

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 169**

51 Int. Cl.:

C12M 1/42	(2006.01)
C12M 1/33	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)
C12Q 1/02	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
G01N 27/26	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
G01N 33/543	(2006.01)
C12N 11/00	(2006.01)
C12N 13/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2010 PCT/CA2010/001176**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011 WO11014946**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10805905 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2459696**

54 Título: **Dispositivos de concentración, captura y lisis de células y método de utilización de los mismos**

30 Prioridad:

02.08.2009 US 230740 P
02.08.2009 US 230738 P
17.12.2009 US 287253 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2018

73 Titular/es:

QVELLA CORPORATION (100.0%)
9133 Leslie Street, Suite 110
Richmond Hill, ON L4B 4N1, CA

72 Inventor/es:

TALEBOUR, SAMAD;
KHINE, AYE AYE;
ALAVIE, TINO;
LEONARD, STEPHAN W y
MAASKANT, ROBERT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 658 169 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

Dispositivos de concentración, captura y lisis de células y método de utilización de los mismos

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

5 La solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/230.740, titulada "DIAGNOSTICS METHODS AND DEVICES INCORPORATING ELECTRO-LYSIS OF BOUND CELLULAR ARRAYS" y presentada el 2 de agosto de 2009, la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/230.738, titulada "LATERAL FLOW DEVICES AND METHODS FOR THE DETECTION OF CELLULAR ANALYTE" y presentada el 2 de agosto de 2009 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/287.253, titulada "CELL CONCENTRATION AND CAPTURE DEVICE AND METHOD OF USE THEREOF" y presentada el 17 de diciembre de 2009.

10 Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos y dispositivos de diagnóstico in-vitro para la concentración y/o detección de analitos celulares. Más concretamente, la invención se refiere a dispositivos de diagnóstico microfluídicos que implican la concentración y captura de células y la permeabilización controlada o lisis de las células.

Antecedentes de la invención

15 El aumento de la sensibilidad y la reducción del tiempo de ejecución de ensayo a menudo es importante para detectar e identificar microorganismos en muestras clínicas y ambientales. Por ejemplo, en el caso de diagnóstico de sepsis, incluso un aumento moderado de la sensibilidad o una disminución del tiempo de ensayo puede tener consecuencias de vida o muerte para el paciente. En ensayos de afinidad de células en los que se requiere una sensibilidad aumentada, es común aumentar la concentración del número de células en las proximidades de los
20 ligandos de captura, e intentar aumentar la frecuencia a la que las células colisionan con los ligandos de captura. La concentración de la muestra, en el caso de muestra celulares, se realiza de manera rutinaria por centrifugación o filtración seguida de re-suspensión de células en un medio líquido apropiado. Desafortunadamente, el proceso requiere varias etapas manuales que consumen tiempo y no es fácilmente automatizable de manera rentable. El documento WO00/73777 describe un aparato para la manipulación de células suspendidas en una interfaz entre un
25 electrodo y una solución de electrolito.

Aunque algunas soluciones han propuesto la utilización de campos eléctricos para la concentración y captura de muestras, tales métodos típicamente requieren todavía complejas etapas de preparación de muestras para obtener un ambiente iónico controlado de forma precisa. Por ejemplo, en dispositivos de la técnica anterior adaptados para producir concentración utilizando concentración electroforética, normalmente es necesario re-suspender la muestra
30 en un amortiguador con una fuerza iónica baja y/o incluir agentes de oxidación y reducción para evitar o mitigar los efectos electrolíticos. Un fallo al tratar estos efectos da lugar a problemas asociados con la dificultad de establecer un campo eléctrico dentro de una muestra acuosa sin tratar o mínimamente tratada debido a los efectos de apantallamiento de los iones disueltos, y la aparición de reacciones electroquímicas, tales como la electrólisis de agua, en las interfaces de electrodo-electrolito. Tales limitaciones afectan a la utilidad de los planteamientos de
35 concentración de muestra eléctricos debido las onerosas y costosas etapas de pre-procesamiento.

Lo que es por tanto necesario es un dispositivo integrado que permita la rápida concentración de analito y la posterior detección de una muestra sin requerir pre-tratamiento significativo de la muestra.

Sumario de la Invención

40 La invención se refiere a un dispositivo capaz de separar células cargadas en base a la aplicación de un campo eléctrico no faradaico que comprende:

un canal microfluídico para hacer fluir una muestra líquida que contiene células;

un primer electrodo dispuesto en una superficie de dicho canal microfluídico, en donde dicho primer electrodo está gravado con una red densa de túneles microscópicos;

un segundo electrodo dispuesto en una superficie opuesta de dicho canal microfluídico; y

45 una capa dieléctrica dispuesta en dicho electrodo para evitar el flujo de una corriente faradaica dentro de dicho canal microfluídico bajo la aplicación de un voltaje entre dicho primer electrodo y dicho segundo electrodo.

En un primer aspecto, se proporciona un aparato para detectar un analito intracelular, comprendiendo el aparato: un soporte sólido que comprende una región de inmovilización, teniendo la región de inmovilización dispuesta en la misma un material adherente para inmovilizar una o más células dispuestas en la muestra de líquido que contiene
50 células; comprendiendo además la región de inmovilización receptores secundarios para unir el analito intracelular liberado de las células.

El material adherente preferiblemente comprende receptores primarios que tienen afinidad por la superficie de las

células, en donde los receptores primarios son preferiblemente anticuerpos. Los receptores secundarios pueden estar inmovilizados en el material adherente. El material adherente puede ser capaz de inmovilizar más de un tipo o género de células. Los receptores secundarios son seleccionados preferiblemente del grupo formado por anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos, y análogos de ácido nucleico. Las células pueden ser células procarióticas en las que el analito intracelular comprende un ácido nucleico. El analito intracelular es preferiblemente específico para un tipo de célula o para un género de célula.

El aparato puede comprender una o más regiones de inmovilización adicional, en donde la región de inmovilización y las regiones de inmovilización adicionales forman una disposición, y en donde cada región de inmovilización es preferiblemente selectiva para un analito intracelular diferente. El material adherente dentro de cada región de inmovilización preferiblemente es selectivo para un único tipo o género de célula. Cada región de inmovilización está preferiblemente dispuesta para detectar un único tipo, especie, cepa, y/o género de un microorganismo.

En un aspecto, el soporte sólido puede ser una superficie de un micropozo.

En otro aspecto, el soporte sólido puede ser una superficie interna de un canal microfluídico, y puede comprender además electrodos para liberar eléctricamente los contenidos de las células inmovilizadas, en donde el soporte sólido comprende: un primer electrodo; un segundo electrodo que define una superficie interna del canal microfluídico que se enfrenta al soporte sólido; y una capa dieléctrica dispuesta en el primer electrodo para evitar el flujo de una corriente faradaica dentro del canal microfluídico bajo la aplicación de un voltaje entre el primer y el segundo electrodos, en donde el material adyacente y los receptores secundarios están dispuestos en la capa dieléctrica. El espesor de la capa dieléctrica y la constante dieléctrica de la capa dieléctrica son preferiblemente seleccionados para proporcionar un campo eléctrico transitorio proximal a la capa dieléctrica dentro del canal microfluídico bajo la aplicación de un pulso de voltaje entre el primer y el segundo electrodos.

El espesor de la capa dieléctrica está preferiblemente dentro del rango de aproximadamente 10 nm y 100 nm, y la constante dieléctrica de la capa dieléctrica está preferiblemente dentro de un rango de aproximadamente 3 a 10. La capa dieléctrica es preferiblemente óxido de aluminio, y el primer electrodo es preferiblemente aluminio. El segundo electrodo es preferiblemente un electrodo transparente.

El canal microfluídico puede comprender además: una zona de concentración eléctrica aguas arriba de la región de inmovilización para concentrar las células dentro de la muestra de líquido cuando la muestra está en contacto con el canal microfluídico, en donde las células pueden estar concentradas hacia una parte aguas arriba del segundo soporte sólido antes de hacer fluir las células aguas abajo a la región de inmovilización bajo la aplicación de un campo eléctrico.

La zona de concentración puede comprender una parte del canal microfluídico en la que el primer y segundo electrodos se extienden aguas arriba de la zona de inmovilización, en donde las células pueden ser concentradas en la parte aguas abajo del soporte sólido bajo la aplicación de una serie de pulsos de voltaje unipolar entre el primer y el segundo electrodos. Alternativamente, la zona de concentración puede comprender electrodos adicionales dispuestos en los lados opuestos del canal microfluídico aguas arriba del primer y el segundo electrodos, en donde las células pueden estar concentradas en la parte aguas arriba del soporte sólido bajo la aplicación de una serie de pulsos de voltaje unipolares entre los electrodos adicionales.

Los receptores secundarios pueden estar dispuestos adyacentes al material adherente dentro de la región de inmovilización, o pueden estar co-mezclados con el material adherente dentro de la región de inmovilización.

En otro aspecto, se proporciona un sistema para detectar un analito intracelular, comprendiendo el sistema el aparato como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el sistema además un medio de manipulación de líquidos para poner en contacto la muestra con el soporte sólido.

En todavía otro aspecto, se proporciona un sistema para detectar un analito intracelular, comprendiendo el sistema el aparato descrito anteriormente, comprendiendo además el sistema una fuente de voltaje de pulsos para aplicar uno o más pulsos de voltaje entre el primer y el segundo electrodos.

En todavía otro aspecto, se proporciona un método para proporcionar una región de inmovilización en un soporte sólido para inmovilizar una o más células, comprendiendo el método: proporcionar el soporte sólido, en donde el soporte sólido comprende una superficie funcionalizada para unir un material adherente y receptores secundarios, en donde el material adherente tiene una afinidad por una superficie de una o más células y los receptores secundarios son seleccionados para unirse al analito intracelular; dispensar uno o más reactivos líquidos que comprenden el material adherente y los receptores secundarios sobre una región localizada del soporte sólido; y secar el soporte sólido.

La etapa de dispensar el uno o más reactivos líquidos puede comprender dispensar un reactivo pre-mezclado que comprenda el material adherente y los receptores secundarios. El material adherente y los receptores secundarios preferiblemente comprenden grupos funcionales para unirse de manera covalente a la superficie funcionalizada. La superficie funcionalizada preferiblemente comprende una capa de silano.

En otro aspecto, se proporciona un dispositivo microfluídico para deteriorar una membrana celular de una célula, comprendiendo el dispositivo: un canal microfluídico para hacer fluir una muestra líquida que contiene células; un primer electrodo dispuesto en una superficie del canal microfluídico; y un segundo electrodo dispuesto en una superficie opuesta del canal microfluídico; y una capa dieléctrica dispuesta en el primer electrodo para evitar el flujo de una corriente faradaica dentro del canal microfluídico bajo la aplicación de un voltaje entre el primer y el segundo electrodos; en donde un espesor de la capa dieléctrica y una constante dieléctrica de la capa dieléctrica son seleccionados para proporcionar un campo eléctrico transitorio amplificado proximal a la capa dieléctrica dentro del canal microfluídico bajo la aplicación de un pulso de voltaje entre el primer y el segundo electrodos.

La capa dieléctrica preferiblemente comprende una región de inmovilización, teniendo la región de inmovilización dispuesto en la misma un material adherente para inmovilizar una o más células dispuestas en la muestra líquida que contiene células. Un espesor de la capa dieléctrica está preferiblemente en el rango de aproximadamente 10 nm y 100 nm, y una constante dieléctrica de la capa dieléctrica está preferiblemente dentro del rango de aproximadamente 3 a 10. La capa dieléctrica es preferiblemente óxido de aluminio.

El canal microfluídico puede comprender además: una zona de concentración eléctrica aguas arriba de la región de inmovilización para concentrar las células dentro de la muestra líquida cuando la muestra líquida entra en contacto con el canal microfluídico, en donde las células pueden ser concentradas hacia una parte aguas arriba de una superficie del canal microfluídico, la superficie dispuesta en un lado común del canal microfluídico con relación a la región de inmovilización, antes de hacer fluir la células aguas abajo a la región de inmovilización bajo la aplicación de un campo eléctrico. La zona de concentración preferiblemente comprende una parte del canal microfluídico en la que el primer y el segundo electrodos se extienden aguas arriba de la zona de inmovilización, en donde las células pueden estar concentradas en la superficie bajo la aplicación de una serie de pulsos de voltaje unipolares entre el primer y el segundo electrodos. La zona de concentración alternativamente puede comprender tercer y cuarto electrodos dispuestos en los lados opuestos del canal microfluídico aguas arriba del primer y el segundo electrodos, en donde las células pueden estar concentradas en la superficie bajo la aplicación de una serie de pulsos de voltaje unipolares entre el tercer y el cuatro electrodos.

En otro aspecto, se proporciona un sistema para deteriorar una membrana celular de una célula, comprendiendo el sistema el aparato de acuerdo con el aparato anterior, comprendiendo además el sistema unos medios de manipulación de líquido para hacer entrar el contacto la muestra de líquido con el canal microfluídico. El sistema puede incluir además una fuente de voltaje de pulsos para aplicar uno o más pulsos de voltaje entre el primer y el segundo electrodos.

En todavía otro aspecto, se proporciona un método para deteriorar una membrana celular de una o más células dispuestas en una muestra líquida que contiene células, comprendiendo el método las etapas de: proporcionar un dispositivo microfluídico que comprende: un canal microfluídico, un primer electrodo dispuesto en una superficie del canal microfluídico; un segundo electrodo dispuesto en una superficie opuesta del canal microfluídico; y una capa dieléctrica dispuesta en el primer electrodo para evitar el flujo de una corriente faradaica dentro del canal microfluídico bajo la aplicación de un voltaje entre el primer y el segundo electrodos, comprendiendo la capa dieléctrica una región de inmovilización, teniendo la región de inmovilización dispuesto sobre la misma un material adherente para inmovilizar las células; hacer fluir la muestra líquida a través del canal microfluídico, en donde una o más células de la muestra líquida que contiene células son inmovilizadas por la región de inmovilización; aplicar uno o más pulsos de voltaje a los electrodos, teniendo los pulsos de voltaje una duración de tiempo y una amplitud seleccionada para deteriorar una membrana celular de las células inmovilizadas; en donde un espesor de la capa dieléctrica y una constante dieléctrica de la capa dieléctrica son seleccionados para proporcionar un campo eléctrico transitorio proximal a la capa dieléctrica dentro del canal microfluídico bajo la aplicación de los pulsos de voltaje entre el primer y el segundo electrodos. El campo eléctrico transitorio amplificado preferiblemente excede un campo eléctrico que sería obtenido en ausencia de la capa dieléctrica.

El método también puede comprender la etapa de hacer fluir un reactivo de lavado a través del canal microfluídico antes de la etapa de aplicar uno o más pulsos de voltaje a los electrodos.

Una fuerza iónica de la muestra de líquido que contiene células es preferiblemente seleccionada para ser menor que 100nM. Cada pulso de los pulsos de voltaje preferiblemente comprende una duración de tiempo en una escala de tiempo de un milisegundo a un sub-milisegundo.

El deterioro de la membrana celular puede comprender la electroporación o electro-lisis de la membrana celular.

La región de inmovilización puede comprender además receptores secundarios para unirse al analito intracelular liberado de las células de inmovilización, el método puede comprender además las etapas de: realizar etapas de ensayo adicionales para detectar el analito intracelular unido a los receptores secundarios. Las etapas de ensayo adicionales pueden comprender hacer fluir un reactivo detector en el canal microfluídico, comprendiendo el reactivo detector un receptor etiquetado específico para el analito intracelular; y hacer fluir un reactivo de lavado a través del canal microfluídico; y detectar una señal procedente del reactivo detector unido al analito intracelular unido.

El analito intracelular comprende preferiblemente un ácido nucleico y los receptores secundarios preferiblemente

comprenden sondas para unirse al ácido nucleico. El ácido nucleico puede comprender rARN y en donde las sondas comprenden una sonda de ADN y una sonda sintética de análogo de ADN.

5 El método puede comprender además la etapa de llenar el canal microfluídico con un amortiguador que comprende una fuerza iónica de menos de aproximadamente 10 mM antes de la etapa de aplicar uno o más pulsos de voltaje a los electrodos. El método puede comprender además, donde la región de inmovilización comprende además receptores secundarios para unirse al analito intracelular, las etapas de: realizar etapas de ensayo adicionales para detectar el analito intracelular unido a los receptores secundarios.

10 El analito intracelular es cargado, en cuyo caso antes de la etapa de realizar las etapas de ensayo adicionales para detectar el analito intracelular unido a los receptores secundarios, se puede realizar la siguiente etapa: aplicar una serie de pulsos de voltaje unipolares entre el primer y el segundo electrodos después de haber liberado el analito intracelular; en donde una pluralidad de los pulsos de voltaje unipolares es seleccionada para concentrar el analito intracelular proximal a los receptores secundarios. La muestra de líquido puede comprender una muestra biológica, y el método puede comprender apantallar la muestra sin tratar de la presencia o ausencia de microorganismos.

15 Antes de la etapa de realizar las etapas de ensayo adicionales para detectar el analito intracelular unido a los receptores secundarios, el método puede comprender además la etapa de llenar el canal microfluídico con un reactivo adicional mientras se aplican los pulsos de voltaje unipolares, el reactivo adicional seleccionado para soportar la unión entre el analito intracelular y los receptores secundarios.

20 Las etapas de ensayo adicionales pueden comprender: hacer fluir un reactivo detector en el canal microfluídico, comprendiendo el reactivo detector un receptor etiquetado específico para el analito intracelular; y hacer fluir un reactivo de lavado a través del canal microfluídico; y detectar una señal procedente del reactivo detector unido al analito intracelular unido.

25 El analito intracelular puede comprender un ácido nucleico, en donde los receptores secundarios comprenden sondas para unirse al ácido nucleico, y el reactivo adicional comprende un amortiguador de hibridación. El ácido nucleico comprende rARN y las sondas preferiblemente comprenden una sonda de ADN o una sonda de análogo de ADN sintético.

30 El método puede comprender además las siguientes etapas: antes de la etapa de aplicar uno o más pulsos de voltaje a los electrodos, hacer fluir un reactivo de detección a través del canal microfluídico, el reactivo de detección seleccionado para producir una señal cuando el reactivo de detección entra en contacto con el analito intracelular procedente de las células inmovilizadas; y después aplicar el uno o más pulsos de voltaje, detectar la señal. La señal es preferiblemente una señal óptica, en cuyo caso el segundo electrodo es transparente. El analito intracelular es preferiblemente trifosfato de adenosina, y en donde el reactivo de detección comprende luciferina y luciferasa.

35 El dispositivo puede comprender además una o más regiones de inmovilización adicionales, en donde la región de inmovilización y las regiones de inmovilización adicionales forman una disposición. Cada región de inmovilización es preferiblemente selectiva para un analito intracelular diferente. El material adherente dentro de cada región de inmovilización está preferiblemente dispuesto para detectar un único tipo, especie, cepa y/o género de un microorganismo.

40 En todavía otro aspecto, se proporciona un método para concentrar células cargadas eléctricamente dentro de una muestra líquida que contiene células, comprendiendo el método las etapas de: proporcionar un dispositivo microfluídico que comprende: una canal microfluídico; un primer electrodo dispuesto en una superficie del canal microfluídico; un segundo electrodo dispuesto en una superficie opuesta del canal microfluídico y una capa dieléctrica dispuesta en uno del primer o del segundo electrodos para evitar el flujo de una corriente faradaica dentro del canal microfluídico bajo la aplicación de un voltaje entre el primer y el segundo electrodos; hacer fluir la muestra líquida a través del canal microfluídico; aplicar una serie de pulsos de voltaje unipolares entre el primer y el segundo electrodos, en donde los pulsos de voltaje unipolares tienen una polaridad seleccionada para aplicar una fuerza electroforética dirigida hacia un lado seleccionado del canal microfluídico. La muestra líquida puede comprender una concentración de iones, y en donde la relación entre una movilidad y una difusibilidad de las especies cargadas excede significativamente la relación entre una movilidad y una difusibilidad de los iones.

El método preferiblemente comprende además la etapa de hacer fluir un líquido de lavado a través del dispositivo fluídico a la vez que se aplican pulsos de voltaje unipolares.

50 La duración de tiempo de cada pulso de voltaje es preferiblemente menor que aproximadamente una escala de tiempo sobre la cual un campo eléctrico dentro del canal fluídico es apantallado por los iones dentro de la muestra. Un intervalo entre los pulsos de voltaje es preferiblemente mayor que aproximadamente un tiempo de relajación difusivo de los iones dentro de la muestra. Una duración de cada pulso de voltaje es preferiblemente mayor que aproximadamente 1 microsegundo y menor que aproximadamente 10 milisegundos. Un intervalo entre los pulso de voltaje es preferiblemente mayor que aproximadamente diez veces la duración de pulso, y/o está aproximadamente dentro del rango de 10 microsegundos a 100 milisegundos.

El método puede comprender además realizar las siguientes etapas antes de aplicar la serie de pulsos de voltaje:

5 aplicar uno o más pulsos de voltaje entre el primer par de electrodos, en donde el voltaje tiene una polaridad seleccionada para aplicar una fuerza electroforética a las especies cargadas en una dirección hacia el lado del canal
 10 fluido común a uno del primer par de electrodos, medir una corriente aplicada al par de electrodos mientras se aplica el uno o más pulsos de voltaje; y seleccionar una duración de pulso preferida para utilizar cuando se aplican
 15 las series de pulsos de voltaje determinando un intervalo de tiempo entre el tiempo en el que un pulso de voltaje es aplicado y el tiempo en el que la corriente medida desciende por debajo de un umbral de corriente mínima
 20 seleccionado.

El umbral de corriente mínimo puede ser seleccionado para ser una fracción de la corriente medida inmediatamente
 10 después de que un pulso de voltaje sea aplicado. Alternativamente, la corriente puede ser fijada como una función
 15 exponencial, y en donde el umbral de corriente mínimo es seleccionado para ser aproximadamente igual a la
 20 corriente medida en un tiempo aproximadamente igual a una constante de tiempo fija.

La muestra puede ser hecha fluir a través del dispositivo fluido utilizando unos medios de bomba externos, y la
 muestra puede ser recirculada a través del dispositivo fluido una o más veces. Un movimiento de la muestra puede
 ser oscilado dentro del dispositivo fluido una o más veces.

15 Los medios de bomba pueden ser medios de bomba externos, en donde la bomba externa está conectada al
 dispositivo a través de tuberías y unos medios de interfaz fluidos conectados a una lumbrera de entrada del
 dispositivo, o un pipetor, en donde el pipetor comprende una punta de pipeta adaptada para ser insertada en una
 lumbrera de entrada del dispositivo. Un material absorbente puede estar provisto aguas abajo de una salida de canal
 del dispositivo está adaptado para inducir flujo de líquido en el canal.

20 El método puede comprender además filtrar la muestra en donde el dispositivo fluido comprende al menos un
 aparato de filtro. El aparato de filtro puede comprender resinas de intercambio iónico empaquetadas.

En un caso en el que las células en microorganismos y en el que la superficie seleccionada del canal microfluido
 comprende además un material adherente para la inmovilización de los microorganismos en el lado seleccionado del
 canal microfluido, el método preferiblemente comprende además las etapas de: monitorizar una señal óptica
 25 indicativa de una acumulación de microorganismos en el lado seleccionado del canal microfluido a través de una
 superficie transparente del canal microfluido mientras se hace fluir la muestra; después de que se haya obtenido
 un nivel de acumulación seleccionado, hacer fluir un reactivo de lavado a través del canal microfluido; proporcionar
 un medio de crecimiento en el canal microfluido; incubar el canal durante un primer intervalo de tiempo mientras se
 30 monitoriza el crecimiento de los microorganismos unidos por el material adherente midiendo la señal óptica; hacer fluir
 un reactivo de lavado a través del canal microfluido; proporcionar un medio de crecimiento inoculado con un
 antibiótico dentro del canal microfluido; medir la señal óptica para determinar una señal de línea de base; incubar
 el canal microfluido durante un intervalo de tiempo mientras se monitoriza el crecimiento de los microorganismos
 unidos por el material adherente en presencia del antibiótico midiendo la señal óptica; y determinar la velocidad de
 crecimiento a partir de la diferencia entre la señal obtenida en presencia del antibiótico y al señal de línea de base.

35 La señal óptica puede comprender una señal de auto-fluorescencia procedente de las células. El método puede
 comprender alternativamente poner en contacto la muestra líquida que contiene células con un reactivo detector
 etiquetado antes de la etapa de hacer fluir la muestra a través del canal microfluido, comprendiendo el reactivo
 detector etiquetado receptores que tienen una afinidad para una superficie de células, comprendiendo la etiqueta
 una etiqueta fluorométrica, y en donde la señal óptica comprende una señal de fluorescencia a partir del reactivo
 40 detector etiquetado unido a las células. El método puede comprender alternativamente poner en contacto la muestra
 líquida que contiene células con una cepa fluorométrica antes de la etapa de hacer fluir la muestra a través del canal
 microfluido, en donde la señal óptica comprende una señal de fluorescencia a partir de la cepa fluorométrica unida
 a las células.

45 El método preferiblemente comprende además la etapa de inferir una susceptibilidad del microorganismo al antibiótico
 a partir de la velocidad de crecimiento.

En otro aspecto, en el que el lado seleccionado es un lado del canal microfluido en donde está situada la capa
 dieléctrica, el método puede comprender además las etapas de: aplicar uno o más pulsos de voltaje a los electrodos,
 teniendo los pulsos de voltaje una duración de tiempo y una amplitud seleccionada para deteriorar una membrana
 celular de las células concentradas proximales a la capa dieléctrica; en donde un espesor de la capa dieléctrica y
 50 una constante de la capa dieléctrica son seleccionados para proporcionar un campo eléctrico transitorio amplificado
 a la capa dieléctrica dentro del canal microfluido bajo la aplicación de pulsos de voltaje entre el primer y el segundo
 electrodos.

En todavía otro aspecto, se proporciona un dispositivo para detectar el analito intracelular, comprendiendo el
 dispositivo: un aparato de flujo lateral que comprende, en contacto de fluido-flujo uno con otro, una zona de
 55 recepción de muestra para recibir una muestra de fluido y una zona de captura que comprende un reactivo de
 captura inmovilizado que se une directamente o indirectamente a uno o más analitos celulares; y un electrodo
 superior en contacto de fluido-flujo con una superficie superior de la zona de captura y un electrodo inferior en
 contacto de fluido-flujo con una superficie inferior de la zona de captura cuando la zona de captura es humedecida

con una muestra líquida. El dispositivo comprende además una fuente de voltaje para aplicar un voltaje entre los electrodos superior e inferior, y puede comprender además uno o más reactivos para detectar el analito intracelular.

El analito intracelular preferiblemente comprende adenosina-5'-trifosfato y en donde uno o más reactivos comprende luciferina y luciferasa.

- 5 El uno o más reactivos son preferiblemente secados dentro de la zona de captura y una zona adicional aguas abajo de la zona de captura.

Preferiblemente comprende receptores para unirse al reactivo intracelular, y son más preferiblemente antibióticos, aptámeros, o sondas de ácido nucleico (o análogos sintéticos de los mismos).

- 10 El dispositivo puede comprender además un reactivo de detección etiquetado para producir una señal medible a partir de un analito intracelular unido a uno o más reactivos.

- 15 El electrodo superior es preferiblemente un electrodo transparente, y una separación entre los electrodos superior e inferior es preferiblemente menor que aproximadamente 100 micras. Un voltaje de una fuente de voltaje y una separación entre los electrodos superior e inferior son preferiblemente seleccionados para ser capaces de proporcionar un campo eléctrico interno entre los electrodos superior e inferior que sea mayor de aproximadamente 1kV/cm.

El dispositivo preferiblemente comprende además unos medios para aplicar una fuerza de compresión al electrodo superior.

Un entendimiento adicional de los aspectos funcionales y ventajas de la invención será realizado haciendo referencia a la descripción detallada y los dibujos siguientes.

20 **Breve descripción de los dibujos**

Las realizaciones de la presente invención están descritas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la Figura 1 muestra una vista esquemática de un dispositivo microfluídico que tiene zonas de concentración y reacción.

La Figura 2 muestra una vista en sección transversal esquemática paralela al flujo de la zona de concentración.

