

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 771**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
G01N 33/543	(2006.01)
G01N 33/569	(2006.01)
B01L 3/00	(2006.01)
C12Q 1/70	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2007 E 14174846 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2786767**

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

30 Prioridad:

10.05.2006 US 799442 P
16.05.2006 US 800939 P
09.05.2007 US 746535

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:

THERANOS IP COMPANY, LLC (100.0%)
7333 Gateway Boulevard
Newark, CA 94560, US

72 Inventor/es:

HOLMES, ELIZABETH A. y
GIBBONS, IAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 703 771 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

Detección en tiempo real del virus de la gripe

Referencia cruzada

Antecedentes de la invención

5 La gripe ("*influenza*") es una enfermedad infecciosa capaz de afectar a una amplia diversidad de huéspedes, incluyendo aves y mamíferos. La gripe está causada por un virus ARN de la familia *orthomyxoviridae* (que generalmente comprende los virus de la gripe de tipo A, B y C). La gripe aviar está causada por un virus de esta familia adaptado a aves, aunque también se denomina gripe de las aves, influenza aviar o influenza de las aves. Una amenaza pandémica actual procede de un brote sin precedentes de la cepa H5N1 del virus de la gripe A en Asia y Europa. Esta cepa tiene la capacidad de mutar y adaptarse a sí misma a un amplio intervalo de huéspedes, incluyendo aves y seres humanos. El Consejo de Seguridad Nacional expuso la "Estrategia Nacional para la Gripe Pandémica" ("La Estrategia") en noviembre de 2005 como respuesta a la amenaza pandémica actual. Una parte crítica de esta iniciativa se centra sobre la rápida identificación de la Gripe Aviar en pacientes y aves. La estrategia pretende mejorar la supervivencia y detección de la Gripe Aviar.

15 Hacia noviembre de 2005, se sabía que el virus que causaba la amenaza pandémica de Gripe Aviar había infectado a 121 personas en cuatro países, dando como resultado 62 muertes en los dos años anteriores. Aquellos infectados con el H5N1 tenían, en la mayoría de los casos, contacto físico extensivo con aves infectadas. Aunque el virus aún no ha mostrado capacidad de transmitirse eficientemente entre humanos, como se ve con el virus de la gripe humana anual epidémica, supone una grave preocupación que adquiriera esta capacidad por mutación genética o intercambio de material genético con un virus de la gripe humano.

20 La gripe provoca aproximadamente 36.000 muertes y más de 200.000 hospitalizaciones cada año solo en Estados Unidos y cuesta a Estados Unidos más de 10.000 millones de \$ anualmente. Además, las últimas tres pandemias, en 1918, 1957 y 1968, mataron aproximadamente a 40 millones, 2 millones y 1 millón de personas en todo el mundo, respectivamente.

25 Sigue habiendo una necesidad apremiante de dispositivos y métodos que puedan detectar de forma precisa y rápida la presencia de la Gripe Aviar para proporcionar un aviso temprano de pandemia para contener la difusión de la enfermedad. Un sistema ideal sería (1) permitir la recuperación, transmisión y análisis de datos de tales dispositivos; y (2) proporcionar un sistema de aviso en tiempo real a los encargados de sanidad y gubernamentales. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas.

30 Yan et al., 2005, *Anal Chem*, 77(23), 7673-7378 describen un inmunoensayo de citometría de flujo multiplexado para la detección y diferenciación del virus de la gripe usando un inmunoensayo basado en microesferas.

El documento US 2002/0055094A1 describe un método de detección del virus de la gripe que utiliza compuestos capaces de unirse específicamente al sitio activo de la neuraminidasa del virus de la gripe.

35 El documento US 2005/0100937A1 describe un dispositivo médico para supervisión de analitos y suministro de fármacos.

El documento WO 2005/031355A1 describe un ensayo para diferenciar múltiples analitos en una única muestra de fluido.

Lee et al., 2006, *Adv. Clin. Chem*, 255-295 proporcionan una visión de conjunto del ensayo microfluídico inmunoabsorbente ligado a enzimas.

40 Gavin et al., 2003, *Clin. Appl. Imm. Rev.*, 4, 151-172 proporcionan una revisión de ensayos diagnósticos rápidos para la gripe.

Liu et al., 2006 (epub 27.4.2006), *Anal Chem.*, 78(12), 4184-4193, describen un dispositivo en serie microfluídica totalmente integrado para identificación y secuenciación del subtipo A de la gripe.

Compendio de la invención

45 En su sentido más amplio, la presente invención se refiere a la materia objeto definida en las reivindicaciones adjuntas.

50 La descripción proporciona un sistema para detectar un analito indicativo de una infección vírica por gripe en un fluido corporal de un sujeto. El sistema típicamente comprende a) un dispositivo fluídico, comprendiendo dicho dispositivo fluídico una unidad de recogida de muestra y un conjunto de ensayo, en donde la unidad de recogida de muestra permite que una muestra de fluido corporal, que se sospecha que contiene dicho analito, reaccione con los agentes reaccionantes contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para producir una señal detectable indicativa de la presencia de dicho analito, b) un conjunto lector que comprende un conjunto de detección para detectar dicha

señal detectable; y c) un conjunto de comunicación para transmitir dicha señal detectada a dicho dispositivo externo. El sistema es capaz de detectar una infección vírica por gripe de tipo A, B y/o C. En general, el analito puede comprender una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe, que puede ser hemaglutinina (por ejemplo, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16) y/o neuraminidasa (por ejemplo, N1, N2, N3, N4 y N5). El fluido corporal puede extraerse de un sujeto seleccionado del grupo que consiste en seres humanos, aves de corral y aves silvestres.

La descripción proporciona también un sistema para detectar una pluralidad de analitos, al menos dos de los cuales son indicativos de una infección vírica por gripe en un fluido corporal de un sujeto. El sistema típicamente comprende a) un dispositivo fluídico, comprendiendo dicho dispositivo fluídico una unidad de recogida de muestra y un conjunto de ensayo, en donde dicha unidad de recogida de muestra permite que una muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene dicha pluralidad de analitos reaccione con los agentes reaccionantes contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para producir una o más señales detectables indicativas de la presencia de dichos al menos dos analitos; b) un conjunto lector que comprende un conjunto de detección para detectar dicha uno o más señales detectables; y c) un conjunto de comunicación para transmitir dicha señal detectada a dicho dispositivo externo.

La descripción proporciona además un método para usar los presentes sistemas. En un aspecto, la descripción proporciona un método para detectar un analito indicativo de una infección por gripe en un fluido corporal de un sujeto. El método implica las etapas de a) proporcionar un sistema del sujeto; b) permitir que una muestra de fluido corporal reaccione con los agentes reaccionantes contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para producir una señal detectable indicativa de la presencia de dicho analito; y c) detectar dicha señal detectable. En otro aspecto, el método comprende las etapas de a) proporcionar un dispositivo fluídico que comprende al menos una unidad de recogida de muestra, un conjunto de inmunoensayo que contiene reactivos de inmunoensayo, una pluralidad de canales en comunicación fluida con dicha unidad de recogida de muestra y/o dicho conjunto de inmunoensayo; b) accionar dicho dispositivo fluídico y dirigir dichos reactivos de inmunoensayo dentro de dicho dispositivo fluídico; c) permitir que una muestra de fluido corporal, que se sospecha que contiene dicho analito, reaccione con dichos reactivos de inmunoensayo contenidos dentro de dicho conjunto de inmunoensayo para producir una señal detectable indicativa de la presencia de dicho analito indicativo de una infección vírica por gripe en dicha muestra; y d) detectar dicha señal detectable generada por dicho analito recogido en dicha muestra de fluido corporal. Cuando se desea, la muestra de fluido corporal usado para tal detección es menor que aproximadamente 500 microlitros. Puede detectarse una diversidad de infecciones víricas por gripe. Estas incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, infección vírica por gripe de tipo A, B y C.

La presente descripción proporciona, además, un método para detectar una pluralidad de analitos, al menos dos de los cuales son indicativos de una infección vírica por gripe en un fluido corporal de un sujeto. El método comprende las etapas de a) proporcionar un dispositivo fluídico que comprende al menos una unidad de recogida de muestra, un conjunto de inmunoensayo que contiene reactivos de inmunoensayo, una pluralidad de canales en comunicación fluida con dicha unidad de recogida de muestra y/o dicho conjunto de inmunoensayo; b) accionar dicho dispositivo fluídico y dirigir dichos reactivos de inmunoensayo dentro de dicho dispositivo fluídico; c) permitir que una muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene dicha pluralidad de analito reaccione con dichos reactivos de inmunoensayo contenidos dentro de dicho conjunto de inmunoensayo para producir una o más señales detectables indicativas de la presencia de dichos al menos dos analitos en dicha muestra; y d) detectar dicha una o más señales detectables generadas a partir de dicha pluralidad de analito recogidos en dicha muestra de fluido corporal.

Se proporciona también en la descripción un dispositivo fluídico para detectar un tipo de infección vírica por gripe. El dispositivo fluídico comprende un cartucho que comprende una pluralidad de reactivos, al menos dos de los cuales son reactivos con diferentes analitos presentes en un fluido corporal de un sujeto, en donde dichos diferentes analitos son indicativos del tipo de infección por gripe. En un aspecto, cada uno de los al menos dos agentes reaccionantes se une a una glucoproteína de superficie diferente de un virus de la gripe. La diferente glucoproteína de superficie puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en hemaglutinina y neuraminidasa. Dos cualesquiera de las siguientes glucoproteínas de superficie pueden ser los analitos diana de los al menos dos agentes reaccionantes: hemaglutinina 1, hemaglutinina 2, hemaglutinina 3, hemaglutinina 4, hemaglutinina 5, hemaglutinina 6, hemaglutinina 7, hemaglutinina 8, hemaglutinina 9, hemaglutinina 10, hemaglutinina 11, hemaglutinina 12, hemaglutinina 13, hemaglutinina 14, hemaglutinina 15, hemaglutinina 16, neuraminidasa 1, neuraminidasa 2, neuraminidasa 3, neuraminidasa 4 y neuraminidasa 5. En una realización preferida, uno de los al menos dos agentes reaccionantes se une a hemaglutinina 5 y el otro se une a neuraminidasa 1. Cuando se desee, el cartucho puede comprender además una unidad de recogida de muestra y un conjunto de ensayo. En algunos aspectos, el conjunto de ensayo es un conjunto de inmunoensayo que comprende agentes reaccionantes inmunológicos.

Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

La figura 1 es una realización que muestra múltiples componentes del presente sistema.

La Figura 2 muestra diferentes capas de un dispositivo fluido ejemplo antes del montaje.

Las Figuras 3 y 4 ilustran la red de fluidos dentro del dispositivo fluido ejemplo.

La Figura 5 una vista superior, lateral e inferior de las cámaras de reactivos ejemplares de la descripción.

5 La Figura 6 ilustra una vista lateral ejemplo de una cámara de reactivo en comunicación fluida con un dispositivo fluido.

La Figura 7 ilustra cámaras de reactivo ejemplares que están llenas con reactivos.

Las Figuras 8 y 9 ilustran una vista lateral de un dispositivo fluido ejemplo que es una combinación con elementos de accionamiento del conjunto lector.

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

La Figura 11 muestra un inmunoensayo enzimático ejemplo de quimioluminiscencia en dos etapas.

La Figura 12 muestra el aumento de la sensibilidad del inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia en dos etapas.

15 La Figura 13 muestra la capacidad de TOSCA de ensayar un número de muestras menor que el ideal y mantener la sensibilidad deseada.

La Figura 14 muestra un ELISA ejemplo.

La Figura 15 muestra un ELISA ejemplo para un virus.

Descripción detallada de la invención

20 Un aspecto de la presente descripción es un sistema para detectar un analito indicativo de una infección vírica por gripe presente en una muestra de fluido corporal. El analito puede ser indicativo de una infección vírica por gripe de tipo A, tipo B y/o tipo C. El analito puede comprender al menos una glucoproteína de superficie de virus de la gripe. Las glucoproteínas de superficie son, sin que ello pretenda ser limitante, hemaglutininas y neuraminidasas. Las proteínas de superficie de hemaglutinina incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las proteínas de superficie de neuraminidasa no limitantes
25 incluyen N1, N2, N3, N4 y N5. El analito puede comprender también un anticuerpo para una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe que es generado por el huésped infectado.

Otro aspecto de la presente descripción es un sistema para detectar una pluralidad de analitos, al menos dos de los cuales son indicativos de una infección vírica por gripe presente en una muestra de fluido corporal. Similarmente, los analitos pueden ser indicativos de una infección vírica por gripe tipo A, tipo B y/o tipo C. Los analitos pueden comprender una pluralidad de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En algunas realizaciones, la pluralidad de glucoproteínas de superficie comprende una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina puede seleccionarse del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y la neuraminidasa puede seleccionarse del grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En realizaciones preferidas de la hemaglutinina es H5 y la neuraminidasa es N1. Los analitos pueden ser también una pluralidad de anticuerpos específicos para glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. El sistema es capaz de detectar
30 y/o cuantificar los analitos de particular interés.

Un aspecto adicional de la presente descripción es un sistema para detectar una pluralidad de analitos incorporados en una única entidad, tal como una partícula de virus o una célula o fragmento de célula. En este aspecto la pluralidad de analitos es preferiblemente una combinación de analitos, al menos dos de los cuales son indicativos de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicativos de una infección vírica por gripe de tipo A, tipo B o tipo C. La pluralidad de analitos puede comprender una combinación de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En algunas realizaciones, la pluralidad de analitos puede ser una combinación de glucoproteínas de superficie que comprenden una combinación de una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina puede seleccionarse del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16, y la neuraminidasa puede seleccionarse del grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En realizaciones preferidas, la combinación de analitos está asociada con una cepa virulenta de gripe tal como la combinación de H5N1. Este aspecto de la invención es específico para detectar la combinación de la pluralidad de analitos. Puede distinguir entre infección con una cepa virulenta, tal como una combinación de H5N1, y una infección supuesta con una combinación de analitos diferente. Una variación de este aspecto de la invención es utilizar uno o más agentes reaccionantes que son reactivos con uno o más antígenos víricos (por ejemplo, anticuerpos antivíricos de glucoproteína de superficie) para capturar las partículas víricas en el sitio de reacción, y después aplicar otro conjunto de agentes reaccionantes (ya sea uno o múltiples agentes reaccionantes) para detectar específicamente las partículas víricas unidas. Un escenario ejemplo utilizará anticuerpos anti-H2
40
45
50

como los anticuerpos de captura, y anticuerpos anti-N5, preferiblemente anticuerpos anti-N5 marcados con enzima, como el reactivo de detección.

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

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

10 Otro aspecto de la presente descripción es un sistema para detectar una pluralidad de analitos, en donde al menos un analito es indicativo de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal, y en donde al menos un analito es un biomarcador en la muestra de fluido corporal indicativo de la tensión impuesta sobre el cuerpo humano por la infección vírica. El al menos un analito indicativo de infección vírica por gripe puede ser cualquier analito indicativo de una infección vírica por gripe descrito en la presente memoria. Los biomarcadores ejemplares
15 indicativos de la tensión impuesta sobre el cuerpo humano por la infección vírica incluyen, sin que ello pretenda ser limitante, CRP, TNF α , interleucinas y similares.

El presente sistema típicamente comprende un dispositivo fluídico que tienen uno o más de los siguientes componentes: una unidad de recogida de muestra, un conjunto de ensayo, un conjunto lector y un conjunto de
20 comunicación. La unidad de recogida de muestra típicamente permite que una muestra de fluido corporal recogida de un sujeto reaccione con los agentes reaccionantes contenidos con el conjunto de ensayo para generar una señal indicativa de la presencia del analito de interés. El conjunto lector detecta la señal, que después se transmite a través del conjunto de comunicación a un dispositivo externo para su procesamiento adicional.

Puede usarse cualquier fluido corporal que se sospeche que contiene un analito de interés junto con el presente sistema o dispositivos. Los fluidos corporales empleados habitualmente incluyen, aunque sin que ello pretenda ser
25 limitante, sangre, plasma, suero sanguíneo, saliva, orina, fluido gástrico y digestivo, lágrimas, deposiciones, semen, fluido vaginal, fluidos intersticiales y líquido cefalorraquídeo. En una realización preferida, los fluidos corporales se usan directamente para detectar los analitos presentes en su interior con el presente dispositivo fluídico sin procesamiento adicional. Cuando se desee, sin embargo, los fluidos corporales pueden pretratarse antes de realizar el análisis con los presentes dispositivos fluídicos. La elección de pretratamientos dependerá del tipo de fluido corporal usado y/o la naturaleza del analito que se está investigando. Por ejemplo, cuando el analito está presente a
30 un bajo nivel en una muestra de fluido corporal, la muestra puede concentrarse a través de cualquier medio convencional para enriquecer el analito. Los métodos de concentración de un analito incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, secado, evaporación, centrifugación, sedimentación, precipitación y amplificación. Cuando el analito es un ácido nucleico, puede extraerse usando diversas enzimas líticas o disoluciones químicas según los procedimientos expuestos en Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual"), o usando resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes. Cuando el analito es una molécula presente sobre o dentro de una célula, la extracción puede realizarse usando agentes de lisado que incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, un detergente desnaturizante tal como es SDS o un detergente no desnaturizante tal como Thesit[®], desoxicolato sódico, Triton[®]X-100 y TWEEN[®]20. En algunas
35 realizaciones, el pretratamiento con la muestra se consigue automáticamente dentro del dispositivo fluídico.
40

El volumen del fluido corporal que se usará con un dispositivo fluídico de la presente descripción generalmente es menor que aproximadamente 500 microlitros, típicamente entre aproximadamente 1 a 100 microlitros. Cuando se desee, puede usarse una muestra de 1 a 50 microlitros o de 1 a 10 microlitros para detectar un analito usando el presente dispositivo fluídico.

