

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 573**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2007 PCT/US2007/015832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2008 WO08008402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2007 E 07810359 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2047250**

54 Título: **Dispositivo y método de detección fotoacústica**

30 Prioridad:

**11.07.2006 US 819941 P**

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

**10.04.2019**

73 Titular/es:

**THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI (100.0%)  
475 McReynolds Hall  
Columbia MO 65211-2015, US**

72 Inventor/es:

**VIATOR, JOHN, A.;  
DALE, PAUL, S.;  
WEIGHT, RYAN, M. y  
SUTOVSKY, PETER**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 708 573 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**

Dispositivo y método de detección fotoacústica

**Campo técnico**

5 El campo de la invención son las pruebas médicas. Un aspecto de la invención se refiere a dispositivos y a un método de detección de analitos en una muestra de fluido corporal, siendo un ejemplo las células tumorales en circulación en una muestra sanguínea.

**Técnica antecedente**

10 La detección de analitos en muestras de fluidos corporales es usada de forma generalizada para fines médicos y de otra naturaleza. Las aplicaciones incluyen la detección de patógenos, proteínas u otros compuestos químicos en sangre, orina, bilis, saliva u otros fluidos corporales. Algunas aplicaciones ejemplares incluyen la detección de drogas, la detección de enfermedades, la detección de una proteína particular y similares. A título de ejemplo particular, la detección de células tumorales en circulación (CTC) en la sangre humana y los sistemas linfáticos tiene el potencial de ayudar en la toma de decisiones clínicas en el tratamiento del cáncer. La presencia de CTC puede significar la aparición de metástasis, indicar una recaída o puede ser usada para monitorizar el avance de una enfermedad.

15 Las técnicas y los dispositivos actuales para la detección de las CTC tienen límites. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es una técnica que se usa en la práctica. Esta técnica implica el análisis del ARN. La técnica lleva un tiempo significativo e implica varias etapas que requieren la pericia de técnicos para realizar ensayos. Con el requerimiento de tal pericia aparece el potencial de error técnico. La congelación, el cultivo, el ensayo, etc., en la técnica de RT-PCR llevan tanto tiempo como pericia. Además, los resultados no están  
20 inmediatamente disponibles para un médico encargado.

La citometría de flujo con láser también tiene el potencial de analizar muestras en busca de CTC. Sin embargo, la detección de las CTC es un área de investigación en evolución y las técnicas óptimas de detección siguen siendo un trabajo en curso. Sin embargo, cuando sea perfeccionada, y si lo es, la técnica seguirá siendo una que comparta parte de los inconvenientes de la RT-PCR; por ejemplo, la implicación de técnicos expertos y demoras en la obtención y la  
25 interpretación de los resultados.

Unos instrumentos potentes de diagnóstico permiten una evaluación rápida y precisa. Crítica para el tratamiento es la etapa inicial de detección de la aparición de metástasis o recaída, y la monitorización del avance de la enfermedad y la respuesta de la enfermedad a un curso o tratamiento que se esté aplicando. Tener información precisa sobre una metástasis puede proporcionar a un médico encargado la oportunidad de ser más efectivo y de abordar la fase particular de la enfermedad indicada por la metástasis. Detectar precisa y rápidamente la presencia de las CTC tiene el potencial de avanzar el estado del diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

30 MacKenzie et al., "A laser photoacoustic sensor for analyte detection in aqueous systems", Sensors and Actuators B, 11 (1993) 213-220 describen la absorción de impulsos de láser por un líquido, por lo que la energía absorbida es convertida en calor y se produce una expansión térmica localizada que provoca una onda de presión a frecuencias ultrasónicas que puede ser detectada con un transductor adecuado.

Gulshan Ara et al., "Irradiation of pigmented melanoma cells with high intensity pulsed radiation generates acoustic waves and kills cells", Lasers in surgery and medicine 10 (1990) n° 1, Nueva York, describen que una radiación visible de impulsos cortos genera ondas acústicas por expansión térmica.

40 Laufer et al., "Pulsed near-infrared photoacoustic spectroscopy of blood", Proceedings of SPIE, vol. 5320, 2004, pp. 57-68 describen la determinación de la saturación de oxígeno de una suspensión salina de hematíes *in vitro* dirigiendo impulsos de láser a una cubeta que contiene la suspensión de hematíes y detectando la señal acústica resultante.

El documento EP 0 369 176 A2 describe el marcado de un complejo antígeno-anticuerpo con un material colorante y la determinación de las propiedades fotoacústicas de la marca por espectroscopia fotoacústica.

45 El documento EP 0 256 474 A2 describe el uso de la espectrometría fotoacústica para determinar la concentración de una sustancia particulada en una muestra. En el método, se dirigen un haz de excitación a una celda que contiene una muestra líquida que comprende una sustancia particulada que absorbe la luz de excitación y genera una señal fotoacústica cuya magnitud es medida y usada para determinar la concentración de la sustancia particulada en la muestra.

**Divulgación de la invención**

50 Un método ejemplar para la detección de un analito en una muestra de fluido corporal comprende las etapas de exponer la muestra de fluido corporal a energía electromagnética para provocar una expansión termoelástica en el analito, y detectar una señal fotoacústica en la muestra que es resultado de la expansión termoelástica, según se define en la reivindicación 1. Un sistema ejemplar para la detección de uno o más analitos en un fluido corporal comprende una cámara de ensayo que tiene al menos una pared lateral configurada para contener una muestra de

ensayo de un fluido corporal, una fuente de energía electromagnética configurada para dirigir una fuente de energía al interior de dicha cámara de ensayo a través de dicha al menos una pared lateral e inducir una expansión termoeléctrica en los uno o más analitos, y un sensor configurado para detectar la expansión termoelástica en la muestra de ensayo, según se define en la reivindicación 12.

5 Un aparato ejemplar adicional es un dispositivo fotoacústico de detección de metástasis que comprende un recipiente para contener una muestra de fluido que ha de ser sometida a ensayo para comprobar la presencia o ausencia de células tumorales en circulación, un láser para someter la muestra de fluido a una luz que induciría una reacción fotoacústica en células tumorales en circulación o en un marcador unido a las mismas, y un sensor acústico para detectar una reacción fotoacústica inducida en la muestra de fluido contenida en dicho recipiente.

#### 10 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que ilustra un método ejemplar de la invención;

la FIG. 2 es un diagrama de flujo que ilustra un segundo método ejemplar de la invención;

la FIG. 3 es una ilustración esquemática de un sistema ejemplar de la invención y también es útil para ilustra un método ejemplar de la invención;

15 la FIG. 4 ilustra la celda de ensayo del sistema de la FIG. 3, ilustrando la FIG. 4(B) la celda cuando es vista a lo largo de la línea 4B-4B de la FIG. 4(A) en la dirección mostrada;

la FIG. 5 ilustra la celda de ensayo del sistema de la FIG. 3;

la FIG. 6 ilustra esquemáticamente la detección de un evento termoelástico usando el sensor del sistema de la FIG. 3;

20 la FIG. 7 ilustra datos resultantes de la práctica de un sistema y un método ejemplares de la invención, presentando la FIG. 7(A) datos para una muestra de ensayo que incluye melanoma vivo y presentando la FIG. 7(B) datos para una muestra de ensayo que incluye caldo de cultivo RPMI y nada de melanoma;

la FIG. 8 es una ilustración esquemática de una celda ejemplar alternativa de flujo; y

25 la FIG. 9 es una ilustración esquemática de la celda de flujo de la FIG. 8 vista a lo largo de la línea 9-9 de la FIG. 8 en la dirección mostrada.

#### **Mejor modo para la realización de la invención**

Antes de exponer realizaciones ejemplares de la invención, se apreciará que la presente invención incluye métodos, así como sistemas. Por ejemplo, un método de la invención puede incluir etapas de uso de un sistema de la invención, y un sistema de la invención, cuando se utilice, puede ser útil para realizar etapas de un método de la invención. En consecuencia, se apreciará que, al describir un método de la invención, también puede proporcionarse la descripción de un sistema. Además, cuando se describe un sistema de la invención, puede hacerse una descripción de un método de la invención. Por ejemplo, se apreciará que, cuando se describen detalles de un sistema de la invención, se proporciona simultáneamente una descripción de uno o más métodos de la invención, y viceversa.

35 La presente invención va dirigida a métodos y sistemas de detección de un analito en una muestra de fluido corporal. Según es usado en la presente memoria, se pretende que el término "analito" sea interpretado de manera amplia en el sentido de ser una sustancia química, biológica o de otra naturaleza, o un material de interés. A título de ejemplo, un analito puede ser una proteína, un patógeno, tal como una o más células tumorales cancerosas, un compuesto químico o similares. Además, según se la usa en la presente memoria, se pretende que la expresión "fluido corporal" sea interpretada de manera amplia con el significado de una muestra líquida que contiene algún fluido que se originó en un cuerpo. Ejemplos incluyen muestras de fluidos corporales que contienen sangre, plasma sanguíneo, orina, bilis, saliva, semen, esperma, leche materna, líquido cefalorraquídeo, fluido intracelular y similares. Es importante destacar que, según es usada en la presente memoria, la expresión "muestra de fluido corporal" no está limitada al fluido obtenido del cuerpo únicamente, sino que también está previsto que incluya muestras preparadas usando el fluido y un fluido diluyente o fluido vehicular. A título de ejemplo, la expresión "muestra de fluido corporal" abarca una muestra preparada suspendiendo un fluido corporal tal como leucocitos en una solución salina.

45 Para describir de manera óptima diversas realizaciones ejemplares de la invención, se proporciona inicialmente una descripción de realizaciones generales (y, en consonancia con ello, un aparato general). La FIG. 1 es un diagrama de flujo que ilustra un método ejemplar de la invención. Una muestra de fluido corporal es expuesta a una fuente de energía electromagnética para provocar una expansión termoelástica en el analito contenido en la muestra. Bloque 50 10. La muestra de fluido corporal puede ser cualquiera de las muestras particulares expresadas anteriormente, incluyendo, por ejemplo, orina, sangre o saliva. Además, puede ser, por ejemplo, una muestra de ensayo que incluya uno de estos materiales diluido, suspendido o en otra condición presente junto con un fluido vehicular. Un fluido vehicular puede ser un disolvente o un fluido diluyente, incluyendo ejemplos soluciones acuosas, una solución salina y similares.

La fuente de energía electromagnética es una luz láser. Se produce una expansión termoelástica cuando un material absorbe energía, se calienta y se expande en consecuencia. El resultado es una señal fotoacústica.

El método de la FIG. 1 incluye, a continuación, una etapa de uso de un sensor acústico para detectar la señal acústica resultante de la expansión termoelástica. Bloque 12. La señal fotoacústica puede ser una onda u otra señal. La detección puede incluir, por ejemplo, el uso de un detector adecuado para detectar una onda acústica que se desplace a través de la muestra de ensayo. Un ejemplo incluye la detección de la desviación de un diafragma en contacto de fluido con la solución cuando la onda acústica hace contacto con el diafragma de un sensor. Otro es usar un detector óptico para medir una señal tal como una perturbación (que puede ser un cambio refractivo) en la muestra tras la expansión termoelástica.

A título de ejemplo adicional, la FIG. 2 presenta un método ejemplar adicional de la invención. Esta realización ejemplar está dirigida a un método de detección de un patógeno, tal como una célula tumoral cancerosa, en una muestra sanguínea. Sin embargo, la aplicación particular del analito para esta realización ejemplar podría cambiarse fácilmente.

En una etapa inicial, se obtiene de un paciente una muestra de sangre. Bloque 20. La muestra puede ser, por ejemplo, de un volumen de solo una fracción de un mililitro hasta un litro o más. Puede ser obtenida a través de un pinchado de la piel con una aguja, de forma intravenosa o similar. Los leucocitos son separados a continuación de la muestra sanguínea. Bloque 22. Esto se puede efectuar, por ejemplo, usando una centrifugadora u otro método conocido de separación. La cantidad de leucocitos separados dependerá, al menos en cierto grado, del tamaño de la muestra sanguínea inicial.

Los leucocitos así separados son puestos a continuación en un fluido vehicular. Esta etapa puede incluir, por ejemplo, la suspensión en una solución salina. Bloque 24. Se pretende que "suspensión", como se usa en la presente memoria, sea interpretado de manera amplia, con el significado de diluido con, transportado con, puesto en o similares. La suspensión de leucocitos en un líquido vehicular puede incluir, por ejemplo, diluir las células en el líquido, mezclar las células en el líquido o similares. Los leucocitos pueden incluir una o más células tumorales cancerosas, tales como melanina.

En una etapa opcional de este método ejemplar, se adhieren varias partículas diana a las células cancerosas. Bloque 26. Las partículas o esferas diana pueden tener un diámetro inferior a 0,01 milímetros. Las partículas pueden ser, por ejemplo, esferas sintéticas de escala micrométrica seleccionadas por su capacidad de ser detectadas por la energía electromagnética a la que será expuesta la muestra. A título de ejemplo particular, pueden usarse nanopartículas de oro, esferas de látex negro, tinciones, puntos cuánticos o cualquier otra molécula (tal como la biotina) que dé a la célula algún color que sean buenos absorbentes de energía electromagnética, tal como una luz láser.

Las partículas diana pueden estar tratadas para hacer que sean atraídas hacia la célula cancerosa y se adhieran a ella. El tratamiento puede incluir proporcionar anticuerpos superficiales que se sabe que son atraídos al analito de interés, carga eléctrica o similares. En una etapa ejemplar, las dianas se unen creando un enlace mediante un par anticuerpo-receptor. Esto proporciona la especificidad y la resistencia necesaria para la unión. La partícula diana es funcionalizada para unirse al anticuerpo específico. Estas partículas funcionalizadas son introducidas en la muestra que contiene las células con los receptores emparejados. Tras lavar las esferas sobrantes que no se unieron a un receptor de célula cancerosa, las células cancerosas tienen esferas unidas a sus receptores (habitualmente, aunque no necesariamente, receptores superficiales).

Esta etapa opcional puede ser útil para "amplificar" el umbral de detección de las una o más células cancerosas. Una etapa alternativa incluye tincionar el analito con una coloración absorbente adecuada. Las partículas diana sobrantes (que no se adhieren a las células cancerosas) pueden ser eliminadas de la muestra de ensayo mediante lavado u otros métodos conocidos. Bloque 28.

A continuación, la muestra de ensayo es comunicada por delante de una luz láser de impulsos. Bloque 30. Esta etapa puede incluir, por ejemplo, colocar la muestra en un sistema de la invención que incluye un depósito, un generador de flujo, tal como una bomba, y un conducto que conecta el depósito a una cámara de ensayo, a la que se dirige la luz láser. Cuando la célula cancerosa de interés es, por ejemplo, un melanoma, la luz láser usada para interrogar a la muestra de fluido puede encontrarse en cualquier lugar del intervalo visible, y en otras longitudes onda que absorbe la melanina. Cuando la célula cancerosa es distinta de un melanoma, la detección se logrará mediante la absorción por las esferas diana.

Además, los métodos y los sistemas de la invención pueden incluir etapas y elementos para usar diferentes longitudes de onda de luz para detectar analitos particulares. Por ejemplo, si se sabe que un analito absorbe luz de la longitud de onda X y no Y, una muestra de ensayo puede ser interrogada con luz de una longitud de onda tanto X como Y. Si se produce una señal positiva cuando es interrogada con X, pero no con Y, se proporciona una indicación de que está presente el analito particular.

La luz láser de impulsos es absorbida por la melanina e induce una expansión termoelástica en ella, que da lugar a una onda acústica en la solución. La onda acústica es medida usando un detector tal como un diafragma. Bloque 32. La magnitud de la desviación del diafragma puede indicar, por ejemplo, no solo la presencia de una célula cancerosa,

sino además una indicación de su tamaño, densidad, coloración, concentración y otras propiedades. Los datos procedentes del diafragma son grabados y mostrados usando un controlador. Bloque 34. Esta etapa puede incluir, por ejemplo, amplificar una señal eléctrica procedente del diafragma, grabarla en memoria y mostrarla en una pantalla.

