

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 190**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2011** **PCT/GB2011/001315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012** **WO12032294**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011** **E 11767279 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2613881**

54 Título: **Dispositivo de ensayo y lector**

30 Prioridad:

07.09.2010 GB 201014805

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

03.06.2019

73 Titular/es:

LUMIRADX UK LTD (100.0%)

3 More London Riverside

London SE1 2AQ, GB

72 Inventor/es:

LOWE, PHILLIP;

KEATCH, STEVEN ALEXANDER y

MCGUIGAN, BRIAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 715 190 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 de ensayo y lector

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de realización de ensayos, usando un cartucho.

Antecedentes de la invención

10 El mercado del diagnóstico in vitro (DIV) es muy competitivo y hay una necesidad constante en el mercado del DIV para desarrollar pruebas de DIV rápidas, de bajo volumen, precisas y baratas. Esto se combina con el hecho de que existe un fuerte deseo en el mercado de desarrollar pruebas de sangre con punción capilar en los dedos con una complejidad reducida para el usuario para permitir la penetración total en el mercado (por ejemplo, puntos de
15 atención, cirugía médica, hogar, etc.). Este modelo de prueba de DIV con punción capilar en los dedos ha demostrado ser un gran éxito para las pruebas de diabetes y se ha convertido en un mercado de 3,5 miles de millones de dólares (ref: Medical Device Today). El deseo y la capacidad de evolucionar IDV de inmunoensayo hacia el análisis de sangre con punción capilar en los dedos se ha visto obstaculizado por los desarrollos tecnológicos, sin embargo, esto sigue siendo un objetivo dorado para muchas empresas de diagnóstico, ya que permite una menor
20 complejidad y una mayor colocación de productos en el mercado existente o sin explotar.

El documento US2005/054078 describe un dispositivo de inmunoensayo y un método de su uso. Se describe una etapa de lavado que comprende el uso de un fluido de lavado segmentado por segmentos de aire.

25 Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un sistema de ensayo barato y fiable para llevar a cabo pruebas de DIV.

Se encuentra entre los objetivos de la presente invención proporcionar una plataforma de diseño de cartucho de ensayo y lector que pueda fabricarse fácil y económicamente, así como ser capaz de ser configurado para llevar a
30 cabo un ensayo o ensayos especificados.

Se encuentra entre los objetivos de la presente invención proporcionar un cartucho de ensayo que pueda adaptarse fácilmente para llevar a cabo varios diferentes ensayos especificados.

35 Se encuentra entre los objetivos de la presente invención proporcionar un sistema de ensayo que comprenda un lector que, preferiblemente, se pueda usar o adaptar fácilmente para realizar varios ensayos diferentes.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un método para realizar un ensayo en una muestra, comprendiendo el método:

introducir una muestra de fluido en un cartucho microfluidico; comprendiendo el cartucho: un sustrato que comprende uno o más canales microfluidicos dispuestos en el mismo y que comprende un agente de unión
45 dispuesto dentro de dicho(s) canal(es) para unir cualquier analito dentro de la muestra, comprendiendo el agente de unión propiedades magnéticas;
un puerto de muestra para introducir dicha muestra de fluido en el cartucho;
un sumidero de salida de fluido para eliminar fluido de dicho(s) canal(es); una o más características de tope diseñadas para evitar que la muestra u otros líquidos pasen a través de las características de tope solo por acción capilar y
50 al menos un puerto de entrada de fluido para permitir que uno o más fluidos se introduzcan en el cartucho y se transporten a través del(los) canal(es) microfluidico(s) y/o el aire que se debe ventilar desde el cartucho;
permitir que la muestra de fluido se extraiga a través del cartucho, de modo que la muestra de fluido entre en contacto con dicho agente de unión antes de ser detenida por dicha una o más características de tope, por lo que al menos una porción de cualquier analito presente en la muestra está limitada por el agente de unión que
55 comprende propiedades magnéticas;
mantener el analito unido en posición utilizando el imán o el campo magnético aplicado por un lector;
lavar cualquier material no unido del analito unido utilizando el lector; y
detectar fluorescentemente cualquier analito unido presente en el cartucho; caracterizado por que la etapa de lavado se realiza utilizando solo el aire presente en el cartucho y la detección fluorescente se realiza en el aire.

60 La descripción también enseña un cartucho de ensayo microfluidico para su uso en la detección de un analito en una muestra de fluido, comprendiendo el cartucho:

un sustrato que comprende uno o más canales microfluidicos dispuestos en el mismo y
65 que comprende un agente de unión dispuesto dentro de dicho(s) canal(es) para unir cualquiera de dicho analito dentro de la muestra;

un puerto de muestra para introducir dicha muestra de fluido en el cartucho;
 al menos un puerto de entrada de fluido para permitir que uno o más fluidos se introduzcan en el cartucho desde
 un dispositivo lector asociado y se transporten a través del(los) canal(es) microfluidico(s); y
 un sumidero de salida de fluido para eliminar fluido de dicho(s) canal(es).

5 El cartucho puede comprender además un área de detección donde se puede detectar cualquier analito unido. El área de detección puede estar contenida dentro del canal de muestra, que es directamente adyacente o aguas abajo del puerto de muestra.

10 El diseño del cartucho de la presente invención puede adaptarse fácilmente para llevar a cabo un número de ensayos diferentes y, por lo tanto, puede ser considerado como una plataforma de ensayo para diversos ensayos. El cartucho y el(los) canal(es) dispuesto(s) en el mismo pueden formarse de cualquier manera conocida por los expertos en la materia, que pueden incluir fotolitografía, grabado químico en húmedo, ablación por láser, moldeo por inyección, estampado y técnicas de impresión. Sin embargo, en una enseñanza preferida, el cartucho y los canales y
 15 otras características dispuestas en el mismo están formados por un emparedado de tres sustratos separados - un sustrato superior, medio e inferior.

El cartucho puede estar formado de cualquier material adecuado, tal como policarbonato, poliéster, poliestireno, PMMA, etc., y el/cada sustrato puede estar formado de uno solo o una pluralidad de material(es). En la realización
 20 que comprende tres sustratos, el sustrato intermedio comprende un patrón cortado a través del sustrato, que corresponde a ciertas características del cartucho, como el(los) canal(es), el puerto de depósito/depósitos de fluido, el área del sumidero y similares. Mediante la aplicación y el emparedado (por ejemplo, mediante termosellado, pegado, grapado y similares), cortando adecuadamente los sustratos superior e inferior, para emparedar el sustrato intermedio entre los sustratos superior e inferior, se puede proporcionar un cartucho en el que se disponen canales y
 25 otras características. Las aberturas o características en el sustrato superior y/o inferior pueden diseñarse para ubicarse conjuntamente con las características en un dispositivo lector (como se explicará más adelante), lo que puede facilitar la ubicación correcta del cartucho en el lector y también permitir de manera importante que un fluido, tal como un tampón de lavado, sea introducido desde un depósito/depósitos de fluido en el lector al cartucho o muestra a aplicar o aire a ventilar desde el cartucho. El fluido/tampón de lavado o el gas pueden introducirse en el
 30 cartucho por medios adecuados tales como una bomba/medios de bombeo en el lector y los medios de transporte de fluido pueden controlar el transporte de fluido dentro del propio cartucho. De este modo, una vez que se ha introducido una muestra en el cartucho, por ejemplo, a través de una acción capilar, el transporte de fluido adicional dentro y a través del cartucho se controla/facilita mediante los medios proporcionados en el dispositivo lector. Se apreciará que el fluido introducido en el cartucho a través del puerto de entrada de fluido puede ser un líquido y/o un gas, tal como aire.

Como se identifica, en uso, la muestra se aplica al cartucho a través de un orificio de introducción de muestra, tal como a modo de acción capilar o por otros medios. En una realización preferida, el puerto de introducción de muestras es una abertura en un lado o cara del cartucho. Deseablemente, el cartucho tiene la forma de un
 40 dispositivo plano generalmente delgado que comprende caras superior e inferior y cuatro bordes. En esta disposición, el puerto de introducción de la muestra se puede formar en uno de los bordes del cartucho, de modo que el usuario solo necesita contactar la muestra con la abertura formada en el borde, para permitir la captación de la muestra en el cartucho. En uso, el usuario contacta la muestra de fluido con el puerto/abertura y, en ciertas realizaciones, debido a las dimensiones de dicho(s) canal(es) dentro del cartucho, el fluido se introduce en el
 45 cartucho por acción capilar. Las dimensiones del puerto/abertura de muestra pueden ser más pequeñas que las dimensiones del canal(es). Cuando el líquido se transporta a través del cartucho, el fluido no se expulsa a través del puerto de muestra, ya que no hay superficies que mojar. Sin embargo, debido a que el sumidero ofrece una gran área vacía que se puede humedecer, la ruta fluidica preferencial es hacia el sumidero.

50 Dicho(s) puerto(s) de entrada de fluido del cartucho está/están adaptados para colocalizar con una característica en el lector, de manera que un fluido, tal como un tampón de lavado o de gas, tal como aire, contenido en un depósito/depósitos dentro del lector, se pueden introducir en el cartucho. Normalmente, el puerto de entrada es simplemente una abertura u orificio dentro de la superficie superior del cartucho. El cartucho puede incluir más de un puerto de entrada, por lo que se puede agregar un fluido, o fluidos, en diferentes puntos de tiempo y/o ubicaciones
 55 dentro del cartucho. Debe entenderse que generalmente se forma un sello hermético entre cada uno de dichos puertos de entrada del cartucho y una característica, tal como una válvula o tubería dentro del lector, que puede estar conectada al fluido del depósito.

De manera deseable, dicho(s) canal(es) en el cartucho también comprende(n) una o más características de tope de fluido, que están diseñadas para evitar que la muestra y/u otros fluidos pasen a través de la característica de tope, en virtud de la acción capilar solamente. Es decir, la muestra o cualquier otro fluido puede ser forzado activamente más allá de dicha(s) característica(s) de tope por una fuerza, tal como la aplicada por una bomba/bombas proporcionadas por el lector. Una característica de tope preferida es un material hidrofóbico (por ejemplo, tintas conductoras o no conductoras imprimibles) o un proceso o material que cambia las propiedades de la superficie de
 60 una superficie del canal, creando así un diferencial hidrofílico/hidrofóbico (por ejemplo, mediante ablación con láser, marcado de superficie, eliminación de material de la superficie, materiales metálicos evaporados, etc.), que está

diseñado para topar/ser una característica de pared o que está recubierto en una pared del canal. En la realización donde los canales se forman en virtud de tres sustratos que se emparedan juntos formando así los canales, el material hidrófobo se puede aplicar a los sustratos superior y/o inferior, de manera que cuando los tres sustratos se emparedan juntos, el material de tope hidrófobo forma una característica en la superficie superior y/o inferior de dicho canal.

También se prefiere que una característica de tope se encuentre aguas arriba de la característica de sumidero, con el fin de que la muestra, después de la aplicación inicial, no fluya en la característica de sumidero. Solo cuando se aplica una fuerza, tal como la que se proporciona a través de una bomba, dentro del lector, el fluido puede pasar la característica de tope aguas arriba de la característica del sumidero y, por lo tanto, permitir que el fluido pase al sumidero. El sumidero de salida de fluido está diseñado para ser un área vacía del cartucho en la que se puede evacuar el fluido gastado o el fluido que no se requiere o considera indeseable. Por ejemplo, la sangre completa contiene muchas proteínas y otros agentes que pueden interferir con las reacciones de ensayo y/o la detección del analito capturado, por ejemplo, mediante la detección de fluorescencia. La presente invención permite que la unión inicial de cualquier analito se lleve a cabo dentro de la muestra de sangre completa, pero todo o sustancialmente todo el material no unido puede ser posteriormente evacuado a la característica del sumidero, permitiendo que se realicen más reacciones y/o detecciones en un medio definido o tampón.

Así como el(los) canal(es) microfluídico, el cartucho de la presente invención puede comprender una o más características de electrodo que contactan con el canal y, por lo tanto, con la muestra una vez introducida en el cartucho. Los electrodos están diseñados para hacer contacto con los contactos eléctricos dentro del lector, lo que permite tomar varias lecturas, cuando sea apropiado. Por ejemplo, uno o más electrodos en el cartucho pueden diseñarse para detectar la carga correcta del cartucho y el lector puede indicar al usuario si el cartucho a) ha sido insertado correctamente en el lector y/o la muestra cargada en el cartucho correctamente. El o los electrodos también pueden realizar una o más mediciones eléctricas en la propia muestra. Por ejemplo, cuando la muestra es una muestra de sangre completa, el o los electrodos pueden realizar una medición de hematocrito de la muestra, lo que puede ser importante para determinar la concentración precisa del analito que se detectará. Las mediciones de conductividad y/o impedancia pueden determinarse según la muestra que se esté estudiando. Por lo tanto, los cartuchos de la presente invención pueden no solo detectar si un analito está presente o no en una muestra por medio de la unión de cualquier analito, sino que también pueden realizarse mediciones eléctricas en la muestra.

La muestra que se aplica al cartucho puede ser cualquier muestra de fluido adecuado. Puede ser, por ejemplo, una muestra de fluido obtenido de un sujeto, tal como sangre completa, plasma, saliva, semen, sudor, suero, menstruación, líquido amniótico, lágrimas, frotis de tejido, orina, líquido cefalorraquídeo, mucosa y similares. Debe apreciarse que los sistemas de ensayo de la presente invención pueden aplicarse en el área de la salud humana, incluidos los mercados de IVD grandes y en crecimiento (por ejemplo, cáncer, cardiología y enfermedades infecciosas). Los ensayos también pueden usarse para probar fármacos y la acción de los fármacos. Sin embargo, el sistema también puede aplicarse en entornos donde es deseable detectar, por ejemplo, agentes tóxicos o agentes infecciosos, tal como bacterias o virus. Por lo tanto, se pueden tomar muestras de ríos o lagos o hisopos de superficies sólidas para obtener una muestra de fluido para proporcionar al cartucho. Los sistemas de ensayo también pueden utilizarse para aplicaciones veterinarias. Esencialmente, cualquier ensayo en el que se pueda proporcionar una muestra en forma fluida puede utilizarse en la presente invención.

La muestra puede, por ejemplo, incluir materiales obtenidos directamente de una fuente, tal como una muestra de sangre completa, así como materiales pretratados usando técnicas, tales como filtración, precipitación, dilución, destilación, mezcla, concentración, inactivación de agentes interferentes, etc. Estas etapas pueden llevarse a cabo antes de que la muestra se introduzca en el cartucho o el propio cartucho puede realizarlo.

La muestra puede ser introducida antes de que el cartucho se inserte en el lector o después de que el cartucho haya sido insertado en el lector. El cartucho puede diseñarse de modo que la muestra se introduzca por medio de una acción capilar, o en virtud de que se forme un sello entre un puerto de entrada del cartucho y el lector, la muestra puede introducirse activamente en el cartucho por medio de aire que se extrae a través del(los) canal(es) microfluídico(s) mediante una bomba/bombas en el lector, tal como una bomba/bombas.

El analito a detectar puede ser cualquier analito deseado y pueden incluir proteínas, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, microorganismos (tales como bacterias y virus), agentes químicos, toxinas, fármacos, metabolitos, restos celulares y similares. Por ejemplo, el presente sistema puede adaptarse para detectar cualquier tipo de analito que pueda unirse a un agente de unión adecuado. El agente de unión puede ser cualquier agente adecuado que sea capaz de unirse específicamente al analito a detectar. Por ejemplo, si el analito es una proteína o péptido, el agente de unión puede ser un receptor o anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a la proteína/péptido. A la inversa, un anticuerpo puede estar unido por una proteína/péptido al cual el anticuerpo está diseñado para unirse específicamente. Los ácidos nucleicos pueden estar unidos por otros ácidos nucleicos que son capaces de hibridar específicamente con el ácido nucleico del analito. Los microorganismos pueden estar unidos por anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas en la superficie del microorganismo. Agentes químicos, toxinas, productos farmacéuticos, metabolitos pueden estar unidos por restos químicos que son capaces o que reaccionan o se unen a los analitos químicos mencionados anteriormente a través de reacciones de unión apropiadas, o afinidades. Los

expertos en la técnica conocen bien muchos tipos de técnicas de unión.

Por otra parte, el agente de unión puede ser una enzima o un sustrato enzimático. Por ejemplo, se pueden eliminar analitos como la glucosa a través de metodologías enzimáticas bien descritas, por ejemplo, el producto de reacción formado después de que la enzima que reacciona con la glucosa puede detectarse mediante el uso de técnicas de detección electroquímica u óptica conocidas por el experto en la técnica. Dichas mediciones se pueden realizar como mediciones independientes o en combinación con otros analitos que se detectarán en la muestra.

El agente de unión puede por sí mismo unirse directamente a una pared o superficie de dicho canal dentro del cartucho, por unión adecuada a la pared o superficie, por ejemplo, a modo de adsorción física, acoplamiento químico covalente, enlace químico no covalente (por ejemplo, biotina-avidina) o una combinación de cualquiera de los anteriores. En una realización preferida, el agente de unión es en forma de una partícula magnética o paramagnética, que comprende un resto de unión y el resto de unión está unido por un enlace químico no covalente (por ejemplo, biotina-avidina) a la superficie de la partícula. Realizaciones adicionales también podrían incluir la adsorción física, el acoplamiento químico covalente, el enlace químico no covalente (por ejemplo, biotina-avidina) o cualquier combinación de estos a la superficie de un agente magnético, tal como una partícula magnética. Los agentes/partículas magnéticas que están funcionalizados para comprender el agente de unión unido a los mismos, pueden simplemente depositarse dentro de un canal del cartucho, de modo que al aplicar la muestra al cartucho y ser atraídos hacia el(los) canal(es), los agentes/partículas magnéticas funcionalizadas son resuspendidas por la muestra de fluido y, por lo tanto, entran en contacto con cualquier analito en la muestra. El área de deposición se puede definir específicamente utilizando características de tope hidrófobas, a través de las técnicas descritas anteriormente para separar esta área del área de detección con el fin de garantizar que no se obtengan altas lecturas de fondo debido a componentes de reactivo (por ejemplo, látex fluorescente) que se están secando en el área de medición/detección.

Como se ha mencionado anteriormente, así como los agentes de unión, el cartucho puede comprender uno o más reactivos depositados dentro de dicho(s) canal(es) microfluídico(s), cuyos reactivos pueden facilitar la detección del analito capturado. Por ejemplo, dicho uno o más reactivos pueden incluir un marcador que se ha adaptado para unirse específicamente al analito capturado, facilitando así su detección.

El analito unido puede detectarse directamente siempre que el analito unido sea capaz de generar una señal detectable, o en la unión del analito puede colocarse una reacción, para generar un producto de reacción y el producto de reacción puede detectarse. Sin embargo, en una realización preferida, el analito unido se pone en contacto con un marcador que puede unirse al analito unido y posteriormente se detecta un complejo marcador/agente de unión/analito. El marcador puede unirse a un resto de unión adicional que también es capaz de unirse específicamente al complejo de agente de unión/analito. Normalmente, el marcador puede unirse a una porción diferente del analito a la que se une el primer agente de unión, o es capaz de unirse a una región del complejo de agente de unión/analito que se forma solo en la generación de tal complejo.

El analito unido se puede transportar al marcador dentro de una región del cartucho por medio de los medios de transporte en el lector haciendo que el analito unido se mueva. Alternativamente, un agente o marcador de detección se pone en contacto con el analito unido en virtud de una cantidad de fluido que se introduce en el cartucho desde un depósito/depositos de fluido en el lector.

Es deseable que el agente de unión y cualquier agente/marcador de detección estén en un estado seco cuando se deposita en el(los) canal(es) del cartucho.

En una realización, el agente/marcador de detección que está diseñado para facilitar la detección del analito está inicialmente situado aguas arriba (en términos de la dirección de la muestra que fluye en el cartucho después de la introducción) desde dicha característica de tope. De esta manera, dicho agente de detección no entra inicialmente en contacto con la muestra en la aplicación inicial de la muestra al cartucho. Solo cuando se suministra un fluido tal como un tampón al cartucho a través del puerto de entrada de fluido, el agente de detección se construye con el analito unido. Cuando se introduce un fluido en el cartucho desde el lector, el agente de detección puede ser transportado por el fluido en contacto con el analito unido resuspendido y transportado por el fluido, pasando por la característica de tope y en contacto con el analito capturado.

En otra realización, después de la fase de unión inicial entre la muestra y el agente de unión y de lavado opcional, el complejo de partícula-analito magnético dentro de un medio de tampón podría transferirse a una región aguas arriba del canal, donde se encuentra el marcador, en forma seca dentro del canal. El complejo magnético partícula-analito dentro del medio de tampón resuspendería/rehidrataría el marcador y permitiría la unión del marcador al analito. Este evento de transferencia es posible debido a la capacidad del lector para eliminar con eficacia y precisión el aire del canal (que es un sistema sellado). Este método puede permitir un mayor control de la rehidratación de los reactivos depositados y la homogeneidad de la dispersión de reactivos.