45 Un beneficio de la presente invención es que solo se requiere un volumen muy pequeño de sangre para detectar un analito de interés en animales. En algunas realizaciones, se extraen entre aproximadamente 1 microlitro y aproximadamente 50 microlitros. En la realización preferida se extraen entre aproximadamente 1 microlitro y 10 microlitros. En las realizaciones preferidas, se extraen aproximadamente 5 microlitros de sangre del sujeto.

Un fluido corporal puede extraerse de un sujeto y llevarse a un dispositivo fluídico de una diversidad de maneras, incluyendo, aunque sin que ello pretenda ser limitante, mediante punción, inyección o pipeteado. En una realización,
50 una lanceta perfora la piel y extrae la muestra hacia el dispositivo fluídico usando, por ejemplo, gravedad, acción capilar, aspiración o fuerza de vacío. La lanceta puede ser parte de un dispositivo fluídico, o parte de un conjunto lector o un componente individual. Cuando sea necesario, la lanceta puede activarse por una diversidad de mecanismos de activación mecánicos, eléctricos, electromecánicos o cualquier otro conocido o cualquier combinación de tales métodos. En otra realización, cuando no se requiere un mecanismo activo, un sujeto simplemente puede proporcionar un fluido corporal al dispositivo fluídico, por ejemplo, como podría ocurrir con una muestra de saliva. El fluido recogido puede ponerse en la unidad de recogida de muestra dentro del dispositivo fluídico. En otra realización, el dispositivo fluídico comprende al menos una microaguja que perfora la piel. La microaguja puede usarse con un dispositivo fluídico en solitario o puede perforar la piel después de que el
55

dispositivo fluido se inserte en un conjunto lector.

En algunas realizaciones, una microaguja es aproximadamente del tamaño de un cabello humano y tiene un microdepósito o cubeta integrados. La microaguja puede penetrar de forma indolora la piel de un sujeto y extraer una pequeña muestra de sangre. Más preferiblemente, la microaguja recoge de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 microlitro, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 microlitros y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 microlitros de sangre capilar. En algunas realizaciones puede construirse una microaguja de silicio que tiene un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 micrómetros de diámetros, preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 micrómetros de diámetro, y lo más preferiblemente aproximadamente 100 micrómetros de diámetro, haciendo que su aplicación a la piel sea prácticamente indolora. Para asegurar que un capilar es realmente atravesado por una aguja, puede usarse una pluralidad de microagujas para la recogida de muestra. Tales microagujas pueden ser del tipo comercializado por Pelikan (Palo Alto, Calif.) y/o Kumetrix (Union City, Calif.). La Patente de Estados Unidos N.º 6.503.231 describe microagujas que pueden usarse con la presente invención.

Los procesos de microfabricación que pueden usarse en la fabricación de las microagujas descritas en la presente memoria incluyen, sin que ello pretenda ser limitante, litografía; técnicas de mordentado tales como extracción química en húmedo, en seco y fotorresistente; oxidación térmica de silicio; galvanoplastia y galvanoplastia química; procesos de difusión tales como difusión de boro, fósforo, arsénico y antimonio; implante de iones; depósito de películas tales como evaporación (filamento, hace de electrones, flash y oscurecimiento y cobertura por etapas), bombardeo, deposición química en fase vapor (CVD), epitaxia (en fase vapor, fase líquida y haces moleculares), galvanoplastia, impresión serigráfica y laminado. Véase, de forma general, Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co. Reading Mass. 1988); Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co. Reading Mass. 1990); Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998; Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997). Alternativamente, las microagujas pueden moldearse en obleas de silicio y después chaparse usando técnicas convencionales de corte de alambre con níquel, oro, titanio o diversos otros metales biocompatibles. En algunas realizaciones, pueden crearse microagujas a partir de biopolímeros. En algunas realizaciones, las microagujas pueden fabricarse y emplearse para los dispositivos reivindicados según los métodos de Mukerjee et al., Sensors and Actuators A: Physical, Volumen 114, números 2-3, 1 sep. 2004, páginas 267-275.

En las realizaciones preferidas una microaguja solo se usa una vez y después se desecha. En algunas realizaciones, un accionador mecánico puede insertar y extraer la microaguja del sujeto, desechar la aguja usada y volver a cargar una nueva microaguja. Las tecnologías mecánicas desarrolladas y fabricadas en volúmenes muy altos para unidades de disco muy pequeñas tienen un conjunto similar de movimiento y bajos requisitos de coste. En realizaciones preferidas el accionador es un MEMS (sistema electromecánico micromecanizado) fabricado usando procesos discontinuos similares a semiconductor. Tales accionadores incluyen, sin que ello pretenda ser limitante, aleación de níquel y titanio, dispositivos neumáticos o piezoeléctricos. En algunas realizaciones, las microagujas son de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 10 micrómetros de espesor, preferiblemente de aproximadamente 2 micrómetros a aproximadamente 6 micrómetros de espesor y los más preferiblemente de aproximadamente 4 micrómetros de espesor. En algunas realizaciones, las microagujas son de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 100 micrómetros de altura, preferiblemente de aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 60 micrómetros de altura, y lo más preferiblemente de aproximadamente 40 micrómetros de altura.

La Figura 1 ilustra un sistema ejemplar de la presente descripción. Como se ilustra, un dispositivo fluido proporciona un fluido corporal de un sujeto y puede insertarse en un conjunto lector. El dispositivo fluido puede tomar una diversidad de configuraciones y, en algunas realizaciones, el dispositivo fluido puede estar en forma de un cartucho. Un detector de identificador (ID) puede detectar un identificador en el dispositivo fluido. El detector de identificador se comunica con un conjunto de comunicación a través de un controlador que transmite el identificador a un dispositivo externo. Cuando se desee, el dispositivo externo envía un protocolo almacenado en el dispositivo externo al conjunto de comunicación basado en el identificador. El protocolo que se hará funcionar en el dispositivo fluido puede comprender instrucciones para el controlador del conjunto lector para realizar el protocolo en el dispositivo fluido incluyendo, aunque sin que ello pretenda ser limitante, un ensayo particular que debe ejecutarse y un método de detección que debe realizarse. Una vez que el ensayo se ha realizado en el dispositivo fluido, una señal indicativa de un analito indicativo de una infección vírica por gripe en la muestra de fluido corporal es generada y detectada por un conjunto de detección. La señal detectada puede comunicarse entonces al conjunto de comunicaciones, donde puede transmitirse al dispositivo externo para su procesamiento incluyendo, sin que ello pretenda ser limitante, el cálculo de la concentración de analito en la muestra o la determinación de la presencia del analito.

La Figura 2 ilustra capas ejemplares de un dispositivo fluido según la presente descripción antes del conjunto del dispositivo fluido que se describe con más detalle a continuación. Las Figuras 3 y 4 muestran una vista superior e inferior, respectivamente, de un dispositivo fluido ejemplar después de que el dispositivo se haya montado. Las diferentes capas están diseñadas y están dadas para formar una red de canales para fluido tridimensionales. Una unidad de recogida de muestra 4 proporciona una muestra de fluido corporal de un sujeto. Como se explicará con

mayor quetalle a continuación, un conjunto lector comprende elementos de accionamiento (no mostrados) que pueden accionar el dispositivo fluídico para iniciar y dirigir el flujo de una muestra de fluido corporal y reactivos de ensayo en el dispositivo fluídico. En algunas realizaciones, los elementos de accionamiento provocan en primer lugar que el flujo de muestra en el dispositivo fluídico 2 de la unidad de recogida de muestra 4 a los sitios de reacción 6, mueva la muestra hacia arriba en el dispositivo fluídico del punto G' al punto G, y después a la cámara de residuos 8. Los elementos de accionamiento inician entonces el flujo de reactivos desde las cámaras de reactivos 10 al punto B', al punto C' y al punto D', después hacia arriba hacia los puntos B, C y D, respectivamente, después al punto A, hacia abajo al punto A', y después a la cámara de residuos 8 de la misma manera que la muestra.

Una unidad de recogida de muestra 4 en un dispositivo fluídico 2 puede proporcionar una muestra de fluido corporal de un sujeto por cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Si fuera necesario, la muestra puede procesarse en primer lugar diluyendo el fluido corporal en una cámara de dilución y/o puede filtrarse separando el plasma de los glóbulos rojos de la sangre en una cámara de filtración. En algunas realizaciones, la unidad de recogida de muestra, la cámara de dilución y la cámara de filtración pueden ser el mismo componente, y en algunas realizaciones pueden ser componentes diferentes, o dos cualesquiera de ellos pueden ser el mismo componente y el otro puede ser un componente diferente. En algunas realizaciones, puede haber más de una unidad de recogida de muestra en el dispositivo fluídico.

En algunas realizaciones puede ser deseable detectar la presencia de analitos en una célula o superficie vírica, dentro de una célula o membrana vírica, o dentro de una célula. La dificultad de detectar tales analitos es que las células y otros elementos formados son partículas y componentes de las células que no interactúan fácilmente con las químicas de ensayo tradicionales que están diseñadas para funcionar sobre analitos en disolución. Los analitos de la superficie celular reaccionan lentamente y de forma ineficiente con las sondas unidas a la superficie, y los analitos dentro de la célula puede que no reaccionen en absoluto con las sondas unidas. Para permitir la detección de tales analitos, en algunas realizaciones, el dispositivo fluídico puede incluir un conjunto de lisado para lisar las células presentes en la muestra de fluido corporal. El conjunto de lisado puede incorporarse con la unidad de recogida de muestra, la cámara de dilución y/o la cámara de filtración. En algunas realizaciones, la unidad de recogida de muestra, la cámara de dilución y el componente de lisado están dentro del mismo elemento en el dispositivo fluídico. En algunas realizaciones, el componente de lisado puede incorporarse con un reactivo de ensayo descrito más adelante.

Cuando se desee, los agentes de lisado pueden pre-impregnarse y después secarse en mallas porosas, mallas de fibra de vidrio, fritas sinterizadas o partículas tales como Porex, papel u otro material similar. Los agentes de lisado pueden secarse sobre superficies planas. Los agentes de lisado pueden disolverse también en diluyentes líquidos u otros reactivos líquidos. En realizaciones preferidas se usan materiales porosos para almacenar los agentes de lisado porque pueden almacenar un agente de lisado en forma seca que probablemente será muy estable. Facilitan también el mezclado de la muestra de fluido corporal con el agente de lisado proporcionando una trayectoria tortuosa para la muestra según esta se mueve a través del material poroso. En las realizaciones preferidas tales materiales porosos tienen una forma de disco con un diámetro mayor que su espesor. En algunas realizaciones, los agentes de lisado pueden secarse sobre los materiales porosos usando liofilización, evaporación pasiva, exposición a un gas fluyente seco caliente u otros métodos conocidos.

Está disponible una diversidad de agentes de lisado en la técnica y son adecuados para su uso en relación con el presente dispositivo fluídico. Los agentes de lisado preferidos son no desnaturalizantes, tales como detergentes no desnaturalizantes. Los ejemplos no limitantes de detergentes no desnaturalizantes incluyen Thesit[®], desoxicolato sódico, Triton[®]X-100 y TWEEN[®]20. Los agentes son preferiblemente no volátiles en las realizaciones donde los agentes se impregnan en materiales porosos sólidos. En algunas realizaciones los agentes de lisado se mezclan juntos. Otros materiales pueden mezclarse con los agentes de lisado para modificar los efectos líticos. Tales materiales ejemplares pueden ser, sin que ello pretenda ser limitante, tampones, sales y proteínas. En realizaciones preferidas, los agentes de lisado se usarán en cantidades que están por encima de la cantidad mínima requerida para lisar las células. En algunas realizaciones, los agentes de lisado se usarán que pueden lisar tanto glóbulos blancos como glóbulos rojos.

Una de las ventajas de la presente invención es que cualquiera de los reactivos necesarios para realizar un ensayo en un dispositivo fluídico según la presente descripción está preferiblemente sobre cartón, o alojados dentro del dispositivo fluídico antes, durante o después del ensayo. De esta manera, la única entrada o salida del dispositivo fluídico es preferiblemente la muestra de fluido corporal proporcionada inicialmente por el dispositivo fluídico. Este diseño ayuda también a crear un dispositivo fluídico fácilmente desechable donde todos los fluidos o líquidos permanecen en el dispositivo. El diseño sobre cartón también evita las fugas del dispositivo fluídico al conjunto lector que permanecería libre de contaminación del dispositivo fluídico.

En una realización preferida hay al menos una cámara de reactivo. En algunas realizaciones puede haber dos, tres, cuatro, cinco, seis o más o cualquier número de cámaras de reactivos según sea necesario para satisfacer los fines de la invención. Una cámara de reactivo está preferiblemente en comunicación fluida con al menos un sitio de reacción, y cuando el dispositivo fluídico se acciona como se describe en la presente memoria, los reactivos contenidos en dichas cámaras de reactivos se liberan a los canales para fluido dentro del dispositivo fluídico.

- Los reactivos usados en la presente invención incluyen, sin que ello pretenda ser limitante tampones de lavado, sustratos enzimáticos, tampones de dilución, conjugados, conjugados marcados con enzima, diluyentes de muestra, disoluciones de lavado, reactivos de pretratamiento de muestra incluyendo aditivos tales como detergentes, polímeros, agentes quelantes, reactivos de unión a albúmina, inhibidores enzimáticos, enzimas, anticoagulantes, agentes aglutinantes de hematíes, anticuerpos u otros materiales necesarios para ejecutar un ensayo en un dispositivo fluídico. Un conjugado enzimático puede ser cualquiera de un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima que puede producir una señal detectable tras la reacción con un sustrato apropiado. Los ejemplos no limitantes de tales enzimas son fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante. En algunas realizaciones los reactivos comprenden reactivos de inmunoensayo.
- En algunas realizaciones, una cámara de reactivo contiene aproximadamente de 50 μ l a aproximadamente 1 ml de fluido. En algunas realizaciones la cámara puede contener aproximadamente 100 μ l de fluido. El volumen de líquido en una cámara de reactivo puede variar dependiendo del tipo de ensayo que se ejecute o de la muestra de fluido corporal proporcionada. En algunas realizaciones, los reactivos se almacenan inicialmente secos y se licuan (por ejemplo, se disuelven o funden) tras iniciarse el ensayo que se ejecuta en el dispositivo fluídico.
- Las Figuras 5 y 6 ilustran una realización ejemplar de una cámara de reactivo sellada. La Figura 5 muestra una vista superior, lateral e inferior de una cámara de reactivo. Una capa superior 11 contiene una pluralidad de blísteres o bolsas 13. Una capa inferior 15 tiene una superficie inferior que está unida a la base del dispositivo fluídico 17 como se muestra en la Figura 6. La capa inferior 15 tiene una pluralidad de canales para fluido 19 dispersados a través de toda la superficie, donde cada canal atraviesa la capa inferior 15. El fluido en la cámara de reactivo está contenido dentro de la cámara mediante un sello rompible a presión 21 entre el canal para fluido 19 y la cámara 13. El sello rompible 21 está diseñado de modo que a una presión predeterminada el sello explota, permitiendo que el fluido en la cámara 13 fluya fuera a través del canal para fluido 19.
- La Figura 7 muestra un proceso ejemplar de llenado de las cámaras de reactivo 13, por ejemplo, con reactivos. Las cámaras de reactivo 13 pueden llenarse con fluido usando un canal de llenado y un canal de extracción de vacío. El proceso de llenado de los reactivos implica en primer lugar retirar todo el aire de la cámara. Esto se hace extrayendo un vacío a través del canal de extracción de vacío. Una vez que el vacío se ha extraído, se pone un sello permanente entre el canal de llenado y el canal extracción de vacío. A continuación, se dispensan los reactivos requeridos en la cámara a través del canal de llenado. Después, se pone un sello permanente entre la cámara y el canal de llenado. Esto asegura que cuando la cámara está comprimida, el fluido puede fluir solo en una dirección, hacia el sello rompible. Si la compresión confiere una presión mayor que la presión de explosión del sello, el sello explota, y el fluido fluye hacia el canal para fluido.
- Las Figuras 8 y 9 ilustran una realización de un dispositivo fluídico en funcionamiento con elementos de accionamiento como se describe en la presente memoria. El dispositivo fluídico 2 contiene una cámara de reactivo 10 y una capa de papel de aluminio rompible 12 que encierra la cámara de reactivo. Por encima del papel de aluminio rompible 12 hay una parte del circuito microfluídico 14. Una cubierta superior 16 dura, aunque elastomérica, actúa como la capa superior del dispositivo fluídico 2. El conjunto lector incluye una placa de accionamiento de válvula 18. Fijada de forma segura a la placa 18 hay una aguja sin núcleo 20, de modo que cuando la placa desciende, el borde afilado de la aguja entra en contacto con la cubierta elastomérica 16. La cubierta superior está hecha también de material de silicona flexible que actuaría como un sello impermeable a la humedad. Esta realización proporciona también una disolución para la evaporación de líquidos y filtraciones desde un dispositivo fluídico aislando cualquier reactivo líquido en el dispositivo fluídico de cualquier reactivo seco hasta que se inicie el ensayo.
- En realizaciones preferidas la cámara de reactivo y la unidad de recogida de muestra están conectados de forma fluida para los sitios de reacción donde las sondas unidas pueden detectar un analito de interés en la muestra de fluido corporal usando el ensayo. Un sitio de reacción podría proporcionar entonces una señal indicativa de la presencia del analito de interés, que puede detectarse entonces mediante un dispositivo de detección descrito en detalle a continuación en la presente memoria.
- En algunas realizaciones, los sitios de reacción son planos pero pueden tomar una diversidad de configuraciones de superficie alternativas. El sitio de reacción preferiblemente forma un soporte rígido sobre el cual puede inmovilizarse un reactante. La superficie del sitio de reacción se elige también para proporcionar características de absorción de luz apropiadas. Por ejemplo, el sitio de reacción puede ser vidrio funcionalizado, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO₂, SiN₄, silicio modificado o uno cualquiera de una amplia diversidad de geles o polímeros tales como (poli)tetrafluoroetileno, (poli)fluoruro de vinilideno, poliestireno, policarbonato, polipropileno o combinaciones de los mismos. Pueden usarse otros materiales apropiados según la presente invención.
- Un reactante inmovilizado en un sitio de reacción puede ser cualquiera que sea útil para detectar un analito de interés en una muestra de fluido corporal. Por ejemplo, tales agentes reaccionantes incluyen, sin que ello pretenda ser limitante, anticuerpos, receptores de la membrana celular, anticuerpos monoclonales y reactivos antisuero con un analito específico indicativo de una infección vírica por gripe. Pueden usarse diversos agentes reaccionantes disponibles en el mercado, tales como un huésped de anticuerpos policlonales y monoclonales desarrollado específicamente para analitos específicos.