5 Habiendo descrito ahora algunos métodos ejemplares generales de la invención, puede proporcionarse una descripción más detallada de otros métodos, sistemas y detalles de realizaciones de la invención. Para hacerlo, resultará útil una presentación de los principios de la fotoacústica en relación con algunas realizaciones de la invención.

10 La fotoacústica, también denominada ultrasonido inducido por láser, usa una luz pulsante de duración corta para crear ondas acústicas ultrasónicas en un medio ópticamente absorbente. Estas ondas acústicas son generadas en función de las propiedades termoelásticas de los analitos seleccionados como diana, que en muchas realizaciones de la invención (pero no en todas) comprenderán cromóforos. Los cromóforos, por definición, son átomos o moléculas dentro de un compuesto que son responsables del color del compuesto dado. Inherentemente, presentan color absorbiendo parcialmente longitudes de onda que componen el espectro visible de la luz incidente. Las longitudes de onda que no se absorben están sujetas a dispersión y reflectancia, según determine la composición del cromóforo particular, emitiendo así el color representativo de las longitudes de onda reflejadas. La fotoacústica se basa en la porción absorbida de la luz incidente. Cuando la luz es absorbida por los cromóforos irradiados, la energía óptica se convierte en energía térmica cinética atrapada dentro del cromóforo, y entonces tiene lugar la posterior expansión térmica de los átomos. Se produce una expansión termoelástica cuando se logra una condición de confinamiento de tensiones depositando energía directa en un cromóforo de manera continua, de manera que la energía sea incapaz de propagarse, salvo por medio de la eventual convección con los medios circundantes. Esta condición se expresa como:

$$t_p < \delta / C_s$$

siendo  $t_p$  la duración del impulso del láser, siendo  $\delta$  la profundidad de absorción de la energía del láser, y siendo  $C_s$  la velocidad del sonido en el medio. Se da por sentado que la profundidad de absorción,  $\delta$ , es menor que el diámetro del haz láser.

25 Puede lograrse una expansión termoelástica transitoria irradiando con impulsos cortos de luz láser concentrada, permitiendo la expansión y la contracción elásticas de una molécula absorbente. Esta expansión termoelástica y la subsiguiente contracción dan lugar a la producción de ondas ultrasónicas longitudinales que se propagan en todas las direcciones alejándose del medio de interés excitado térmicamente. Una generación de calor más intensa producirá una onda acústica más intensa mediante una mayor expansión termoelástica. Por lo tanto, un absorbente óptico intenso desprende una onda acústica intensa. Conceptualmente, la fotoacústica puede describirse como energía láser pulsante que es absorbida rápidamente por un medio dispersante, de modo que la expansión termoelástica transitoria dé lugar a la formación y la propagación de energía acústica. La expansión termoelástica, usada en la fotoacústica, puede ser descrita (suponiendo un absorbente puro en el que  $\delta = 1/\mu_0$ ) por

$$p(z) = \frac{1}{2} \mu_a \Gamma e^{\mu_a z}$$

35 representando  $p(z)$  la presión a la profundidad  $z$ , siendo  $\mu_a$  el coeficiente de absorción óptica del tejido, siendo  $\Gamma$  el coeficiente de Gruneisen, que denota la fracción de energía óptica que es convertida en energía acústica. Depende de la temperatura y es igual a 0,12 a temperatura ambiente para la mayoría de los tejidos.

40 La energía fotoacústica total resultante de la absorción de un haz está directamente relacionada con el contenido de los cromóforos. La cantidad de expansión termoelástica dada en la anterior ecuación está directamente relacionada con el coeficiente de absorción  $\mu_a$  del cromóforo. El coeficiente de absorción se deriva del coeficiente de absorptividad molar y de la concentración de cromóforos, según se describe con:  $\mu_a = 2,3 \epsilon c$ , siendo  $c$  la concentración de los cromóforos específicos y siendo  $\epsilon$  el coeficiente de absorptividad molar del compuesto. Estas relaciones son útiles para caracterizar al cromóforo más allá de su detección. Por ejemplo, la magnitud de la energía fotoacústica detectada puede ser útil para estimar el tamaño, la densidad y la identidad de un cromóforo desconocido.

45 La presión acústica es proporcional a la energía por unidad de volumen, dada en julios por  $\text{cm}^3$ . Si se mantiene constante el tamaño de un punto, la integral de la presión sobre la profundidad presenta la energía total absorbida, dada por:

$$E_a = \int_0 P_0(z) dz$$

$E_a$  es la energía total absorbida por el cromóforo y  $P_0(z)$  es la presión inicial en función de la profundidad  $z$ . La integral da una cantidad expresa en términos de  $\text{J}/\text{cm}^2$ , por lo que la energía total detectada está relacionada con esta cantidad por el área activa del detector. La cantidad de energía ( $E_a$ ) absorbida está directamente relacionada con la cantidad

de energía lumínica incidente sobre el medio (también dada como  $J/cm^2$ ) hasta cierto límite determinado por la capacidad de absorción del cromóforo específico.

La detección de estas ondas fotoacústicas diminutas es, igualmente, tan importante como su producción en muchas realizaciones de la invención. Los métodos de detección fotoacústica pueden variar drásticamente de un diseño experimental a otro. Un elemento que se ha descubierto que es útil en los métodos y los aparatos de la invención es un copolímero piezoeléctrico en conexión eléctrica con dos electrodos, siendo uno el hilo de tierra y midiendo el otro el cambio de tensión positiva de la película. Estas películas pueden estar construidas de difluoruro de polivinilideno, o PVDF, y pueden o no incorporar un recubrimiento de aluminio que actúe como elemento conductor. Sin embargo, se contemplan muchas otras configuraciones del detector, incluyendo (a título de ejemplo y no de limitación) otros diafragmas cuya desviación pueda ser medida cuando los golpee una onda acústica, detectores ópticos que detecten un cambio en el índice de reflexión y/o de refracción en un fluido cuando una onda acústica se desplaza en el mismo, y similares.

Al propagarse las ondas longitudinales acústicas hacia la película piezoeléctrica de un sistema y un método ejemplares, se acumula presión según la magnitud de cada onda de presión. Cuando estas ondas de presión entran en contacto con la película piezoeléctrica, la superficie lateral de la película objeto de impacto por la onda de presión se desplaza, alternado la bicapa estabilizada entrópicamente. La alteración de la capa polimérica provoca que se forme una carga eléctrica entre las dos capas del copolímero que puede ser detectada por dos electrodos conductores como un pico de tensión. Usando información sobre la magnitud de la señal (por ejemplo, la amplitud del pico de tensión) y/o la diferencia horaria entre el envío de un impulso de láser y la recepción de la onda de presión, la densidad y la concentración de los cromóforos pueden ser cuantificadas, así como su ubicación relativa a la de la película de PVDF, según se describe en detalle posteriormente. Algunos sistemas y métodos de la invención incluyen elementos y etapas de toma de estas mediciones y de uso de los datos resultantes para medir la densidad y similares.

Según se ha expuesto anteriormente, algunos ejemplos de la presente invención incluyen aparatos y métodos para detectar la presencia de células cancerosas melanóticas en el aparato hematogénico humano. Algunos sistemas y métodos emplean la tecnología fotoacústica como un método *in vitro* de detección y cuantificación de células tumorales en diseminación con el fin de detectar cánceres o como un método de determinación de la eficacia de la quimioterapia. Tales dispositivos y métodos ofrecen una manera de mejorar los protocolos estándar de detección, a la vez que alivian muchos de los síntomas problemáticos de los métodos alternativos de detección de la técnica anterior.

Algunos sistemas y métodos de detección fotoacústica de la invención proporcionan beneficios y ventajas, incluyendo la capacidad de identificar con precisión las células cancerosas diseminadas en el torrente sanguíneo, tanto en una etapa temprana como en una tardía. Esto proporciona una alternativa relativamente indolora y de menor coste a los protocolos clínicos de métodos de detección de tipo quirúrgico, y ofrece un mecanismo muy necesario para la detección temprana de la enfermedad. Se propone que este sistema de detección puede proporcionar un método para umbrales de detección precisos y sin precedentes identificando células individuales de melanoma en presencia de millones de células secundarias constituyentes de la sangre.

Un dispositivo ejemplar de detección proporciona un sistema de flujo a través del cual pueden introducirse soluciones de interés con el fin de excitar tan solo una única célula cancerosa melanótica por excitación láser pulsante. Para hacerlo, se incorpora en el sistema una celda transparente de flujo, o cámara de excitación, propicia para la excitación por láser. También se incluye un sistema acústico fiable de detección o un elemento de detección similar para captar ondas fotoacústicas. Se usa un elemento de señal para convertir las ondas acústicas producidas por la excitación melanótica en señales de tensión que puedan ser mostradas para su análisis.

En la FIG. 3 se muestra esquemáticamente un sistema ejemplar 50 de detección de la invención. Incluye, entre otros elementos, una cámara de excitación o celda 52 de flujo. La celda 52 de flujo es la cámara en la que se producen la excitación láser y la propagación y la detección de la onda acústica. Varias celdas de flujo diferentes son adecuadas para su uso en métodos y sistemas de la invención. Algunas incluyen paredes laterales transparentes que permiten que una fuente de energía electromagnética, siendo el láser un ejemplo, esté situada de forma externa a la celda. Una celda ejemplar 52 que resulta ser útil es una celda adaptable de flujo disponible comercialmente en Spectrocell, Oreland, Pensilvania). La celda 52 es mostrada esquemáticamente en la FIG. 3, y es ilustrada con mayor detalle en la FIG. 4.

Las FIGURAS 4(A) y 4(B) muestran la celda 52 de flujo. Tiene una forma tridimensional de caja generalmente rectangular, que incluye paredes laterales estrechas opuestas primera y segunda 54 unidas a paredes laterales opuestas más anchas 56. Las dimensiones mostradas son únicamente ilustrativas; serán útiles otras dimensiones. Según muestra la FIG. 4B, en la celda ejemplar 52 las paredes laterales estrechas tienen una anchura de aproximadamente 2 mm (a lo ancho de la FIG. 4B) y las paredes laterales más anchas tienen una anchura de aproximadamente 10 mm. La celda 52 también incluye un diafragma 58 de detección dispuesto en una de las paredes laterales más anchas 56 y que cubre un paso cilíndrico de aproximadamente el mismo diámetro en la pared lateral 56, por el que está en contacto de fluido con la muestra de ensayo en el interior de la celda 52. En la celda ejemplar 52, el diafragma 58 es una película de PVDF con un diámetro de 5 mm. La celda 52 también incluye un electrodo positivo 60 que se extiende fuera del interior de la celda y a través de un paso pequeño en una de las paredes laterales estrechas 54 y en contacto de fluido con la muestra de ensayo en la misma.

La FIG. 4(B) es un esquema que muestra las dimensiones de la celda ejemplar 52 de flujo y la dirección de un haz láser incidente 64 cuando atraviesa la celda 52 desde una fuente externa. La celda ejemplar 52 de flujo tiene unas dimensiones de aproximadamente  $2 \times 10 \times 45$  mm (anchura de las paredes  $54 \times$  anchura de la pared  $56 \times$  altura) para un volumen fluido total de aproximadamente 0,9 ml. Se contemplan y serán útiles otras dimensiones. Las dimensiones particulares serán seleccionadas en función de consideraciones de diseño, incluyendo tamaño del haz de energía, el rendimiento volumétrico deseado de la muestra de ensayo, el caudal y similares.

Las partes superior e inferior de la cámara 52 de flujo están ahusadas hacia tomas cilíndricas 66 con un diámetro interno de aproximadamente 2,7 mm y un diámetro externo de aproximadamente 4,95 mm. Estas tomas 66 sirven para conectar la celda al conducto 68 (FIG. 3) que comunica el fluido de la muestra de ensayo con el interior y el exterior de la celda 52.

El haz láser 64 de alta intensidad es dirigido a una de las paredes laterales estrechas 54 de la celda 2 de flujo, opuesta a la del diafragma 58 de detección, a una altura aproximadamente igual a la de la abertura 54 de detección. El haz láser 64 atraviesa la muestra líquida de ensayo en el interior de la celda 52 y sale a través de la pared lateral estrecha 54 opuesta.

Según se ha expuesto anteriormente, el haz láser se configura para inducir una reacción termoelástica en la muestra de ensayo que da lugar a una onda acústica. En algunos métodos y aparatos de la invención, la onda acústica es detectada a través del uso de un diafragma 58 que se desvía cuando la onda acústica hace contacto con él. El diafragma ejemplar 58 se encuentra en contacto de fluido con la muestra de ensayo. La desviación del diafragma 58 puede ser detectada a través de varios métodos. En la celda ejemplar 52 de flujo, se emplea el diafragma 58 de película piezoeléctrica en la pared lateral más ancha 56 de la celda como diafragma sensor de la onda acústica.

Según se ilustra óptimamente en esquema de la FIG. 5, el diafragma 58 está dispuesto alrededor de un par de electrodos que incluyen el electrodo interno 60 y un electrodo externo mostrado en general en 80 que serán descritos posteriormente. Esta configuración da lugar a un campo eléctrico entre los electrodos 60 y 80 que ha de ser alterado y fluctuar cuando el diafragma 58 sea desviado entre los mismos. Según se expondrá con detalle posteriormente en la presente memoria, la fluctuación del campo eléctrico puede ser medida y usada para señalar la presencia de una onda acústica y, por lo tanto, de un analito. La cantidad de desviación del diafragma puede ser usada para estimar cualidades del analito detectado, incluyendo, por ejemplo, su coloración, su densidad, su masa y/o su tamaño.

El diafragma o película piezoeléctrica 58 en el sistema ejemplar 50 es cortado a un diámetro ligeramente mayor que un paso de 5 mm de diámetro en una de las paredes laterales más anchas 56 (10 mm) y está fijado al exterior de la celda 52 de flujo por un sellador 100% de silicona disponible en DAP Inc., Baltimore, Maryland. La película piezoeléctrica 54 es una película copolimérica de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 100 micrómetros disponible en Ktech Corp., Albuquerque, Nuevo México.

Aunque se contemplan muchas configuraciones adicionales, se usan electrodos de cobre tanto para la detección de la señal positiva como para la conexión a tierra. Para cada una se usaron mecanismos diferentes. El electrodo positivo ejemplar 60 es un hilo de cobre pelado de 0,6 mm de diámetro de aproximadamente 17 mm de longitud insertado en la pared lateral estrecha 54 (2 mm de anchura) de la celda 52 de flujo, según muestran las FIGURAS 4A-B y la FIG. 5. El electrodo 60 está sellado con sellador 100% de silicona. Se extiende sobre gran parte de la anchura horizontal de 10 mm de la pared lateral más ancha 56 y deja un extremo externo que está conectado por un conductor, tal como el hilo 82, para su transferencia a un controlador, que puede incluir uno o más de un ordenador, un amplificador 84 (FIG. 3), un osciloscopio 86 (FIG. 3), o similares.

El electrodo negativo 80, o de tierra, consiste en una placa circular delgada 90 de cobre de 4 mm de diámetro de Small Parts, Inc., Miami Lakes, Florida, soldada a un hilo de corta longitud de 3,5 mm de diámetro que, a su vez, está soldado a un conector 31-221-VP BNC 92 de Jameco Electronics, Belmont, California, que se conecta a un cable coaxial RG 58 94 puesto a tierra de Pomona Electronics, Everett, Washington. La placa plana 90 de cobre está a ras del lado externo de la película 54 de PVDF. Esto proporciona una tierra a un lado de la película piezoeléctrica.

