

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 482**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2015** **E 15196909 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017** **EP 3025781**

54 Título: **Procedimiento de determinación de aglutinación**

30 Prioridad:

28.11.2014 EP 14461594

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.01.2018

73 Titular/es:

MAKULSKA, SYLWIA (50.0%)

Wilcza Gora; Zwirowa 2

05-506 Lesznowola, PL y

SANGO TECHNOLOGIES SP. Z O.O. (50.0%)

72 Inventor/es:

MAKULSKA, SYLWIA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Francisco

ES 2 651 482 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

Procedimiento de determinación de aglutinación

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para llevar a cabo ensayos de aglutinación de fluidos biológicos tales como sangre o sus componentes, o saliva u orina, y más generalmente para la determinación de reacciones antígeno-anticuerpo que implican aglutinación, en dispositivos de microfluídica.

Antecedentes

- 10 Los Lab-on-chips, que operan habitualmente como dispositivos de microfluídica, son construcciones que facilitan una variedad de ensayos de muestras biológicas líquidas, por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo u orina. Hoy día, los sistemas de microfluídica están llegando a tener un aumento de importancia ya que necesitan el uso de una muestra reducida para investigar debido a su miniaturización.

- 15 Uno de los ensayos que se están aplicando a los sistemas de microfluídica incluye los ensayos de aglutinación de la sangre. Normalmente, la medición implica una reacción de las células sanguíneas o la sangre completa con la sustancia que actúa como reactivo, es decir, un agente de aglutinación (anticuerpo) en un canal(es) (tal como un canal(es) de microfluídica), en el que el reactivo produce un cambio en ciertas propiedades físicas de la sangre investigada, de manera que se puede determinar la aglutinación midiendo el cambio. Normalmente, el tipaje de la sangre se lleva a cabo con el uso de fracciones sanguíneas, es decir, después de la centrifugación. Las células sanguíneas aisladas de la sangre completa se ensayan entonces en contacto con reactivos monoclonales que
20 contienen anticuerpos, y el plasma aislado se ensaya con glóbulos rojos convencionalizados con antígenos conocidos en su superficie.

Otra categoría de ensayos serológicos son los inmunoensayos, tales como la PCR y ELISA.

- 25 Los procedimientos más ampliamente conocidos para determinar la aglutinación implican la evaluación visual de la aglomeración de las células sanguíneas en la sangre, que se pueden llevar a cabo a gran escala, por ejemplo, en placas de cristal y tubos de ensayo, o a escala miniaturizada con sistemas de microfluídica.

- 30 Por ejemplo, la Patente de EE. UU. US8318439 describe un aparato de microfluídica para el tipaje de sangre por determinación visual de la aparición de agregados que resultan del proceso de aglutinación. El dispositivo comprende un canal de reacción de aglutinación provisto con un suministro de sangre, un suministro de reactivo de aglutinación, un cuello y una ventana óptica en la que se puede evaluar ópticamente la reacción positiva por la aparición de "agregados" que son visibles en la ventana. Además, las dimensiones seleccionadas del cuello tienen influencia sobre el número de Reynolds, y por lo tanto potencia la reacción de aglutinación. Sin embargo, el procedimiento visual puede producir la generación de errores debido a las imperfecciones del ojo humano.

Además, otros documentos distintos describen dispositivos y procedimientos para determinar la aglutinación de las muestras biológicas líquidas por comparación del cambio de viscosidad de la sangre.

- 35 Por ejemplo, una solicitud de patente PCT WO2012164263 describe un sistema de microfluídica y un procedimiento de ensayo, que implica la medición de una variación de la viscosidad de una muestra. El dispositivo de microfluídica consiste en dos canales paralelos intersectados en su interior y exterior. El procedimiento implica la adición de una muestra de sangre en los canales de microfluídica seguido por la provisión de un tampón de caza en el canal. El líquido fluye a lo largo del primer y segundo canales, en el que se proporciona el agente de aglutinación en el
40 primero, pero no en el segundo canal. Como la aglutinación enlentece el caudal de la muestra de sangre, solo el fluido no aglutinado sale de la disposición de canales y por lo tanto se bloquea la muestra aglutinada en el primer canal. La distancia que viaja el líquido aglutinado en el primer canal es indicativo del grado de aglutinación.

- 45 Un procedimiento similar y dispositivo se describe en la solicitud de patente de EE. UU. US20090317793. El dispositivo comprende un canal de referencia y un canal de ensayo en el que se proporciona el agente de aglutinación. Los canales están intersectados en ambos extremos y se proporcionan regiones de mezclado dispuestas de manera que el líquido de referencia que fluye de la sección del canal de referencia superior a la región de mezcla bloquea el flujo del líquido de ensayo en la parte superior del canal de ensayo. La aglutinación se determina visualmente por observación de la posición del flujo en el frete de la muestra líquida en el canal de ensayo.

- 50 Otro procedimiento de ensayo de diagnóstico se describe en una aplicación de patente PCT WO2011035385. El procedimiento implica la aglutinación de una muestra, seguido por su depósito en un sustrato analítico poroso, en el que la muestra forma una mecha. La muestra que se aglutina en contacto con los anticuerpos específicos se separa/eluye en contacto con el sustrato, mientras que la muestra de sangre en contacto con el anticuerpo no específico no se separa/eluye. La velocidad de elución y la extensión de la separación de la muestra en el sustrato

indican el grado de coagulación.

Una Solicitud de patente de EE. UU. US20030224457 describe un procedimiento para determinar la presencia de anticuerpo en una muestra de sangre por tipaje inverso en un bio-disco óptico con un canal de microfluídica; el procedimiento implica la aplicación de una muestra de sangre en el canal de microfluídica seguido por el girado del disco que efectúa el movimiento del suero sanguíneo a través del canal de microfluídica; a continuación, se añade al suero un grupo sanguíneo ABO conocido y se gira el bio-disco óptico, después se incuba la muestra en el canal de microfluídica. La aglutinación se mide por exploración de la mezcla con un rayo incidente de radiación electromagnética. Los datos obtenidos por la radiación determina la presencia de células aglutinadas.

Por lo tanto, hay numerosas maneras para determinar la aglutinación en dispositivos de microfluídica. Sin embargo, en ciertas circunstancias, la reacción de aglutinación puede producir un cese del flujo y por tanto, la muestra se puede bloquear, lo que puede dar lugar adicionalmente a una estimación errónea de la utilidad del ensayo de aglutinación. Además, puede producir dificultades en la limpieza de los canales de microfluídica. Además, cuando se utiliza una muestra más pequeña, es decir, una muestra que tiene un tamaño de una gota o gotícula, o en el caso en el que la reacción de aglutinación es sustancialmente escasa, normalmente, el fenómeno de aglutinación no se puede evaluar correctamente.

Una solicitud de patente polaca PL396494 describe un dispositivo y un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de aglutinación con un sistema de microfluídica que utilizan una muestra de sangre con un tamaño de gota. El sistema de microfluídica se proporciona con un suministro de una gota que vehicula un anticuerpo (tal como reactivos monoclonales), un suministro de una gota que vehicula un antígeno (por ejemplo, glóbulos rojos) y un canal de microfluídica en el que se mezclan las sustancias. El ensayo implica la medición del tiempo de flujo de la gota a una distancia pre-determinada a lo largo del canal de microfluídica. El tiempo de flujo de la gota, en que se produce la reacción de aglutinación, es significativamente más largo que el tiempo análogo para la gota en que no se produce la reacción; la comparación de los tiempos de flujo permite distinguir si se produjo la aglutinación o no.

Por lo tanto, existe una necesidad para el desarrollo adicional de la medición de los cambios en las propiedades físicas de los líquidos cuando fluyen a través de los canales de microfluídica. Se habían descrito distintos procedimientos para afrontar esta necesidad. Por ejemplo, se habían propuesto los siguientes procedimientos para la medición de resistencia adicional de las gotas en los canales de microfluídica:

V. Labrot y col., Biomicrofluidics, vol. 3, p. 012804, 2009, describe un procedimiento para la medición directa de la presión de la gota en una corta sección de un canal durante el flujo de una única gota. No obstante, necesita el uso de un micromanómetro muy preciso y se producen errores adicionales debido a la presencia de canales laterales para la medición de la presión.