En otra realización, el agente de unión y el marcador se depositan en el canal de muestra. La muestra rehidrata estos reactivos permitiendo que se produzca la reacción de unión. En esta realización, todos los reactivos pueden

entrar en contacto con la muestra, el lector luego acumula los complejos de partículas de analito-marcador magnéticos en una región dentro del canal de muestra a través de la aplicación de un imán/electroimán. El lector luego expulsa el marcador/muestra sin unir al sumidero usando un lavado con aire. El lector puede utilizar un depósito/depósitos de fluido/aire desechable o también un depósito/depósitos de fluido reutilizable. El complejo magnético de partícula-analito-marcador se cuantifica entonces en un entorno de aire.

Cada cartucho puede estar diseñado para realizar la detección del analito individual o la detección de analitos múltiples. Además, cada cartucho comprende más de un sistema de canales microfluídicos, de modo que se puede realizar más de un ensayo utilizando un solo cartucho.

Es deseable que los cartuchos puedan ser producidos fácilmente en masa. El cartucho puede proporcionarse en una tira, donde inicialmente se conectan varios cartuchos, por ejemplo, inicialmente juntos, por ejemplo, a través de un sello perforado. De esta manera, el usuario puede retirar fácilmente un cartucho de la tira, antes de usarlo.

Una vez que el cartucho se ha cargado con una muestra, cualquier analito capturado se puede detectar por medio de un lector adecuado. La presente invención proporciona un lector de este tipo y un aspecto opcional importante de la presente invención es la provisión separada de un depósito/depósitos de fluido/tampón dentro del lector. Una ventaja de esto es que los propios cartuchos pueden estar inicialmente "secos", es decir, que contienen poco o ningún líquido dentro del cartucho antes de la aplicación de la muestra. Esto no solo simplifica la fabricación de los propios cartuchos, sino que también mejora la vida útil y permite que muchos de los cartuchos de la presente invención se almacenen a temperatura ambiente, con poca degradación de los componentes químicos o biológicos dentro del cartucho antes de su uso.

En una enseñanza adicional, se enseña un método de realizar un ensayo en una muestra, comprendiendo el método:

introducir una muestra en un cartucho microfluídico de la presente invención de manera que cualquier analito presente en la muestra pueda unirse a un agente de unión;
lavar cualquier material no unido del analito unido utilizando un fluido o gas adecuado introducido en el cartucho a través del puerto de entrada; y
detectar cualquier analito unido marcado presente en el cartucho.

En una enseñanza adicional, se enseña un sistema de ensayo para realizar un ensayo en una muestra de fluido, comprendiendo el sistema de ensayo:

a) un cartucho microfluídico de acuerdo con el primer aspecto (o realizaciones preferidas del mismo); y
b) un dispositivo lector, comprendiendo el dispositivo lector:

i) un puerto de recepción para introducir el cartucho en el lector;
ii) un depósito/depósitos internos para almacenar un fluido o un gas;
iii) medios para suministrar el fluido o el gas al puerto o puertos de entrada del cartucho una vez insertado dentro del lector, de modo que el fluido o el gas puedan ser transportados a través del canal(es) microfluídico(s) del cartucho; y
iv) medios de detección para permitir la detección de cualquier analito unido o un producto de reacción formado como resultado de la unión del analito al agente de unión dentro del cartucho.

El lector incluye un puerto de recepción en el que el cartucho se va a insertar. El lector puede adaptarse para garantizar la correcta inserción del cartucho y esto podría tomar varias formas. Por ejemplo, el cartucho puede ubicarse inicialmente en un mecanismo portador que ingresa al lector, como puede encontrarse en ordenadores para cargar CD y similares. Alternativamente, el puerto de recepción puede dimensionarse para permitir que se reciba el cartucho y se puede encontrar un elemento de tope interno dentro del lector en el que el cartucho se apoya una vez que se inserta correctamente. Además, o alternativamente, las características que se encuentran o cortan en la superficie del cartucho pueden diseñarse para ubicarse conjuntamente con las características que se encuentran dentro del lector y solo una vez que el cartucho esté ubicado correctamente en el lector, se podrá leer el cartucho.

El depósito/depósitos de fluido están dimensionados preferiblemente de tal manera que más de un cartucho de muestra puede ser analizado y leído antes de que el fluido en el depósito/depósitos necesite ser reemplazado. Es deseable que se puedan realizar muchos ensayos antes de que sea necesario reemplazar el fluido en el depósito/depósitos. Alternativamente, en el caso de que el depósito/depósitos internos estén llenos de aire, el depósito/depósitos no requerirán ser reemplazados, ya que cuando el depósito/depósitos fueron expulsados completamente, podrían retraerse a su posición inicial, extrayendo aire de la atmósfera. En el caso de un depósito/depósitos de fluido, el fluido se puede introducir en el depósito/depósitos manualmente desde otra fuente. Preferiblemente, el depósito/depósitos toman la forma de un cartucho reemplazable, que puede introducirse en el lector cuando sea necesario. Por ejemplo, un usuario puede tener, o estar provisto de, un lector que puede configurarse para realizar varios diferentes tipos de ensayos, pero al usuario se le proporciona un kit que comprende

cartuchos de ensayo y un depósito de líquido/cartucho de depósitos que son adecuados para un analito particular o analitos a detectar. De esta manera, antes de su uso, el usuario inserta el cartucho de depósito/depósitos de fluido en el lector. El propio cartucho de depósito/depósitos puede tener una característica de identificador único, tal como un dispositivo de código de barras o chip, que el lector reconoce que está asociado con un ensayo particular que es apropiado para los cartuchos de muestra y el cartucho de depósito/depósitos, o el usuario puede configurar el lector para realizar un ensayo particular que está asociado con el cartucho de muestra particular y opcionalmente el cartucho de depósito/depósitos. Para algunos ensayos, aunque pueden requerirse cartuchos de muestra fabricados de manera diferente, se puede usar un solo cartucho de depósito/depósitos de fluido para realizar varios ensayos diferentes. Es deseable que un solo cartucho de depósito/depósitos de fluido pueda contener suficiente fluido para poder realizar muchos ensayos, como más de 25 o 50 ensayos, antes de que sea necesario reemplazar el cartucho de depósito/depósitos. El fluido puede ser un agente de lavado tal como agua, que puede incluir un tampón, tal como PBS, HEPES y similares. Otros fluidos también pueden ser adecuados.

De acuerdo con la invención, el agente de unión puede estar unido a la superficie de agentes magnéticos, tales como cuentas magnéticas; se entiende que el lector comprenderá un imán permanente o un electroimán que está diseñado para aplicar un campo magnético o se acercará al mismo o se aplicará un campo magnético, para concentrar y mantener las partículas magnéticas en un área particular de dicho canal microfluidico del cartucho. Esta área puede ser el área de detección. La concentración de las partículas magnéticas en un área particular puede servir para facilitar la detección de cualquier analito capturado y/o aumentar la sensibilidad de detección. Además, al mantener las partículas a través del campo magnético, también permite que el fluido no deseado que rodea el analito unido sea lavado, dejando así al analito capturado libre de agentes/contaminantes potencialmente interferentes que pueden estar presentes en la muestra inicial. El campo permanente o electromagnético puede reducirse o aumentarse, por ejemplo, al mover un imán permanente más cerca o más alejado del cartucho, o al aumentar o disminuir la intensidad del campo aplicado. Esto puede servir para permitir que las partículas magnéticas se "relajen" o se vuelvan menos concentradas en una ubicación particular, mientras que el campo magnético todavía las mantiene o no en cierta medida. Esto puede facilitar que se realicen reacciones adicionales sobre las partículas, que pueden realizarse de manera más eficiente en comparación con si las partículas magnéticas estuvieran concentradas. También puede ser preferible en ciertas aplicaciones que la detección se realice cuando las partículas están menos "concentradas" o relajadas.

En uso, el imán puede usarse para contener cualquier agente unido una vez que el campo magnético se ha aplicado a la muestra. El fluido procedente del puerto de entrada de fluido puede introducirse en el cartucho y el fluido puede facilitar el lavado por el aire presente en el cartucho, alejar cualquier componente no unido de la muestra y/o permitir que otros reactivos, tal como un agente de detección, puedan introducirse en contacto con el analito capturado.

El lector de la presente invención comprende además medios de detección para detectar cualquier analito capturado dentro del cartucho de muestra. Los medios de detección pueden ser cualquier medio adecuado dependiendo del ensayo particular. Por ejemplo, los medios de detección pueden ser un fluorímetro, que puede usarse para detectar una señal fluorescente, una vez que se haya excitado apropiadamente, del analito o producto de reacción unido, marcado o no marcado. El analito/producto de reacción unido puede emitir fluorescencia natural una vez que se haya utilizado la luz de una longitud de onda apropiada para excitar el analito/producto, o se puede usar un marcador adicional para unir por separado el analito unido y el marcador detectado por medios fluorescentes. Los marcadores detectables se pueden usar solos, o junto con una micropartícula o cuenta, tal como un óxido de metal, polisacárido o partícula de látex. Muchos tipos de látex y otras partículas son conocidos en la técnica.

El lector comprende medios adecuados para el transporte de fluido desde el depósito/depósitos de fluido, cuando está presente, en y en todo el cartucho. El lector también puede estar configurado para permitir que el aire, tal como el aire filtrado, se transporte a dicho(s) canal(es) microfluidico(s) del cartucho. El lector comprende tubos, válvulas y/o sellos apropiados, según sea necesario, para permitir que el fluido en el depósito/depósitos y/o el aire se introduzca en el cartucho. Los medios pueden ser una bomba/bombas y la bomba puede bombear fluido/gas en una dirección, o puede ser capaz de bombear fluido/gas hacia adelante y hacia atrás. Una bomba preferida es un actuador lineal de motor paso a paso, una bomba piezoeléctrica, una bomba de ósmosis, una bomba peristáltica o una bomba de pistón. El suministro de fluido/gas al cartucho de muestra puede ser controlado por un conjunto de control microfluidico, que puede controlar el suministro de uno o más fluidos/gases al cartucho de muestra, a una o más aberturas de entrada en el cartucho y en los momentos adecuados.

El lector puede incluir otras características, tales como un dispositivo de calentamiento para permitir que los ensayos se lleven a cabo a una temperatura particular, así como circuitos eléctricos apropiados y software para permitir que el lector sea programado para llevar a cabo uno o más ensayos diferentes.

El sistema de plataforma de la presente invención, que comprende el cartucho y el lector proporciona una serie de ventajas:

1. Volumen reducido de la muestra: la introducción capilar de un fluido, tal como una muestra de sangre mediante punción en el dedo, reduce la complejidad para el usuario y permite realizar las pruebas en cualquier entorno (por ejemplo, ambulancia, punto de atención, consulta médica, campo de batalla, etc.), y similar a las

pruebas de glucosa, lo que permite colocar los productos en cualquier lugar.

2. Rendimiento, sensibilidad y precisión: La capacidad de realizar ensayos de etapas múltiples aumentará la sensibilidad, la precisión y la reproducibilidad de los ensayos, un requisito importante de cualquier prueba de IVD. Esto será cada vez más importante a medida que la FDA continúe con su reducción del error total permitido para el lanzamiento de productos de nuevas pruebas de DIV (la entrada en los mercados de productos nuevos y existentes se volverá más difícil).

3. Estabilidad a temperatura ambiente: Muchas pruebas de IVD existentes requieren almacenamiento y envío refrigerados, este requisito agrega un coste significativo al producto y también restringe el uso y la distribución del producto. La naturaleza inicial "seca" de los cartuchos de muestra ayuda a su estabilidad y vida útil.

4. Los bajos costes de materiales y un proceso de fabricación simple permiten bajos costes de bienes (COG), lo que permite que se generen ganancias sustanciales y más elevadas por las ventas de tiras de IVD. Esto es especialmente necesario en el mercado de inmunoanálisis y IVD molecular, donde las pruebas convencionales tienden a ser de alta complejidad, lo que hace que los costes del material de la tira y el coste general del ensayo sean más altos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá además ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras, que muestran:

La figura 1 muestra una representación esquemática de un cartucho de muestra de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención;

La figura 2 es una representación esquemática de cómo se puede formar un cartucho de las enseñanzas de la presente invención;

La figura 3 es una fotografía de una porción de un cartucho de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención que muestra varias características;

Las figuras 4 y 5 muestran que la sangre ingresa y llena la porción del cartucho que se muestra en la figura 3;

Las figuras 6, 7 y 8 son fotografías de una porción detallada de un cartucho de la presente invención que muestra partículas magnéticas que son capturadas por un imán y que se retienen después de lavar una muestra de sangre;

La figura 9 es una fotografía de una porción detallada de un cartucho de la presente invención que muestra partículas magnéticas que se mantienen de manera más difusa después de la retirada parcial de un imán;

Las figuras 10 y 11 son representaciones esquemáticas de realizaciones adicionales de un cartucho de muestra de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención;

La figura 12 es una representación esquemática de un dispositivo lector de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención;

La figura 13 es un esquema de los mecanismos internos asociados con un dispositivo lector de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención;

La figura 14 es una representación esquemática de un sistema de gestión de fluidos encontrado dentro de un dispositivo lector de las enseñanzas de la presente invención;

La figura 15 muestra una representación esquemática de un sistema de depósito/depositos de fluido y cómo se puede usar dentro de un lector de las enseñanzas de la presente invención;

La figura 16 muestra los resultados experimentales graficados de un ensayo húmedo total lavado con PSA con los cartuchos de ensayo medidos en el medidor MST Pro V1 de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención;

La figura 17 muestra resultados experimentales graficados que muestran la correlación entre los ensayos húmedos lavados con PSA total medidos en tiras en el medidor MST Pro y el instrumento de referencia Víctor V;

La figura 18 muestra resultados experimentales graficados que muestran la correlación entre los ensayos húmedos lavados con PSA total medidos en tiras en el medidor MST Pro y el instrumento de referencia Víctor V;

La figura 19 muestra los resultados experimentales graficados que muestran el ensayo de PSA total en húmedo realizado en el medidor y la tira MST Pro, utilizando el medidor una etapa de lavado con aire para expulsar el marcador sin unir del canal;

La figura 20 muestra los resultados experimentales graficados que muestran el ensayo de PSA total en húmedo realizado en el medidor y la tira MST Pro, no usando una etapa de lavado y midiendo la intensidad de fluorescencia del fluoróforo después de que el complejo de partículas magnéticas-PSA-látex fluorescente se acumula mediante el imán;

La figura 21 muestra los resultados experimentales graficados que muestran el ensayo total húmedo lavado con PSA realizado con el medidor MST Pro V1 y la tira. Para los datos, el medidor MST Pro V1 utiliza un lavado de fluido para expulsar la muestra (que contiene el marcador sin unir) de los canales de la tira al sumidero;

La figura 22 muestra los resultados experimentales graficados de un ensayo seco total de PSA realizado con reactivos secados en tira MST Pro V1 y el ensayo realizado en el medidor MST Pro V1 de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención;

La figura 23 muestra los resultados experimentales graficados de un ensayo de 2 etapas de PSA total medio secado realizado con reactivos secados en la tira MST Pro V1 y el ensayo realizado en el medidor MST Pro V1. En este caso, el látex fluorescente se depositó en el cartucho de prueba en formato seco.

La figura 24 muestra los resultados experimentales graficados de un ensayo de 2 etapas de PSA total medio secado realizado con reactivos secados en la tira MST Pro V1 y el ensayo realizado en el medidor MST Pro V1.

En este caso, las partículas magnéticas se depositaron en el cartucho de prueba en formato seco;

La figura 25 muestra los resultados experimentales graficados de una exploración a través de un canal de muestra de prueba en la tira MST Pro V1 utilizando el instrumento medidor MST Pro V1; y

La figura 26 muestra una representación esquemática de realizaciones adicionales de un cartucho de muestra (tira MST Pro V1, como se usa en la sección experimental) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

Un cartucho de muestra (10) de acuerdo con una realización de las enseñanzas de la presente invención se muestra en la figura 1. Se aplica un fluido, tal como sangre, al puerto de introducción de la muestra (12) (a través de, por ejemplo, un dedo o sangre venosa). En esta realización particular, dos canales (14,16) se extienden desde este puerto de introducción de la muestra (12), los canales (14,16) están separados y no están unidos, aunque para el usuario que está aplicando la sangre, el canal puede aparecer como uno. Aunque no debe interpretarse como limitativa, la descripción adicional se referirá a la muestra que es una muestra de sangre completa.

La aplicación total de la muestra puede ser menor que 1 μ l en función del número de canales para llenar, por lo tanto, cuando el usuario aplica una muestra, tal como una gota de sangre, ambos canales (14, 16) se llenarán bajo fuerza capilar. Este proceso es muy rápido y está más en sintonía con el llenado de las tiras de glucosa en sangre en lugar del relleno de separación de sangre prolongado de algunas plataformas de inmunoensayo. Depositados en los dos canales (14, 16) hay partículas magnéticas funcionalizadas con el anticuerpo (18). Como se describirá con más detalle, la sangre llena cada canal (14, 16) hasta las características de tope fluidicas (20, 22), un tope (22) aguas abajo de un vacío de sumidero (28) y el otro tope (20) en el canal de muestra principal. Las características de tope fluidicas pueden crearse aplicando una tinta hidrófoba imprimible a una superficie del canal. Cuando el cartucho (10) se forma a partir de tres sustratos (50, 52 y 54) como se muestra en la figura 2b, la tinta hidrófoba se puede aplicar a los sustratos superior (50) e inferior (54), para formar una característica de tope en las superficies superior e inferior de un canal. Las características de tope fluidicas (20, 22) en el canal principal de la muestra también pueden actuar como electrodos de detección de llenado si se hacen de un material eléctricamente conductor hidrófobo adecuado. A medida que el cartucho (10) se inserta en el lector, se puede iniciar un mecanismo de calentamiento del cartucho, calentando el cartucho a una temperatura constante predefinida durante la duración de la prueba. Esto permite muchos beneficios que se comentan a continuación.

En el extremo de cada uno de los 2 canales de la muestra (14, 16) en el cartucho puede haber un electrodo (23), véase la figura 2. También puede haber un electrodo (23) presente cerca del sumidero de desbordamiento (28) (que también podría usarse como zona de medición electroquímica). A través del lector, verificando la continuidad eléctrica entre los electrodos, el lector podrá confirmar que los canales (14, 16) se han llenado satisfactoriamente con la muestra. Esto se puede realizar a través de una simple medición de conductancia. Para un canal específico, si los electrodos (23) se han humedecido exitosamente con sangre (lo que significa que ambos canales se llenaron completamente con la muestra), entonces una corriente eléctrica puede conducir de un electrodo a otro a través de la muestra de sangre. De lo contrario, si la muestra de sangre no está presente, o si solo ha llenado parcialmente el canal, entonces uno de los electrodos no se humedecerá, lo que significa que la corriente eléctrica no puede fluir de un electrodo a otro.

En el presente sistema de cartucho/ensayo, deberá ser posible medir el hematocrito de la muestra de sangre. El diseño del cartucho significa que la medición se puede realizar sin ninguna interferencia de los reactivos que se utilizan para la funcionalidad del ensayo primario.

La figura 3 muestra una porción del cartucho (1) con más detalle y, en particular, las características de tope de fluido (20, 22). Una característica adicional (60) se muestra junto al punto de aplicación de la muestra (12). Esta característica (60) está diseñada para evitar que cualquier muestra humedezca la superficie exterior del cartucho en la aplicación de la muestra.

Las características de tope hidrofóbicas (20, 22) están presentes en ambas superficies interiores eliminando cualquier trayectoria hidrófila que resulta en la interrupción del fluido en esta característica. En una realización, se utilizan dos superficies hidrófilas, sin embargo, se podrían usar combinaciones alternativas de superficies hidrófilas/hidrófobas para llenar la tira por acción capilar. En un ejemplo extremo de esto, podrían utilizarse dos superficies internas hidrófobas y al proporcionar una acción de "succión" por medio de una bomba en el lector, el cartucho puede llenarse con la muestra.

A medida que la sangre llena los canales de muestra (14, 16) (ver las figuras 4 y 5) las partículas magnéticas del anticuerpo funcionalizado (18) (que se depositan previamente en el canal de reactivos secos) se vuelven a suspender por la sangre, lo que permite unir cualquier analito/s presente. La sangre se llena hasta las características de tope (20, 22), ver la figura 5. Una vez que las partículas (18) se vuelven a suspender, se permitirá que la incubación con la muestra de sangre se produzca durante un período de tiempo definido (tiempo de incubación) y se controla mediante software y programación apropiados del lector. Las partículas magnéticas se pueden elegir como la fase de captura debido a su alta movilidad y funcionalidad (dependiendo del tamaño, es decir, coeficientes de difusión, etc.) para reducir las distancias de difusión y, en última instancia, el tiempo de incubación. Este tipo de reacción será muy eficiente y reproducible al unir el analito de las muestras de sangre. Durante la unión de las

partículas magnéticas del analito, se puede realizar una medición del hematocrito mediante electrodos de hematocrito (24). El lector puede utilizar el valor del hematocrito para calcular la concentración final del analito, ya que el valor de referencia será una medición de plasma realizada por un analizador clínico. Se puede requerir una medición de hematocrito para corregir la diferencia de concentración asociada con el analito presente en un volumen
 5 dado de muestra debido a las diferentes proporciones de glóbulos rojos a plasma. Por lo tanto, una medida de la sangre completa se puede corregir para esta diferencia por medio de una medición de hematocrito para que los resultados sean consistentes con los asociados con una muestra de plasma.