Con referencia una vez más al esquema de la FIG. 3, se bombean soluciones experimentales de una muestra de ensayo a través del conducto 68 de circulación usando una bomba 102. En el sistema ejemplar 50, la bomba 102 es una bomba peristáltica, concretamente una Masterflex L/S Economy Drive.

Se hace notar que, aunque muchos sistemas y métodos de la invención incluyen la circulación de muestras de ensayo, otros no. La circulación es beneficiosa en muchas aplicaciones, sin embargo, dado que permite que una muestra relativamente grande sea sometida a un haz de energía relativamente pequeño y compacto mientras se hace que circule por delante del haz.

El conducto 68 de circulación en el sistema ejemplar comprende un tubo de silicona endurecida con platino L/S 14 disponible en Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, Illinois. Aunque pueden usarse otras bombas, una bomba peristáltica ofrece ventajas, porque no hay ningún elemento mecánico de la bomba que interactúe directamente con la muestra de fluido en el conducto 100. En el sistema ejemplar 50, se introducen aproximadamente 15 ml de soluciones de muestras de ensayo en un depósito abierto 104 de  $13,75 \text{ cm}^3$ . La bomba peristáltica 102 proporciona una presión negativa, que hacer circular al fluido de la muestra de ensayo fuera del depósito 102, llevándolo a través

de la celda 52 de ensayo, y devolviéndolo finalmente al depósito 104 a través de una parte superior abierta. El tubo 68 de silicona es ajustado por tamaño a las tomas 66 de salida y entrada (FIG. 4) de la celda 52 de flujo. En el sistema ejemplar 50, las soluciones de muestras de ensayo circulan a una velocidad promedio de aproximadamente 9 ml/minuto, permitiendo que los analitos de interés sean excitados 235 veces cuando cruzan verticalmente la trayectoria 64 del haz (FIG. 4) de un láser de impulsos de 5 ns con un tamaño de punto de 1 mm (condiciones medias para una configuración dada).

Los expertos en la técnica apreciarán que, como fuente de energía electromagnética, se usan láseres, y en particular luz láser de impulsos. Hay una amplia variedad de láseres adecuados para ser usados en diferentes métodos y sistemas de la invención. Para una aplicación particular se pueden especificar, según se desee, factores tales como longitud de onda de la luz, anchura del haz, intensidad y similares.

En el sistema ejemplar 50, se hace posible la excitación fotoacústica por un sistema láser pulsante nítidamente enfocado mostrado en general en 110 en la FIG. 3. Aunque pueden usarse diversos láseres diferentes y otras fuentes de energía electromagnética, el sistema láser 110 en el sistema ejemplar 50 incluye un láser de itrio-aluminio-granate dopado con neodimio, o Nd:YAG, de triple frecuencia de conmutación Q de Quantel Les Ulis, Cedex, Francia, alojado en un sistema láser regulable integrado vibrante de Opotek, Carlsbad, California. El Nd:YAG es un láser bombeado que emite luz láser de 1024 nm por impulsos mediante un conmutador óptico denominado "conmutador Q" que actúa como una puerta para liberar luz en la inversión máxima de los iones de neodimio. Una vez liberada, la luz láser es reflejada por dos espejos dentro del sistema láser regulable integrado vibrante a un segundo generador armónico en el que la longitud de onda es convertida en 532 nm, luego a un tercer generador armónico, en el que es convertida en 355 nm. La luz láser de 355 nm es bombeada a un oscilador paramétrico óptico u OPO.

El OPO contiene un cristal de borato de bario beta que es regulado por la rotación electrónicamente controlada del cristal con respecto al haz. El OPO convierte la longitud de onda de entrada de 355 nm en dos haces —el de señal y el complementario—, cada uno de los cuales tiene longitudes de onda más largas que el haz de entrada una cavidad denominada oscilador resonante doble hace oscilar las longitudes de onda tanto de señal como la complementaria, mientras que el ángulo de regulación del cristal determina una coincidencia de fase que produce la longitud de onda deseada, que luego es liberada de la cavidad. El ángulo de regulación es controlado por un motor por pasos operado por un programa externo generado por un ordenador.

El OPO permite la producción de longitudes de onda variables que oscilan entre 410 nm y 710 nm. La longitud de onda particular de la luz utilizada en los métodos y los sistemas de la invención usando un láser dependerá de las aplicaciones, incluyendo la longitud de onda que será absorbida por el analito que se esté buscando, y similares. A título de ejemplo, puede ser útil una luz láser de aproximadamente 450 nm.

Tras el OPO, al haz atraviesa un polarizador. En algunos sistemas de la invención, la luz láser es acoplada entonces por una lente en un soporte de fibras de fibra óptica (siendo un ejemplo una fibra estándar de sílice de 1,5 mm) para la transferencia lumínica. Aunque esto puede ser útil, en algunas aplicaciones la fibra puede estar sujeta a roturas y a pérdida de energía que dan lugar a resultados deficientes. Otros dispositivos y métodos ejemplares, incluyendo el sistema ejemplar 50, utilizan un sistema de suministro "abierto", en el que la luz láser atraviesa la atmósfera desde el sistema láser 110 hasta la celda 52 de ensayo. En el sistema ejemplar 50, el uso de la luz abierta aumentó la entrada de energía en la celda 52 de ensayo, pasando de un intervalo de 7,0-8,0 mJ de salida cuando se usaba fibra, a 11-12 mJ.

En algunos sistemas y métodos ejemplares de la invención, puede existir una solución de compromiso entre la intensidad de la energía radiante y una exposición radiante suficiente. Es decir, un haz radiante es, idealmente, lo bastante grande para abarcar la totalidad del analito o todos los cromóforos que puedan atravesar la celda 52 de detección, pero no demasiado grande para que no proporcione suficiente energía para una intensidad de señal competente. Esta solución de compromiso debe ser equilibrada, además, con los costes de un sistema láser 110: aunque es concebible que pudiera obtenerse un sistema suficientemente grande para proporcionar un haz de diámetro sumamente grande de muchísima energía, los costes para hacerlo pueden ser prohibitivos.

El haz láser 64 que sale de la toma de salida del sistema láser regulable integrado vibrante 110 adopta la forma de una elipse. En tales métodos y sistemas ejemplares, el haz debería estar enfocado en la celda 52 de flujo para que el perfil del haz adopte una forma circular que oscile entre aproximadamente 1 mm y 2 mm de diámetro para que entre limpiamente en la pared de 2 mm de la celda 52 de flujo. Diferentes tamaños de haz serán útiles para celdas de diferente tamaño, pero es generalmente ventajoso configurar el haz para que tenga un diámetro que se extienda por toda la anchura de la celda 52. Esto permite que toda la sección transversal de la muestra de ensayo en circulación sea irradiada por el haz. Además, configurar la celda de ensayo en una geometría tal como la mostrada en la FIG. 4, en la que la celda con forma de caja rectangular tiene un lado delgado (por ejemplo, el lado de 2 mm) y un lado más ancho (por ejemplo, el lado de 10 mm) puede ser ventajoso. En tales geometrías, el haz 64 puede atravesar las paredes laterales estrechas opuestas 54 e irradiar toda la sección transversal de la muestra en circulación dentro de la celda 52 de ensayo.

Con referencia de nuevo al esquema de la FIG. 3, en el sistema ejemplar 50 el haz 64 de salida estaba orientado espacialmente por una serie de lentes mostradas en general en 112. Estas incluyen una lente cilíndrica 114 (lente nº

LJ1014L2-B, de Thorlabs, Newton, Nueva Jersey), además de dos lentes colimadoras plano-convexas, de 100 mm (elemento 116) y 50 mm (elemento 118) de distancia focal (lentes n<sup>os</sup> LA 1509 y LA 1131, también de Thorlabs, Newton, Nueva Jersey) antes de entrar en la celda 52 de flujo. El resultado fue que el haz 64 tiene un tamaño de punto cilíndrico de 1 a 2 mm diámetro que media entre 11,0-12,0 mJ cuando entra en la celda 52. El tamaño del punto se determinó irradiando papel de alineamiento láser ZP-IT, de Kentek Corp., Pittsfield, New Hampshire, con un único impulso de 5 ns y midiendo el diámetro de la quemadura.

Se presenta el esquema de la FIG. 6 para ilustrar más completamente los mecanismos de excitación y detección de algunos sistemas y métodos. En lo pertinente a algunos métodos y sistemas ejemplares de la invención, el mecanismo fotoacústico comienza con la excitación de un analito o cromóforo 150; en este caso ejemplar, melanoma o su espectro tisular relacionado. En el sistema ejemplar 50 y en los métodos ejemplares relacionados, se destella luz láser 54 con una frecuencia de aproximadamente 5 ns y se encuentra a una longitud de onda de aproximadamente 450 nm. La frecuencia de los impulsos puede ser seleccionada según se desee, dependiendo de factores tales como geometría y escala de la celda, caudal de la muestra, analito que se esté buscando y similares. En muchos sistemas y métodos ejemplares, se creen que son útiles las frecuencias más rápidas que un milisegundo, más rápidas que un microsegundo y, en muchas aplicaciones (tales como el sistema ejemplar 50), del orden de un nanosegundo (ns).

Esto bombardea al cromóforo 150 de interés en la muestra de ensayo cuando atraviesa el haz 64. El cromóforo 150 absorbe del haz 64 al menos una porción de la luz incidente y la energía fotónica es transformada en energía térmica. El aumento de energía térmica causa una elevación de la temperatura dentro del cromóforo 150 y se produce una expansión termoelástica cinética. La expansión termoelástica es transitoria, debido a la naturaleza pulsante de la luz láser incidente 64. Dado que los impulsos de excitación son lo suficientemente cortos en duración para que no escape del cromóforo 150 ningún calor térmico, se producen pequeños agrandamientos elásticos de las células 150 dentro de la solución, de manera que se propaguen ondas 152 de presión alejándose de la fuente en el intervalo de 1-50 MHz.

Las ondas longitudinales de presión, como las emanadas de una fuente fotoacústica, se propagan paralelas a la dirección e la onda. El efecto resultante es el de una onda de compresión o banda en movimiento de alta presión. Esta banda de alta presión se mueve libremente en la solución (tal como el entorno de la muestra de ensayo dentro de la celda 52 de flujo) alejándose de la fuente en todas direcciones. la velocidad de la onda varía con la aplicación y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 mm por segundo. Una porción de estas ondas 152 entra en contacto con el diafragma 58 y lo golpea como un mazo golpearía la superficie de un tambor.

La película 58 de PVDF es un copolímero de alta ordenación que puede ser comparado con una bicapa lipídica en un sistema biológico. En el estado estacionario, o tierra, las condiciones son entrópicamente favorables para una estructura copolimérica ordenada. Cuando una onda acústica 152 golpea una superficie de la película 58, esa capa copolimérica es alterada, aumentando la entropía del sistema y, en consecuencia, formando un cambio en la superficie alterada. El exterior de la película 58 está conectado a tierra por el electrodo 90 de placa de cobre (FIG. 5), confiriendo por ello una carga positiva a la superficie interior de la película 58 de PVDF.

En otras realizaciones ejemplares, la película de PVDF u otro sensor puede ser de menor tamaño, lo que puede aumentar la intensidad de la señal al disminuir el área del detector y eliminar parte de la atenuación de la señal. Pueden aplicarse productos químicos como el óxido de indio y estaño a la superficie positiva del PVDF para aumentar la conductancia en la superficie de la película.

La tensión positiva producida por el fenómeno fotoacústico es conducida por todo del interior de la celda 52 de ensayo por una solución vehicular conductora, tal como la solución salina al 1,8% que es usada en algunos métodos y sistemas ejemplares de la invención. El electrodo 60 descrito anteriormente saca la carga de la celda 52 de flujo para su análisis ulterior.

En el sistema ejemplar 50, la señal eléctrica resultante es amplificada para facilitar la detección. La tensión transducida de un efecto fotoacústico es llevada al amplificador 84 (FIG. 3), que, en el sistema ejemplar, es un amplificador SR445A de 350 MHz de Stanford Research Systems, Sunnyvale, California, en el que es amplificada por cuatro etapas, cada una de las cuales proporciona una ganancia de 5 para un intervalo de amplificación de 5 a 125. En el sistema ejemplar 50, las señales de tensión son mostradas por el osciloscopio 86, que, en el sistema ejemplar 50, es un osciloscopio TDS 2024 de 200 MHz de Tektronix, Beaverton, Oregón, activado por un fotodiodo disponible en Thorlabs, Newton, Nueva Jersey, tras cada disparo del láser.

Se hace notar que el amplificador 84 y el osciloscopio 86 son un ejemplo de componentes electrónicos útiles para recibir y analizar señales procedentes de la celda 52 de ensayo. En otros sistemas ejemplares, estos componentes son sustituidos por un único controlador, que puede ser, por ejemplo, un dispositivo a base de procesadores con componentes internos útiles para amplificar y procesar la señal de tensión procedente de la celda 52. Tal controlador puede producir datos, incluyendo datos visuales y/o de audio que indiquen la presencia de una onda acústica y, por lo tanto, de un cromóforo de interés. El controlador también puede grabar datos en memoria, y grabar otros datos, tales como la hora, la identificación de la muestra de ensayo y similares. El controlador puede ser, por ejemplo, un ordenador.

Según se ha hecho notar anteriormente, las FIGURAS 3-6 son únicamente esquemáticas, y han sido proporcionadas para ilustrar diversos elementos de una realización ejemplar de un sistema y un método de la invención. Otros sistemas y métodos variarán con respecto a los ilustrados anteriormente. De hecho, el sistema, según está ilustrado, representa un aparato experimental que puede ser configurado, por ejemplo, en un laboratorio. Las realizaciones comerciales de sistemas y métodos de la invención pueden ser configuradas usando conductos, celdas, depósitos y similares alternativos.

A título de ejemplo, algunas realizaciones comerciales pueden ser configuradas en un alojamiento, usando un controlador informático que esté unido al láser, a la bomba y que proporcione obtención, grabación, procesamiento y presentación de datos. Algunas realizaciones de la invención pueden valorar la portabilidad y ser configuradas como tales. Otras variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

A título de ejemplo, se configuró un sistema adicional de la invención usando una configuración alternativa de la celda. La celda fue configurada como un dispositivo de doble cámara construido a partir de portaobjetos de microscopio disponibles en Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania, cianoacrilato de Loctite, Avon, Ohio, sellador 100% de silicona de Dow Corning, Baltimore, Maryland, y plástico laminar de nailon de Small Parts Inc., Miami Lakes, Florida. Estos materiales fueron cuidadosamente cortados y contruidos a mano y, en ocasiones, dieron lugar a resultados menos fiables que los obtenidos con el sistema ejemplar 50. Una cámara sirvió como cámara de flujo y condujo una señal positiva, similar a la celda 52 de flujo de las FIGURAS 3-4. La segunda cámara era un depósito estancado lleno de solución salina que se conectó a tierra mediante un electrodo insertado en la cámara.

Separando las dos cámaras había una división de vidrio con un paso de 5 mm de diámetro cortado en la misma. La película de PVDF se selló en la cara de la división en el lado conectado a tierra. En consecuencia, este mecanismo funcionó de la misma manera que el diafragma en el sistema ejemplar 50 y fue usado para plasmar la idea de un dispositivo fotoacústico propuesto. Era esencialmente coherente con la celda 52 expuesta anteriormente, salvo que la segunda cámara llena de solución salina sustituyó al electrodo 80 conectado a tierra.

Se han utilizado, asimismo, otras variaciones de la celda 52. A título de ejemplo, en una configuración alternativa, el electrodo interno 60 fue eliminado. Esta configuración utilizó un electrodo adicional positivo de placa de cobre alojado en el lado opuesto del electrodo 80 de tierra que sujetaba entre sí ambos lados de una película de PVDF chapada en aluminio. Esta película sustituyó al diafragma 58 mostrado anteriormente. El chapado de aluminio puede servir como conductores para las señales tanto positiva como de tierra, evitando el uso del electrodo 60 invasivo en la celda de flujo.