Otro procedimiento, descrito en S. A. Vanapalli y col., Lab on a Chip, vol. 9, p. 982, 2009, caracteriza un comparador de flujo basado en equilibrar el flujo medido (con gota) con un flujo de referencia coloreada de velocidad controlada. No obstante, la calidad de este procedimiento es limitada por la indicación experimental del desplazamiento de interfaz entre el aceite coloreado y transparente.

Otro procedimiento conocido más, descrito en M. J. Fuerstman y col., Lab on a Chip, vol. 7, p. 1479, 2007 y V. Labrot y col., Biomicrofluidics, vol. 3, p. 012804, 2009 utiliza el modelo de flujo de segmentos de fluido separados mediante un bucle de canales simple midiendo la velocidad del flujo de burbujas o gotículas. La precisión de este procedimiento depende críticamente en varias conjeturas y detalles técnicos: el comportamiento de las gotas en las uniones divergentes y la resolución espacial de las mediciones.

Los procedimientos citados anteriormente se basan en observaciones y mediciones de las propiedades de gotas individuales.

Se sigue de las publicaciones mencionadas anteriormente que las técnicas de medición del cambio en ciertas propiedades físicas de las muestras líquidas con los canales de microfluídica están sometidas a un rápido desarrollo.

Existe la necesidad del desarrollo adicional de procedimientos de ensayo de aglutinación basados en la medición del cambio en las propiedades físicas de una muestra líquida, que sean más eficaces y den lugar a resultados más fiables, incluso cuando se proporciona un tamaño de muestra reducida, tal como gotas.

Sumario

Un procedimiento para la determinación de la aglutinación de un líquido biológico midiendo un cambio en la resistencia hidrodinámica del líquido biológico que fluye a través de un canal de un dispositivo de microfluídica, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) calibrar el dispositivo de microfluídica calculando un valor calibrado de la resistencia hidrodinámica de una secuencia de gotas de un líquido biológico conocido en el que se produce aglutinación y un valor calibrado de una secuencia de gotas de un líquido biológico conocido en el que la aglutinación no se produce, de acuerdo con las etapas – que se llevan a cabo entonces con un líquido biológico de ensayo; b) cargar el canal de reacción de microfluídica con una fase líquida hidrófoba continua, teniendo el canal de reacción de microfluídica unos detectores (6, 7) espaciados a la distancia definida en la sección de medición del

canal de reacción de microfluídica; c) introducir en el canal de reacción de microfluídica una primera gota de referencia que es una gota del líquido biológico mezclado con solución salina o PBS o agua e inmiscible con la fase continua; d) producir que la primera gota de referencia fluya a través del canal de reacción de microfluídica; e) medir el tiempo de flujo de la gota que fluye a través del canal de reacción de microfluídica que tiene una sección de medición f) introducir en el canal de reacción de microfluídica una segunda gota de referencia a través del canal de reacción de microfluídica que es el mismo de la primera gota de referencia, seguido por una secuencia de 1 a 1000 gotas de ensayo, siendo la gota de ensayo una gota del líquido biológico, igual que el comprendido en las gotas de referencia, y el reactivo de aglutinación y no miscible con la fase continua; g) producir que la segunda gota de referencia y la secuencia de gotas de ensayo fluyan a través del canal de reacción de microfluídica; h) medir el tiempo de flujo de la segunda gota de referencia a través de la sección de medición en presencia de la secuencia de gotas de ensayo en el canal de reacción de microfluídica; i) calcular la resistencia hidrodinámica de la secuencia de la gota de ensayo; y j) determinar la aglutinación del líquido biológico comparando la resistencia hidrodinámica con los valores calibrados.

La fase continua puede separar la gota de la superficie de la pared del canal de microfluídica.

El líquido biológico puede ser una muestra de sangre completa, plasma, suero o corpúsculos aislados.

El líquido biológico puede ser una muestra de saliva.

El líquido biológico puede ser una muestra de orina.

Para el tipaje de sangre, el reactivo de aglutinación puede comprender anticuerpos monoclonales seleccionados de entre el grupo que consiste en anticuerpos contra el sistema de grupos sanguíneos (anti-A, anti-B y anti-D).

La fase continua se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en hexadecano, Fluorinert y aceite mineral.

El procedimiento puede comprender la introducción en el canal de reacción de microfluídica de dos gotas de referencia que tienen el mismo volumen.

La secuencia de la gota de ensayo se puede introducir en el canal de reacción de microfluídica después de que la segunda gota de referencia ha viajado una distancia desde 10 a 20 anchuras del canal de reacción de microfluídica.

Las gotas de ensayo pueden tener un tamaño de 3 a 4 anchuras del canal de reacción de microfluídica.

La distancia entre las gotas de ensayo introducidas en el canal de reacción de microfluídica puede ser desde 2 a 5 anchuras del canal de reacción de microfluídica.

Breve descripción de los dibujos

El procedimiento se presenta por medio de realizaciones ejemplares en un dibujo, en el que:

La Fig. 1 es una representación esquemática de un dispositivo de microfluídica.

Las Fig. 2A-2B son una representación esquemática útil para el cálculo del cambio en la resistencia hidrodinámica de la muestra líquida ensayada.

La Fig. 3 presenta los resultados de las mediciones de resistencia hidrodinámica de ciertas gotas que contienen muestras y reactivos.

Descripción detallada

El procedimiento presentado en el presente documento implica la detección de la aglutinación midiendo un cambio en la resistencia hidrodinámica de las muestras líquidas biológicas que contienen antígenos, tales como fluidos corporales humanos y animales, por ejemplo, sangre. En particular, el procedimiento implica el análisis de muestras líquidas biológicas después de que se han retirado del cuerpo u no se supone que se introducirán en el cuerpo. Este procedimiento es especialmente adecuado para llevar a cabo ensayos de aglutinación ordinarios, así como para llevar a cabo un análisis de aglutinación en el que solo está disponible una pequeña cantidad de muestra o cuando el uso de otros procedimientos de ensayo puede dar un resultado confuso. Debido a su sensibilidad, el procedimiento puede utilizarse también para confirmar los resultados obtenidos por diferentes procedimientos.

El procedimiento es adecuado para la detección de la aglutinación, es decir, la reacción que ocurre en una mezcla que contiene antígenos específicos y anticuerpos. El procedimiento es útil especialmente para el tipaje de la sangre, entrecruzamiento, ensayo directo de Coombs (DCT)/ ensayo directo de anti-globulina (DAT) y ensayo indirecto de Coombs/ensayo indirecto de anti-globulina (IAT), o puede servir como un ensayo individual para la detección de la presencia de otros anticuerpos o puede indicar una infección, tanto bacteriana como vírica, o incluso una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo tiroiditis de Hashimoto). El procedimiento presentado en el presente documento se lleva a cabo preferentemente a temperatura ambiente; sin embargo, también se puede llevar a cabo en temperaturas menores o mayores.

El procedimiento puede utilizar diferentes sistemas de microfluídica que tengan una arquitectura, que sea adecuada

para mezclar un cierto volumen de una sustancia de muestra con cierto volumen de una sustancia de reactivo. Por ejemplo, un ensayo se puede llevar a cabo con un dispositivo de microfluídica que se muestra en la Fig. 1. Se pueden utilizar también otros dispositivos, por ejemplo, tales como los que se describen en la solicitud de patente polaca PL396494. Sin embargo, el dispositivo de microfluídica que se va a utilizar para la determinación de un cambio en la resistencia hidrodinámica debe estar desprovisto de capilares que mantengan la resistencia hidrodinámica constante de los canales de microfluídica. Por lo tanto, el dispositivo de microfluídica se puede utilizar para llevar a cabo la medición del cambio en la resistencia hidrodinámica, de acuerdo con la presente invención.