- 25 La Figura 3 muestra un modelo de circuito equivalente para el módulo de concentración.

La Figura 4 muestra el módulo de pretratamiento de muestras.

La Figura 5 muestra una vista en sección transversal esquemática paralela al flujo de la zona de reacción.

La Figura 6 muestra un esquema de la muestra antes y después del filtrado.

La Figura 7 muestra la formación de la capa concentrada y la retención de células en las regiones de inmovilización.

- 30 La Figura 8 muestra un esquema de un proceso de lavado.

La Figura 9 muestra una lisis de célula y una etapa de detección de señal basada en ATP.

La Figura 10 muestra la lisis de célula y la hibridación del ácido nucleico.

La Figura 11 muestra la detección de señal basada en hibridación del ácido nucleico.

- 35 La Figura 12 ilustra un método para determinar la susceptibilidad antibiótica de una muestra bacteriana de acuerdo con una realización de la invención.

La Figura 13 muestra un dispositivo de flujo lateral que comprende electrodos para detectar analito celular.

La Figura 14 ilustra las etapas adoptadas para preparar una disposición de anticuerpos co-inmunizados y sondas oligonucleótidas de captura.

La Figura 15 ilustra una comparación del analito de captura mediante sondas de captura única y co-inmovilizada.

40 **Descripción detallada de la invención**

- 45 Hablando en términos generales, los sistemas descritos aquí están dirigidos a dispositivos para la concentración, captura y detección de analito celular. Como se requiere, las realizaciones de la presente invención están descritas aquí. Sin embargo, las realizaciones descritas son meramente a modo de ejemplo, y se ha de entender que la invención puede ser realizada de cualquiera de las formas distintas y alternativas. Las Figuras no están a escala y algunas características pueden estar exageradas o minimizadas para mostrar detalles de elementos particulares

mientras los elementos relacionados pueden haber sido eliminados para evitar oscurecer los aspectos novedosos. Por lo tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos descritos aquí no son interpretados como limitativos sino meramente como una base para las reivindicaciones y como una base representativa para enseñar a un experto en la técnica a emplear de forma variada la presente invención. Con la finalidad de enseñar y no de limitar, las realizaciones ilustradas están dirigidas a dispositivos y métodos adaptados para concentrar y detectar analito de unión celular o de membrana.

Como se ha utilizado aquí, los términos, "comprende" y "que comprende" constituyen una inclusión y no una exclusión. Específicamente, cuando se utiliza en esta descripción incluyendo las reivindicaciones, los términos "comprende" y "que comprende" y las variantes de los mismos significan características etapas o componentes específicos que están incluidos. Estos términos no han de ser interpretados para excluir la presencia de otras características, etapas o componentes.

Como se ha utilizado aquí, los términos "alrededor" y "aproximadamente", cuando se utilizan en combinación con rangos y dimensiones de partículas, composiciones y mezclas y otras propiedades o características, significan cubrir ligeras variaciones que pueden existir en los límites superior e inferior de los rangos de las dimensiones de manera que no excluyen realizaciones en las que como media, la mayoría de las dimensiones quedan satisfechas pero en donde estadísticamente las dimensiones se pueden salir de esta región. No es la intención excluir realizaciones como tales de la presente invención.

Como se ha utilizado aquí, la conjunción coordinante "y/o" significa una selección entre una disyunción lógica y una conjunción lógica de las palabras, frases o cláusulas. Específicamente la frase "X y/o Y" se debe interpretar como "uno o ambos de X e Y" en donde X e Y son cualquier palabra, frase o cláusula.

"Disposición" y "superficie de disposición" como se han utilizado aquí han de ser interpretados ampliamente y generalmente para referir a una disposición lineal o de dos dimensiones de regiones de inmovilización discretas (en la presente al menos dos), tendiendo cada una un área finita formada sobre una soporte sólido, normalmente sobre una superficie continua de la misma, y soportando uno o más agentes de unión. Las disposiciones ordenadas de ácidos nucleicos, proteínas, moléculas pequeñas, células y otras sustancias en un soporte sólido hacen posible el análisis paralelo de las muestras biomecánicas complejas.

"Región de inmovilización" como se ha utilizado aquí se requiere a un área localizada en la superficie de soporte sólida para unir una o más células o analito intracelular liberado de una o más células. La región de inmovilización puede tener cualquier forma deseada, tal como circular, rectangular, elíptica, etc., y a menudo referida como un "punto".

"Soporte sólido", como se ha referido aquí comprende cualquier sustrato sólido (flexible o rígido) sobre el cual se desea aplicar una disposición de uno o más agentes de unión. El sustrato puede ser biológico, no biológico, orgánico, inorgánico, o una combinación de los mismos, y puede tener forma de partículas, hebras, precipitados, geles, láminas, tubos, esferas, recipientes, capilares, almohadillas, películas plásticas, rebanadas, etc., teniendo cualquier forma conveniente, incluyendo forma de disco, esfera, círculo, etc. La superficie de sustrato que soporta la disposición puede tener cualquier configuración en dos dimensiones y puede incluir, por ejemplo escalones, nervios, ondas, terrazas, y similares y puede ser la superficie de una capa de un material diferente del resto del sustrato.

"Par de unión específico" (abreviado "sbp") como se ha utilizado aquí describe un par de moléculas (tiene cada uno un miembro de un par de unión específico) que son derivadas de forma natural o producidas sintéticamente. Uno de los pares de moléculas tiene una estructura (tal como un área o cavidad) en su superficie que se une específicamente a (y por tanto está definida como complementaria con) una estructura particular (tal como una organización espacial y polar) de otra molécula, de manera que las moléculas del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Ejemplos de tipos de pares de unión específicos (sin ninguna limitación a los mismos) con antígeno-anticuerpo, anticuerpo-hapteno, biotina-avidina, ligando-receptor (por ejemplo receptor de hormonas, péptido-receptor, enzima-receptor), carbohidrato-proteína, carbohidrato-lípido, lectina, carbohidrato, ácido nucleico-ácido nucleico (tal como oligonucleótido-oligonucleótido).

"Acido nucleico" se refiere a un polímero desoxirribonucleico (ADN) o un polímero ribonucleico (ARN) tanto en su forma simple como en su forma de rama doble, y también comprende análogos producidos sintéticamente que pueden funcionar de manera similar a los ácidos nucleicos que se producen de forma natural. Aunque los ácidos nucleicos tienen una estructura troncal de fosfato, los ácidos nucleicos artificiales pueden contener otros tipos de estructuras, nucleótidos o bases. Esto incluye, por ejemplo, ácidos péptido nucleicos (APNs) como se ha descrito en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.948.902 y las referencias citadas en la presente; ácidos nucleicos piranosil (-pNAs) como se ha descrito en, por ejemplo, el documento WO 99/15540 (p-ARNs), WO 99/15539 (p-ARNs), y WO 00/11011 (p-ADNs); ácidos nucleicos bloqueados (LNAs), como se ha descrito en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.316.198; y fosfotriatos y otras variantes de la estructura de fosfonato de los ácidos nucleicos nativos.

El término "receptor" o "antiligando" se refiere a cualquier compuesto o composición capaz de reconocer una organización espacial y polar particular de una molécula, por ejemplo, sitio epitópico o determinante. Los receptores

ilustrativos incluyen receptores que se producen de forma natural, por ejemplo tiroxina que se une a la globulina, anticuerpos, enzimas, fragmentos Fab, lectinas, ácidos nucleicos, aptámeros de ácido nucleico, avidina, proteína A, barsar, componente de complemento C1q, y similares. La avidina está destinada a incluir avidina de blanco de huevo y proteínas de unión de biotina de otras fuentes, tales como estreptavidina.

5 "Oligonucleótido" se refiere a multímeros de nucleótido de única rama de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos.

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen kappa, lambda, alfa, delta, épsilon, y regiones de contante de mu, así como, innumerables genes de regiones variables de inmunoglobulina. Las cadenas lineales son clasificadas como o bien kappa o bien lambda. Las cadenas pesadas son clasificadas como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente un anticuerpo es una inmunoglobulina que tiene un área en su superficie o en una cavidad que se une específicamente a, y está por tanto definida como complementaria con una organización espacial o polar particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmentos de la misma. Los fragmentos de la misma pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Los anticuerpos pueden incluir también anticuerpos quiméricos fabricados mediante métodos de recombinación.

"Análito de superficie de célula" como se ha utilizado aquí, se refiere a una molécula o receptor situado en la superficie externa de una célula. El análisis de superficie de célula puede ser un antígeno que tenga una reacción inmune específica. Los antígenos de superficie de célula pueden, por ejemplo, estar formados de carbohidratos, lípidos o proteínas.

"Muestra" como se ha utilizado aquí, se refiere a cualquier muestra líquida que contenga células o bien a partir de un cultivo de células o bien aisladas de un organismo, un órgano, un líquido corporal o un tejido. La muestra de tejido puede ser utilizada obtenida directamente de una fuente o después de un pretratamiento para modificar su carácter. Tales muestras pueden incluir muestras humanas, animales o hechas por el hombre. La muestra puede ser preparada en cualquier medio conveniente que no interfiera con el ensayo. La muestra de fluido puede ser enviada desde cualquier fuente, tal como un fluido fisiológicos que incluye sangre, suero, plasma, saliva, esputo, fluido de lente ocular, sudor, orina, leche, fluidos de ascitis, mucosidades fluido sinovial, fluido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, fluido cerebroespinal, semen, mucosidad cervical, secreciones vaginales o uretrales, fluidos amnióticos, y similares. Aquí, los homogenatos de fluidos de tejidos celulares tales como por ejemplo, pelo, piel, o peladuras de uñas, extractos de carne y pieles de frutas y frutos secos también son considerados fluidos biológicos. El pretratamiento puede implicar preparar el plasma a partir de la sangre, diluir los fluidos viscosos, y similares. Métodos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, separación, concentración, inactivación de componentes de interferencia, y la adición de reactivos. Alternativamente, la muestra líquida puede ser un medio de crecimiento en el que una muestra biológica que contiene microorganismos puede haber sido colocada e incubada. Además de los fluidos fisiológicos, se pueden utilizar otras muestras tales como agua, productos de comida, extractos de suelo, y similares para el rendimiento industrial, ambiental, o de ensayos de producción de comida así como ensayos de diagnóstico. Además, un material sólido que se crea que contiene un análisis se puede utilizar como muestra de ensayo una vez que sea modificada para proporcionar un medio líquido o para liberar el análisis. La selección y pretratamiento de muestras biológicas, industriales o ambientales antes de ensayar son bien conocidas en la técnica y no necesitan ser descritas con más detalle. Los tipos de célula a modo de ejemplo que pueden ser de interés para utilizar en el ensayo incluyen: células bacterianas, células del hígado, células gastrointestinales, células epiteliales, células endoteliales, células del riñón, células cancerígenas, células madre, células del hueso, células de músculos lisos, células de músculos estriados, células del músculo cardíaco, y células nerviosas. Las células sanguíneas incluyen por ejemplo, leucocitos, tales como neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, macrófagos.

"Análito intracelular" como se ha utilizado aquí se refiere a una molécula situada dentro de una célula. El análisis intracelular puede ser un antígeno que tenga una reacción inmune específica. Los análisis de unión intracelular pueden, por ejemplo, consistir en carbohidratos, lípidos o proteínas, ATP y ácidos nucleicos.

50 Hablando en términos generales, los sistemas descritos aquí están dirigidos a ensayos y dispositivos de diagnóstico que implican la captura, detección e identificación de células en una configuración de fase sólida. Como se requiere, las realizaciones de la presente invención están descritas en la presente. Sin embargo, las realizaciones descritas son meramente a modo de ejemplo, y se debería entender que la invención puede ser llevada a la práctica de muchas formas varias y alternativas. Las Figuras no están a escala y algunas características pueden estar exageradas o minimizadas para mostrar detalles de elementos particulares mientras que los elementos relacionados pueden haber sido eliminados para evitar oscurecer los aspectos novedosos. Por lo tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos descritos en la presente no han de ser interpretados como limitativos sino meramente como una base para las reivindicaciones y como bases respectivas para enseñar a un experto en la técnica la utilización de forma diversa de la presente invención. Con la finalidad de enseñar y no de limitar, las realizaciones 60 ilustradas están dirigidas a ensayos y dispositivos de diagnóstico que implican la captura, detección y eliminación de células en una disposición de fase sólida.

Las realizaciones descritas aquí proporcionan métodos y dispositivos para la detección multiplexada de células en un formato de ensayo con base en disposición, de fase sólida. En una primera realización, se proporciona un método para la detección de analito intracelular.

- 5 En la primera etapa, una muestra de líquido que puede contener células está en contacto con un soporte sólido que comprende una región de inmovilización que comprende un material adherente para capturar las células sobre el soporte sólido. El material adherente está preferiblemente dispuesto en una disposición de regiones de inmovilización, tales como puntos o líneas. El material adherente puede comprender receptores que específicamente se unen con los antígenos de la superficie de la célula, o puede comprender un material que no se une específicamente a la superficie de las células. Cada región de inmovilización en la disposición se emplea para realizar un ensayo específicamente multiplexado. La muestra es incubada mientras que está en contacto con el soporte sólido, durante cuyo tiempo las células presentes en la muestra se pueden unir con el material adherente formando una disposición. Alternativamente, la muestra puede entrar en contacto con el soporte sólido en la célula de flujo microfluídico, en cuya muestra es hecho fluir sobre el soporte sólido de una manera controlada para favorecer la captura de las células.
- 10
- 15 En una segunda etapa, el soporte sólido es preferiblemente lavado para eliminar las células no específicamente unidas y sueltas, las proteínas y otras moléculas que de otro modo podrían generar artefactos, fondos, ruido y reacciones cruzadas.

- 20 En una tercera etapa, el analito intracelular es liberado de las células unidas al soporte sólido mediante la aplicación de un campo eléctrico de suficiente fuerza para causar la electroporación o electrolisis de las células unidas. Esta etapa de electroporación o electro-lisis in situ hace que el analito intracelular liberado de una célula dada sea inicialmente concentrado en la región directamente por encima de la región de inmovilización a la que la célula está unida. La lisis lograda por el campo eléctrico no da lugar a un flujo de fluido o mezcla apreciable, y por tanto hace posible que la liberación de los componentes intracelulares esté inicialmente confinada al área local próxima a la región de inmovilización durante una duración de tiempo dictada principalmente solo por la difusión. Además, a diferencia de los métodos de lisis químicos, el uso de un campo eléctrico habilita la introducción de reactivos de detección antes de la lisis, de manera que el analito intracelular puede entrar en contacto inmediatamente con los reactivos una vez liberado de la célula. Este aspecto clave del presente método de lisis permite la detección con resolución espacial de ensayos multiplexados en una forma de disposición.
- 25

- 30 Una cuarta etapa implica una etapa de detección, en la que se emplean uno o más reactivos detectores para generar una señal indicativa de la presencia de un analito intracelular particular. La señal está localmente generada en las proximidades de cada región de inmovilización en la disposición, y la señal producida en cada región de inmovilización en la disposición, y la señal producida en cada región de inmovilización en la disposición es detectada. Por consiguiente, con cada inmovilización en la disposición que representa un ensayo multiplexado distinto, la señal desde cada ensayo se obtiene mediante la detección del sistema capaz de resolver especialmente las señales desde los puntos de la disposición.
- 35

Dispositivo Microfluídico para la Concentración, Lisis y Detección

- 40 De acuerdo con una realización preferida, el analito celular está concentrado en una primera zona de un canal microfluídico, y después es hecho fluir bajo condiciones de flujo laminar dentro de las proximidades de una superficie adherente proporcionada en una segunda zona aguas abajo de la primera zona. Preferiblemente, el analito celular es capturado mediante las fuerzas de unión específicas para la superficie adherente.

- 45 El analito celular es preferiblemente una estructura de membrana unida de superficie tal como una célula biológica, y más preferiblemente, bacterias y/u hongos. En una realización seleccionada, parte de los contenidos celulares son liberados sometiendo a las células a campos eléctricos de pulsos locales que abren los poros de la membrana de célula. Las moléculas específicas en el contenido celular liberado pueden reaccionar con reactivos apropiados y la presencia de las células es detectada a través de las señales ópticas o eléctricas resultantes. El dispositivo puede formar un componente de un sistema analizador automatizado de producción baja, media o alta, y puede opcionalmente ser configurado como un dispositivo desechable. Preferiblemente, el dispositivo es un consumible utilizado en un dispositivo electrónico separado, proporcionando con ello un sistema para controlar las fuerzas ejercidas en una célula principalmente con la finalidad de retención de célula óptima independientemente de la composición iónica de la muestra acuosa.
- 50

- 55 En la realización preferida el dispositivo tiene una estructura microfluídica que comprende un canal longitudinal con dimensiones adoptadas para soportar flujo laminar en el mismo. La Fig. 1 muestra un ejemplo no limitativo del dispositivo 1. Tiene un canal de flujo delgado 14 que está definido por una placa de base 12 y una placa superior 13 separada por un separador delgado con el canal cortado a partir de ella. Típicamente, el separador está hecho de un material dieléctrico que es ligeramente deformable bajo una presión de pinzamiento aplicada. El separador define de este modo las paredes laterales del canal, proporciona la obturación de fluido, y aísla eléctricamente las placas superior e inferior una de la otra. Aunque el canal está mostrado en la Fig. 1 formado entre dos placas unidas lateralmente por una capa separadora, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que son previsibles una amplia variedad de geometrías y conjuntos de canal mediante las presentes realizaciones. En un ejemplo adicional

no limitativo, al canal puede estar formado como un rebaje dentro de un sustrato, en donde la placa superior define la pared de canal superior, y el rebaje define tanto la pared de canal inferior como las paredes de canal laterales.

El canal incluye una entrada 10 a través de la cual los fluidos pueden ser introducidos, tal como la muestra de fluido, para ser analizados y otros líquidos que pueden ser requeridos para el lavado del canal o la detección de los contenidos celulares. El dispositivo está también equipado con una salida 11 que puede estar en comunicación de fluido con unos medios de recogida tales como una cámara de desecho, o, por ejemplo con una almohadilla absorbente. El flujo a lo largo el canal es proporcionado por medio de una diferencia de presiones entre las lumbreras de entrada y de salida.

En una realización, el diferencial de presiones puede ser generado por unos medios de bomba tales como una bomba externa que funciona en conjunto con el dispositivo a través de accesorios microfluidicos conocidos en la técnica, tales como accesorios de tuberías y de obturación. Aunque la muestra puede estar hecha para fluir directamente desde la lumbrera de entrada a la lumbrera de salida del dispositivo, se pueden usar realizaciones alternativas en las que la muestra es recirculada dentro del canal, con lo que se incrementa la probabilidad de que el analito celular será capturado por el material adherente en la segunda zona del dispositivo. En todavía otra realización, los medios de bomba pueden estar configurados para producir un flujo oscilatorio de la muestra en una dirección longitudinal para aumentar la probabilidad de unión. En otra realización, el fluido puede ser introducido en la muestra a través de un pipetor manual o automático configurado para inyectar la muestra y/u otros reactivos o amortiguadores en la lumbrera de entrada.

La sección de trabajo del canal de flujo 14 está dividida en dos zonas. La primera zona se denomina la "zona de concentración" y tiene dimensiones adaptadas para producir flujo laminar. En un ejemplo no limitativo, las dimensiones H, W y L₁ pueden ser seleccionadas para ser aproximadamente del orden de 0,1x5x10 mm³. Dos electrodos 15 y 16, respectivamente en los lados interiores de las placas 12 y 13, están destinados a incluir un campo eléctrico a través de la zona. El voltaje es preferiblemente aplicado por una fuente de voltaje externa, que está preferiblemente eléctricamente conectada a almohadillas de contacto externas en el dispositivo que están ellas mismas conectadas a las placas 12 y 13.

El campo eléctrico dependiente del tiempo ejerce una fuerza efectiva en las células, con tal de que comprendan una carga de superficie, y las transporte a una región delegada en las proximidades inmediatas del electrodo anódico 15. Los detalles de los pulsos dependientes del tiempo se proporcionan más adelante. La segunda zona puede también estar denominada como "zona de reacción" y contiene un material adherente para capturar el analito concentrado. En un ejemplo no limitativo, la segunda zona puede tener una dimensión longitudinal L_{II} en el rango de 10 mm.

Como se ha descrito anteriormente, la segunda zona contiene un material adherente, que preferiblemente se une selectivamente a las células. El material adherente está preferiblemente dispuesto en una tira horizontal que es aproximadamente perpendicular a la dirección del flujo de fluido dentro del canal. De esta manera, las células concentradas en la región justo encima de la superficie del canal fluyen sobre el material adherente y la capacidad de unión del dispositivo se ve mejorada. Preferiblemente, el material adherente es selectivo y provisto en forma de una disposición 19 de tiras ha sido creado para unirse a más de un tipo de células. Los expertos en la técnica entenderán que es posible una amplia gama de otras geometrías de regiones de inmovilización y tiras dispuestas dentro del campo de la presente invención. En un ejemplo no limitativo, la disposición puede ser una disposición regular de puntos. El material adherente en disposición puede comprender además componentes moleculares adicionales para mejorar el rendimiento del material adherente, por ejemplo, excipientes para bloqueo no específico, estabilidad de vida útil, y materiales de hidrogel para la porosidad y/o la capacidad de unión mejoradas.

En una realización preferida, cada elemento de disposición es una área de geometría bien definida sobre la cual un material adherente (por ejemplo ligandos de captura específicos para una clase de analito) ha sido inmovilizado. Cuando las células, concentradas en la extremidad inferior del canal, se mueven lentamente sobre la disposición de elementos de unión, se pueden unir con el material adherente y llegan a ser capturadas sobre la fase sólida. En una realización preferida, al menos una parte del canal es transparente dentro de la segunda zona, haciendo posible con ello la investigación óptica directa de las células unidas. Por ejemplo, la presencia de células unidas al material adherente se puede determinar mediante muchos métodos ópticos, tales como, pero no limitándose a, dispersión de luz, fluorescencia, quimioluminiscencia, generación de imágenes, y resonancia de plasmón de superficie.

En una realización preferida, dos electrodos 17 y 18 están provistos adicionalmente en los lados interiores de las placas 12 y 13, y están destinados a inducir un campo eléctrico a través de la segunda zona para la electroporación o electro-lisis de unión de membrana capturada o analito celular. El material adherente (bien como una línea única o una disposición) está dispuesto en la superficie interna de uno de los electrodos (el electrodo 17). Aplicando una diferencia de potencial breve y grande entre los dos electrodos 17 y 18 células sometidas a electroporación y dependiendo de la magnitud y duración del campo eléctrico resultante algunas moléculas dentro de la célula son liberadas. Estas se pueden utilizar para detectar la presencia de células. Preferiblemente, uno de los electrodos 17 y 18 es transparente, con lo que se hace posible la detección óptica directa de una señal procedente de la interacción del material intracelular liberado con uno o más reactivos de detección fluidos a través de canal.

Módulo de concentración

La sección del dispositivo 1 que constituye la primera zona se denomina "módulo de concentración". Está destinado a la separación de las células cargadas en base a la aplicación de un campo eléctrico no faradaico (es decir, no hay carga transportada a través de la doble capa formada en las paredes del canal). Cuando una muestra que contiene células cargadas (por ejemplo, bacterias) es inyectada a través de la entrada 10 en el interior del dispositivo, se desarrolla un flujo de Poiseuille en una dirección longitudinal por el tiempo alcanza la zona de concentración. Allí, las células cargadas son sometidas a un campo eléctrico trasversal y está concentrado en un lado del canal bajo una fuerza electroforética.

Como se ha mencionado anteriormente, en una realización preferida, las células cargadas son microorganismos tales como bacterias u hongos. A pH fisiológico (5-7), la mayoría de los microorganismos están cargados negativamente debido a que el número de grupos carboxilo y fosfato excede el número de grupos amino en la superficie de la célula. Como partículas cargadas, estas células experimentan una fuerza de atracción hacia el ánodo 15, en lo que sigue denominado "pared de acumulación". Cuando las células se aproximan a la pared, su movimiento total es detenido por varias fuerzas repulsivas, fuerzas de elevación y fuera difusivas asociadas con el movimiento Browniano y son retenidas a una pequeña distancia de la pared. En las regiones cerca de la salida de la zona de concentración un perfil de células de concentración de tipo Gausiano se forma en las proximidades de la pared de acumulación. Las células después viajan lentamente a la zona de reacción a la velocidad asociada con el flujo en la distancia de equilibrio desde la pared.

El principal reto para la operación exitosa del módulo de concentración es establecer un campo eléctrico trasversal con la suficiente fuerza en la región central del canal. Es bien conocido que la aplicación de un campo eléctrico constante en un canal que contiene una solución acuosa da lugar a la formación de capas dobles eléctricas cerca de los electrodos y en algunos casos tanto como el 99% de la caída de potencial se produce a través de las capas dobles. Por consiguiente, el campo eléctrico real experimentado por el analito celular cargado referido como "campo efectivo", es solo una pequeña fracción del campo nominalmente aplicado y el volumen de líquido en el canal queda apantallado de los electrodos por las capas de polarización de iones y moléculas de agua en las superficies de electrodos.

Desafortunadamente, las muestras clínicas generalmente tienen elevadas resistencias iónicas. Por ejemplo, un caldo de soja triptico de medio de cultivo común incluye 5 g/L de cloruro de sodio y 2,5 g/L de fosfato de dipotasio. Estas sales dan lugar a una fuerza iónica de aproximadamente 100 nM. Si tal solución es introducida en un canal con al menos un electrodo de bloqueo conectado a una fuente de energía de corriente continua, el potencial eléctrico no faradaico caerá en un 37% a una distancia de 1 nm desde el electrodo. Esta distancia es la longitud de Debye, λ_D , denominado fuerza iónica I por la siguiente relación:

$$\lambda_D = 0.304 / \sqrt{I} \quad (1)$$

en donde I y λ_D tienen las unidades del mol/L y nm, respectivamente.

La aplicación de una diferencia de potencial eléctrico entre los electrodos no bloqueados separados por una solución electrolítica puede dar lugar a reacciones electroquímicas en la interfaz electrodo-electrolito si el voltaje aplicado excede un valor umbral. La formación de gas puede obstruir rápidamente el canal conduciendo al fallo electroforético. Además, el aumento de presión en el canal podría causar daño mecánico al módulo. La cantidad de campo eléctrico lateral que se puede aplicar es por tanto limitada por la restricción que no debería resultar en la generación de gases en cantidades que excedan el límite de solubilidad.

Un planteamiento común en la técnica anterior implica suprimir la generación de burbujas de oxígeno en hidrógeno añadiendo un par-rédox a la muestra que fluido a lo largo de los electrodos. Como ejemplo, quinhidrona, que es un complejo entre la hidroquinona (H_2Q) que actúa como un donante de electrones y la *p*-benzoquinona (Q) que actúa como un aceptador de electrones, se puede añadir a las corrientes de flujo. En lugar de oxidación y reducción de agua, que genera oxígeno e hidrógeno, ahora la H_2Q es oxidada y la Q es reducida sin ninguna generación de burbujas. Obviamente, este método complica la introducción de la muestra y contradice el objetivo de realizar un ensayo rápido y de bajo coste.

A diferencia de los métodos conocidos, ambos de los asuntos anteriormente descritos, es decir la formación de burbujas y el apantallamiento del campo, pueden ser aliviados incluyendo al menos una capa aislante eléctrica para evitar que una corriente faradaica fluya en el canal. La generación de burbujas de gas es evitada aislando el ánodo de la muestra con una capa delgada de revestimiento dieléctrico, que sirve para eliminar los procesos de transferencia de carga que se producen a través el límite electrodo-electrodo. En otra realización de la invención, los electrodos pueden ser no bloqueantes, y la generación de una corriente faradaica puede ser suprimida manteniendo el voltaje aplicado por debajo del voltaje umbral.