Una clase preferida de agentes reaccionantes son los anticuerpos. Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo" (usado de forma intercambiable en la forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse de forma específica a una diana, tal como un analito en un fluido corporal, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente memoria, el término abarca no solo anticuerpos intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión, anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida.

Los presentes métodos y aparatos pueden utilizar agentes reaccionantes para anticuerpo que están disponibles en el mercado o que se generan *de novo*. Se conocen en la técnica métodos de laboratorio para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, véase Harlow y Lane, *Antibodies Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988) y Sambrook et al. (1989). Brevemente, los anticuerpos monoclonales útiles para la presente invención pueden producirse biológicamente introduciendo un antígeno de un virus de la gripe en un animal, por ejemplo un ratón o rata. Las células productoras de anticuerpos en el animal se aíslan y fusionan con las células de mieloma o células de heteromieloma para producir células híbridas o hibridomas.

Los isótopos particulares de un anticuerpo monoclonal pueden prepararse ya sea directamente, por selección a partir de la fusión inicial, o preparados secundariamente, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de diferente isotipo usando la técnica de selección sib para aislar variantes de intercambio de clase usando el procedimiento descrito en Steplewski et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 8653 o Spira et al. (1984) *J. Immunol. Methods* 74: 307.

Los agentes reaccionantes para anticuerpo pueden unirse (es decir, conjugarse) a un marcador detectable adecuado dependiendo de la reacción de ensayo particular.

En algunas realizaciones, un reactante detecta un analito indicativo de una infección vírica por gripe de tipo A, tipo B o tipo C. El analito puede comprender al menos una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe. Las glucoproteínas de superficie ejemplares, sin que ello pretenda ser limitante, son una hemaglutinina y una neuraminidasa. Las proteínas de la superficie de la hemaglutinina incluyen H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las proteínas de superficie de neuraminidasa incluyen N1, N2, N3, N4 y N5.

En algunas realizaciones, los agentes reaccionantes detectan una pluralidad de analitos, al menos dos de los cuales son indicativos de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicativos de infección vírica por gripe de tipo A, tipo B o tipo C. Los analitos pueden comprender una pluralidad de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En algunas realizaciones la pluralidad de glucoproteínas de superficie comprende una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina puede seleccionarse del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y la neuraminidasa puede seleccionarse del grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En las realizaciones preferidas, la hemaglutinina es H5 y la neuraminidasa es N1.

Un experto en la materia apreciará que hay muchas maneras de inmovilizar diversos agentes reaccionantes sobre un soporte donde puede tener lugar la reacción. La inmovilización puede ser covalente o no covalente, a través de un resto enlazador o uniéndolos a un resto inmovilizado. Estos métodos se conocen bien en el campo de la síntesis en fase sólida y micro-matrices (Beier et al., *Nucleic Acids Res.* 27: 1970-1-977 (1999)). Los restos de unión ejemplares no limitantes para fijar ya sea cualquiera de ácidos nucleicos o moléculas proteicas tales como anticuerpos a un soporte sólido incluyen uniones estreptavidina o avidina/biotina, uniones carbamato, uniones éster, amida, tioléster, tiourea funcionalizada con (N), maleimida funcionalizada, amino, disulfuro, amida, uniones hidrazona y entre otras. Además, puede fijarse un resto sililo a un ácido nucleico directamente a un sustrato tal como vidrio usando métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones hay más de un sitio de reacción que puede permitir la detección de múltiples analitos de interés de la misma muestra de fluido corporal. En algunas realizaciones hay 2, 3, 4, 5, 6 o más sitios de reacción, o cualquier otro número de sitios de reacción, según sea necesario, para llevar a cabo el propósito de la invención.

En realizaciones con múltiples sitios de reacción en un dispositivo fluídico, cada sitio de reacción puede inmovilizarse con un reactante diferente de un reactante en un sitio de reacción diferente. En un dispositivo fluídico con, por ejemplo, tres sitios de reacción, puede haber tres sondas diferentes, cada una unida a un sitio de reacción diferente para unirse a tres analitos diferentes de interés en la muestra. En algunas realizaciones puede haber diferentes agentes reaccionantes unidos a un único sitio de reacción si se usara, por ejemplo, una CCD con múltiples áreas de detección como dispositivo de detección, de modo que pudieran detectarse múltiples analitos diferentes en un único sitio de reacción. La capacidad de usar múltiples sitios de reacción además de múltiples sondas diferentes en cada sitio de reacción posibilita las características de alta capacidad de producción de la presente invención.

En realizaciones preferidas de la descripción el dispositivo fluídico incluye al menos una cámara de residuos para atrapar o capturar todos los líquidos después de que se hayan usado en el ensayo. En realizaciones preferidas, hay

más de una cámara de residuos, al menos una de las cuales tiene que usarse con un conjunto de calibrado descrito más adelante en la presente memoria. Las cámaras de residuos sobre cartón permiten también que el dispositivo sea fácilmente desechable. La cámara de residuos está preferiblemente en comunicación fluida con al menos un sitio de reacción.

- 5 Al menos uno de estos canales típicamente tendrá pequeñas dimensiones de la sección transversal. En algunas realizaciones las dimensiones son de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,03 mm a aproximadamente 3 mm, y más preferiblemente de aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 2 mm. Los canales para fluido en el dispositivo fluido pueden crearse, por ejemplo, sin que ello pretenda ser limitante, por moldeo por inyección de precisión, ataque con láser o cualquier otra técnica conocida en la técnica para llevar a cabo el propósito de la invención.

10 Para asegurar que una respuesta de ensayo dada (por ejemplo, un recuento de fotones) producido en un sitio de reacción se correlaciona con una concentración precisa de un analito de interés en una muestra, es preferiblemente ventajoso calibrar el dispositivo fluido antes de detectar la respuesta (por ejemplo, detectando fotones). El calibrado del dispositivo fluido en el punto de fabricación, por ejemplo, puede ser insuficiente para asegurar que se determina una concentración de analito precisa, porque el dispositivo fluido puede transportarse antes de su uso y puede experimentar cambios de temperatura, por ejemplo, de modo que un calibrado realizado durante la fabricación no tiene en cuenta los efectos de cualquier cambio posterior en la estructura del dispositivo fluido o los reactivos contenidos en su interior. En una realización preferida de la presente invención, un dispositivo fluido tiene un conjunto de calibrado que simula el conjunto de ensayo en cuanto a componentes y diseño, excepto que no se introduce una muestra en un conjunto de calibrado. Haciendo referencia a las Figuras 3 y 4, un conjunto de calibrado ocupa aproximadamente la mitad del dispositivo fluido 2 e incluye las cámaras de reactivos 32, los sitios de reacción 34, una cámara de residuos 36 y canales para fluido 38. De forma similar al conjunto de ensayo, el número de cámaras de reactivo y sitios de reacción puede variar dependiendo del ensayo que se ejecute en el dispositivo fluido y el número de analitos que se detecte.

25 Cuando se desee, puede proporcionarse un sensor para evaluar la fiabilidad de un ensayo para un analito en un fluido corporal con el uso del presente dispositivo fluido junto con el dispositivo fluido, el lector y/o dentro del envase del presente sistema. El sensor es capaz de detectar un cambio en los parámetros de operación bajo los cuales normalmente funciona el presente sistema. Los parámetros de operación incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, temperatura, humedad y presión, que pueden afectar al rendimiento del presente sistema.

30 Un dispositivo fluido y un conjunto lector pueden transportarse, después de la fabricación, al usuario final, juntos o individualmente. Como un conjunto lector se usa repetidamente con múltiples dispositivos fluidos, puede ser necesario tener sensores en ambos dispositivo fluido y conjunto lector para detectar tales cambios durante el transporte, por ejemplo. Durante el transporte, los cambios en la presión o temperatura pueden afectar al rendimiento de un número de componentes del presente sistema y, como tal, un sensor localizado en cualquiera del dispositivo fluido o el conjunto lector puede transmitir estos cambios, por ejemplo, el dispositivo externo, de modo que pueden hacerse ajustes durante el calibrado o durante el procesado de datos en el dispositivo externo. Por ejemplo, si la presión o temperatura de un dispositivo fluido alcanzara un cierto nivel durante el transporte, un sensor localizado en el dispositivo fluido podría detectar que este cambio había ocurrido y trasladar esta información al conjunto lector cuando este es insertado en el conjunto lector por el usuario. Puede haber un dispositivo de detección adicional en el conjunto lector para realizar esto, o tal dispositivo podría incorporarse en otro componente del sistema. En algunas realizaciones, esta información puede transmitirse de forma inalámbrica a cualquiera del conjunto lector o el dispositivo externo. Igualmente, un sensor en el conjunto lector puede detectar cambios similares. En algunas realizaciones, puede ser deseable tener un sensor en el embalaje de transporte también, ya sea en lugar de en los componentes del sistema o además de los mismos.

45 La fabricación de los canales para fluido generalmente puede llevarse a cabo por cualquier número de técnicas de microfabricación bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las técnicas litográficas se emplean opcionalmente en la fabricación de, por ejemplo, sustratos de vidrio, cuarzo o silicio, usando métodos bien conocidos en las industrias de fabricación de semiconductores tales como ataque fotolitográfico, ataque con plasma o ataque químico en húmedo. Alternativamente, los métodos de micromecanizado tales como perforación con láser, micromolienda y similares se emplean opcionalmente. Similarmente, para sustratos poliméricos, pueden usarse también técnicas de fabricación bien conocidas. Estas técnicas incluyen moldeo por inyección o métodos de moldeo por estampado, donde se producen grandes números de sustratos opcionalmente usando, por ejemplo, sellos de laminado para producir láminas más grandes de sustratos a microescala o técnicas de microcolada de polímeros, donde el sustrato se polimeriza dentro de un molde micromecanizado.

50 En algunas realizaciones, al menos una de las diferentes capas del dispositivo fluido puede construirse de sustratos poliméricos. Algunos ejemplos no limitantes de materiales poliméricos incluyen poliestireno, policarbonato, polipropileno, polidimetilsiloxanos (PDMS), poliuretano, cloruro de polivinilo (PVC) y polisulfona.

60 El dispositivo fluido puede fabricarse por estampado, enlace térmico, adhesivo, o en el caso de ciertos sustratos, por ejemplo, sustratos de vidrio, o poliméricos semi-rígidos o no rígidos, por adhesión natural entre los dos componentes. En algunas realizaciones el dispositivo fluido se fabrica por soldadura por ultrasonidos o acústica.

La Figura 2 muestra una realización de la descripción en la cual el dispositivo fluidoico 2 está comprendido por 7 capas. Los elementos que se muestran, por ejemplo, se cortan en el sustrato polimérico de modo que cuando las capas se posicionan apropiadamente cuando se ensamblan formarán una red fluida. En algunas realizaciones pueden usarse más o menos capas para construir un dispositivo fluidoico para llevar a cabo el fin de la invención.

5 Un objetivo de la presente descripción es prevenir que el fluido dentro de un dispositivo fluidoico entre en contacto con los componentes de un conjunto lector que puede ser necesario que permanezca seco y/o no contaminado y también prevenir la contaminación a un dispositivo de detección dentro del conjunto lector. Una fuga en el dispositivo fluidoico podría dar como resultado que líquidos, por ejemplo, reactivos o residuos, escapen del dispositivo fluidoico y contaminen el lector. En otras realizaciones, podría ponerse un material absorbente líquido, tal como materiales
10 poliméricos encontrados en pañales, dentro de una parte del canal para fluido o cámara de residuos para absorber el líquido residual. Un ejemplo no limitante de tal polímero es poliacrilato sódico. Tales polímeros pueden absorber cientos de veces su peso de fluidos. Por tanto, pueden requerirse solo cantidades mínimas de tales materiales poliméricos para conseguir el objetivo de absorber los fluidos fugados. En algunas realizaciones, una cámara de residuos se llena con un material superabsorbente. En algunas realizaciones, el líquido que se filtra puede
15 convertirse en un gel u otra forma sólida o semisólida.

Otro objetivo del presente sistema es proporcionar un dispositivo fluidoico que puede ejecutar una diversidad de ensayos en un dispositivo fluidoico. Un protocolo dependiente de la identidad del dispositivo fluidoico puede transferirse de un dispositivo externo, donde este puede almacenarse, a un conjunto lector para posibilitar que el conjunto lector lleve a cabo el protocolo específico en el dispositivo fluidoico. En realizaciones preferidas, el
20 dispositivo fluidoico tiene un identificador (ID) que es detectado o leído por un detector de identificador descrito en la presente memoria. El identificador puede comunicarse entonces con un conjunto de comunicación, donde este puede transferirse o transmitirse a un dispositivo externo.

En algunas realizaciones el identificador puede ser un identificador de código de barras con una serie de líneas negras y blancas, que pueden ser leídas por un detector de identificador tal como un lector de código de barras, que se conocen bien. Otros identificadores podrían ser una serie de valores alfanuméricos, colores, protuberancias, o cualquier otro identificador que pueda estar localizado en un dispositivo fluidoico y que pueda detectarse o leerse por un detector de identificador. En algunas realizaciones, el identificador puede comprender un dispositivo de
25 almacenamiento o memoria y puede transmitir información a un detector de identificación. En algunas realizaciones pueden usarse ambas técnicas.

30 Una vez que una muestra de fluido corporal se proporciona a un dispositivo fluidoico, este se inserta en un conjunto lector. En algunas realizaciones el dispositivo fluidoico se inserta parcialmente de forma manual y, después, un interruptor mecánico en el conjunto lector sitúa apropiadamente de forma automática el dispositivo fluidoico dentro del conjunto lector. Puede usarse también cualquier otro mecanismo conocido en la técnica para insertar un disco o cartucho en un dispositivo. En algunas realizaciones puede requerirse solo inserción manual.

35 En algunas realizaciones, el conjunto lector comprende un detector de identificador para detectar o leer un identificador en el dispositivo fluidoico, un controlador para controlar automáticamente el conjunto de detección y también componentes mecánicos del conjunto lector, por ejemplo, bombas y/o válvulas para controlar o dirigir el fluido a través del dispositivo fluidoico, un dispositivo de detección para detectar una señal creada por la ejecución de un ensayo en el dispositivo fluidoico, y un conjunto de comunicación para comunicarse con un dispositivo externo.

40 Un detector de identificador detecta un identificador en el dispositivo fluidoico que está comunicado con un conjunto de comunicación. En algunas realizaciones, el detector de identificador puede ser un dispositivo similar a un escáner de código de barras, que lee un código de barras en un dispositivo fluidoico. El detector de identificador puede ser también un LED que emite luz que puede interactuar con un identificador que refleja la luz y que es medida por el detector de identificador para determinar la identidad de un dispositivo fluidoico.

45 En las realizaciones preferidas, el conjunto lector aloja un controlador que controla una bomba y una serie de válvulas para controlar y dirigir el flujo de líquido dentro del dispositivo fluidoico. En algunas realizaciones el conjunto lector puede comprender múltiples bombas. La muestra y los reactivos preferiblemente se empujan a través de los canales para fluido mediante una fuerza de vacío creada por la abertura y cierre secuencial de al menos una válvula mientras se activa una bomba dentro del conjunto lector. Se conocen bien los métodos de uso de al menos una
50 válvula y al menos una bomba para crear una fuerza de vacío. Aunque puede usarse una fuerza de empuje negativa, una fuerza de empuje positiva puede ser generada también por al menos una bomba y válvula según la presente invención. En otras realizaciones el movimiento del fluido en el dispositivo fluidoico puede ser por acción electro-osmótica, capilar, piezoeléctrica o microaccionadora.

Las Figuras 8 y 9 ilustran una secuencia ejemplar para iniciar el flujo de un reactivo dentro del dispositivo fluidoico. Una placa de accionamiento 18 en el conjunto lector comprende una aguja sin núcleo o pasador 20 que cuando se
55 baja flexiona la cubierta superior 16, que está fabricada preferiblemente de un material elastomérico fuerte y flexible. Sin embargo, la lámina de ruptura fácil 12 se rompe entonces debido a la tensión inducida por la flexión de la cubierta superior 16. Las válvulas localizadas aguas abajo de la cámara de reactivo perforan diferentes áreas de la lámina en el dispositivo fluidoico y después pueden trabajar en tándem con una bomba dentro del conjunto lector para

crear una fuerza de vacío para extraer el reactivo de la cámara de reactivo 6 en un canal para fluido y después dirigir el flujo del reactivo a un sitio de reacción. Al menos una válvula está conectada fluidamente, preferiblemente a una bomba alojada dentro del conjunto lector. La aguja sin núcleo o pasador 20 se retira del dispositivo fluídico cuando el dispositivo se retira del conjunto lector. Una de las ventajas de esta realización es que no se requiere una bomba en un chip, lo que al menos disminuye el tamaño y el coste del dispositivo fluídico y permite que el dispositivo sea desechable.