El dispositivo que se muestra en la Fig. 1 tiene canales de admisión 1, 2 para introducir las gotas de la sustancia de muestra 8 y sustancia de reactivo 9, que están suspendidas en un líquido continuo 10 que no se mezcla con las sustancias 8, 9 y un canal de reacción 5. Por ejemplo, el líquido 10 puede ser cualquier líquido que no se mezcle con soluciones acuosas, tal como aceite del grupo de hidrocarburos simples o hidrocarburos funcionalizados, aceite mineral, aceite fluorado u otros. Los canales de admisión 1, 2 preferiblemente se unen para formar un único canal de reacción 5, preferentemente precedido por una región de mezcla 3, en el que las gotas 8, 9 se pueden unir para formar una gota 11 que es una mezcla de la sustancia de muestra y de la sustancia de reactivo. Opcionalmente, en la región 3 pueden posicionarse – dentro o fuera del dispositivo – dos electrodos (a, b) para aumentar la mezcla de las gotas mediante un pulso de campo eléctrico oscilante (electro-coalescente). El canal de reacción 5 puede comprender una parte serpenteante 4, o preferentemente todo el canal de reacción 5 es un canal 5 serpenteante que facilita la mezcla de los componentes de las gotas durante el flujo a través del canal de reacción 5. La gota(s) mezclada fluye(n) hacia una sección 5a que comprenden dos detectores 6,7 posicionados a una distancia considerable entre ellos para medir el tiempo de flujo de las gotas a lo largo de la sección 5a del canal de salida 5. Los detectores 6, 7 pueden ser, por ejemplo, detectores ópticos o eléctricos por lo tanto, la sección 5a es una sección de medición 5a del canal de reacción 5.

Para llevar a cabo un ensayo, los canales de admisión 1, 2 se cargan con la fase continua 10 que es hidrófoba. La fase continua 10 del primer canal de admisión 1 es, preferentemente, la misma sustancia que la del segundo canal de entrada 2. La fase continua y la muestra líquida que se va a investigar tienen que ser inmiscibles. La fase continua 10 es hidrófoba para el material analizado que es hidrófilo (sustancialmente los fluidos corporales son soluciones acuosas). La muestra investigada tiene que ser una sustancia líquida diferente que comprende el antígeno. El canal de microfluídica puede tener, por ejemplo, una sección rectangular, cuadrada, circular u oval, y preferentemente cuadrada. Las paredes del canal deberían ser, preferentemente, también hidrófobas para asegurar que la fase continua forme una película fina que separe la gota de las paredes. Esto elimina el riesgo de contaminación del dispositivo de microfluídica producida por material biológico, por lo tanto el dispositivo se puede considerar como estéril.

El procedimiento para la determinación de aglutinación que mide el cambio de resistencia hidrodinámica implica las siguientes etapas:

- cargar el dispositivo de microfluídica con una fase continua;
- proporcionar en el canal de reacción 5a la primera gota de referencia, es decir, la gota que comprende un volumen pre-determinado de la muestra líquida y un volumen determinado de solución salina. La primera gota de referencia no contiene ningún reactivo que pueda producir aglutinación, asegurando de esta manera que no se producirá aglutinación en la primera gota de referencia;
- medición del tiempo de flujo de la primera gota de referencia mediante la medición en la sección 5a del canal de reacción 5;
- después, de que la primera gota de referencia deje el canal de reacción 5, se proporciona en el canal de reacción una segunda gota de referencia que es sustancialmente, y preferentemente exactamente, la misma que la primera gota de referencia: que tenga la misma composición (es decir, que la segunda gota de referencia tenga la misma muestra líquida del mismo volumen, y el mismo volumen de la misma solución salina que la primera gota de referencia). La segunda gota de referencia no contiene ningún reactivo que pueda producir la aglutinación, asegurando, de esta manera, que no se producirá la aglutinación en la segunda gota de referencia;
- a continuación de la introducción en el canal de reacción 5 de la segunda gota de referencia, a condición de que en el canal de reacción 5 una secuencia de gotas de ensayo, comprendiendo la secuencia, sustancialmente, desde 1 a 1000 de las gotas de ensayo. Las gotas de ensayo son gotas de muestra líquida que contienen el reactivo, es decir, un anticuerpo monoclonal o policlonal que puede producir la aglutinación en la gota de ensayo, en el caso de que esté presente el antígeno específico en la muestra líquida. Siendo todas las gotas de ensayo de la secuencia sustancialmente, y preferentemente exactamente, la misma, es decir, todas las gotas de ensayo tienen la misma composición, la misma muestra líquida, el mismo reactivo conocido, y son del mismo volumen. Además, la muestra líquida de cada gota de ensayo es la misma que la muestra líquida contenida en la primera y segunda gota de referencia. Por lo tanto, con una medición de cada gota, tanto la de referencia como la de ensayo en el canal de reacción, contiene la misma muestra líquida;
- medir el tiempo de flujo de la segunda gota de referencia mediante la medición en la sección 5a del canal de reacción 5;
- calcular la resistencia hidrodinámica del canal de reacción 5 durante el flujo de la primera gota de referencia basándose en el tiempo de flujo medido de la primer gota de referencia mediante la medición de la sección 5a del canal de reacción 5;
- calcular la resistencia hidrodinámica del canal de reacción 5 durante el flujo de la segunda gota de referencia

junto con la secuencia de gotas de ensayo (que tiene de 1 a 1000 gotas de ensayo) basándose en el tiempo de flujo medido de la segunda gota de referencia a través de la sección de medición 5a del canal de reacción 5;

- determinar si la aglutinación se produce o no comparando los resultados obtenidos. Si la se produce la aglutinación en la secuencia de las gotas de ensayo, entonces el flujo de la gota(s) de ensayo (junto con la segunda gota de referencia) producen un aumento de la resistencia hidrodinámica del canal de microfluídica (canal de reacción 5) en comparación con la resistencia calculada para este canal durante el flujo de las gotas no aglutinadas (es decir, la secuencia de la secuencia de gotas de ensayo no aglutinadas. Lo que se va a comparar es el valor de la resistencia hidrodinámica, calculada como se describe posteriormente, para a) primera gota de resistencia y b) segunda gota de resistencia y una secuencia ("tren") de las gotas de ensayo fluyendo después de la segunda gota de referencia.

A continuación se describe el procedimiento para la determinación de la aglutinación de acuerdo con la invención con más detalle:

A continuación de la carga de los canales de microfluídica 1, 2, 5 con la fase continua, se introduce un volumen conocido de una muestra líquida, por ejemplo en una cantidad de 60 nl – 1,5 µl en el primer canal de admisión 1, por ejemplo por medio de un puerto de muestra. La tensión superficial entre la muestra líquida y la fase continua mantiene la muestra proporcionada en forma de gota 8 de manera que no se mezclará con la fase continua 10 en el canal.

En el caso de un ensayo de sangre, la muestra de sangre que se va a investigar puede ser sangre completa (no centrifugada, extraída utilizando un procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la muestra de sangre se puede extraer en un depósito anticoagulante. Dependiendo del procedimiento de extracción y el tipo de envase (por ejemplo, un tubo) las siguientes sustancias son adecuadas para utilizarse como el anticoagulante: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o su sal sódica – EDTA disódico (EDTA-Na₂), citrato trisódico o ácido cítrico, oxalato sódico u oxalato potásico, heparina (como una sal de sodio, litio o calcio). No obstante, el procedimiento que se presenta en el presente documento es aplicable independientemente del depósito en el que se recolecta la sangre.

La gota de una muestra líquida 8 de un volumen pre-determinado se introduce en el canal de admisión 2 y fluye corriente abajo de este canal 2. La gota de solución salina 9 de un volumen pre-determinado se introduce en el canal de admisión y fluye corriente abajo en el canal 9. La gota de la muestra líquida y la gota de solución salina se mezclan en la región de mezclado 3, formando de esta manera una primera gota de referencia de un volumen pre-determinado. La primera gota de referencia formada se introduce en el canal de reacción 5 y fluye corriente abajo a través del canal de reacción 5, que preferentemente es serpenteante para proporcionar una mezcla mejor de los componentes de la gota. Los detectores 6, 7 miden el tiempo de flujo de la primera gota de referencia a través de la sección de medición 5a del canal de reacción 5. La longitud de la sección de medición 5a es preferentemente de 10 cm. Es importante que la primera gota de referencia sea la única gota presente en el canal de reacción durante la medición del tiempo de flujo de la primera gota de referencia. Esta medición sirve como medición de calibración que se tiene en cuenta en los cálculos descritos posteriormente con más detalle.