Después de que las partículas magnéticas funcionalizadas de anticuerpos (18) han unido cualquier analito en la sangre de un imán permanente (80) o el campo electromagnético se utiliza para mantener el complejo de partículas magnéticas analito-anticuerpo en su lugar (véase la figura 6). Luego se entrega un tampón de lavado o gas desde un puerto de entrada (26). El medio de lavado se proporciona a partir de un depósito/depósitos de tampón presente en el lector (un depósito/depósitos de tampón particular y, por lo tanto, se puede insertar el tampón en el lector dependiendo del ensayo particular y, por lo tanto, se detecta el analito). Un volumen definido de tampón (por
 10 ejemplo, 1-2 μL) se expulsa del depósito/depósitos del lector a través de un sistema de bombeo hacia los canales de muestra (14, 16) que empujan la sangre más allá de la característica de tope de fluido (22) hacia el vacío del sumidero (28), dejando las partículas magnéticas en el tampón. (Ver las figuras 7 y 8). Las partículas magnéticas (18) se pueden visualizar como una banda discreta (82) que aún se mantiene dentro del canal (14, 16).

Después de esta etapa, una serie de etapas adicionales de lavado, como anteriormente, pueden realizarse (todas usando la etapa de mantenimiento de las partículas magnéticas mediante un campo magnético aplicado) y donde otros reactivos secos depositados (30, 32) pueden resuspenderse en el tampón (por ejemplo, el mismo tampón que el tampón de lavado) que luego se bombea a los canales de muestra (14, 16), para permitir que ocurran eventos de enlace de una manera muy controlada. O como se describió anteriormente, el complejo de analito de partículas magnéticas lavadas que está contenido dentro de la matriz de tampón limpio puede transportarse aguas arriba, pasando la característica de tope (20) a la ubicación en la tira donde se seca el marcador en el cartucho de prueba desechable. En este punto, el complejo de analito de partículas magnéticas se puede unir al marcador, seguido de una etapa de lavado adicional y de la medición del marcador. (En ambos de estos ejemplos, solo la reacción de unión al analito de cuentas magnéticas se produce en la sangre, todas las demás reacciones y/o etapas de unión se producen en un entorno de tampón muy controlado).
 20
 25
 30

Sin embargo, el campo magnético también puede estar "relajado" (véase la figura 9) moviendo el imán de distancia desde el cartucho y reduciendo de este modo la atracción magnética de esta manera de las partículas magnéticas (18) que todavía pueden mantenerse por el campo magnético, aunque menos fuertemente y puede formarse una banda más difusa (84) de partículas. El movimiento del imán (80) hacia el cartucho nuevamente servirá para concentrar las partículas (18) una vez más.
 35

En resumen, esto significa que cualquier reactivo y/o marcador nunca contacta con la matriz de sangre "sucio", y todas las reacciones/unión (aparte de la etapa de captura de analito inicial) está muy controlado en un entorno tamponado, opcionalmente un entorno calentado para maximizar la eficiencia de detección y evitar/minimizar la unión no específica y los productos interferentes se eliminarán (maximizando la repetibilidad/precisión de la medición). Esto permite que el sistema actual use reactivos que normalmente no se habrían elegido porque eran "problemáticos" en plasma/sangre. Además, también significa que todas las mediciones de detección, tales como las mediciones de fluorescencia también se producen en un entorno de tampón "limpio", lo que significa que el enfriamiento/interferencia de la muestra (como se espera en la sangre o el plasma) se reduce/elimina, lo que permite realizar mediciones reproducibles muy sensibles. Esto permite una selección mucho mayor de marcadores de detección, por ejemplo, fluoruros, porque se minimiza la extinción de la luz de excitación o emisión.
 40
 45

Se debe apreciar que la descripción anterior, con referencia a la figura 1, se ha hecho en relación con un cartucho de dos canales, pero la presente invención también se refiere a un solo canal, así como a varios canales, por ejemplo, 6, 7, 8 cartuchos, etc. Cada canal puede llevar a cabo la misma reacción con fines de reproducibilidad/precisión, o puede diseñarse para llevar a cabo diferentes ensayos; de esta manera, cada cartucho puede ser capaz de llevar a cabo una reacción "múltiple".
 50

La figura 10 muestra un cartucho (10) similar al que se muestra en la figura 1, pero adicionalmente muestra electrodos de llenado (23) que pueden detectar el llenado correcto de la muestra por el cartucho (10). Se proporcionan otros electrodos (24) para permitir obtener un valor de hematocrito de la muestra de sangre.
 55

Una realización adicional de un cartucho 11 de acuerdo con la presente invención se muestra en la figura 11. En esta realización preferida, 6 canales son alimentados por un solo puerto de entrada de muestra en lugar de que los dos canales sean alimentados por el único puerto de entrada de muestra. El diseño de la banda de 6 canales es una versión ampliada de la banda de 2 canales que se muestra en la figura 1, por lo que se agregaron canales adicionales que comparten el mismo sumidero (90). Esto permite un uso más efectivo de la huella de la tira y permite una mayor capacidad de multiplexación.
 60
 65

En última instancia, se realiza una medición (por ejemplo fluorescente) por un lector mediante detección óptica u

otros medios, adecuada para el marcador a detectar. Por ejemplo, si el marcador es un marcador fluorescente, los medios de detección pueden ser capaces de realizar y detectar la excitación y la emisión de los fluóforos elegidos: una vista esquemática de un lector portátil de acuerdo con la presente invención se muestra en las figuras 12-15. Esta realización del lector (medidor MST Pro V1) es la realización específica que se utilizó para realizar los experimentos como se describe en la sección Experimental. Además, todos los resultados experimentales se obtuvieron utilizando el diseño de tira de 6 canales (como se muestra en la figura 26). El lector (100) comprende una plataforma (106) para recibir y mantener un cartucho (10) de la presente invención y un cabezal de sellado (105) cuya actuación puede controlarse mediante solenoides (108) para producir un sistema sellado mediante el cual el instrumento puede bombear un gas, tal como aire o un fluido, tal como un tampón de lavado, en la tira de una manera controlada. Además, el lector comprende un cartucho de depósito/depósitos de fluido (111) para contener fluido o gas para su posterior suministro al cartucho (10). El cartucho de depósito/depósitos puede contener una cámara separada para cada canal de prueba contenido en la tira, de manera que la activación y el control del fluido/aire para cada canal de prueba se accione directamente desde lo que efectivamente es una fuente de bomba separada. Alternativamente, el cartucho de depósito/depósitos puede comprender una cámara que luego se divide en múltiples salidas, de tal manera que la activación y el control del fluido/aire para cada canal de prueba se accione desde una fuente de bombeo común. El fluido o gas se suministra por medio de un actuador (113) que actúa sobre el carcho del depósito/depósitos. También se proporcionan medios de detección óptica (107) y circuitos eléctricos (112) adecuados y un chip o chip(s) de ordenador asociado(s) y software para controlar el lector y realizar el ensayo. Además, debido a que el sistema descrito tiene la flexibilidad de realizar muchas etapas de lavado y suministro de reactivos, muchos formatos de ensayo pueden configurarse utilizando el sistema actual.

Un soporte de imán (103) y el imán asociado que puede estar orientado a 45 grados, (104) pueden ser controlados mediante el uso de un motor (110) con el fin de llevar el imán en contacto o muy cerca de la tira de prueba, con el fin de influir en las partículas magnéticas o paramagnéticas contenidas dentro de la tira reactiva. Para realizar la medición del ensayo (por ejemplo, fluorescente), el cabezal de lectura óptica (107) se puede mover a lo largo de las zonas de medición o detección (222) de cada uno de los múltiples canales de prueba en el cartucho de prueba controlado por un motor (109). Por lo tanto, la cabeza de lectura óptica se puede utilizar para realizar múltiples mediciones en un cartucho de prueba desechable. La gráfica que se muestra en la figura 25 muestra los resultados de una lectura de ejemplo del cabezal de lectura óptica a través de un canal de prueba en el cartucho de prueba. (utilizando el diseño del lector medidor MST Pro V1). A partir de los resultados, se puede ver que el instrumento puede realizar múltiples mediciones en todo el ancho del canal de prueba, lo que permite identificar y transformar la señal de fluorescencia máxima en un resultado mediante el uso de un algoritmo y mostrarla al usuario a través del LCD (101). Además, el instrumento podría interpretar la forma asociada con las mediciones tomadas a través del canal de prueba y usar esto como un control a bordo, por ejemplo, si la respuesta de lectura da la forma de una disminución constante o un aumento constante en lugar de una respuesta parabólica, entonces podría ser utilizado para determinar un resultado erróneo o no uniforme.

Se apreciará que se requiere el lector de controlar con mucha precisión el suministro de fluido/gas de, por ejemplo, el tampón de lavado en el cartucho desechable. El cartucho puede incluir una serie de canales de muestra separados, y es posible que se requieran varias etapas de lavado para cada canal, debiendo realizarse cada paso de lavado a una velocidad de flujo precisa y con un volumen preciso. Cada canal puede tener una pluralidad de puertos de interfaz de lavado ((26) de la figura 1) sobre los cuales se realiza un sello para garantizar el suministro correcto del lavado de tampón/gas desde el depósito/depósitos en el lector. Un sistema de gestión fluidica adecuado puede estar compuesto por 3 componentes principales (como se muestra en la figura 14), una bomba/bombas fluidicas (113), un cartucho de depósito/depósitos de tampón 111 (y la figura 15) y una interfaz fluidica de lector/cartucho o sello (105).

La bomba/bombas fluidicas que se utilizan para transportar el fluido desde el cartucho de depósito/depósitos de tampón a y durante todo el cartucho, puede ser un actuador lineal de motor paso a paso (por ejemplo, E21H4U-5-900 Haydon Kerk Motion Solutions), las características asociadas con un actuador lineal de motor paso a paso que lo convierten en una solución deseable incluyen el hecho de que se bloquea en posición cuando se detiene (de modo que el fluido no puede empujar contra el cartucho de depósito/depósitos de tampón y el actuador lineal) y que los motores paso a paso tienen movimiento de resolución muy fina (por ejemplo, 0,0015 mm/paso del motor).

La interfaz fluidica de lector/cartucho puede conseguirse mediante el uso de una cabeza de sellado recubierta con caucho suave en el lector que se localiza conjuntamente con dichos orificios de entrada de lavado (26) del cartucho. Alternativamente, una junta de caucho podría ubicarse en el cartucho de prueba desechable, o podría haber una junta de caucho presente tanto en el cabezal de sellado como en el cartucho de prueba desechable. El cabezal de sellado tendrá una salida (por ejemplo, un orificio en la membrana de caucho que contiene la salida del sistema de administración fluidica) que se alinea con cada uno de los puertos de entrada de fluido del cartucho.

El lector puede incluir preferiblemente un tampón de lavado de depósito/depósitos. El depósito/depósitos de lavado de tampón puede contener el líquido de lavado de tampón para realizar ensayos en varios cartuchos. Alternativamente, en el caso de que el depósito/depósitos esté lleno de aire, podría ser una característica permanente del diseño del lector, ya que no sería necesario reemplazarlo como se explicó anteriormente.

Para hacer el lector adecuado para su uso por el usuario, de tal manera que la sustitución del cartucho de depósito/depósitos de tampón no de como resultado que el líquido se derrame hacia fuera y sobre el lector o usuario, el cartucho de depósito/depósitos de lavado de gas/tampón y el lector pueden estar diseñados para tener interfaces de sellado automático, de manera que cuando se retira el cartucho del depósito/depósitos del lector, se sella cualquier fluido dentro de los límites del depósito/depósitos y el instrumento. El sello puede diseñarse de tal manera que solo se abra cuando el depósito/depósitos se inserta correctamente en el punto de interfaz apropiado en el instrumento, se puede incorporar una característica para penetrar en el cartucho de depósito/depósitos de tampón de sellado automático. Para asegurarse de que el fluido de tampón dentro del cartucho de depósito/depósitos de lavado de tampón no se evapore, lo que provocaría la formación de huecos de aire dentro del cartucho, el cartucho de depósito/depósitos de tampón puede tener sellos de lámina en ambos extremos, sobre un extremo del émbolo de la jeringa, y sobre un extremo de sellado automático. Estos sellos de lámina se romperán por el controlador de la bomba de jeringa y la función de interfaz del cartucho del medidor, respectivamente. Un ejemplo de una realización de este tipo se muestra en la figura 15, donde la interfaz fluidica del lector/cartucho de muestra se logra mediante el uso de un cabezal de sellado recubierto de caucho suave en el lector que interactúa con el cartucho de muestra. El cabezal de sellado tendrá una salida (es decir, un orificio en la membrana de caucho que contiene la salida del sistema de administración fluidica) que se alinea con cada uno de los puntos de entrada de la tira.

El cartucho de depósito/depósitos de tampón/gas puede tener una cámara singular que acciona las diversas etapas de lavado asociadas con cada canal de prueba de una sola fuente que luego se divide en múltiples puntos de puerto de salida a través de diversas válvulas y tubos. Preferiblemente, el cartucho de depósito/depósitos de tampón/gas puede tener una cámara separada para cada canal de prueba, de modo que las etapas de lavado asociadas con cada canal de prueba se realicen desde fuentes individuales. Este tipo de diseño también se muestra en la figura 15, y no requiere ninguna válvula en el lector o en el cartucho de prueba. Alternativamente, el cartucho de depósito/depósitos puede tener varias cámaras que están asociadas con subgrupos comunes de canales de prueba contenidos en el cartucho de prueba.

Como se discutió anteriormente, con el fin de mantener la fase de captura y el analito unido, etc. consiguiendo su lavado durante las etapas de lavado del tampón y de lavado del reactivo, las cuentas magnéticas en la tira de ensayo desechable requieren que se sujeten mediante el lector. Esta función se cumplirá utilizando un imán permanente o un electroimán. Es posible manipular las cuentas magnéticas de ciertas maneras que podrían ayudar a mejorar la precisión, la sensibilidad y el rango de medición. Por ejemplo, para señales fluorescentes de ensayo más bajas, puede ser beneficioso que el imán reúna todas las cuentas magnéticas en un grupo estrechamente unido, aumentando la densidad de los fluoróforos presentes y, por lo tanto, la intensidad de la luz emitida hacia el detector. En contraste, en los casos en que hay señales más altas, y el sensor de luz y la electrónica del lector están cerca de la saturación, puede ser beneficioso retirar o mover el imán para relajar o extender las cuentas magnéticas sobre un área determinada, reduciendo así la intensidad de la luz emitida hacia el sensor. Esto podría verse como una nueva forma de utilizar el imán para influir tanto en la sensibilidad como en el rango del ensayo o afectar la cinética de unión de los ensayos de varias etapas. Por lo general, para un imán, los puntos donde la densidad de flujo es mayor (y, por lo tanto, donde las cuentas magnéticas tenderán a gravitar están a lo largo del borde del imán, ya que es donde las líneas de flujo magnético tienen la trayectoria de viaje más corta desde el polo norte hasta el polo sur.

Es una característica física de desarrollo del ensayo que la temperatura ambiente puede influir en la magnitud de la respuesta. En la presente invención, este efecto de la temperatura será impulsado principalmente a través del efecto de la temperatura en la difusión, por lo que un aumento de la temperatura puede resultar en un aumento de la eficiencia de enlace entre las cuentas magnéticas y el analito objetivo, y la unión posterior a los reactivos administrados. El sistema actual se puede usar, por ejemplo, en un consultorio médico y en el hogar, y el rango de temperaturas al que estará expuesto el sistema será amplio, desde tal vez tan bajo como 10 grados centígrados hasta tan alto como 35 grados centígrados. Un método para eliminar este efecto de temperatura consiste en calentar la tira de prueba a una temperatura predeterminada, por ejemplo, 40 grados, lo que eliminaría cualquier variación asociada con el ensayo debido a los efectos de la temperatura. Por lo tanto, el lector también puede comprender medios de control de temperatura, tales como un calentador.

El control de la temperatura del cartucho se puede implementar mediante la utilización de la superficie superior del bloque óptico (que estará en contacto con la tira y puede estar hecho de un metal conductor del calor, tal como aluminio, que tiene buenas propiedades de conductividad térmica) como calentador para mantener la temperatura del cartucho de muestra. Alternativamente, la plataforma de soporte en la que se apoya el cartucho de prueba desechable dentro del lector podría utilizarse como la superficie calentada que hace contacto con la tira. El calentamiento de la superficie calentada se puede realizar utilizando una resistencia de alto vataje y bajo valor (por ejemplo, 1 ohmio), o bien utilizando un MOSFET con la pestaña del disipador térmico del MOSFET unida a la superficie superior del bloque óptico. La temperatura se puede controlar colocando un sensor de temperatura en la superficie del bloque de calentamiento y utilizando la salida de este sensor de temperatura para modificar el flujo de corriente a través de la resistencia de alto vataje/MOSFET. Una ventaja adicional de esta implementación es que la ganancia de fotodiodo de silicio MPPC (el fotodiodo de silicio MPPC es el detector utilizado para medir la intensidad de la luz emitida por los fluoróforos objetivo en la tira de prueba) es sensible a la temperatura ambiente, por lo tanto, implementando la superficie superior del bloque óptico como calentador también garantizaría que se controla la

temperatura ambiente cerca del fotodiodo de silicio MPPC.

Un método alternativo de calentar el cartucho de muestra sería crear un elemento de calentamiento muy delgado. El hecho de que el elemento de calentamiento sea muy delgado (100-250 micrómetros) también significaría que un imán podría colocarse debajo del elemento y aún estar cerca del cartucho para que las cuentas magnéticas se puedan recoger. El elemento de calentamiento delgado podría adoptar una forma similar a la de una PCB flexible, con pistas de cobre intercaladas entre dos capas de polímero. Un lado de la capa se puede recubrir con un material reflectante, o se le puede adherir una capa reflectante para hacer la superficie de espejo, si se requiere que el elemento de calentamiento refleje la luz emitida por los fluoróforos objetivo, hacia el fotodiodo de silicio MPPC. Alternativamente, en el caso de que la fluorescencia de fondo se convierta en un problema en el sistema, un lado del elemento podría tener un acabado negro mate en lugar de una superficie reflectante.

El bloque óptico del lector de la presente invención puede ser capaz de proporcionar las fuentes de luz para múltiples longitudes de onda de excitación del fluoróforo y la medición de la luz emitida posterior de los fluoróforos. Es la intensidad de esta luz emitida por los fluoróforos en el cartucho de prueba desechable lo que proporcionará la medición del ensayo. El bloque de medición óptica es responsable de medir la cantidad de analito objetivo presente en el cartucho a través de los marcadores unidos asociados, tal como fluoróforos. El bloque de medición óptica puede comprender un fotodiodo de silicio de contador de fotones de múltiples píxeles (MPPC) (por ejemplo, Hamamatsu S10362-11-100C) y un LED de banda ancha de alta potencia que emite un amplio espectro de longitudes de onda (por ejemplo, HP803WW Roithner LaserTechnik GmbH).

Un fotodiodo de silicio MPPC puede preferirse, ya que tiene una ganancia interna muy alta (en la región de 1 millón) en comparación con un fotodiodo estándar (ganancia = 1) o un fotodiodo de avalancha (ganancia = en la región de 100). Una característica conveniente del fotodiodo de silicio MPPC es que su ganancia interna varía en relación con la tensión de polarización inversa que se le aplica (por ejemplo, una tensión de polarización de 70 V da como resultado una ganancia de aproximadamente 1 millón, mientras que una tensión de polarización de 65 V da como resultado una ganancia de aproximadamente 100.000). El lector puede utilizar esta relación para manipular el rango dinámico del sistema de medición, es decir, para concentraciones de analito más altas, la tensión de polarización del fotodiodo se puede reducir para garantizar que la salida del fotodiodo no sature la electrónica del instrumento. Cabe señalar que en realizaciones alternativas se podría implementar un fotodiodo estándar o un fotodiodo de avalancha en lugar de un fotodiodo de silicio MPPC.

Una alta potencia de banda ancha LED es conveniente para que un solo LED se pueda usar para generar múltiples longitudes de onda de excitación (es decir, la luz que incide sobre los fluoróforos de analito objetivo) teniendo un portaobjetos de filtro que se puede mover para colocar diferentes filtros frente al LED para generar diferentes longitudes de onda. El portaobjetos también contiene filtros asociados con el fotodiodo de silicio para bloquear la luz de excitación, de modo que el fotodiodo de silicio mida solo la luz emitida por los fluoróforos.

Con referencia al cartucho de 2 canales como se muestra en la figura 1, el bloque de medición óptica puede estar dispuesto de tal manera que hay 2 conjuntos de fotodiodos LED y silicio, uno para cada canal en la tira. La ubicación de los fotodiodos y los LED es fija. El portaobjetos se puede mover de manera tal que se puedan colocar diferentes filtros entre los LED y los fotodiodos de silicio MPPC para diferentes mediciones. Alternativamente, en lugar de tener 2 conjuntos fijos de fotodiodos de LED y silicio, podría implementarse un solo cabezal óptico que pueda moverse entre los diferentes canales de prueba.