Sin embargo, se descubrió que el chapado en aluminio comprometió a cierta medida la integridad estructural de la película 58 de PVDF y dio como resultado una intensidad deficiente de la señal. Se cree que la falta de intensidad de la señal puede haber sido consecuencia del cortocircuitamiento de la señal por el contacto del electrodo. Para abordar este problema, el sistema ejemplar 50 mostrado anteriormente utiliza la película no chapada 58, un electrodo positivo interno 60, y una puesta directa a tierra mediante un electrodo chapado externo 80 colocado directamente en el área de detección de la película 58 de PVDF. Aunque la configuración mostrada anteriormente resultó beneficiosa con respecto a la configuración de película chapada, en algunas aplicaciones esta configuración alterna de los electrodos puede ser útil en algunas aplicaciones.

También se contemplan otras variaciones y modificaciones del sistema y del método mostrados anteriores. Algunas modificaciones, por ejemplo, serán útiles para regular el umbral de detección de los sistemas y los métodos de la invención. Este puede regularse, al menos hasta cierto punto, a través del ajuste de la intensidad de la señal. Una mayor intensidad de la señal generalmente dará lugar a mayor sensibilidad. Sin embargo, los incrementos en la intensidad de la señal deben equilibrarse con el ruido resultante en la señal. Es deseable una relación señal-ruido elevada. Los expertos en la técnica apreciarán que la puesta a punto de un sistema para lograr esto será posible y puede variar en detalles de aplicación particulares. A continuación, se exponen algunos elementos del sistema y de los métodos ejemplares que pueden variarse para afectar a la intensidad de la señal y a la proporción de ruido.

Por ejemplo, se logró una mejora en la intensidad de la señal en el sistema ejemplar 50 debido a un aumento en el tamaño de la abertura de detección en la pared lateral 56 que subyace al diafragma 58 de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 5 mm de diámetro. Generalmente, las aberturas de detección mayores aumentan la probabilidad de que se produzca la captación de la onda acústica de entre el medio circundante. Se logró una mejora adicional en la intensidad de la señal usando un volumen total de la celda relativamente pequeño, y en particular en lo referente a la anchura de la pared lateral estrecha 54 de 2 mm. Esta anchura de la pared lateral estrecha 54 de 2 mm restringe a los cromóforos que atraviesan la celda de flujo y fuerza a todo el medio a atravesar el haz de excitación, garantizando que no se pase por alto ningún cromóforo que atraviese la celda.

Aunque el valor de 2 mm es solo un ejemplo de un tamaño útil, muchos métodos y sistemas se beneficiarán usando una primera pared lateral 54 que sea más estrecha que la segunda pared lateral 56, estando dirigida la fuente de energía electromagnética a través de la primera pared lateral estrecha 54. Cuando el haz tiene una anchura que se extiende sustancialmente por toda la pared lateral estrecha 54, es irradiada toda la sección transversal de la muestra de ensayo en circulación. Dirigir al haz a través de la pared lateral más ancha 56, por otro lado, requeriría un haz significativamente más ancho (con una energía resultante significativamente menor por unidad de área).

Son posibles otras configuraciones para lograr este resultado, incluyendo, por ejemplo, configuraciones de la celda de ensayo con una porción estrecha de "garganta" a través de la cual la muestra de ensayo fluye a alta velocidad. Sin embargo, la velocidad no debería ser tan grande que acorte el tiempo de estancia de los analitos en el haz de energía. A continuación, se expone en la presente memoria una configuración ejemplar.

5 También se hace notar que hay beneficios en ubicar el diafragma 58 de detección en la pared lateral más ancha 56, a través de la cual no pasa el haz 64. Esta pared lateral más ancha 56 proporciona un área mayor para que puedan usarse diafragmas mayores 58. Además, en algunos experimentos se descubrió que el haz 64 podría causar un mayor ruido en la señal de detección por un efecto piroeléctrico de fotones lumínicos que interactuaban con los polímeros de la película. Se logró un mejor rendimiento cuando el haz fue dirigido atravesando la pared lateral estrecha 54 y se evitó la interacción directa con el diafragma 58. Sin embargo, en algunos sistemas y métodos ejemplares, la excitación frontal puede resultar útil.

10 En otras realizaciones de métodos y sistemas de la invención, se proporcionó otra modificación para mejorar adicionalmente el rendimiento. Pueden proporcionarse, por ejemplo, elementos para regular la ubicación mutua del haz láser 64 y de la celda 52. Aunque son posibles muchos mecanismos posibles para lograr esto, resulta útil una etapa x-z de traslación conectada a uno o a ambos del láser 110 o la celda 52. Esto puede resultar útil para garantizar que el haz encuentre con precisión la celda 52 de ensayo. Tal mecanismo ha sido ilustrado esquemáticamente como el dispositivo 170 de ajuste X-Y-Z. En la práctica, este puede comprender una mesa controlable subyacente al láser 110 o a la celda 52 o similar.

15 Otras modificaciones potenciales del sistema 50 incluyen el uso de una fibra para comunicar luz láser según se ha descrito anteriormente para maniobrar la fuente de luz a la ubicación más eficiente para la excitación de la celda 52. Se efectuaron pruebas de ensayo usando luz emitida directamente desde una fibra y se descubrió que daban lugar a un tamaño de punto de casi 4 mm. Se descubrió que el enfoque de la luz láser era importante y que estaba directamente relacionado con la intensidad de la señal. También se descubrió que una pequeña disminución en el diámetro del tamaño del punto daba lugar a un aumento en la exposición radiante según la ley cuadrática inversa. Según se expone posteriormente, se descubrió que, al menos en el sistema ejemplar 50, el uso de fibra disminuía la intensidad de la señal.

20 La exposición radiante se define como julios por  $\text{cm}^2$ . En lo que respecta al diseño de algunos sistemas de la invención, una disminución de un milímetro en el tamaño del punto de 3 mm a 2 mm para una fuente lumínica de 12 mJ da lugar a un aumento del 125% en exposición radiante. Por lo tanto, se insertó una lente planoconvexa de 35 mm (lente n° LAI027 de Thorlabs, Newton, Nueva Jersey) entre la fibra y la cámara de detección para disminuir el tamaño del punto incidente hasta aproximadamente 2 mm de diámetro. Al final, todo el sistema fue recolocado para la excitación sin una fibra intermedia, según se ha descrito anteriormente con referencia al sistema láser 110 y a su lente 112. Esto aumento la energía incidente de 7,0 u 8,0 mJ a 11,0 o 12,0 mJ. El tamaño del punto fue llevado a menor de  $0,026 \text{ cm}^3$  (entre 1 y 2 mm de diámetro), dando una exposición radiante en el intervalo de 460-900  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  y aumentando las tensiones de la señal a su nivel más alto.

25 La amplificación de la señal al pasar del aparato de detección al osciloscopio también puede desempeñar un papel importante en la identificación de una señal, así como en la respuesta de ruido. En el sistema ejemplar 50, se descubrió que una ganancia de 25 parecía producir la mejor diferenciación de las señales. A menudo, una ganancia de 125 reducía la proporción señal-ruido significativamente y producía resultados deficientes, aunque debería hacerse notar que, en algunos casos, fue preferible una ganancia de 125 para la detección de señales sumamente débiles. Por lo tanto, en el sistema ejemplar 50, se usa por defecto una ganancia de 25; sin embargo, la ganancia debería fijarse en función del experimento o aplicación individual.

30 Las pruebas de detección se realizaron usando el sistema ejemplar 50 y los métodos expuestos anteriormente. Se usaron microesferas de látex como precursor de células de melanoma vivo. También se usaron soluciones de ensayo para determinar un umbral de detección para el sistema y el método ejemplares para caracterizar la sensibilidad del sistema ejemplar. Se realizaron algunos ensayos experimentales usando un diseño de doble cámara, mientras que el establecimiento inicial de umbrales se llevó a cabo un diseño de cámara única para la celda de flujo.

35 Se usaron microesferas negras de látex CML (n° 2-BK-7000, disponibles en Interfacial Dynamics Corp., Portland, Oregón) que median 6,6  $\mu\text{m}$  de diámetro como espectros tisulares para imitar la respuesta fotoacústica de las células de melanoma (las propiedades ópticas de las células de melanoma y de los espectros tisulares son descritas posteriormente). Se optó por las microesferas de látex por su espectro de absorción de banda ancha y su tamaño relativo. Una célula estándar de melanoma puede oscilar entre 10  $\mu\text{m}$  y más de 50  $\mu\text{m}$ , dependiendo de la heterogeneidad de la línea celular y de la morfología de la célula. Aunque la célula de melanoma tiene a ser mucho mayor que las microesferas usadas en estas pruebas, las microesferas contienen un pigmento más oscuro y, por lo tanto, imitan suficientemente el efecto fotoacústico de una célula de melanoma, según se expone posteriormente. Sin embargo, se especula que el mayor tamaño de las células de melanoma y el gran número de gránulos de melanina contenidos dentro de ellas les permitirán producir una señal fotoacústica más intensa que las microesferas por célula individual. Por lo tanto, se cree que el auténtico melanoma proporcionará una señal similar a la de las microesferas, si no mayor.

El análisis espectroscópico de las microesferas de látex se realizó usando un espectrómetro de alta resolución HR-2000 y una fuente de luz halógena HL-2000 (de Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida). Se tomó un espectro de absorción de 4,3 g/100ml (4,3%) de microesferas negras usando una cubeta de 150 µm construida de portaobjetos de vidrio de 1 mm de grosor (de Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania) y material delgado de 150 µm (de Artus Corp., Englewood, Nueva Jersey). La solución de microesferas fue colocada en la cubeta construida e insertada entre la fuente de luz halógena y el detector del espectrómetro. Los datos se analizaron usando OOIBase32 (de Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida). La captura de datos se realizó en un tiempo de integración de 14 ms sin promediar. Se usó un tramo de trayectoria corta para reducir los efectos de la dispersión en los datos de absorbancia. El espectro de absorción resultante confirma que las microesferas poseen una absorción estable en todo el espectro visible, lo que demuestra que las esferas son, ciertamente, un absorbente negro de banda ancha. Este espectro indica un ligero aumento en la absorbancia con una longitud de onda dentro del intervalo visible.

Las microesferas de látex fueron introducidas en un fluido vehicular conductor de la señal. En los ensayos experimentales realizados, se usó solución salina. También resultarán útiles otros fluidos vehiculares. Inicialmente, la solución salina fue una solución de cloruro sódico (NaCl) al 0,9% creada añadiendo 0,9 g de soluto sólido de NaCl en 100 ml de disolvente de agua desionizada. En los ensayos experimentales realizados, se usó una solución al 1,8%, aunque muchas otras concentraciones resultarán útiles. Se añadieron microesferas a 20 ml de solución salina en concentraciones variables que oscilaban entre un máximo de  $7,124 \times 10^6$  microesferas/ml a un mínimo de  $7,0 \times 10^2$  microesferas/ml. La concentración de microesferas de cada solución se dedujo por:

$$\text{microesferas/ml} = \left( \frac{V_s}{V_m / V_{su}} \right) (V_i) / (20\text{ml})$$

representando  $V_s$  el volumen sólido de las microesferas de fábrica,  $V_m$  el volumen de una sola microesfera de 6,6 µm,  $V_{su}$  el volumen restante de la suspensión de microesferas de fábrica, and  $V_i$  el volumen incorporado en la solución salina. Se pusieron 15 ml de cada concentración seleccionada en el depósito para su circulación a través del sistema de detección.

Se crearon diversas concentraciones de esferas usando sistemas y métodos de la invención. Las pruebas emplearon una solución salina al 0,9%, una excitación de 510 nm, una energía de entrada de 7,5 mJ, y un tamaño de punto de  $2,36 \text{ mm} \times 2,45 \text{ mm}$ , dando lugar a una exposición radiante de  $0,129 \text{ J/cm}^2$ . La señal fue promediada en 64 tomas de datos. Los resultados de estas pruebas confirman que los sistemas y los métodos de la invención son no solo útiles para detectar las microesferas, sino que, además, son útiles para estimar la concentración de las microesferas.

Se efectuaron dos conjuntos adicionales de experimentos para determinar la sensibilidad de un sistema y un método ejemplares. En el primero, se usaron concentraciones de muestras que oscilaban entre  $7,12 \times 10^6$  y  $7,0 \times 10^2$  microesferas/ml para obtener una comprensión de la variación de la señal con la concentración. Determinar esto hace posible cuantificar concentraciones desconocidas de espectros tisulares mediante intensidades de señal conocidas. Esto representa un beneficio importante de algunos sistemas y métodos de la invención: la intensidad de la señal puede ser usada para estimar cualidades tales como la densidad del analito, la concentración del analito, el tamaño del analito y otras propiedades.

Todas las pruebas del primer conjunto de experimentos se efectuaron con los siguientes parámetros experimentales: excitación de 450 nm, entrada de energía de 8,75 mJ, tamaño de punto de  $1 \times 1 \text{ mm}$ , longitud del haz de 13,1 mm, exposición radiante de  $0,875 \text{ J/cm}^2$ , y caudal de 9 ml/min. Las concentraciones de  $7,12 \times 10^6$  a  $8,9 \times 10^4$  de las muestras emplearon una ganancia de señal de 25 promediada en 64 tomas de datos. Concentraciones menores que oscilaban de  $5,5 \times 10^3$  a  $7,0 \times 10^2$  usaron una ganancia de señal de 125 promediada en 128 tomas de datos. Los parámetros distintos fueron útiles para diferenciar señales de concentraciones menores para esta configuración. Los resultados experimentales de estos experimentos confirmaron de nuevo que puede lograrse la detección fotoacústica de células en circulación usando sistemas y métodos de la invención descritos en la presente memoria. Se detectaron con éxito microesferas de látex de 6,6 µm de diámetro en 3 concentraciones del orden de  $10^6$  por mililitro.

En el segundo conjunto de experimentos, se hizo que siete soluciones de microesferas de diferentes concentraciones que oscilaban entre  $8,9 \times 10^4$  microesferas/ml y  $7,0 \times 10^2$  microesferas/ml atravesaran un sistema de la invención. Las pruebas se realizaron con los siguientes parámetros: excitación de 450 nm, amplificación de  $\times 25$ , promediada en 128 tomas de datos, caudal de 9 ml/min, entrada de energía láser 11,5-12,0 mJ, tamaño de punto de  $0,13 \times 0,2 \text{ cm}$  ( $0,026 \text{ cm}^2$ ), y una exposición radiante de  $0,461 \text{ mJ/cm}^2$ .

Estos experimentos sugieren que las variaciones en la ganancia de amplificación de la señal pueden ser una modificación paramétrica ejemplar útil para aumentar la sensibilidad. En el sistema ejemplar 50, resultaron útiles las ganancias de 25, 50 y 125, resultando las configuraciones mayores de ganancia en mayor sensibilidad de detección. Sin embargo, una configuración de ganancia demasiado alta corre el riesgo de una mayor proporción señal-ruido.

En consideración adicional de la sensibilidad, suponiendo una distribución homogénea de las microesferas en toda la solución, la cantidad exacta de microesferas individuales que cruzan la trayectoria del haz en cualquier momento dado puede deducirse por:

$$M_{\#} = (C_m)(V_b)$$

siendo  $M_{\#}$  el número de microesferas excitadas, siendo  $C_m$  la concentración de microesferas por mililitro de solución, y siendo  $V_b$  el volumen de la trayectoria del haz de excitación a través de la celda de flujo en  $\text{cm}^3$ . Esta deducción hace posible darse cuenta del número de células individuales que producen cada señal fotoacústica, interpolando, por lo tanto, el número de cromóforos individuales necesarios para inducir una señal diferenciada.