Después de que la primera gota de referencia deja el canal de reacción, la segunda gota de referencia se introduce en el canal de reacción 5. Como ya se ha mencionado, la segunda gota de referencia debería ser de la misma composición y del mismo volumen que la primera gota de referencia. Por lo tanto, la segunda gota de referencia es exactamente la misma que la primera gota de referencia. La segunda gota de referencia puede generarse por ejemplo de la misma manera que la primera gota de referencia.

A continuación de la introducción en el canal de reacción 5 de la segunda gota de referencia, se introduce la secuencia de gotas de ensayo que comprenden, preferentemente desde 1 a 1000 gotas de ensayo en el canal de reacción, por lo tanto, la secuencia de gotas de ensayo sigue a la segunda gota de referencia fluyendo corriente abajo a través del canal de reacción 5. Así, la segunda gota de referencia junto con la secuencia de las gotas de ensayos forma una serie de gotas fluyendo en la misma dirección a través del canal de reacción 5. La distancia entre las gotas respectivas en la serie se debería seleccionar de manera que se asegure la separación de las gotas entre ellas durante la longitud completa del canal de reacción 5 durante el flujo de la serie de gotas a través del canal de reacción 5.

Mientras una serie de gotas fluye a través del canal de reacción 5, se mide el tiempo de flujo de la segunda gota de referencia a través de la sección de medición 5a. Esto significa que durante la medición del tiempo de flujo de la segunda gota de referencia, a través de sección de medición 5a, la serie de gotas (la segunda gota de referencia y la secuencia de gotas de ensayo, es decir, un número predeterminado de gotas de ensayo) está presente en el canal de reacción 5.

Las gotas de ensayo, que se van a introducir en el canal de reacción 5 después de la segunda gota de referencia, se pueden generar de la siguiente manera:

Se introduce un volumen conocido de la muestra líquida 8, la misma que la muestra líquida de la primera y segunda gotas de referencia en el canal de admisión 2. El volumen conocido del reactivo 9, que comprende el

anticuerpo monoclonal o policlonal, se introduce en el dispositivo mediante la segunda entrada del canal 1. El reactivo 9 fluye a lo largo de la segunda entrada del canal 2 para mezclarse en la región de mezcla 3 con la muestra 8, formando de esta manera la gota de ensayo 11, en el punto de mezclado 3. Sin embargo, el reactivo 9 se puede introducir en la región de mezcla de una manera diferente, por ejemplo el reactivo 9 puede depositarse en la región de mezcla 8.

La afinidad del agua del reactivo 9 y la muestra 8 debería ser similar o preferentemente la misma. El reactivo puede comprender un anticuerpo monoclonal o policlonal, por ejemplo, anti-A, anti-B o anti-D u otros, y deberían ser capaces de producir una reacción de aglutinación con el antígeno si está presente en la muestra (especificidad).

Opcionalmente, a continuación de la introducción de un volumen de muestra pre-determinado en el canal de admisión 1, la muestra 8 se puede dividir generando una secuencia de gotas, cada una del mismo volumen, preferentemente en el intervalo de desde 60 a 300 [nl], y más preferentemente cada una tiene un volumen de 64 nl. Cada gota de la muestra se va a mezclar con la gota de un reactivo que contiene el mismo anticuerpo monoclonal o policlonal conocido.

La secuencia formada de gotas de muestra fluye en dirección corriente abajo de manera que se mezclan, una a una, con volúmenes determinados (gotas) del mismo reactivo 9 en la región de mezclado 3 del sistema de microfluídica para formar una secuencia de gotas de ensayo. Cada gota de ensayo fluye en dirección corriente abajo a través del canal de reacción 5 del dispositivo de microfluídica.

El canal de reacción 5 está provisto con los detectores 6, 7 espaciados a cierta distancia del canal de reacción 5, definiendo la sección de medición 5a del canal de reacción 5. Preferentemente, el canal de reacción 5 es sustancialmente largo y se le da forma de una pluralidad de meandros de manera que el canal de reacción 5 junto con la sección de medición 5a del canal de reacción 5 es un canal serpenteante. Los detectores 6, 7 miden el tiempo de flujo de cada gota de referencia que fluye a través de la distancia de la sección de medición 5a. Los datos obtenidos se utilizan adicionalmente para el cálculo de la resistencia hidrodinámica del sistema completo, es decir, la hidrodinámica del canal de reacción con resistencia hidrodinámica de las gotas que fluye. Preferentemente, el volumen de las gotas de referencia y las gotas de ensayo se escoge preferentemente de manera que cada gota sea 3 a 4 más larga que la anchura del canal.

A continuación se presenta las etapas para llevar a cabo la medición:

1. generación de una primera gota de referencia mezclando la gota de muestra con la solución o PBS que sirve como marcador.

2. medición del tiempo de flujo de la primera gota de referencia a través de la sección de medición 5a del canal de reacción 5 y el cálculo de la resistencia hidrodinámica de la primera gota de referencia (r_d) junto con la resistencia de un canal (R): $r_d + R$

3. generación de una segunda gota de referencia, exactamente la misma que la primera gota de referencia, y entonces, después de que la segunda gota de referencia haya viajado una cierta distancia de aproximadamente 10 a 20 anchuras de canal, que es particularmente útil para alcanzar la falta de interacción entre la gota de referencia y las gotas de ensayo), la generación de una secuencia de n gotas de ensayo (donde $n = (1, 1000)$) que contienen la muestra líquida y un cierto reactivo; las gotas deberían ser 3-4 veces más largas (dicha longitud de las gotas caracteriza la sensibilidad más alta de cambio de viscosidad) que la anchura del canal y separadas entre ellas 2.5 veces la anchura del canal (para conseguir la distancia segura entre las gotas lo que previene las colisiones (de un lado) y producir simultáneamente el aumento de interacción entre las gotas (por el otro lado)),

4. medición del tiempo de flujo de la segunda gota de referencia a través de la sección de medición 5a del canal de reacción 5 y el cálculo de la resistencia hidrodinámica junto con la resistencia de un canal ($R + r_d + nr_n$),

5. comparación del tiempo de flujo de la segunda gota de referencia con el tiempo de flujo de la primera gota de referencia hace posible el cálculo de la relación $nr_n/(R+r_d)$

Las etapas 3, 4, y 5 deberían repetirse tantas veces como número de individuos se vayan a detectar. Debido a que cada secuencia de gotas de ensayo comprende el mismo reactivo, las etapas 3, 4 y 5 se deberían repetir para diferentes reactivos conocidos. En este procedimiento cada secuencia de gotas debería ser similar, es decir, el mismo número de gotas en la secuencia, el mismo volumen de la muestra líquida y el mismo volumen de reactivo en las gotas de ensayo, pero cada secuencia de las gotas de ensayo tiene diferentes reactivos conocidos (por ejemplo, diferentes anticuerpos monoclonales o policlonales)

La Fig. 2A – 2B es una representación esquemática útil para los cálculos de cambio de resistencia hidrodinámica de una única gota (Fig. 2A), y una secuencia de gotas (Fig. 2B).

El tiempo de flujo de una única gota (es decir, la segunda gota de referencia) 12 en presencia del canal de reacción 5, la secuencia de gotas de ensayo 13, a la distancia D medida por los detectores fijados en puntos de control, da los datos utilizados en el cálculo de la resistencia hidrodinámica.

La segunda gota de referencia se introduce en el canal después de que la primera gota de referencia haya dejado el canal, de manera que no esté influenciado el flujo de la primera gota de referencia por la segunda gota de

referencia.

El tiempo de flujo de la primera gota de referencia a través de la sección de medición 5a del canal de reacción 5 depende de su viscosidad endógena, mientras que el flujo de tiempo de la gota depende de la viscosidad endógena y la carga de su viscosidad producida por la reacción con el reactivo de aglutinación.