Realizaciones alternativas de la configuración indicada del bloque óptico son las siguientes:

1. En una realización, tanto la fuente de excitación como el detector de emisiones están ubicados en la misma cara del cartucho. Una alternativa a esto es que el cartucho se encuentra entre la fuente de emisiones y el detector de emisiones.

Una razón por la que la fuente y el detector pueden ubicarse en la misma superficie es para dejar espacio para la integración del cartucho con el sistema de administración de fluidos, la interfaz del conector del cartucho, el bloque de calentamiento y el control de partículas magnéticas.

2. En otra realización, existe la implementación de un portaobjetos de filtro móvil para permitir la selectividad en la excitación y la detección de varios fluoróforos. En una configuración más simple donde solo se requiere la detección de un único fluoróforo por canal, no se requeriría el deslizamiento del filtro y podría reemplazarse con un solo filtro de excitación fijo y un solo filtro de emisión para cada canal.

3. En una realización adicional, la fuente de luz para la excitación de los fluoróforos proviene de un emisor de banda ancha. Implementaciones alternativas donde no existe la necesidad de excitarse en múltiples longitudes de onda podrían incluir fuentes de luz específicas de longitud de onda, tal como LED de banda estrecha.

Otra alternativa a un LED de banda ancha sería una lámpara de flash de xenón, siendo la intensidad de una lámpara de flash de xenón mucho mayor que la de un LED. Además, una lámpara de flash de xenón emite en un rango mayor de longitudes de onda. Cuando los LED de banda ancha "blanco" o "blanco cálido" pueden emitir hasta una longitud de onda de alrededor de 400 nm, las lámparas de flash de xenón pueden emitir hasta

alrededor de 200 nm, lo que significa que las lámparas de flash de xenón pueden usarse para longitudes de onda de excitación en el rango UV.

4. En otra realización, la configuración del bloque óptico podría comprender dirigir la luz de excitación a un espejo dicróico (o divisor de haz) montado en un ángulo de 45 grados con respecto a la normal que refleja la luz de excitación a través de 90 grados hacia la muestra en el cartucho de prueba desechable. El espejo dicróico se elige de modo que la luz de excitación generada por el fluoróforo se encuentre en una longitud de onda que se desplaza a través del espejo dicróico (es decir, no se refleja de nuevo hacia la fuente de emisión) donde el fotodiodo de silicio está situado para la detección de la luz emitida. También se pueden colocar filtros ópticos adicionales frente a la fuente de luz y el detector óptico en esta configuración para reducir la banda de paso de las longitudes de onda de luz producidas por el emisor y aceptadas por el detector.

Debido a la variación en los procesos asociados con la fabricación de cartuchos de prueba de ensayo desechable, normalmente se requiere que se caracterice cada lote de cartuchos y para los valores de calibración específicos, que se introduzcan en el lector, de manera que la respuesta de ensayo generada por el cartucho de prueba se pueda normalizar por el lector internamente antes de informar el resultado final del ensayo. En la presente invención, existe la oportunidad de utilizar el cartucho de tampón como una herramienta para transportar datos particulares de interés, por ejemplo, parámetros de calibración de ensayo sobre su lote asociado de cartuchos. Una implementación podría incluir la conexión de un chip de memoria EEPROM al cartucho de depósito/depositos, por lo que el lector puede leer los datos en el chip de memoria EEPROM.

En una realización particular, el cartucho de muestra y lector asociado están diseñados para llevar a cabo un inmunoensayo, en el que el analito a detectar es un antígeno y el agente de unión es un anticuerpo. Las partículas paramagnéticas pueden funcionalizarse mediante la unión de anticuerpos contra antígenos libres o libres y complejos.

Debido al presente diseño del cartucho, de manera importante la única reacción de unión que se produce inicialmente es la unión a cualquier antígeno en la sangre de anticuerpos, esto da como resultado una serie de ventajas. Principalmente significa que se pueden realizar ensayos de varias etapas, lo que significa que la molécula/partícula seleccionada nunca contacta ("ve") la sangre. Este es un beneficio significativo sobre las tecnologías de inmunoensayo POC existentes en las que tanto la fase de captura como el marcador están en contacto con la muestra. Los esquemas típicos de unión de inmunoensayos POC generalmente consisten en partículas de captura planas o magnéticas y un marcador que podría estar unido a una partícula, conjugado o polímero, etc. Sin embargo, tanto la fase de captura como la de marcador entran en contacto con la muestra (sangre, plasma, etc.). Esto puede llevar a una serie de problemas. Dentro de los inmunoensayos hay muchas especies que interfieren con las etapas de unión del inmunoensayo. Los principales candidatos son los anticuerpos humanos contra animales, como los anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), los anticuerpos animales contra animales (en el caso de aplicaciones veterinarias), el factor reumatoide, los anticuerpos anti-BSA, el fibrinógeno, etc. La unión específica no específica (HAMA, factor reumatoide) y la unión no específica pueden dar como resultado resultados altamente inexactos que resultan en un rendimiento deficiente y, en última instancia, en un diagnóstico incorrecto de las muestras de pacientes. Esto es especialmente cierto, ya que los inmunoensayos de POC se refieren generalmente al rendimiento del analizador clínico que incorpora ensayos de varias etapas, etapas de lavado muy efectivas y detección de marcadores en una matriz limpia. La unión específica y no específica resulta en un marcador unido a la fase de captura de una manera no consistente con la concentración de analito (puede ser mayor o menor que el resultado esperado), lo que resulta en un resultado inexacto. Pueden emplearse partículas de látex fluorescentes que se funcionalizan mediante la unión de anticuerpos contra el antígeno libre y complejo. Por lo tanto, se puede formar un sándwich entre las partículas magnéticas, el antígeno a detectar y las partículas de látex fluorescentes.

En una realización del presente sistema, sin embargo, el marcador de detección, tal como un resto fluorescente nunca en contacto con la sangre, como la sangre se elimina por lavado antes de que cualquier marcador que se ponga en contacto con el analito unido. Por lo tanto, cualquiera de estos eventos matriciales que podrían facilitar la unión no específica no puede producirse porque las cuentas magnéticas (18) y el marcador de detección no están presentes en la sangre al mismo tiempo, al igual que algunos sistemas analizadores clínicos. Esto es muy importante cuando se considera el error total permitido (ATE) de un inmunoensayo. Existe un impulso dentro de las autoridades regulatorias, como la FDA para ajustar el ATE en cualquier producto de ensayo nuevo para aumentar la precisión de las pruebas con respecto a los sistemas de referencia.

Para una población dada de muestras clínicas, aunque la mayoría de las sangres/muestras se recuperan con precisión, la ATE puede ser afectada por unas pocas respuestas inexactas. Por lo tanto, es muy importante que cualquier nueva tecnología de plataforma esté diseñada para minimizar estos efectos. La presente invención tiene como objetivo realizar el diseño apropiado del cartucho y el lector asociado, reduciendo así el sesgo de muestra a muestra (por ejemplo, eliminación de la unión específica no específica y la unión no específica).

Otra ventaja de solamente realizar la etapa de captura de partículas magnéticas en la muestra no tratada, tal como la sangre, es que las mediciones de la sangre pueden llegar a ser muy precisas. La mayoría de los inmunoensayos

son altamente sensibles con respecto a las concentraciones de reactivos (es decir, la concentración de la fase de captura y la fase de marcado). Se requiere una concentración de reactivo suficiente para impulsar la pendiente, mientras que una concentración de reactivo demasiado alta da como resultado un aumento de las intercepciones del ensayo. En un análisis de sangre completa, este problema se puede exagerar aún más, ya que incluso si deposita exactamente el mismo volumen y concentración de reactivo, los reactivos tendrán diferentes concentraciones en diferentes tipos de sangre de hematocrito (ya que los reactivos se resuspenden en diferentes volúmenes de plasma). Por ejemplo, los mismos reactivos depositados en un 60 % de sangre de hematocrito tendrán 1,87 veces menos volumen que un 25 % de sangre de hematocrito. Como resultado, los reactivos estarán más concentrados en el 60 % de sangre de hematocrito que en el 25 % de sangre de hematocrito. Esto solo podría causar problemas de sesgo de sangre a sangre, ya que tanto la fase de captura como la de marcado variarán en concentraciones, por lo tanto, la eficiencia general de captura (número de interacciones de fase de captura-analito-marcador realizadas a partir del número total de interacciones de fase de captura-analito-marcador posibles = eficiencia de captura) variarán entre las sangres debido a los efectos del hematocrito solo. Esto, junto con las viscosidades variables de diferentes tipos de sangre (y plasma) afecta los coeficientes de difusión de cualquier reactivo móvil que puede resultar en un ATE deficiente.

Tener solo las partículas magnéticas que se unen al analito en la sangre ayuda a reducir significativamente este problema, ya que las partículas magnéticas de gran movilidad y funcionales serán altamente eficientes con respecto a la unión del analito. Por lo tanto, la diferencia en la concentración de partículas magnéticas en sangre de hematocrito alta o baja es menos importante, ya que casi todo el analito disponible está unido en esta etapa. Los efectos de viscosidad de sangre a sangre se minimizan aún más por el calentamiento del cartucho aplicado, ya que no habrá efecto de temperatura, ya que el cartucho siempre tendrá una temperatura constante, como se describió anteriormente.

Para un inmunoensayo, una vez que los agentes no unidos en la sangre han sido lavados activamente fuera del canal de muestra hacia fuera en el sumidero, el lector luego entrega una pequeña cantidad de tampón en el cartucho de muestra a través de un punto de entrada de memoria intermedia en la tira que contiene una deposición seca de cuentas de látex fluorescente funcionalizadas con anticuerpos (u otros reactivos de unión secundarios). La cuenta de látex fluorescente marcada con anticuerpo es resuspendida por el tampón y luego bombeada al canal que contiene los complejos de analito de partículas magnéticas. El imán permanente o el electroimán alojado en el lector todavía está aplicando un campo magnético en este punto y "retiene" los complejos de analito de partículas magnéticas en su lugar en el canal. Una vez que el látex fluorescente funcionalizado con anticuerpos ha sido transportado por el lector al canal que contiene los complejos de analito-partícula magnética, el campo magnético se elimina, permitiendo que se produzca una segunda reacción de unión. (Aunque también sería posible permitir la fase de unión mientras el imán está en posición y las cuentas magnéticas se mantienen en posición). Alternativamente, el complejo de partículas magnéticas-analito podría ser transportado aguas arriba en el cartucho de muestra, para contactar con el marcador. Alternativamente, como se describió anteriormente, todos los reactivos de unión (fase de captura de partículas magnéticas y marcador) podrían depositarse en el canal de muestra y la reacción de unión ocurriría en el canal de muestra. La acumulación magnética y el lavado de aire/fluido por el lector aseguran que los complejos de partículas de analito-marcador magnéticos se cuantifiquen en un entorno de aire/fluido.

La flexibilidad del presente sistema permite el potencial para una medición muy flexible y sensible. En este punto, todo el sistema está configurado para una alta eficiencia de captura, lo que da como resultado ensayos muy sensibles, ya que las partículas magnéticas se cargan efectivamente con analito, por lo que las colisiones con el marcador deberían dar como resultado eventos de unión exitosos. Para mayor claridad, se describirá un esquema de unión; sin embargo, debido a la flexibilidad del diseño de la plataforma actual, se puede formatear casi cualquier arquitectura de ensayo concebida.

Una etapa de lavado se realiza generalmente para eliminar cualquier medición óptica posterior del marcador no unido que se hace a continuación, en un entorno 'limpio'. En el caso de la detección fluorescente, esto permite el uso de fluoróforos que no serían utilizables en algunas matrices (por ejemplo, sangre) donde, de lo contrario, se produciría una extinción significativa de la señal específica (sin la eliminación de esta matriz).

Se podría proporcionar una amplificación adicional de la señal, si es necesario, mediante la resuspensión y el bombeo de un reactivo de unión terciario en el canal. Por ejemplo, podría usarse una partícula marcada adicional (marcador idéntico o diferente) con anticuerpos contra un componente de la partícula marcada primaria (por ejemplo, un inmunógeno acoplado a la partícula marcada para la cual existen buenos anticuerpos). Una vez más, se realizaría una etapa de retención y lavado magnético para eliminar cualquier partícula marcada recubierta con marcador secundario no unido. El lector luego mediría el marcador de la misma manera (si se usara el mismo marcador) o de una manera diferente si se usara un marcador diferente. Esta medida adicional podría utilizarse para aumentar el rango y la sensibilidad de la medición.

Muchos inmunoensayos POC actuales que utilizan marcadores fluorescentes que miden los marcadores en una matriz de sangre o plasma. Como se describió anteriormente, hay muchos componentes en la sangre y el plasma (albúmina sérica humana, bilirrubina, hemoglobina, etc.) que interfieren con la longitud de onda de excitación o emisión utilizada para medir la concentración del fluoróforo capturado. Como resultado, la precisión dentro y entre

las sangres de otros inmunoensayos POC puede verse afectada únicamente por la medición del marcador fluorescente solamente (además de todos los problemas de unión de la matriz). Como resultado, se utilizan fluoróforos que intentan minimizar estos efectos, por lo que no son necesariamente el mejor marcador fluorescente que se debe utilizar, sino la necesidad de realizar la medición de fluorescencia en una "matriz sucia". Sin embargo, la plataforma actual permitirá una elección extendida de marcadores fluorescentes que permitan elegir los marcadores que dan como resultado el mejor rendimiento del ensayo. Esto solo es una ventaja; también significa que la multiplexación puede lograrse más fácilmente como se discutió.

La presente invención posibilita la multiplexación (es decir, la detección de más de un analito usando una sola muestra) dentro de un único canal utilizando partículas magnéticas como una fase de captura. Por ejemplo, si no es posible usar múltiples marcadores fluorescentes debido a las propiedades ópticas de la sangre y el plasma, entonces la multiplexación no sería posible dentro de un canal porque no hay manera de proporcionar especificidad de medición, ya que las partículas magnéticas no pueden distribuirse espacialmente en partículas magnéticas específicas para el analito 1, 2, etc. Esta es la razón por la cual la captura plana se utiliza como fase de captura en plataformas POC que pueden realizar multiplexación. Por ejemplo, algunas pruebas de panel utilizan el mismo marcador fluorescente (debido a las limitaciones de sangre y plasma) para los marcadores con los anticuerpos de captura para cada analito distribuido espacialmente en la tira para permitir la capacidad de multiplexación. Como las partículas magnéticas son móviles y susceptibles al campo magnético aplicado, la especificidad debida a la distribución espacial de las partículas magnéticas (específicas contra diferentes analitos) es difícil de lograr debido a las limitaciones ópticas del marcador fluorescente en plasma o sangre. Sin embargo, al proporcionar una etapa de lavado como en la presente invención, la multiplexación dentro de un solo canal utilizando partículas magnéticas y marcadores fluorescentes se convierte en una realidad. Además, el diseño de la banda de 6 canales permite la multiplexación con un fluoróforo y, por lo tanto, aumenta la capacidad de multiplexación general cuando se tiene en cuenta la multiplexación dentro del canal (múltiples fluoróforos).

Debido a la flexibilidad que ofrece la capacidad de realizar una sola etapa, ensayos de múltiples etapas y lavado múltiples etapas, hay una gran oportunidad de ampliar los rangos de medición de analito o linealizar la curva de respuesta a la dosis de un ensayo. Por ejemplo, las curvas típicas de respuesta a dosis de inmunoensayo son sigmoideas. Esto se debe a la saturación del reactivo (reactivo insuficiente para mantener la unión lineal) o la saturación del marcador/método de detección (es decir, los métodos de detección se saturan y ya no pueden medir el marcador de manera lineal). Sin embargo, la plataforma actual permitirá una respuesta lineal completa en todo el rango de medición, y esto puede lograrse mediante varios métodos. Por ejemplo, el lector puede medir la concentración de las partículas fluorescentes en cada etapa del ensayo de varias etapas. Por lo tanto, después de que se haya producido la etapa inicial de unión de partículas fluorescentes, el lector podría medir la intensidad de la fluorescencia. Esta podría ser una medición de rango, por ejemplo, por lo que si la intensidad supera un valor umbral (establecido durante la calibración), utiliza la intensidad de fluorescencia para calcular la concentración del analito (calibración 1) y la prueba se detiene en este punto. Sin embargo, si la intensidad de fluorescencia está por debajo del valor umbral, esto indicaría una baja concentración de analito y las etapas de amplificación adicionales descritas anteriormente (calibración 2) y la subsiguiente intensidad de fluorescencia utilizada para calcular la concentración de analito. Esto también podría lograrse utilizando los dos canales, en los que un canal se sintoniza para realizar mediciones muy sensibles, mientras que el otro se ajusta (concentración de reactivo y/o tiempo de enlace) para realizar mediciones lineales en la porción restante del rango de medición del analito. La saturación óptica que resulta en la no linealidad también puede ser combatida por el lector. La plataforma actual permite muchas formas diferentes de lograr respuestas lineales en los rangos medibles, lo que permitirá una calibración más precisa que resulta en una mejor precisión dentro y entre la sangre, lo que resulta en un ATE mejor. Se prevé que la distribución de partículas magnéticas podría usarse para afectar tanto a la medición del marcador fluorescente como las reacciones de unión. Por ejemplo, las partículas magnéticas podrían medirse como una distribución homogénea/distribuida en todo el canal, permitiendo mediciones de rango, mientras que las mismas partículas magnéticas podrían acumularse para aumentar la intensidad de fluorescencia para impulsar la sensibilidad de la medición. Asimismo, el mismo principio podría usarse para afectar las reacciones de unión y ajustar los ensayos en consecuencia.

En el diseño de cartucho mostrado en la figura 1, se muestran dos canales idénticos; sin embargo, las mediciones no requieren esto, por lo tanto, se puede emplear un canal en el cartucho, y esto podría permitir una medición de inmunoensayo por debajo de 1 μ L.

En comparación con el diseño de la tira 2 de canal, se unen los canales dentro del diseño de la tira 6 de canal (que se muestran en la figura 11). En la banda de 2 canales, los dos canales son entidades separadas que no están unidas. El diseño de 6 canales puede tener canales unidos (al igual que el diseño de 2 canales) porque el sistema es un sistema sellado. En la figura 11, se muestran electrodos que podrían usarse para mediciones electroquímicas (219) que podrían situarse en uno o más de los canales de muestra. También se muestran electrodos que podrían usarse para la detección electroquímica y/o del fluido de muestra, así como para actuar como características de tope fluidicas (220, 221). La figura 11 también muestra 2 características alternativas de diseño de la tira que podrían prestar la tira para ser llenada con la muestra de prueba que se presenta al final de la tira (217) o la parte superior de la tira (218). Cada canal de prueba dentro del cartucho de prueba puede tener uno o más puertos de lavado (206, 208, 200, 202).

Los puertos de lavado de tira (200, 202) están cerrados (sellados por el lector). Después de un cierto tiempo (por ejemplo, 5 minutos), el lector puede colocar un imán en contacto con la tira reactiva, o muy cerca de la misma, lo que hará que las cuentas magnéticas se acumulen en una banda apretada que se mantendrá en posición durante la etapa de lavado primario. El cartucho de la bomba de jeringa se puede activar para realizar una etapa de lavado con líquido o gas, un canal a la vez, por ejemplo, utilizando válvulas para controlar la apertura y el cierre de cada canal. (por ejemplo, el primer puerto (206) en aislamiento). O todos los canales al mismo tiempo, por lo que cada puerto (206 y 202) está abierto al cartucho de la bomba de jeringa a través de la ausencia de un sistema de válvulas, o un sistema de válvulas donde todas las válvulas asociadas están abiertas. La realización preferida es el caso donde no hay válvulas presentes, ni en el lector ni en el cartucho de prueba desechable. Cuando la sangre se lava con tampón o gas (por ejemplo, aire) que se introduce a través del primer puerto (206), la sangre se empuja sobre una característica de tope fluidica (221) en el sumidero (210). La acumulación de partículas magnéticas descrita anteriormente, los procesos de relajación por permanente o electroimanes, etc. siguen siendo exactamente iguales. En el caso de que el cartucho de la bomba de jeringa haya lavado los canales de prueba del cartucho de prueba con gas para un ensayo de una sola etapa, en este punto, la medición fluorescente final para cada canal se puede realizar en el área de detección/medición (222). Debe tenerse en cuenta que, en este caso, la medición es la de una banda magnética acumulada: complejo fluoróforo en el aire. En el caso de un ensayo de varias etapas, se requiere que el lector realice tareas adicionales, como se indica a continuación.

La sangre no se empuja en los otros canales (212, 213, 214, 215, 216), ya que los puertos (200, 202) están sellados o bajo presión/fuerza positiva debida al cartucho de bomba de jeringa que actúa sobre estos puertos al mismo tiempo. (En este caso, no se requieren válvulas ni en el lector ni en el cartucho de prueba desechable). Por lo tanto, el único lugar para que la sangre desplazada vaya es el sumidero (210). Cada canal tiene al menos un puerto(s) de entrada de fluido, por lo tanto, como el primer puerto está abierto (por ejemplo, 206) y se usa como un puerto para dispensar líquido en el cartucho, los puertos adicionales (por ejemplo, 208) ubicados en el canal superior pueden cerrarse, evitando que se dispense fluido por el canal. Por lo tanto, la sangre se lava del canal y en el sumidero.