De este modo, en una realización preferida de la invención, el dispositivo es no faradaico y comprende al menos un electrodo de bloqueo, y el tamizado del campo eléctrico en las partes centrales del canal se evita parcialmente aplicando el voltaje de accionamiento en dos etapas. En la primera etapa, denominada como tiempo de conexión,

una diferencia de potencial es rápidamente creada entre los dos electrodos y es mantenida a lo largo de un periodo de tiempo de t_{on} . Durante este periodo de tiempo la capa doble es desarrollada en la interfaz electrodo-electrodo y la fuerza del campo dentro del canal es todavía apreciable. En la segunda etapa, el campo eléctrico aplicado es cero o ligeramente negativo para el tiempo t_{off} , denominado tiempo de desconexión. Este tiempo es lo suficientemente largo para permitir que los iones más pequeños, tales como Cl^- , se difundan de nuevo y reconstruyan su distribución uniforme. Por un lado, t_{off} debería ser lo suficientemente corto, de manera que el desplazamiento difusivo medio de las células durante el tiempo de desconexión no exceda (preferiblemente no sea mayor de un primer porcentaje de) el desplazamiento electroforético que han recibido durante el tiempo de conexión. Como se mostrará más adelante, la difusibilidad mucho más elevada de los iones con relación a las células hace esto posible.

La construcción y funcionamiento de un ejemplo no limitativo del módulo de concentración se describe a continuación haciendo referencia su vista en sección transversal esquemática paralela al flujo que se ilustra en la figura 2. En la realización preferida, el electrodo transparente 16 es comúnmente preparado uniendo químicamente un revestimiento de óxido de metal con una placa ópticamente transparente tal como un cristal (13). La capa de óxido preferida es una capa delgada de ITO (óxido de Indio estaño) aproximadamente de 100 nm de espesor. La transparencia del electrodo es esencial para acceder a la señal en la zona de reacción si las reacciones ideadas para detectar los contenidos celulares han sido seleccionadas para generar señales ópticas. Como se muestra en la técnica anterior, se pueden utilizar otras capas transparentes o parcialmente transparentes, tales como películas metálicas delgadas, en lugar de la capa de ITO.

El electrodo 15 está preferiblemente montado en una placa de base 12. Este electrodo tiene una capa de superficie dieléctrica, 24 en la interfaz del canal. La capa dieléctrica puede ser preparada revistiendo la placa con una capa delgada de materiales tales como poliestireno. En la realización preferida, el electrodo conductor 15 y la placa de base 12 son de aluminio y el revestimiento dieléctrico 24 es de óxido de aluminio (Al_2O_3). La superficie de óxido de aluminio está preferiblemente modificada para crear grupos hidroxilo seguidos por el revestimiento con una capa de silano heterobifuncional, creando grupos funcionales para interactuar covalentemente con los ligandos de captura. En aplicaciones en las que se requiere larga exposición al Cl^- la capa de óxido puede no proporcionar suficiente protección ante la corrosión. En este caso, la observación realizada por B. F. Shew et al (*J Electrochem. Soc.* 138:3288 (1991)) se puede utilizar en la preparación del electrodo. La adición de cantidades bastante pequeñas (5% molar o menor) de metales de transición (por ejemplo, Ta, Mo, y W) al Al puede reducir la velocidad de corrosión del Al en hasta aproximadamente 100 veces, y el tiempo de rotura bajo el campo eléctrico constante a través de la capa de óxido protectora se puede incrementar en aproximadamente 10 veces.

Utilizando una fuente de voltaje externa 25, se aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos 15 y 16, con el electrodo inferior teniendo un potencial positivo con respecto al electrodo superior. La salida de la fuente de voltaje 25 es preferiblemente un tren de pulsos de elevada frecuencia y los pulsos son preferiblemente sustancialmente cuadrados. La frecuencia, la amplitud y la forma del pulso de la onda eléctrica aplicada pueden ser determinadas en base a prosperidades conocidas de la muestra líquida, o pueden ser seleccionadas de acuerdo con la retroalimentación basada en la corriente monitorizada por el medidor 26. Los expertos en la técnica apreciarán que la onda puede ser modificada con el fin de optimizar el rendimiento del dispositivo.

Como se ilustra esquemáticamente en la figura, el flujo de entrada 22 tiene una distribución sustancialmente uniforme de las células suspendidas. Como resultado de la acción de concentración del módulo de flujo de salida 23 las células están localizadas cerca de la superficie de ánodo. La convección de líquido las transporta despacio a la zona de reacción.

La estructura básica del módulo de concentración es análoga a la estructura de un condensador electrolítico polarizado. En tales condensadores, la capa dieléctrica de óxido de aluminio (Al_2O_3) está formada oxidando electroquímicamente el aluminio. Con el fin de incrementar la superficie efectiva en 100 veces, y así incrementar la capacitancia por unidad nominal de área, el electrodo está grabado con una densa red de túneles microscópicos. El espesor de la capa dieléctrica se determina mediante el voltaje aplicado durante el proceso de formación electroquímica (anodización) y es a menudo elegido para ser 2 nm por cada voltio que se puede aplicar de forma segura sobre el electrodo. Dado que el voltaje requerido en el módulo de concentración no excede un par de voltios en muchas aplicaciones, la capa de Al_2O_3 que se produce de forma natural (de aproximadamente 5 nm de espesor) puede ser suficiente.

Modelo de Circuito del Módulo de Concentración Eléctrico

El módulo de concentración eléctrico puede ser modelizado mediante el circuito eléctrico equivalente presentado en la figura 3a. Las capacitancias C_{DL1} y C_{DL2} corresponden a las capacitancias de doble capa dinámicas en las interfaces de la capa dieléctrica 24 y el electrodo 16 respectivamente con el líquido en el canal. R_{DL1} y R_{DL2} son las resistencias paralelas correspondientes a la corriente de fuga en los dos condensadores. En general, los valores C_{DL} para superficie de metal planas están dentro del intervalo de 5-50 $\mu F/cm^2$ dependiendo del tipo de metal, fuerza iónica y composición de la solución, rugosidad superficial, temperatura y voltaje.

La capacitancia C_{DE} es la capacitancia de la capa dieléctrica cuyo valor depende del espesor de la capa y del área efectiva del electrodo. Por ejemplo, la rugosidad de la superficie puede aumentar la capacitancia en un factor tan alto

como 1000. La resistencia R_{DE} es la resistencia paralela equivalente de la capa dieléctrica y cuenta para la corriente de fuga en el condensador. Disminuye con el aumento de capacitancia, temperatura y voltaje. Los valores típicos para R_{DE} están en el orden de $100/C_{DE}$ M Ω con C_{DE} en μ F.

5 R_{CH} representa la resistencia de solución en masa y C_{CH} la capacitancia de la masa. El valor C_{CH} es tan pequeño que puede ser aproximado con el circuito abierto. Para un canal con una anchura de 100 μ m, la resistencia R_{CH} es de aproximadamente 100 Ω/cm^2 para una fuerza iónica de 1 mN.

10 R_{LOAD} es la suma de la resistencia de salida de suministro de energía y la resistencia de entrada de los electrodos. Todos los valores de parámetros eléctricos, con la excepción de R_{LOAD} , R_{DE} y C_{DE} son dependientes de la fuerza iónica de la solución portadora. La resistencia de carga modifica la división de voltaje entre los componentes de circuito y se hace particularmente importante con fuerzas iónicas más elevadas.

Considerando los valores típicos de los parámetros eléctricos, el circuito equivalente puede ser simplificado como se presenta en la Figura 3b. Las resistencias R_{DE} , R_{DL1} y R_{DL2} son lo suficientemente grandes que pueden ser aproximadas como las capacitancias abierta y de dos capas dobles que hayan sido combinadas en serie como C_{DL} . El tiempo de carga de capa doble, de acuerdo con este modelo de circuito, viene dado por

15
$$\tau_c = (R_{LOAD} + R_{CH})(C_{DE}C_{DL} / (C_{DE} + C_{DL})) \quad (2)$$

De este modo, el periodo t_{on} durante el cual se mantiene la diferencia de potencial entre los electrodos debería ser elegido para ser del orden de τ_c . Bazant et al (Physical Review E 70. 021506 (2004)) ha sugerido que la escala de tiempo primaria para la relajación de cargas viene dada por

$$\tau_D = \lambda_D^2 / D_{ion} \quad (3)$$

20 en donde D_{ion} es el coeficiente de difusibilidad de los iones y λ_D viene dada por la relación (1).

Preferiblemente, t_{off} , el periodo durante el cual la diferencia de potenciales entre los electrodos es llevada a cero, se elige para que sea mayor que τ_D .

25 Como se puede observar fácilmente, ambos tiempos característicos del módulo de concentración (τ_c y τ_D de las ecuaciones 2 y 3) dependen de la fuerza iónica de la solución acuosa. Esto implica que los valores óptimos de t_{on} y t_{off} variarán para las muestras con diferentes fuerzas iónicas. Aunque estos valores pueden ser elegidos empíricamente para un tipo de muestra dado, o ser predicho si la fuerza iónica de la muestra es conocida o puede ser medido, una realización preferida, emplea un bucle de retroalimentación, mostrado en la Figura 2 en 27, que comprende el medidor de corriente 26 y la unidad controladora 28.

30 En una realización, dependiendo de la medida de corriente en algunos puntos en el tiempo, los parámetros de circuito localizado del módulo pueden ser estimados y los valores de t_{on} y t_{off} determinados y aplicados. Este esquema de control está basado en el hecho de que el flujo de corriente es un indicador del campo eléctrico efectivo experimentado por las células en el canal. De acuerdo con M. Marescaux et al. (PHYSICAL REVIEW E 79, 011502 (2009)), hay dos contribuciones al flujo de corriente. La carga de la capa doble es inicialmente el fenómeno dominante, dando lugar a una disminución exponencial de la corriente transitoria. En la segunda etapa, denominada
35 "acumulación retrasada", cerca de la capa, la concentración de cargas positivas y negativas se hace menor que en la masa. Como resultado, las cargas positivas y negativas se difunden hacia los electrodos. El reajuste de la capa doble conduce a una corriente de medida. Esta corriente transitoria es despreciable durante la carga de capa doble inicial, pero llega a ser dominante en momentos más largos debido a que disminuye mucho más lentamente que una disminución exponencial. La diferencia de potencial aplicado a través de los dos electrodos debería ser
40 desconectada antes del comienzo de la "acumulación retrasada" y para entonces el campo eléctrico ya estaría apantallado del centro del canal.

45 En otra realización, los medios de retroalimentación pueden comprender la medida de un parámetro de circuito, tal como la corriente, y el tiempo t_{on} , puede ser determinado para ser el intervalo de tiempo que sigue a la aplicación inicial del campo eléctrico y el tiempo en el que la corriente de medida desciende por debajo de un umbral predeterminado. En una realización, el umbral puede ser una fracción preseleccionada de la corriente medida cuando el campo eléctrico es inicialmente aplicado.

50 En una realización preferida, el umbral es determinado aplicando una serie inicial de pulsos a los electrodos y midiendo la corriente resultante, y ajustando la corriente medida en una función conocida. Por ejemplo, la corriente medida puede ser ajustada en una función que disminuye exponencialmente y el umbral puede ser aproximadamente igual a la corriente medida en un tiempo aproximadamente igual a una constante de tiempo fijada.

Sin estar destinado a ser limitado por la teoría, la efectividad del módulo de concentración se cree que depende del hecho de que aunque las movilidades electroforéticas de las células no móviles y los iones más pequeños son

numéricamente de similares en orden de magnitud, sus coeficientes de difusibilidad varían enormemente. Con el fin de ilustrar este principio, se proporciona un ejemplo genérico.

Consideremos una muestra electrolítica que contenga una suspensión de bacterias no móviles que tienen forma esférica con un radio de $1 \mu\text{m}$ que fluyen a un módulo de concentración. La altura del canal H se toma como $100 \mu\text{m}$. El coeficiente de difusibilidad y la movilidad electroforética de la bacteria se estima en $D_{\text{cell}} = 2,2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ y $\mu_{\text{cell}} = 2,0 \times 10^{-4} \text{ (cm/s)/(V/cm)}$, respectivamente. Los pulsos cuadrados con $t_{\text{on}} = 0,5 \text{ ms}$ y $t_{\text{off}} = 2 \text{ ms}$ son aplicados a los electrodos. La amplitud de los pulsos se ajusta de tal manera que el campo efectivo durante el tiempo "de conexión" es de $E_{\text{eff}} = 100 \text{ V/cm}$. El desplazamiento lateral medio de la bacteria durante el tiempo de conexión es $\Delta y_{\text{cell}} = \mu_{\text{cell}} E_{\text{eff}} t_{\text{on}} = 0,1 \mu\text{m}$. Durante el tiempo de desconexión la célula se difunde aleatoriamente sobre una longitud media

de $\delta_{\text{cell}} = \sqrt{D_{\text{cell}} t_{\text{off}}} = 2,1 \times 10^{-2} \mu\text{m}$. La relación $\delta_{\text{cell}}/\Delta y_{\text{cell}}$ se calcula para que sea el 21%. Su pequeñez indica que la difusión no deteriora severamente la trayectoria de las bacterias que alcanzan la pared de recogida después de $H/(2\Delta y_{\text{cell}}) = 500$ ciclos, si hubiera empezado desde el centro del canal. Por otra parte, para un ion CL^- con coeficiente de difusibilidad y movilidad de $D_{\text{ion}} = 1,86 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ y $\mu_{\text{ion}} = 8,0 \times 10^{-4} \text{ (cm/s)/(V/cm)}$ los correspondientes desplazamientos son $\Delta y_{\text{ion}} = 0,4 \mu\text{m}$ y $\delta_{\text{ion}} = 1,93 \mu\text{m}$. Entonces, $\delta_{\text{ion}}/\Delta y_{\text{ion}} = 480\%$, que indica que cuando el campo externo es desactivado, los iones se relajan a una distribución de densidad uniforme, conducida por la difusión.

En casos seleccionados, la movilidad de las bacterias puede afectar al rendimiento del módulo de concentración. En ausencia de un campo de fuerza y en un recipiente grande las células capaces de moverse se mueven impulsándose ellas mismas por medio de flagelos a modo de pelo con patrones de natación que se asemejan a un caminar aleatorio tridimensional. La difusión de Fickian usual puede ser utilizada para describir su movilidad aleatoria como es hecha, por ejemplo, por P. Lewus, R. M. Ford (Biotechnology and Biosensing 75 292 (2001)) que mostraba que el movimiento de *E. Coli* AW 405 es similar a una partícula con una velocidad de difusión de $3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Este valor es próximo al coeficiente de difusibilidad de iones pequeños. Sin embargo, hay dos razones que sugieren que, en presencia de capacidad de movilidad celular, el módulo de concentración debería permanecer efectivo. En presencia campo eléctrico, las células de bacterias se alinean ellas mismas a lo largo del campo eléctrico y migrarán hacia un electrodo dependiendo de la naturaleza de la superficie celular, conocida como galvanotaxis. Como resultado de la galvanotaxis el movimiento de las células es de este modo restringido a la dirección lateral. También cuando una célula de bacteria colisiona con la superficie del canal tiende a nadar paralela a la superficie y por tanto se acumulará cerca de la superficie descrita por G. Li y J. X. Tang PRL 103, 078101 (2009). La naturaleza del pulso del campo eléctrico aplicado aumentará el número de colisiones para mejorar su efecto.

El módulo de concentración puede funcionar en un amplio rango de fuerzas iónicas. Sin embargo, la alta fuerza iónica reduce el rendimiento del módulo por tres razones: 1) las movilidades electroforéticas de las células se reducen apreciablemente cuando aumenta la fuerza iónica, lo que requiere la aplicación de elevados voltajes para la concentración eficiente; 2) las elevadas fuerzas iónicas están asociadas con tiempos de carga más cortos, requiriendo de este modo t_{on} más corto, como resultado de lo cual, el ciclo duro, definido como $t_{\text{on}}/(t_{\text{on}} + t_{\text{off}})$, se reduce; y 3) La resistencia de canal R_{CH} , es inversamente proporcional a la fuerza iónica, y cuanto menor es esta resistencia mayor es el calor generado en los electrodos y en el canal, lo que puede producir efectos deteriorantes en las células. Por lo tanto, la reducción de fuerza iónica generalmente da lugar al rendimiento mejorado del módulo de concentración. La tarea de la reducción iónica en la muestra puede ser realizada por el módulo de pretratamiento de muestra que puede estar integrado en la entrada de muestras 10 del dispositivo (véase la Fig. 1).

Pre-tratamiento de Muestra

La Fig. 4 muestra un ejemplo de un filtro de pre-tratamiento de muestra de acuerdo con una realización preferida de la invención. El módulo de pre-tratamiento de muestra 4 consta de la entrada 40, la salida 41, el pre-filtro 42, empaquetado en resinas de intercambio de iones 43, y un filtro 44. El pre-filtro 42 excluye las partículas grandes tales como las resinas de intercambio catiónico y las resinas absorbentes no iónicas utilizadas en algunas muestras como medio de cultivo del sistema Becton Dickinson. Las resinas de intercambio iónico (43) que comprenden resinas catiónicas y aniónicas mezcladas sirven para desionizar la muestra un capturar partículas iónicas más pequeñas (por ejemplo, carbono activado y polvo de tierra de batán, cuando son empleados en el medio de cultivo de bioMerieux). El filtro 44 retiene las resinas iónicas y los iones unidos y las partículas iónicas para evitar que entren en el módulo de concentración.

El pre-filtro y el filtro pueden estar hechos de un material poroso de polialquileno no tejido tal como polipropileno, polietileno, o fritas porosas de politetrafluoretileno con el tamaño de poro apropiado de $35\text{-}125 \mu\text{m}$ adecuado para retener las resinas y las partículas grandes. Más preferiblemente el material poroso es un material térmicamente y químicamente resistente, tal como un polietileno de alta densidad. Un pre-filtro y un filtro pueden estar presentes en los respectivos extremos de un tubo, tal como tubos de polietileno de baja densidad retráctiles y resinas de intercambio de iones estarán empaquetados entre ellos. Preferiblemente, un pre-filtro y un material tubular serán un tipo hidrofílico o revestido con un polímero hidrofílico. Las láminas porosas de polietileno de alta densidad hidrofílico para hacer pre-filtros y filtros, y los materiales tubulares de polietileno de baja densidad están ampliamente disponibles de fuentes comerciales.

Para desionizar los iones y partículas iónicas, se pueden utilizar la resina de intercambio de cationes en forma de H^+ y la resina aniónica en forma de OH^- . El Na^+ en el medio se une a la resina de catión en las uniones de H^+ y Cl^- de intercambio a la resina de aniones en el intercambio de OH^- . El H^+ eliminado y el OH^- forman moléculas de H_2O . Este método es ampliamente aplicado en desionización de agua. Preferiblemente, son utilizadas las resinas de gel microporosas con tamaño de poro mayor que el tamaño de las bacterias u otros analitos celulares de interés. Además, como bacterias cargadas negativamente, todavía pueden unirse a la superficie de la resina aniónica y unirse no específicamente a la superficie de las resinas, ambos tipos de resinas serán tratados con surfactante no iónico tal como TritonX-100. Ejemplos de resinas mezcladas son Amberlite MB-150 de Rohm & Hass y Dowex-Marathon MR-3 de Dow Chemicals con tamaños de partículas comprendidos entre 500-700 μm .

10 Zona de Reacción

Una sección trasversal de la segunda zona está esquemáticamente presentada en la Figura 5. Esta sección de la disposición se conoce como módulo de reacción. Se puede entender que es una extensión del módulo de concentración y durante la etapa de concentración de muestra el par de electrodos adicionales opcionales 18 y 17, como los dos electrodos 16 y 15 del módulo de concentración, pueden ser accionados por el suministro de energía 25 de la Figura 2 para ayudar adicionalmente en la concentración de la muestra. El flujo de entrada 57 es hecho pasar a lo largo de la zona de concentración por la convención de fluido.

Las células, que han sido ubicadas en la extremidad inferior del flujo, no se difunden en la región central del canal mediante la acción simultánea del mecanismo de concentración tanto en los módulos de concentración como de reacción. Esto asegura una captura de células más eficiente mediante el material adherente cuando las células pasan mucho tiempo en las proximidades de la superficie. En la sección aumentada de la figura, se muestra una realización no limitativa en la que el material adherente comprende ligandos de captura que en este caso tienen elevada afinidad por las células (por ejemplo, elevada afinidad a una clase seleccionada de células representadas por los círculos negros). En esta realización, las células que pertenecen a otras clases pasarán sobre sus respectivas regiones de inmovilización sin ser retenidas. Los ligandos de captura pueden ser anticuerpos y estar preferiblemente inmovilizados uniéndose covalentemente a una capa de moléculas separadoras 55 en las regiones de inmovilización.

Aunque las realizaciones anteriormente mencionadas describen un dispositivo que comprende tanto una zona de concentración como una zona de reacción, se entiende que los dispositivos de acuerdo con las diferentes realizaciones pueden comprender o bien una o ambas zonas de concentración o de reacción. Por ejemplo, en una realización en la que la muestra contiene una concentración de células relativamente grande, en cuyo caso una etapa de concentración puede no ser necesaria para unir un número suficiente de células en la zona de reacción, un dispositivo puede comprender una zona de reacción sin una zona de concentración.

El revestimiento dieléctrico en la zona de reacción 54 es preferiblemente sustancialmente más grueso que su contraparte 24 en el módulo de concentración. El espesor grande asegura que la capa dieléctrica será capaz de resistir la elevada fuerza del campo eléctrico durante la electroporación, como se ha descrito anteriormente. En la realización preferida, la capa de Al_2O_3 y el espesor de 2 nm por cada voltio será aplicado en el electrodo 17.

Una vez que toda la muestra ha pasado el canal y las células están retenidas, se puede realizar un proceso de lavado opcional inyectando un líquido de lavado en el canal. El flujo se lleva el analito que ha si adherido sobre la superficie del canal. En el caso específico de las células, generalmente tienen una pequeña afinidad por la superficie no adherente, pueden ser desplazadas por la fuerza de cizalla del flujo de lavado. Cuando se requiera un lavado más riguroso, la acción de lavado puede ser ayudada aplicando una fuerza eléctrica repulsiva débil a las células. Esto se hace invirtiendo la polaridad del suministro de energía 25 y aplicando una secuencia de pulsos a los electrodos.

Electro-lisis y Detección

En una realización preferida, la zona de reacción se emplea para la electroporación o electrolisis de la célula unida. La primera etapa de la etapa de reacción es llenar el canal con un líquido de electroporación o amortiguador. La composición de este líquido depende de la naturaleza de la reacción destinada. Por ejemplo, si la intención es detectar la presencia de catálisis a través del su contenido de ATP, como se describe adicionalmente más adelante, el líquido apropiado debería contener reactivos necesarios para iniciar y realizar al oxidación de luciferina bajo la catálisis por luciferasa seguida de la emisión de luz. Un amortiguador típico puede tener la siguiente composición: luciferasa, D-luciferina, amortiguador Tricina pH 7,8, sulfato de magnesio, EDTA, DTT, BSA.

La liberación de contenidos celulares deseados se realiza aplicado un fuerte campo eléctrico a las células capturadas para hacer la membrana de la célula permeable a un medio exterior. Este método se conoce como electroporación. La electroporación de la membrana de célula puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la fuerza del campo eléctrico.

Preferiblemente, el campo eléctrico es lo suficientemente elevado para producir la rotura irreversible de la pared de la célula. La rotura irreversible de la membrana hace que las membranas de la célula se revienten, y la presión osmótica del citosol y el medio externo se desequilibran y las células son deterioradas como resultado del

sobrehinchamiento. La electroporación irreversible es comúnmente conocida como lisis de célula y es deseable en los casos en los que el dispositivo esté destinado a liberar las moléculas celulares, tales como ATP, ácidos nucleicos y proteínas.

5 Hablando en líneas generales, el campo interno para la electroporación o electro-lisis depende de muchos factores, incluyendo el tamaño de una estructura de pared celular de la célula, el voltaje aplicado, y la separación entre los electrodos utilizados para aplicar el campo. La resistencia de campo eléctrico requerida para conseguir un potencial de trans-membrana de más de 1 V es de aproximadamente 1 kV/cm. Preferiblemente, el voltaje aplicado es seleccionado para proporcionar un campo eléctrico interno de al menos 1 kV/cm, aunque este umbral se conoce que
10 varía para diferentes tipos y especies de células. Dependiendo del campo aplicado, la electroporación puede ser permanente, o reversible.

El voltaje puede ser aplicado como voltaje de corriente continua o de corriente alterna, y puede ser continuo o a pulsos. En una realización preferida un voltaje de corriente continua es aplicado para limitar la formación de burbujas debidas a la electrolisis. Preferiblemente, el voltaje es de corriente alterna, tiene una frecuencia entre 1 y aproximadamente 10 MHz. En otra realización alternativa, el voltaje es aplicado en uno o más pulsos, durante cada pulso aproximadamente 10 microsegundos a 10 milisegundos. Los expertos en la técnica fácilmente apreciarán que diferentes combinaciones de voltaje, frecuencia, pulsos y duración serán apropiados para los diferentes materiales, geometrías y tipos de células.

En la técnica anterior, dos configuraciones básicas habían sido sugeridas para realizar la electroporación o electro-lisis; la axial-ohmica y la transversal-ohmica. La configuración axial-ohmica ha sido utilizada en los dispositivos microfluídicos (por ejemplo, US6287831, y Wang et al., *Biosensors and Bioelectronics* 22:582-588, 2006). El campo requerido es generado por la caída de voltaje cuando una corriente eléctrica pasa a través de un medio acuoso de elevada resistencia que contiene una suspensión de células. Un campo eléctrico es entonces establecido a lo largo de la longitud del dispositivo insertando dos cables en la entrada y la salida de muestra.

La configuración transversal-ohmica es utilizada en vasos de electroporación convencionales (por ejemplo US6074605). En la forma básica, el dispositivo incluye un alojamiento hueco de forma sustancialmente rectangular. Dos electrodos están insertados en el interior del alojamiento directamente opuesto uno con el otro, a ras contra las paredes de alojamiento. La electroporación es realizada aplicando una diferencia de voltaje entre los dos electrodos. Estas configuraciones pueden ser adoptadas en las realizaciones descritas aquí. Alternativamente para las realizaciones para las que los receptores de célula primarios son inmovilizados sobre una superficie dieléctrica, el campo requerido es generado cargando el condensador formado por dos electrodos conductores, uniendo uno detrás de la superficie dieléctrica y el otro opuesto a esta superficie. En este caso, el campo transitorio es capaz de realizar electro-lisis en las células.

Aunque la lisis eléctrica de las células es conocida, (por ejemplo, *Bioelectrochemistry*, 2004, 64, 113-124. *Lab Chip*, 2005, 5, 23-29. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 385, 474-485. US7418575), estos métodos enseñan que las células deberían estar suspendidas en un medio líquido y que un campo eléctrico grande es requerido que esté por encima de la fuerza umbral en todo el volumen del medio. Los dispositivos basados en tal planteamiento han encontrado retos en conseguir la lisis debido a la presencia de apantallamiento del campo por la formación de la capa doble.

Por el contrario, en las realizaciones descritas aquí, el módulo de reacción, las células están unidas en superficie. Durante el proceso de carga de capa doble, aunque la fuerza de campo rápidamente disminuye en las regiones de canal internas, aumenta en el límite de electrodo (*Phys. Rev. E* 70, 021506 (2004)). Por lo tanto, diferencias de potencial relativamente bajas son suficientes para proporcionar fuerzas de campo eléctrico elevadas en las proximidades de las células.

Con el fin de ilustrar las ventajas de la electroporación en la superficie de electrodo, se proporciona a continuación un ejemplo no limitativo. Considerando el caso de un canal con una altura (la dimensión H en la figura 1) de 100 μm , la intención es realizar lisis de células bacterianas mediante electroporación irreversible. Se ha informado de que los campos eléctricos requeridos son de aproximadamente 10 kV/cm. Si las células están suspendidas en el líquido, el suministro de energía debe enviar una diferencia de potencial de 100 V.