5 Además, durante las pruebas experimentales se usó una solución salina más concentrada para potenciar la intensidad de la señal incrementando la conductividad por la solución de ensayo mientras se disminuía la resistencia del agua. Inicialmente, se había usado una solución salina fisiológica al 0,9% como disolvente para las pruebas. Se realizó un estudio que dobló la concentración salina al 1,8%, con un aumento resultante en la intensidad de la señal. Aumentar la concentración salina del 0,9% al 1,8% aumentó la señal pico de la solución en un factor de 1,2. Aunque pueden lograrse aumentos adicionales de la intensidad con concentraciones salinas mayores, a cierto nivel la concentración se vuelve demasiado alta para soportar la supervivencia de una célula de melanoma vivo, dado que empiezan a lisarse a concentraciones salinas por encima de aproximadamente el 0,9%. Se cree que las concentraciones de aproximadamente un 1,8% proporcionan un máximo útil, aunque en algunas circunstancias puedan usarse concentraciones más elevadas. Además, pueden ser útiles otras soluciones, además del suero fisiológico, en la práctica de los métodos y los sistemas de la invención. Generalmente, los fluidos conductores que soportan un melanoma resultarán útiles cuando se use un sensor acústico que dependa de un electrodo interno. Otras configuraciones del sensor pueden permitir usar fluidos no conductores.

20 Usar el sistema ejemplar expuesto en lo que antecede con un vehículo de solución salina al 1,8% resultó tener mucho éxito para la detección fotoacústica de espectros tisulares en forma de microesferas de látex negro de  $6,6 \mu\text{m}$ . Los resultados indican que los sistemas y los métodos de la invención son capaces de detectar la presencia de células individuales en una solución en circulación.

25 Para caracterizar adicionalmente algunos sistemas y métodos de la invención, se llevaron a cabo ensayos adicionales usando analitos distintos de las microesferas descritas anteriormente, o además de las mismas. Una aplicación en la que muchos sistemas y métodos de la invención encontrarán utilidad particular incluyen (sin limitación) la detección de células cancerosas de melanoma que circulan por el sistema hematogénico de un potencial paciente de cáncer. Los sistemas y métodos ejemplares de detección de la invención pueden procesar materiales a través de un análisis *in vitro* que requiere un método para extraer las células de interés de un paciente humano. Una simple extracción sanguínea es el método más común de obtención de células presentes en el aparato circulatorio y puede ser usada como método rutinario, relativamente indoloro, para obtener muestras particulares de interés. Una vez que se recoge una muestra de sangre, se propone que las células metastásicas de melanoma puedan ser aisladas con precisión de sangre entera *in vitro* implementando, a título de ejemplo, una técnica de centrifugación de Ficoll-Hypaque. Esta técnica requiere que la sangre entera extraída sea sometida a separación de gradiente por centrifugación para aislar la capa celular particular de interés antes de introducirla en el sistema de detección fotoacústica.

35 Para evaluar adicionalmente los sistemas y los métodos de la invención, se introdujeron espectros tisulares que representan melanoma biológico en muestras sanas de sangre *in vitro* y fueron detectados usando el método fotoacústico. Esta sección describe detalles experimentales de tales ensayos de prueba. Sin embargo, antes de proporcionar tal detalle, serán útiles ciertos antecedentes de la aplicación.

40 Los leucocitos, o glóbulos blancos, defienden al cuerpo contra organismos infecciosos y agentes extraños, tanto en tejidos como en el propio torrente sanguíneo. La sangre humana contiene entre aproximadamente 5.000 y 10.000 leucocitos por milímetro cúbico; el número aumenta en presencia de una infección. Los leucocitos, al igual que los eritrocitos, se forman en células madre de la médula ósea. Tienen núcleos y se clasifican en dos grupos: granulocitos and agranulocitos.

45 Los granulocitos se forman en la médula ósea y representan aproximadamente el 70% de todos los leucocitos. Los granulocitos incluyen tres tipos de células: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los neutrófilos constituyen la gran mayoría de los granulocitos. El fin principal de estas células es rodear y destruir a las bacterias y a otras partículas extrañas, así como actuar en mecanismos de respuesta inflamatoria durante la infección o una reacción alérgica. Los granulocitos sirven como primera línea de defensa contra la infección de células extrañas.

50 Los agranulocitos incluyen monocitos y linfocitos. Los monocitos se derivan de las células fagocíticas que recubren muchos canales vasculares y linfáticos, denominados sistemas reticuloendoteliales. Los monocitos normalmente suman del 4% al 8% de los leucocitos. Se desplazan a áreas de infección, donde se transforman en macrófagos, grandes células fagocíticas que atrapan y destruyen organismos dejados por los granulocitos y los linfocitos. Los linfocitos, en condiciones normales, constituyen entre aproximadamente el 20% y el 35% de todos los leucocitos, pero proliferan rápidamente ante una infección. Hay dos tipos básicos de linfocitos: los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B tienden a migrar al tejido conectivo, en el que se desarrollan en células plasmáticas que producen anticuerpos muy específicos contra antígenos extraños. Otros linfocitos B actúan como células con memoria, listas para una infección posterior del mismo organismo. Algunos linfocitos T matan a las células invasoras directamente; otros interactúan con otras células del sistema inmunitario, regulando la respuesta inmunológica.

Células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) es una expresión usada para describir monocitos y linfocitos que pueden ser separados de una solución de sangre entera usando una técnica de centrifugación de Ficoll-Hypaque descrita en la presente memoria. En los métodos y los sistemas de la invención también serán útiles otras técnicas de separación, incluyendo el centrifugado y técnicas similares.

5 Aunque existe información contradictoria sobre la enfermedad metastásica y sus interacciones con el sistema inmunitario humano, se plantea la hipótesis de que los antígenos presentes en la superficie de las células de melanoma en el torrente sanguíneo de un individuo con enfermedad metastásica serán reconocidos por estas células mononucleares, que se unirán a ellos. Esta suposición se basa en la idea de que la enfermedad metastásica es una enfermedad *crónica* que persiste en el torrente sanguíneo y sería principalmente atacada por monocitos y linfocitos, que se cree que defienden contra la enfermedad crónica más que los granulocitos. Por lo tanto, el aislamiento de la capa de células mononucleares de sangre periférica debería dar lugar al aislamiento de cualquier célula de melanoma presente en el torrente sanguíneo.

10 Se extrajeron muestras de sangre sana y libre de cáncer de individuos que dieron su consentimiento dentro del grupo del laboratorio. Se tomaron muestras mediante punción venosa del área antecubital del brazo en una cantidad de 10 a 50 centímetros cúbicos usando un procedimiento estándar de extracción de sangre. Se usaron tubos recubiertos de líquido de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para la recogida de sangre para inhibir la coagulación. Las muestras de sangre fueron almacenadas en un ambiente refrigerado durante no más de cinco horas antes de ser procesadas.

15 Se usó una técnica de separación de Ficoll-Hypaque para aislar la capa de células mononucleares de sangre periférica de las muestras de sangre entera. El proceso de Ficoll-Hypaque emplea un compuesto de azúcar de una densidad específica que separa componentes sanguíneos específicos por un gradiente de densidad cuando se aplica la fuerza centrífuga. Se puso aproximadamente 1 ml de gradiente de separación Histopaque 1077 (de Sigma-Aldrich Inc., San Luis, Misuri) en tubos de vidrio Pyrex nº 9800 (de Corning Inc., Acton, Massachusetts). Se vertieron suavemente aproximadamente 7 ml de sangre de las muestras refrigeradas sobre el Histopaque 1077 y se detuvieron con un tapón de caucho. El tubo de muestra fue colocado a continuación en una centrífuga Vanguard 6500 de 60 Hz a 3400 rpm (de Hamilton Bell Co., Montvale, Nueva Jersey) y fue centrifugado durante 10 minutos. El gradiente y la ubicación relativa resultantes incluyen la capa de células mononucleares de sangre periférica, que consiste en monocitos y linfocitos separados directamente por encima de la capa de Histopaque y por debajo del plasma. Los granulocitos son más grandes y están separados por debajo de la capa de Histopaque, directamente por encima de la capa de sangre (no mostrado).

20 Después de la separación, la capa diferenciada de PBMC fue retirada cuidadosamente con pipetas estándar de transferencia (de Samco Scientific Corp., San Fernando, California) y fue colocada en tubos de microcentrifugación de parte superior plana de 1,5 ml (de Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania). Las PBMC de los tubos de microcentrifugación fueron lavadas en una solución salina y se volvieron a centrifugar durante 5 minutos. Se pipetearon la solución salina y el plasma sobrantes de la parte superior de la capa de PBMC. Esto se repitió hasta que las células mononucleares de sangre periférica quedaron claramente aisladas.

25 Se añadieron dos suspensiones de células mononucleares aisladas (0,111 g) a 20 ml de una solución salina al 0,9%. Una suspensión sirvió de control. La segunda suspensión contenía 0,5 ml ( $1,49 \times 10^8$ ) de microesferas de látex negro. Ambas fueron introducidas en un sistema ejemplar de detección fotoacústica de la invención.

30 Se creó una segunda muestra de ensayo en la que se añadió 1 ml ( $2,98 \times 10^8$ ) de microesferas de látex negro de 6,6  $\mu\text{m}$  a 7 ml de una muestra de sangre humana antes de la centrifugación de Ficoll-Hypaque. La capa de células mononucleares de sangre periférica fue aislada según se ha descrito previamente, se le añadieron 20 ml de suero fisiológico al 0,9% y fue introducida en el sistema de detección.

35 Todas las pruebas fueron realizadas con los siguientes parámetros: excitación de 450 nm, amplificación de  $\times 25$ , promediada en 128 tomas de datos, caudal de 9 ml/min, energía de entrada 9,5-10,5 mJ, y un tamaño de punto de  $0,16 \times 0,16 \text{ cm}$  ( $0,0256 \text{ cm}^2$ ), resultando en una exposición radiante de  $0,39 \text{ J/cm}^2$ . Se postula que las células de melanoma en el torrente sanguíneo de un paciente metastásico pueden permanecer en el plasma cuando sean sometidas al gradiente de Ficoll-Hypaque. Por esta razón, se realizó un ensayo separado utilizando plasma sanguíneo aislado para determinar la capacidad dinámica del sistema ejemplar de detección de funcionar usando diferentes medios. Se prepararon dos muestras: una muestra de control que consistía en 3 ml de plasma humano y 10 ml de solución salina al 0,9% y una muestra de ensayo de la misma solución con 0,5 ml ( $1,49 \times 10^8$ ) de microesferas negras agregadas, para imitar la presencia de melanoma en el plasma. Se usaron parámetros experimentales similares a los de antes, salvo que se usó una longitud de onda de excitación de 595 nm para eliminar la absorción por el plasma pigmentado de forma natural de color amarillo. Después del aislamiento de la capa de células mononucleares de sangre periférica, se creó una suspensión de suero fisiológico/células mononucleares a la que se agregaron  $1,49 \times 10^8$  microesferas ( $7,12 \times 10^6$  por ml). La amplificación se estableció en 25, excitación de 450 nm y resultados fotoacústicos para una suspensión celular de agranulocitos de control.

40 La forma de onda de control de salida resultante para la suspensión de células mononucleares confirma que no hay excitación fotoacústica que ocurra al excitar las PBMC. Cabe esperar esto, ya que las células mononucleares son de color blanco y no deberían contener cromóforos activos que puedan producir una señal fotoacústica. La forma de onda

fotoacústica resultante de la adición de microesferas en una suspensión de células mononucleares aisladas confirma claramente una vez más la capacidad de los sistemas y los métodos de investigación investigados para identificar cromóforos entre una solución de PBMC en circulación.

5 Además, la forma de onda resultante de la adición de microesferas en la sangre entera previa a la centrifugación es representativa de las células de melanoma presentes en el propio torrente sanguíneo. Las microesferas se agregaron en una gran concentración, para que, si todas las esferas se aislaban debidamente, se diera lugar a  $7,12 \times 10^6$  microesferas/ml en la solución. Probablemente no fue así, ya que se puede suponer que se perdieron muchas microesferas durante el proceso de separación. La forma de onda resultante muestra que la centrifugación de Ficoll-Hypaque tiene muchísimo éxito en el aislamiento de espectros tisulares que representan células de melanoma, lo que  
10 demuestra que esta hipótesis es correcta.

La extracción de plasma sanguíneo ilustra un segundo método para detectar cromóforos en una solución no salina. Las microesferas se detectaron con precisión a altas concentraciones a 595 nm. Esto muestra la versatilidad de la modificación de la longitud de onda para la detección. La longitud de onda de 595 nm no excita al plasma pigmentado amarillo (como se ve en el control), fundamentalmente porque el plasma absorbe en el espectro azul y rojo. No  
15 obstante, la longitud de onda de 595 nm proporciona excitación fotoacústica para espectros tisulares presentes en una solución debido a la absorción de banda ancha de las microesferas. Esto proporciona un modo para la detección de células aisladas en el plasma sanguíneo, lo que resultará beneficioso.

Estos experimentos confirmaron que la respuesta fotoacústica de los espectros tisulares inoculados en sangre sana puede ser aislada y detectada con precisión mediante los sistemas y los métodos de detección fotoacústica de la invención ilustrados anteriormente. Los resultados experimentales confirman que los métodos y los sistemas de la invención son útiles para extraer e identificar células distribuidas uniformemente entre cientos de millones de células constituyentes de la sangre que no son de interés. También muestra la capacidad de los sistemas y los métodos para expresar la presencia de cromóforos entre una suspensión de células mononucleares que elimina la necesidad de un método de aislamiento celular adicional. Se cree que las células de melanoma maligno vivo residirán en el mismo  
20 gradiente Ficoll-Hypaque que las células espectrales tisulares. Sin embargo, también es posible que las células de melanoma, al ser más grandes que las microesferas y de diferente composición, puedan separarse de manera diferente, posiblemente en la capa de granulocitos.