- 5 Comparando la resistencia hidrodinámica del sistema (es decir, canal de reacción + gota respectiva)) se obtiene información aproximadamente la presencia de un antígeno en la muestra de ensayo.

La resistencia hidrodinámica se calcula utilizando las siguientes fórmulas:

$$\beta = \frac{v_l}{V} = \frac{DS}{Q(t_2 - t_1)} \quad (\text{fórmula I})$$

$$R + r_d = \frac{p}{Q} = \frac{p\beta(t_2 - t_1)}{DS} \quad (\text{fórmula II})$$

$$R + nr_n + r_d = \frac{p\beta(t'_2 - t'_1)}{DS} \quad (\text{fórmula III})$$

$$\frac{nr_n}{R + r_d} = \frac{(t'_2 - t'_1)}{(t_2 - t_1)} - 1 \quad (\text{fórmula IV})$$

en las que:

- 10 β – movilidad de la gota de referencia
 v_l – velocidad lineal de una gota
 V – velocidad media de la fase continua
 nr_n – resistencia hidrodinámica de la secuencia de gotas analizadas
 t_1 – tiempo de detección de la primera gota de referencia bajo el primer detector
15 t_2 – tiempo de detección de la primera gota de referencia bajo el segundo detector
 t'_1 – tiempo de detección de la segunda gota de referencia bajo el primer detector
 t'_2 – tiempo de detección de la segunda gota de detección bajo el segundo detector
 D – distancia entre detectores
 R – resistencia hidrodinámica de un canal
20 S – área de la sección transversal del canal
 r_d – resistencia hidrodinámica de una gota única
 Q – tasa volumétrica de flujo en un canal
 p – presión que induce el flujo

- 25 Habiendo dado el tiempo de flujo de la primera gota de referencia, de la fórmula I se puede utilizar para el cálculo de la movilidad de la gota de referencia (β), ya que D (distancia entre detectores), S (área de la sección transversal del canal) son valores conocidos. Además, Q (tasa volumétrica del flujo en un canal) – se calcula pesando el líquido que fluye fuera del chip en una balanza en el tiempo fijo y calculando Q como una relación del volumen de líquido que sale fluyendo (calculado basado en el peso) y el tiempo.

- 30 Los siguientes valores de t_1 y t_2 – medidos para la primera gota de referencia, y los valores t'_1 , t'_2 medidos para la segunda gota de referencia se pueden utilizar para el cálculo de la resistencia hidrodinámica del sistema utilizando la fórmula II – para el cálculo de la resistencia hidrodinámica del sistema durante el flujo de esta gota, y utilizando la fórmula III – para el cálculo de la resistencia hidrodinámica del sistema durante el flujo de la serie de gotas que consiste en la segunda gota de referencia y la secuencia de gotas de ensayo.

- 35 La presión que induce el flujo (p) constituya la diferencia de presión sobre el reservorio con la fase continua (aceite), y la presión atmosférica. El reservorio de fase continua es un dispensador que introduce la fase continua en el dispositivo de microfluídica.

- 40 A continuación se lleva a cabo la etapa de calibración. La calibración se lleva a cabo para una variedad de secuencias de gotas de ensayo, es decir, las secuencias de gotas de ensayo aglutinadas y las gotas de ensayo no aglutinadas de viscosidad conocida. La calibración se lleva a cabo de la siguiente manera. Se generan secuencias de gotas que comprende distintos números n de gotas, por ejemplo, para n de 1 a 100. UN tipo de secuencias se

genera con gotas con aglutinación y otro tipo de secuencias se genera con gotas sin aglutinación. Como resultado de la calibración, se pueden obtener los valores de resistencia hidrodinámica, respecto a determinadas secuencias de gotas. Estos valores pueden someterse a algún error estándar (desviación). La calibración permite determinar, para cada número n mínimo de gotas si es posible distinguir el valor de resistencia hidrodinámica de una secuencia de gotas en la que se produce la aglutinación y de una secuencia de gotas en la que no se produce la aglutinación. La calibración proporciona resultados específicos del dispositivo, dependiendo por ejemplo de su estructura y configuración de los canales de admisión y válvulas.

La calibración da la información del menor número de gotas de ensayo n que se deberían generar como una secuencia de gotas de ensayo que se van a introducir en el canal de reacción 5 después de la segunda gota de referencia con el fin de ser capaces de distinguir la secuencia en la que se produce la aglutinación de las en donde no se produce la aglutinación.

Los resultados de los ensayos que se han llevado a cabo muestran que se puede obtener una distinción cien por cien (100 %) fiable para la secuencia de gotas de ensayo que tienen tres gotas de ensayo ($n = 3$) que fluyen después de la segunda gota de referencia en el canal de reacción 5. La expresión: 'una distinción cien por cien fiable' se entiende como la suma de desviaciones estándar medias triplicadas medidas para 100 gotas de ensayo aglutinadas y 100 gotas de ensayo no aglutinadas, respectivamente.

No obstante, para algunas mediciones, la secuencia de gotas de ensayo puede consistir en una gota de ensayo ($n = 1$) que da una distinción fiable entre la resistencia hidrodinámica de las series de gotas aglutinadas y no aglutinadas.

Las mediciones para la primera gota de referencia se llevan a cabo para determinar la resistencia hidrodinámica de esta gota. Sin embargo, no es necesario determinar el valor exacto de la resistencia hidrodinámica, sino que es suficiente determinar cuánto ha cambiado la resistencia del sistema con respecto al flujo de la fase continuo. Se señalará que el aumento de la resistencia hidrodinámica del sistema (es decir, el flujo de la fase continua con la gota) habitualmente produce una reducción de la tasa volumétrica del flujo. Además, la medición de la primera gota de referencia se puede tratar como una medición de calibración. A continuación, se introduce una segunda gota de referencia, que continúa con una secuencia de gotas de ensayo y cuya resistencia hidrodinámica se va a calcular. La distancia particular de la segunda gota de referencia y las gotas de ensayo se fija con el fin de reducir las interacciones entre la secuencia de gotas de ensayo y la segunda gota de referencia (dichas interacciones podrían producir resultados falsos). Como se ha mencionado en el presente documento, cada gota cambia la resistencia hidrodinámica del sistema, y esto tiene influencia en la tasa volumétrica del flujo de la fase continua. Por otro lado, el cambio de la tasa volumétrica del flujo es visible en el sistema completo; por lo tanto la segunda gota de referencia detecta la presencia de gotas adicionales cambiando su velocidad. El cambio de la velocidad de la segunda gota de referencia y la comparación de la velocidad de la segunda gota de referencia y la primera gota de referencia (introducida individualmente en el sistema) permite calcular el cambio de resistencia hidrodinámica introducida en el sistema por las gotas de ensayo.

Cuando las gotas de ensayo se mueven en una secuencia, forman una especie de "tren" (secuencia) y tienen influencia entre ella. Las mediciones han demostrado que esta influencia aumenta (o a veces disminuye) la resistencia hidrodinámica de los líquidos medidos, que es beneficioso para la medición.

