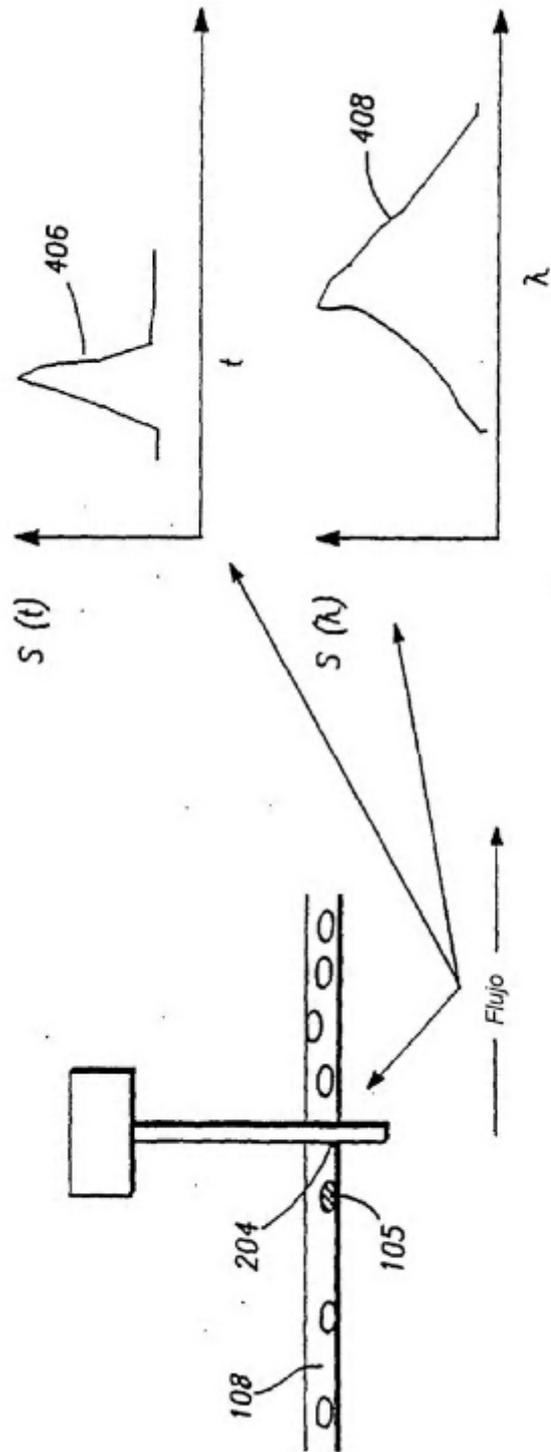


FIG. -4B

Espectro de emisión del colorante fluorescente CyDye