Una entrega secundaria del marcador puede ser realizada o, alternativamente, el complejo de analito de partículas magnéticas puede ser transferido hasta el canal a la zona en la que el marcador se deposita (211, 212, 213, 214, 215, 216). Debe tenerse en cuenta que las características impresas en el diseño de la tira se pueden usar para contener estos reactivos en un área predefinida. Este concepto también podría aplicarse a los reactivos primarios depositados en el canal de muestra de prueba (223). Esta entrega secundaria del proceso de marcado puede nuevamente realizarse individualmente en un proceso canal por canal, o puede realizarse en todos los canales a la vez. Cuando se usan varios puertos para un canal, este proceso se basa en los puertos (200, 202, 206, 208) que se abren y cierran (solo se abre un puerto por canal a la vez), en el caso de un solo puerto asociado con cada canal, esto no es necesario. En el caso de la entrega del marcador, el primer puerto de lavado de tiras (206) utilizado para la etapa de lavado se cerrará, y el segundo puerto ubicado en el canal se abrirá y se usará para dispensar fluido para rehidratar y entregar el marcador al complejo de partícula magnética-analito o eliminar el aire (lo que resulta en un evento de transferencia). El evento de transferencia es posible porque la tira es un sistema sellado, y en lugar de bombear fluido hacia la tira, la "bomba" aspira aire desde la tira, lo que da como resultado que el complejo de analito de partículas magnéticas en el tampón sea aspirado a lo largo del canal hacia el marcador depositado. Este proceso se repetiría para los canales restantes (212, 213, 214, 215, 216).

En el caso en el que solo hay un puerto asociado con cada canal de prueba (figura 26, 224), el volumen de aire presente en la zona (225) entre la muestra de ensayo y el puerto puede ser utilizado para desplazar la muestra a partir del área del canal de muestra (rellenado desde el puerto de entrada de muestra (226)). Por lo tanto, en el caso de que el cartucho de la bomba de jeringa contenga fluido, solo se requiere un puerto para realizar un ensayo de 2 etapas, ya que el lavado primario se realiza utilizando aire que ya está presente en el canal de prueba del cartucho de prueba, lo que permite que el fluido posterior se bombee desde el cartucho para rehidratar los reactivos secundarios (depositados en la región identificada por el punto 227) y presentarlos al complejo de partículas magnéticas presentes en el área del canal de muestra del canal de prueba. Es posible realizar un ensayo de 1 etapa con un lavado con aire con solo 1 puerto (224) asociado con cada canal, este es el diseño del cartucho (tira MST Pro V1, figura 26) asociado con la sección experimental.

Como se ha descrito anteriormente, la presente plataforma permite medir múltiples analitos dentro de cada canal. La multiplexación se puede realizar fácilmente en un canal depositando partículas magnéticas con diferentes agentes de unión contra los analitos que se medirán. Esto podría lograrse haciendo preparaciones individuales de partículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos y luego combinándolas y depositándolas en el canal de muestra. En comparación, se podría hacer una preparación única mediante la cual una población de anticuerpos mixtos (contra todos los analitos que se van a medir) se acopla a una población de partículas magnéticas que da como resultado partículas magnéticas que tienen varios anticuerpos diferentes acoplados a las mismas. En ambas realizaciones, se podrían hacer preparaciones de partículas de látex fluorescente/fluoróforos confiriendo la especificidad de anticuerpo requerida contra los analitos a medir, permitiendo que se realice un complejo clásico de "sándwich" de inmunoensayo (los inmunoensayos que emplean mediciones de fluorescencia en sangre y plasma no podrían realizar estas mediciones como las partículas magnéticas específicas de diferentes analitos no podrían distribuirse espacialmente como se describió anteriormente). Se podrían realizar más etapas de amplificación si fuera necesario; y los reactivos podrían sintonizarse aún más para permitir esto. Existe una amplia gama de fluoróforos disponibles

con diferentes longitudes de onda de excitación y emisión y se prevé que se puedan medir hasta 5 analitos diferentes dentro de un canal. Además de las mediciones de inmunoensayo, las mediciones electroquímicas también podrían incorporarse en la medición de la tira. Por ejemplo, se podría realizar una medición electroquímica de la concentración de glucosa y una medición de hemoglobina glicosilada utilizando la plataforma presente. Por ejemplo, en el caso de una medición electroquímica de glucosa, se incorporaría un conjunto adicional de electrodos que reflejaría la posición de los electrodos de hematocrito en el otro canal. Todos los reactivos necesarios se depositarían en los electrodos. A medida que la sangre llena los canales y se producen todos los eventos de inmunoensayo descritos anteriormente, se produce la medición electroquímica de la glucosa en la sangre, el lector interpreta la concentración de glucosa y la sangre se lava en el sumidero. Por lo tanto, la plataforma actual podrá incorporar una gama muy diversa de mediciones en un cartucho.

Muchas de las plataformas actuales de inmunoensayos POC requieren el almacenamiento de las tiras refrigerado. La presente invención puede evitar tales problemas empleando características que hacen posible la estabilidad a temperatura ambiente. Por ejemplo, otros sistemas de inmunoensayo POC tienen bolsas de tampón que contienen un sustrato enzimático (un reactivo húmedo), estos sustratos tienen una estabilidad de temperatura ambiente limitada y, como resultado, el producto tiene un perfil de estabilidad refrigerado. En comparación, el único reactivo "húmedo" de la presente invención es cartucho de depósito/depositos de tampón. Esto no está contenido dentro del cartucho de muestra y como el tampón generalmente no se apaga a temperatura ambiente, la presente invención evita este problema. Del mismo modo, ninguno de los reactivos es reactivo húmedo, ya que todos se depositarán en el cartucho y serán resuspendidos por el tampón cuando se entreguen al canal de muestra o resuspendidos por la sangre. Los reactivos secos depositados evitarán así cualquier inestabilidad del reactivo húmedo; asimismo, se han evitado los marcadores de enzimas (es decir, los marcadores de enzimas y anticuerpos) (debido a sus perfiles de estabilidad deficientes) y las formulaciones de estabilización se pueden optimizar para un solo reactivo (por ejemplo, partículas magnéticas) sin afectar al perfil de estabilidad de otros reactivos (por ejemplo, el marcador).

Sección experimental

Materiales:

Maleimida-PEG2-biotina:

Thermo Scientific, Cat 21901 (EZ-link maleimida-PEG2-biotina).

Partículas de látex de amina fluorescente:

Invitrogen, Cat F8765 (1 µm de fluoesferas de color amarillo verdoso con funcionalización de la superficie de la amina)

Partículas de látex de neutravidina fluorescentes:

Invitrogen, Cat F8776 (1 µm de fluoesferas de color amarillo-verde con funcionalización de la superficie con neutravidina)

Partículas paramagnéticas:

Ademtech, Cat 03223 (200nm Strep + partículas paramagnéticas)

Anticuerpo 1H12:

Hytest, Cat 4P33 MAb 1H12 (anti-PSA, humano)

Anticuerpo 5A6:

Hytest, Cat 4P33 MAb 5A6 (anti-PSA, humano)

PBS:

Thermo Scientific, Cat 28372 (paquetes de solución salina tamponada con fosfato BupH)

BSA:

Sigma, Cat A4503-50G (albúmina, a partir de suero bovino)

Agua:

Sigma, Cat W4502 (agua para biología molecular)

2MEA:

Thermo Scientific, Cat 20408 (clorhidrato de 2-mercaptoetanolamina)

5 **SPDP:**

Pierce, Cat 21857 (3-(2-piridilditio) propionato de *N*-succinimidilo)

PSA:

10

Hytest, Cat 8P78 (antígeno específico de la próstata)

Kit de cuantificación de biotina:

15 Thermo Scientific, Cat 28005 (kit de cuantificación de biotina Pierce)

Columnas de exclusión de tamaño:

Thermo Scientific, Cat 89882 (columnas desaladoras de centrifugación Zeba)

20

Columnas de exclusión de tamaño:

GE Healthcare, Cat. 17-0851-01 (columnas PD10)

25 **EDTA:**

Sigma, Cat EDS-100G (ácido tetraacético etilendiamina, anhidro)

Tween:

30

Sigma P7949-100ML (Tween-20)

DMSO:

35 Thermo Scientific, Cat 20684 (dimetilsulfóxido)

Preparación de reactivos

Preparación de partículas paramagnéticas y de látex utilizando interacciones estreptavidina-biotina y neutravidina-biotina, respectivamente.

40

Anticuerpo.

Reducción de enlaces de disulfuro de anticuerpos para biotinylation

45

Use un stock de anticuerpo sin diluir (1H12 y 5A6) a una concentración entre 2 y 7 mg/ml. Se extrae un volumen apropiado de stock de anticuerpos para dar 1 mg de anticuerpo. Un volumen apropiado de EDTA 14,28 mM en PBS, pH 7,2 se agrega a 1 mg de anticuerpo para dar una concentración de EDTA de 1 mM.

50

Se disuelven 6 mg de 2MEA en 100 µl de EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2. Se agrega 1 µl de esta solución 2MEA por cada 10 µl de solución de anticuerpo. Esta solución se mezcla y se incuba en un baño de agua a 37 grados durante 90 minutos.

55

Esta solución se pasa luego a través de una columna PD10 (previamente equilibrada con EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2) y se recogen las fracciones de 500 µl. Se toma una muestra de cada fracción y se mide en un espectrofotómetro UV, con la absorbancia a 280 nm utilizada para cuantificar la proteína encontrada en cada fracción. Las fracciones que contienen concentraciones significativas de proteína se seleccionan y combinan y se vuelven a medir en el espectrofotómetro UV. Esta medición se utiliza para determinar la concentración de anticuerpos usando un coeficiente de extinción del anticuerpo de 1 mg/ml = 1,4 unidades de absorbancia a 280 nm.

Unión de maleimida-PEG2-biotina a anticuerpo

60

La maleimida-PEG2-biotina se disuelve en EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2 para dar una solución 20 mM. Se añade un volumen apropiado de esto al anticuerpo reducido para dar un exceso molar 40 veces mayor de maleimida-PEG2-biotina sobre el anticuerpo reducido. Luego se mezcla y se incuba durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego se pasa a través de otra columna PD10 que ha sido pre-equilibrada con EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2. Se recogen fracciones de 500 µl y se miden utilizando el espectrofotómetro UV a 280 nm. Las fracciones que contienen niveles significativos de proteínas son elegidas y combinadas. Una muestra de esta solución se mide nuevamente a 280 nm

65

por absorbancia, y la concentración de anticuerpo se determina utilizando el coeficiente de extinción del anticuerpo de 1 mg/ml = 1,4 unidades de absorbancia a 280 nm. El número de biotinas unidas por anticuerpo se determina luego utilizando el kit de cuantificación de biotina Pierce, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 **Látex.**

Unión del anticuerpo biotinilado 5A6 al látex

10 1 µm de látex recubierto con neutravidina se lava en 0,1 % de Tween-20 en PBS, pH 7,2 (mediante centrifugación a 16100x g para 3,5 min, 4 °C) y se resuspendieron en el mismo a una concentración de 0,5 % de sólidos. El anticuerpo biotinilado 5A6 se diluye a una concentración de 200 µg/ml en tween-20 al 0,1 % en PBS, pH 7,2. Luego se agrega un volumen igual de 200 µg/ml de b5A6 al látex al 0,5 %. Esta solución se mezcla bien y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación en un mezclador giratorio (30 rpm) en la oscuridad.

15 Luego, las partículas se lavan 4 veces (utilizando centrifugación a 16100x g, 3,5 min a 4 °C) con un volumen igual de PBS, pH 7,2 para eliminar cualquier anticuerpo biotinilado no unido y se resuspenden en PBS, pH 7,2 para dar una concentración de látex de un 0,25 % de sólidos.

Esto será referido en el texto como látex funcionalizado 1.

Partículas paramagnéticas

20 **Unión del anticuerpo a la partícula**

Partículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina a 200 nm se lavan (utilizando un separador magnético) en tween al 0,1 % en PBS, pH 7,2 y se resuspenden en la misma para dar una concentración de sólidos del 0,5 %. El anticuerpo biotinilado 1H12 se diluye en Tween al 0,1% en PBS, pH 7,2 para dar 50 µg/ml. Un volumen igual de partículas paramagnéticas al 0,5 % y 50 µg/ml de anticuerpo biotinilado se combinan, se mezclan y se dejan incubar durante 70 minutos a temperatura ambiente, con agitación usando un agitador rotatorio a 30 rpm.

30 Las partículas paramagnéticas se lavaron 4 veces (utilizando un separador magnético) en un volumen igual de tween al 0,1 % en PBS, pH 7,2 y se resuspendieron en el mismo para dar una concentración de partículas paramagnéticas de 0,5 % de sólidos. Esto será referido en el texto como partículas paramagnéticas funcionalizadas.

Preparación de partículas de látex utilizando interacciones amina-SPDP.

35 **Anticuerpo.**

Reducción de enlace de disulfuro de anticuerpo para la unión a SPDP

40 Se usa un stock de anticuerpo sin diluir (5A6) a una concentración entre 2 y 7 mg/ml. Se extrae un volumen apropiado de stock de anticuerpos para dar 100 µg de anticuerpo. Un volumen apropiado de EDTA 14,28 mM en PBS, pH 7.2 se agrega a 100 µg de anticuerpo para dar una concentración de EDTA de 1 mM.

Se disuelven 6 mg de 2MEA en 625 µl de EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2. Se agrega 1 µl de esta solución 2MEA por cada 10 µl de solución de anticuerpo. Esta solución se mezcla y se incuba en un baño de agua a 37 grados durante 90 minutos.

45 Esta solución se pasa luego a través de una columna de desalinización por centrifugación Zeba (previamente equilibrada con EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2) y se recoge el flujo. Se toma y se mide una muestra de flujo a través del espectrofotómetro UV, con la absorbancia a 280 nm registrada. Esta medición se utiliza para determinar la concentración de anticuerpos usando un coeficiente de extinción del anticuerpo de 1 mg/ml = 1,4 unidades de absorbancia a 280 nm.

50 **Látex.**

El látex fluorescente funcionalizado con amina se lava en EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2 (usando centrifugación a 16100x g durante 3,5 min, 4 °C) y se resuspende en el mismo a una concentración de 0,5 % de sólidos.

55 El SPDP se disuelve en un volumen apropiado de DMSO para dar una concentración de 20 mM de SPDP. Luego se agrega SPDP en DMSO al látex al 0,5 % para dar SPDP 1 mM. Esto se mezcla e incuba en la oscuridad durante 70 minutos con agitación suave (30 rpm en el mezclador rotativo). Luego, el látex se lava 3 veces con un volumen de reacción 2x de EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2 (usando centrifugación a 16100x g durante 3,5 min, 4 °C). El látex se resuspende luego en el mismo volumen apropiado para obtener una concentración de látex de 0,5 % de sólidos.

60 Esto proporciona un látex que está unido a SPDP, listo para la unión del anticuerpo reducido.

Unión de látex con anticuerpos reducidos con SPDP unido.

65 Anticuerpo reducido 5A6 se diluye a 1 mg/ml en EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2. Luego se mezcla 1 mg/ml de anticuerpo con látex al 0,5 % unido a SPDP en una proporción de 1:1. Esto proporciona una mezcla de unión de látex al 0,25 % con 500 µg/ml de anticuerpo en EDTA 1 mM en PBS, pH 7,2.

Esta reacción de unión se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 19,5 horas y luego se lava 4 veces con un volumen de reacción 1x de PBS, pH 7,2 (usando centrifugación a 16100x g durante 3,5 min, 4 °C). El látex se resuspendió luego en PBS, pH 7,2 en el volumen apropiado para dar sólidos al 0,25 %. Esto será referido en el texto como látex funcionalizado 2.

5

Procedimientos de ensayo

Ensayo 1:1 etapa de ensayo en húmedo con lavado manual

10 Se añaden 7 µl de partículas paramagnéticas funcionalizadas al 0,5 % (con b1H12 unido) a un eppendorf y se colocan en un separador magnético. El sobrenadante se elimina y las partículas se resuspenden en 49 µl de 30 mg/ml de BSA en un 0,05 % de tween-20 en PBS, pH 7,2. A esto, se añaden 7 µl de látex 1 funcionalizado al 0,25 % (con 5A6 biotinilado unido) y se mezcla la solución.

15 Se retiraron 8 µl de esta mezcla y se agregaron a 2 µl de proteína PSA en 60 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2 (N.B. El PSA se encuentra a 5 veces la concentración final requerida). Se mezcla y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

20 El eppendorf se agrega luego a un separador magnético y el sobrenadante se elimina cuidadosamente. Luego se agregan 20 µl de tween-20 al 0,05 % en PBS, pH 7,2 al sedimento, mientras se mantiene en el separador magnético. Se eliminó el sobrenadante y se usaron 20 µl de tween-20 al 0,05 % en PBS, pH 7,2 para resuspender los complejos de partículas, una vez retirados del separador magnético.

25 Esto se repite con varias concentraciones diferentes de PSA, produciendo complejos de ensayo húmedos lavados que se han diluido 2x de la reacción original.

Estos complejos diluidos y lavados se miden de 3 maneras diferentes de la siguiente manera:

Medida de ensayo en húmedo lavado 1:

30

Se añaden 2 µl de complejos de ensayo húmedos lavados a 38 µl de PBS en un Optiplato negro de 384 pocillos para la medición de fluorescencia. Luego se mide la placa con un Perkin Elmer Victor3 V. La señal fluorescente en el pozo se mide con el programa incorporado 'Fluorescein (485 nm/535 nm, 0,1s)', adaptado para su uso en un formato de 384 pocillos. Este programa utiliza la excitación a 485 nm y la emisión a 535 nm con un tiempo de medición de 0,1 s.

35

Medida de ensayo en húmedo lavado 2:

40 8 µl de complejos de ensayo lavados en húmedo se utilizan para rellenar un cartucho 'tira MST Pro V1' (como se muestra en la figura 26). Los reactivos de ensayo húmedos lavados se aplicaron al cartucho a través del puerto de entrada de la muestra (226). Esto permitió que la muestra (en este caso los reactivos de ensayo húmedos lavados) llenara los 6 canales hasta las características de tope fluidicas (229, 228, 239, 237) (que también pueden actuar como electrodos de detección de llenado a través de la conexión eléctrica al lector a través del conector (230)). Este cartucho se inserta en un lector 'medidor MST Pro V1' (como se muestra en la figura 12) y la señal se mide por la óptica en el lector que escanea cada canal utilizando un movimiento lineal del cabezal óptico en la posición (222, 242). En este método, los complejos de ensayo húmedos lavados se distribuyen homogéneamente por todo el canal y, por lo tanto, en el área de detección (es decir, no se concentran en una banda mediante el uso de un campo magnético). Cabe señalar que las mediciones no se realizan en el canal (243) en estos experimentos, ya que se ha configurado como un canal de corrección del hematocrito con electrodos de hematocrito (237) para las mediciones de sangre completa que no se utilizan aquí. También se debe tener en cuenta que los electrodos de hematocrito, en este caso, se han hecho de un material hidrófobo para evitar el llenado de todo el canal y, por lo tanto, de la muestra de desecho. Para electrodos de hematocrito en funcionamiento se usaría un material menos hidrófobo o hidrófilo.

Medida de ensayo en húmedo lavado 3:

55

Los cartuchos (tira MST Pro V1) llenos de complejos de ensayo húmedos lavados, como se describe en la medición ensayo húmedo lavado 2 anterior, entonces se volvieron a medir utilizando el Victor3 V. Esto se llevó a cabo fijando el cartucho a un Optiplato negro de 384 pocillos y alineando el canal del cartucho a medir (en las posiciones 222, 241) sobre un pocillo específico. La señal fluorescente del canal se midió luego midiendo la señal del pocillo correspondiente utilizando el programa incorporado 'Fluorescein (485 nm/535 nm, 0,1 s)', adaptado para su uso en un formato de 384 pocillos. Este programa utiliza la excitación a 485 nm y la emisión a 535 nm con un tiempo de medición de 0,1 s. Esto se repitió para cada canal a medir.

60

Resultados para el ensayo 1:

65

Los resultados para las comparaciones entre los diferentes métodos de medición de los complejos de ensayo

húmedos lavados se muestran en las figuras 16, 17 y 18.

La figura 16 muestra el total de los ensayos húmedos lavados con PSA medidos en una tira MST Pro V1 en el medidor MST Pro V1 (medición 2 del ensayo húmedo lavado). Se realizaron ensayos de PSA total en húmedo según la metodología experimental descrita anteriormente. El ensayo húmedo total lavado con PSA se midió en el medidor MST Pro V1 como se muestra en la figura 12. Los resultados muestran claramente una respuesta de ensayo sistemático con una fase lineal inicial seguida de una fase no lineal. El corte clínico para los ensayos de PSA total utilizados en el cribado del cáncer de próstata es de 4 ng/ml. El ensayo es claramente lo suficientemente sensible como para realizar mediciones precisas por encima del valor de umbral de corte de una manera cuantitativa. En este conjunto de datos, los complejos de partículas de PSA-látex paramagnético se distribuyen homogéneamente a lo largo de los canales de tira durante la fase de medición óptica. El medidor MST Pro solo se ha utilizado para medir los ensayos en húmedo lavados con PSA total en una tira.