Sin embargo, para las células unidas en superficie el requisito de voltaje puede ser sustancialmente reducido. Sin tener intención de estar limitado por la teoría, este descubrimiento puede ser interpretado dentro del contexto de un modelo cualitativo de transporte de carga en un campo eléctrico desarrollado por Beunis et al (*Physical Review E*, 78, 011502 (2008)). Inmediatamente después de la aplicación de un voltaje V_A sobre los electrodos de bloqueo en el tiempo de referencia ($t = 0$) una carga superficial positiva se acumula cerca del electrodo negativo y una carga superficial negativa se acumula cerca del electrodo positivo. Adyacente a los electrodos, las regiones de carga de espacio con espesores $\lambda_{SC}(t)$ ocurren cuando las cargas de una polaridad están completamente ausentes. Para un valor suficientemente grande del voltaje aplicado, la variación es el mecanismo de carga dominante y la difusión puede ser abandonada. Por lo tanto, la velocidad a la que las regiones de carga de espacio crecen es igual a la velocidad de las cargas en la masa:

$$\frac{d\lambda_{SC}(t)}{dt} = \mu E_{bulk} \quad (4),$$

en donde, μ es la movilidad de los iones (supuesto que sea la misma para los iones positivos y negativos) y E_{bulk} es el campo eléctrico en la masa. Beunis et al, muestran que dentro de las aproximaciones razonables, el campo en la región de carga de espacio, E_{SC} , puede ser calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$E_{SC} = \sqrt{E_{bulk}^2 + \frac{4qnm}{\epsilon\epsilon_0} \left(x + \lambda_{SC} - \frac{H}{2}\right) E_{bulk}} \quad (5)$$

en donde, q es la carga iónica, n es la densidad iónica media en el medio, ϵ_0 es la permisividad dieléctrica del vacío y ϵ es la constante dieléctrica relativa del medio, y x se mide desde el centro del canal.

Para calcular el campo eléctrico interno basado en el análisis anterior, un microcanal que tiene una altura de 100 μm fue llenado con 170 μM de solución de NaCl, y un voltaje de etapa de amplitud $V_A = 1$ fue aplicado a los electrodos de canal. La corriente medida como una función del tiempo (t en segundos) podría ser aproximadamente

$$I(t) = \frac{I_0}{1 + (t/6.5 \times 10^{-4})^2}, \quad E_{bulk}(t) = \frac{V_A / H}{1 + (t/6.5 \times 10^{-4})^2}.$$

Por consiguiente, fue deducido que en la ecuación (4) con $\mu = 7,15 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ se encontró que aproximadamente 8 ms después la aplicación del campo externo, la anchura de la región de carga de espacio será comparable al tamaño típico de una célula bacteriana, es decir $\lambda_{SC}(t = 8 \text{ ms}) = 1 \mu\text{m}$. En este tiempo la fuerza del campo en el centro de la región de carga de espacio (0,5 μm desde el electrodo) alcanza una magnitud de 1,5 kV/cm, que es 15 veces mayor que la que era de esperar si el efecto de apantallado no estuviera presente.

El análisis anterior demuestra que seleccionando una capa dieléctrica que tenga un espesor y una constante dieléctrica de manera que la caída de campo eléctrico se produzca sustancialmente dentro de la capa de carga de espacio en el canal, un campo eléctrico amplificado es obtenido dentro del canal próximo a la capa dieléctrica. Como se ha observado anteriormente, un espesor preferido para la capa dieléctrica está dentro del rango de aproximadamente 10 y 100 nm, y una constante dieléctrica preferida de la capa dieléctrica está en el rango de aproximadamente 3 a 10, y más preferiblemente por encima de 10. De este modo, el suministro de energía de alto voltaje separado no es necesario para la electroporación y una única fuente de energía de bajo coste puede realizar los procesos de concentración, lavado y electroporación. Además, debido al bajo valor del voltaje aplicado, el espesor de la capa dieléctrica (preferiblemente Al_2O_3), necesaria para el bloqueo del electrodo, se puede mantener bajo y la reducción en el tiempo de carga de electrodo, y sus problemas asociados, se evitan.

Como se ha descrito anteriormente, en una realización, el material adherente comprende un receptor específico de célula, en donde las células se unen específicamente al soporte sólido directamente a través de la unión específica de una superficie de célula con el receptor inmovilizado dentro de una región de inmovilización. En una realización preferida, el material adherente que está dispuesto para unir la célula al soporte sólido incluye además receptores secundarios inmovilizados que son específicos para el analito intracelular liberado desde las células que sigue a la aplicación del campo eléctrico. Los receptores secundarios hacen posible la captura del analito intracelular localmente liberado de una célula unida inmediatamente después de la electroporación o electro-lisis. Preferiblemente el material adherente es proporcionado en una disposición espacial, y los receptores secundarios están dispuestos dentro de la disposición. El material adherente puede estar dispuesto dentro de una disposición de regiones de inmovilización que comprenden receptores primarios, con cada región de inmovilización en la disposición que comprende un receptor específico para un tipo dado de célula o células, y en donde cada región de inmovilización comprende además un receptor secundario para detectar el analito intracelular post-lisis o post-electroporación. En otra realización, los receptores secundarios están provistos de una región de inmovilización del soporte sólido adyacente a una zona dada del material adherente.

La captura de las células por el material adherente y la posterior electroporación o electrolisis de células en el soporte sólido concentra de manera efectiva el analito intracelular cerca de los receptores secundarios, sin la necesidad rápida de un cuidadoso y eficiente mezclado. La posterior adición de un reactivo detector hace posible la detección y/o cuantificación de la presencia del analito intracelular en base a la ubicación espacial de la señal en la disposición.

Se ha de entender, sin embargo, que la presente realización que implica la captura de las células a través del material adherente en la zona de inmovilización, la lisis de las células capturadas para liberar sus contenidos intracelulares, y la posterior detección de los contenidos intracelulares a través de la unión de los contenidos intracelulares a los receptores secundarios proporcionados en la región de inmovilización, no se limitan a las realizaciones que implican la electro-lisis o electroporación de las células unidas. Como tal, el material adherente y los receptores secundarios no necesitan estar unidos a un electrodo ni a una capa dieléctrica, sino que pueden estar unidos sobre cualquier soporte sólido adecuado, como se describe mejor más adelante. En una realización

preferida, el material adherente y los receptores secundarios están dispuestos dentro de una región de inmovilización definida en una superficie de pozo de microplaca. Para liberar los contenidos intracelulares, se puede emplear cualquier método de lisis adecuado, incluyendo, pero no limitándose a, lisis química, lisis mecánica y lisis ultrasónica.

- 5 Se ha de entender además que aunque las realizaciones precedentes han sido descritas dentro del contexto de la unión de células al soporte sólido mediante el material adherente con el fin de deteriorar la membrana celular (por ejemplo electro-lisis o electroporación), la captura y/o la concentración de las células en las proximidades de la capa dieléctrica para la posterior electroporación y electro-lisis se puede conseguir mediante el campo eléctrico que actúa como concentración solo, sin la necesidad de materia adherente dentro de la zona de inmovilización. En tal
10 realización, el método anterior de aplicar pulsos de voltaje unipolares se puede realizar para concentrar las células en la región proximal a la capa dieléctrica, preferiblemente dentro de, o adyacente a, la región de carga de espacio anteriormente mencionada. Una vez que las células han sido acumuladas en esta región bajo al aplicación del campo eléctrico de los pulsos de voltaje unipolares, pueden ser aplicados uno o más pulsos de voltaje con una amplitud suficiente para el deterioro de la membrana celular. Por consiguiente, las células en una muestra de líquido
15 que contiene células pueden ser concentradas proximales a la superficie dieléctrica y electroporada y/o electro-lizada. En una realización preferida, la capa dieléctrica puede comprender una región de inmovilización que tenga en la misma solo receptores secundarios para unirse con el analito intracelular liberado de las células.

Este aspecto único de las realizaciones descritas aquí hace posible la detección de elevada sensibilidad de un amplio rango de analitos intracelulares que incluyen proteínas y ácido nucleicos. Además, la concentración de
20 analito intracelular en las proximidades espaciales de los receptores secundarios soporta la detección del analito con muy bajo número de copia, sin recurrir al esquemas de mezclado y concentración complejos. Como se mostrará en los siguientes ejemplos, estas realizaciones pueden ser adaptadas a una amplia gama de plataformas de ensayos, y es particularmente adecuado para sistemas analizadores automáticos que emplean cartucho microfluídicos.

En una realización preferida, los receptores secundarios son sondas de ácido nucleico inmovilizadas que reconocen
25 y se hidrolizan específicamente con ácidos nucleicos liberados después de la aplicación del campo eléctrico. Esta realización, por tanto, proporciona un ensayo de unión de fase sólida de dos etapas híbrido, con una primera etapa que implica la captura de células sobre una disposición de las regiones de inmovilización en un soporte sólido a través de los receptores primarios, y la segunda etapa que implica la captura de ácidos nucleicos liberados por los receptores secundarios inmovilizados en el mismo soporte sólido. Después de la aplicación del campo eléctrico y la liberación de analito intracelular, el vaso de reacción es incubado durante un periodo de tiempo suficiente para hacer posible la unión de los ácidos nucleicos a las sondas de ácidos nucleicos inmovilizadas. En ensayo puede entonces proceder de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, en la que un ensayo de sándwich es realizado añadiendo sondas de detector etiquetadas que son específicas de los ácidos nucleicos que comprenden el analito intracelular liberado.

35 En otra realización preferida, los receptores secundarios son anticuerpos que específicamente reconocen el analito intracelular después de la aplicación del campo eléctrico. Como en la realización precedente, que implica el uso de sondas de ácidos nucleicos como receptores secundarios, esta realización también proporciona un ensayo de unión de fase sólida de dos etapas híbrido, con una primera etapa que implica la captura de las células sobre una disposición de puntos en un soporte sólido a través del material adherente (por ejemplo, receptores primarios), y la
40 segunda etapa que implica la captura del analito intracelular liberado por anticuerpos inmovilizados en el mismo soporte sólido que el material adherente. Después de la aplicación del campo eléctrico y la liberación del analito intracelular, el vaso de reacción es incubado durante un periodo de tiempo suficiente para hacer posible la unión del analito intracelular liberado a los anticuerpos inmovilizados. El ensayo puede entonces proceder de acuerdo con los métodos de la técnica, en la que un ensayo de sándwich se realiza añadiendo anticuerpos etiquetados que son
45 específicos para cada analito intracelular.

En una realización preferida, la señal procedente de cada punto en las realizaciones precedentes (que implica la detección del analito intracelular a través de los receptores secundarios inmovilizados) es una señal óptica que puede incluir, pero no se limita a, señales producidas por etiquetas cromogénicas, fluorométricas, luminiscentes, quimioluminiscentes, electro-luminiscentes, o fluorométricas de resolución temporal. La señal óptica puede estar
50 producida o facilitada por una única etiqueta, tal como fluoroforo, pero puede ser producida o facilitada por dos o más fracciones etiquetadas, o puede requerir la adición de más reactivos tales como sustratos de producción de señal.

Métodos a modo de ejemplo para preparar un soporte sólido con material adherente y receptores secundarios se describen más adelante. Preferiblemente, el material adherente comprende un anticuerpo que tiene una afinidad por
55 la superficie de célula, y los receptores secundarios comprenden sondas de ácidos nucleicos (o análogos de los mismos) para unir el analito intracelular que comprende ácidos nucleicos (tales como rARN). El material adherente y los receptores secundarios con los grupos funcionales apropiados pueden ser inmovilizados en cualquier superficie conocida en la técnica anterior después de cualesquiera métodos de preparación de superficie conocidos para introducir grupos funcionales reactivos apropiados en el soporte sólido. Ejemplos de preparaciones pueden ser
60 deposición de pequeñas moléculas tales como organosilanos y enlazadores de tiol por interacción covalente o macromoléculas tales como poli-L-Lisina y PEI por absorción física.

En una realización a modo de ejemplo, todavía no limitativa, una capa de silano hetrobifuncional con grupos funcionales, X-Si-X', puede ser depositada sobre la superficie (Y) en la que una capa de silano puede ser aplicada para formar Y-O-Si-X'. X' puede ser trimetoxi (-OCH₃)₃, trietoxi (-OC₂H₅)₃ o tricloro (Cl₃) y formar química Y-O-Si-X' en la hidrólisis. Un ejemplo de tal superficie es superficie hidroxilada de soporte de aluminio, con una capa de óxido procesa de forma natural o artificial, y una capa de silano hetrobifuncional es generada por la formación Al-O-Si-X'.

X puede variar e interactuar de manera covalente con el respectivo grupo funcional de ligando de captura o la molécula de enlazador cruzado puede ser unida a la capa de silano a través de la química apropiada. Por ejemplo, X puede ser grupo funcional glicidil de glicidiloxipropil-trimetoxisilano (GOPTS) o grupo funcional amino de 3-aminopropiltrióxosilano (APTS). El grupo funcional glicidil de GOPTS interactuará fácilmente con el grupo funcional amino de la molécula que se vaya a unir. Sin embargo, una activación adicional del grupo funcional amino de APTS con la química de enlace cruzado, por ejemplo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), será requerida para la interacción covalente con el grupo funcionan carboxilo de las moléculas que va a ser unidas. Opcionalmente, el grupo funcional amino de APTS puede ser pre-activado con cualquier química conocida, por ejemplo, con enlazador cruzado bifuncional de glutaraldehído, para interactuar fácilmente con el grupo funcional amino del ligando de captura que va a ser inmovilizado. Alternativamente, las moléculas de proteínas con elevada afinidad y especificad, tales como avidina o estreptavidina pueden ser inmovilizadas en la superficie de aluminio funcionalizada mediante cualquier química apropiada a un ligando de captura biotinilado puede ser fácilmente inmovilizado por la interacción de afinidad de biotina-avidina.

Una vez que la preparación superficial se ha completado, los materiales adherentes y los receptores secundarios, que han sido suspendidos en un amortiguador apropiado, pueden ser dispensados en la región deseada de la superficie mediante métodos de dispensación de líquido conocidos en la técnica anterior. En la realización preferida, los materiales adherentes y los receptores secundarios son suspendidos en un amortiguador común y por tanto son dispensados juntos. En otra realización, el receptor secundario ya está unido al material adherente mediante unión covalente o de bio-afinidad. El material adherente resultante es suspendido en un amortiguador apropiado para la dispensación. Estas realizaciones proporcionan mejor regularidad en la fabricación. En la tercera realización, los materiales adherentes y los receptores secundarios son suspendidos en amortiguadores separados y son dispensados secuencialmente. Después de la dispensación, utilizado cualquier planteamiento, la superficie es mantenida en un ambiente apropiado, que ha sido optimizado en términos de temperatura y atmosfera ambiental, para permitir la formación de unión covalente y la evaporación del exceso de amortiguador. Después, la superficie es lavada para retirar el exceso de materiales. Finalmente las zonas reactivas no unidas son bloqueadas mediante métodos conocidos en la técnica.

Preferiblemente, antes de la lisis, un amortiguador de lisis es hecho fluir en el canal microfluídico para soportar la lisis eficiente de las células adheridas. Después de la lisis, los ácidos nucleicos pueden ser concentrados en la superficie y retenidos en la superficie mediante la aplicación de voltaje a los electrodos 17 y 18. Preferiblemente, el voltaje es aplicado a una forma de corriente continua uni-polar, bajo la operación de pulsos, como se ha descrito en la sección de concentración, para concentrar las células en el lado del ánodo de la célula. El amortiguador de lisis puede ser retirado, y un amortiguador de hibridación puede ser hecho fluir a la cámara mientras se retiran los ácidos nucleicos en la íntima proximidad a las ondas inmovilizadas (por ejemplo, manteniendo el voltaje de pulsos). Después de proporcionar el amortiguador de hibridación y liberar el campo eléctrico aplicado, se produce la hibridación. Preferiblemente el amortiguador de hibridación comprende además sondas detectoras etiquetadas. Alternativamente, puede estar dispuesta una etapa adicional en la que el amortiguador de hibridación sea retirado y la solución de sonda detectora sea hecha fluir a la cámara para facilitar la detección de los ácidos nucleicos intracelulares unidos.

Por ejemplo, una sonda detectora puede constituir un oligonucleótido etiquetado con una enzima quimioluminiscente tal como peroxidasa del rábano. En esta realización a modo de ejemplo, el oligonucleótido etiquetado no unido es retirado en una etapa de lavado adicional, y la señal de ensayo es detectada ópticamente después de la detección de un sustrato quimioluminiscente.

Se puede emplear una amplia gama de ensayos alterativos para la detección de los ácidos nucleídos unidos, tales como utilizar sondas etiquetadas de PNA y ensayos de baliza molecular. Durante la hibridación objetivo, la elevada concentración catiónica en el amortiguador neutraliza la carga negativa en la sonda de ADN de una única cadena y acelera la cinética de hibridación. Por lo tanto, en las etapas de ensayo anteriormente descritas, un amortiguador de lisis no iónico es sustituido por un amortiguador de hibridación altamente iónico. La estructura troncal de PNA permite una fuerza iónica baja para la hibridación objetivo, que es ventajosa para la lisis inmediatamente seguida por la hibridación en el mismo amortiguador iónico bajo. En otro planteamiento que utiliza un ensayo de baliza molecular, la señal fluorescente de la baliza molecular es detectada sólo después de la hibridación objetivo y por tanto la separación de las sondas hidrolizadas y las sondas no unidas no es necesaria, eliminando la etapa de lavado que sigue a la hibridación. Las balizas moleculares pueden estar diseñadas como una estructura troncal de ADN o PNA como se conoce en la técnica, permitiendo la flexibilidad de la selección de concertación iónica para el amortiguador de lisis. En lugar de utilizar como sondas detectoras, las sondas de baliza moleculares pueden ser inmovilizadas en el soporte sólido como receptores secundarios para capturar los ácidos nucleicos intracelulares liberados después de la lisis, con lo que se proporciona un ensayo de unión de fase sólida de dos etapas híbrida sin los requisitos del reactivo detector adicional y las etapas de lavado.

En otra realización preferida, cada punto de la disposición en el soporte sólido comprende además un electrodo, con cada electrodo conectado eléctricamente a una almohadilla de contacto externamente dirigible. Preferiblemente, un electrodo de referencia está adicionalmente provisto en el contacto fluido con los electrodos de disposición. Por consiguiente, una etiqueta y sustrato electromecánico pueden ser empleados para utilizar en tal realización para la medida espacialmente resuelta de una señal de ensayo eléctricamente.

Dispositivos de acuerdo con varias realizaciones como se han descrito aquí pueden estar en el formato de un kit que haga posible que los usuarios personalicen y/o seleccionen el material adherente y/o los receptores secundarios apropiados a las células objetivo y a los analitos intracelulares de interés. El kit preferiblemente comprende elementos requeridos para al menos una de concentración, lisis y detección como se ha descrito anteriormente y además proporcionar unos medios para que el usuario proporcione material adherente seleccionado por el usuario (por ejemplo, anticuerpos primarios que tienen por objetivo una superficie de célula) y/o receptores secundarios (por ejemplo, anticuerpos o sondas para unirse al analito intracelular de interés) al soporte sólido.

En una realización preferida, el kit comprende un sustrato que contiene un canal microfluídico abierto, que expone el soporte sólido, una placa superior separada, y opcionalmente un adhesivo de obturación o estructura de pinzado para poner en contacto la placa superior con el sustrato y encerrar el canal microfluídico para utilizar con una muestra líquida. El usuario puede aplicar ligandos de captura al soporte sólido preparado mediante métodos de dispensación manual o automática (por ejemplo, manchado).

Cuando los ligandos de captura han sido aplicados y todo el exceso de material ha sido retirado, la placa superior será aplicada al canal y formada allí por medio de, por ejemplo, adhesivo sensible a la presión pre-aplicado tanto en la placa superior como inferior. El dispositivo, así preparado, puede entonces ser empleado para realizar las etapas del método anteriormente mencionadas de acuerdo con varias realizaciones (por ejemplo, concentración, lisis y detección) como se ha descrito en esta memoria.

El canal abierto puede comprender una superficie preparada para unirse al ligando de captura de interés sobre toda la superficie proporciona al usuario la flexibilidad para seleccionar cualquier configuración especial apropiada para la disposición. Las herramientas en instrumentos están disponibles comercialmente para ayudar en la aplicación de disposiciones de soportes sólidos. Una realización preferida proporciona una máscara pre-colocada sobre el soporte sólido que aísla regiones de unión discretas que forman la disposición. La máscara permite que las gotas de distintos ligandos de captura sean colocadas en cada región de unión mientras se evita que estas gotas se esparzan a las regiones vecinas.

Como un ejemplo, la máscara puede comprender una película de plástico delgada con orificios que definen regiones de inmovilización potenciales, en donde la película de plástico está preferiblemente fijada al soporte sólido por un adhesivo tal como un respaldo adhesivo retirable. Las gotas de los ligandos de captura deseados serían aplicadas a las regiones de unión mediante, por ejemplo, un aplicador de punta o una pipeta. Después de la finalización de la aplicación de los ligandos de captura (que pueden comprender o una o ambas del material adherentes de superficie de célula y los receptores secundarios para unirse al analito intracelular) y retirar el exceso de material, la máscara puede opcionalmente ser retirada del soporte sólido y el canal microfluídico puede ser obturado proporcionando la placa superior como se ha observado anteriormente. Podría estar prevista una máscara más elaborada que podría proporcionar control mejorado de las gotas durante la aplicación de los ligandos de captura para facilitar el uso por el usuario.

El soporte sólido del kit de plataforma abierta anteriormente mencionado puede ser preparado por procesos presentados en los siguientes dos ejemplos no limitativos. En el primer ejemplo, las placas de soporte de aluminio pulidas son limpiadas con agua y después aclaradas dos veces con etanol y secadas al aire. 2% de 3-Aminopropil Trietoxilano es preparado en un 95% de Metanol y un 5% de agua y las placas son sumergidas en silano durante 5 minutos. Después, las placas son enjuagadas en metano dos veces, secadas al aire y colocadas a 110°C durante 10 minutos. Después del enfriamiento, las placas son sumergidas en 2,5% enlazador cruzado homobifuncional de glutaraldehído en fosfato salino amortiguado, pH 7,4 a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas son enjuagadas concienzudamente con agua y secadas al aire. La zona de reacción del canal microfluídico es definida aplicando un separador adhesivo de doble lado en la superficie tratada de las placas. El usuario inmovilizará el anticuerpo o la sonda de captura oligonucleótida etiquetada amino, o una mezcla de los mismos como se ilustra en el Ejemplo 2 mas adelante, en un amortiguador de unión de pH básico tal como amortiguador de carbonato pH 9, mediante el método de manchado manual o automático, lavará los materiales no unidos y bloqueará los sitios de unión no específicos mediante el método de elegir antes de aplicar la placa superior.

En el segundo ejemplo, 2,5% de enlazador cruzado homobifuncional de glutaraldehído en solución salina amortiguada de fosfato, pH 7,4 será aplicado solo en las áreas predefinidas de la zona de reacción con áreas de unión aisladas creadas por la máscara retirable con respaldo adhesivo. El usuario aplicará una gota de anticuerpo o de sonda de captura oligonucleótida etiquetada amino, o una mezcla de los mismas, en un amortiguador de unión de pH básico tal como amortiguador de carbonato pH 9, sobre las áreas predefinidas, permitiendo la inmovilización de los ligandos de captura, lavará los materiales no unidos, retirará la máscara retirable y bloqueará los sitios de unión no específicos en toda la zona de reacción por el método de elección antes de aplicar la placa superior.

- Los dispositivos de acuerdo con las distintas realizaciones como se han descrito aquí se pueden emplear para el apantallamiento de las muestras biológicas para la detección de la presencia de microorganismos por encima de cierto límite de detección umbral. Esto se puede realizar haciendo fluir una cantidad suficientemente elevada de muestra a través del dispositivo para obtener una señal medible, mientras se emplean las técnicas anteriormente mencionadas para la retención y concentración de células. Suponiendo una eficiencia de retención de menos del 100%, el volumen de la muestra puede ser ajustado para asegurar que se establece un requisito de sensibilidad mínimo. En otras palabras, la cantidad de muestra que es hecha fluir a través del dispositivo es ajustada para compensar los requisitos de sensibilidad de la aplicación clínica particular. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, esto se puede conseguir en una etapa de calibración. En un ejemplo no limitativo, si la muestra clínica es sangre y se requiere un límite de detección de 100 CFU/ml, entonces el volumen de muestra total que es utilizada para la concentración y detección debe ser 100 veces la del caso en el que la muestra es orina y se desea un límite de detección de 10^4 CFU/ml. En una realización, el dispositivo puede ser operado en un régimen de "flujo pasante", en el que se emplea un volumen de muestra que es sustancialmente mayor que el volumen del dispositivo, para mejorar el límite de detección para tratar requisitos de rendimiento clínicos.
- Como se ha ilustrado en el ejemplo anterior, la cantidad de muestra requerida para conseguir un cierto límite de detección es variable a través de las diferentes muestras y tipo de espécimen. Las realizaciones seleccionadas soportan el flujo continuo de la muestra a través del dispositivo hasta que la concentración de célula apropiada ha sido conseguida monitorizando, por ejemplo, una señal óptica tal como la auto fluorescencia o la dispersión de luz, en la zona de concentración.
- En una realización particular en la que el material adherente comprende principalmente receptores, los receptores primarios y/o secundarios pueden estar químicamente unidos a un hidrogel, tal como un hidrogel basado en poli(acrilamida) (por ejemplo, Yu et al., *BioTechniques* 34:1008-1022, 2003). Los monómeros de acrilamida pueden ser copolimerizados con diferentes sondas (por ejemplo, oligonucleótidos, ADN, proteínas, aptámeros, etc.) mediante polimerización fotoinducida de monómeros modificados metacrílicos. Los hidrogeles pueden ser unidos a cristal, silicona, u otras superficies. Los receptores de avidina modificada pueden ser unidos por hidrogeles que contienen monómeros de biotina modificada. El uso de hidrogeles mejora la estabilidad de los receptores, tales como las proteínas, y puede mantener su actividad de unión durante seis meses o más (Yu, et al., 2003). Los dispositivos microfluídicos basados en hidrogel pueden ser utilizados en combinación con los métodos de detección óptica descritos anteriormente.
- Los receptores primarios y/o secundarios pueden ser unidos a la superficie del hidrogel a modo de red o alternativamente pueden ser embebidos dentro del hidrogel para aumentar su estabilidad. Además, la naturaleza hidrofílica del hidrogel evita la unión no específica con el soporte sólido, dando lugar a una señal de fondo más baja. La estructura tridimensional del hidrogel proporciona un área de superficie más grande para la inmovilización de receptores y como resultado, se mejora la intensidad de la señal de ensayo. Cuando los receptores están embebidos dentro del hidrogel, los ensayos de unión anteriormente mencionados para la presencia o ausencia de analito intramolecular también pueden ser realizados dentro del gel. El hidrogel puede ser utilizado para confinar la reacción y/o los reactivos de manera localizada para mejorar la sensibilidad de los ensayos. Como de ha observado anteriormente, tales ensayos pueden ser realizados utilizando, por ejemplo, la detección de ácido nucleico o inmunoensayos. En una realización preferida, los receptores primarios y/o secundarios pueden ser unidos a la superficie del hidrogel a modo de haz, en los cuales los polímeros de hidrogel están extendiéndose como un haz desde la superficie, proporcionan área superficial mayor para la inmovilización del receptor que el hidrogel a modo de red anteriormente mencionado. Además, los receptores están totalmente expuestos al medio acuoso y por tanto las reacciones de unión específicas entre los receptores y los analitos son mejoradas más. El uso del hidrogel a modo de haz para disposiciones ha sido descrito en la Patente de Estados Unidos N° 6.994.964. Las realizaciones precedentes que implican el uso de receptores secundarios pueden ser adaptadas para la detección específica de células en un cierto número de formas. En una realización preferida, el material adherente comprende receptores primarios y tanto los receptores primarios como los receptores secundarios inmovilizados en un punto dado en la disposición son específicos para un tipo de célula o células (o género, especie o cepa de células). En otra realización, el material adherente dispuesto en cada punto en la disposición se une con una amplia gama de tipo de células, y los receptores secundarios en cada punto son específicos para el analito intracelular procedente de un tipo de célula o células dado. En otra realización preferida, el material adherente comprende receptores primarios que son específicos para una célula o tipo de célula en cada punto, y los receptores secundarios se unen con el analito intracelular procedente de una amplia gama de tipos de células. En las realizaciones en las que las sondas secundarias provistas en cada punto son específicas para analito intracelular procedente de una célula y tipo de célula dado, y donde los diferentes puntos tienen células o tipos de células objetivo diferentes, los reactivos detectores etiquetados son preferiblemente específicos para el analito intracelular, y de este modo proporcionan un grado adicional de especificidad. Tales reactivos detectores etiquetados pueden estar dispuestos como un conjunto multiplexado de reactivos etiquetados en forma líquida que se añade a la reacción.
- Al contrario que las reacciones anteriores que implican la detección de fase sólida del analito intracelular, las realizaciones alternativas utilizan ensayos homogéneos para la detección del analito intracelular. El ensayo homogéneo implica la adición de uno o más reactivos que reaccionan con el analito intracelular liberado para producir una señal detectable. Las realizaciones descritas más adelante hacen posible de manera ventajosa el uso de un ensayo homogéneo para la detección local del analito intracelular después de la lisis o la electroporación, en la

íntima proximidad del punto sobre el cual una célula está unida.