Un conjunto de reacción preferiblemente aloja un conjunto de detección para detectar una señal producida por al menos un ensayo en el dispositivo fluídico. La Figura 1 ilustra una posición ejemplar de un dispositivo de detección de la presente invención con respecto al dispositivo fluídico que está por debajo del dispositivo fluídico. El conjunto de detección puede estar por encima del dispositivo fluídico o en una orientación diferente con respecto al dispositivo fluídico basándose, por ejemplo, en el tipo de ensayo que se realice y el mecanismo de detección que se emplee.

En realizaciones preferidas, se usa un detector óptico como el dispositivo de detección. Los ejemplos no limitantes incluyen un fotodiodo, un tubo fotomultiplicador (PMT), un detector de recuento de fotones o un dispositivo acoplado a carga (CCD). En algunas realizaciones puede usarse un diodo PIN. En algunas realizaciones, un diodo PIN puede estar acoplado a un amplificador para crear un dispositivo de detección con una sensibilidad comparable a un PMT. Algunos ensayos pueden generar luminiscencia como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones se detecta la quimioluminiscencia. En algunas realizaciones un conjunto de detección podría incluir una pluralidad de cables de fibra óptica conectados como un haz a un detector de CCD o a una matriz de PMT. El haz de fibra óptica puede estar construido por fibras discretas o por muchas fibras pequeñas fusionadas juntas para formar un haz sólido. Tales haces sólidos están disponibles en el mercado y pueden interactuar fácilmente con los detectores de CCD.

En algunas realizaciones, el sistema de detección puede comprender detectores o sensores no ópticos para detectar un parámetro particular de un sujeto. Tales sensores pueden incluir temperatura, conductividad, potenciometría y amperometría, para compuestos que se oxidan o reducen, por ejemplo, O₂, H₂O₂ e I₂, o compuestos orgánicos oxidables/reducibles.

Un conjunto de comunicación se aloja preferiblemente dentro del conjunto lector y es capaz de transmitir y recibir información de forma inalámbrica desde un dispositivo externo. Tal comunicación inalámbrica puede ser tecnología Bluetooth o RTM. Pueden utilizarse diversos métodos de comunicación, tales como conexión de acceso telefónico por cable con un módem, un enlace directo tal como un T1, ISDN o línea de cable. En realizaciones preferidas se establece una conexión inalámbrica usando redes inalámbricas ejemplares tales como redes celulares, satélite o de localizador, GPRS o un sistema local de transporte de datos tal como Ethernet o anillo de Token sobre una red de área local. En algunas realizaciones, la información se encripta antes de transmitirla por una red inalámbrica. En algunas realizaciones el conjunto de comunicación puede contener un componente de comunicación por infrarrojos inalámbrico para enviar y recibir información.

En algunas realizaciones el conjunto de comunicación puede tener un dispositivo de memoria o almacenamiento, por ejemplo una RAM localizada, en la que puede almacenarse la información recogida. Puede requerirse un dispositivo de almacenamiento si la información no puede transmitirse en un momento dado debido, por ejemplo, a una incapacidad temporal de conexión inalámbrica a una red. La información puede estar asociada con el identificador del dispositivo fluídico en el dispositivo de almacenamiento. En algunas realizaciones el conjunto de comunicación puede retroenviar la información almacenada después de cierta cantidad de tiempo. En algunas realizaciones, el dispositivo de memoria puede almacenar la información durante un periodo de diez días antes de borrarla.

En las realizaciones preferidas, un dispositivo externo se comunica con el conjunto de comunicación dentro del conjunto lector. Un dispositivo externo puede comunicarse inalámbricamente con un conjunto lector, pero también puede comunicarse con una tercera parte incluyendo, sin que ello pretenda ser limitante, un paciente, personal médico, personal clínico, personal de laboratorio u otros en la industria del cuidado de la salud.

En algunas realizaciones, el dispositivo externo puede ser un sistema informático, un servidor u otro dispositivo electrónico capaz de almacenar información o de procesar información. En algunas realizaciones el dispositivo externo incluye uno o más sistemas informáticos, servidores u otros dispositivos electrónicos capaces de almacenar información o procesar información. En algunas realizaciones, un dispositivo externo puede incluir una base de datos de la información en cuestión, por ejemplo, aunque sin que ello pretenda ser limitante, registros médicos o historial del sujeto, registros de ensayos clínicos o registros de ensayos preclínicos. En realizaciones preferidas, un dispositivo externo almacena protocolos para ejecutar en un dispositivo fluídico que pueden transmitirse al conjunto de comunicación de un conjunto lector cuando este ha recibido un identificador indicando qué dispositivo fluídico se ha insertado en el conjunto lector. En algunas realizaciones, un protocolo puede ser dependiente de un identificador del dispositivo fluídico. En algunas realizaciones, el dispositivo externo almacena más de un protocolo para cada dispositivo fluídico. En otras realizaciones la información en cuestión en el dispositivo externo incluye más de un protocolo. En realizaciones preferidas el servidor externo almacena algoritmos matemáticos para procesar un recuento de fotones enviado desde un conjunto de comunicación y, en algunas realizaciones, calcula la

concentración de analito en una muestra de fluido corporal.

5 En algunas realizaciones, el dispositivo externo puede incluir uno o más servidores como se conoce en la técnica y están disponibles en el mercado. Tales servidores pueden proporcionar un equilibrio de carga, gestión de tareas y capacidad de copia de seguridad, en el caso de fallo de uno o más de los servidores u otros componentes del dispositivo externo, para mejorar la disponibilidad del servidor. Un servidor puede implementarse también en una red distribuida de unidades de almacenamiento y procesadoras, como se sabe en la técnica, en donde el procesamiento de datos según la presente invención reside en estaciones de trabajo tales como ordenadores, eliminando de esta manera la necesidad de un servidor.

10 Un servidor puede incluir una base de datos y procesos de sistema. Una base de datos puede residir dentro del servidor, o puede residir en otro sistema servidor que sea accesible al servidor. Puesto que la información de la base de datos puede contener información sensible, puede implementarse un sistema de seguridad que evite que usuarios no autorizados accedan a la base de datos.

15 Una ventaja de la presente descripción es que la información puede transmitirse desde el dispositivo externo de vuelta no solo al conjunto lector, sino a otras partes u otros dispositivos externos, por ejemplo, sin que ello pretenda ser limitante, una PDA o un teléfono móvil. Tal comunicación puede conseguirse mediante una red inalámbrica como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, puede enviarse una concentración de analito calculada u otra información actual, por ejemplo, aunque sin que ello pretenda ser limitante, al personal médico o al sujeto.

Métodos de uso

20 El presente aparato y sistemas proporcionan un medio eficaz para detección en tiempo real de analitos indicativos de una infección vírica por gripe presentes en un fluido corporal de un sujeto.

25 Un aspecto de la presente descripción es un método para detectar un analito indicativo de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal. El analito puede ser indicativo de una infección vírica por gripe de tipo A, tipo B o tipo C. El analito puede comprender al menos una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe. Las glucoproteínas de superficie ejemplares son, sin que ello pretenda ser limitante, una hemaglutinina y una neuraminidasa. Las proteínas de superficie hemaglutinina incluyen H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las proteínas de superficie neuraminidasa incluyen N1, N2, N3, N4 y N5. El analito puede comprender también un anticuerpo para una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe.

30 Un aspecto de la presente descripción es un método para detectar una pluralidad de analitos, al menos dos de los cuales son indicativos de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicativos de una infección vírica por gripe de tipo A, tipo B o tipo C. Los analitos pueden comprender una pluralidad de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En algunas realizaciones, la pluralidad de glucoproteínas de superficie comprende una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina puede seleccionarse del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16, y la neuraminidasa puede seleccionarse del grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En realizaciones preferidas, el método detecta tanto hemaglutinina H5 como neuraminidasa N1. En una realización el método proporciona la detección de H5 y N1 en las mismas partículas víricas (véase la Figura 15).

35 Un aspecto adicional de la presente descripción es un método para detectar una pluralidad de analitos incorporados en una única entidad tal como una partícula vírica o una célula o fragmento de célula. En este aspecto, la pluralidad de analitos son preferiblemente una combinación o complejo de analitos, al menos dos de los cuales son indicativos de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicativos de una infección vírica por gripe de tipo A, tipo B o tipo C. La pluralidad de analitos puede comprender una combinación o complejo de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En algunas realizaciones la pluralidad de analitos puede ser una combinación de glucoproteínas de superficie que comprende una combinación de una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina puede seleccionarse del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y la neuraminidasa puede seleccionarse del grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En realizaciones preferidas, la combinación de analitos está asociada con una cepa virulenta de la gripe, tal como la combinación H5N1. Este aspecto de la descripción es específico para detectar la combinación de la pluralidad de analitos. Puede distinguir entre infección con una cepa virulenta, tal como una combinación de H5N1, e infección supuesta con una combinación diferente de analitos.

40 En algunas realizaciones, el método detecta una pluralidad de anticuerpos humanos para antígenos víricos, tal como anticuerpos para glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe.

45 En algunas realizaciones, el analito de interés puede ser un complejo de un analito indicativo de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal y un anticuerpo humano para el analito. El analito puede ser cualquier analito indicativo de una infección vírica por gripe descrito en la presente memoria, aunque es preferiblemente la hemaglutinina H5, la neuraminidasa N1 o el complejo de las glucoproteínas de superficie H5 y N1.

50 Otro aspecto de la presente descripción es un método para detectar una pluralidad de analitos, en donde al menos

un analito es indicativo de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal, y en donde al menos un analito es un biomarcador en la muestra de fluido corporal indicativo de la tensión impuesta sobre el cuerpo humano por la infección vírica o un indicador de la respuesta del cuerpo a la infección. El al menos un analito indicativo de una infección vírica por gripe puede ser cualquier analito indicativo de una infección vírica por gripe descrito en la presente memoria. Los biomarcadores ejemplares indicativos de la tensión impuesta sobre el cuerpo humano por la infección vírica incluyen, sin que ello pretenda ser limitante, CRP, TNF α , interleucinas y similares. Los biomarcadores ejemplares indicativos de la reacción defensiva del cuerpo frente al virus incluyen anticuerpos para el virus, particularmente del isotipo IgM.

El presente aparato y sistemas tienen un espectro de utilidad, por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedades y detección de enfermedades.

Por consiguiente, en una realización, la presente descripción proporciona un método para detectar un analito indicativo de una infección del virus de la gripe en un fluido corporal de un sujeto que comprende proporcionar un dispositivo fluídico que comprende al menos una unidad de recogida de muestra, un conjunto de inmunoensayo que contiene reactivos de inmunoensayo, una pluralidad de canales en comunicación fluida con dicha unidad de recogida de muestra y/o dicho conjunto de inmunoensayo; accionar dicho dispositivo fluídico y dirigir dichos reactivos de inmunoensayo dentro de dicho dispositivo fluídico; permitir que una muestra de fluido corporal, que se sospecha que contiene dicho analito, reaccione con dichos reactivos de inmunoensayo contenidos dentro de dicho conjunto de inmunoensayo para producir una señal detectable indicativa de la presencia de dicho analito en dicho fluido corporal; y detectar dicha señal detectable generada por dicho analito inicialmente recogido en dicha muestra de fluido corporal. Preferiblemente, se usa una muestra de fluido corporal de menos de aproximadamente 500 μ l para una o más de estas aplicaciones.

Como se usa en la presente memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable, y hacen referencia a un animal, preferiblemente una especie de ave (pájaro) o de mamífero (por ejemplo, un ser humano). El término aviar como se usa en la presente memoria incluye aves de corral. Los mamíferos incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, murinos, simios, seres humanos, animales de granja, animales para deporte y animales de compañía.

Como se usa en la presente memoria, en algunos aspectos, los términos "reactivos" y "agentes reaccionantes" se usan de forma intercambiable.

En algunas realizaciones, puede proporcionarse en primer lugar una muestra de fluido corporal al dispositivo fluídico por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. El dispositivo fluídico puede insertarse después en el conjunto lector. Un detector de identificación alojado dentro del conjunto lector puede detectar un identificador del dispositivo fluídico y comunicar el identificador a un conjunto de comunicación, que está alojado preferiblemente dentro del conjunto lector. El conjunto de comunicación transmite entonces el identificador a un dispositivo externo que transmite un protocolo a ejecutar en el dispositivo fluídico basado en el identificador al conjunto de comunicación. Un controlador preferiblemente alojado dentro del conjunto lector controla los elementos de accionamiento que incluyen al menos una bomba y una válvula que interactúan con el dispositivo fluídico para controlar y dirigir el movimiento del fluido dentro del dispositivo. En algunas realizaciones, la primera etapa del ensayo es un ciclo de lavado donde todas las superficies dentro del dispositivo fluídico se humedecen usando un tampón de lavado. El dispositivo fluídico se calibra después usando un conjunto de calibrado haciendo circular los mismos reactivos que se usarán en el ensayo a través de los sitios de reacción de calibrado, y después una señal de luminiscencia desde los sitios de reacción es detectada por el medio de detección, y la señal se usa para calibrar el dispositivo fluídico. La muestra que contiene el analito se introduce en el canal para fluido. La muestra puede diluirse y separarse adicionalmente en plasma u otro componente deseado en un filtro. La muestra separada fluye ahora a través de los sitios de reacción y los analitos presentes en la misma se unirán a los agentes reaccionantes unidos sobre la misma. El plasma del fluido de muestra después se retira por lavado de los pocillos de reacción a una cámara de residuos. Dependiendo del ensayo que se ejecute, los reactivos apropiados se dirigen a través de los sitios de reacción para llevar a cabo el ensayo. Todos los tampones de lavado y otros reactivos usados en las diversas etapas, incluyendo la etapa de calibrado, se recogen en tanques de lavado. La señal producida en los sitios de reacción es detectada después por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

Puede realizarse una diversidad de ensayos en un dispositivo fluídico según la presente descripción para detectar un analito de interés en una muestra. Está disponible en la técnica una amplia diversidad de marcadores que pueden emplearse para conducir los presentes ensayos. En algunas realizaciones, los marcadores son detectables por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores de ácido nucleico útiles incluyen ³²P, ³⁵S, tintes fluorescentes, reactivos de alta densidad de electrones, enzimas, biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas para los cuales están disponibles anticuerpos antisuero o monoclonales. Se conoce una amplia diversidad de marcadores adecuados para marcar componentes biológicos y se informa de ellos de forma extensiva en la bibliografía tanto científica como de patentes, y generalmente son aplicables a la presente invención para el marcado de componentes biológicos. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores calorimétricos o partículas magnéticas. Los agentes de marcado opcionalmente incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anticuerpos policlonales, proteínas u otros

5 polímeros tales como matrices de afinidad, carbohidratos o lípidos. La detección transcurre por cualquiera de una diversidad de métodos conocidos, incluyendo espectrofotométricos o de seguimiento óptico de marcadores radioactivos o fluorescentes u otros métodos que siguen una molécula basándose en tamaño, carga o afinidad. Un resto detectable puede ser de cualquier material que tenga una propiedad química o física detectable. Tales marcadores detectables se han desarrollado bien en el campo de la electroforesis en gel, cromatografía en columna, sustratos sólidos, técnicas espectroscópicas y similares, y en general, los marcadores útiles en tales métodos pueden aplicarse a la presente invención. De esta manera, un marcador incluye, sin que ello pretenda ser limitante, cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, eléctricos, ópticos, térmicos o químicos.

10 En algunas realizaciones el marcador está acoplado directa o indirectamente a una molécula que se va a detectar, tal como un producto, sustrato o enzima, según métodos bien conocidos en la técnica. Como se ha indicado anteriormente, se usa una amplia diversidad de marcadores, dependiendo de la elección del marcador, de la sensibilidad requerida, de la facilidad de conjugación del compuesto, de los requisitos de estabilidad, de la instrumentación disponible y de las provisiones de evacuación. Los marcadores no radiactivos a menudo se fijan por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando se une covalentemente a un polímero. El ligando se une entonces a una molécula anti-ligando que puede detectarse de forma inherente o unirse covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Se pueden usar numerosos ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, este puede usarse junto con anti-ligandos marcados. Alternativamente, puede usarse cualquier compuesto hapténico o antigénico usado en combinación con un anticuerpo.

15 En algunas realizaciones el marcador puede estar conjugado también directamente a compuestos generadores de señal, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores fundamentalmente serán hidrolizadas, particularmente fosfatasas, esterasas y glucosidasas, u oxidoreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo y umbeliferona. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalazindionas, tales como luminol y dioxetanos.