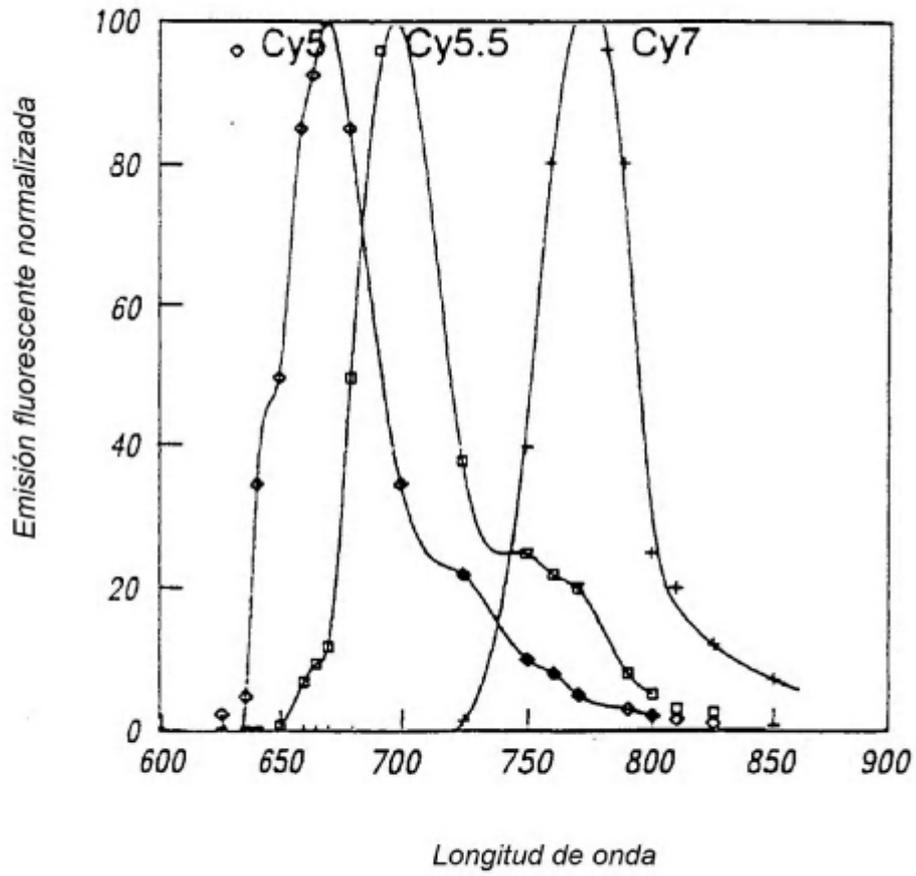


FIG. - 5A

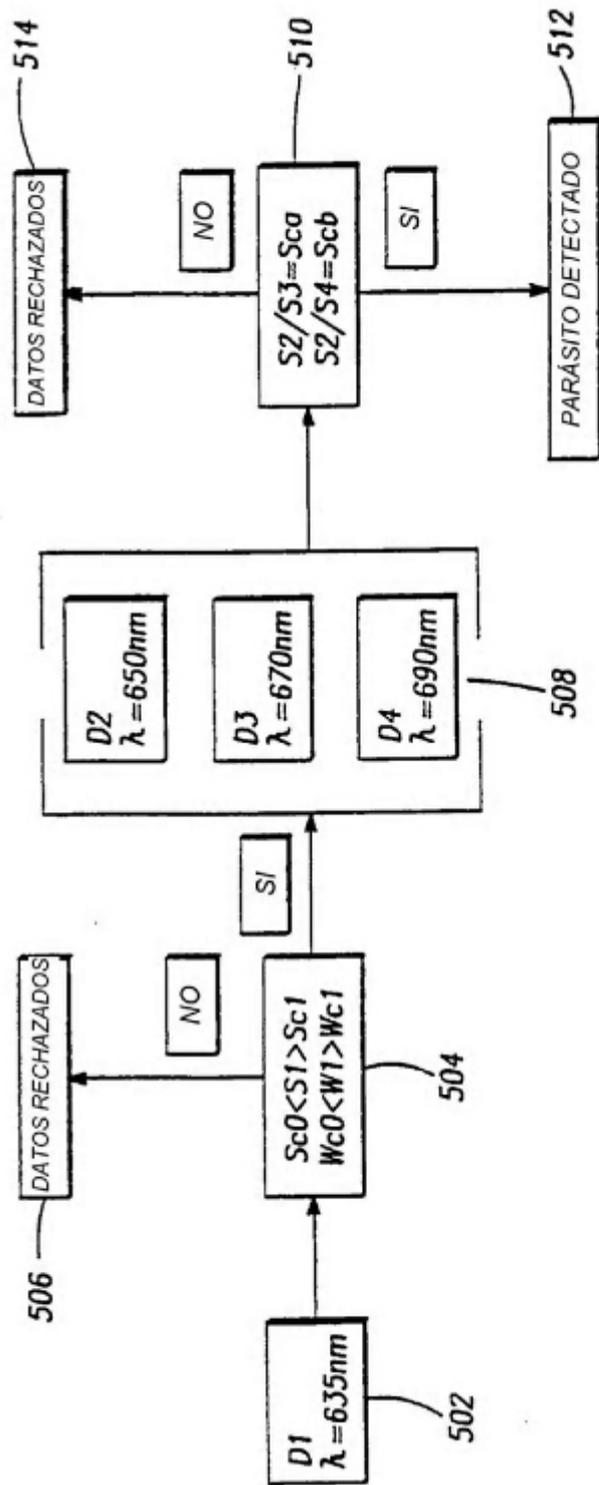


FIG. --5B

Experimento de calibración: perlas carmesí de 2 micrones

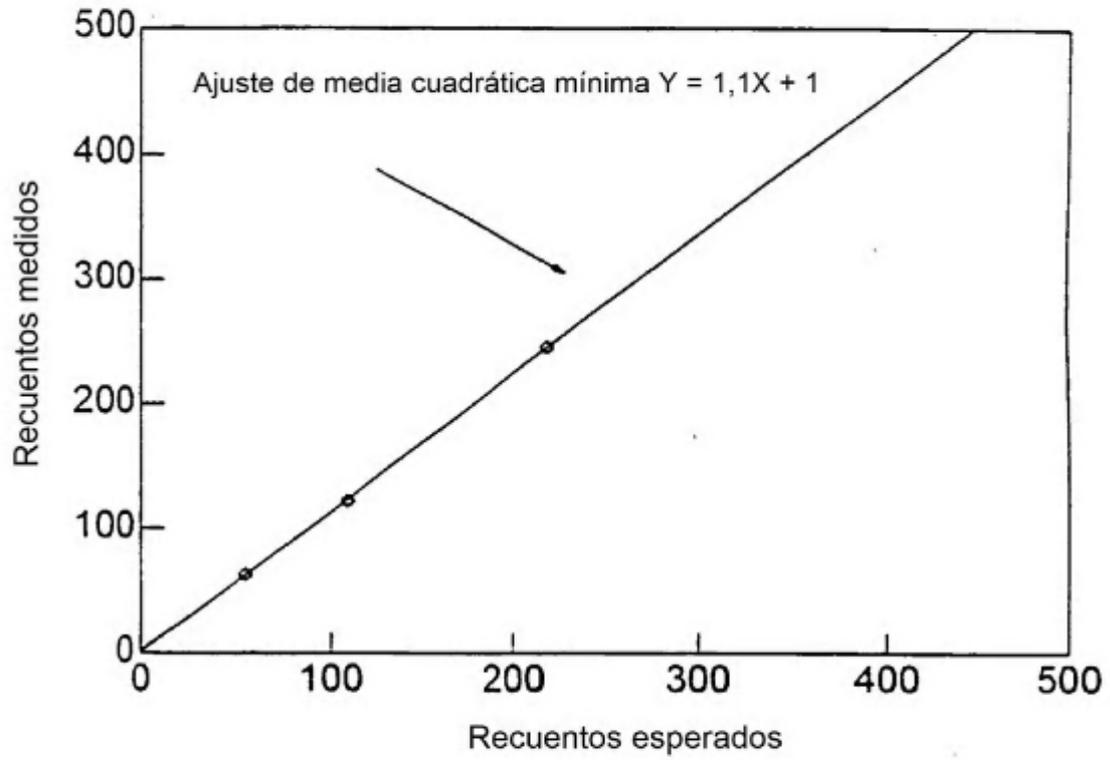


FIG. - 6A

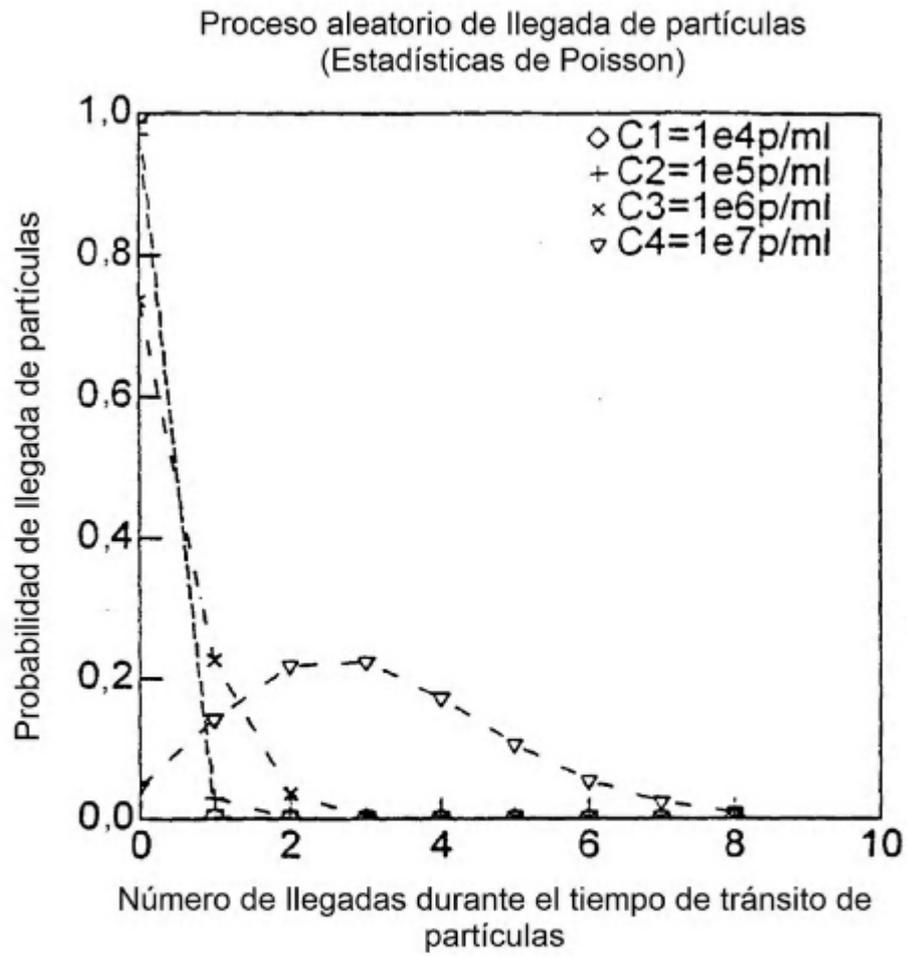


FIG. -6B

Curva de calibración Ecoli tintada SYTO60 (dispositivo Guava)
 Tiempo de detección: 30 segundos