Los ensayos de detección descritos anteriormente han demostrado que los métodos y los sistemas de la invención pueden detectar con éxito cromóforos en solución del orden de veinte células individuales o menos. La sensibilidad de un sistema ejemplar descrito anteriormente es de solo dos microesferas. Otros sistemas y métodos de la invención pueden ser modificados mediante la selección de la energía del láser, el área del haz, la geometría de la celda de ensayo y parámetros similares para lograr un umbral de detección de solo una célula cancerosa.  
30

Una evaluación experimental adicional de métodos y sistemas de la invención en aplicaciones dirigidas a la detección de células cancerosas diseminadas es someter a ensayo la capacidad de detectar células de melanoma *in vitro*. Para ello, se cultivó una línea celular de melanoma vivo para que se pudiera introducir una gran cantidad de melanina aislada en el sistema para la detección. La siguiente exposición describe la línea celular usada y los métodos de cultivo celular empleados, y describe en detalle los métodos y los sistemas de la invención utilizados para detectar el melanoma vivo.  
35

Resultará útil cierta exposición de antecedentes sobre el melanoma. El melanoma es un tumor maligno compuesto de melanocitos no regulados. Una célula de melanoma es esencialmente un melanocito que contiene una o más mutaciones que inhiben el crecimiento celular normal y la regulación. Un melanocito produce coloración en mamíferos al segregar tres pigmentos únicos: las eumelaninas nitrogenadas insolubles oscuras, formadas por la polimerización oxidativa de las dihidroxiindolquinonas; las fenomelaninas solubles en álcali, derivadas de cisteinil-DOPA, que proporcionan los colores más claros (principalmente marrón y rojo-marrón); y los feocromos anfóteros (colores rojo y rojo-anaranjado). Estos colores se sintetizan enzimáticamente en sitios granulares de 10 nm que recubren las paredes internas de los melanocitos.  
40

Estos pigmentos son denominados melanina y son producidos en diversas formas, tamaños y cantidades, dependiendo de la célula. La cantidad y el tipo de melanina producida determinan el color de la piel, del cabello y de los ojos en los mamíferos. La melanina producida está encapsulada por la célula de melanoma que proporciona un pigmento para cualquier célula productora de melanina. Precisamente los gránulos de melanina encapsulados dentro del melanocito o célula de melanoma, sirven como absorbentes de banda ancha para producir señales fotoacústicas cuando son expuestos a una luz láser incidente.  
45

Las melaninas son una clase extensa de macromoléculas funcionales que muestran conjuntamente un modelo de estructura de banda característico de un sólido amorfo con amplio espectro de absorción de banda en el espectro visible y UV. Se ha demostrado que la eumelanina, el pigmento más extendido, absorbe eficientemente la energía de los fotones UV y visibles y se desactiva con una eficiencia cuántica de menos del 0,05%, lo que se ajusta a su papel como fotoprotector en la piel. El mecanismo por el cual esto ocurre es complicado y no se entiende completamente. Los estudios muestran que las melaninas consisten en pequeñas unidades oligoméricas heterogéneas que poseen diferentes estados redox que dan como resultado un amplio abanico de saltos HOMO-LUMO (diferencia de energía)  
50

entre el orbital molecular ocupado más alto y el orbital molecular no ocupado más bajo). Este modelo de desorden químico permite la absorción monótona de banda ancha como consecuencia de la superposición de un gran número de transiciones gaussianas ampliadas no homogéneamente asociadas con los componentes del conjunto de melanina. A pesar de todo el trabajo realizado para caracterizar la absorción de melanina, se ha planteado la hipótesis de que el espectro de absorción de la melanina humana está dominado por la dispersión, ya que no muestra resonancias de absorción características en el espectro visible o el ultravioleta.

Los melanocitos están presentes en todos los órganos de base epitelial que dan lugar a tumores cancerosos. Por lo tanto, se cree que las células de melanoma están presentes en cualquier cáncer de base epitelial, o carcinomas, y sus células metastásicas resultantes. Desgraciadamente, aproximadamente el 10% de estos carcinomas consisten en células de melanoma amelanóticas que no producen pigmento, lo que hace que el método de detección fotoacústica sea ineficaz. Sin embargo, se cree que podrían usarse los mecanismos de marcado molecular, que incluyen tecnología de tinción y nanopartículas, a título de ejemplo y no de limitación, para identificar células amelanóticas *in vitro* y unirse a ellas, lo que permitiría la excitación fotoacústica de los marcadores unidos. Esto podría acabar permitiendo la detección fotoacústica de cualquier cáncer a base de melanoma.

La línea celular de melanoma utilizada en los experimentos expuestos a continuación fue SK-MEL-1. Estas células se obtuvieron originalmente en 1968 a partir de la linfa del conducto torácico de un caucásico de 29 años con melanoma maligno que avanzaba rápidamente. Se sabe que las células son tumorigénicas en ratones desnudos o hámsters tratados con cortisona, que producen melanomas malignos pigmentados. Características celulares adicionales incluían una propiedad de crecimiento esférico, con células agrupadas de forma poco rígida que presentaban un citoplasma granular.

Las células fueron cultivadas en suspensión en matraces de cuello inclinado de 25 cm<sup>2</sup> con un tapón de estilo fenólico (de Corning Glass Works, Corning, Nueva York) a 37°C en un entorno humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%. En cada matraz se mantuvieron aproximadamente 10 ml de la suspensión celular. Se usó un caldo compuesto por 444,4 ml de RPMI (de Invitrogen Corp., Grand Island, Nueva York), 5 ml de glutamina (también de Invitrogen Corp.), 50 ml de suero fetal bovino (de US Bio-Technologies Inc., Pottstown, Pensilvania) y 0,6 ml de gentamicina (de American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y fue renovado tres veces por semana. Cuando se cambiaba el caldo, se retiraban y desecharon 7 ml de la suspensión celular, dejando 3 ml en el matraz original. Luego, se volvía a añadir al matraz 7 ml de caldo fresco.

Las células eran contadas antes de cada renovación del caldo. Se obtenía una pequeña muestra de células para el recuento. Las células eran mezcladas suavemente con una tinta azul con una disolución de 1:2. Usando un hemocitómetro, se contaron las células en tres cuadrados. Se realizó una citocentrifugación en una tanda seleccionada de células y se formó un bloque celular y se lo tincionó con hematoxilina y eosina. Las células individuales variaban en tamaño, y muchas contenían inclusiones intracelulares oscuras. Los núcleos estaban ubicados centralmente, eran redondos, y contenían uno o más nucleolos prominentes.

Se descubrió que la cantidad de melanina producida variaba según la célula, conteniendo aproximadamente el 5% de las células densos gránulos citoplasmáticos marrones dispersos uniformemente por todo el citoplasma. Por lo tanto, solo 1 de cada 20 células vivas de melanoma producían melanina de forma activa. El estado aneuploide mutado del melanoma transformado es evidente a través de células que contienen múltiples núcleos.

Se llevaron a cabo varios ensayos de control usando métodos y sistemas ejemplares de la invención para demostrar de manera definitiva la detección de células de melanoma en lugar de otros absorbentes o efectos piroeléctricos. Estos experimentos de control se realizaron además de detectar suspensiones de melanoma.

Además de una solución de control salina normal al 1,8% (preparada y sometida a ensayo según la anterior exposición), se preparó una solución de  $7,124 \times 10^6$  microesferas/ml utilizando microesferas de látex CML blanco de 6,6 μm (de Interfacial Dynamics Corp., Eugene, Oregón). Aunque las microesferas negras representan los efectos absorbentes del melanoma, las microesferas blancas pueden ser usadas para representar los efectos dispersantes de las células de melanoma. Por lo tanto, la suspensión de microesferas blancas fue introducida para determinar los efectos de un medio puramente dispersante en el sistema. Las células de melanoma vivo actúan como absorbentes y dispersantes debido a su contenido variable de melanina y a la gran cantidad de área de superficie *blanca*. Es posible que un medio de dispersión (como el melanoma) pueda producir señales fantasma u oscilaciones debido a un efecto pirotécnico, o señales producidas por fotones dispersos que interactúen con la película piezoeléctrica o los electrodos. Estos ensayos de control dan ejemplos de las formas de onda piroeléctricas típicas para eliminar la posibilidad de confundir una señal piroeléctrica con la de una señal de melanoma.

Se realizó un segundo experimento de control utilizando una suspensión 1:1 de caldo de cultivo RPMI (descrito anteriormente) y solución salina al 1,8%. El caldo, usado para cultivar las células de melanoma, contiene rojo de fenol que sirve como un indicador de ácido/base para identificar cuándo las células han agotado los nutrientes del caldo de cultivo. El rojo de fenol (fenolsulfonftaleína) tiene un valor de pK de 7,9. Existen diferentes espectros de absorción de diferentes fuentes y técnicas de detección, como se puede ver al comparar los dos espectros. Es evidente que el rojo de fenol tiene una absorbancia variable a 450 nm que podría producir una señal fotoacústica, pero ninguna absorbancia a 620 nm. Por lo tanto, los ensayos de detección se realizaron a 450 nm y 620 nm tanto para la suspensión

del caldo de cultivo como para la suspensión del melanoma para la comparación. Esto garantizaría que cualquier señal producida a 620 nm sería la de las células de melanoma, no la del caldo de cultivo, ya estuviera presente en las células o absorbido por las células, eliminando así la noción de que el medio de cultivo pueda estar produciendo una señal fotoacústica confundida con melanoma.

5 Antes de suspender el melanoma para su introducción en el sistema de detección, las células fueron contadas y luego centrifugadas 1200 RPM a 4°C durante diez minutos usando una centrifugadora Fisher Scientific accuSpin 3R. El sobrenadante del caldo se eliminó entonces del sedimento celular formado. A continuación, las células se lavaron usando solución salina tamponada con fosfato de Dulbeccos (Invitrogen Corp., Grand Island, Nueva York). Se añadió solución salina al sedimento, las células se mezclaron suavemente, volvieron a suspenderse y se repitió el  
10 procedimiento utilizando los mismos métodos descritos anteriormente. Finalmente, se eliminó el sobrenadante de la solución salina y se añadió una pequeña cantidad de solución salina nueva al sedimento celular.

Se creó una solución de 15ml que consistía en  $2,3 \times 10^6$  células de melanoma vivo y solución salina al 1,8%, resultando en una suspensión de  $1,53 \times 10^5$  células/ml. Esta suspensión fue introducida en el sistema ejemplar de la invención y detectada usando luz láser de impulsos con los siguientes parámetros: excitación de 450 nm y 620 nm,  
15 energía de entrada de 9,5-11,6 mJ, ganancia de 25, y promedio en 128 tomas de datos.

La línea celular elegida para estos ensayos fue una línea celular de melanoma metastásico no agrupada. La muestra original fue tomada del tumor metastásico de un paciente con cáncer de clase IV, lo que insinúa que las células poseen una capacidad inherente de diseminarse e introducirse en el torrente sanguíneo. Por lo tanto, las células cultivadas y sometidas a ensayo deberían ser comparables a las células que estarían presentes en el torrente sanguíneo de un  
20 paciente con cáncer metastásico. Aproximadamente el 5%, o 1 de cada 20, de las células cultivadas produjeron melanina visible. El tamaño de punto irradiado para estos ensayos fue de 0,13 cm  $\times$  0,2 cm (0,026 cm<sup>2</sup>) con una longitud de haz de 1 cm. Si se supone que 1 de cada 20 células produjo melanina viable, entonces se puede deducir que cualquier señal resultante fue producida por 200 células melanóticas de melanoma por trayectoria de haz irradiado. Se usaron 450 nm para excitar las muestras de melanoma debido a las propiedades de absorción óptica  
25 presentadas anteriormente.

Las FIGURAS 7A y 7B muestran los datos resultantes, incluyendo la FIG. 7<sup>a</sup> los resultados para el melanoma vivo y mostrando la FIG. 7B resultados para el cultivo de RPMI. Los datos de ruido en el extremo izquierdo de cada gráfico (cerca del origen) corresponden al ruido de disparo del láser. Según indica la FIG. 7A, es evidente una señal distinta de melanoma a aproximadamente 2,5 ms. No se produce tal pico en los datos de RPMI de la FIG. 7B. Los resultados  
30 de estos experimentos confirman que las señales de melanoma vivo se diferenciaron clara y sistemáticamente. Las señales fueron claramente diferentes de las del caldo de cultivo de RPMI y de las de los ensayos espectrales tisulares de microesferas. Estas formas de onda características muestran claramente la capacidad del sistema de detección para detectar células de melanoma maligno *in vitro*.

Por lo tanto, el melanoma maligno vivo cultivado fue detectado con éxito usando los sistemas y los métodos de la invención. Las señales estuvieron claramente diferenciadas y conservaron un patrón distinto en lo relativo a la  
35 detección de melanoma. Además, cuando se comparan con las pruebas de umbral para los métodos y los sistemas ejemplares expuestos anteriormente en relación con las pruebas con esferas únicamente, la señal del melanoma tuvo una tensión más de 2 veces mayor.

La determinación de las propiedades ópticas para las microesferas de látex negro y las células del melanoma vivo que se expuso anteriormente es útil para comprender cómo se comparan los espectros tisulares de microesferas con las células vivas que intentan representar. Entender cómo interactúa la luz con los dos medios absorbentes objeto de  
40 ensayo permite extraer conclusiones sobre su capacidad para producir señales fotoacústicas. Una vez que se tiene conciencia del potencial de producción de señales a través de la determinación de las propiedades ópticas, se puede explicar con mayor detalle la respuesta fotoacústica de las suspensiones de células de melanoma y de las suspensiones de microesferas de látex negro. A partir de estos datos, se pueden establecer correlaciones entre los ensayos de sensibilidad realizados con espectros tisulares de látex y los resultados de la detección del melanoma vivo real.

Las esferas de integración ofrecen un método para determinar simultáneamente las propiedades ópticas de los materiales empleando el algoritmo de adición-duplicación inversa para medir el flujo de luz conjunto de las esferas de  
50 integración. Esta exposición detalla las propiedades ópticas de interés, proporciona una breve explicación de la teoría de la integración de las mediciones de las esferas, describe la metodología usada y expone las propiedades ópticas de las microesferas de látex y del melanoma maligno.

Hay varias propiedades que se usan para describir las interacciones de la luz con medios turbios. Las tres propiedades consideradas en detalle en esta memoria son la absorción, la dispersión y la anisotropía. Una propiedad óptica importante para el propósito de los sistemas y los métodos de la invención es la absorción. La cantidad de absorción  
55 de un material en una longitud de onda particular está directamente relacionada con la intensidad de la señal fotoacústica que produce.

La absorción se produce cuando un fotón de luz incidente interactúa con una molécula que puede absorber ese fotón en forma de transición de energía molecular. En el espectro visible, estas transiciones consisten en desplazamientos orbitales de electrones en compuestos formados por dienos conjugados. Los compuestos que contienen dienos conjugados constituyen la mayoría de los materiales absorbentes o cromóforos. La absorción de un compuesto se describe por su coeficiente de absorción,  $\mu_a$ , definido como la probabilidad de absorción de luz a una distancia infinitesimal  $ds$ , dada como  $\text{cm}^{-1}$ . El coeficiente de absorción depende de la longitud de onda y está determinado por el tipo de cromóforo y su concentración. Suponiendo un medio puramente absorbente, el coeficiente de absorción se puede calcular utilizando la ley de Beer, dada como:

$$I_t = I_o e^{-\mu_a d}$$

El coeficiente de absorción está exponencialmente relacionado con el porcentaje de luz transmitida y depende del grosor de la muestra. Esto describe el método más simple para determinar la absorción. De forma realista, no existe un medio puramente absorbente, lo que explica la necesidad de métodos más complicados de determinación de propiedades ópticas, como el algoritmo de adición-duplicación inversa.

La dispersión describe la interacción de fotones que no son absorbidos por un medio particular y es causada por cambios en el índice de refracción en un material. La dispersión óptica se describe mediante el coeficiente de dispersión,  $\mu_s$ , y se define como la probabilidad de dispersión de fotones a una distancia infinitesimal  $ds$ , dada por  $\text{cm}^{-1}$ . El coeficiente de dispersión de un material se basa en la densidad volumétrica de los dispersores y depende del tamaño de la partícula. Se puede usar la ley de Beer de la misma manera que en la absorción para calcular el coeficiente de dispersión para un medio puramente dispersante.

La anisotropía describe la cantidad de luz que es dispersada hacia delante por un material. La función de fase, o ángulo de refracción de la luz, se caracteriza por la anisotropía,  $g$ , que es el coseno promedio de la función de fase. La anisotropía varía entre la dispersión isotrópica ( $g=0$ ) y la dispersión frontal completa ( $g=1$ ).

Hay otras propiedades ópticas que pueden ser relevantes para algunos métodos y sistemas de la invención, incluyendo, por ejemplo, el albedo de dispersión, dado por:

$$a = \mu_s / (\mu_a + \mu_s)$$

El albedo representa la porción relativa de dispersión durante un evento de interacción de la luz. El coeficiente de atenuación lumínica total está dado por:

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s$$

La tasa de atenuación efectiva para medios muy dispersos es dada por:

$$\mu_{ef} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1-g))}$$

El camino libre medio (clm) para un fotón que atraviesa un medio absorbente y dispersante está dado por:

$$clm = 1/\mu_t$$

La profundidad óptica para un medio absorbente y dispersante está dada por:

$$\tau = d(\mu_a + \mu_s)$$

Por último, el coeficiente reducido de dispersión describe un medio muy dispersante relacionando la anisotropía con el coeficiente de dispersión como:

$$\mu'_s = \mu_s(1-g)$$

Todas estas propiedades ópticas pueden ser usadas para descifrar la composición de un material a través de la puesta en práctica de los sistemas y los métodos de la invención.