20 Los métodos para detectar marcadores los conocen bien los expertos en la materia. Por lo tanto, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, los medios para su detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en auto-radiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, este puede detectarse excitando el fluorocromo con una longitud de onda apropiada de luz y detectando la fluorescencia resultante, por ejemplo, por microscopía, por inspección visual, por película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como cámaras digitales, dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y fototubos, u otro dispositivo de detección. Similarmente, los marcadores enzimáticos se detectan proporcionando sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, los marcadores colorimétricos sencillos a menudo se detectan de forma simple observando el color asociado con el marcador. Por ejemplo, el oro conjugado a menudo resulta ser rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

25 En algunas realizaciones, la señal detectable puede proporcionarse por fuentes de luminiscencia. La "luminiscencia" es el término usado comúnmente para referirse a la emisión de luz desde una sustancia por cualquier razón distinta de una subida en su temperatura. En general, los átomos o moléculas emiten fotones de energía electromagnética (por ejemplo, luz) cuando estos se mueven de un "estado excitado" a un estado de menor energía (normalmente el estado basal). Hay muchas causas de excitación. Si la causa de la excitación es un fotón, el proceso de luminiscencia se denomina "fotoluminiscencia". Si la causa de la excitación es un electrón, el proceso de luminiscencia se denomina "electroluminiscencia". Más específicamente, la electroluminiscencia es el resultado de la inyección directa y retirada de electrones para formar un par electrón-hueco, y recombinación posterior del par electrón-hueco para emitir un fotón. La luminiscencia resultante de una reacción química normalmente se denomina "quimioluminiscencia". La luminiscencia producida por un organismo vivo normalmente se denomina "bioluminiscencia". Si la fotoluminiscencia es el resultado de la transición permitida de espín (por ejemplo, una transición de un único singlete, transición triplete-triplete), el proceso de fotoluminiscencia normalmente se denomina "fluorescencia". Típicamente, las emisiones de fluorescencia no persisten después de que la causa de la excitación se haya retirado como resultado de estados excitados de corta duración que pueden relajarse rápidamente a través de tales transiciones permitidas de espín. Si la fotoluminiscencia es el resultado de una transición prohibida de espín (por ejemplo, una transición triplete-singlete), el proceso de fotoluminiscencia normalmente se denomina "fosforescencia". Típicamente, las emisiones de fosforescencia persisten lo suficiente después de que la causa de la excitación sea retirado o como resultado de los estados excitados de larga duración que pueden relajarse únicamente a través de tales transiciones de espín prohibidas. Un "marcador luminiscente" puede tener una cualquiera de las propiedades descritas anteriormente.

30 Las fuentes quimioluminiscentes adecuadas incluyen un compuesto que resulta excitado electrónicamente por una reacción química y que después puede emitir luz que sirve como la señal detectable o que da energía a un aceptor fluorescente. Se ha encontrado que un diverso número de familias de compuestos proporcionan quimioluminiscencia en una diversidad de condiciones. Una familia de compuestos es 2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona. Un compuesto usado frecuentemente es luminol, que es un compuesto 5-amino. Otros miembros de la familia incluyen 5-amino-6,7,8-

trimetoxi- y el análogo dimetilamino[ca]benzo. Puede hacerse que estos compuestos sean luminiscentes con peróxido de hidrógeno alcalino o hipoclorito de calcio y base. Otra familia de compuestos son los 2,4,5-trifenilimidazoles, con lofina como el nombre común del producto precursor. Los análogos quimioluminiscentes incluyen sustituyentes para-dimetilamino y -metoxi. La quimioluminiscencia puede obtenerse también con oxalatos, normalmente ésteres oxalil activos, por ejemplo, p-nitrofenilo y peróxido, tales como peróxido de hidrógeno, en condiciones básicas. Otros compuestos quimioluminiscentes útiles que se conocen también incluyen ésteres de N-alquil acridinio y dioxetanos. Alternativamente, las luciferinas pueden usarse junto con luciferasa o lucigeninas para proporcionar bioluminiscencia.

En algunas realizaciones, los inmunoensayos se ejecutan en un dispositivo fluídico. Aunque los ensayos de unión competitiva, que se conocen en la técnica, pueden ejecutarse en algunas realizaciones, en ciertas realizaciones se usan métodos en dos etapas que eliminan la necesidad de mezclar un conjugado y una muestra antes de exponer una muestra a un anticuerpo, lo que puede ser deseable cuando se usan volúmenes muy pequeños de muestra y conjugado, como en el dispositivo fluídico de la presente invención. Un ensayo de dos etapas tiene ventajas adicionales sobre los ensayos de unión competitiva cuando se usa con un dispositivo fluídico como se describe en la presente memoria. Esto combina la facilidad de uso y alta sensibilidad de un inmunoensayo intercalado (unión competitiva) con la capacidad de ensayar moléculas pequeñas.

En un ensayo ejemplar en dos etapas mostrado en la Figura 10, el analito que contiene la muestra ("Ag") fluye en primer lugar sobre un sitio de reacción que contiene anticuerpos ("Ab"). Los anticuerpos se unen al analito presente en la muestra. Después de que la muestra pase sobre la superficie, se hace pasar una disolución con analito conjugado a un marcador ("Ag marcado") a una alta concentración sobre la superficie. El conjugado satura cualquiera de los anticuerpos que no se han unido al analito. Antes de alcanzar el equilibrio y que ocurra cualquier desplazamiento del analito sin marcar pre-unido, la disolución de conjugado de alta concentración se retira por lavado. La cantidad de conjugado unido a la superficie se mide entonces por la técnica apropiada y el conjugado detectado es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Una técnica de medición ejemplar para un ensayo en dos etapas es un inmunoensayo con enzima de quimioluminiscencia como se muestra en la Figura 11. Como se sabe en el campo, el marcador puede ser un marcador disponible en el mercado, tal como dioxitiano-fosfato, que no es luminiscente pero que se hace luminiscente después de la hidrólisis, por ejemplo, mediante fosfatasa alcalina. Una enzima tal como fosfatasa alcalina se hace pasar también sobre el sustrato para provocar que el marcador alcance la luminiscencia. En algunas realizaciones, la disolución de sustrato se complementa con agentes de potenciación tales como, sin que ello pretenda ser limitante, fluoresceína en micelas mixtas, polímeros solubles o PVC, que crean una señal mucho más brillante que el luminóforo en solitario. Además, se emplea un conjugado de fosfatasa alcalina con un número de recambio mayor que el usado en el ensayo comercial. Eso permite que la generación de señal transcurra mucho más rápidamente y se consiga una señal global más alta. El aumento de sensibilidad de inmunoensayo con enzima quimioluminiscente en dos etapas (TOSCA) se ilustra en la Figura 12. La Figura 12 muestra que para analitos en la concentración de picomolar, TOSCA es capaz de proporcionar una señal más robusta (mayor sensibilidad) que un ensayo de unión competitiva. El uso de un ensayo de unión en dos etapas contribuye por tanto a capacidades de sensibilidad mayores de la presente invención.

Adicionalmente, TOSCA es menos sensible a los efectos de la matriz que otras metodologías. Esto permite que se trabaje con muestras que no se han procesado previamente de forma extensiva usando técnicas de laboratorio convencionales tales como, por ejemplo, extracción en fase sólida y cromatografía. La capacidad de TOSCA de ensayar un número de muestras menor que el ideal y mantener la sensibilidad deseada se ilustra en la Figura 13. Comparado con el ensayo de unión competitiva, para todas las preparaciones de muestra (y diluciones), TOSCA tiene una mejor sensibilidad que la unión competitiva.

Un inmunoensayo útil que puede ejecutarse en el dispositivo fluídico es ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas). La realización de un ELISA generalmente implica al menos un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno de interés (es decir, un analito que es indicativo de infección vírica por gripe). Una muestra que contiene o se sospecha que contiene el antígeno de interés se inmoviliza sobre un soporte (por ejemplo, una placa de microtitulación, un pocillo u otro soporte que tenga una superficie para inmovilización) de forma no específica (por ejemplo, por adsorción a la superficie) o específica (por ejemplo, mediante captura por otro anticuerpo específico al mismo antígeno, en un "sándwich" ELISA). Una vez inmovilizado el antígeno, se añade el anticuerpo de detección, formando complejos con el antígeno. El anticuerpo de detección puede conjugarse a una enzima o puede ser detectado él mismo por un anticuerpo secundario que a su vez está conjugado a una enzima. Tras la adición de un sustrato para la enzima conjugada, se genera una señal detectable que indica la presencia y/o cantidad de antígeno en la muestra. La elección de sustratos dependerá de la enzima conjugada. Los sustratos adecuados incluyen sustratos fluorogénicos y cromogénicos. Un experto en la materia será consciente de que los parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica.

La Figura 14 ilustra un ELISA típico. Como se muestra, una superficie de captura en fase sólida puede incluir un primer anticuerpo fijado al cual puede añadirse plasma diluido (muestra). Si está presente analito en la muestra, este puede unirse al primer anticuerpo y quedar inmovilizado. Puede añadirse un reactivo enzimático que incluye, por ejemplo, un anticuerpo acoplado o conjugado a una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina). Si la parte de

anticuerpo del reactivo enzimático puede unirse al analito, entonces el reactivo enzimático también queda inmovilizado en la superficie de captura. Además de un sustrato para la enzima puede dar como resultado un producto que produce un efecto, por ejemplo, luz que puede medirse y representarse como se muestra. De esta manera, puede medirse la cantidad de analito presente en una muestra.

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

Aunque se usan un primer y segundo antígenos diferentes (y anticuerpos) en el ejemplo ilustrado, se prevé que un único tipo de antígeno de ensayo pueda detectarse usando dos formas del mismo anticuerpo (es decir, una forma en fase sólida inmovilizada para captura de antígeno y una forma marcada con enzima para detección).

- 20 El término "analitos" usado en la presente invención incluye, sin que ello pretenda ser limitante, fármacos, profármacos, agentes farmacéuticos, metabolitos de fármaco, biomarcadores tales como proteínas expresadas y marcadores celulares, anticuerpos, antígenos, virus, proteínas del suero, colesterol, polisacáridos, ácidos nucleicos, analitos biológicos, biomarcadores, gen, proteína u hormona o cualquier combinación de los mismos. A un nivel molecular, los analitos pueden ser glucoproteína de polipéptido, polisacárido, lípido, ácido nucleico y una combinación de los mismos.

Son de interés biomarcadores asociados con una enfermedad particular o con un estadio de enfermedad específico. Tales analitos incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, aquellos asociados con enfermedades autoinmunes.

- 30 Son también de interés analitos que son indicativos de un microorganismo. Los microorganismos ejemplares incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, bacterias, virus, hongos y protozoos.

- El analito puede ser indicativo de una infección vírica por gripe de tipo A, tipo B o tipo C. El analito puede comprender al menos una glucoproteína de superficie de un virus de la gripe. Las glucoproteínas de superficie ejemplares son, sin que ello pretenda ser limitante, una hemaglutinina y una neuraminidasa. Las proteínas de superficie de hemaglutinina incluyen H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las proteínas de superficie de neuraminidasa incluyen N1, N2, N3, N4 y N5.

- Un aspecto de la presente descripción es un sistema para detectar una pluralidad de analitos, al menos dos de los cuales son indicativos de una infección vírica por gripe en una muestra de fluido corporal. Los analitos pueden ser indicativos de una infección vírica por gripe del tipo A, tipo B o tipo C. Los analitos pueden comprender una pluralidad de glucoproteínas de superficie de un virus de la gripe. En algunas realizaciones la pluralidad de glucoproteínas de superficie comprende una hemaglutinina y una neuraminidasa. La hemaglutinina puede seleccionarse del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y la neuraminidasa puede seleccionarse del grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5. En realizaciones preferidas, la hemaglutinina es H5 y la neuraminidasa es N1. El sistema es capaz de detectar y/o cuantificar los analitos de particular interés.

- 45 Detectando la presencia de antígenos víricos o anticuerpos para los antígenos, por ejemplo, el dispositivo fluídico puede detectar la presencia de un tipo de virus de la gripe en la muestra de fluido corporal del sujeto.

- Los analitos que pueden detectarse por el presente método incluyen también patógenos de transmisión hemática seleccionados de un grupo no limitativo que consiste en *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (MSRA) resistente a metilicina, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus pneumoniae* y *Candida albicans*.

- Los analitos que pueden detectarse por el presente método abarcan también una diversidad de enfermedades de transmisión sexual seleccionadas de entre las siguientes: gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*), sífilis (*Treponema pallidum*), clamidia (*Chlamydia trachomatis*), uretritis agónica (*Ureaplasma urealyticum*), infección por levaduras (*Candida albicans*), candroide (*Haemophilus ducreyi*), tricomoniasis (*Trichomonas vaginalis*), herpes genital (VSH tipo I y II), VIH I, VIH II y hepatitis A, B, C, G, así como hepatitis causada por TTV.

Se prevé que en algunas realizaciones la presente invención proporcione la supervisión de una infección por

- patógeno ya sea directamente por detección del patógeno o indirectamente, por ejemplo, por detección de un analito asociado con un patógeno (por ejemplo, un antígeno vírico) o incluso por detección de un anticuerpo para un componente o producto asociado con un patógeno (por ejemplo, un anticuerpo para un antígeno vírico). Se prevé también que un patógeno pueda detectarse indirectamente a través de una respuesta inmunitaria al patógeno. La detección del patógeno puede realizarse en una muestra de ensayo de un sujeto que es asintomático o sintomático para el patógeno. La detección del patógeno puede realizarse sobre una muestra de ensayo de un sujeto antes, durante o después de la infección con el patógeno. Como tal, se prevé que puede supervisarse una infección en fase temprana (por ejemplo, en algunos casos, una infección asintomática), o cualquier fase tardía de infección para el patógeno de interés.
- Puede detectarse un amplio intervalo de concentraciones de patógeno en una muestra de un sujeto, ya sea directa o indirectamente, como se ha analizado anteriormente usando la invención. La cantidad de patógeno presente en una muestra de ensayo puede expresarse en cualquiera de un número de maneras bien conocidas en la técnica. A modo de ejemplos no limitantes, el número de patógenos puede expresarse como carga vírica (por ejemplo, donde la infección es una infección vírica), unidades infecciosas (UI), y/o unidades infecciosas por millón de células o mililitro (UIPM). En un ejemplo, se prevé que los patógenos puedan detectarse en una muestra de ensayo en una concentración desde 100 UI por ml de muestra hasta 1×10^9 UI por ml de muestra usando la invención. En otro ejemplo pueden detectarse patógenos desde 100 UI por ml de muestra hasta 1000 UI por ml de muestra usando la invención. En otro ejemplo más los patógenos pueden detectarse desde 1000 UI por ml de muestra hasta 1×10^6 UI por ml de muestra usando la invención.
- En una realización diferente, la presente descripción proporciona un método de supervisión de más de un parámetro farmacológico útil para evaluar la eficacia y/o toxicidad de un agente terapéutico contra la gripe. El método comprende someter una muestra de fluido corporal de un sujeto al que se ha administrado el agente terapéutico contra la gripe a un dispositivo fluídico, para supervisar dicho más de un parámetro farmacológico, comprendiendo dicho dispositivo fluídico al menos una unidad de recogida de muestra y un conjunto de ensayo que comprende reactivos de reacción; accionar dicho dispositivo fluídico y dirigir dichos reactivos de inmunoensayo dentro de dicho dispositivo fluídico; permitir que dicha muestra de fluido corporal reaccione con los reactivos de inmunoensayo para producir señales detectables significativas de los valores de más de un parámetro farmacológico de dicha muestra; y detectar dicha señal detectable generada a partir de dicha muestra de fluido corporal. Cuando se desee, el método implica además repetir las etapas en un intervalo de tiempo provocadas por una señal inalámbrica comunicada al sujeto.
- Para los fines de esta invención, un "agente terapéutico" pretende incluir cualquier sustancia que tenga utilidad y/o potencial terapéutico. Tales sustancias incluyen, aunque sin que ello pretenda ser limitante, compuestos biológicos o químicos tales como moléculas orgánicas o inorgánicas, sencillas o complejas, péptidos, proteínas (por ejemplo anticuerpos) o polinucleótidos (por ejemplo antisentido). Puede sintetizarse un gran conjunto de compuestos, por ejemplo polímeros, tales como polipéptidos y polinucleótidos, y compuestos orgánicos sintéticos basados en diversas estructuras de núcleo, y estos están incluidos también en el término "agente terapéutico". Además, diversas fuentes naturales pueden proporcionar compuestos para identificación, tales como extractos vegetales o animales, y similares. Debe entenderse, aunque no siempre se indica explícitamente, que el agente se usa en solitario o en combinación con otro agente, que tiene la misma o diferente actividad biológica que los agentes identificados por identificador inventivo. Los agentes y métodos pretenden también combinarse con otras terapias.
- Los parámetros farmacodinámicos (PD) según la presente invención incluyen, sin que ello pretenda ser limitante, parámetros físicos tales como temperatura, frecuencia cardiaca/pulso, presión sanguínea y ritmo respiratorio y biomarcadores tales como proteínas, células y marcadores celulares. Los biomarcadores podrían ser indicativos de enfermedad o podrían ser el resultado de la acción de un fármaco. Los parámetros farmacocinéticos (PK) según la presente invención incluyen, sin que ello pretenda ser limitante, concentración de fármaco y de metabolito de fármaco. Identificar y cuantificar los parámetros PK en tiempo real de un volumen de muestra es extremadamente deseable para la apropiada seguridad y eficacia de los fármacos. Si las concentraciones de fármaco y metabolito están fuera del intervalo deseado y/o se generan metabolitos inesperados debido a una reacción inesperada con el fármaco, puede ser necesaria una acción inmediata para asegurar la seguridad del sujeto. Similarmente, si cualquiera de los parámetros farmacodinámicos (PD) cae fuera del intervalo deseado durante un régimen de tratamiento, puede tomarse también una acción inmediata.
- En las realizaciones preferidas, los datos de parámetros físicos se almacenan o se comparan para almacenar perfiles de datos de parámetro físico en un sistema bioinformático que puede estar en un dispositivo externo que incorpora datos farmacogenómicos y farmacocinéticos en sus modelos para la determinación de la toxicidad y dosificación. Esto no solo genera datos para ensayos clínicos años antes de los procesos actuales, sino que posibilita la eliminación de las disparidades actuales entre eficacia aparente y toxicidad real de fármacos a través de una supervisión continua en tiempo real. Durante el proceso de decisión de ir/no ir en estudios clínicos, pueden realizarse estudios de población comparativos a gran escala con los datos almacenados en la base de datos. Esta compilación de datos y supervisión en tiempo real permite que más sujetos entren en los ensayos clínicos de una manera segura más pronto de lo que actualmente se permite. En otra realización los biomarcadores descubiertos en estudios de tejido humano pueden ser dirigidos por el dispositivo para una precisión mejorada de la determinación de trayectorias de fármaco y eficacia en estudios del cáncer.