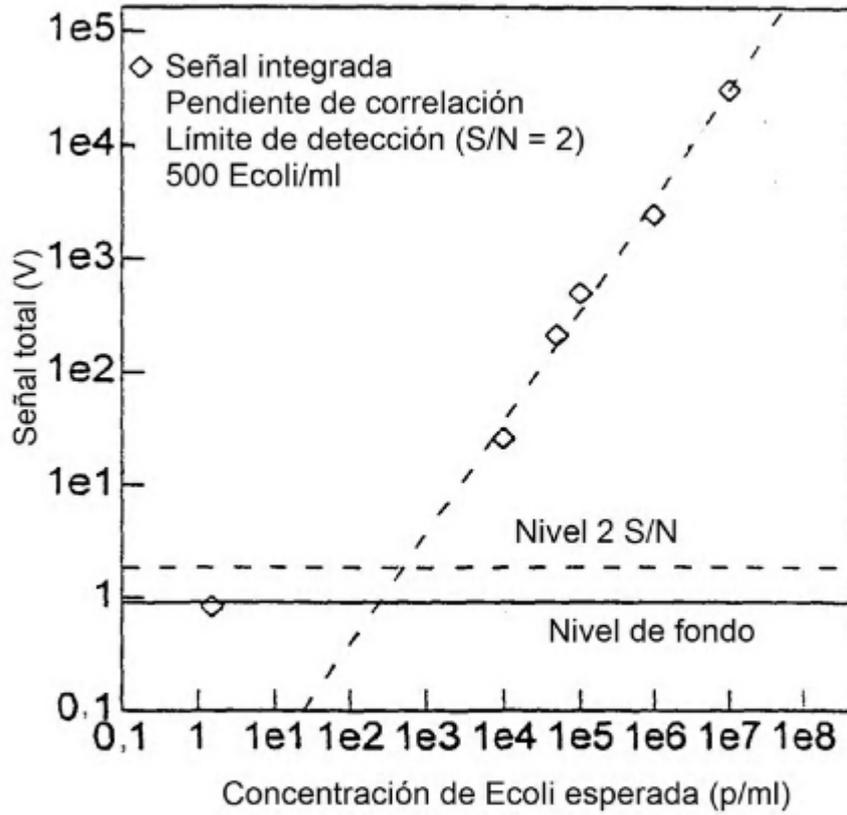


FIG. -6C

Efecto de la concentración de rotíferos sobre la tasa de eliminación