Estas relaciones pueden ser usadas no solo para comprender mejor el funcionamiento y los resultados de los sistemas y los métodos de la invención, sino que también pueden ser usadas para determinar y estimar las cualidades de los analitos detectados. Las etapas de un método de la invención incluyen, por ejemplo, el uso de estas relaciones para determinar la densidad, la masa, el tamaño de un analito, su concentración y similares.

Además, algunos otros métodos y sistemas de la invención pueden incluir etapas y elementos para construir con el tiempo una base de conocimientos que sea útil para determinar tales características para los analitos. A título de

ejemplo, algunos métodos de la invención pueden incluir etapas de calibración, mediante las cuales se someta a ensayo a diferentes dianas espectrales (por ejemplo, microesferas) usando diferentes concentraciones, diferentes absorbancias, diferente aporte de energía y otras variaciones de los parámetros de ensayo. Un sistema de la invención puede incluir una memoria para almacenar datos resultantes e instrucciones de programa para analizar los datos. Los datos resultantes pueden ser usados para desarrollar un modelo predictivo para usarlo cuando se presenten datos de pruebas reales de un analito desconocido para determinar las características de ese analito.

Además, pueden desarrollarse las denominadas formas de onda distintivas para diferentes analitos mediante ensayos. Estas pueden ser útiles para identificar un analito desconocido. Además, algunos sistemas y métodos de la invención pueden ser útiles para detectar e identificar múltiples analitos diferentes en una sola muestra. Los diferentes analitos presentes en la muestra única pueden ser identificados a través de sus diferentes formas de onda.

Los sistemas y los métodos de detección fotoacústica de la invención tienen la capacidad de detectar la presencia de melanina en solución. Los sistemas y los métodos son fáciles de usar y permiten una preparación de muestras relativamente simple, ya que, una vez que se aísla un bloque de células, solo se requiere agregar un fluido vehicular como solución salina para conducir la señal de tensión. Las muestras pueden introducirse rápidamente en un sistema ejemplar a través de un depósito externo y hacerlas circular utilizando una bomba para inducir una presión negativa. Las soluciones de ensayo también se pueden eliminar fácilmente y todo el sistema se puede limpiar en minutos, proporcionando resultados eficientes y una capacidad de procesamiento de alto volumen.

Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar muchas modificaciones a los sistemas y los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, las cámaras de detección pueden ser configuradas para mejorar la sensibilidad del dispositivo. Los sistemas y los métodos de la invención han sido utilizados con espectros en forma de microesferas negras de látex CML de 6,6  $\mu\text{m}$ , que actúan como un absorbente de banda ancha similar al de la melanina. Las señales fotoacústicas derivadas de microesferas de látex negro han sido discriminadas y han presentado un umbral de detección bajo, así como una señal muy intensa y claramente diferenciada.

Los métodos de la invención también incluyen etapas para el aislamiento de células de melanoma de sangre entera. Se ha descubierto que la capa de células mononucleares de sangre periférica puede ser aislada y puesta en el sistema de detección sin crear falsos positivos. Además, la simple adición de espectros tisulares en forma de microesferas de látex en sangre entera ha producido resultados firmes que indican que el protocolo para la preparación de muestras puede aislar con precisión cuerpos extraños, como el melanoma, en el torrente sanguíneo. Los resultados han demostrado tener éxito en la detección de absorbentes de banda ancha en medio de millones de células mononucleares.

Un dispositivo fotoacústico ejemplar de la invención ha detectado con éxito células de melanoma en una suspensión salina estándar. La forma de onda fotoacústica para el melanoma maligno es marcadamente diferente de la de otros absorbentes, incluidas las microesferas de espectros tisulares. La difracción acústica de las células de melanoma da lugar a una forma de onda fotoacústica identificable de forma única que puede ser usada para diferenciar una señal de melanoma de posibles falsos positivos como la sangre. El umbral de detección es de un nivel útil para proporcionar una detección muy temprana de CTC, patógenos y otros analitos de interés. Además, se contemplan modificaciones a algunos de los elementos de los sistemas y los métodos descritos en la presente memoria para aumentar la sensibilidad. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, aumentar la intensidad o el tamaño del haz incidente, disminuir el área de irradiación, mejorando aún más la intensidad de la señal y similares.

Las FIGURAS 8 y 9, por ejemplo, ilustran esquemáticamente una configuración alternativa ejemplar de una celda 250 de flujo. La celda 250 incluye secciones 252 superior e inferior que generalmente tienen forma de embudo. Una sección 254 de angostura estrecha de forma cilíndrica está situada entre las dos secciones de embudo 252 y las conecta. La sección de angostura está hecha de una pared lateral transparente que puede ser de vidrio, a título de ejemplo. Un láser 256 dirige un haz 258 de impulsos a través de la sección 256 de angostura. Según se muestra mejor en la vista desde arriba de la FIG. 9, el haz pulsante 258 se extiende sustancialmente por todo el diámetro de la sección 254 de angostura cilíndrica, por lo que se ilumina la sección transversal completa de la muestra de ensayo que se comunica a través de la sección 254 de angostura. Dicho de otra manera, esta configuración, como la de las FIGURAS 3-5, capta todo el flujo de la muestra de ensayo dentro de la trayectoria del haz.

Hay un sensor acústico 260 dispuesto en un lado de la sección 254 de angostura. El sensor 260 puede ser una película que se desvíe cuando una onda acústica la golpee, o puede ser otro dispositivo. Como se muestra en las FIGURAS 8 y 9, el sensor 260 está dispuesto en la sección 254 de angostura en una ubicación adyacente a la trayectoria del haz 258, pero está situado en un lado en el que el haz no pasa directamente para evitar (o al menos minimizar) la posible interferencia con o desde el haz láser 258.

La celda 250 de flujo puede dimensionarse como se desee y como sea adecuado para una aplicación particular. En una configuración ejemplar, la celda es de escala micrométrica, para que la sección 254 de angostura transporte solo algunas células de melanoma y garantice la excitación de todo el material que atraviese la sección 254. La sección 254 de angostura puede ser, por ejemplo, un tubo capilar que tenga un diámetro de aproximadamente 1 mm o aproximadamente 2 mm. Si se proporcionara en un diámetro adecuadamente pequeño, cabría esperar que solo una

o algunas CTC estuvieran en el pequeño volumen que reside en la sección 254 de angostura. Dirigir el haz de energía 258 a la angostura estrecha 254 excitaría entonces solo una o algunas CTC cada vez.

5 Usar una configuración como la celda 250 de flujo puede ser útil en algunos métodos de la invención para estimar la concentración del analito. Los picos de onda en los datos resultantes se pueden contar para estimar el número de células de analito detectadas en la muestra. Este conocimiento, junto con el volumen de la muestra, llevará a una determinación de la concentración de analito en la muestra.

10 La celda 250 de flujo puede ser colocada en línea con un depósito, una bomba y otros elementos, según se desee. Puede ser usada en una configuración en circulación en la que se hace que una muestra atraviese la sección 254 de angostura varias veces, o puede ser usada en una configuración de una sola pasada, en la que una muestra atraviesa la celda 250 de flujo solo una vez. En una configuración ejemplar, la celda 250 de flujo es usada en una disposición de flujo por gravedad que no depende de una bomba. O bien, se puede usar una jeringa para suministrar una muestra de ensayo en línea con la celda 250 de flujo, impulsando la presión de expulsión de la jeringa la muestra de ensayo a través de la celda 250. Se proporciona un controlador 262 (FIG. 8), que está vinculado tanto al láser 256 como al sensor acústico 260. El controlador puede ser un dispositivo a base de procesadores, tal como un ordenador, e incluye el procesamiento de obtención de datos, el almacenamiento de datos, el control del láser y funcionalidades de control del sensor acústico. También puede incluir una pantalla para mostrar datos.

20 Los sistemas y los métodos de detección de la invención para la detección de analitos como el melanoma metastásico han demostrado tener éxito. Con la capacidad de analizar muestras de sangre en menos de 30 minutos sin la ayuda de un histólogo capacitado, un sistema ejemplar de detección fotoacústica puede ser el método más fiable para detectar el cáncer. Este método y este sistema sin precedentes podrían revolucionar el campo de la oncología, entre otros, al proporcionar un vehículo para la detección temprana de una enfermedad metastásica, además de funcionar como un método para determinar la eficacia de la quimioterapia. Además, si la teoría paralela de la metástasis es cierta, los dispositivos y los sistemas ejemplares serán de gran utilidad como detectores tempranos no solo de la enfermedad metastásica sino también de cualquier forma melanótica de cáncer cerca de su inicio.

25 Sin embargo, los métodos y los sistemas de la invención no están limitados al cáncer o a la detección de patógenos. Los expertos en la técnica apreciarán que los sistemas y los métodos encontrarán utilidad en una amplia variedad de aplicaciones adicionales. Algunas aplicaciones ejemplares adicionales incluyen pruebas para determinar si un fluido corporal incluye una proteína particular o un rastro de una droga ilegal. Otras incluyen la detección de analitos que están presentes en el esperma.

30 Los beneficios y las ventajas de los dispositivos y los sistemas de la invención son evidentes. La exposición en la presente memoria de métodos y sistemas particulares se ha hecho con el propósito de ilustrar algunos de los mejores modos para poner en práctica la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de detección de un analito en una muestra de un fluido corporal que comprende las etapas de:
- 5 - hacer circular dicha muestra a través de una cámara (52) de ensayo, incluyendo dicha cámara (52) de ensayo un sensor acústico (260) configurado para detectar una señal fotoacústica después de que se produzca una expansión termoelástica en dicha cámara (52) de ensayo;
- exponer la muestra de fluido corporal a energía electromagnética, que comprende un haz láser (64) de impulsos, para provocar una expansión termoelástica en el analito, que comprende dirigir un haz de dicha energía electromagnética al interior de dicha cámara de ensayo y que comprende captar todo el flujo de dicha muestra de fluido corporal con dicho haz;
- 10 - detectar una señal fotoacústica en la muestra resultante de dicha expansión termoelástica.
2. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 1 en el que dicha expansión termoelástica es resultado de que dicho analito absorba al menos una porción de dicha luz, y en el que dicha señal fotoacústica comprende una onda acústica resultante de dicha expansión termoelástica.
3. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 1 en el que dicha fuente de energía electromagnética comprende un láser (110) pulsante a una frecuencia más rápida que un microsegundo, comprendiendo dicho fluido corporal uno o más de sangre, bilis, esperma, orina o saliva, y en el que dicho analito comprende uno de una proteína o un patógeno.
- 15
4. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 1 y que, además, comprende la etapa de añadir partículas diana a dicha muestra de fluido corporal que tienen un diámetro inferior a 0,01 milímetros, estando configuradas dichas partículas para responder a dicha energía electromagnética, y estando configuradas dichas partículas para adherirse a dicho analito.
- 20
5. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 4 en el que dichas partículas diana comprenden microesferas que tienen anticuerpos seleccionados para adherirse a dicho analito, estando configuradas dichas microesferas para absorber dicha energía electromagnética.
- 25
6. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 1 en el que la etapa de detección de dicha señal fotoacústica comprende la detección de una desviación en un diafragma (58) que se encuentra en contacto de fluido con dicha muestra de fluido corporal, produciéndose dicha desviación cuando una onda acústica hace contacto con dicho diafragma (58).
7. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 1 en el que la etapa de detección de dicha señal fotoacústica comprende la medición de una perturbación eléctrica que se produce cuando una capa piezoeléctrica es desviada.
- 30
8. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 1 en el que dicha señal fotoacústica comprende una onda de presión que se desplaza por dicha muestra de fluido corporal.
9. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 1 en el que la etapa de detección de dicha señal fotoacústica incluye, además, el uso de la magnitud de dicha señal para estimar uno o más del tamaño, la densidad y la concentración del analito.
- 35
10. El método de detección de un analito definido por la reivindicación 1, realizándose el método *in vitro* y en el que el analito comprende una o más células cancerosas en circulación, que comprende las etapas de:
- separar leucocitos de una cantidad de sangre;
- 40 suspender dichos leucocitos en un líquido vehicular para crear una muestra de ensayo; y
- comunicar dicha muestra de ensayo a través de la cámara (52) de ensayo;
- usar un láser (110) para inducir la expansión termoelástica de dichas una o más células cancerosas en dicha muestra de ensayo comunicada a través de dicha cámara (52) de ensayo; y
- 45 usar el sensor acústico (260) para detectar la señal fotoacústica resultante de dicha expansión termoelástica en dicha cámara (52) de ensayo.
11. El método de detección de una o más células cancerosas en circulación definido por la reivindicación 10 y que, además, incluye las etapas de:
- adherir varias dianas microesféricas a cada una de dichas una o más células cancerosas;

comprendiendo la etapa de uso de dicho láser (110) dirigir un rayo láser pulsante a una frecuencia más rápida que aproximadamente 1 microsegundo al interior de dicha muestra de ensayo a través de una pared lateral transparente (54, 56) de la cámara de ensayo; y,

comprendiendo dicha señal fotoacústica una onda acústica que se desplaza por dicha muestra; e

- 5 incluyendo dicho sensor acústico (260) un diafragma (58) en contacto de fluido con dicha muestra de ensayo en dicha cámara (52) de ensayo, desviándose dicho diafragma (58) cuando dicha onda acústica lo golpea.

**12.** Un sistema (50) de detección de uno o más analitos en un fluido corporal que comprende:

una cámara (52) de ensayo que tiene al menos una pared lateral (54, 56) y que está configurada para contener al menos una porción de una muestra de fluido corporal;

- 10 una fuente de energía electromagnética configurada para dirigir una fuente de energía al interior de dicha cámara (52) de ensayo a través de dicha al menos una pared lateral (54, 56) y para inducir una expansión termoelástica en dichos uno o más analitos, siendo dicha cámara (52) de ensayo transparente y

comprendiendo dicha fuente de energía electromagnética un láser (110) de impulsos que tiene un haz que ilumina toda la sección transversal de dicha muestra de ensayo según atraviesa dicha cámara (52) de ensayo; y

- 15 un sensor configurado para detectar dicha expansión termoelástica en dicha muestra de fluido corporal en dicha cámara (52) de ensayo.

**13.** El sistema (50) definido por la reivindicación 12 en el que dicho sensor comprende un sensor acústico (260) que tiene un diafragma (58) que es desviado cuando una onda acústica generada por dicha expansión termoelástica lo golpea, estando dispuesto dicho sensor acústico (260) sobre dicha cámara (52) de ensayo.

- 20 **14.** El sistema (50) definido por la reivindicación 13 en el que dicho diafragma (58) del sensor acústico comprende un diafragma piezoeléctrico en contacto de fluido con dicha muestra de ensayo, comprendiendo además dicho sensor acústico (260) electrodos primero y segundo (60, 64) dispuestos alrededor de lados opuestos de dicho diafragma piezoeléctrico.

- 25 **15.** El sistema (50) definido por la reivindicación 12 en el que dicha fuente de energía electromagnética comprende un láser (110) pulsante a una frecuencia más rápida que un milisegundo.

**16.** El sistema (50) definido por la reivindicación 11 y que, además, comprende:

un depósito (104), un conducto (68) y una bomba (102), comunicándose dicho depósito (104) con dicha cámara (52) de ensayo a través de dicho conducto (68), estando dispuesta dicha bomba (102) a lo largo de dicho conducto (68) para llevar dicha muestra de dicho depósito (104) a dicha cámara (52) de ensayo; y

- 30 comprendiendo dicha cámara (52) de ensayo al menos unas paredes laterales primera y segunda (54, 56), siendo dicha primera pared lateral (54) más estrecha que dicha segunda pared lateral (56), estando dirigido dicho láser (110) de impulsos a través de dicha primera pared lateral (54) y estando dispuesto dicho sensor en dicha segunda pared lateral (56).