Los reactivos adicionales requeridos para el ensayo homogéneo pueden ser proporcionados al vaso o a la cámara de reacción, (es decir, contactados con el soporte sólido) antes de la aplicación del campo eléctrico y la liberación del analito intracelular. Por consiguiente, después de la liberación del analito intracelular, la reacción homogénea es indicada indefinidamente debido a la presencia de los reactivos adicionales. Esto, a su vez hace posible la detección de una señal de ensayo que, aunque se origina a partir de una reacción homogénea, generalmente está localizada en un volumen espacial que está en íntima proximidad con el punto sobre el que la célula fue inmovilizada inicialmente.

Los reactivos son preferiblemente seleccionados para producir una señal de ensayo en un intervalo de tiempo que es menor que el intervalo de tiempo sobre el cual el analito intracelular se puede difundir a un punto adyacente, con lo que se hace posible la detección resuelta espacialmente de la señal de ensayo. En otras palabras, seleccionando los reactivos de ensayo homogéneos que rápidamente producen una señal relativa a la escala de tiempo de la difusión lateral, las señales de ensayo procedentes de cada punto individual pueden ser resueltas espacialmente y detectadas en un formato multiplexado.

Dado que la naturaleza de la reacción homogénea requiere que los mismos reactivos de ensayo homogéneo estén presentes en cada punto, es preferible que los reactivos de ensayo homogéneo detecten un analito intracelular que puede ser común a las células unidas en todos los puntos de la disposición. Por consiguiente, la especificidad de una célula particular unida a un punto particular se proporciona mediante los receptores primarios que unen la célula al soporte sólido antes de la aplicación del campo eléctrico.

En una realización preferida, el ensayo homogéneo es un ensayo para trifosfato de adenosina (ATP) intracelular endógeno, y los reactivos homogéneos son preferiblemente luciferina y luciferasa. La reacción del ATP endógeno (liberado por las células unidas después de la aplicación de un campo eléctrico) con luciferina y luciferasa produce luminiscencia que será inicialmente producida a partir de un volumen que está espacialmente localizado cerca del punto de disposición sobre el que la célula fue inicialmente unida. En una realización preferida de la invención, un dispositivo de generación de imágenes ópticas tal como una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) se emplea para generar una imagen de la luminiscencia procedente de la reacción homogénea antes de la pérdida de resolución espacial que da lugar de la difusión lateral.

Cuando un ensayo homogéneo es utilizado para la detección del analito intracelular, la muestra puede ser pre-tratada con una sustancia que inactive el analito intracelular superfluo que se puede originar en la muestra procedente de la fuente adicional tal como los tipos de células que no están destinados a ser ensayados (por ejemplo, glóbulos rojos en un ensayo para bacterias en una muestra de sangre). En una realización preferida en la que el ensayo homogéneo está provisto para detectar ATP endógeno, una etapa de pre-tratamiento de muestra puede incluir proporcionar ATPasa a la muestra para inactivar cualquier ATP en la muestra.

Las realizaciones precedentes también pueden ser combinadas con un ensayo de unión adicional que es realizado antes de la liberación del analito intracelular (es decir, antes de la aplicación del campo eléctrico) para la detección de identificación de las células unidas a la disposición. En esta realización, las fracciones de unión etiquetadas adicionales que comprenden receptores o ligandos etiquetados están incluidas que específicamente se unen con el analito de superficie de célula o receptores sobre la superficie de célula. Durante la posterior etapa de lavado, son eliminadas las fracciones de unión etiquetadas unidas no específicamente o no unidas. Como resultará evidente para los expertos en la técnica las fracciones de unión etiquetadas preferiblemente comprenden un conjunto multiplexado de fracciones de unión etiquetadas, con cada miembro en el conjunto uniéndose específicamente a una célula o tipo de células objetivo por la disposición.

Las fracciones de unión etiquetadas preferiblemente producen señales ópticas que hacen posible la detección y/o la cuantificación de las células unidas a la disposición mediante la generación de imágenes o mediante el microscopio. Como se ha descrito anteriormente, las fracciones de unión etiquetadas pueden incluir, pero no limitarse a, señales producidas por etiquetas cromogénicas, fluorométricas, luminiscentes, quimioluminiscentes, electroluminiscentes, o fluorométricas de resolución temporal. Como apreciarán los expertos en la técnica, la señal óptica puede ser producida o facilitada por una única etiqueta, tal como un fluoróforo, o puede ser producida para facilitar dos o más fracciones etiquetadas, o puede requerir la adición de reactivos adicionales tales como sustrato que produzcan señales. La señal óptica es preferiblemente representada por un dispositivo de formación de imágenes tal como una cámara CCD, y la señal multiplexada resuelta espacialmente puede ser utilizada para detectar y/o cuantificar la unión de las células a los puntos de disposición antes de la aplicación del campo eléctrico. En una realización preferida, se utiliza la suficiente resolución óptica para detectar la morfología de célula.

En todavía otra realización preferida, las células unidas a los receptores primarios son detectores y/o cuantificadas por el método anteriormente mencionado utilizando fracciones de unión etiquetadas, y la viabilidad de las células unidas se determina después de la liberación del analito intramolecular de acuerdo con la realización anteriormente mencionada de la invención.

En una realización a modo de ejemplo, la disposición está configurada para unir específicamente múltiples tipos de

células, en las que células de género, especie y cepas únicas son unidas a cada punto de la disposición. Inicialmente, las células unidas son identificadas por el ensayo de unión anteriormente mencionado. Los reactivos de ensayo homogéneos que comprenden luciferina y luciferasa son posteriormente puestos en contacto con la disposición, y un campo eléctrico es aplicado para liberar localmente ATP de las células unidas. La viabilidad de las células (por ejemplo, una determinación de si las células están vivas o muertas) se determina correlacionando la señal obtenida a partir del ensayo de ATP homogéneo con la presencia o cantidad de células determinada a partir del ensayo de unión inicial. Esta realización puede estar además adoptada para utilizarse en múltiples disposiciones para la determinación de la resistencia antibiótica, con lo que la viabilidad de los microorganismos expuestos a los antibióticos se puede determinar y se puede obtener una indicación de la susceptibilidad o resistencia de los microorganismos a los antibióticos.

Métodos de Detección

Los ejemplos no limitativos seleccionados son en lo que sigue proporcionados para describir métodos para la detección de microorganismos en una muestra tal como sangre, orina, o un medio de crecimiento en el que una muestra biológica que se sospecha que tiene microorganismos ha sido inoculada e incubada. En un primer método de detección basado de ATP, se siguen preferiblemente las siguientes etapas:

1) Filtrado de la muestra: La muestra es opcionalmente hecha pasar a través de una unidad de filtro para retirar las células eucarióticas, el ATP, y la materia en partículas. La muestra filtrada puede ser bombeada de forma continua a través de una lumbrera de entrada a través de una cámara de reacción.

2) Formación de la capa concentrada: Aplicando un campo eléctrico, las células de microorganismos pueden ser opcionalmente (si se desea elevada sensibilidad) traídas a una capa en las proximidades de la pared de cámara inferior.

3) Retención de células de fase sólida: Las células de microorganismo son capturadas y retenidas en una disposición de ligandos de captura específicos.

4) Lavado: Los residuos retenidos no específicamente son preferiblemente eliminados con una etapa de lavado.

5) Reactivo de retención: La cámara de reacción se llena con una solución que contiene Luciferina y Luciferasa.

6) Lisis de célula: Las células son sometidas a lisis aplicando brevemente un campo eléctrico grande a la disposición.

7) Detección de señal: Los biositios son fotografiados y la señal bioluminiscente es medida.

Estas etapas se pueden entender haciendo referencia a las Figuras 6-9 que describen esquemáticamente las etapas de ensayo básicas que utilizan los métodos de detección basados en ATP. Se ha de entender que en aplicaciones en las que no se requiere elevada sensibilidad algunas etapas se pueden omitir y con ello el método de ensayo se simplifica. Por ejemplo, cuando la concentración de microorganismos en una muestra tal como el medio de crecimiento post-cultivo positivo, es muy elevada, la etapa de concentración puede ser ignorada. Sin embargo, en la siguiente sección, el proceso será descrito con todas las etapas incluidas.

Una muestra típica, representada en la Figura 6 en 60, contiene célula de microorganismos, tales como 62 y 64, células eucarióticas 66 y las moléculas de ATP 68 de fondo. Las células eucarióticas tienen mucho más ATP que las células de microorganismos, así incluso pequeñas cantidades de estas células, si no han sido suficientemente eliminadas de la cámara de reacción durante la etapa de lavado, pueden liberar grandes cantidades de ATP dando lugar a unos resultados de ensayo no fiables. Los dispositivos para retirar estas células se conocen en la técnica anterior (US 7419798) y trabajan filtrando las células eucarióticas con un filtro que permite que las células de microorganismos pase a su través. Típicamente esto se realiza teniendo poros en el filtro de un tamaño nominal particular. Por ejemplo, los filtros de relevancia particular tienen poros suficientemente grandes para permitir el paso de microorganismos pero lo suficientemente pequeños para evitar el paso de células eucarióticas presentes en la muestra de fluido de interés. Los microorganismos son típicamente menores que 1 micra de diámetro: las plaquetas son de aproximadamente 3 micras de diámetro; y las células eucarióticas nucleadas son típicamente de 10-200 micras de diámetro.

Preferiblemente se emplea una unidad de filtrado 70 que comprende un filtro 72. La muestra puede contener encima de ATPasa, y el filtro puede incluir enzimas de ATPasa inmovilizadas 74 que eliminan el ATP de fondo de la muestra para reducir más el fondo del ensayo y aumentar la sensibilidad del ensayo.

La Figura 7 muestra esquemáticamente un aporte de un dispositivo 80 de concentración, lisis y detección similar al mostrado en las Figuras 1, 2 y 5, que comprende un área de concentración 90 y un área de reacción 100. El dispositivo incluye placas planas superior e inferior 82 y 84 separadas por medio de un elemento de separación (no mostrado), que forma y obtura la cámara. Como se ha descrito anteriormente, este tipo de cámara puede ser fabricada de acuerdo con métodos conocidos, tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos 5.240.618 y 6.180.906. Típicamente, el separador entre las placas 82 y 84 está fabricado de MYLAR® o un material

similar que es ligeramente deformable bajo una presión de pinzado aplicada. El separador, de este modo sirve para definir las paredes laterales de la cámara, proporciona una obturación de fluido, y aísla eléctricamente las placas entre sí. Las dimensiones de longitud L, anchura W y altura H, del área de reacción 100 en la cámara son del orden de 2 cm, 2 mm y 100 µm, respectivamente.

5 El fluido es introducido en la cámara a través de la lumbrera de entrada y es conducido a la cámara de desecho a través de la lumbrera de salida (estas lumbreras se amuestran en la Figura 1). Los elementos de la cámara son ilustrados con mayor detalle en las vistas en sección transversal de las figuras 2 y 3. La placa superior 84 preferiblemente está hecha de un material transparente. Una capa delgada y semitransparente de metal u otro material conductor 86 está siendo revestida sobre la superficie interior de la placa superior (espesor exagerado en la Figura). Por lo tanto, el conductor está en contacto físico con los fluidos. El material conductor se muestra como dos secciones distintas 86 y 88 en la figura 7 y 8, pero en una segunda realización no hay separación física entre la secciones y forman una única superficie conductora. La placa inferior 82 puede estar hecha de una placa de metal o un conductor revestido sobre un sustrato dieléctrico 88 en el que el conductor consta de dos secciones distintas 92 y 94 situadas opuestas a las correspondientes secciones conductoras en la placa superior como se ilustra en la Figura 7. En este caso, el conductor de placa inferior está también en contacto físico con el fluido en la cámara y está definido como una configuración de Conductor Superior-Conductor Inferior (TC-BC). En otra realización, designada como configuración Conductor Superior-Dieléctrico Inferior (TC-BD), las secciones de placa inferior 92 y 94 están hechas de material conductor o semiconductor (tal como Al o Si) con el lado interior de la placa oxidado para formar, o estar revestido con, una capa delgada de dieléctrico 96. Bajo algunas circunstancias puede ser deseable para las configuraciones anteriores constar de secciones conductoras continuas únicas sobre la superficie superior e inferior respectivamente abarcando la longitud eléctricamente activa de la cámara.

El voltaje necesario en diferentes etapas del ensayo es aplicado por la fuente de voltaje 98. La fuente está conectada a las superficies eléctricamente conductoras de las placas mediante terminales eléctricos. Como se expondrá en lo que sigue, la lisis de células eléctrica requiere breves campos del orden de 5 kV/cm. Por lo tanto, la fuente de voltaje 98 debería ser capaz de conmutar desde 0 a aproximadamente 100 Voltios en escalas de tiempo de milisegundos.

La etapa de concentración puede ser necesaria en aplicaciones que requieren elevada sensibilidad de ensayo de menos de 10.000 CFU/mL. Esta etapa está incluida para remediar una limitación clave en la sensibilidad de ensayo impuesta por la dependencia de la difusión pasiva de los microorganismos a los ligandos de captura. Las velocidades de difusión de algunos microorganismos son extremadamente pequeñas, de manera que se difunden sólo aproximadamente 1 µm en un segundo. La etapa de concentración de la presente realización se puede entender haciendo referencia a la figura 7. Cuando el fluido fluye a la cámara de reacción, un perfil de velocidad parabólico (flujo de Pouseuille) se establece a través del espesor de la cámara debido a la condición de unión de no desplazamiento en las paredes de la cámara. La aplicación de una diferencia de voltaje a las placas 86 y 92 establece un campo eléctrico transversal, que induce un desplazamiento transversal de las células de microorganismo a través de la cámara hacia la placa 92. A medida que las células se aproximan a la pared, su movimiento total es finalmente detenido. La posición de equilibrio final o disposición de estado estable a través de la dimensión delgada de la cámara se determina por el equilibrio de la fuerza de accionamiento primaria y las fuerzas de oposición, que son producidas por el desplazamiento o los efectos hidrodinámicos. La región 102, en donde reside la mayoría de los microorganismos, se denomina capa de concentración.

Si la capa dieléctrica 96 no está incluida, entonces la operación de DC es preferiblemente empleada y un campo sostenible se puede conseguir con la adición de un par red-ox a la muestra. Un par red-ox bien conocido es quinona/hidroquinona. Preferiblemente, la capa dieléctrica 98 es proporcionada sobre las capas conductoras 92 y 94, y la concentración se consigue conmutando rápidamente el voltaje en una escala de tiempo de milisegundos para conseguir el desplazamiento neto de las células con relación a los iones de fondo, como se ha descrito en las secciones anteriores.

Las células de microorganismos transportadas a las proximidades de la disposición de receptores inmovilizados 104 dentro del área de reacción 100 pueden colisionar con un ligando de captura específico 106 y ser específicamente retenidas. Los puntos de disposición pueden tener geometrías arbitrarias, pero en una realización preferida tienen forma rectangular con dimensiones de aproximadamente 0,5 mm x 2 mm, con la dimensión más larga alineada perpendicular a la dirección de flujo axial de la cámara. Los ligandos de captura son preferiblemente anticuerpos que reconocen los antígenos de la superficie de la célula.

Como será conocido por los expertos en la técnica, el método mediante el cual los anticuerpos son inmovilizados depende de las propiedades superficiales del material. En una realización preferida, la placa 82 es Al con una capa delgada de Al₂O₃ formando la capa dieléctrica 96. La superficie de óxido de aluminio puede ser modificada para crear grupos hidroxilo después del revestimiento con una capa de silano heterobifuncional, creando grupos funcionales para interactuar de manera covalente con los ligandos de captura. La unión no específica de microorganismos y otros materiales no deseados a la superficie es evitada tratando la superficie con un amortiguador de bloqueo adecuado.

Para mejorar más la sensibilidad del ensayo, la superficie de la placa 82 puede ser revestida con una capa de

hidrogel funcionalizada de polímero a modo de haz tridimensional. Los ligandos de captura son inmovilizados en la capa de hidrogel por interacción covalente con grupos funcionales sobre los haces del polímero. El polímero hidrofílico inhibe la unión de microorganismos no específica a la superficie con lo que reduce la señal de fondo. Los haces de polímero proporcionan una área mucho mayor de sustrato para la inmovilización del ligando de captura, dando lugar a la multiplicidad de sitios de unión para las células de microorganismos objetivo y en aumento de la detección de señal. En este método, el requisito para el tratamiento de la superficie con un amortiguador de bloqueo es limitado debido a la inherente inhibición de la unión no específica sobre la capa de hidrogel.

La especificidad de los receptores (por ejemplo, anticuerpos) empleados para formar la disposición de puntos pueden ser confeccionada a medida dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, puede ser deseable tener ligandos de captura específicos para diferentes cepas de *E. coli* que no reaccionen cruzadamente entre sí. En otro ejemplo no limitativo, puede ser deseable tener un ligando de captura que se una a muchas o a todas las cepas de *E. coli*, y otros que se unan a muchas o a todas las especies o cepas del género *Streptococcus*.

El proceso de lavado, que se muestra en la Figura 8, es realizado para eliminar las células de microorganismo unidas no específicamente. Estas incluyen células 110 que se habían retenido fuera del correspondiente (específico) punto de disposición. El enjuague de la cámara de reacción con un amortiguador de lavado puede no ser muy efectivo cuando la velocidad en las proximidades de la disposición es cercana a cero bajo condiciones de flujo laminar. Para un lavado más efectivo, se pueden utilizar fuerzas electroforéticas para proporcionar fuerza de discriminación entre células unidas específicamente y no específicamente. Para este fin, un voltaje polarizado ligeramente inverso es aplicado a los electrodos dentro del área de reacción 100 antes y/o durante el lavado.

La Figura 9 presenta esquemáticamente las dos etapas cuando es empleado el esquema de detección basado en ATP. Antes de la lisis de las células, la cámara es llenada con una solución que contiene Luciferina 120 y Luciferasa 122. Después es aplicado un pulso de voltaje elevado con una corta duración en el nivel de milisegundo sobre los electrodos 88 y 94. Esto coloca las células unidas en un campo elevado del orden de pocos kV/cm, que abre los poros, de manera que la célula y permite que el contenido celular, entre el que se encuentran los nucleótidos tal como el ATP, sea liberado. En la Figura 9 las células lisadas están indicadas con 124 y 126 y el ATP liberado con 128.

Teóricamente es posible medir una amplia gama de nucleótidos que son liberados por la lisis de la célula con la sensibilidad proporcionada por el uso de uno o más de muchos sistemas de ensayo basados en enzimas que están disponibles en la técnica. Sin embargo, en este método preferido, el ATP es fácilmente medido por el ensayo con una variedad de combinaciones de sustrato enzima/enzima. Para la rápida y eficiente determinación de los niveles de ATP liberados es especialmente preferido utilizar reacciones de enzimas que den lugar a la producción de luminiscencia, más convenientemente usando luciferasa (US4200493). El ATP liberado es cuantificable con reactivos comercialmente disponibles utilizando bioluminiscencia en donde es utilizado para accionar la oxidación de luciferina baja catálisis por luciferasa dando lugar a la emisión de luz. La eficiencia de la cuantía de esta relación es extremadamente elevada y la presencia y cantidad de luz detectada por el sistema óptico 130 (Figura 9) da una medida del ATP liberado y de este modo de la presencia y número de organismos objetivo.

Una de las principales ventajas del presente método es que debido a la rápida lisis eléctrica de célula y a la inmediata aparición de la reacción enzimática, la señal de detección y en consecuencia la identificación y cuantificación, se realiza antes de que el ATP liberado se pueda difundir a los puntos de disposición adyacentes. Esto hace posible el ensayo multiplexado de muchas células en una única cámara de reacción. La distancia característica, l , que una partícula con coeficiente de difusión D se difundirá en el tiempo, t , es

$$l = \sqrt{Dt}$$

El coeficiente de difusión de pequeñas moléculas tales como ATP está en el rango de $5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Por lo tanto, el tiempo característico para difundir $500 \mu\text{m}$, que es la separación típica de las regiones de inmovilización, se tiene que es de 500 s. Esta detección simultánea de múltiples células es posible en tal disposición de regiones de inmovilización es posible dado que el tiempo característico es mucho mayor que los tiempos de lisis y detección combinados.

Como es conocido en la técnica, la designación de sondas de ácido nucleico es generalmente más fácil que la preparación de anticuerpos específicos. Por consiguiente, como se ha descrito anteriormente, en un segundo ejemplo, los anticuerpos son utilizados para capturar los microorganismos y el material de ácido nucleico intracelular de las células se puede utilizar como objetivo para la identificación a través de la hibridación con sondas de ácido nucleico específicas. La especificidad de los anticuerpos puede ser relajada de acuerdo con el rango de los microorganismo objetivo que son buscados. En este segundo método de detección que implica la detección de ácidos nucleicos intracelulares, se siguen preferiblemente las siguientes etapas:

1) Filtrado de la muestra: La muestra opcionalmente es hecha fluir a través de una unidad de filtro para retirar las células eucarióticas y otra materia en partículas.

2) La muestra filtrada es bombeada de forma continua a través de una puerta de entrada a través de una cámara de

reacción.

3) Lavado: los residuos retenidos no específicamente son preferiblemente retirados con una etapa de lavado.

4) Formación de la capa concentrada: Aplicando un campo eléctrico, las células de microorganismos pueden ser opcionalmente (si se desea una elevada sensibilidad) traídas a una capa en las proximidades de la pared de cámara inferior.

5) Retención de células de fase sólida: Los microorganismos son capturados y retenidos en un material adherente (preferiblemente una configuración de ligandos de captura específicos)

6) La cámara de reacción se llena con una solución que contiene sondas detectoras de ácido nucleico etiquetadas.

7) Lisis de célula: Se realiza la lisis en las células aplicando brevemente un campo eléctrico grande a las regiones de inmovilización.

8) Incubación: Se permite que el rARN liberado sea hibridado tanto con ácido nucleico inmovilizado como con sondas detectoras de ácido nucleico etiquetadas.

9) Lavado: Las sondas detectoras de ácido nucleico etiquetadas no unidas excedentes son retiradas.

10) Generación y detección de señal: Las señales procedentes de las sondas etiquetadas son medidas (preferiblemente la disposición genera una imagen y es medida la señal óptica).

Un importante aspecto de este ejemplo de detección es que hace posible la identificación rápida y sensible de microorganismos para los cuales un anticuerpo específico no está disponible o no se pueden llevar a la práctica por cualquier motivo. En este caso, el contenido de ácido nucleico del microorganismo, preferiblemente rARN, puede ser detectado como un identificador dado que las sondas de diseño específicas para rARN están relativamente disponibles. El método basado en la hibridación del ácido nucleico está destinado a esta aplicación. En este caso, menos anticuerpos específicos, incluso superficies adherentes de célula aun no específica se pueden utilizar en las regiones de inmovilización para capturar todas las especies y cepas objetivo.

Un ejemplo es el caso cuando el objetivo es detectar una cepa dada de un microorganismo y un anticuerpo específico está solo disponible con la especificidad adecuada hasta el nivel de especies. Un remedio ofrecido por el presente método es el siguiente. Una sonda de captura de ácido nucleótido específica para el rARN específico de cepa es preparada e inmovilizada junto con el anticuerpo disponible en, dentro, o adyacente al mismo punto de disposición. Después, el ensayo continúa a través de las secuencias representadas en las Figuras 7-8 y 10-11.

Después de que las células de microorganismos son capturadas por la disposición y opcionalmente lavadas, la cámara de reacción es llenada con un amortiguador que es seleccionado para soportar la lisis de las células adheridas, y opcionalmente para soportar más la hibridación de los ácidos nucleicos liberados para las sondas en la disposición con un rigor apropiado. El amortiguador puede comprender además sondas detectoras etiquetadas para la posterior detección de ácido nucleicos hibridados unidos a la disposición. Las etiquetas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, indicadores de enzima.

Preferiblemente, como se ha descrito anteriormente, el amortiguador es seleccionado para proporcionar lisis eficiente de las células adheridas, y los ácidos nucleicos liberados son posteriormente retirados a la superficie y retenidos en la superficie mediante la aplicación de voltaje a los electrodos 88 y 94. Preferiblemente el voltaje se aplica como se ha descrito anteriormente para concentrar unas especies cargadas en el lado del ánodo de la célula, por ejemplo, bajo el funcionamiento a pulsos. Esto permite que el amortiguador de la lisis sea retirado y sustituido con un amortiguador de hibridación mientras se retienen los ácidos nucleicos liberados en la íntima proximidad de las sondas inmovilizadas. Después de proporcionar el amortiguador de hibridación, el campo puede ser liberado, permitiendo que la hibridación se produzca. Preferiblemente, el amortiguador de hibridación comprende además sondas detectoras etiquetadas. Alternativamente, una etapa adicional puede estar provista en la que el amortiguador de hibridación es retirado y una solución de sonda detectora es hecha fluir a la cámara para facilitar la detección de los ácidos nucleicos intracelulares unidos.

Un pulso de alto voltaje con una corta duración en el nivel del submilisegundo se aplica a los electrodos. Esto coloca las células unidas en un campo elevado del orden de unos pocos kV/cm para abrir la membrana de célula y permitir que el contenido celular, incluyendo ácido nucleico tal como rARN sea liberado.

La Figura 10 ilustra la unión del rARN de liberación 140 a las sondas inmovilizadas 142 que residen dentro de los puntos de disposición. También mostrados son las sondas detectoras 144 en solución, que se unen al rARA liberado para facilitar la detección en forma de ensayo de sándwich molecular.

El coeficiente de difusión de las moléculas de rARN está en el rango de 10^{-8} cm²/s (Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 2488-2503). Por lo tanto, la distancia de difusión característica en 1 s es de aproximadamente 10 µm. Esto indica que para un periodo de tiempo apreciable después de la lisis de las células, la concentración del rARN liberado 140 en las proximidades de las ondas de captura nucleicas inmovilizadas 142, será muy elevada. Esta

concentración objetivo elevada minimiza el tiempo necesario para la hibridación de la sonda de captura objetivo. De este modo, una apreciable fracción del rARN liberado puede ser hibridada a las sondas de ácido nucleídeo 142. Este rARN unido también será hibridado a las sondas detectoras de ácido nucleico etiquetadas, lo que comprende un ensayo de sándwich como se ha descrito anteriormente. Las sondas detectoras unidas no específicamente o no unidas son retiradas mediante una etapa de lavado, descrita también anteriormente en las etapas mencionadas de método del ejemplo.

El detalle de detectar las ondas detectoras de ácido nucleicos etiquetadas unidas se determina por el tipo de etiqueta. Una realización no limitativa se muestra en la Figura 11, en donde la etiqueta es una reacción catalizada por una enzima que genera una señal quimioluminiscente. La reacción se inicia llenando la cámara de reacción con un sustrato apropiado 146. La señal 148 es grabada por el sistema óptico 150.

Aplicaciones Adicionales de Electroporación

Una aplicación de electroporación reversible es liberar las pequeñas moléculas, tales como ATP, a la vez que se mantiene la viabilidad de la célula con la finalidad de inmovilizar la actividad de la célula. En este caso, un potencial de transmembrana del orden de 0,2-1,0 V es generado aplicando una fuerte diferencia de voltaje a los electrodos. El campo eléctrico resultante genera poros en la membrana de las células. Estos poros hidrofílicos hacen posible que las moléculas grandes y cargadas, que son normalmente incapaces de cruzar la membrana, se fuguen por difusión.