La figura 17 muestra la correlación entre los ensayos húmedos lavados con PSA total medidos en tiras en el medidor MST Pro y Victor3 V. Las mismas tiras (que contienen los ensayos húmedos lavados con PSA total lavados) que se midieron en el medidor MST Pro (ver la figura 16, medición del ensayo lavado en húmedo 2) se midió luego en el Victor3 V (medición del ensayo húmedo lavado 3), con los resultados resumidos en la figura 17. Se observa una clara correlación entre los dos métodos de medición (medidor MST Pro V1 y Victor3 V), especialmente considerando que el Victor3 V es un lector de placas convencional y no está diseñado para medir señales fluorescentes en tiras de laminado. Esto probablemente explica el mayor error asociado con las mediciones de Victor V. Los datos demuestran que la medición óptica realizada por el medidor MST Pro V1 es una medición precisa altamente sensible, especialmente cuando se compara con una muy costosa tecnología de lector de placa fluorescente "estándar de oro" (Victor3 V).

La figura 18 muestra la correlación entre los ensayos húmedos lavados con PSA total medidos en tiras en el medidor MST Pro y el Victor V. Los ensayos húmedos lavados con PSA total también se midieron en un ensayo de placa de microtitulación convencional utilizando el Victor3 V (medición de ensayo húmedo lavado 1). Estos resultados se compararon con los ensayos húmedos lavados con PSA total medidos en una tira con el medidor MST Pro V1 (medición de ensayo húmedo lavado 2). La correlación entre las dos metodologías de medición se muestra en la figura 18. Se observa una excelente correlación entre las dos metodologías que demuestran la capacidad de realizar mediciones altamente sensibles y precisas utilizando el medidor y tira MST Pro (Plataforma) en volúmenes de muestra muy pequeños. El canal de muestra es de 1 µL, sin embargo, el volumen medido en la tira V1 de MST pro por el bloque óptico es solo de aproximadamente 0,2 µL.

Ensayo 2: Ensayo en húmedo de 1 etapa con lavado y medición realizado en el lector 'medidor MST pro V1'

Los reactivos del ensayo se combinan en los siguientes volúmenes y concentraciones en un tubo eppendorf:

Partículas paramagnéticas funcionalizadas al 0,5% (con b1H12 unido):	1µl
30 mg/ml de BSA, interpolación al 0,05% en PBS, pH 7,2:	6µl
0,25% de látex funcionalizado 1 (con 5A6 biotinilado unido):	1µl
PSA (diluido en 60 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2):	2µl

Todos los reactivos se mezclan y luego se usan para llenar los canales de un cartucho 'tira MST Pro V1' (consulte la figura 26 para la descripción del cartucho usado) a través del puerto de entrada de muestra (226) donde llena los canales hasta las características de tope fluidica (229, 228, 237). Este cartucho se inserta en un lector 'medidor MST Pro V1' (consulte la figura 12 para obtener una descripción del lector utilizado) a través del conector (230), donde se produce una incubación de 5 minutos. Luego, el lector trae un imán permanente al cartucho donde actúa para recolectar las partículas paramagnéticas y cualquier cosa unida a las mismas en el área de detección (222, 241). La cabeza del lector óptico luego realiza una medición de la señal fluorescente escaneando las áreas de detección de cada canal (222, 241). Esta medición incluye el látex fluorescente unido específicamente a las partículas paramagnéticas a través de PSA y también cualquier látex fluorescente no unido que se encuentra dentro del área de detección (consulte la figura 20 para obtener una descripción de estos resultados). El cabezal de sellado del lector forma un cierre hermético a los fluidos con puertos de entrada de los canales 1, 2, 3, 4, 5, 6 (224, 231, 232, 233, 234, 235, respectivamente). Mientras los complejos paramagnéticos se mantienen en su lugar con el imán, el lector realiza una etapa de lavado expulsando a) el tampón de lavado (0,1% tween-20 en PBS, pH 7,2) o b) aire del cartucho de la bomba de jeringa (como se muestra en la figura 15, imagen inferior del cartucho de jeringa de 6 cámaras a través de los puertos de entrada (231, 232, 233, 234, 235, 224) para desplazar el fluido de muestra del canal y, por lo tanto, eliminar el látex sin unir del área de detección, donde se desplaza hacia el sumidero (236). Luego, el cabezal del lector óptico realiza una medición de la señal fluorescente restante de los complejos de unión dentro de la matriz de la sustancia de lavado (fluido o aire) al escanear las áreas de detección de cada canal (222, 241) (ver la figura 19 para una descripción de estos resultados usando el lavado con aire y la figura 21 para los resultados usando el lavado con tampón de lavado).

Resultados para el ensayo 2:

La figura 20 muestra un ensayo de PSA total en húmedo realizado en el medidor y tira MST Pro, no usa una etapa de lavado y mide la intensidad de fluorescencia del fluoróforo después de que el complejo de partículas paramagnéticas-PSA-látex fluorescente se acumula por el imán. Un control integrado altamente efectivo se resume

en la figura 20. Antes de que el medidor realice un lavado con aire o fluido, el imán acumula complejos de partículas de látex paramagnético-PSA-fluorescente. En este punto, el medidor puede realizar una lectura óptica de los canales y cuantificar la concentración del marcador de látex fluorescente como se muestra en la figura 20. Es interesante que los recuentos de ADC de respuesta fluorescente estén relacionados con la concentración de PSA, es decir, una

respuesta de dosis sin una etapa de lavado, que podría utilizarse como un ensayo homogéneo independiente. Luego, el medidor realiza la etapa de lavado y mide la concentración de los complejos de látex fluorescente de partículas paramagnéticas-PSA. La señal fluorescente del ensayo siempre debe ser inferior después de la etapa de lavado (aire o fluido), ya que el marcador fluorescente no unido se retira del canal.

La figura 19 muestra el ensayo de PSA total en húmedo realizado en el medidor y la tira MST Pro, el medidor utiliza una etapa de lavado con aire para expulsar el marcador sin unir del canal. Los ensayos húmedos lavados con PSA total se realizaron con medidor y tira MST Pro V1. El medidor MST Pro V1 utiliza un lavado con aire para expulsar la muestra (que contiene el marcador sin unir) de los canales de tira en el sumidero. Los resultados se resumen en la figura 19, la curva de respuesta a la dosis del ensayo demuestra claramente una respuesta de ensayo rápida, sensible, precisa y cuantitativa para el PSA total. El tiempo de prueba de 5 minutos sería una mejora significativa en las pruebas de PSA POC rápidas actuales, al igual que las mejoras en la sensibilidad/precisión y la naturaleza cuantitativa del ensayo demostrado. Es interesante que los datos demuestran claramente que un "lavado con aire" es un método muy eficaz para eliminar el marcador fluorescente no unido del canal y que las mediciones precisas de los marcadores fluorescentes unidos a las partículas paramagnéticas a través del analito (PSA) se puedan realizar en un entorno no líquido. Esto permite formatear ensayos simples, pero altamente funcionales en la plataforma MST Pro.

La figura 21 muestra un ejemplo de una curva de respuesta de dosis de datos para el ensayo de PSA total en húmedo realizado en el medidor y tira MST Pro, donde el medidor utiliza una etapa de lavado con fluido para expulsar el marcador sin unir del canal. El lavado con líquido es altamente efectivo y demuestra una prueba de PSA rápida, sensible y precisa. En comparación con la metodología de lavado con aire, los complejos de marcador de partículas de látex fluorescente-PSA paramagnético se miden ópticamente en el entorno fluido. El lavado con tampón fluido podría contener componentes que podrían mejorar aún más la señal fluorescente (por ejemplo, agentes quelantes, agentes de liberación de tinte fluorescente, etc.).

Ensayo 3: Ensayo en seco de 1 etapa con lavado y medición realizado en el lector 'medidor MST pro V1'

Los reactivos se depositan y se secan dentro de un cartucho de 'tira MST Pro V1' de la siguiente manera:

- 8 µl de partículas paramagnéticas funcionalizadas al 0,5% (con 1H12 biotinilado unido) 8 µl de trehalosa 25 mg/ml en PBS, pH 7,2
- 8 µl de 300 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2
- 8 µl de tween-20 al 0,1% en PBS, pH 7,2
- 8 µl de 0,25 % de látex funcionalizado 2 (con 5A6 unido mediante SPDP)

Los reactivos anteriores se combinan y se agrega 1 µl de esta mezcla de deposición de 1 etapa por canal de un cartucho de 'tira MST Pro V1' (como se muestra en la figura 26). Los reactivos se depositan en la posición (223, 242) en cada canal y no se les permite ingresar al área de detección (222, 241) (esto se logra mediante el uso de una línea de pluma hidrofóbica para definir el área de deposición del reactivo en una sola superficie del laminado cartucho, que es suficiente para evitar la propagación del reactivo, pero no lo suficientemente fuerte como para evitar el llenado de la muestra del cartucho completamente montado por la fuerza del capilar). Para la deposición, el cartucho está medio montado, con solo la parte inferior y la capa media del cartucho unidas entre sí. Los reactivos se pipeteen en la zona de deposición de reactivos del canal de muestra de prueba medio montado (consulte la figura 26, con la zona de deposición de reactivos indicada en el cartucho como punto 223, 242). Estos se secan en un horno a 33 °C durante 10 minutos. La capa superior del cartucho se une a la mitad del cartucho montado para producir un cartucho de tres capas completamente montado (consulte la figura 2 para ver un ejemplo de cómo las tres capas se unen para formar un cartucho montado, para un diseño de cartucho diferente) con reactivos secos. La figura 26 (240) indica la forma del material adhesivo de doble cara que se corta para formar canales y estructuras de sumidero cuando se une entre dos capas de material laminado. Luego, el cartucho se almacena en una bolsa de lámina sellada que contiene desecante hasta su uso.

La proteína PSA se diluye a la concentración requerida en 60 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2. Se inserta un cartucho que contiene reactivos secos en el lector de 'medidor MST Pro V1' y luego se agregan 8 µl de PSA al cartucho para llenar los canales de muestra de prueba. La muestra se aplica al cartucho a través del puerto de entrada de la muestra (226) y llena los canales por la fuerza capilar hasta las características de tope fluidicas hidrófobas (229, 228, 239, 237). La incubación de enlace de 5 minutos se produce antes de que el lector lleve un imán permanente al cartucho donde actúa para recolectar las partículas paramagnéticas y todo lo que se encuentre vinculado al área de detección (222, 241). El cabezal de sellado del lector forma un cierre hermético a los fluidos con puertos de entrada de los canales 1, 2, 3, 4, 5, 6 (224, 231, 232, 233, 234, 235, respectivamente). Mientras los complejos paramagnéticos se mantienen en su lugar con el imán, el lector realiza una etapa de lavado expulsando aire del cartucho de la bomba de jeringa (como se muestra en la figura 15, imagen inferior del cartucho de jeringa de 6 cámaras) para desplazar el fluido de muestra del canal y, por lo tanto, retirar el látex sin unir del área de detección y colocándolo en el sumidero (236). La cabeza del lector óptico luego realiza una medición de la señal fluorescente

restante (de los complejos de enlace de sándwich específicos de partículas paramagnéticas, partículas fluorescentes de PSA) que permanecen en el aire al escanear las áreas de detección de cada canal (222, 241) (ver la figura 22 para una descripción de estos resultados).

5 Resultados para el ensayo 3:

La figura 22 muestra los resultados de un ensayo de PSA en seco total realizado en el medidor y la tira MST Pro, el medidor utiliza la etapa de lavado con aire para expulsar el marcador no unido del canal. Todos los reactivos fueron depositados en la tira. El rango dinámico del ensayo de PSA total se incrementó significativamente al usar una preparación diferente del marcador de látex fluorescente y al reducir la tensión de entrada al detector óptico. Los resultados del resumen se muestran en la figura 22, donde el ensayo es un ensayo completamente seco con todos los reactivos depositados dentro de la tira. El rango de ensayo se ha extendido significativamente, la respuesta lineal se ha incrementado 10 veces (10 a 100 ng/ml), y esto es de gran valor ya que algunos ensayos requieren análisis con un límite de detección bajo, pero un rango dinámico grande. Con tales ensayos, la linealidad no se mantiene en el amplio rango dinámico, lo que resulta en una reducción del rendimiento del ensayo en concentraciones más altas. La plataforma MST Pro puede superar esta limitación de varias maneras. Por ejemplo, la no linealidad debida a la saturación del detector óptico se puede superar al reducir la sensibilidad del detector óptico al reducir la tensión de entrada. Por lo tanto, si la unión es lineal, la sensibilidad reducida del detector óptico permitirá aumentar aún más el rango dinámico del ensayo (el medidor contendrá una curva de calibración de PSA para la configuración del detector óptico alto y bajo). En comparación, si la no linealidad se debe a una limitación del reactivo, se podrían usar dos canales de la tira MST Pro para maximizar el rendimiento del ensayo en todo el rango del ensayo. Los reactivos desarrollados para realizar mediciones muy sensibles que tienen un rango dinámico limitado podrían depositarse en un canal, mientras que los reactivos que son menos sensibles pero que permiten que el rango dinámico del ensayo se incremente significativamente podrían depositarse en otro canal. Cada conjunto de reactivos/canal tendría su propia curva de calibración, lo que permitiría mejorar el rendimiento del ensayo en todo el rango del ensayo.

Ensayo 4: Ensayo semiseco de 2 etapas (partículas secas de látex) con lavado y medición realizadas en el lector de 'medidor MST Pro V1'

Los reactivos se depositan y se secan dentro de un cartucho de 'tira MST Pro V1' de la siguiente manera:

- 10 µl de látex funcionalizado al 0,25% (con enlace 5A6 biotinilado)
- 10 µl de 25 mg/ml de trehalosa en PBS, pH 7,2
- 20 µl de 300 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2
- 10 µl de tween-20 al 0,1% en PBS, pH 7,2

Los reactivos anteriores se combinan y se agrega 1 µl de esta mezcla de deposición por canal de un cartucho de 'tira MST Pro V1' (como se muestra en la figura 26). Los reactivos se depositan en la posición (223, 242) en cada canal y no se les permite ingresar al área de detección (222, 241) (esto se logra mediante el uso de una línea de pluma hidrofóbica para definir el área de deposición del reactivo en una sola superficie del laminado cartucho, que es suficiente para evitar la propagación del reactivo, pero no lo suficientemente fuerte como para evitar el llenado de la muestra del cartucho completamente montado). Para la deposición, el cartucho está medio montado, con solo la parte inferior y la capa media del cartucho unidas entre sí. Los reactivos se pipeteen en la zona de deposición de reactivos del canal de muestra de prueba medio montado (consulte la figura 26, con la zona de deposición de reactivos indicada en el cartucho como punto 223, 242). Estos se secan en un horno a 33 °C durante 10 minutos. La capa superior del cartucho se une a la mitad del cartucho montado para producir un cartucho de tres capas completamente montado (consulte la figura 2 para ver un ejemplo de cómo las tres capas se unen para formar un cartucho montado, para un diseño de cartucho diferente) con reactivos secos. La figura 26 (240) indica la forma del material adhesivo de doble cara que se corta para formar canales y estructuras de sumidero cuando se une entre dos capas de material laminado. Luego, el cartucho se almacena en una bolsa de lámina sellada que contiene desecante hasta su uso.

En este ensayo de 2 etapas, la primera etapa de unión (partículas paramagnéticas funcionalizadas con PSA) se lleva a cabo en un formato húmedo, antes de la segunda etapa de unión (partículas paramagnéticas funcionalizadas - PSA con látex funcionalizado 1) se produce utilizando el látex funcionalizado seco 1 en el cartucho de la tira MST Pro V1' de la siguiente manera:

Etapas 1

Los siguientes reactivos se combinan:

- 2 µl de partículas paramagnéticas funcionalizadas al 0,5 % (con 1H12 biotinilado unido)
- 6 µl de 30 mg/ml de BSA en PBS, pH 7.
- 2 µl de PSA (diluido en 60 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2)

Esta primera reacción de unión se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de agregar 8 µl al cartucho que contiene látex funcionalizado seco para llenar los canales de muestra de prueba, como se muestra en

la figura 26. La muestra se aplica al puerto de entrada de muestra (226) donde llena los canales hasta las características de tope de fluidos (228, 239, 229) (que están hechas de tinta hidrófoba). La incubación de enlace de 5 minutos se produce antes de que el lector lleve un imán permanente al cartucho donde actúa para recolectar las partículas paramagnéticas y todo lo que se encuentre vinculado al área de detección. El cabezal de sellado del lector entonces forma un cierre hermético a los fluidos con puertos de entrada de los canales 1, 2, 3, 4, 5, 6 (224, 231, 232, 233, 234, 235, respectivamente). Mientras los complejos paramagnéticos se mantienen en su lugar con el imán, el lector realiza una etapa de lavado expulsando aire del cartucho de la bomba de jeringa para desplazar el líquido de muestra del canal y, por lo tanto, retira el látex no adherido del área de detección (222, 241) y colocándolo en el sumidero (236). La cabeza del lector óptico luego realiza una medición de la señal fluorescente restante (de los complejos de enlace de sándwich específicos de partículas paramagnéticas, partículas fluorescentes de PSA) que permanecen en el aire al escanear las áreas de detección de cada canal (ver la figura 23 para una descripción de estos resultados).

Resultados para el ensayo 4:

La figura 23 muestra un ensayo de dos etapas de PSA total realizado en el medidor y la tira MST Pro. El medidor utiliza una etapa de lavado con aire para expulsar el marcador no unido del canal. El marcador de látex fluorescente se depositó en la tira. Los resultados de resumen se muestran en la figura 23. El marcador de látex fluorescente se depositó en la tira y la muestra que contenía PSA y partículas paramagnéticas se agregó a la tira. El medidor realizó un lavado con aire y midió ópticamente la concentración del marcador de látex fluorescente capturado. Se observan curvas de respuesta a la dosis sistemática y demuestran que los ensayos de dos o tres etapas pueden formatearse en la plataforma MST Pro y que el marcador de látex fluorescente podría depositarse en una tira y usarse para realizar ensayos de dos etapas.

Ensayo 5: Ensayo semiseco de 2 etapas (partículas paramagnéticas secas) con lavado y medición realizada en el lector de 'medidor MST Pro V1'

Los reactivos se depositan y se secan dentro de un cartucho de 'tira MST Pro V1' de la siguiente manera:

- 10 µl de partículas paramagnéticas funcionalizadas al 0,5% (con enlace 1H12 biotinilado)
- 10 µl de PBS, pH 7,2
- 10 µl de 25 mg/ml de trehalosa en PBS, pH 7,2
- 10 µl de 300 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2
- 10 µl de tween-20 al 0,1% en PBS, pH 7,2

Los reactivos anteriores se combinan y se agrega 1 µl de esta mezcla de deposición por canal de un cartucho de 'tira MST Pro V1' (como se muestra en la figura 26). Los reactivos se depositan en la posición (223, 242) en cada canal (sin embargo, no es vital que estos reactivos se mantengan separados del área de detección ya que no se deposita ningún marcador (látex fluorescente)). Para la deposición, el cartucho está medio montado, con solo la parte inferior y la capa media del cartucho unidas entre sí. Los reactivos se pipeteen en la zona de deposición de reactivos del canal de muestra de prueba medio montado (consulte la figura 26, con la zona de deposición de reactivos indicada en el cartucho como punto 223, 242). Estos se secan en un horno a 33 °C durante 10 minutos. La capa superior del cartucho se une a la mitad del cartucho montado para producir un cartucho de tres capas completamente montado (consulte la figura 2 para ver un ejemplo de cómo las tres capas se unen para formar un cartucho montado, para un diseño de cartucho diferente) con reactivos secos. La figura 26 (240) indica la forma del material adhesivo de doble cara que se corta para formar canales y estructuras de sumidero cuando se une entre dos capas de material laminado. Luego, el cartucho se almacena en una bolsa de lámina sellada que contiene desecante hasta su uso.

En este ensayo de 2 etapas, la primera etapa de unión (látex 1 funcionalizado con PSA) se realiza en un formato en húmedo, antes de la segunda etapa de unión (látex funcionalizado 1-PSA con partículas paramagnéticas funcionalizadas) se produce utilizando partículas paramagnéticas funcionalizadas secas dentro del cartucho de 'tira MST Pro V1' de la siguiente manera:

Etapas 1

Los siguientes reactivos se combinan:

- 2 µl de látex funcionalizado al 0,25 % (con 5A6 biotinilado unido)
- 6 µl de 30 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2
- 2 µl de PSA (diluido en 60 mg/ml de BSA en PBS, pH 7,2)

Esta primera reacción de unión se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de agregar 8 µl al cartucho (como se muestra en la figura 26) que contiene partículas paramagnéticas funcionalizadas secas para llenar los canales de muestra de prueba. La muestra de 8 µl se aplica al puerto de entrada de muestra (226) y llena los canales hasta las características de tope fluidicas (229, 228, 239). La incubación de enlace de 5 minutos se produce antes de que el lector lleve un imán permanente al cartucho donde actúa para recoger las partículas

paramagnéticas y cualquier cosa unida a ellas en el área de detección (222, 241). El cabezal de sellado del lector entonces forma un cierre hermético a los fluidos con puertos de entrada de los canales 1, 2, 3, 4, 5, 6 (224, 231, 232, 233, 234, 235, respectivamente). Mientras los complejos paramagnéticos se mantienen en su lugar con el imán, el lector realiza una etapa de lavado expulsando aire del cartucho de la bomba de jeringa para desplazar el líquido de muestra del canal y, por lo tanto, retira el látex no adherido del área de detección (222, 241) y colocándolo en el sumidero (236). La cabeza del lector óptico luego realiza una medición de la señal fluorescente restante (de los complejos de enlace de sándwich específicos de partículas paramagnéticas, partículas fluorescentes de PSA) que permanecen en el aire al escanear las áreas de detección de cada canal (222, 241) (ver la figura 24 para una descripción de estos resultados).