A continuación se describe los estadios ejemplares de tipaje de sangre con el uso de las mediciones de resistencia hidrodinámica:

1. Cargar los canales con la fase continua.
2. La introducción de una muestra (1-1,5 μ l) en el canal de admisión.
3. División de una muestra generando una secuencia de 3 gotas, de 250 nl cada una.
4. Generación de una primera gota de referencia que comprende solución salina/PBS (312 nl) y la muestra (250 nl).
5. Mediciones de resistencia hidrodinámica de la primera gota de referencia.
6. Generación de una segunda gota de referencia que comprende solución salina/PBS (312 nl) y la muestra (250 nl, y entonces la gota de ensayo que comprende el reactivo (64 nl) con anticuerpos monoclonales (anti-A) mezclados con la primera gota de sangre.
7. Las mediciones del tiempo de flujo de la segunda gota de referencia que fluye con la gota de ensayo a través del canal, y entonces el cálculo de la resistencia hidrodinámica en el canal de microfluidica durante el movimiento de gotas analizadas.
8. Generación de una segunda gota de referencia que comprende solución salina/PBS (312 nl) y la muestra (250 nl) y entonces una gota de ensayo que comprende un reactivo (64 nl) con anticuerpos monoclonales (anti-B), distintos de los de la etapa previa, mezclados con la segunda gota de sangre.
9. Las mediciones del tiempo de flujo de la segunda gota de referencia durante el movimiento de las gotas analizadas y el cálculo de la resistencia hidrodinámica del canal de microfluidica.
10. Generación de una segunda gota de referencia que comprende solución salina /PBS (312 nl) y muestra (250 nl) y entonces una gota de ensayo que comprende un reactivo (64 nl) con anticuerpos monoclonales (anti-D), distintos de los de la etapa previa, mezclados con la segunda gota de sangre.
11. Mediciones del tiempo de flujo de la segunda gota de referencia durante el movimiento de gotas analizadas y

cálculo de la resistencia hidrodinámica del canal de microfluídica.

12. Determinación de si se produce la aglutinación en gotas de ensayo individuales o no por comparación de la resistencia hidrodinámica por su flujo a través del canal de microfluídica con la resistencia en el canal de microfluídica durante el flujo de la gota de referencia.

5 Un factor externo que tiene influencia directamente en el tiempo de flujo es la geometría de un canal, en particular:

- i) la sección transversal de un microcanal, preferentemente rectangular, con un aspecto de relación de lados 1:3 o 1:4,
- ii) la longitud de una parte del canal de microfluídica en que las mediciones se han llevado a cabo, y también
- iii) la viscosidad de la fase continua,
- iv) la presencia o ausencia de tensioactivo en/o ambas fases, o
- v) el caudal de la fase continua.

10

Todos estos parámetros deben fijarse arbitrariamente. No obstante, se supone que las condiciones iniciales se van a fijar de manera que el procedimiento completo –desde la introducción de la muestra hasta la lectura del resultado – toma poco tiempo, aproximadamente pocos minutos.

15 Para los fines de los ensayos antes de la transfusión se debe aumentar el número de etapas en las que las gotas con muestras de sangre se generan y mezclan con los reactivos por el número de antígenos que se van a detectar. Esto se aplica en el procedimiento hidrodinámico para la detección de la aglutinación.

En vez de sangre completa se pueden utilizar glóbulos rojos convencionalizadas con ciertos antígenos (conocidos) en su superficie. Los reactivos monoclonales deben por lo tanto remplazarse por el suero o plasma del paciente de manera que el ensayo mostrará la presencia de anticuerpos en su sangre. Esta variante puede ser una parte del tipaje de sangre o procedimiento de ensayo cruzado, o sirve como un ensayo individual para la detección de otros anticuerpos, cuya presencia puede indicar infección, tanto bacteriana como vírica, o incluso una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto).

20

A continuación se describe los estadios ejemplares del ensayo directo de Coombs (DCT)/ensayo directo de anti-globulina (DAT) con el uso de las mediciones de resistencia hidrodinámica:

25

1. Cargar los canales con la fase continua.
2. Introducción de una muestra (0,5-1 µl) en la entrada del canal.
3. División de la muestra generando una secuencia de 2 gotas, de 250 nl cada una.
4. Generación de una gota de solución salina/PBS (64 nl) y mezclarla con la primera gota de sangre en la cámara – primera gota de referencia.
5. Mediciones del tiempo de flujo y cálculo de la resistencia hidrodinámica de esta primera gota de referencia en el canal de microfluídica durante su movimiento.
6. Generación de una segunda gota de referencia, exactamente la misma que la primera gota de referencia, y generación de una gota de un suero anti-globulina (reactivo de Coombs) (64 nl) y mezclado con la segunda gota de sangre en la cámara – gota de ensayo.
7. Mediciones del tiempo de flujo de la segunda gota de referencia durante el movimiento de la segunda gota de referencia y la gota de ensayo a través del canal y cálculo de la hidrodinámica en el canal de microfluídica durante el movimiento de estas gotas.
8. Determinación de si se produjo la aglutinación en la gota de ensayo o no por comparación de su resistencia hidrodinámica con la resistencia hidrodinámica de la gota de referencia.

30

35

40

Preferentemente, se utiliza el hexadecano como fase continua. También se puede utilizar Fluorinert (por ejemplo, FC50, HFE-7500), que se utiliza comúnmente en técnicas microfluídicas para aplicaciones bioquímicas, así como otros aceites minerales. La elección del aceite se debería basar en la humectabilidad del material con que se fabricarán los canales y de la tensión superficial entre el aceite considerado y el material analizado.

45 Cualquier interacción fisicoquímica entre la fase continua y el material del que está fabricado el canal de microfluídica descalifica dicha combinación. Por ejemplo, algunos polímeros elásticos, tales como el polidimetilsiloxano (PDMS), se hincha en contacto con cualquier aceite. Esto da como resultado el acortamiento de su vida de trabajo y limita marcadamente los límites del espectro de aplicaciones en las que se puede utilizar dicho material.

50 La biocompatibilidad de la fase continua y el material del canal de microfluídica es un problema importante. Un material preferido para el canal de microfluídica es el policarbonato, primeramente debido a su precio relativamente bajo y fácil de procesar. Además, hay un procedimiento específico que se desarrolla haciendo su superficie hidrófoba. La translucidez del material que se escoja también es importante. El canal de microfluídica no tiene que ser completamente transparente, sin embargo debería ser capaz de un análisis óptico del interior de al menos partes clave del canal, es decir, los puntos de control (al menos dos) en el que se disponen los detectores. También se puede utilizar el poliláctido (PLA) como material para el canal de microfluídica debido a su transparencia, hidrofobia, biocompatibilidad y capacidad de biodegradarse.

55

Preferentemente, el canal tiene una sección transversal rectangular o cuadrada. Es más favorable que la sección transversal circular debido a una disposición de pares de remolinos que aparecen dentro de las gotas que fluyen. En una gota que fluye a través de un canal rectangular o cuadrado, los pares de remolinos se disponen de tal manera que se aumenta la mezcla de su contenido. Estos remolinos también son responsables de la reunión de agregados, tales como aglutinados (complejos antígeno-anticuerpo), en la parte posterior o anterior de una gota. Esto hace posible otro procedimiento (de confirmación) para la detección de la aglutinación – por mediciones de la intensidad de la luz que pasa a través de la gota o comparando el contraste entre las gotas analizadas de una cierta muestra.

Un ejemplo de dicha distinción se presenta en la Fig. 3. La intensidad de la luz se convierte en amplitud de tensión por un convertidor de luz en tensión. La gota sin aglutinación es homogénea, al contrario que la gota de la muestra con aglutinación. El proceso de aglutinación y la acumulación adicional de agregados en la parte trasera de una gota da como resultado una distribución no homogénea del contenido de la gota. Cualquier discrepancia entre la gota analizada y la línea base asignada a una gota homogénea indica una reacción que tiene lugar en el interior.

La longitud de los canales es de menor importancia. Debería ser capaz de mezclar apropiada y suficientemente el contenido de las gotas. Esto puede estar influenciado por su longitud o la forma serpenteante. Preferentemente, ambas de estas características se pueden combinar para obtener el mejor efecto.

El volumen de la gota se puede ajustar de acuerdo con la anchura del canal de microfluidica. Como el procedimiento reológico se basa en el cambio de resistencia hidrodinámica, se desea fijar un volumen para el que el cambio es el más observable. Para los canales con la sección transversal cuadrada y un ancho de 360 μm este efecto está aumentado en gotas que tiene un volumen de 320 nl (como se describe en Phys. Rev. Lett., 2012, 108, 134501S. Jakiela, P. M. Korczyk, S. Makulska, O. Cybulski y P. Garstecki.). Además, para los análisis de muestras de sangre o glóbulos rojos (RBC) en contacto con reactivos monoclonales/plasma/suero, la proporción preferida es 256 nl y 64 nl, respectivamente. Estas condiciones proporcionan la mayor diferencia en la movilidad de las gotas aglutinadas y no aglutinadas.