La aplicación de la electroporación reversible no está limitada a la liberación de contenido celulares, y otras aplicaciones son consideradas dentro del campo de las realizaciones de la presente invención. La electroporación puede ser aplicada para cualquier tipo de célula incluyendo células de plantas y células cultivadas para el envío de moléculas tales como ADN, ARN, proteínas, fármacos y tintes a las células, específicamente por los ligandos capturados, utilizado un tinte que sea impermeabilizante para las células vivas que pueden acceder al interior de las células solo después de la electroporación transitoria. Otro planteamiento para detectar objetivos intracelulares, es la introducción de sondas de baliza molecular fluorescentes para la detección de ARN de células vivas como se ha descrito por Bao et al. (Annu Rev Biomed Eng. 2009; 11:25-47).

Otras aplicaciones de electroporación reversible incluyen envío de genes de genes recombinantes o genes silenciadores tal como interferencia de ARN (ARNi) a una célula objetivo específica para la manipulación de la expresión de gen específico, y la introducción de vacuna de ADN en una célula objetivo específica para la presentación de antígeno objetivo en la investigación de inmunología. Un ejemplo de aplicación para el envío de moléculas pequeñas pueden ser los estudios preclínicos de electro-quimioterapia en un tipo específico de células en la investigación del cáncer.

Otra realización de la presente invención ofrece más control sobre la velocidad de transporte molecular a través de la membrana debido a la distribución estrecha de distancias célula-electrodo. Las células adheridas son unidas a los ligandos de captura de este modo son separadas de la superficie de electrodo por una distancia media igual a la longitud del ligando. Después de la aplicación del voltaje a los electrodos, todas las células son sometidas a un campo eléctrico dependiente del tiempo similar y desarrollarán distribución similar de poros en sus superficies. Esta uniformidad del campo eléctrico puede ser controlada adicionalmente aplicando un voltaje a pulsos con una escala de tiempo suficientemente corta para mantener un campo sustancialmente uniforme local a la célula. Además, la longitud de los separadores 55 puede ser utilizada de manera ventajosa como un parámetro de multiplexación. La velocidad de electroporación es similar a las células hibridadas en dos regiones de inmovilización que difieren en que las longitudes separadoras son diferentes. Esto proporciona una herramienta para estudiar simultáneamente el efecto de una molécula en el comportamiento de la célula como una función de la dosis.

En otra realización, la electroporación se puede hacer para que ocurra en un área o ubicación específica de unas especies celulares. La célula es primero unida, como se ha descrito en realizaciones anteriores, y la unión se realiza utilizando un receptor celular que es encontrado o concentrados en una región específica de la superficie celular. Esto proporciona una orientación de la célula con relación a la pared del canal. El campo eléctrico es después aplicado a un bajo voltaje (por debajo de un umbral para la electroporación o lisis) durante una escala de tiempo suficiente para producir el tamizado iónico dentro del líquido del canal, que produce un perfil de campo no homogéneo que se deteriora rápidamente y específicamente no homogéneo en la pared del canal. La posterior aplicación de uno o más pulsos de electroporación o electrolisis produce la electroporación preferencial o la ruptura de la célula en el lado de la célula más cercano a la pared del canal debido a la resistencia de campo eléctrico aumentada en esta región.

Ensayo de Susceptibilidad Antibiótica

Las realizaciones de la presente invención también se pueden adaptar para afrontar una desventaja principal de los métodos bacteriológicos clínicos actuales, a saber la necesidad de aislar las bacterias o el medio de agar sólido cuando se procesa un espécimen clínico. Incluso la bacteria de crecimiento rápido tal como E. coli requiere al menos 8 horas para formar colonias macroscópicas en placas de agar. Aunque muchos aspectos del volumen de trabajo de laboratorio clínico han sido automatizados incorporando métodos moleculares, la bacteriología clínica permanece siendo una labor altanamente intensiva. La mayoría de los laboratorios actualmente automatizan los ensayos de

identificación y de susceptibilidad utilizando o bien los instrumentos Vitek (Biomerieux) o bien instrumentos Phoenix (Becton, Dickenson). Sin embargo, estos sistemas dependen de la selección de colonias apropiadas por el personal experto de crecimiento repentino en placas de agar. Varios planteamientos de amplificación de ADN para bacteriología clínica han sido comercializados; sin embargo estos esfuerzos ha conseguido penetración en el mercado limitada debido a los elevados costes, la necesidad de purificación de objetivo (debido a la sensibilidad de la tecnología de amplificación de ADN a los inhibidores de polímero), el fracaso en la automatización de los métodos, y lo más importante, la necesidad de realizar lisis a las células que en efecto detiene su crecimiento y proporciona solo datos descritos referentes al crecimiento con lo que la superposición complica la estimación de la susceptibilidad antibiótica.

Esta realización de la presente invención permite la detección del crecimiento de células en presencia de un medio de cultivo inoculado con los antibióticos apropiados detectando el cambio en la señal de fluorescencia procedente de las bacterias durante un periodo de tiempo. Esto se consigue inyectando el espécimen (pre o post cultivo) a través del canal de la Figura 1, con lo que las células se concentran más utilizando un campo eléctrico aplicado como ya se ha descrito. La concentración de células en la superficie de la zona de reacción puede ser monitorizada midiendo la intensidad de señal de fluorescencia (o bien debida a la autofluorescencia, o bien a la fluorescencia procedente de un receptor etiquetado unido al analito). En este punto, el flujo de muestra es interrumpido y el canal es lavado. Después de que se haya conseguido la concentración de células de una cantidad deseada en la zona de reacción, el medio de cultivo previamente inoculado con los antibióticos apropiados, como se ha determinado por la etapa de identificación de especies, es insertado en el canal en donde entra en contacto con las células previamente retenidas. Una medida de fluorescencia inicial se obtiene para establecer la línea de base para el "no crecimiento". La medida de la posterior señal de fluorescencia revela el crecimiento y la velocidad de crecimiento a partir de la cual se pueden deducir los datos de susceptibilidad, como se ilustra en la Figura 9.

El cambio en la señal de fluorescencia puede revelar el crecimiento que ayuda a determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC). Si se utiliza la autofluorescencia, entonces, la MIC puede ser determinada midiendo la dosis de antibiótico a la que el crecimiento de la señal de fluorescencia es reducido más allá de un cierto nivel. Esto se puede realizar mediante dos métodos: 1) aumentando la dosis de antibiótico durante el crecimiento en uno o dos ciclos de multiplicación, o 2) teniendo múltiples canales que han sido previamente inoculados con diferentes dosis.

Sin embargo, ello no permitirá la determinación de la concentración bactericida mínima (MBC) para antibióticos que realmente maten las células bacterianas. Eso se puede realizar manchando las bacterias con unos tintes fluorescentes apropiados (es decir, manchas vitales y mortales) de manera que la señal procedente de las células muestras o vidas se pueda distinguir. Estas manchas difieren en su capacidad para penetrar en células bacterianas sanas. Utilizando este tipo de manchas, y cuando la señal de fluorescencia es monitorizada con filtro apropiado, es posible determinar la MIC, MBC, o la ausencia de crecimiento.

Dado que algunos medios de crecimiento son altamente fluorescentes, puede ser deseable utilizar manchas fluorescentes para el rechazo de modo común. En otras palabras, utilizando una mancha que emite fluorescencia en una cierta parte del espectro en presencia de bacterias muertas y una mancha diferente para bacterias vivas que está espectralmente separada, es posible anular los efectos de la fluorescencia de fondo que es omnipresente en el medio de cultivo. Adicionalmente, y debido al hecho de que ciertas manchas pueden inhibir el crecimiento bacteriano, una mancha para bacterias muertas y señal de dispersión procedente de la región de crecimiento se puede utilizar para realizar el mismo rechazo de modo común.

Dispositivo de Flujo Lateral con Electro Lisis para la Detección Rápida

En una realización adicional, el dispositivo de ensayo esta dispuesto para determinar la presencia o ausencia de analito celular en una muestra de fluido. El dispositivo de ensayo incluye un soporte y una matriz que define una trayectoria de flujo axial. Típicamente, la matriz incluye además una zona de recepción de muestra y un área de observación que contiene una zona de captura. En una realización relacionada, la matriz incluye además una zona absorbente dispuesta aguas abajo del área de observación. Los electrodos están dispuestos en contacto con la zona de captura para la electroporación o la electro-lisis de analitos celulares unidos al mismo. Tal electroporación o electro-lisis hacen posible la detección directa de analito celular ensayando fracciones endógenas tales como ATP o enzimas que producen ATP. Esta realización proporciona de manera ventajosa un dispositivo de flujo lateral celular libre de etiquetas que supera muchas limitaciones y problemas con los dispositivos y métodos de la técnica anterior. En particular, se proporciona el dispositivo de ensayo de flujo lateral y el método para la detección de analito celular con velocidad y sensibilidad mejoradas.

En una realización preferida, la zona de recepción de muestra acepta una muestra de fluido que puede contener analito celular. Además, un área de observación está dispuesta aguas abajo de la zona de adición de muestra y contiene un reactivo de captura inmovilizado que se une selectivamente con un antígeno celular. De este modo, cuando la muestra de fluido fluye a través de la matriz, el analito celular se unirá con el reactivo de captura inmóvil en la zona de captura del área de observación.

En una realización particularmente preferida, el analito celular de interés procede del grupo que incluye pero no se limita a, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*,

CoNS, Strep. Pneumoniae, Staphylococci de Coagulasa Negativa (S.epidermidis, S.haemolyticus), Enterobacter (cloacae/aerog.), Klebsiella (pneumoniae/oxytoca), Serratiamarcescens, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Stenotrofomonas maltophilia, Gandida albicans, Gandida tropicalis, Gandida parapsilosis, Gandida glabrata, Gandida krusei, y Aspergillus fumigatus.

5 En otra realización preferida, el dispositivo de ensayo puede detectar la presencia o la ausencia de más de un único antígeno celular. Por ejemplo, el reactivo de captura puede unirse selectivamente a todos los miembros de la familia Candida. En otro ejemplo, el reactivo de captura puede unirse selectivamente a todos los miembros de la familia Enterococcus. Esto se puede conseguir mediante un número de medios o métodos conocidos en la técnica, tal como anticuerpos que surgen contra especies de nivel de género más amplias, o mezclando múltiples anticuerpos que son
10 cada uno selectivo para uno o más analitos celulares.

En otra realización preferida, la muestra de fluido fluye a lo largo de una trayectoria de flujo que discurre desde la zona de recepción de muestra (aguas arriba) al área de observación (aguas abajo). Opcionalmente el fluido puede a partir de entonces fluir a la zona absorbente.

15 En una realización preferida, la zona de recepción de muestra está hecha de una almohadilla de aplicación absorbente que permite que flujo de células de interés. Materiales adecuados para la fabricación de almohadillas de aplicación absorbentes incluyen, pero no se limita a, materiales o almohadillas de polietileno hidrofílico, papel de filtro de fibra de vidrio, papel desecado, pulpa de papel, tejido, y similar. En una realización referida, la zona de recepción de muestra está construida a partir de cualquier material que absorbe agua.

20 En una realización preferida, la almohadilla de aplicación absorbente está hecha de cualquier material cuya muestra de fluido pueda pasar conteniendo analito celular. Además, la almohadilla de aplicación absorbente puede estar construida para actuar como un filtro para componentes celulares que no son de interés, hormonas, partículas, y otras sustancias que pueden estar presentes en la muestra de fluido. Los materiales de almohadilla de aplicación adecuados para el uso en realizaciones de la invención incluyen también aquellos materiales de almohadilla de aplicación descritos en la Patente de Estados Unidos N1 5.075.078. En todavía otra realización preferida, la
25 almohadilla de aplicación absorbente puede incorporar otros agentes tales como miembros de unión específicos auxiliares, reactivos de pretratamiento de muestra de fluidos, y reactivos de producción de señal.

30 En otra realización preferida, el dispositivo de ensayo está configurado para realizar un proceso de análisis inmunológico. En todavía otra realización, el transporte líquido a lo largo de la matriz está basado en la acción capilar, con lo que la trayectoria de transporte de líquido puede estar formada no solo por una o más capas de material absorbente, por ejemplo papel o lana, sino también por una separación que es succionada totalmente por la acción capilar.

35 En una realización preferida, la matriz es capaz de flujo lateral no absorbente. "Flujo lateral no absorbente" significa un flujo líquido en el que todos los componentes disueltos o dispersos del líquido son transportados a velocidades sustancialmente iguales y con flujo relativamente no afectado lateralmente a través de la membrana, opuesto a la retención preferencial de uno o más componentes como ocurriría por ejemplo en materiales capaces de absorber o embeber uno o más componentes.

40 En una realización preferida adicional, la matriz está hecha de un material no absorbente típico, tal como un material laminar de polietileno de alta densidad fabricado por Porex Technologies Corp. de Faiburn, Ga., USA. El material laminar tiene una estructura de poros abierta con una densidad típica, al 40% de volumen de huecos, de 0,57 gm/cc y un diámetro de poro medio de 1 a 250 micras, siendo la media generalmente entre 3 y 100 micras. El diámetro de poro óptimo para la membrana es de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µm. Las membranas típicamente están comprendidas entre aproximadamente 1 mil a aproximadamente 15 mils de espesor, típicamente en el rango comprendido entre 5 o 10 mils, pero pueden ser de hasta 200 mils y más gruesas. En una realización preferida, la matriz tiene una distribución de tamaño de poro que minimiza el atrapamiento no específico de analito celular.

45 En todavía otra realización preferida, la matriz está hecha de un material tal como papel no tratado, mezclas de celulosa, nitrocelulosa, poliéster, y copolímero de acrilonitrilo, y similares. La matriz puede estar construida para proporcionar o bien flujo absorbente o bien no absorbente. En una realización especialmente preferida, la matriz está hecha de un tejido no tricotado tal como Rayon o fibra de vidrio. Otros materiales adecuados incluyen aquellos materiales cromatográficos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.075.078. En una realización preferida,
50 todo o parte del material de matriz puede ser tratado con una solución que incluye agentes de bloqueo y/o de estabilización. Los agentes de bloqueo incluyen albumina de suero bovino (BSA), metilado BSA, caseína, leche seca sin grasa.

55 En dispositivos de la técnica anterior que requieren una zona de etiqueta, el empleo de agentes de bloqueo y estabilización seleccionados junto con fracciones coloreadas en la zona de etiquetado seguido por la inmovilización de los agentes de bloqueo y de estabilización en el soporte (por ejemplo, proceso de secado por congelación, o un proceso de secado con aire caliente forzado) es de suma importancia para conseguir el rendimiento adecuado del dispositivo. Es bien conocido que las fracciones visibles, especialmente las partículas, se agregan en el secado con aire y no se rehidratan fácilmente en contacto con una muestra de líquido. Por lo tanto, la conversión ausente a la

superficie no absorbente, en lugar de ser transportada a la zona de captura con la muestra, las fracciones visibles permanecen atrapadas en la zona de etiquetado. Por el contrario, las realizaciones de la presente invención, que no requieren tales fracciones de etiquetado ni tales medios de bloqueo y/o estabilización, proporcionan una mejora sustancial en el coste, la producción de fabricación, estabilidad a largo plazo y rendimiento.

- 5 El área de observación puede estar hecha de cualesquiera materiales enumerados anteriormente, o puede estar hecha de un material que sea opaco cuando esté en estado seco, y transparente cuando esté en estado humedecido, ejemplos de los cuales incluyen nitrocelulosa, nilón, difluoruro de polivinilideno hidrofílico (PVDF). El difluoruro de polivinilideno hidrofílico (PVDF) está comercialmente disponible de la firma Millipore, Bedford, USA, bajo la marca comercial Immobilon AV. Sin embargo, en base a la presente descripción, el experto puede también
- 10 seleccionar otros materiales y especialmente membranas de material sintético que cumplan las condiciones anteriormente mencionadas. Se cree que el índice de refracción del material sintético es de mayor influencia en estas características. Se asume que los materiales porosos, cuyo índice de refracción es próximo al del líquido de muestra, tienen la propiedad que los hace transparentes en un estado húmedo. En otra realización, el área de observación está hecha de nilón.
- 15 En una realización preferida, la zona de captura puede estar construida a partir de cualesquiera materiales enumerados anteriormente. En una realización preferida, la zona de captura está hecha del mismo material que la zona de observación. Las realizaciones de la presente invención comprenden un dispositivo de ensayo con una o más zonas de captura.

- 20 Realizaciones adicionales incluyen zonas de captura que incluyen materiales microporosos fabricados de nitrocelulosa, cuya denominación significa cualquier éster de ácido nítrico de celulosa. De este modo los materiales adecuados pueden incluir nitrocelulosa en combinación con ésteres de ácidos carboxílicos de celulosa. El tamaño de poro de las membranas de nitrocelulosa puede variar ampliamente, pero está preferiblemente dentro de 5 a 20 micras, preferiblemente 8 a 15 micras. De nuevo es óptimo proporcionar un material con una distribución de tamaño de poro que minimice el atrapamiento no específico del analito celular. Para proporcionar flujo no absorbente, estos
- 25 materiales pueden estar tratados con agentes de bloqueo que pueden bloquear las fuerzas que explican la naturaleza absorbente de las membranas absorbentes. Agentes de bloqueo adecuados incluyen albumina de suero bovino, albúmina de suero bobino metilada, suero de animal completo, caseína, y leche seca sin grasa.

- 30 En una realización preferida, el área de observación incluye además una línea de control de procedimiento, para verificar que el flujo de muestra es como el esperado. La línea de control es una región espacialmente distinta que contiene un miembro de unión inmovilizado que reacciona con un reactivo etiquetado. En una realización preferida, el reactivo etiquetado es proporcionado en una zona de etiqueta de control adicional que forma una parte de la matriz y está situada entre, y en contacto de fluido con la zona de adición de muestra y la zona de captura. Preferiblemente, el reactivo de control es secado por congelación en la zona de etiqueta de control. Más preferiblemente los reactivos de bloqueo y estabilización anteriormente mencionados pueden además ser añadidos
- 35 a la zona de etiqueta de control o a la zona de recepción de muestra. En otra realización la línea de control de procedimiento contiene una muestra auténtica del analito celular de interés, o un fragmento de la misma. En otra realización preferida, la línea de control contiene anticuerpo que es específico para, o proporciona de otro modo la inmovilización del, reactivo etiquetado. Durante el funcionamiento, el reactivo etiquetado se une a la línea de control, incluso cuando el analito de interés está ausente de muestra de ensayo.

- 40 En una realización relacionada, un conjugado de control es introducido en la muestra de flujo aguas arriba de la línea de control. Por ejemplo, el conjugado de control puede estar unido a la muestra de fluido antes de que la muestra se aplique al dispositivo de ensayo. Alternativamente, el conjugado de control se puede unir difusivamente en la zona de recepción de muestra, o en la zona de etiqueta de control.

- 45 En una realización preferida, el conjugado de control incluye una etiqueta de control y un reactivo de control. Típicamente, un reactivo de control es elegido para ser diferente del reactivo que es reconocido por el reactivo de captura. Además, el reactivo de control es generalmente no específico para el analito. En una realización preferida, el reactivo de control se une a un compañero de captura que está inmovilizado en la línea de control de procedimiento. De este modo, el conjugado de control es directamente detectado en la línea de control.

- 50 La etiqueta de control puede incluir estreptavidina, y el compañero de captura de control puede incluir biotina, que se acopla con la avidina específicamente. En una realización particularmente preferida, la etiqueta de control incluye biotina, y el compañero de captura de control incluye estreptavidina. El artesano apreciará que también se pueden utilizar otros pares de unión "irrelevantes" tales como reacciones de antígeno/anticuerpo no relacionadas con el analito.

- 55 El uso de una línea de control es útil ya que la apariencia de la señal en la línea de control indica el tiempo en el que el ensayo resultante puede ser leído, incluso para un resultado negativo. De este modo, cuando la señal esperada aparece en la línea de control, se puede observar la presencia o ausencia de una señal en la zona de captura.

En otra realización preferida, la matriz puede incorporar además una zona absorbente. La zona absorbente puede actuar para incrementar la cantidad de muestra de fluido que viaja a través de la zona de captura.

En esta realización, la zona absorbente está situada aguas abajo de la zona de captura y puede ser unos medios para eliminar el exceso de muestra y la etiqueta libre distinta del analito de interés ser la matriz del dispositivo. Generalmente, la zona absorbente constará de un material absorbente tal como un papel de filtro, un filtro de fibra de vidrio, o similares.

- 5 El dispositivo también puede contener un extremo de indicador de zona de control. El indicador de zona de control puede constar de un reactivo de indicación de pH (tal como verde de bromocresol) impregnado en la zona absorbente o en una ubicación aguas abajo de la zona de captura. Después del contacto con la muestra, se produce el cambio de pH en la matriz procesada. Este desplazamiento de pH vuelve al indicador de pH de un color diferente (por ejemplo, el verde de bromocresol puede pasar de amarillo a azul) lo que se ve en la ventana de observación
10 sobre la zona de control. Esta tecnología sirve también como un control de ensayo interno.

El extremo de la zona de control de ensayo puede estar construido aplicando una línea de tinta soluble sobre la zona de captura (en el interfaz con la zona absorbente). El frente de líquido que se mueve a través de la zona de captura solubilizará la tinta y la transferirá al absorbente. El cambio de color resultante se verá en una ventana de observación por encima de la zona absorbente, significando el final de ensayo.

- 15 En una realización preferida, el reactivo de captura se une con el analito celular. El reactivo de captura puede ser elegido para unirse directamente al analito celular o unirse indirectamente al analito uniéndose con un miembro de unión específico auxiliar que está unido al analito celular. Además, el reactivo de captura puede ser inmovilizado en la fase sólida antes o durante la realización del ensayo por medio de cualquier método de unión adecuado. Típicamente, el sitio de captura es una parte delimitada o definida de la fase sólida tal como la reacción de unión
20 específica del reactivo de captura y el analito esta localizaba o concentrado en una zona limitada, con lo que se facilita la detección de la señal local al sitio de captura al contrario que otras partes de la fase sólida. En una realización relacionada, el reactivo de captura puede ser aplicado a la fase solida mediante inmersión, inscripción con una pluma, dispersión a través de un tubo capilar, o a través del uso de una impresión de chorro de reactivo u otras técnicas. Además, la zona de captura puede estar marcada, por ejemplo con un tinte, de manera que la posición de la zona de captura sobre la fase sólida se puede determinar visualmente o instrumentalmente incluso
25 cuando no haya etiqueta inmovilizada en el sitio.

- En otra realización, el área de observación incluye un área de control negativo. La finalidad de este área de control es alertar al usuario de que el dispositivo de ensayo no está trabajando apropiadamente. En una realización preferida, el control negativo es esa parte del área de observación fuera de la zona de captura, y no incluye ninguna parte del área de observación situada directamente o cerca de la zona de captura. Cuando se trabaja
30 apropiadamente no debería ser visible ninguna señal ni marca en el área de control negativa.

- El dispositivo de ensayo preferiblemente incluye electrodos para la aplicación de un voltaje a través de la matriz de la zona de captura después de que la muestra haya sido añadida al dispositivo de ensayo y el analito celular se haya unido en la zona de captura. Los electrodos incluyen un electrodo inferior dispuesto debajo de la matriz y un electrodo superior dispuesto encima de la matriz. La aplicación de un voltaje entre los electrodos da lugar a la creación de un campo eléctrico interno dentro de la matriz de la zona de captura. Si el voltaje es seleccionado para producir un campo eléctrico interno que excede el umbral para al electroporación del analito celular unido a la zona de captura, se producirá la electroporación del analito celular unido. De manera similar, si el voltaje es seleccionado para producir un campo eléctrico interno que exceda el umbral de la electro-lisis del analito celular unido en la zona de captura, se producirá la electro-lisis del analito celular unido.
40

En una realización preferida, el dispositivo de ensayo incluye una carcasa o alojamiento hueco que tiene una abertura de aplicación y una lumbrera de observación. En esta realización, la matriz de flujo está contenida dentro de la carcasa hueca, y la muestra de fluido es añadida a la matriz a través de la abertura, que es una abertura situada en una ubicación aguas arriba del alojamiento.

- 45 Típicamente, la abertura está situada por encima de la almohadilla de aplicación de la muestra. En una realización preferida, una abertura puede estar dispuesta en cualquier ubicación por encima de la matriz que proporcionaría la fácil adición de muestra de fluido o reactivo a la matriz.

- Los materiales de electrodo adecuados incluyen metales tales como cobre, plata u oro, y otros materiales conductores. Los electrodos superior e inferior están eléctricamente conectados a las almohadillas de contacto u otros puntos de contacto adecuados sobre el dispositivo de ensayo. Ubicaciones a modo de ejemplo para almohadillas de contacto están sobre la superficie exterior de la carcasa, tal como la superficie superior, superficies laterales, o superficie inferior. En una realización preferida, las almohadillas de contacto son accesibles para los puntos de contacto de acoplamiento dispuestos en un analizador o lector automatizados.
50

- Preferiblemente, el electrodo inferior directamente está en contacto con la superficie inferior de la matriz en la zona de captura, de manera que está en contacto fluido directo con los líquidos que fluyen a través de la zona de captura. El electrodo inferior preferiblemente comprende una hoja de metal de una lámina de metal. Alternativamente, el electrodo inferior puede ser depositado sobre la superficie superior de un material de respaldo utilizado para soportar la matriz en el alojamiento. El electrodo inferior se puede extender sobre el rango espacial
55

total de la zona de captura, o se puede extender sólo en la región en la que están situados los anticuerpos y otros receptores.

En una realización preferida, la membrana puede estar respaldada por una capa generalmente impermeable al agua, tal como milar, con el electrodo inferior emparedado entre la capa y la membrana. Cuando se emplea, el respaldo está generalmente sujeto a la membrana por un adhesivo, tal como cinta adhesiva de doble cara 3M 444, con el electrodo situado entre el adhesivo y la capa. Típicamente, el respaldo impermeable al agua es utilizado para membranas de bajo espesor. Una amplia variedad de polímeros se pueden utilizar con tal de que no se unan no específicamente a los componentes de ensayo y no interfieran con el flujo de la muestra. Los polímeros ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poliestireno y similares. Alternativamente, la membrana puede ser autoportante. Otras membranas no absorbentes, tales como cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, copolímeros de acetato de vinilo y cloruro de vinilo, poliamida, policarbonato, poliestireno, y similares, también se pueden utilizar.

El electrodo superior está dispuesto en contacto con el lado superior de la zona de captura, y está en contacto de fluido-flujo con el líquido de fluye a través de la zona de captura cuando la zona de captura es humedecida. El electrodo superior se puede extender en todo el rango completo de la zona de captura, o se puede extender solo en la región en la que los anticuerpos y otros receptores están situados. El electrodo superior puede comprender un material conductor opaco o puede comprender preferiblemente un electrodo de transporte que esté opcionalmente dispuesto sobre un sustrato transparente. En una realización, el electrodo transparente es una capa de óxido de indio estaño o un sustrato de vidrio.

En otra realización preferida, los electrodos superior e inferior son además utilizados para detectar la llegada del frente de fluido de muestra a la zona de captura mediante los cambios en las propiedades eléctricas tales como la conductividad o la resistividad del material entre los dos electrodos. Esto proporciona un control de procedimiento adicional para el dispositivo de ensayo.

El campo interno para la electroporación o electro-lisis depende de muchos factores, incluyendo el tamaño de la estructura de pared celular del analito celular, el voltaje aplicado, y la separación entre los electrodos. La fuerza del campo eléctrico requerida para conseguir un potencial transmembrana de más de 1 V es aproximadamente 1kV/cm. Preferiblemente, el voltaje aplicado es seleccionado para proporcionar un campo eléctrico interno de al menos 1 kV/cm, aunque este umbral se conoce que varía para diferentes tipos de células y especies. En una realización a modo de ejemplo, la matriz tiene un espesor de 5 mil y el voltaje aplicado es de al menos 12,5 V y se aplica durante al menos 10 microsegundos. Dependiendo del campo aplicado, la electroporación puede ser permanente, o reversible.

El voltaje puede ser aplicado en un voltaje de corriente continua o de corriente alterna, y puede ser continuo o a pulsos. En una realización preferida, un voltaje de corriente alterna es aplicado para limitar la formación de burbujas debido a la electrolisis. Preferiblemente, el voltaje es de corriente alterna, tiene una frecuencia de entre 1 y aproximadamente 10 MHz. En otra realización preferida, el voltaje es aplicado en uno o más pulsos, durando cada pulso aproximadamente 10 microsegundos a 10 milisegundos. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que serán apropiadas diferentes combinaciones de voltaje, frecuencia, duración de pulsos para diferentes materiales, geometrías y tipos de células.