Resultados para el ensayo 5:

La figura 24 muestra un ensayo de PSA total de dos etapas realizado en el medidor y la tira MST Pro, el medidor utiliza etapa de lavado con aire para expulsar el marcador sin unir del canal. La fase de captura de partículas paramagnéticas se depositó en la tira. El medidor utiliza una etapa de lavado con aire para expulsar el marcador no unido del canal. Las partículas paramagnéticas se depositaron en la tira y se añadió una muestra de PSA/marcador de látex a la tira. El medidor realizó un lavado con aire y midió ópticamente la concentración del marcador de látex fluorescente capturado. Se muestra una curva de respuesta a la dosis sistemática para los ensayos de dos etapas y demuestra que los ensayos de dos o tres etapas pueden formatearse en la plataforma MST Pro y que las partículas paramagnéticas podrían depositarse en una tira y usarse para realizar ensayos de dos etapas. Estos resultados, junto con los del Ensayo 4 (figura 23) muestran cómo sería posible secar látex y partículas paramagnéticas dentro del mismo cartucho y realizar un ensayo de 2 etapas completamente seco.

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar un ensayo en una muestra, comprendiendo el método:

5 introducir una muestra fluida en un cartucho microfluídico; comprendiendo el cartucho:

un sustrato que comprende uno o más canales microfluídicos dispuestos en el mismo y que comprende un agente de unión dispuesto dentro de dicho(s) canal(es) para unir cualquier analito dentro de la muestra, comprendiendo el agente de unión propiedades magnéticas;

10 un puerto de muestra para introducir dicha muestra de fluido en el cartucho;

un sumidero de salida de fluido para eliminar fluido de dicho(s) canal(es); una o más características de tope diseñadas para evitar que la muestra u otros líquidos pasen a través de la(s) característica(s) de tope solo por acción capilar y

15 al menos un puerto de entrada de fluido para permitir introducir uno o más fluidos en el cartucho y transportarlos a través del(los) canal(es) microfluídico(s) y/o el aire que se debe ventilar desde el cartucho;

permitir que la muestra de fluido se extraiga a través del cartucho, de modo que la muestra de fluido entre en contacto con dicho agente de unión antes de ser detenida por dicha una o más características de tope, por lo que al menos una porción de cualquier analito presente en la muestra está limitada por el agente de unión que comprende propiedades magnéticas;

20 mantener el analito unido en posición utilizando el imán o el campo magnético aplicado por un lector;

lavar cualquier material no unido del analito unido utilizando el lector; y

detectar de manera fluorescente cualquier analito unido presente en el cartucho;

caracterizado por que la etapa de lavado se realiza utilizando solo el aire presente en el cartucho y la detección fluorescente se realiza en el aire.

25 2. El método según la reivindicación 1, en el que un marcador u otro reactivo pueden ponerse en contacto con el analito unido.

30 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la detección se realiza en cualquier analito unido, que está sustancialmente libre de componentes de la muestra.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de fluido es una muestra de sangre completa.

35 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra de fluido introducida en el cartucho microfluídico es inferior a 1 microlitro.

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra se introduce en el cartucho mediante acción capilar.