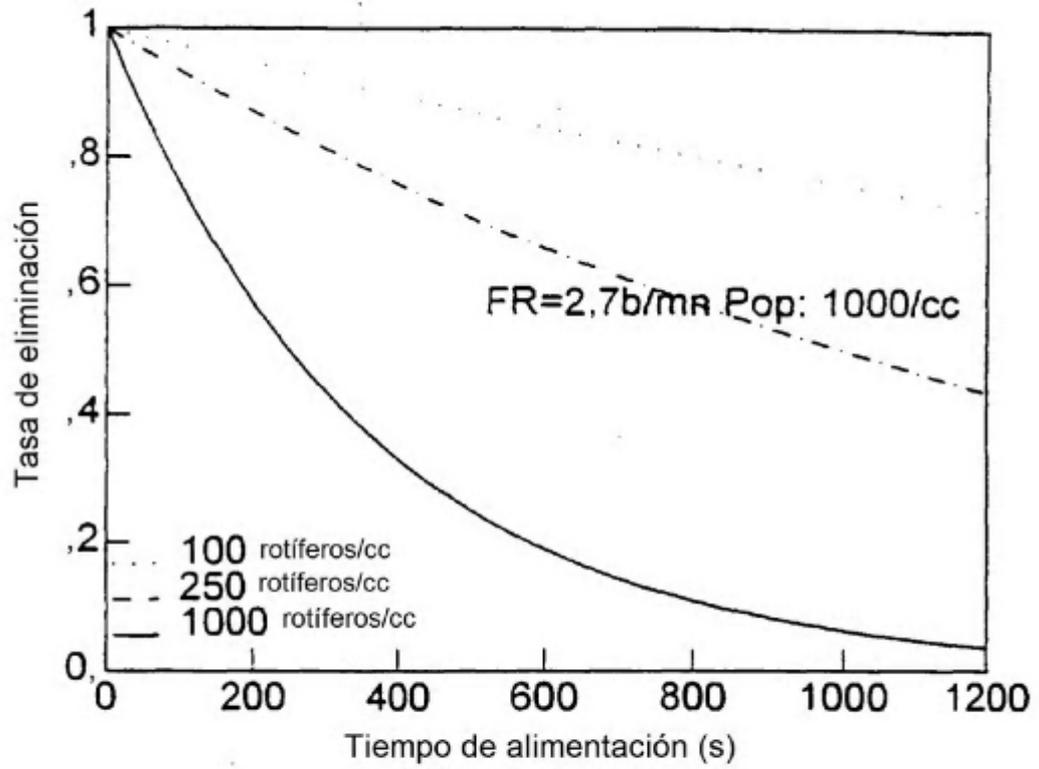


FIG. - 7A

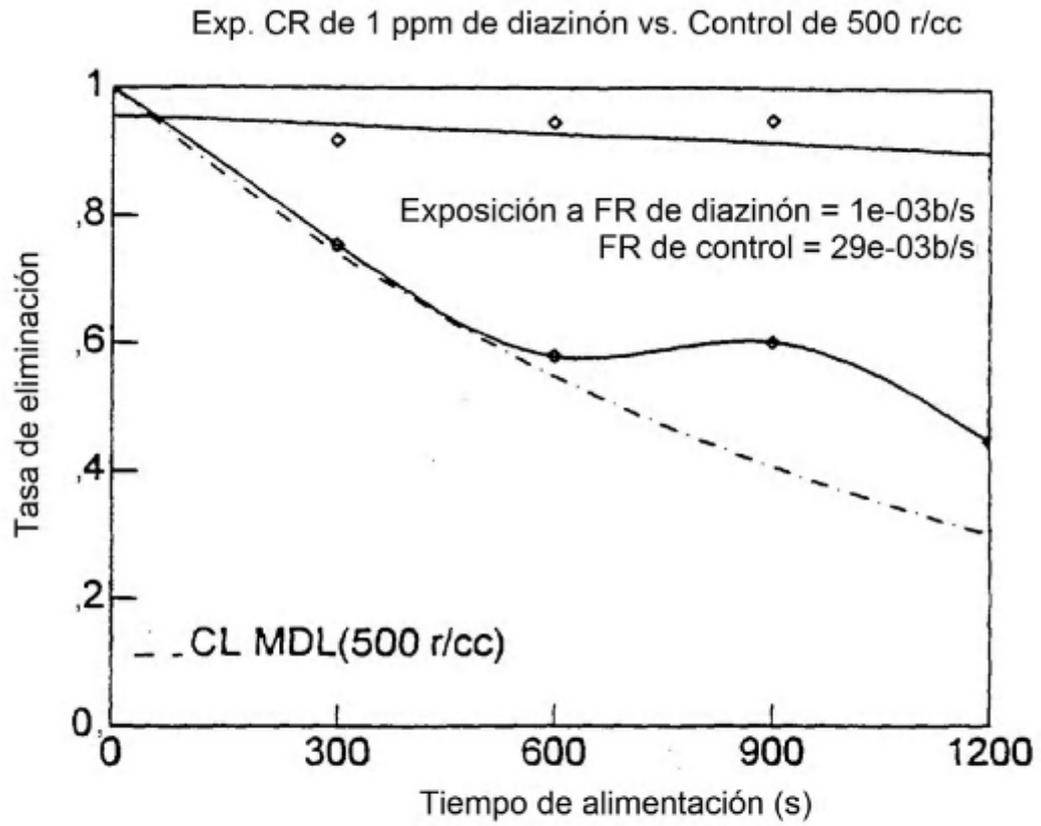


FIG. - 7B

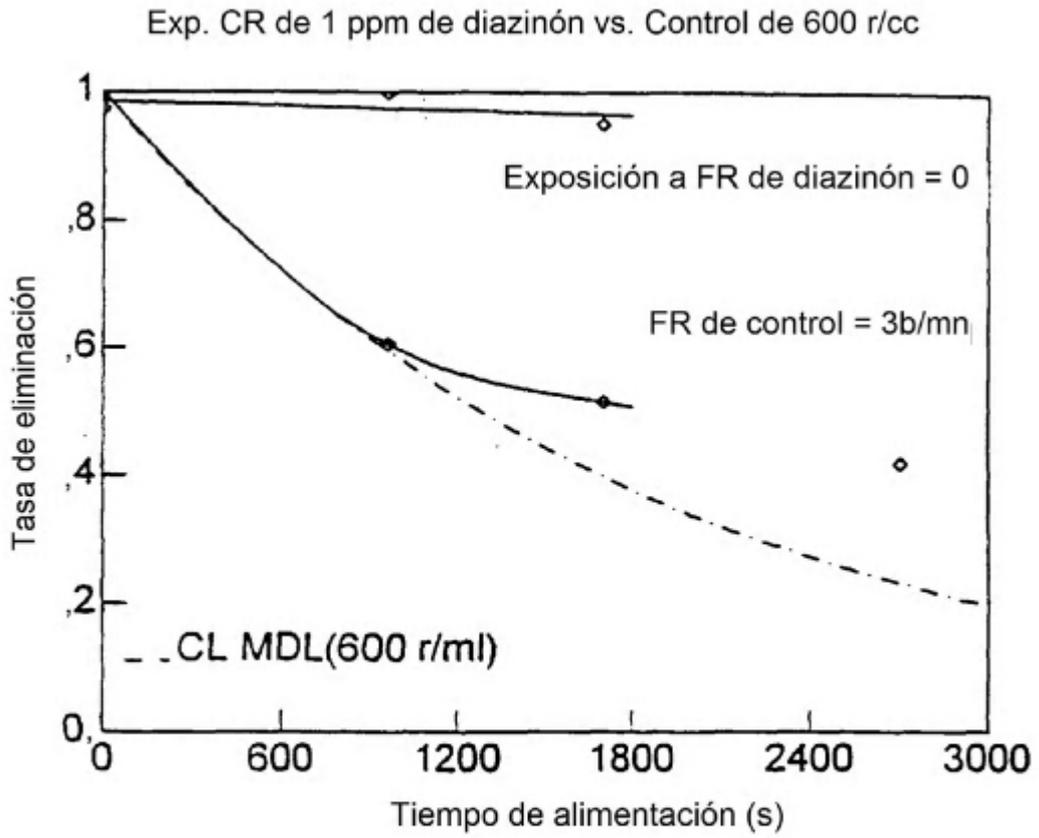