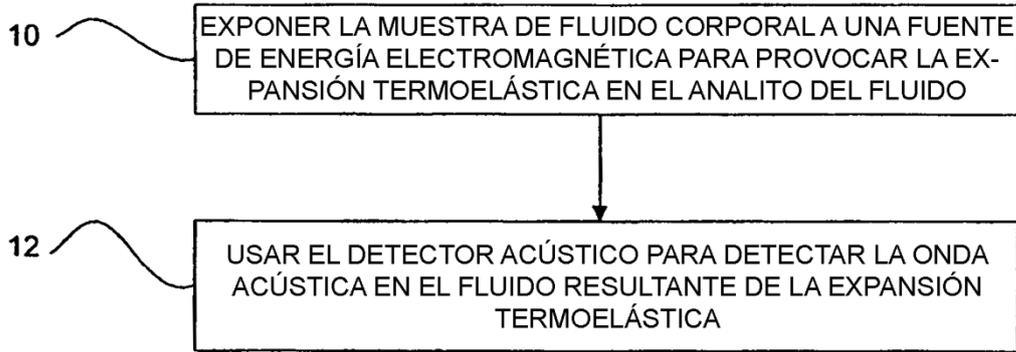


FIG. 1

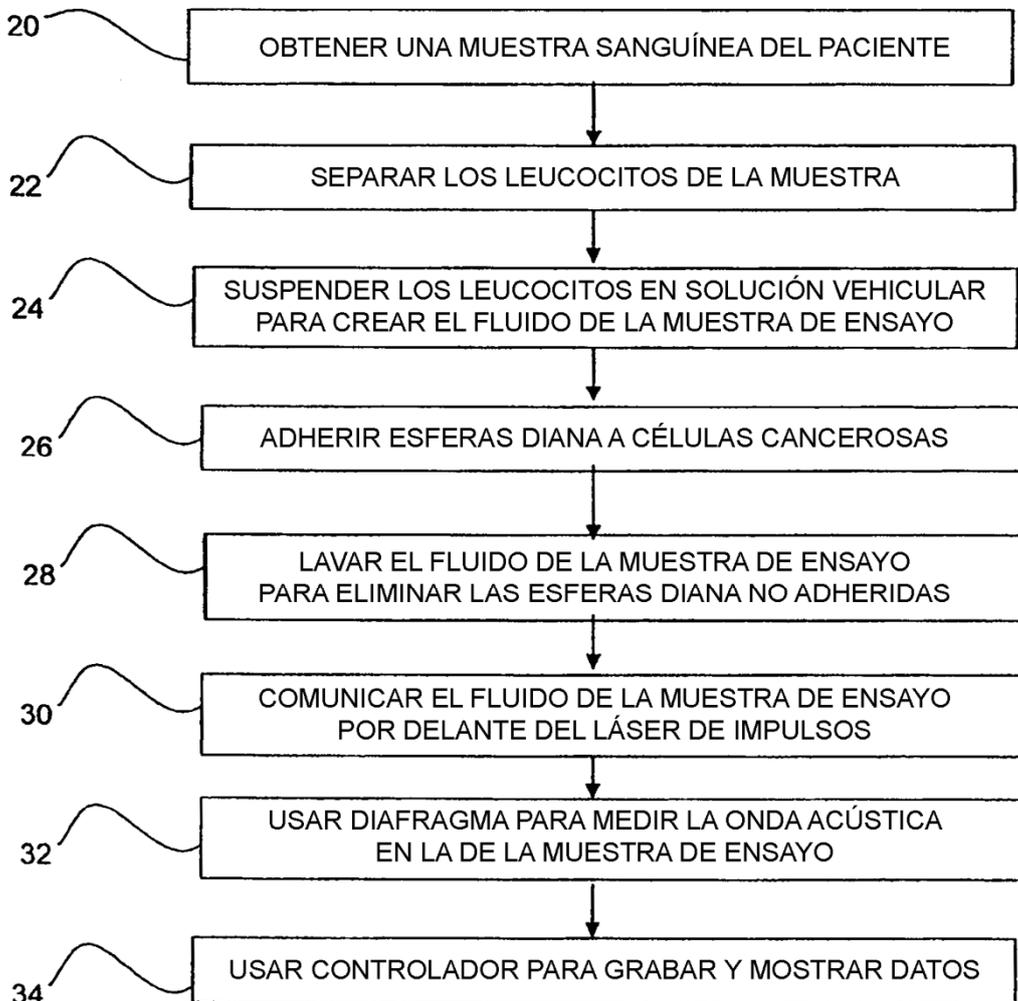


FIG. 2

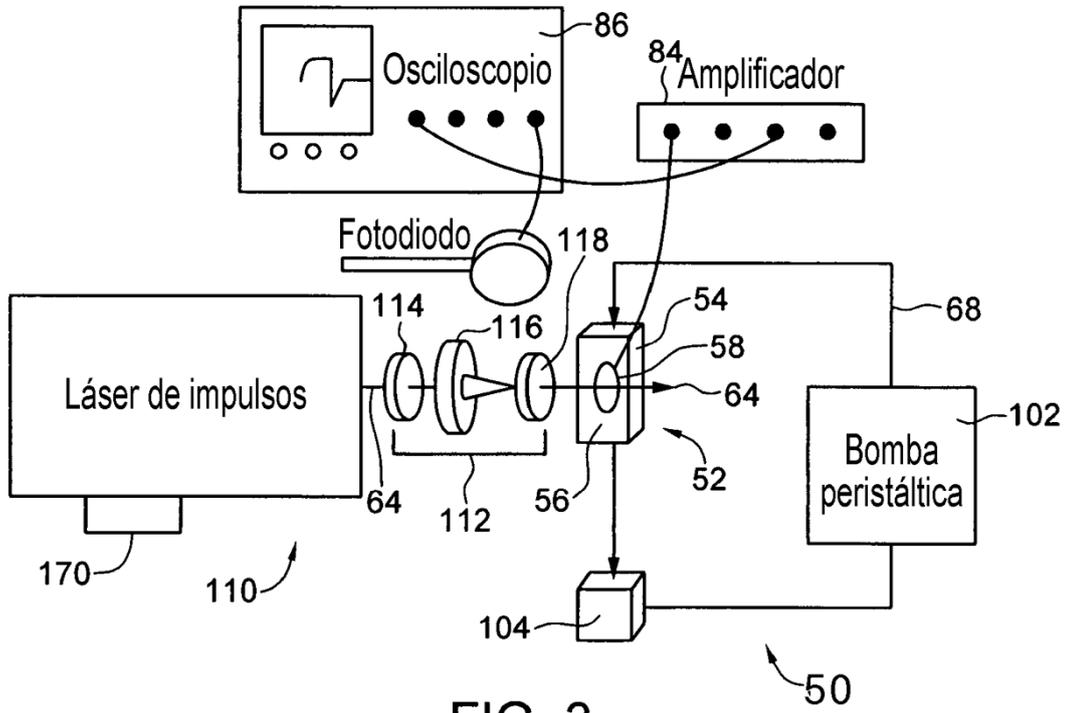


FIG. 3

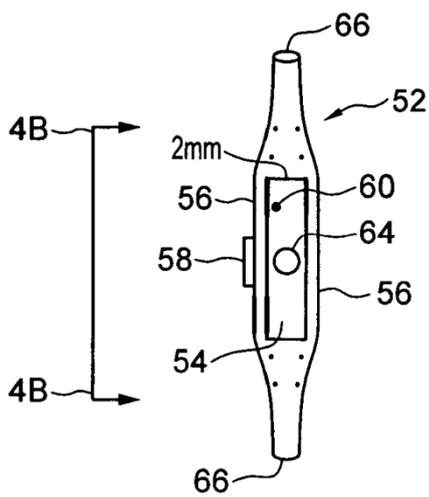


FIG. 4A

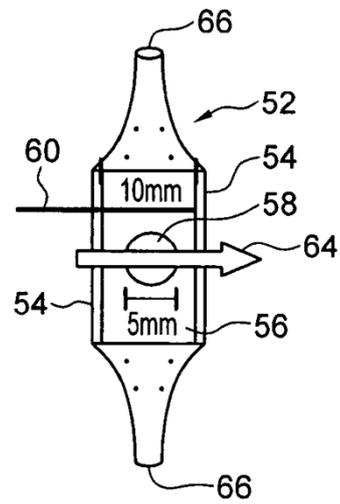


FIG. 4B

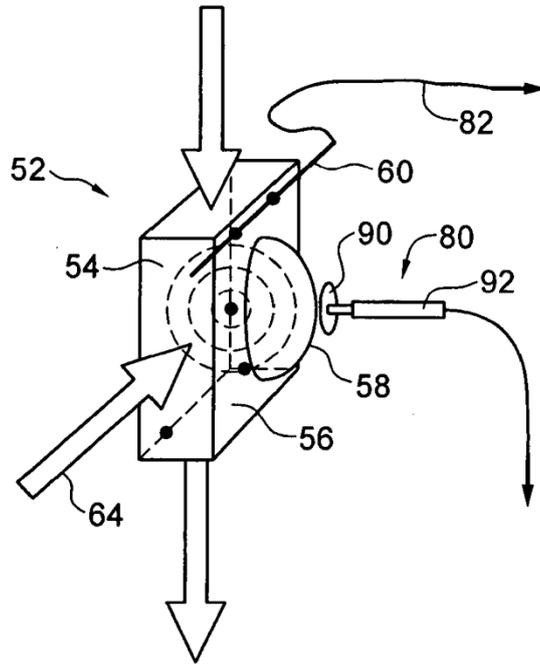


FIG. 5

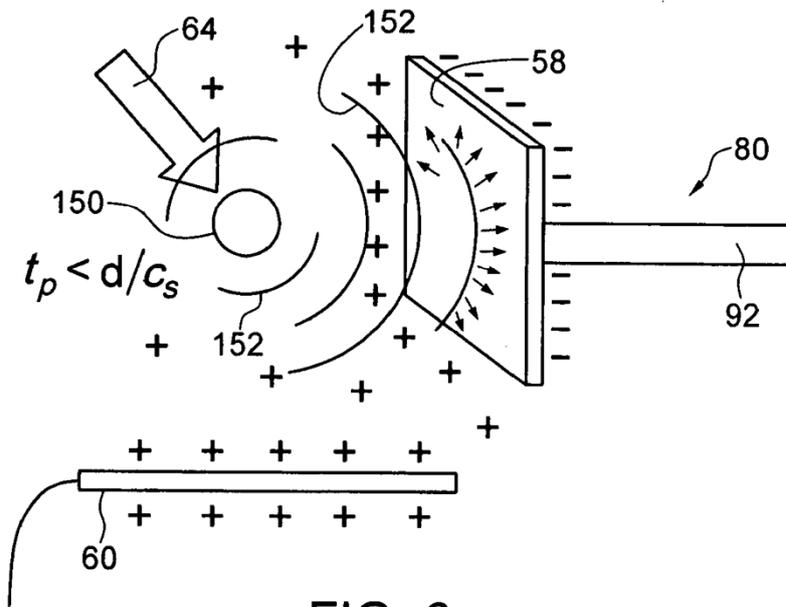


FIG. 6

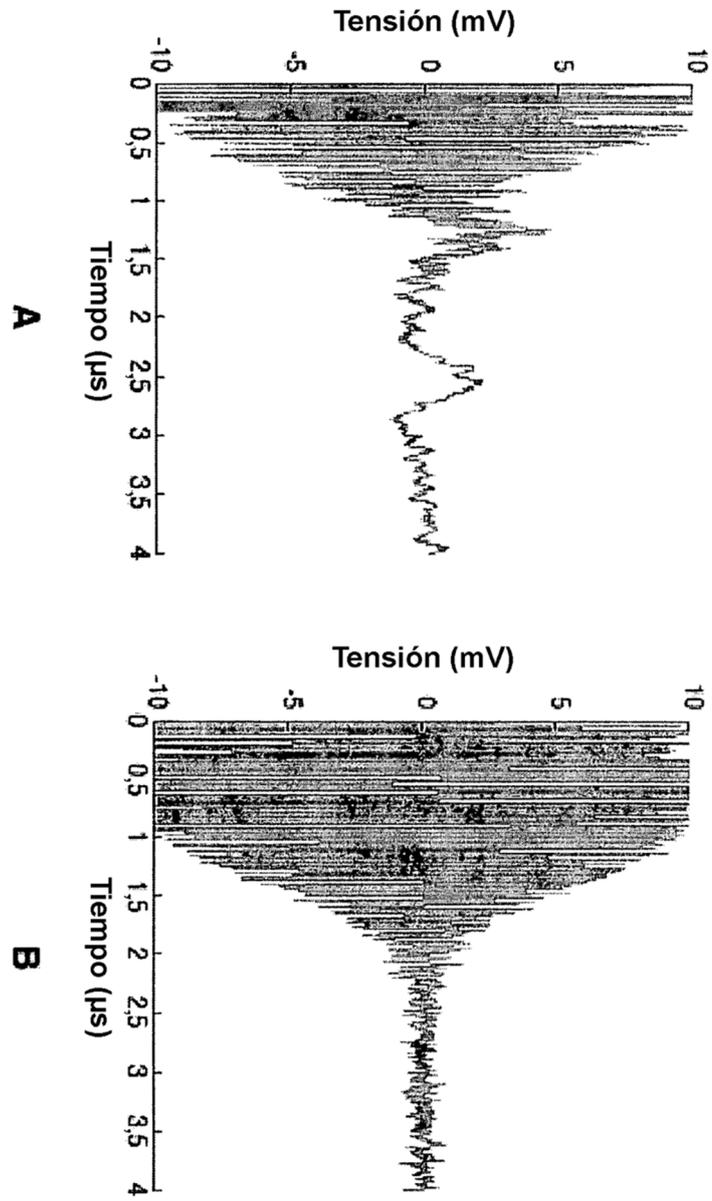


FIG. 7

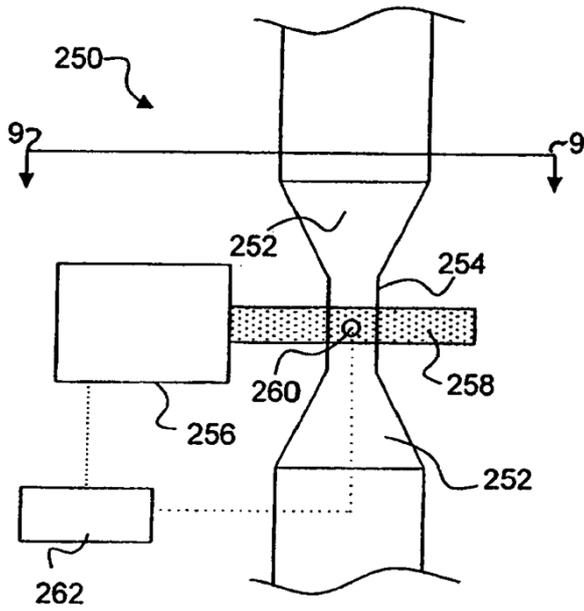


FIG. 8

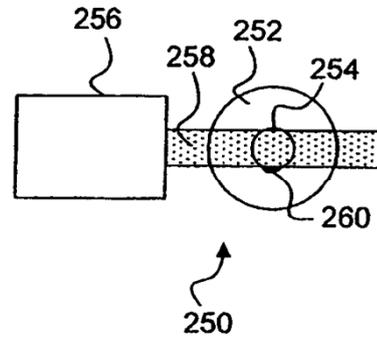


FIG. 9