Ejemplo

El ensayo se llevó a cabo con el uso de sangre humana completa como muestra, y reactivos monoclonales disponibles en el mercado (como se utiliza en los laboratorios analíticos) como un reactivo que contiene anticuerpos. El área de detección comprende un canal de 10 cm de largo equipado con dos fotodiodos que sirven como detectores ópticos y puntos de control a la vez. Los resultados de las mediciones de la resistencia hidrodinámica se presentan en la Fig. 4. La resistencia hidrodinámica típica es significativamente diferente para las gotas aglutinadas y no aglutinadas. La diferencia alcanza incluso un 10 % en las muestras de sangre humana completa.

Las barras de error marcan la desviación estándar media de cada muestra, es decir una σ en distribución normal, y la triple σ también. No hay solapamiento de triple σ de las muestras aglutinadas y no aglutinadas. Por lo tanto, la probabilidad de un fallo en el tipaje es prácticamente cero. La muestra con la peor precisión tenía un valor de σ múltiple ligeramente por encima de 4. Que implica que la mínima fiabilidad de estas mediciones es mayor del 99,9991 % (1 error por cada millón de ensayos).

La fiabilidad de la cabecera de los ensayos de aglutinación ABO que se llevan a cabo con tarjetas especiales puede variar y es del 93 % al 99 % (cuando se combina con otro ensayo). En el caso de la detección de un antígeno A débil (A_2) que se lleva a cabo con cartas la fiabilidad cae por debajo del 40 %. Como se puede ver en la Fig. 3 no hay diferencia significativa en la fiabilidad de detección de este antígeno utilizando el procedimiento reológico en comparación con una detección de A_1 . Es más, la detección de antígenos del sistema Kell se mantiene en el mismo alto nivel de fiabilidad.

La existencia de transfusiones ABO incompatibles se ha informado que varía de 1 a 250 por cada 100000 unidades de transfusión. El tipaje incorrecto (tanto por errores técnicos como administrativos) utilizando procedimientos convencionales constituye aproximadamente el 13 % de errores de transfusión. Los errores se deben no solo a la técnica de ensayo, sino a menudo resulta también de errores en el procedimiento y del manejo impropio de las muestras.

Lo que es importante es que el presente procedimiento no necesita el pre-procesamiento de la sangre tal como la centrifugación. Otra ventaja es la poca cantidad de sangre necesaria para llevar a cabo el ensayo. Los procedimientos convencionales necesitan de 5-15 ml de sangre para el tipaje, y otro tanto para el ensayo cruzado. En el procedimiento hidrodinámico solo se necesita un microlitro de sangre más o menos.

En los ensayos tales como PCR, LAMP o ELISA, el aumento del número de cadenas de polímero, ADN u otras moléculas dentro de una gota deberían resultar en un cambio medible de su resistencia hidrodinámica. Sin embargo, no hay datos concluyentes en la bibliografía para confirmar o negar esta suposición.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la aglutinación de un líquido biológico midiendo un cambio de la resistencia hidrodinámica del líquido biológico que fluye a través de un canal de microfluídica de un dispositivo de microfluídica, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 5 a) calibrado del dispositivo de microfluídica calculando un valor calibrado de la resistencia hidrodinámica de una secuencia de gotas de un líquido biológico conocido en el que se produce la aglutinación y un valor calibrado de una secuencia de gotas de un líquido biológico conocido en el que no se produce aglutinación, de acuerdo con las etapas (b)-(i) que se llevan a cabo posteriormente para un líquido biológico de ensayo;
- 10 b) carga del canal de reacción (5) de microfluídica con una fase líquida continua hidrófoba, teniendo el canal de reacción de microfluídica detectores (6, 7) espaciados a la distancia que define la sección de medición (5a) del canal de reacción de microfluídica, en el que la presión que induce el flujo en el canal de reacción (5) de microfluídica constituye la diferencia de presión en el depósito con la fase continua y la presión atmosférica;
- 15 c) introducción una primera gota de referencia en el canal de reacción (5) de microfluídica, siendo una gota del líquido biológico mezclada con solución salina o PBS o agua y no miscible como la fase continua;
- d) producción del flujo de la primera gota de referencia a través del canal de reacción (5) de microfluídica que tiene una sección de medición (5a);
- e) medición del tiempo de flujo de la primera gota de referencia a través de la sección de medición (5a) del canal de reacción (5) de microfluídica;
- 20 f) introducción en el canal de reacción (5) de microfluídica de una segunda gota de referencia que es la misma que la primera gota de referencia, seguida por una secuencia de 1 a 1000 gota(s) de ensayo, siendo la gota(s) de ensayo gota(s) de un líquido biológico que el mismo que comprenden las gotas de referencia, y el agente de aglutinación y no miscible con la fase continua;
- g) hacer fluir la segunda gota de referencia y la secuencia de gota(s) de ensayo a través del canal de reacción (5) de microfluídica;
- 25 h) medición del tiempo de flujo de la segunda gota de referencia a través de la sección de medición (5a) en presencia de la secuencia de la gota(s) de ensayo en el canal de reacción (5) de microfluídica;
- i) cálculo de la resistencia de hidrodinámica de la primera gota de referencia y la segunda gota de referencia que está seguida por la secuencia de gota(s) de ensayo, basándose en los resultados obtenidos del tiempo de flujo formado en las etapas: e y h; y
- 30 j) determinación de la aglutinación del líquido biológico comparando el valor calculado de la resistencia hidrodinámica de la primera gota de referencia con el valor calculado de resistencia hidrodinámica de la segunda gota de referencia, en el que la aglutinación se produce en la secuencia de gota(s) de ensayo si el valor calculado de la resistencia hidrodinámica de la segunda gota de referencia ha aumentado en comparación con el valor calculado de la resistencia hidrodinámica de la primera gota de referencia.
- 35 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la fase continua separa la gota de la superficie de la pared del canal de microfluídica.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el líquido biológico es una muestra de sangre completa, plasma, suero o corpúsculos aislados.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el líquido biológico es una muestra de saliva.
- 40 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el líquido biológico es una muestra de orina.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que para el tipaje de sangre, el reactivo de aglutinación comprende anticuerpos monoclonales seleccionados de entre el grupo que consiste en anticuerpos del sistema de grupos sanguíneos (anti-A, anti-B y anti-D).
- 45 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la fase continua se selecciona de entre el grupo que consiste en hexadecano, Fluorinert y aceite mineral.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende la introducción en el canal de reacción (5) de microfluídica de dos gotas de referencia que tienen el mismo volumen.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la secuencia de gota(s) de ensayo se introduce en el canal de reacción (5) de microfluídica después de que la segunda gota de referencia haya viajado una distancia de desde 10 a 20 anchos del canal de reacción (5) de microfluídica.
- 50 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que las gotas de ensayo tienen un tamaño de desde 3 a 4 anchos del canal de reacción (5) de microfluídica.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la distancia entre las gotas de ensayo introducidas en el canal de reacción (5) de microfluídica es desde 2 a 5 anchos del canal de reacción (5) de microfluídica.
- 55