En otra realización, la presente descripción proporciona un método para detectar al menos dos analitos distintos indicativos de una infección vírica por gripe de diferentes concentraciones en un fluido corporal de un sujeto comprende proporcionar un dispositivo fluido que comprende una unidad de recogida de muestra, un conjunto de ensayo, y una pluralidad de canales en comunicación fluida con dicha unidad de recogida de muestra y/o dicho conjunto de ensayo; permitir que una muestra de un fluido corporal reaccione con una pluralidad de agentes reaccionantes contenidos en dicho conjunto de ensayo para producir señales indicativas de las concentraciones de dichos al menos dos analitos; y detectar dichas señales que son indicativas de la presencia o ausencia de los al menos dos analitos distintos, en donde dichas señales son detectables sobre un intervalo de 3 órdenes de magnitud.

Actualmente, existe una necesidad de detectar más de un analito indicativo de una infección vírica por gripe donde los analitos están presentes en un intervalo de concentración ampliamente variable, por ejemplo, un analito está en la concentración de pg/ml y otro está en la concentración de ng/ml. Quimioluminiscencia-ELISA tiene la capacidad de ensayar simultáneamente analitos que están presentes en la misma muestra en un amplio intervalo de concentración. Otra ventaja de poder detectar concentraciones de diferentes analitos presentes en un amplio intervalo de concentración es la capacidad de relacionar las razones de la concentración de estos analitos con la seguridad y eficacia de múltiples fármacos administrados a un sujeto. Por ejemplo, las interacciones fármaco-fármaco inesperadas pueden ser una causa común de reacciones adversas del fármaco. Una técnica de medición corriente en tiempo real para medir diferentes analitos ayudaría a evitar la potencialmente desastrosa consecuencia de interacciones adversas fármaco-fármaco.

Poder supervisar la velocidad de cambio de la concentración de un analito o PD o PK durante un periodo de tiempo en un único sujeto, o realizar un análisis de tendencia sobre la concentración, PD o PK, ya sea concentraciones de fármacos o sus metabolitos, puede ayudar a prevenir situaciones potencialmente peligrosas. Por ejemplo, si la glucosa fuera el analito de interés, la concentración de glucosa en una muestra en un momento dado, así como la tasa de cambio de la concentración de glucosa durante un periodo dado de tiempo podría ser muy útil para predecir y evitar, por ejemplo, acontecimientos hipoglucémicos. Tal análisis de tendencia tiene implicaciones beneficiosas extensas sobre el régimen de dosificación de fármaco. Cuando están implicados múltiples fármacos y sus metabolitos, a menudo es deseable la capacidad de indicar una tendencia y tomar medidas proactivas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para realizar un análisis de tendencia sobre la concentración de un analito indicativo de una infección vírica por gripe en un sujeto. El método comprende a) proporcionar un dispositivo fluido que comprende al menos una unidad de recogida de muestra, un conjunto de inmunoensayo que contiene reactivos de inmunoensayo, una pluralidad de canales en comunicación fluida con dicha unidad de recogida de muestra y/o dicho conjunto de inmunoensayo; b) accionar dicho dispositivo fluido y dirigir dichos reactivos de inmunoensayo dentro de dicho dispositivo fluido; c) permitir que una muestra de fluido corporal reaccione con dichos reactivos de inmunoensayo contenidos dentro de dicho conjunto de inmunoensayo para producir una señal detectable indicativa de la presencia de dicho analito en dicha muestra; d) detectar dicha señal detectable generada a partir de dicho analito recogido en dicha muestra de fluido corporal; y e) repetir las etapas a) a d) para un único sujeto durante un periodo de tiempo para detectar concentraciones de dicho analito, realizando de esta manera dicho análisis de tendencia.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar un analito indicativo de una infección vírica por gripe en un fluido corporal de un sujeto usando un ensayo transmitido desde un dispositivo externo. El método comprende proporcionar un dispositivo fluido que comprende al menos una unidad de recogida de muestra y un conjunto de inmunoensayo que contiene reactivos de inmunoensayo; detectar dicho dispositivo fluido y transmitir inalámbicamente un protocolo de inmunoensayo a dicho dispositivo; permitir que una muestra de fluido corporal reaccione con reactivos de inmunoensayo para producir una señal detectable indicativa de la presencia de dicho analito usando dicho protocolo de inmunoensayo transmitido; y detectar dicha señal detectable.

La comunicación entre un conjunto lector y un dispositivo de almacenamiento externo permite que un conjunto lector de la presente invención descargue un protocolo específico para el dispositivo fluido para ejecutarlo en el dispositivo fluido basándose en la identidad del dispositivo fluido. Esto permite que un conjunto lector pueda usarse de forma intercambiable con cualquier dispositivo fluido apropiado descrito en la presente memoria. Además, el dispositivo externo puede almacenar una pluralidad de protocolos asociados con un dispositivo fluido dado, y dependiendo de, por ejemplo, un régimen o plan de tratamiento de un sujeto, pueden comunicarse diferentes protocolos desde el dispositivo externo al conjunto lector para ejecutarse en un dispositivo fluido para detectar una diversidad de analitos indicativos de infección por el virus de la gripe. El dispositivo externo puede almacenar también una pluralidad de protocolos asociados no solo con un dispositivo fluido, sino también con un sujeto o sujetos particulares, de modo que un protocolo puede asociarse con un sujeto así como con un dispositivo fluido.

La presente invención permite la cuantificación automática de un parámetro farmacológico de un sujeto así como la comparación automática del parámetro con, por ejemplo, los registros médicos del sujeto que pueden incluir un historial del parámetro supervisado, o registros médicos de otro grupo de sujetos. El acoplar en tiempo real la supervisión del analito con un dispositivo externo que puede almacenar datos, así como realizar cualquier tipo de procesamiento de datos o algoritmo, por ejemplo, proporciona un dispositivo que puede ayudar con el cuidado típico del sujeto que puede incluir, por ejemplo, comparar datos actuales del sujeto con datos pasados del sujeto. La

presente invención crea por tanto un método de negocio que realiza eficazmente al menos parte de la supervisión de un sujeto que está siendo realizada actualmente por el personal médico.

5 Una de las ventajas significativas de la red prevista se ilustra en la Figura 20. Como toda la información se canaliza de forma segura a través de Internet, esto permite la compartición simultánea de la información con diversas partes interesadas, mientras se satisfacen las necesidades clínicas, reguladoras y de negocio apropiadas.

10 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método de transmisión de un parámetro farmacológico de un sujeto a través de un dispositivo manual que comprende proporcionar un dispositivo fluido que comprende al menos una unidad de recogida de muestra y un conjunto de ensayo; permitir que una muestra de fluido corporal reaccione con los agentes reaccionantes contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para producir una señal detectable indicativa de la presencia de dicho analito indicativo de un virus de la gripe; detectar dicha señal detectable; transmitir dicha señal a un dispositivo externo; procesar dicha señal en dicho dispositivo externo; y transmitir dicha señal procesada a través de un dispositivo manual.

15 Una ventaja de la presente invención es que los resultados del ensayo pueden comunicarse sustancialmente de forma inmediata a cualquier tercera persona que pueda beneficiarse de obtener los resultados. Por ejemplo, una vez que la concentración de analito se ha determinado en el dispositivo externo, esta puede transmitirse a un paciente o personal médico que pueda necesitar realizar una acción adicional. La etapa de comunicación a una tercera persona puede realizarse de forma inalámbrica como se describe en la presente memoria, y transmitiendo los datos a un dispositivo manual de una tercera persona, la tercera persona puede ser notificada de los resultados del ensayo prácticamente en cualquier momento y en cualquier lugar. De esta manera, en un escenario sensible al tiempo, se puede contactar con un paciente inmediatamente en cualquier lugar si fuera necesaria una acción médica urgente.

20 En algunas realizaciones un método para seleccionar automáticamente un protocolo a ejecutar en un dispositivo fluido comprende proporcionar un dispositivo fluido que comprende un detector de identificador y un identificador; detectar dicho identificador con dicho detector de identificador; transferir dicho identificador a un dispositivo externo; y seleccionar un protocolo para ejecutar en dicho dispositivo fluido a partir de una pluralidad de protocolos en dicho dispositivo externo asociado con dicho identificador.

30 Detectando cada dispositivo fluido basado en un identificador asociado con el dispositivo fluido después de que este se inserte en el conjunto lector, el sistema de la presente invención permite descargar protocolos específicos para el dispositivo fluido desde un dispositivo externo y ejecutarlos en el dispositivo fluido. En algunas realizaciones, el dispositivo externo puede almacenar una pluralidad de protocolos asociados con el dispositivo fluido o asociados con un sujeto o grupo de sujetos particular. Por ejemplo, cuando el identificador se transmite al dispositivo externo, el software en el dispositivo externo puede obtener el identificador. Una vez obtenido, el software en el dispositivo externo, tal como una base de datos, puede usar el identificador para identificar protocolos almacenados en la base de datos asociados con el identificador. Si solo un protocolo está asociado con el identificador, por ejemplo, la base de datos puede seleccionar el protocolo y el software en el dispositivo externo puede transmitir entonces el protocolo al conjunto de comunicación en el conjunto lector. La capacidad de usar protocolos específicamente asociados con un dispositivo fluido permite que cualquier dispositivo fluido apropiado se use con un único conjunto lector y, de esta manera, prácticamente cualquier analito de interés puede ser detectado con un único conjunto lector.

40 En algunas realizaciones pueden asociarse múltiples protocolos con un único identificador. Por ejemplo, si es beneficioso detectar del mismo sujeto un analito una vez a la semana, y otro analito dos veces a la semana, los protocolos en el dispositivo externo asociados con el identificador pueden estar asociados también cada uno de ellos con un día de la semana diferente, de manera que cuando se detecta el identificador, el software en el dispositivo externo puede seleccionar un protocolo específico que está asociado con el día de la semana.

45 En algunas realizaciones un sujeto puede estar provisto de una pluralidad de dispositivos fluidos que se van a usar para detectar una diversidad de analitos. Un sujeto, por ejemplo, puede usar diferentes dispositivos fluidos en diferentes días de la semana. En algunas realizaciones, el software en el dispositivo externo que asocia el identificador con un protocolo puede incluir un proceso para comparar el día actual con el día en el que se tiene que usar el dispositivo fluido, basándose en un ensayo clínico, por ejemplo. Si por ejemplo, los dos días de la semana no son idénticos, el dispositivo externo puede enviar de forma inalámbrica notificación al sujeto usando cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, o conocidos en la técnica, para notificar que un dispositivo fluido incorrecto está en el conjunto lector y también cuál es el dispositivo fluido correcto que debe usar ese día. Este ejemplo es solo ilustrativo y puede ampliarse fácilmente, por ejemplo, al notificar al sujeto que un dispositivo fluido no se está usando en el momento correcto del día.

55 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método de obtención de datos farmacológicos útiles para evaluar la eficacia y/o toxicidad de un agente farmacéutico contra la gripe a partir de un animal de ensayo. El método implica las etapas de a) proporcionar un dispositivo fluido que comprende al menos una unidad de recogida de muestra, un conjunto de ensayo; y una pluralidad de canales en comunicación fluida con dicha unidad de recogida de muestra y/o dicho conjunto de ensayo; b) permitir que una muestra de fluido biológico de menos de aproximadamente 50 μ l reaccione con los agentes reaccionantes contenidos dentro de dicho conjunto de

5 ensayo para producir una señal detectable generada a partir de un analito, indicativa de una infección vírica por gripe, recogida inicialmente en dicha muestra que es indicativa de un parámetro farmacológico; y c) detectar dicha señal detectable; y d) repetir las etapas de reacción y detección con una segunda muestra de fluido biológico del mismo animal de ensayo. En una realización relacionada, la presente descripción proporciona un método que comprende a) proporcionar un dispositivo fluídico que comprende al menos una unidad de recogida de muestra, un conjunto de ensayo; y una pluralidad de canales en comunicación fluida con dicha unidad de recogida de muestra y/o dicho conjunto de ensayo; b) permitir que una muestra de fluido biológico reaccione con los agentes reaccionantes contenidos dentro de dicho conjunto de ensayo para producir una señal detectable generada a partir de un analito recogido inicialmente en dicha muestra, que es indicativa de un parámetro farmacológico; y c) detectar dicha señal detectable; y d) repetir las etapas de reacción y detección con una segunda muestra de fluido biológico del mismo animal de ensayo, en donde el animal no está sometido a anestesia.

10 Cuando se usan animales de laboratorio en el ensayo preclínico de un agente farmacéutico contra la gripe, a menudo es necesario sacrificar al sujeto de ensayo para extraer suficiente sangre para realizar un ensayo para detectar un analito de interés. Esto tiene implicaciones tanto financieras como éticas y, como tal, puede ser ventajoso poder extraer una cantidad de sangre de un animal de ensayo de tal manera que no sea necesario sacrificar al animal. Además, esto puede permitir también que el mismo animal de ensayo se ensaye con múltiples agentes farmacológicos en diferentes momentos, permitiendo así un ensayo preclínico más eficaz. Como promedio, el volumen de sangre total en un ratón, por ejemplo, es de 6-8 ml de sangre por cada 100 gramos de peso corporal. Un beneficio de la presente invención es que se requiere solo un volumen muy pequeño de sangre para realizar los ensayos preclínicos en ratones u otros animales pequeños de laboratorio. En alguna realización se extraen entre aproximadamente 1 microlitro y aproximadamente 50 microlitros. En la realización preferida se extraen entre aproximadamente 1 microlitro y 10 microlitros. En las realizaciones preferidas se extraen aproximadamente 5 microlitros de sangre.

15 Otra ventaja adicional de mantener vivo al animal de ensayo es evidente en un estudio en el transcurso del tiempo preclínico. Cuando se usan múltiples ratones, por ejemplo, para supervisar los niveles de un analito en el fluido corporal del sujeto de ensayo con el tiempo, se introduce en el ensayo la variable añadida de usar múltiples sujetos. Sin embargo, cuando puede usarse un único animal de ensayo como su único control durante un transcurso de tiempo, puede realizarse un ensayo preclínico más preciso y beneficioso.

20 Aunque en la presente memoria se han mostrado y descrito las realizaciones preferidas de la presente invención, será obvio para los expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo únicamente. A los expertos en la materia se les ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin alejarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria en la realización práctica de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de realización de un análisis de tendencia sobre la concentración de partículas del virus de la gripe en una pluralidad de muestras de fluido corporal obtenidas a partir de un sujeto, que comprende:

5 a) recibir un cartucho en un conjunto lector, conteniendo dicho cartucho una muestra de fluido corporal y comprendiendo un conjunto de inmunoensayo, conteniendo dicho conjunto de inmunoensayo un primer reactivo de anticuerpo para inmunoensayo y un segundo reactivo de anticuerpo para inmunoensayo, y comprendiendo dicho conjunto lector un conjunto de detección;

10 b) permitir que dicha muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene una partícula del virus de la gripe reaccione con dicho primer reactivo de anticuerpo para inmunoensayo y dicho segundo reactivo de anticuerpo para inmunoensayo, en donde dicho primer reactivo de anticuerpo para inmunoensayo comprende un primer anticuerpo que se une específicamente a una molécula de hemaglutinina presente en una partícula del virus de la gripe para formar un primer complejo inmune sobre dicha partícula del virus de la gripe, y en donde dicho segundo reactivo de anticuerpo para inmunoensayo comprende un segundo anticuerpo que se une específicamente a una molécula de neuraminidasa presente también sobre dicha partícula del virus de la gripe para formar un segundo complejo inmune sobre dicha partícula del virus de la gripe, con lo que dicha partícula del virus de la gripe se une simultáneamente mediante ambos dicho primer reactivo de inmunoensayo y dicho segundo reactivo de anticuerpo para inmunoensayo, produciendo dichos complejos inmunes una o más señales detectables que indican la presencia simultánea de hemaglutinina y neuraminidasa sobre dicha partícula del virus de la gripe, en donde cualquiera del primero y segundo reactivo de anticuerpo para inmunoensayo está inmovilizado sobre un soporte sólido;

15 c) detectar, mediante dicho conjunto de detección o dicho conjunto lector, dicha una o más señales detectables generadas a partir de dichos complejos inmunes, en donde dicha presencia simultánea de hemaglutinina y neuraminidasa es indicativa de la presencia de y concentraciones de dichas partículas del virus de la gripe en la muestra; y

20 d) repetir las etapas a), b) y c) para una o más muestras de fluido corporal adicionales obtenidas a partir del sujeto durante un periodo de tiempo para detectar concentraciones de dicho analito durante dicho periodo de tiempo, realizando de esta manera dicho análisis de tendencia

en donde,

30 dicha hemaglutinina se selecciona del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y dicha neuraminidasa se selecciona del grupo que consiste en N1, N2, N3, N4 y N5.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen de cada muestra de fluido corporal es menor que aproximadamente 500 microlitros.

35 3. El método de la reivindicación 1, en donde la detección de dicha hemaglutinina y neuraminidasa es indicativa de una infección vírica por gripe seleccionada de una infección vírica por gripe de tipo A, una infección vírica por gripe de tipo B y una infección vírica por gripe de tipo C.

4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha hemaglutinina es H5 y dicha neuraminidasa es N1.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho cartucho comprende además al menos una unidad de recogida de muestra.