FIG. - 7C

Efecto de la concentración de rotíferos sobre la tasa de eliminación

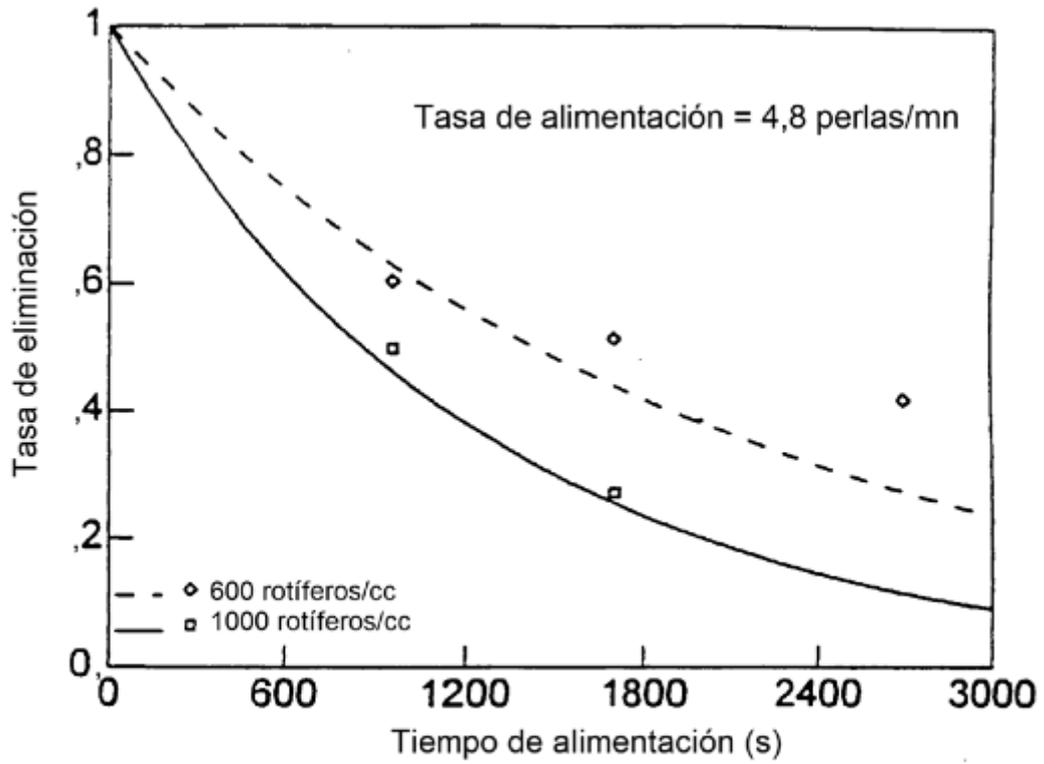


FIG. - 7D