La detección de una señal debido a la presencia de uno o más antígenos celulares unidos en la zona de captura se puede conseguir en un cierto número de realizaciones diferentes, como se describirá más adelante. Generalmente, una señal se obtiene proporcionando un reactivo de producción de señal a la zona de captura, en donde reacciona con un componente de producción de señal proporcionado por el analito celular electroporado y electrolisado. En una realización preferida, el reactivo de generación de señal está hecho para fluir a la zona de captura antes de la aplicación del voltaje.

El reactivo de producción de señal puede contener un material adicional que permite la detección y/o confirmación de la presencia del reactivo de producción de señal en la zona de captura. Los materiales que pueden ser incluidos son, pero no se limitan a, materiales cromogénicos, luminiscentes y fluorométricos. En una realización preferida, la detección de la presencia del reactivo de producción de señal se proporciona por un sistema de detección en un analizador o lector automático.

El reactivo de producción de señal puede seguir la misma trayectoria de flujo que la muestra, es decir, puede ser aplicado a la lumbrera de la muestra y fluir a través de la zona de etiqueta a la zona de captura. En otra realización, el reactivo que produce señal puede ser añadido a la zona de captura desde arriba, por ejemplo, mediante un pipetor manual o automático, un cuentagotas y otros medios de dispensación de líquido. En otra realización, el reactivo de producción de señal puede estar contenido dentro de la carcasa en un compartimento o cámara sellado tal como una bolsa de papel de aluminio, que puede ser accionada (por ejemplo abriendo una válvula) o rota para hacer que el reactivo de producción de señal fluya sobre la matriz o directamente a la zona de captura desde una dirección lateral. En la realización preferida, la actuación es provista por un analizador o lector automatizado.

En una realización preferida, la señal es luminiscente. En una realización preferida, el componente de producción de señal es adenosina-5'-trifosfato (ATP). En esta realización, el reactivo de producción de señal es uno o más

reactivos conocidos de ensayo para el ensayo de ATP, tal como la luciferasa.

En una realización alternativa, el componente de producción de señal es una enzima que genera ATP, por ejemplo, adelinato quinasa. En esta realización, el reactivo de producción de señal incluye ADP y uno o más reactivos conocidos de ensayo para el ensayo de ATP, tal como la luciferasa.

- 5 En una realización preferida en la que la señal es luminiscente, la carcasa está adaptada para hacer posible que un operador de ensayo o dispositivo automatizado retire el electrodo superior de la zona de captura, con lo que se hace posible la detección de luminiscencia desde la zona de captura después de la aplicación de un voltaje entre los electrodos. En una realización preferida, el electrodo superior está retirablemente unido al dispositivo. En otra realización preferida, el electrodo superior puede ser movido axialmente a lo largo del dispositivo, y está preferiblemente soportado por la carcasa. En todavía otra realización preferida, el electrodo superior puede residir externamente como un electrodo permanente o externo desechable. Por ejemplo, el electrodo superior puede estar dispuesto y aplicado físicamente y/o trasladado por un analizados o lector automatizado.

15 La presente realización mejora respecto a los dispositivos de electroporación de la técnica anterior, particularmente aquellos que implican células fluidicas cerradas, proporcionan un ambiente fluido abierto en el que cualesquiera burbujas de gas creadas por los procesos electrolíticos son fácilmente retiradas al ambiente circundante.

20 En otra realización preferida, el electrodo superior puede estar adaptado para aplicar una fuerza de compresiva a la zona de captura durante la aplicación del voltaje. Esta fuerza compresiva puede ser aplicada externamente por un analizador o lector automatizado, o manualmente. Alternativamente la fuerza compresiva puede ser aplicada de forma temporal o permanente fijando el lector con relación a la carcasa. La fuerza compresiva preferiblemente reduce la separación entre los electrodos, lo que reduce el voltaje requerido para conseguir la electroporación o la electro-lisis. En una realización preferida, la fuerza compresiva reduce la separación entre electrodos en un factor de dos o más.

25 De lo anterior, se aprecia que la carcasa o alojamiento exterior del dispositivo puede adoptar diversas formas. Típicamente incluirá una carcasa alargada y puede tener una pluralidad de partes de interfijación. En una realización particularmente preferida, el alojamiento incluye una tapa superior y un soporte inferior. En una realización la tapa superior contiene una abertura de aplicación y una lumbreira de observación. En otra realización el alojamiento puede contener divisores entre las tiras de matriz para evitar el flujo de muestra de fluidos entre las tiras.

30 En una realización preferida, el alojamiento está hecho de un material impermeable a la humedad y no conductor, por ejemplo un material plástico. Se contempla que la variedad de plástico comercialmente disponible incluya, pero no se limite a, vinilo, nilón, cloruro de polivinilo, polipropileno, poliestireno, polietileno, policarbonatos, polisulfanos, poliésteres, uretanos, y epoxis, pueden ser utilizados para construir un alojamiento. El alojamiento puede ser preparado mediante metodologías convencionales tales como tecnologías de moldeo estándar que son bien conocidas y utilizadas en la técnica. El alojamiento puede ser producido por tecnologías de moldeo que incluyen pero no se limitan a, moldeo por inyección, moldeo por compresión, moldeo por transferencia, moldeo por soplado, moldeo por extrusión, moldeo de espuma, y moldeo de termoespuma. Las tecnologías de moldeo anteriormente mencionadas son bien conocidas en la técnica y de este modo no se describirán con detalle en la presente. Véase por ejemplo, Processes And Materials Of Manufacture, Third Edition, R.A. Lindsberg (1983) Allyn y Baron pp. 393-431.

40 Los expertos en la técnica apreciarán que un dispositivo de tira de ensayo de puede fabricar de más de un material (por ejemplo, diferentes zonas o sitios pueden ser de diferentes materiales) y un dispositivo de flujo pasante puede tener más de una capa, en donde las diferentes capas pueden estar hechas de materiales diferentes, siempre y cuando los múltiples materiales o capas estén en contacto de flujo de fluido y una con otra con lo que se hace posible el paso de muestra de ensayo entre los materiales o capas. El contacto de fluido-flujo permite en paso de al menos algunos componentes de la muestra de ensayo entre las zonas o capas del dispositivo. El flujo de fluido es preferiblemente uniforme a lo largo de la interfaz de contacto entre las diferentes zonas o capas. Diferentes reactivos puede estar dispuestas en diferentes materiales, y diferentes reactivos pueden estar dispuestos en diferentes zonas.

45 Las realizaciones de la presente invención son particularmente adecuadas para un dispositivo de ensayo como se muestra en los dibujos adjuntos, y están descritas con detalle en lo que sigue. Se entiende que los dibujos se proporcionan con fines de ilustración y no significa que se limite el campo de la presente invención.

50 La Figura 13 muestra una primera realización de un dispositivo de ensayo 10 construido de acuerdo con una realización preferida de la presente invención. El ejemplo se proporciona con el fin de enseñar una realización preferida y no está destinado a limitar de ninguna manera el campo de la invención.

55 El dispositivo de ensayo 210 tiene un soporte inferior 214, una matriz de flujo 218, una cubierta superior 222, y un desecante opcional 226. En su dirección longitudinal, la matriz 218 puede ser subdividida en una zona de aplicación de muestra 230, una zona de etiqueta de control opcional 234, un área de observación 238, y una zona absorbente 242. La Figura muestra el dispositivo esquemáticamente en una vista aumentada en donde la tapa superior 222 y el soporte inferior 214 están verticalmente desplazados con fines ilustrativos.

La zona de aplicación de muestra está situada en una ubicación aguas arriba en la matriz 218, y está configurada para recibir la muestra de fluido. La zona de control de etiqueta 234 está opcionalmente situada aguas abajo de la zona de aplicación 230 y contiene el reactivo de etiqueta para utilizar con una línea de control opcional. El área de observación está situada aguas abajo de la zona de etiqueta, e incluye una zona de captura 240 que contiene el reactivo de captura. La almohadilla absorbente 242 está situada aguas abajo del área de observación 38.

La tapa 222 tiene una abertura de aplicación 248 dispuesta encima de la almohadilla de aplicación de muestra y una lumbrera de observación 252 dispuesta encima del área de observación. En cooperación, la cubierta superior y el soporte inferior están configurados para proporcionar un alojamiento para la matriz 218 y el desecante 226. Como se muestra, el desecante está típicamente situado separadamente de la matriz. Los electrodos superior 260 e inferior 262 están dispuestos encima y debajo de la zona de captura, respectivamente. La zona de captura 240 opcionalmente incluye una línea de control inmovilizada que selectivamente se une al reactivo de etiqueta dispuesto en la zona de etiqueta opcional.

Durante el funcionamiento, el fluido de muestra es añadido a través de la abertura 248, y a la almohadilla de aplicación 230. La muestra de fluido es transportada desde la almohadilla de aplicación 230 a la zona de etiqueta opcional 234, en donde el fluido extrae el reactivo etiquetado. Si la zona de etiqueta no está dispuesta, la muestra de fluido fluye desde la almohadilla de aplicación de muestra a la zona de captura.

A continuación, la muestra de fluido es hecha avanzar al área de observación 238, y después sobre la zona absorbente. El área de observación 238, ahora humedecida por el fluido de muestra, puede volverse transparente. El analito celular se une a los receptores inmovilizados en la zona de captura 240 dentro de la zona de observación 238. El frente de fluido progresa axialmente a lo largo de la matriz y es absorbido por la almohadilla absorbente 242.

En una realización preferida, antes de la aplicación de un voltaje a los electrodos superior 260 e inferior 262, un reactivo de producción de señal es primero transportado a la zona de captura. Como se ha descrito anteriormente, esto se puede conseguir mediante muchos métodos diferentes que resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los métodos a modo de ejemplo incluyen añadir el reactivo de producción de señal a la almohadilla de aplicación de muestra 230, que fluirá axialmente a lo largo de la matriz hasta la zona de captura, o añadir directamente el reactivo de producción de señal a la zona de captura desde encima de la zona de captura 240 (a través de la lumbrera de observación 252).

La aplicación de un voltaje a los electrodo superior 260 e inferior 262 hace que el analito celular unido a la zona de captura 240 sea sometido a electroporación o electro-lisis (dependiendo de la naturaleza del voltaje aplicado). Si el reactivo de producción de señal no ha sido añadido antes de la aplicación del voltaje, el reactivo de producción de señal es posteriormente añadido mediante medios que incluyen los descritos en el párrafo anterior. Preferiblemente, el electrodo superior aplica una fuerza de compresión a la zona de captura mientras que el voltaje es aplicado, lo que reduce la separación entre los electrodos y reduce el voltaje umbral que se requiere para la electroporación o la electro-lisis. Más preferiblemente, la fuerza compresiva se aplica a un analizador o lector automatizado.

Después de la aplicación del voltaje, el analito celular unido a la zona de captura 240 hace disponible al componente de producción de señal, que puede reaccionar con el reactivo de producción de señal para producir una señal. El componente de producción de señal puede ser hecho disponible por electro-lisis, en la que el componente de producción de señal es liberado en el fluido en la zona de captura 240, o puede ser hecho disponible después de la electroporación permitiendo que el reactivo de producción de señal entre en el analito celular para reaccionar con el componente de producción de señal internamente, o tanto internamente como externamente, a la pared de célula del analito celular.

Como se ha descrito anteriormente, la señal es preferiblemente una señal óptica y es más preferiblemente luminiscente, pero puede ser cromogénica o fluorométrica. El reactivo de producción de señal es preferiblemente luciferasa y el componente de producción de señal es preferiblemente ATP. La emisión óptica que comprende la señal puede ser detectada por un generador de imágenes tal como un generador de imágenes CCD o CMOS. Preferiblemente, el generador de imágenes está alojado dentro de un analizador o lector automáticos. El analizador o lector pueden incluir medios de translación tales como motores lineales para escanear un área de la zona de captura.

Para hacer posible la generación de imágenes de un dispositivo de ensayo en el que la señal es una emisión óptica, el electrodo superior 260 puede ser retirado antes de la generación de la imagen. El electrodo puede ser retirado manualmente o puede ser retirado por un analizador automático. Preferiblemente, el electrodo superior es trasladado axialmente lo largo del dispositivo para hacer la zona de captura accesible al generador de imágenes. Alterativamente, el electrodo superior puede formar un componente externo de un kit de dispositivo de ensayo, y puede ser aplicado y retirado por un analizador o lector automatizado. Más preferiblemente, el electrodo superior 260 es un conductor transparente, tales como un óxido de indio estaño, que puede estar dispuesto en un sustrato transparente. En tal realización, la potencia óptica que comprende la señal puede ser fotografiada directamente o detectada sin la necesidad de mover o retirar el electrodo superior 260.

Después de generar la imagen o detectar la emisión óptica procedente del dispositivo, la señal es relacionada con

una concentración bacteriana, o un resultado positivo/negativo, por medio de los datos de calibración previamente establecidos o una curva de calibración preestablecida. Tal información de calibración puede ser obtenida ensayando ejemplos que contienen concentraciones conocidas de analito celular, como se conoce en la técnica.

5 Las realizaciones de la invención no están destinadas a estar limitadas a un único dispositivo de ensayo, y las realizaciones contemplan además un dispositivo de analito multicelular. Por ejemplo, el dispositivo de ensayo puede incluir más de una zona de captura, en donde las zonas de captura están situadas en serie o axialmente a lo largo de la matriz, y cada zona de captura tiene en la misma un único receptor objetivo en un único analito celular. En otra realización preferida, el dispositivo de ensayo puede comprender múltiples dispositivos de flujo paralelos en conexión de flujo de fluido con una o más almohadillas de muestra, con el conjunto de dispositivos contenido en un
10 único alojamiento. En una realización más preferida, está provisto un dispositivo de múltiples tiras que comprende múltiples dispositivos de ensayo paralelos, con múltiples zonas de captura por dispositivo de ensayo paralelos, en donde cada zona de captura está en contacto de fluido con los electrodos superior e inferior cuando se humedece.

15 En una realización más de la invención, el analito celular que es electroporado o electro-lisado genera moléculas genéticas tales como ADN o ARN disponibles en la zona de captura, en donde se pueden unir a los receptores moleculares adicionales situados dentro de la zona de captura, o aguas abajo de la zona de captura, en una zona de captura molecular suplementaria que está dentro de la zona de observación. Los reactivos etiquetados moleculares adicionales, por ejemplo, oligonucleótidos ADN y PNA etiquetados, pueden ser proporcionados a la zona de captura a través de los medios de dispensación de líquido extremos, tales como un pipetor.

20 Los siguientes ejemplos son presentados para hacer posible que los expertos en la técnica entiendan y lleven a la práctica la presente invención. No deben ser considerados como una limitación del campo de la invención, sino ser meramente ilustrativos y representativos de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de las Regiones de Inmovilización que Comprenden Anticuerpos o Sondas de Ácido Nucleico

25 En un ejemplo, un soporte sólido es preparado para la inmovilización de o bien un anticuerpo que reconoce una superficie de célula o bien una sonda de ácido nucleico para unirse a ácidos nucleicos intracelulares. Placas inferiores de aluminio pulidas fueron limpiadas con agua, después enjuagadas dos veces con metanol y secadas al aire. 2% de 3-Aminopropil Trietoxisilano fue preparado en 95% de Metanol y un 5% de agua y las placas fueron sumergidas en silano durante 5 minutos. Después, las placas fueron enjuagadas en metanol dos veces, secadas al
30 aire y cocidas a 110 °C durante 10 minutos. Después del enfriamiento, las placas fueron sumergidas en 2,5% de enlazador cruzado homobifuncional de glutaraldehído en solución salina amortiguada de fosfato, pH 7,4 durante 1 hora, enjuagadas concienzudamente en agua y secadas al aire. La zona de reacción del canal microfluídico fue definida aplicado un separador adhesivo de doble lado sobre la superficie tratada de las placas de aluminio. La sonda oligonucleótida de captura etiquetada con amino de 1 uM de concentración final que reconoce 16S rARN de E.coli o anticuerpo anti-E. coli de cabra (Abcam) de 50 ug/mL de concentración final en 10 mM de amortiguador de carbonato pH 9 fue manchada en la zona de reacción de las placas de aluminio preparadas e incubadas en una
35 cámara humedecida a temperatura ambiente durante 1 hora a 4° C durante toda la noche. El anticuerpo o la sonda no unido fue lavado de la superficie con agua y la zona de reacción fue bloqueada con 0,2% de albumina de suero bovino y 0,1% de Tween-20 en PBS pH 7,4 a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado con agua,
40 las placas fueron secadas al aire y los canales microfluídicos fueron montados aplicando la placa superior sobre el separador adhesivo.

Ejemplo 2: Preparación de Regiones de Inmovilización que Comprenden Anticuerpos y Sondas de Ácido Nucleico.

45 En un segundo ejemplo, el protocolo anterior fue adaptado para soportar la co-inmovilización de sondas de anticuerpo y ácido nucleico dentro de una región de inmovilización común. El método se ilustra esquemáticamente en el gráfico de flujo mostrado en la Figura 14, como se describe en lo que sigue. Una concentración final de 1 µM de sonda oligonucleótida de captura etiquetada con biotina fue mezclada con 20 µg/mL de Estreptavidina (Sigma) en 10 nM de amortiguador de carbonato pH 9 durante 5 minutos, y después fue añadida concentración final de anticuerpo anti-E. coli de cabra (Abcam) de 50 ug/mL. La mezcla de anticuerpo y sonda fue manchada sobre la zona de reacción de las placas de aluminio preparadas, formando con ello una región de inmovilización común, e
50 incubada en una cámara húmeda a 4 °C durante una noche. Los materiales no unidos fueron lavados de la superficie con agua y la zona de reacción fue bloqueada con 0,2% de albumina de suero bovino y 0,1% de Tween-20 en PBS pH 7,4 a una temperatura ambiente durante una hora. Después del lavado con agua, las placas fueron secadas al aire y los canales microfluídicos fueron montados aplicando la placa superior sobre el separador adhesivo.

55 Con el fin de demostrar la efectividad del método de inmovilización de receptor anteriormente mencionado, fueron construidos dos canales de reacción. Cada canal tiene tres zonas; la primera zona, indicada con "Anticuerpos Antibacterias" en la Figura 15, tiene dos regiones de inmovilización idénticas con anticuerpos inmovilizados siguiendo el método del Ejemplo 1. La segunda zona, indicada como "sondas de captura de rARN", en la Figura 15,

tiene dos regiones de inmovilización idénticas con sondas de ácido nucleico inmovilizadas siguiendo el método del Ejemplo 1. La tercera zona, indicada con "Biositio Híbrido" en la Figura 15, tiene dos regiones de inmovilización idénticas con anticuerpos y sondas de ácido nucleico co-inmovilizadas siguiendo el método del Ejemplo 2.

5 La cepa de Escherichia coli DH5- α fue re-suspendida en PBS como 10^8 CFU/mL. La suspensión de bacterias en 50 μ L de volumen fue hecha fluir en el canal n $^\circ$ 1, indicada con "Muestra de Bacteria completa" en la Figura 15. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, el canal fue lavado con un volumen de 100 μ L de agua 5 veces. Después, el canal fue llenado con 2 μ g/mL de anticuerpo anti-E.coli de cabra conjugado con peroxidasa en el amortiguador de bloqueo. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, el canal fue lavado con agua 5 veces y llenado con sustrato de peroxidasa TMB para membrana (sigma) para detectar la bacteria capturada. El resultado se muestra en la figura 15.

10 El segundo canal, indicado con "Lisato de bacterias" en la Figura 15, fue utilizado para detectar 16S rARN. La cepa de Escherichia coli DH5- α fue re-suspendida en agua destilada como 10^8 CFU/mL y la lisis de célula bacteriana fue permitida durante 10 minutos. La bacteria lisada en un volumen de 20 μ L fue mezclada con un volumen de 20 μ L de 0,5 μ M de sonda detectora etiquetada con FITC en 500 mM de amortiguador de fosfato pH 7,4. La mezcla fue hecha fluir en el canal e incubada durante 10 minutos a 46°C. El canal fue lavado con agua durante 5 minutos y llenado con anticuerpo anti-FITC conjugado con peroxidasa (Chemicon) diluido 1:1000 en amortiguador de bloqueo. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, el canal fue lavado con agua cinco veces y llenado con TMB para detectar el rARN bacteriano unido. El resultado se muestra en la figura 15. Se puede observar fácilmente que el rendimiento de la región de inmovilización híbrida es similar al biositio que tiene receptores individuales.

20 La descripción anterior de las realizaciones preferidas de la invención ha sido presentada para ilustrar los principios de la invención y no para limitar la invención a la realización particular ilustrada. Está dispuesto que el campo de la invención esté definido por todas las realizaciones englobadas en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfluídico capaz de separar células cargadas basado en la aplicación de un campo eléctrico no faradiaco, que comprende:
- un canal microfluídico para hacer fluir una muestra líquida que contiene células;
- 5 un primer electrodo dispuesto en la superficie de dicho canal microfluídico, en donde dicho primer electrodo está grabado con una densa red de túneles microscópicos;
- un segundo electrodo dispuesto en una superficie opuesta de dicho canal microfluídico; y
- una capa dieléctrica dispuesta en dicho primer electrodo para evitar el flujo de una corriente faradaica dentro del canal microfluídico bajo la aplicación de un voltaje entre dicho primer electrodo y dicho segundo electrodo.
- 10 2. El dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer electrodo es aluminio y en el que dicha capa dieléctrica es óxido de aluminio.
3. El dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho óxido de aluminio está formado mediante la oxidación electroquímica del aluminio.
- 15 4. El dispositivo microfluídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que un espesor de dicha capa dieléctrica está dentro del rango de 10 nm a 100 nm.
5. El dispositivo microfluídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha capa dieléctrica comprende una región de inmovilización, teniendo dicha región de inmovilización dispuesta en la misma un material adherente para inmovilizar una o más células.
- 20 6. El dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho material absorbente comprende receptores primarios que tienen afinidad por una superficie de una o más células.
7. El dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además receptores secundarios dispuestos en dicha región de inmovilización, en donde dichos receptores secundarios son adecuados para unir un analito intracelular procedente de una o más células.
- 25 8. El dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que dichos receptores primarios son anticuerpos.
9. El dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dichos receptores secundarios son seleccionados del grupo que comprende anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos, y análogos de ácido nucleico.
- 30 10. El dispositivo microfluídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, que comprende además una o más regiones de inmovilización adicionales, en donde dicha región de inmovilización y dichas regiones de inmovilizaciones adicionales forman una disposición.