40 6. El método de la reivindicación 1, que comprende además accionar dicho cartucho y dirigir dichos reactivos de anticuerpo para inmunoensayo dentro de dicho cartucho.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha muestra de fluido corporal que se sospecha que contiene dicha partícula del virus de la gripe reacciona con dichos reactivos de anticuerpo para inmunoensayo contenidos dentro de dicho conjunto de inmunoensayo basándose en un protocolo transmitido desde un dispositivo externo.

45 8. El método de la reivindicación 8, en donde el protocolo se transmite inalámbricamente desde dicho dispositivo externo.

9. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de transmitir dicha señal detectable a un dispositivo externo.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el dispositivo externo es un servidor.

50 11. El método de la reivindicación 1, en donde el cartucho comprende una pluralidad de canales que proporcionan comunicación fluida entre dicha unidad de recogida de muestra y dicho conjunto de inmunoensayo.

12. El método de la reivindicación 1, en donde dicho cartucho comprende un identificar, una unidad de recogida de

- muestra y un conjunto de inmunoensayo que comprende dicho reactivo de anticuerpo para inmunoensayo; un detector de identificador lee dicho identificador y comunica a un conjunto de comunicación que transmite la información de dicho identificador a un dispositivo externo; un protocolo asociado con dicho identificador, transmitiéndose dicho protocolo desde dicho dispositivo externo como respuesta a la transmisión de dicha información de dicho identificador a dicho dispositivo externo; y en donde dicha muestra de fluido corporal recogida en dicha unidad de recogida de muestra reacciona con dichos reactivos de anticuerpo para inmunoensayo basándose en dicho protocolo para producir dicha señal detectable indicativa de la presencia de dicha partícula vírica.
- 5
13. El método de la reivindicación 1, en donde dicha una o más muestras de fluido corporal adicionales se obtienen a una frecuencia seleccionada de una vez a la semana y dos veces a la semana.
- 10
14. El método de la reivindicación 1, en donde la hemaglutinina es H1 y la neuraminidasa es N1.