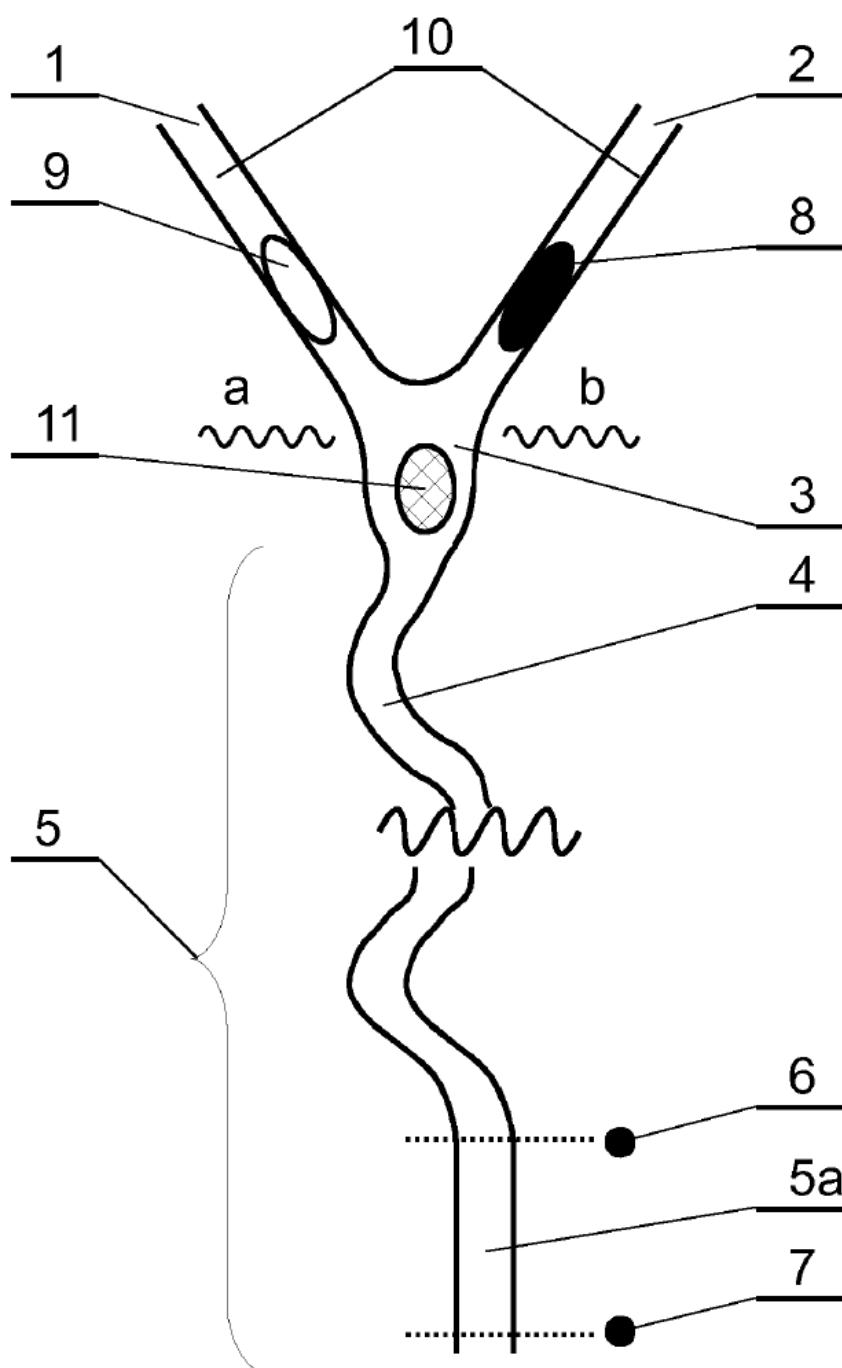


Fig. 1

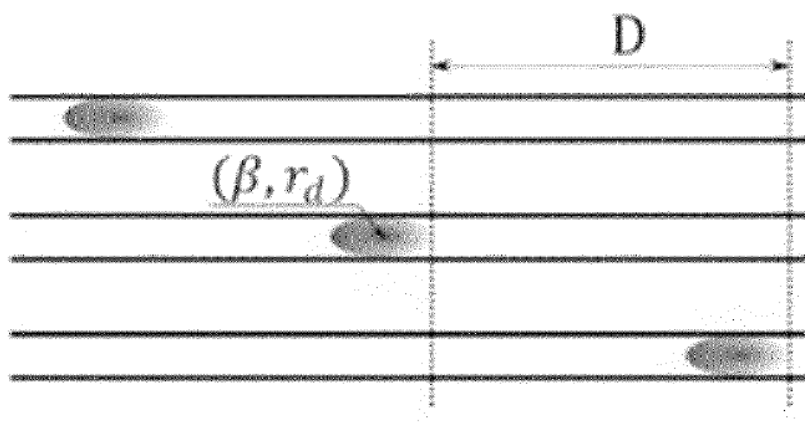


Fig. 2A

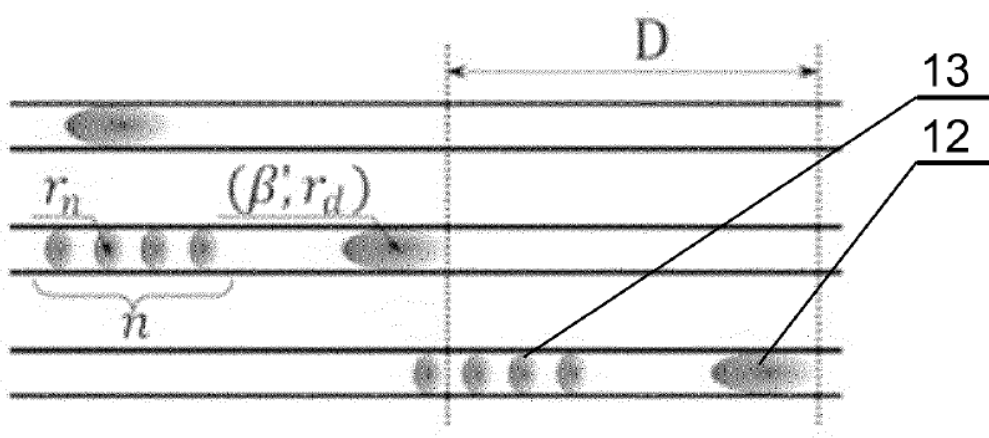


Fig. 2B

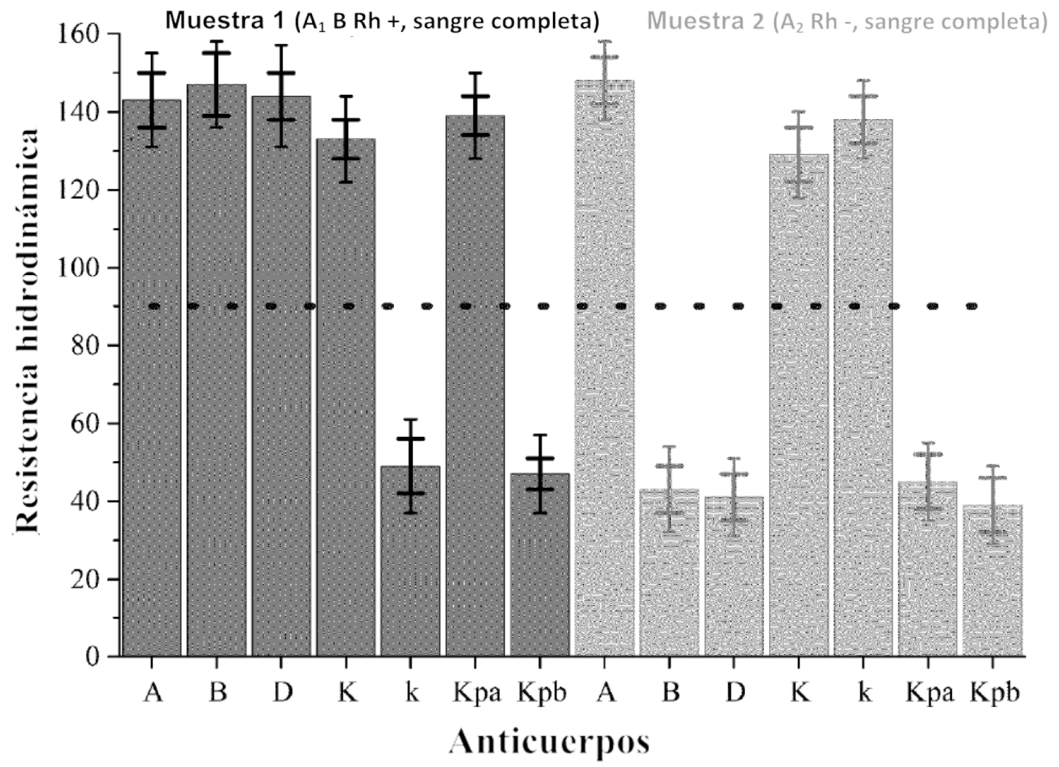


Fig. 3