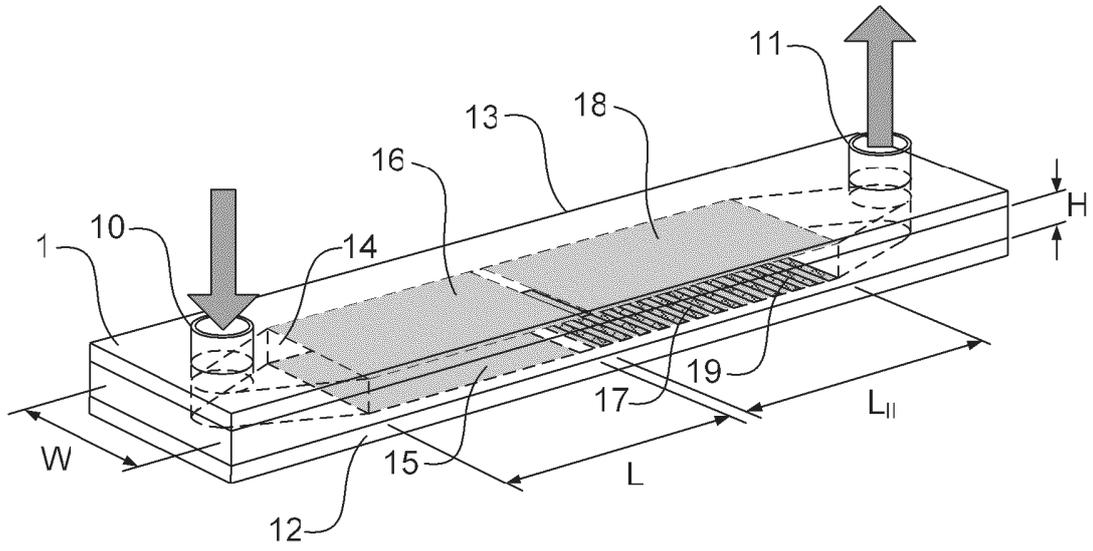


Figura 1

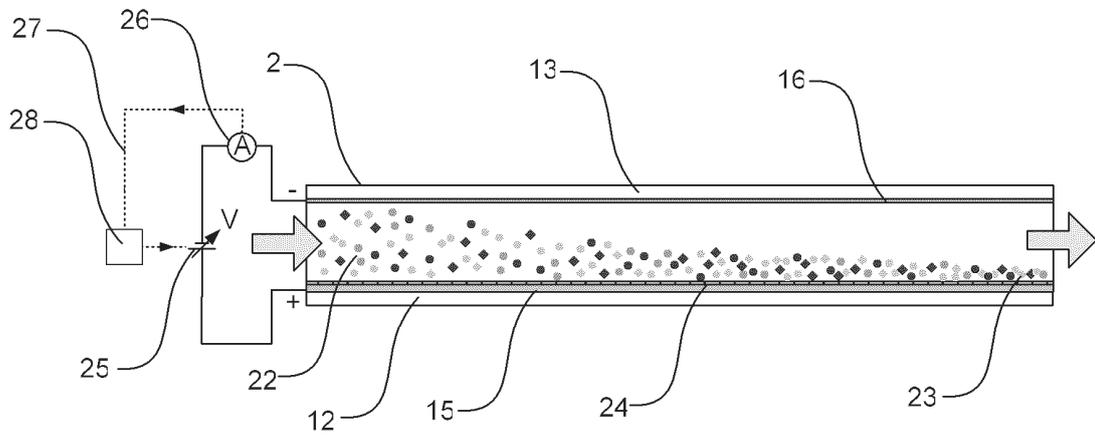


Figura 2

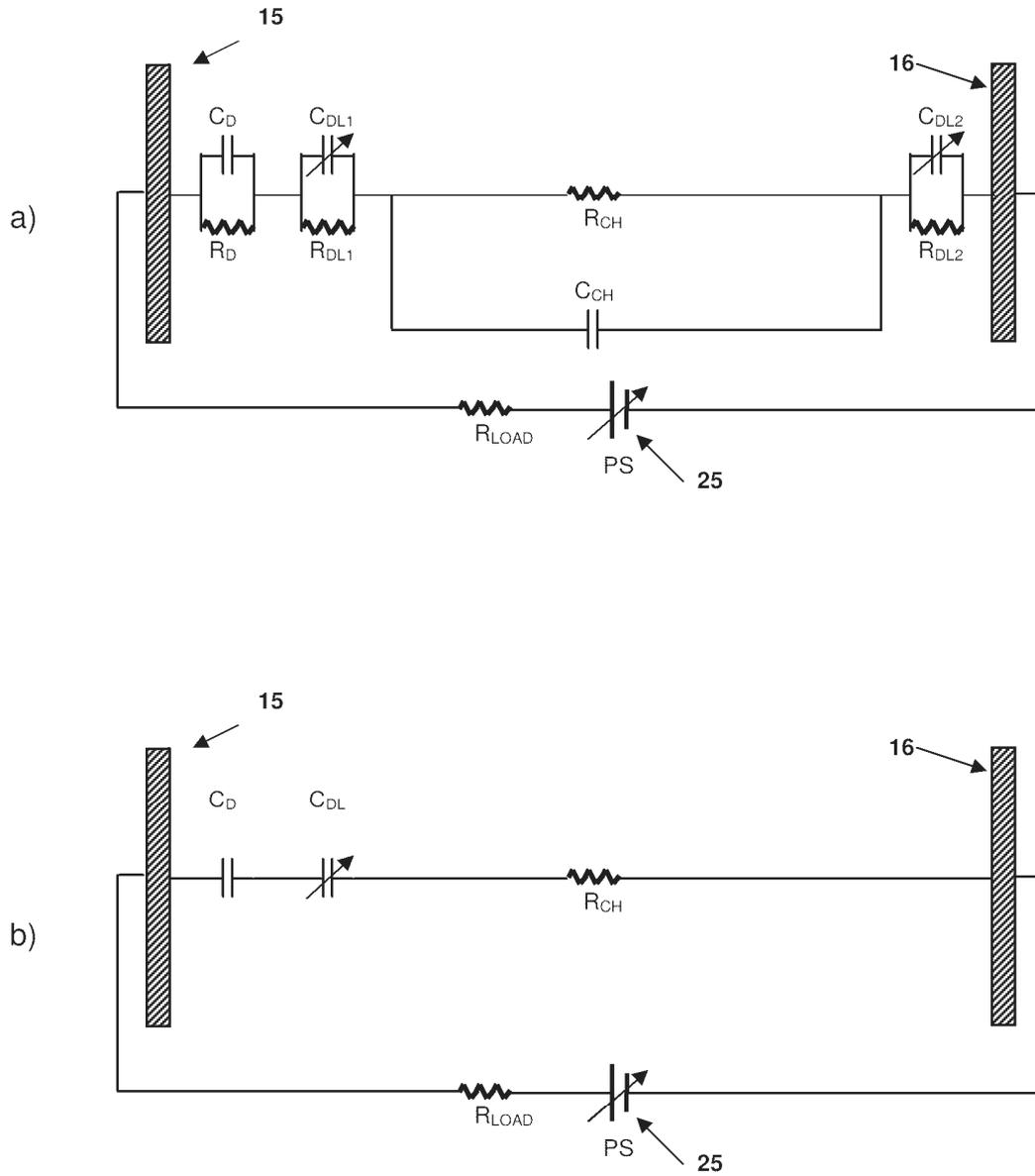


Figura 3

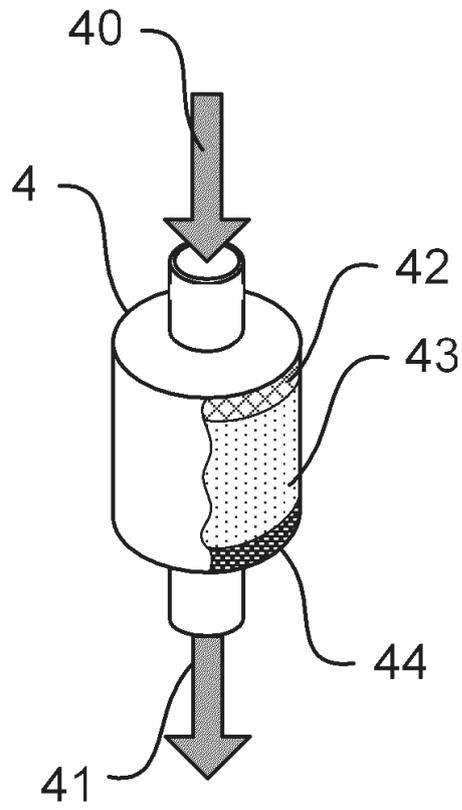


Figura 4

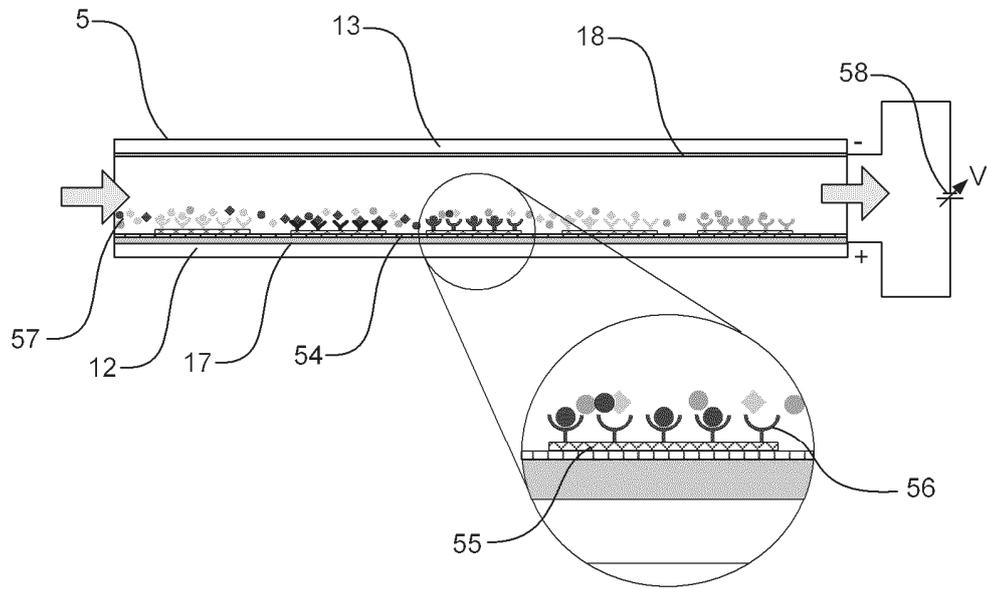


Figura 5

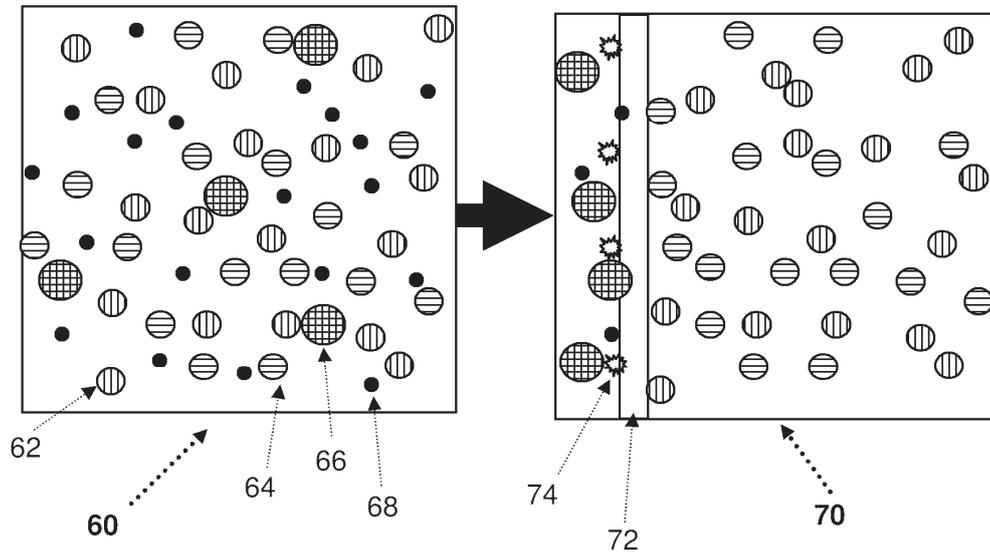


Figura 6

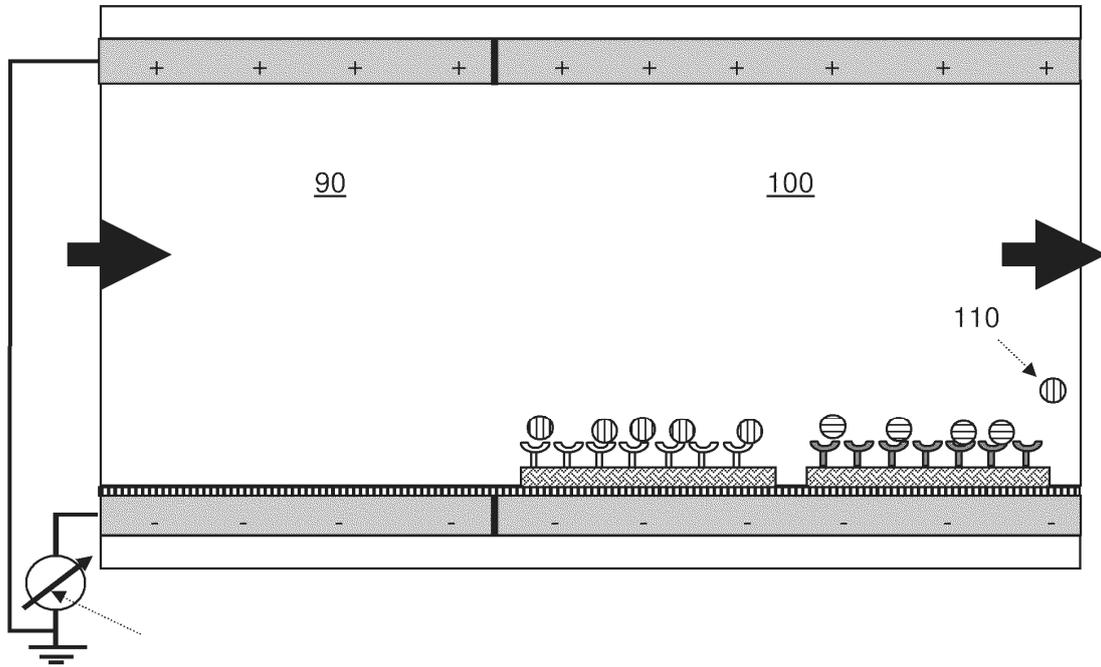


Figura 8

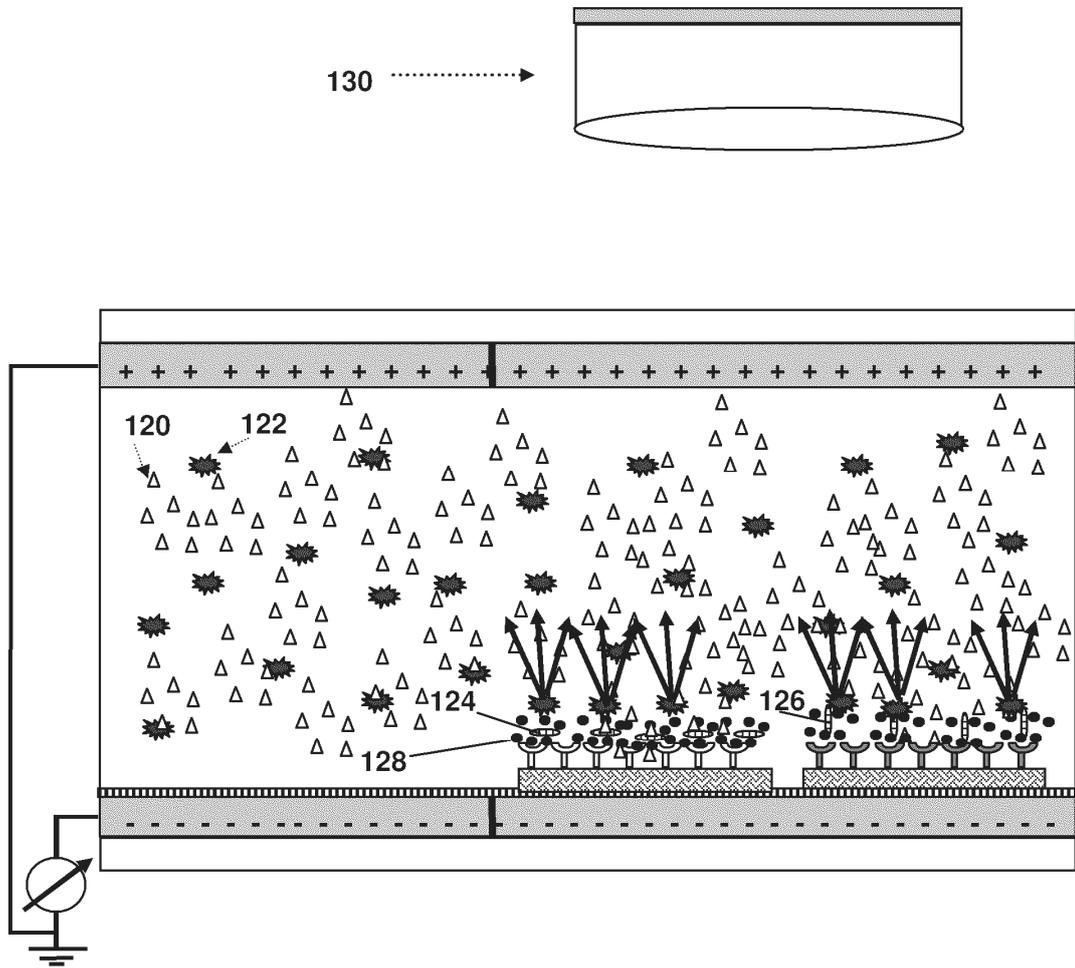


Figura 9

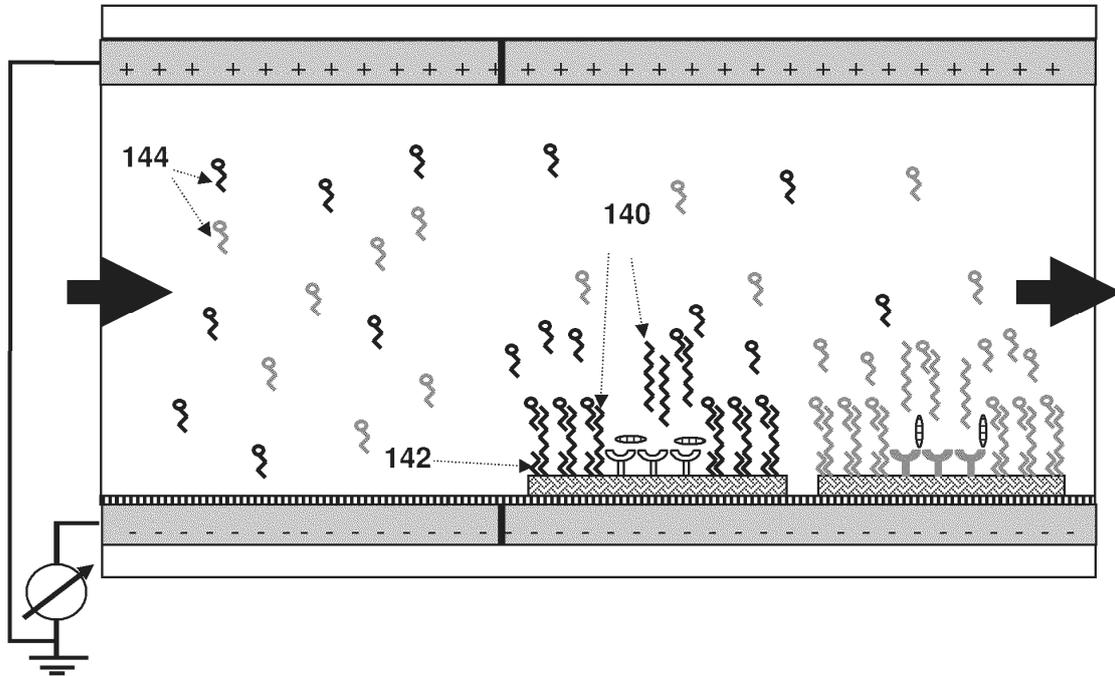


Figura 10

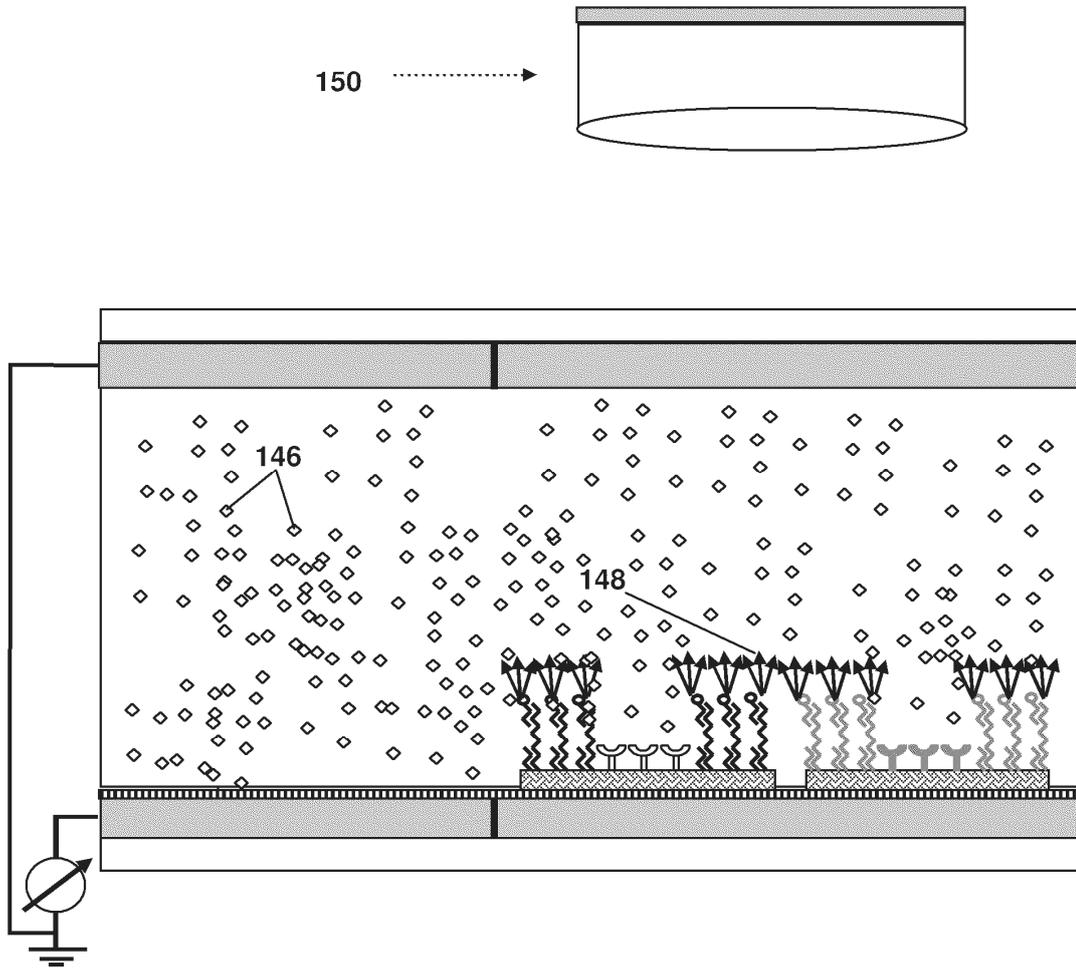


Figura 11

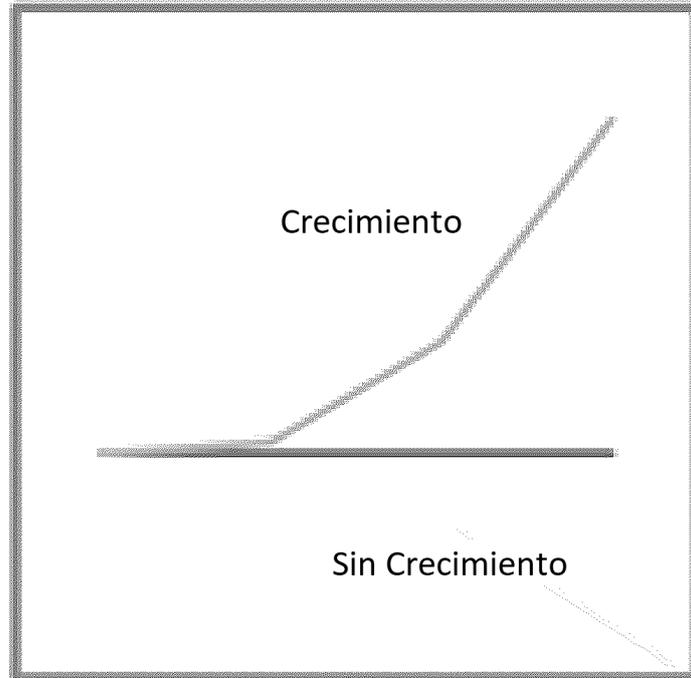


Figura 12

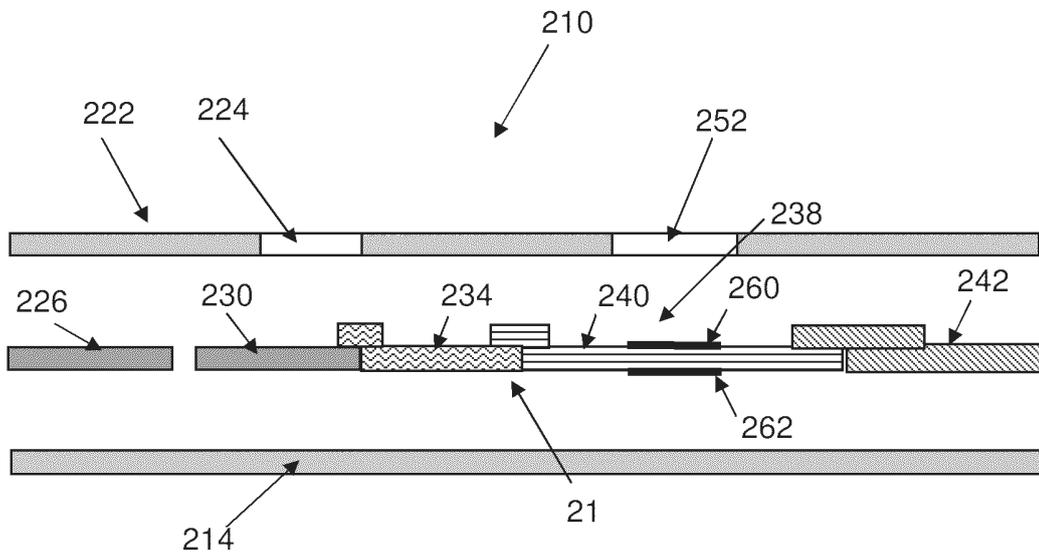


Figura 13

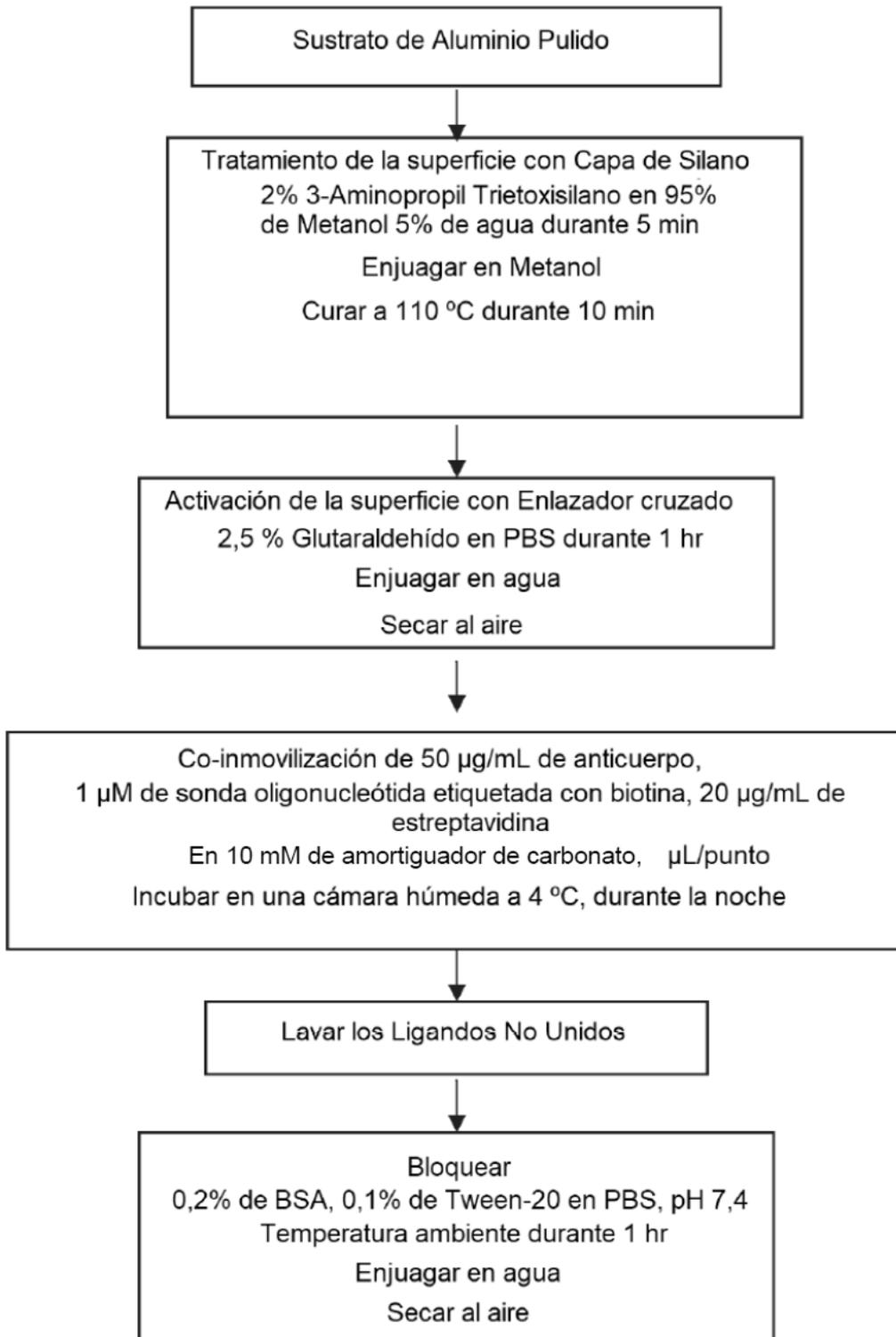


Figura 14

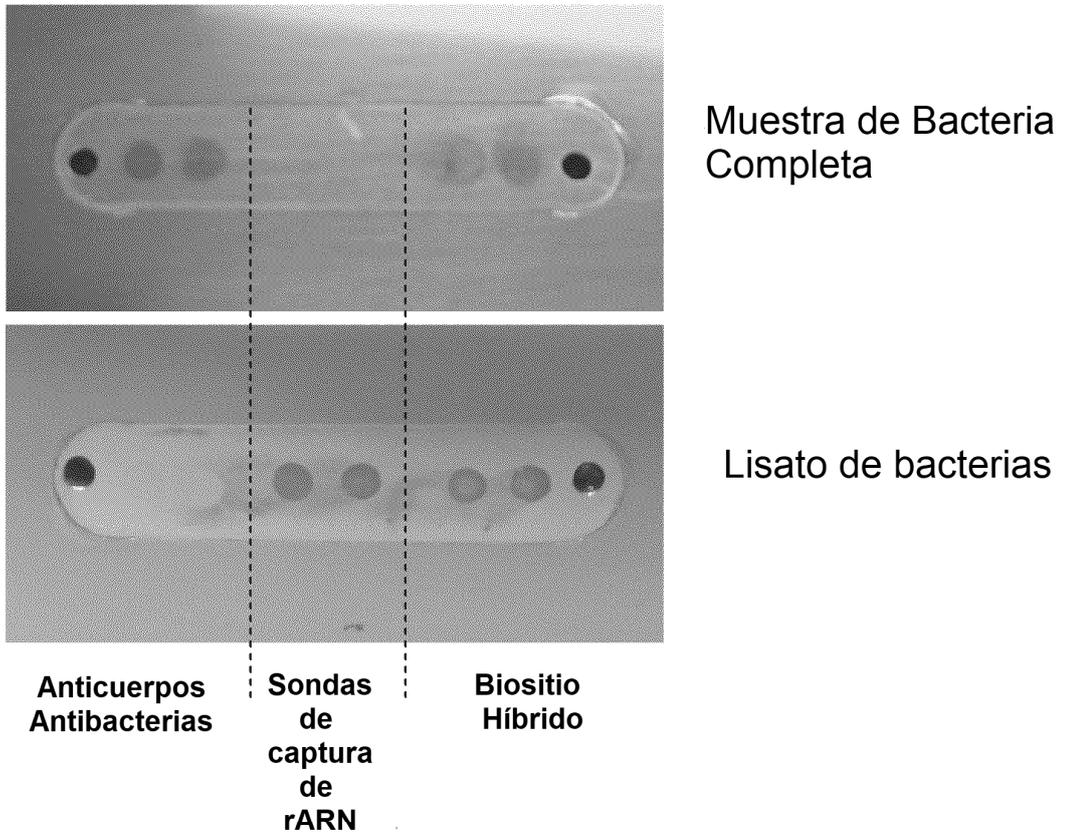


Figura 15