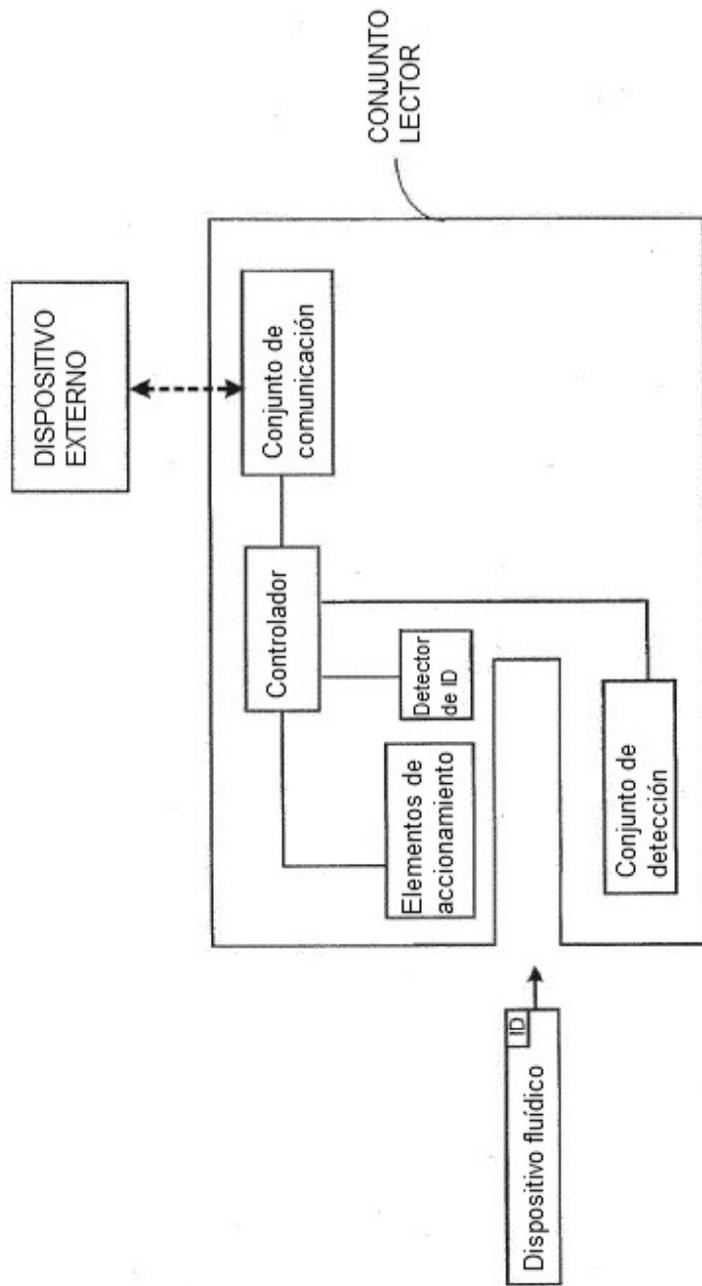


Figura 1

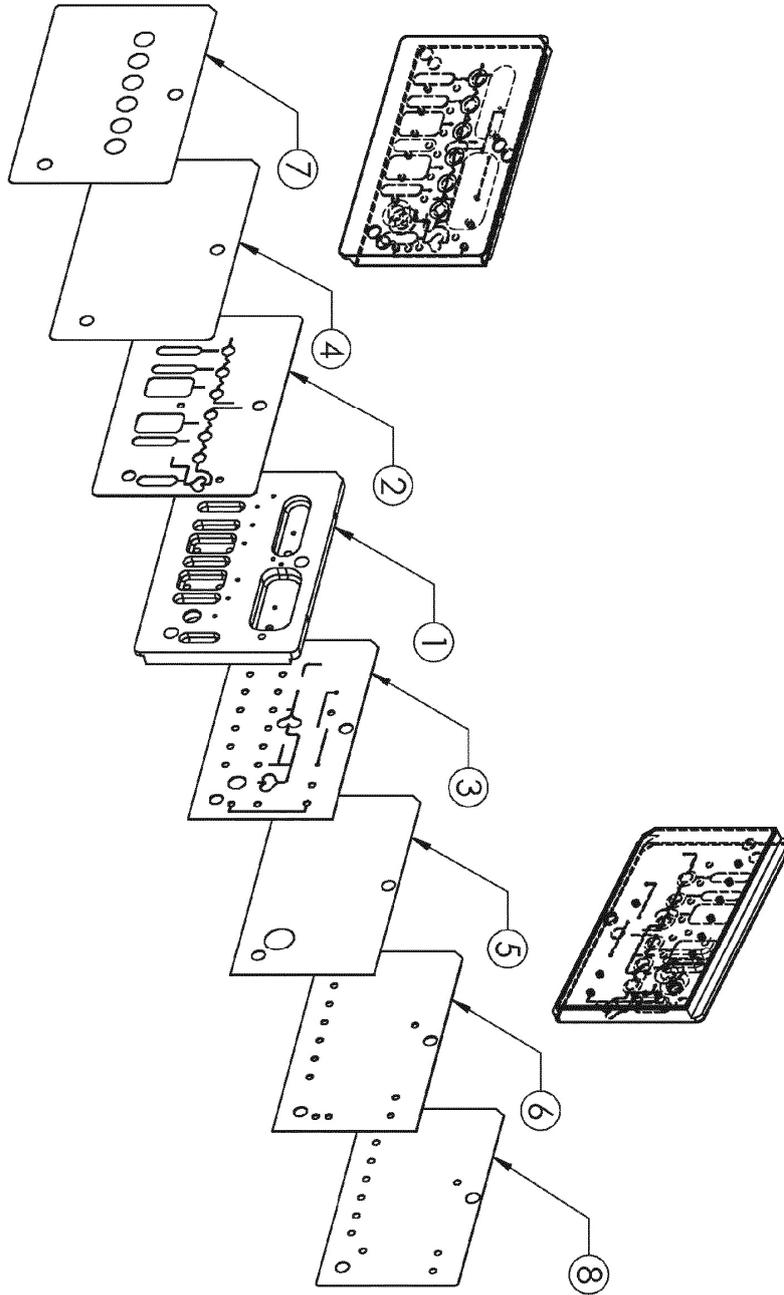


Figura 2

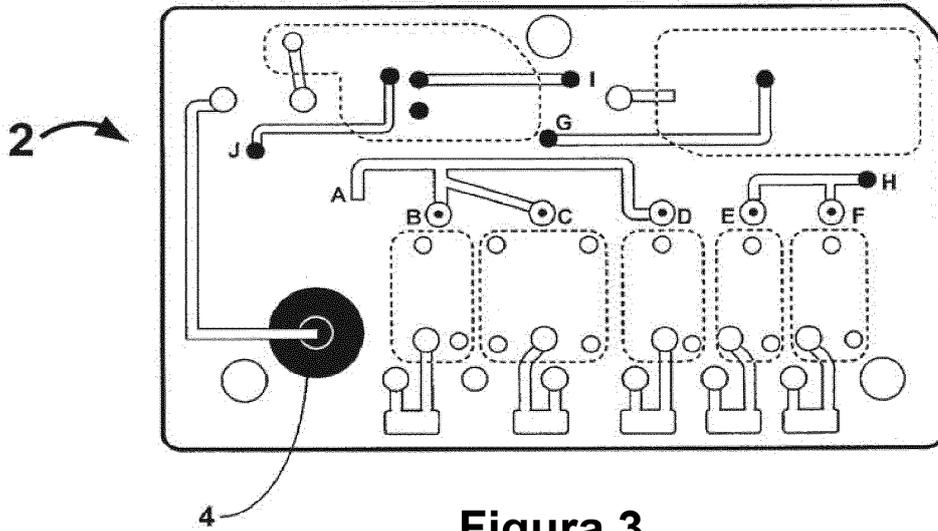


Figura 3

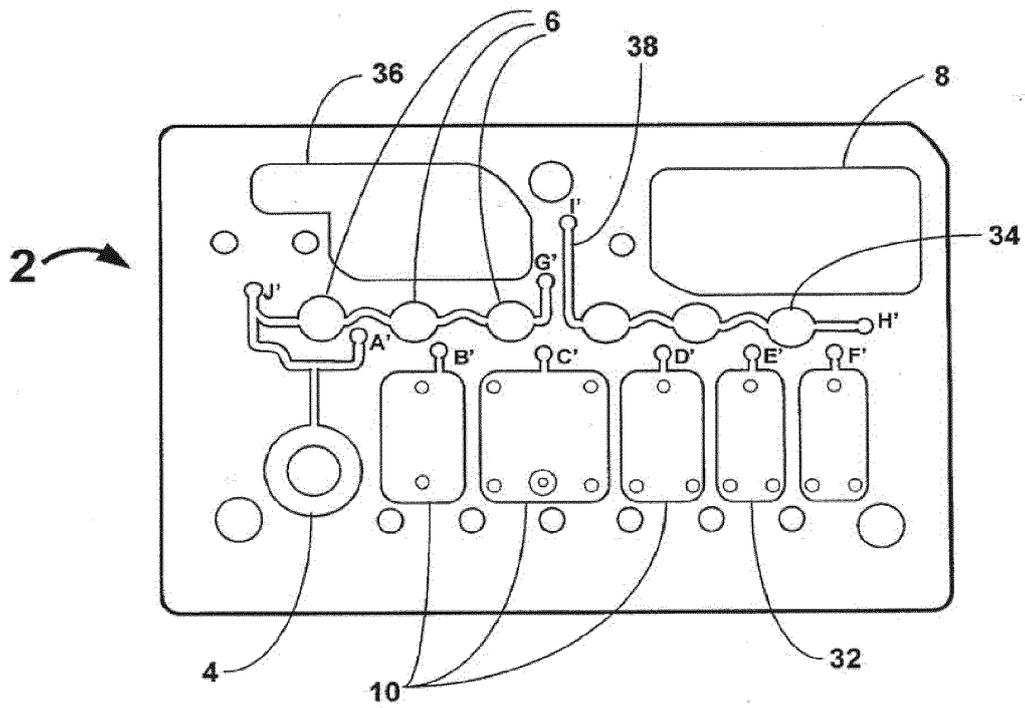


Figura 4

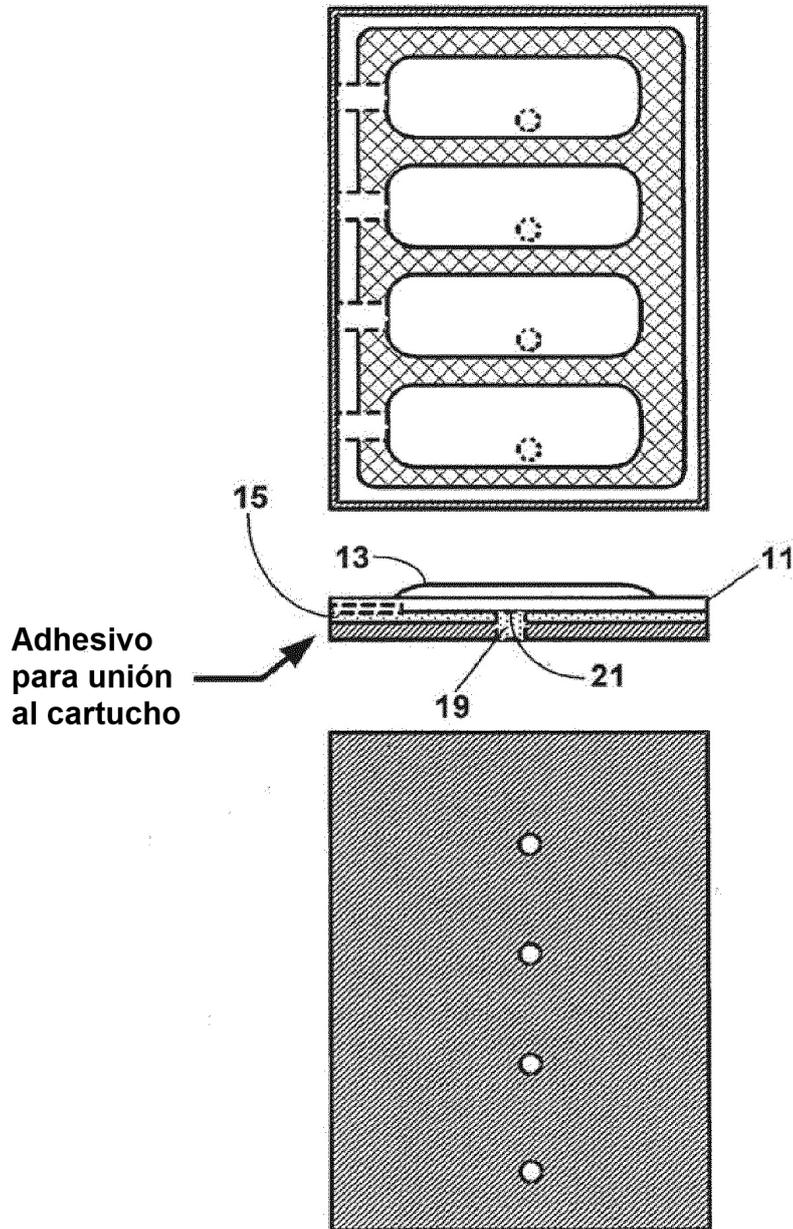


Figura 5

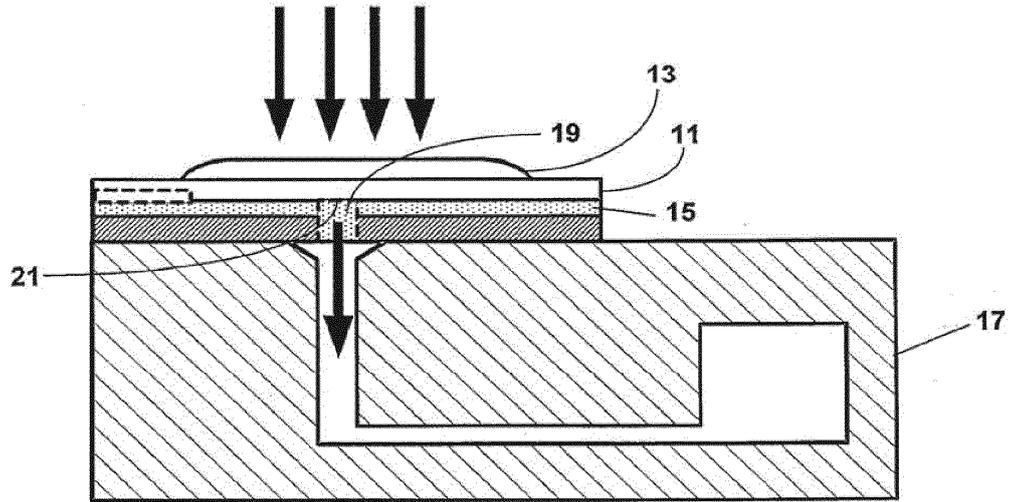


Figura 6

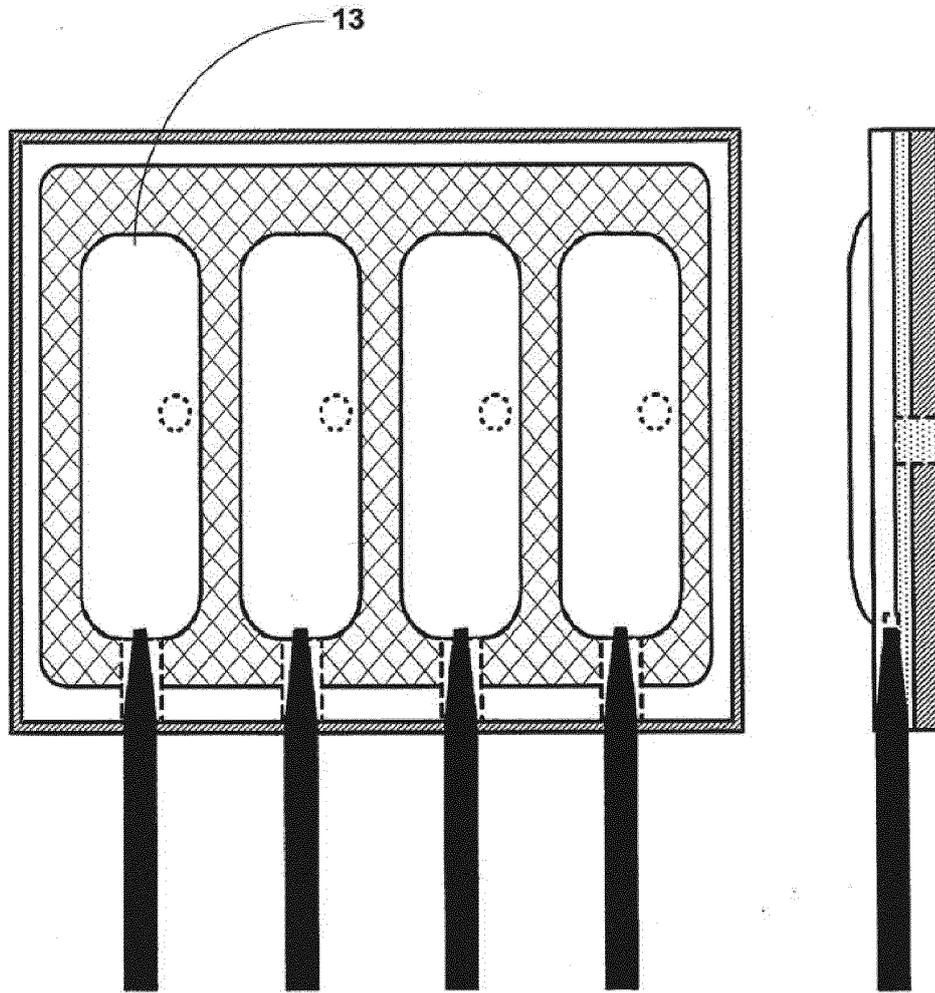


Figura 7

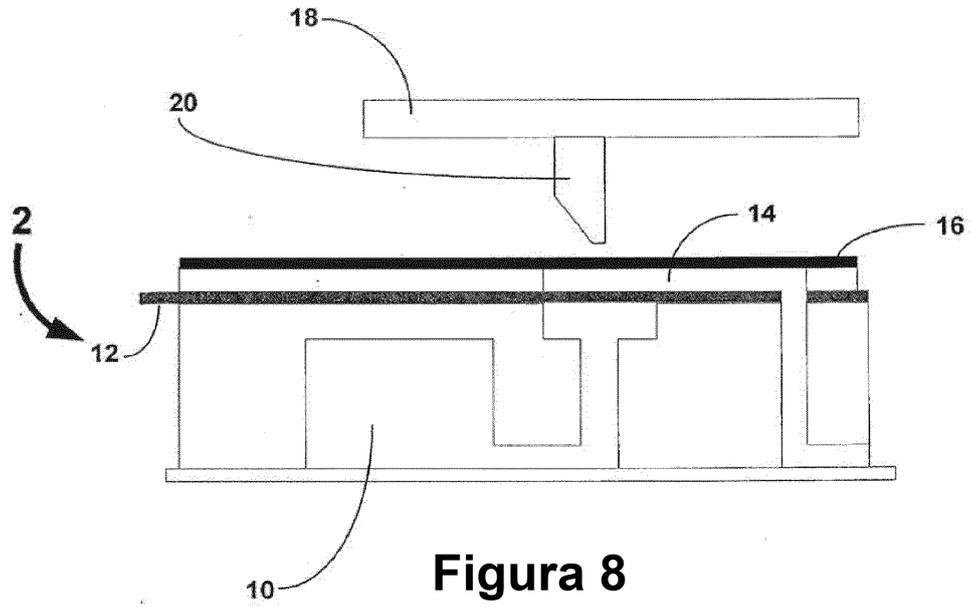


Figura 8

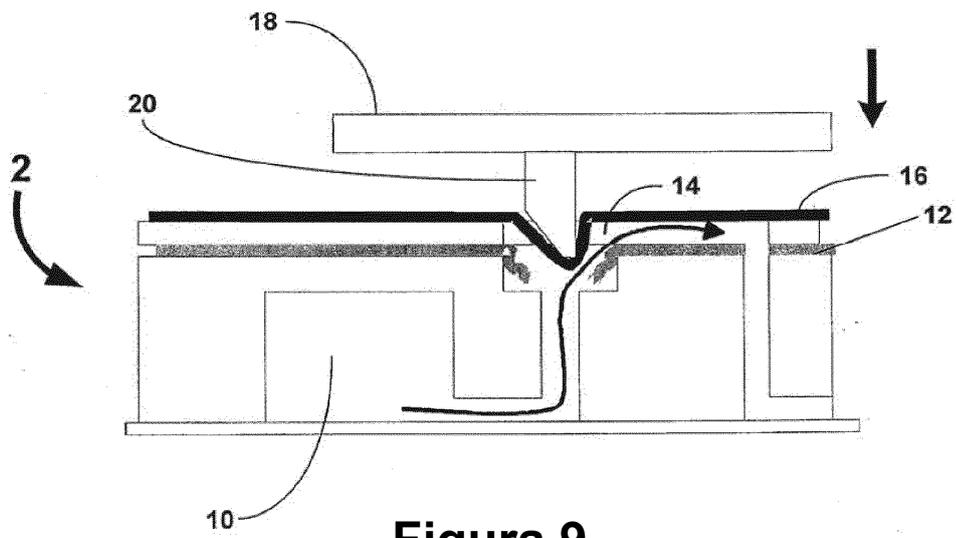


Figura 9

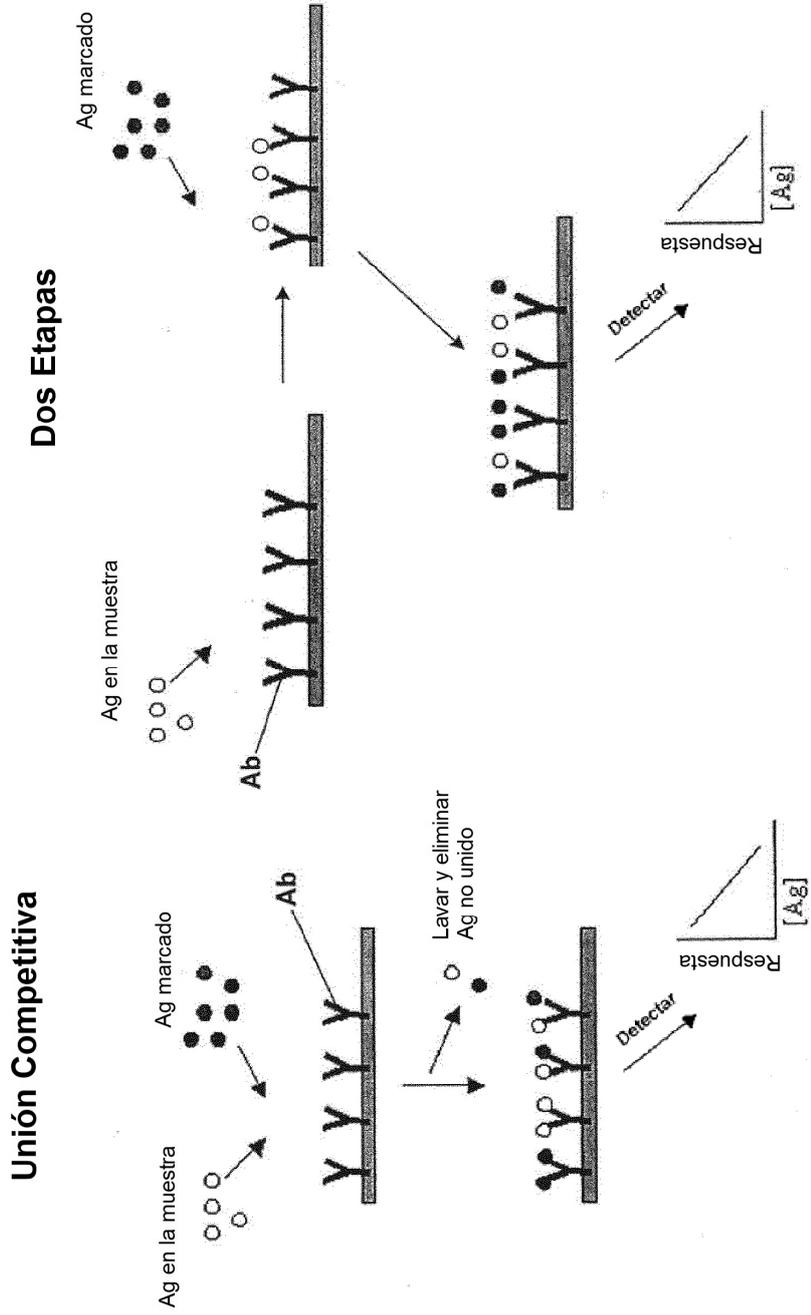


Figura 10

Inmunoensayo Enzimático de Quimioluminiscencia

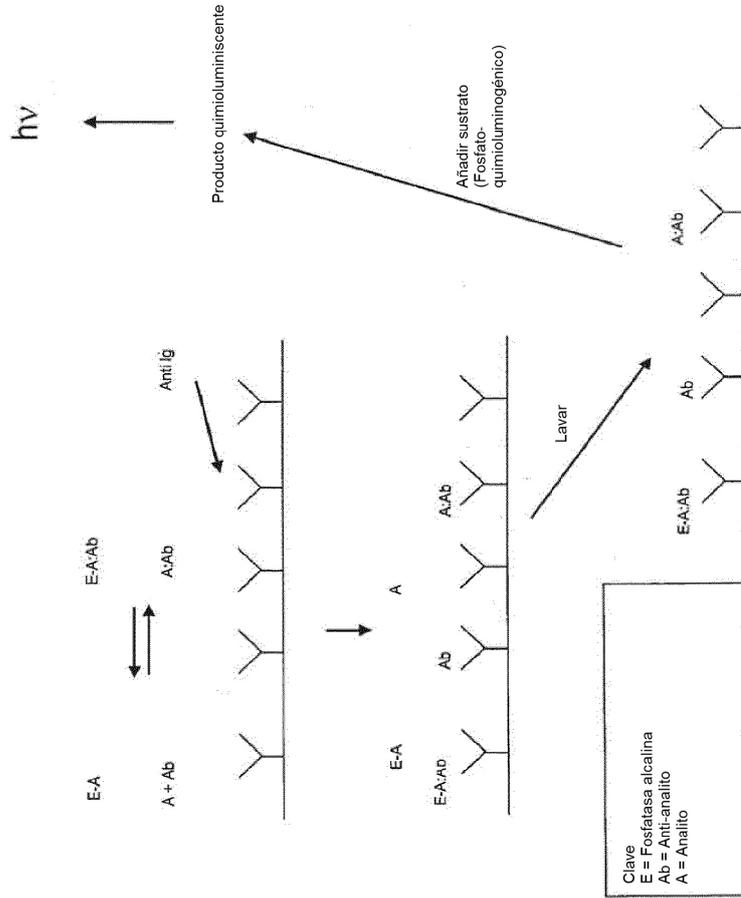


Figura 11

Ensayo TOSCA

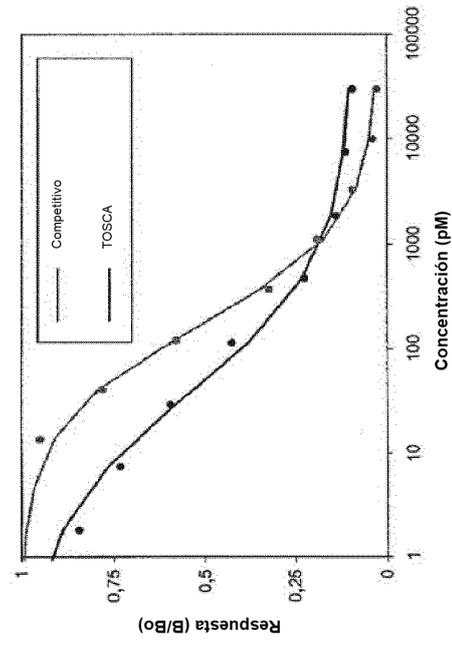
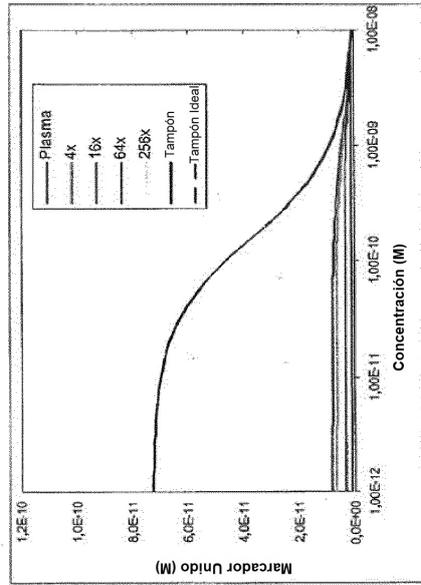


Figura 12

Efecto del plasma

Unión Competitiva



Dos Etapas

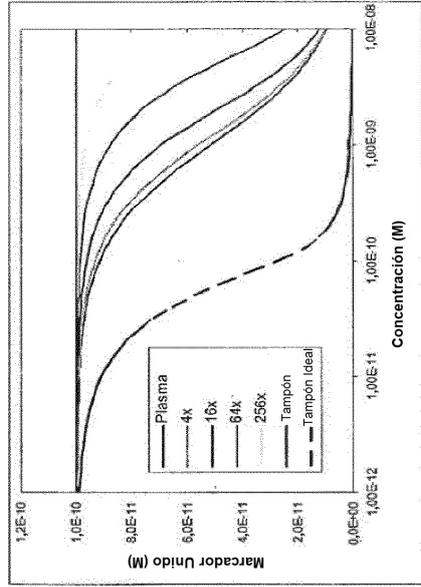


Figura 13

Ensayo TOSCA

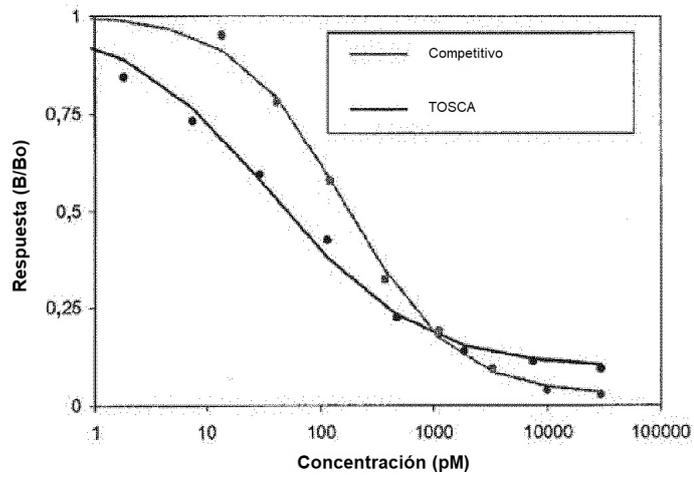
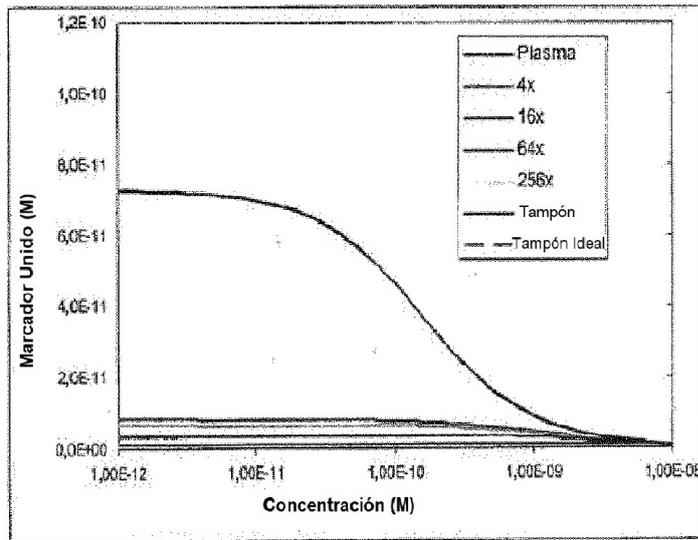


Figura 12

Efecto del plasma

Unión Competitiva



Dos Etapas

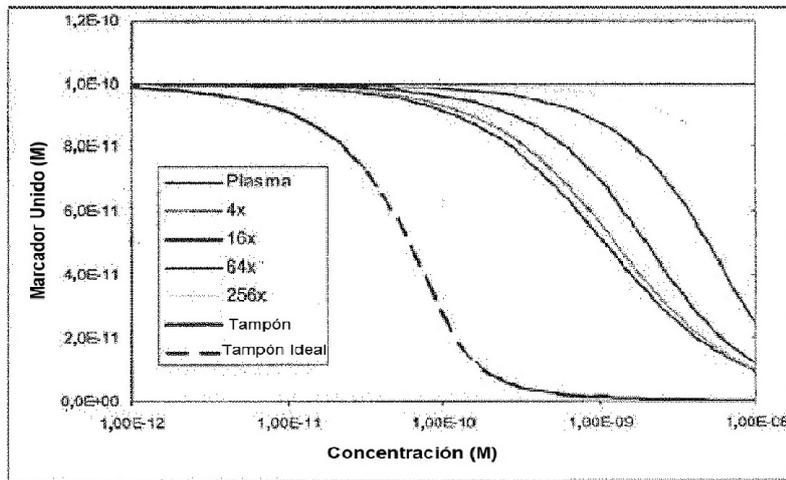


Figura 13