40

Figura 1

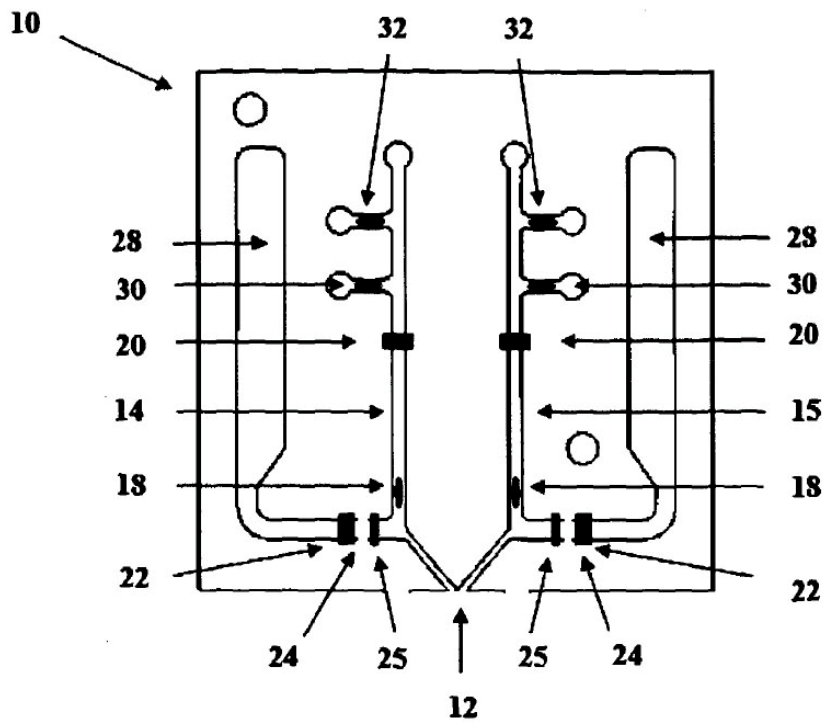


Figura 2

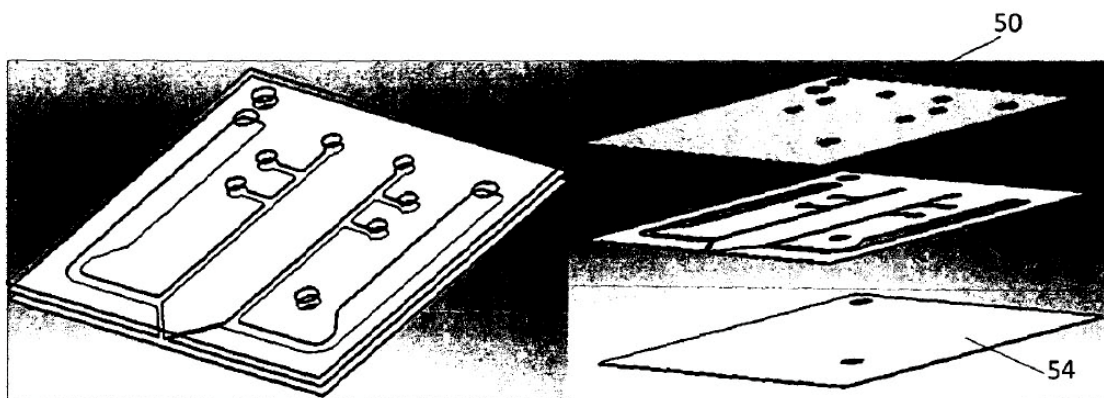


Figura 3

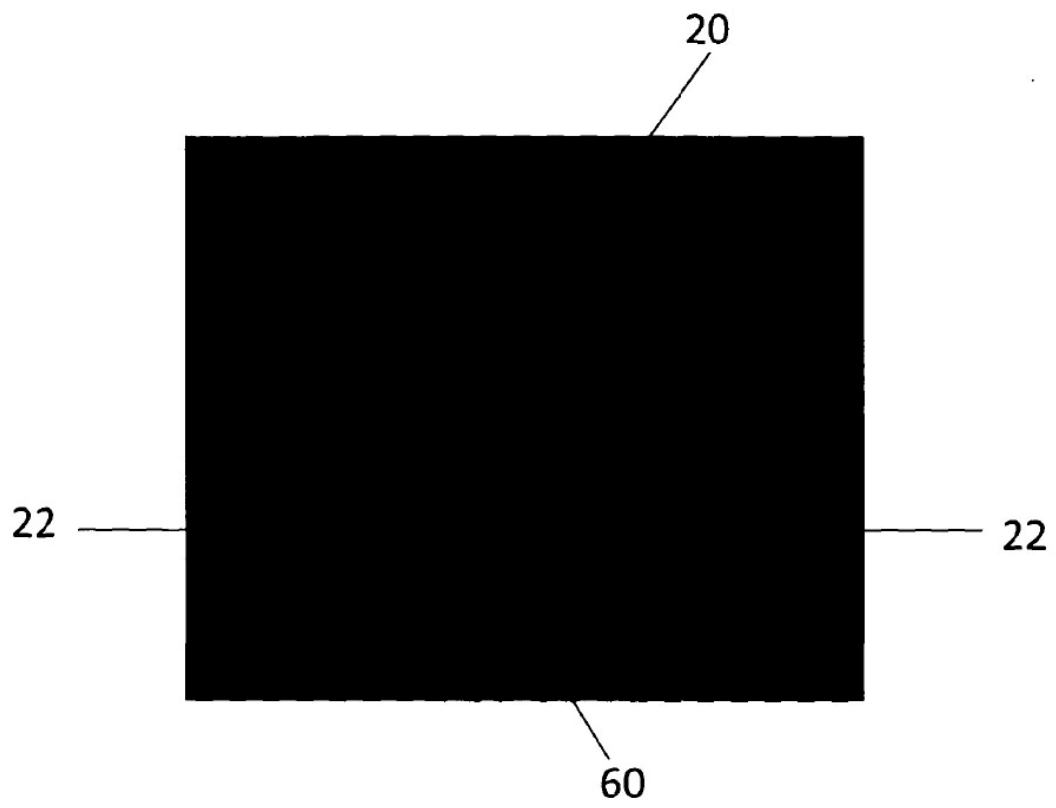


Figura 4

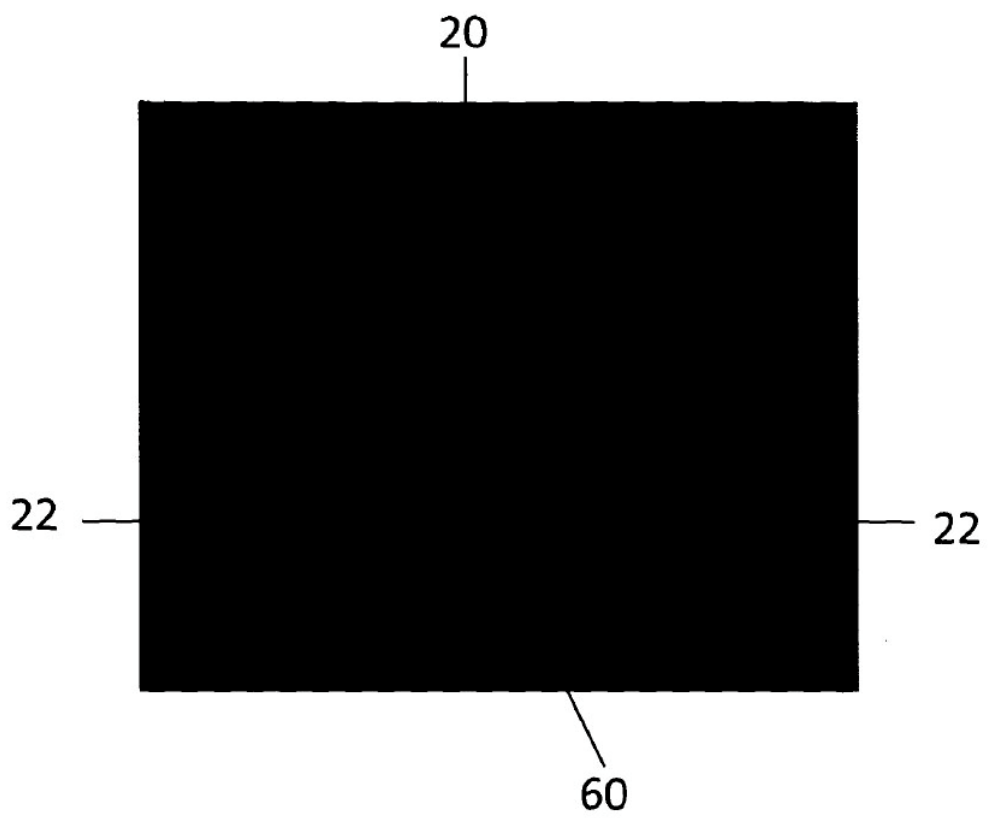


Figura 5

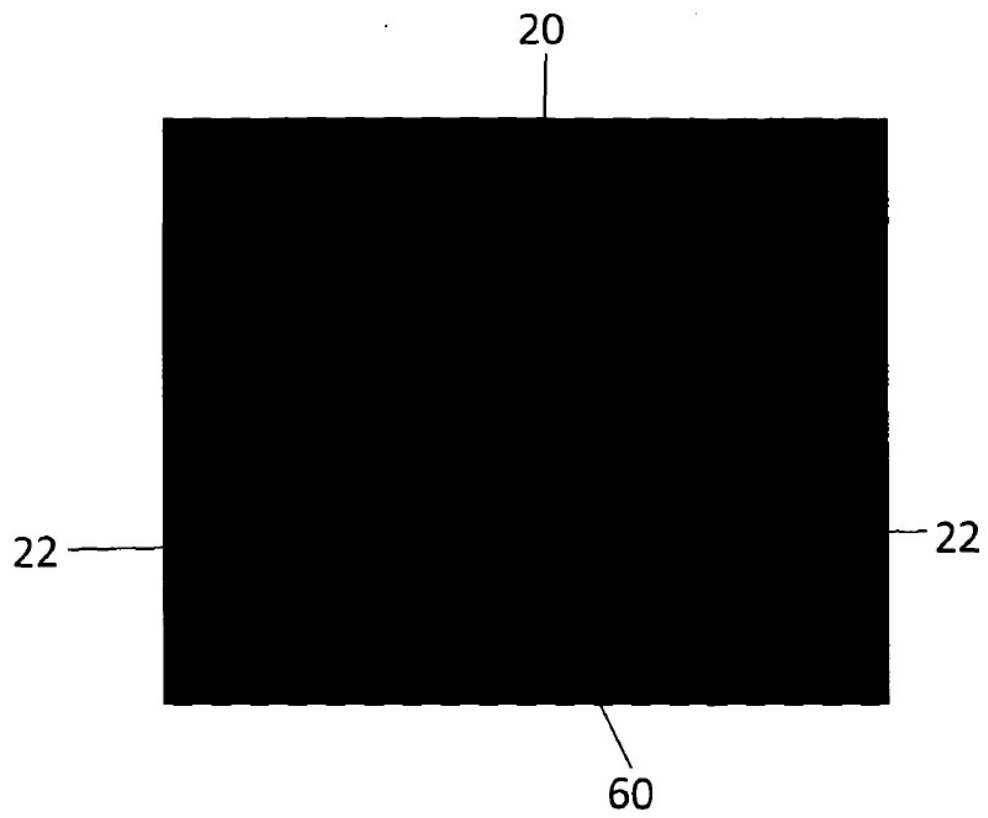


Figura 6

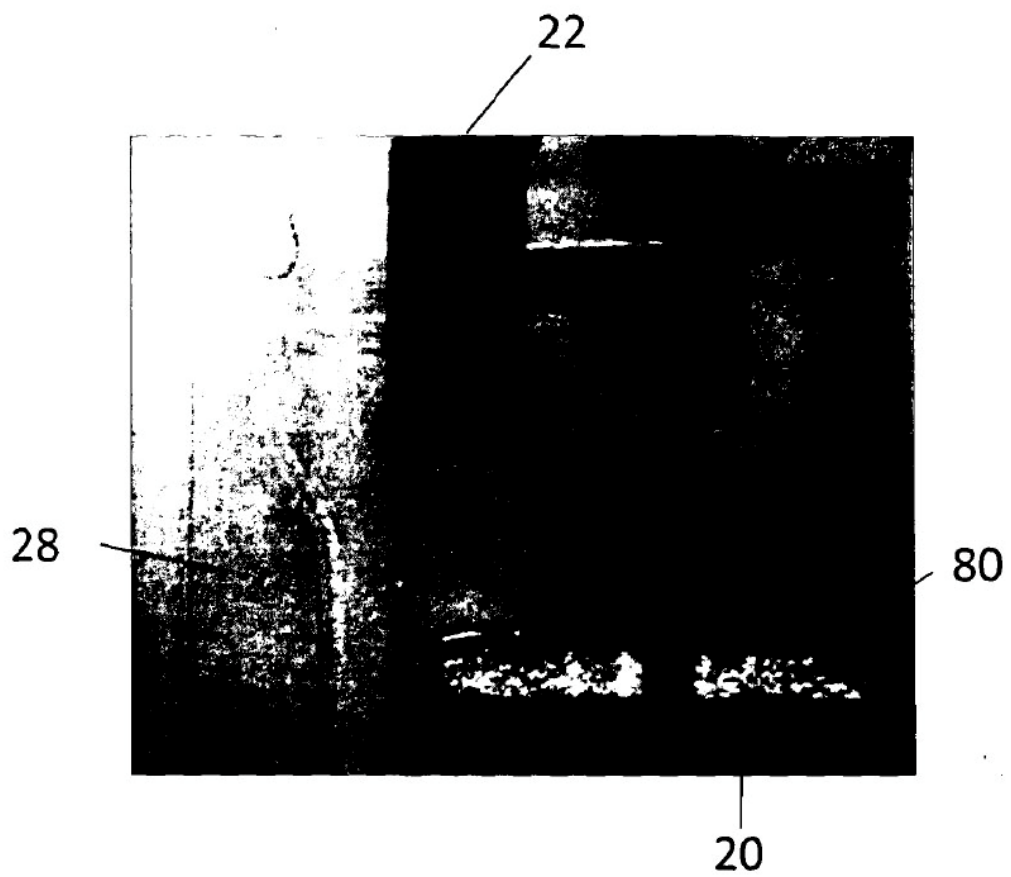


Figura 7

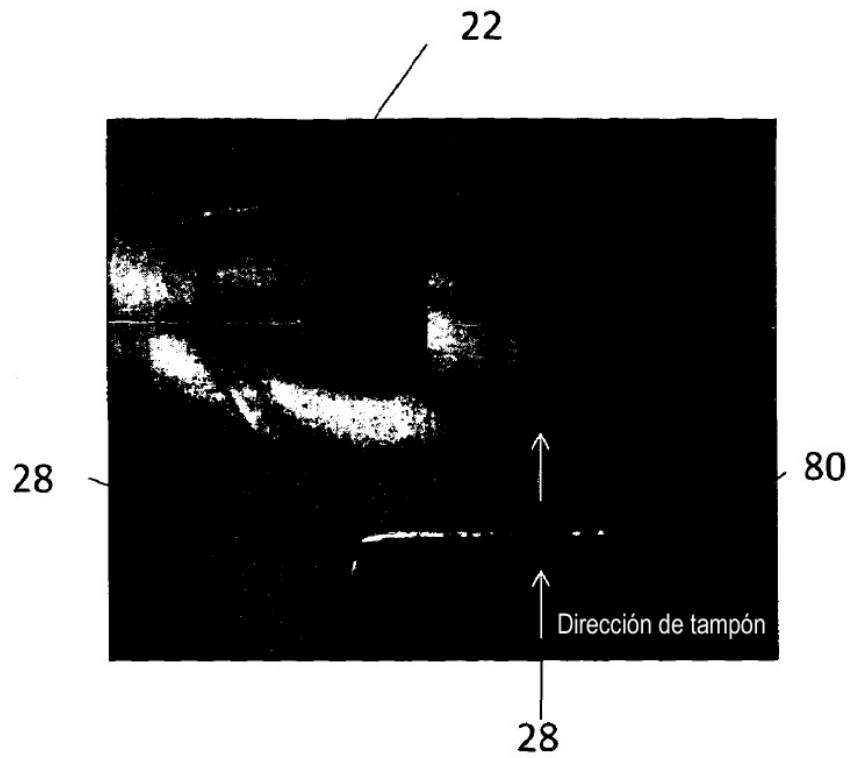


Figura 8

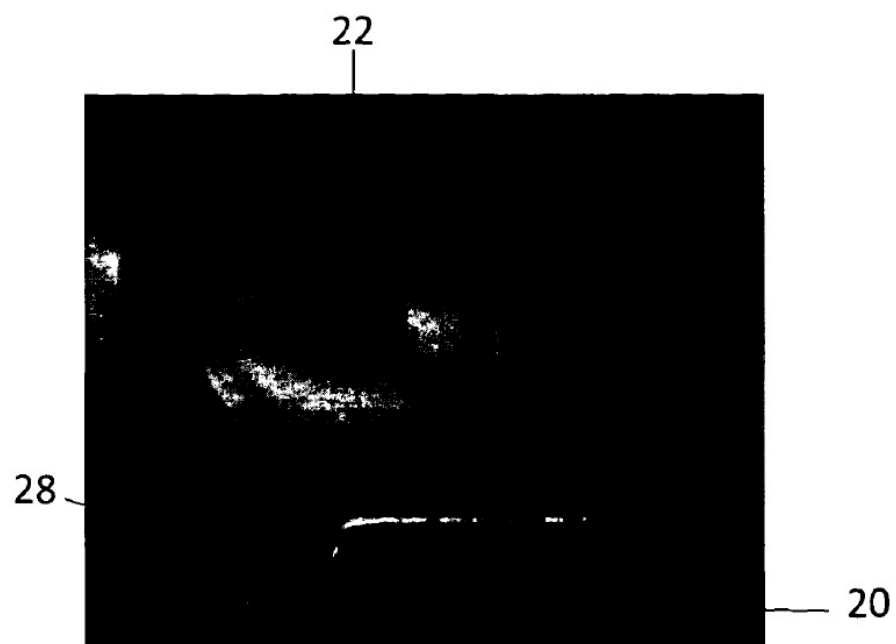


Figura 9

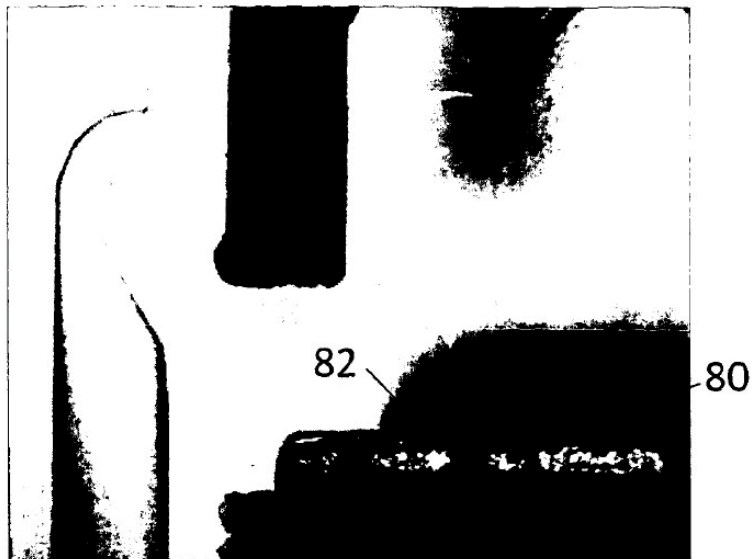


Figura 10

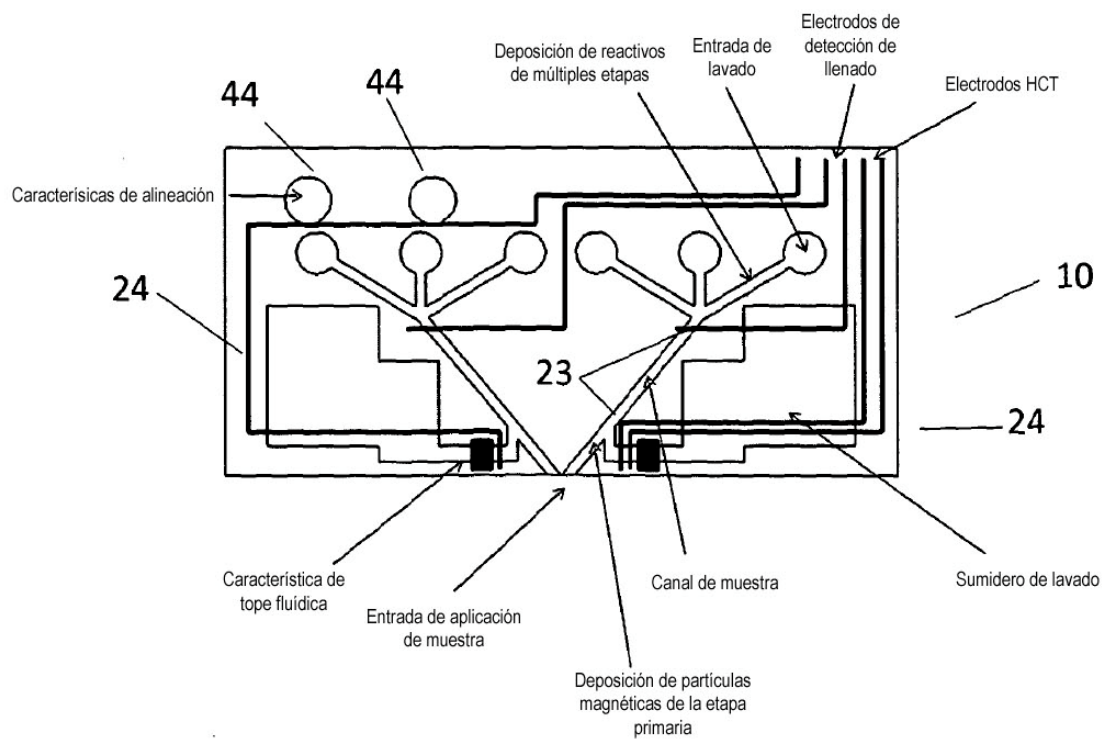


Figura 11

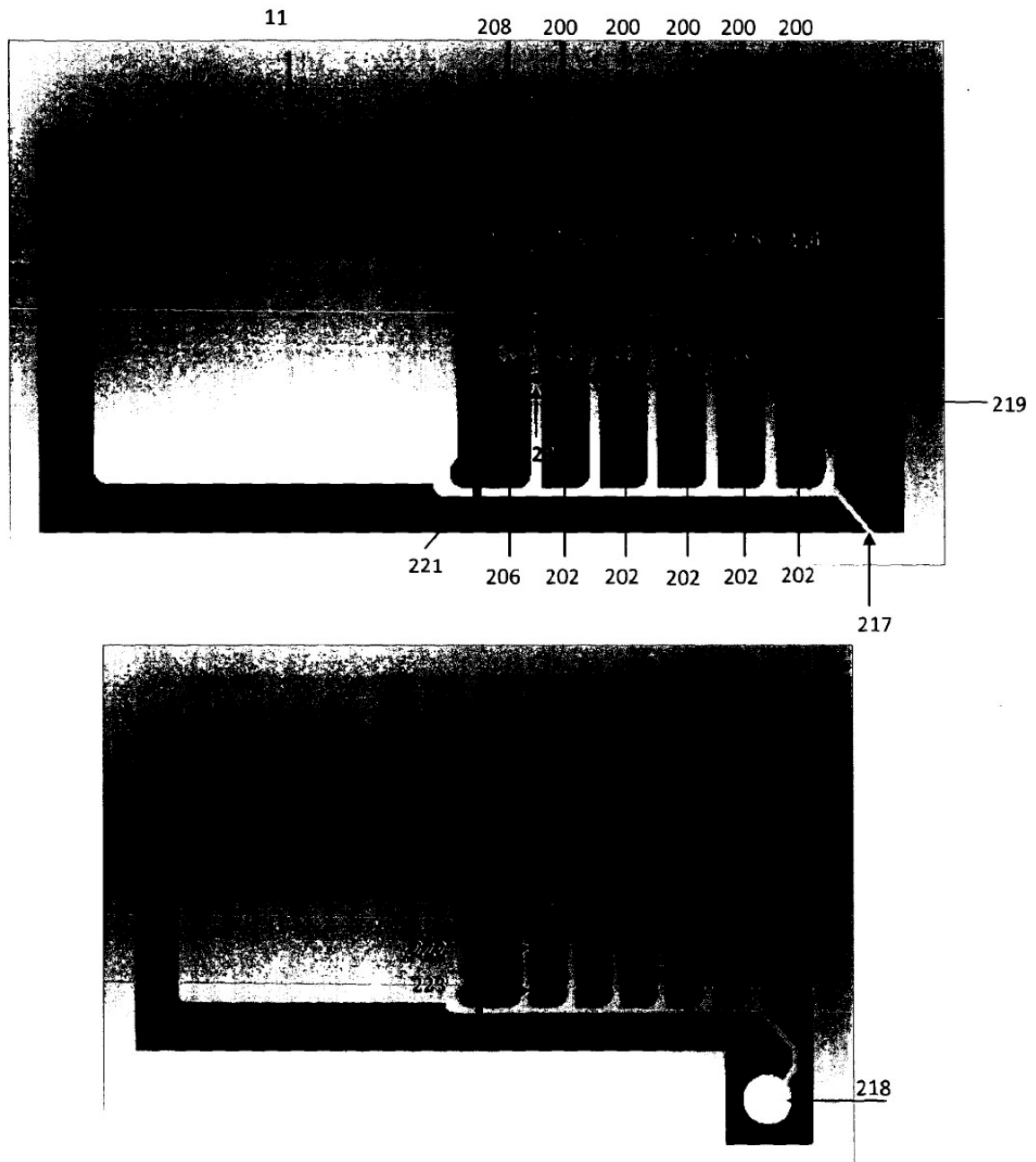


Figura 12

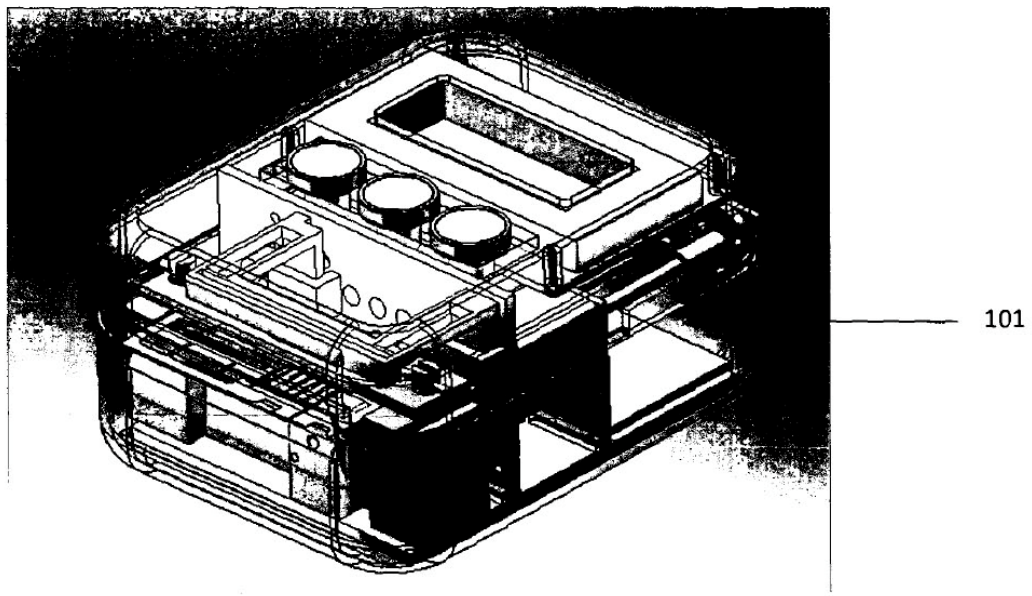
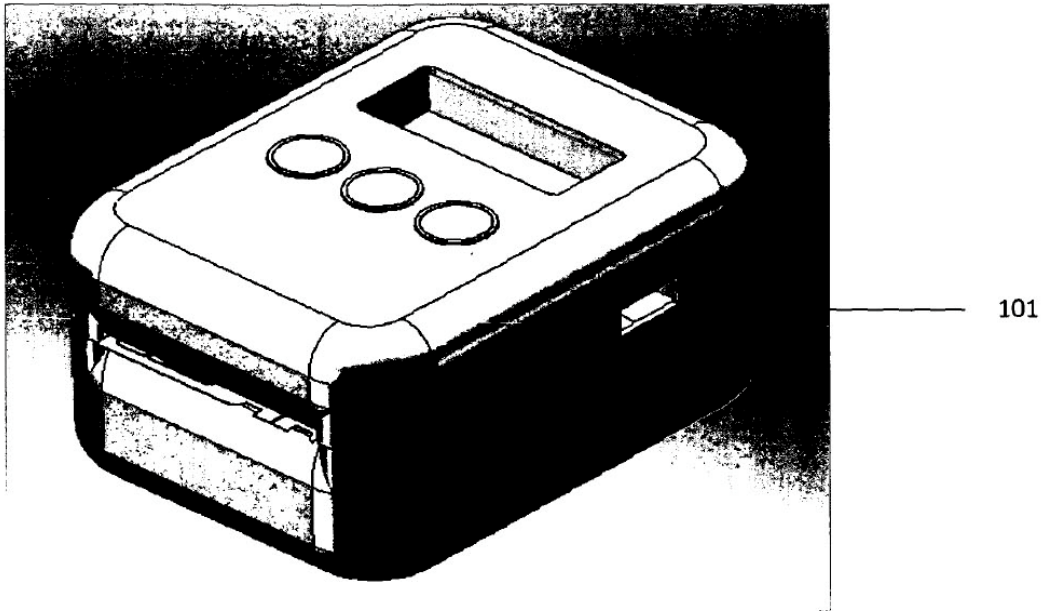


Figura 13

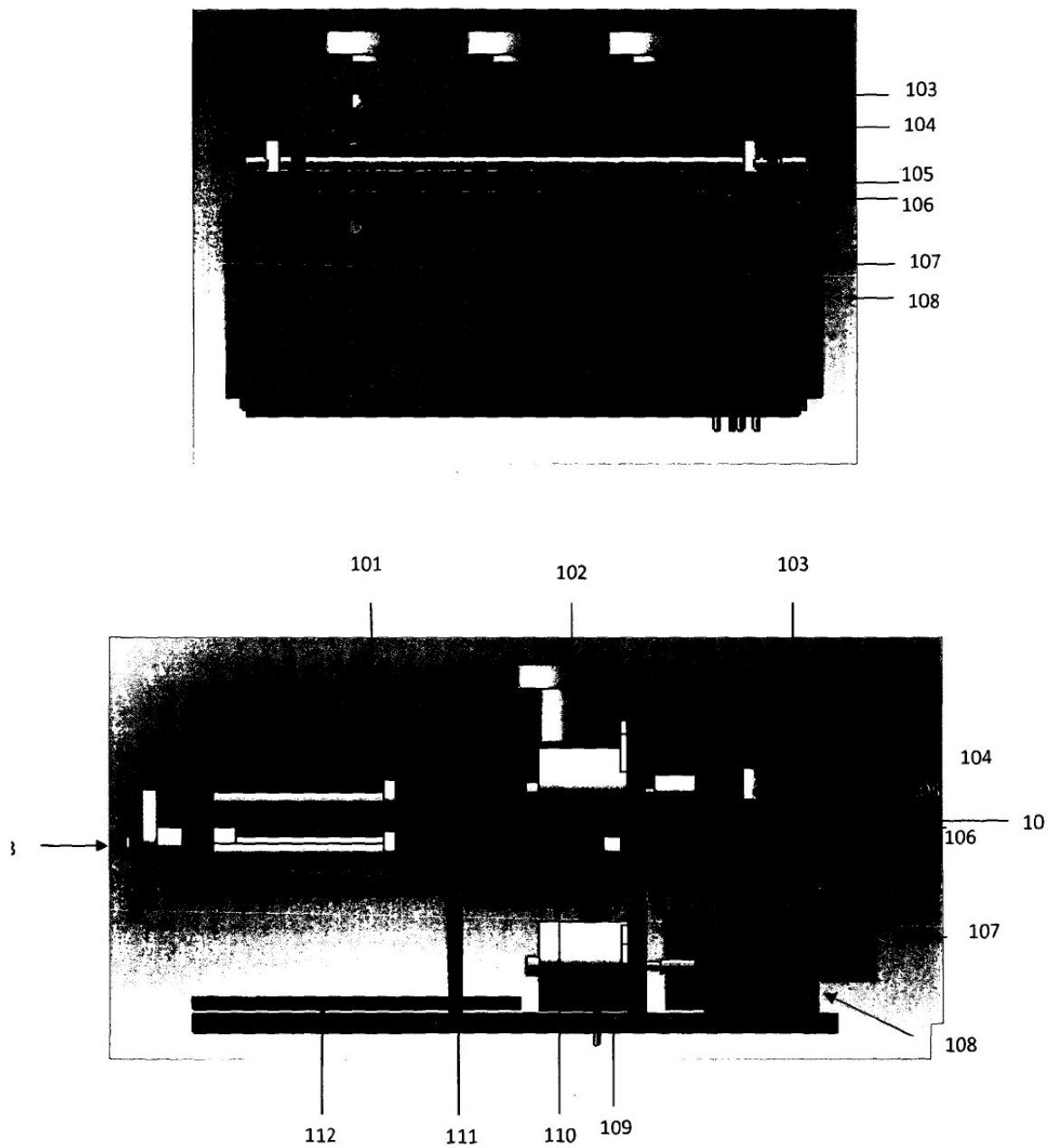


Figura 14

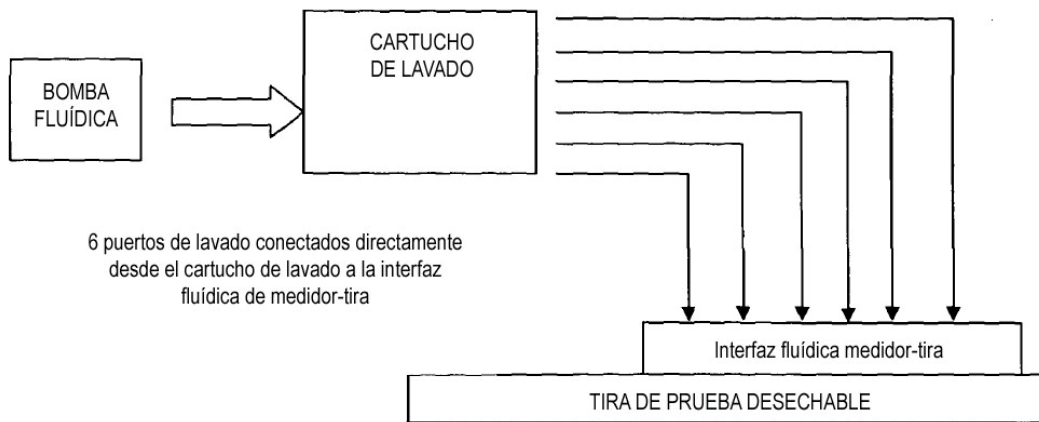
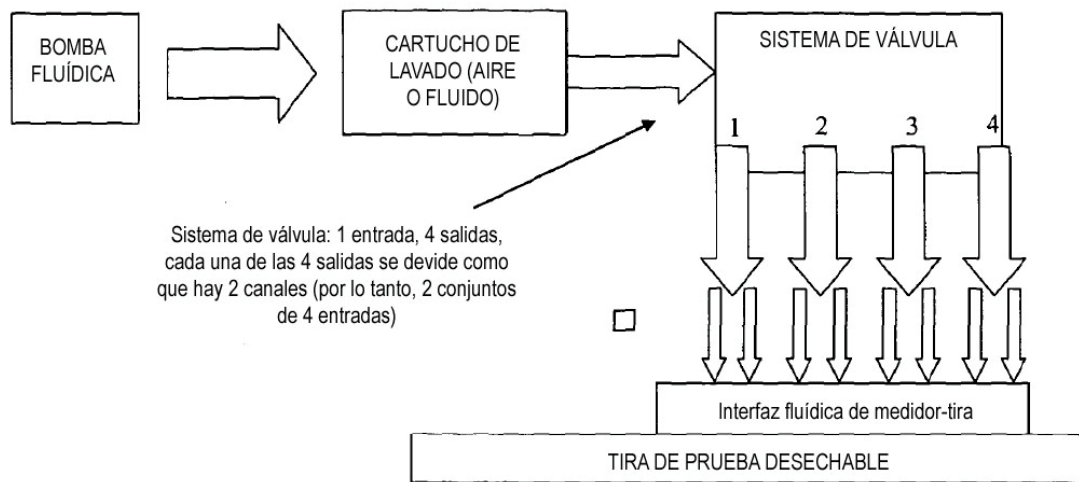
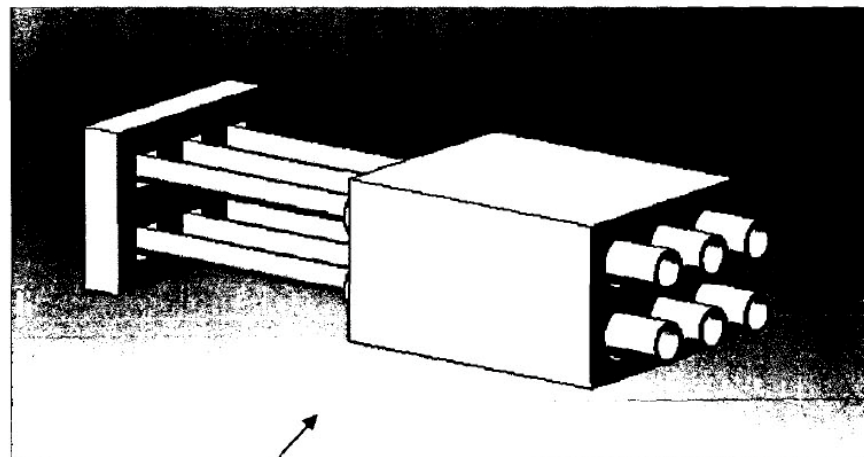
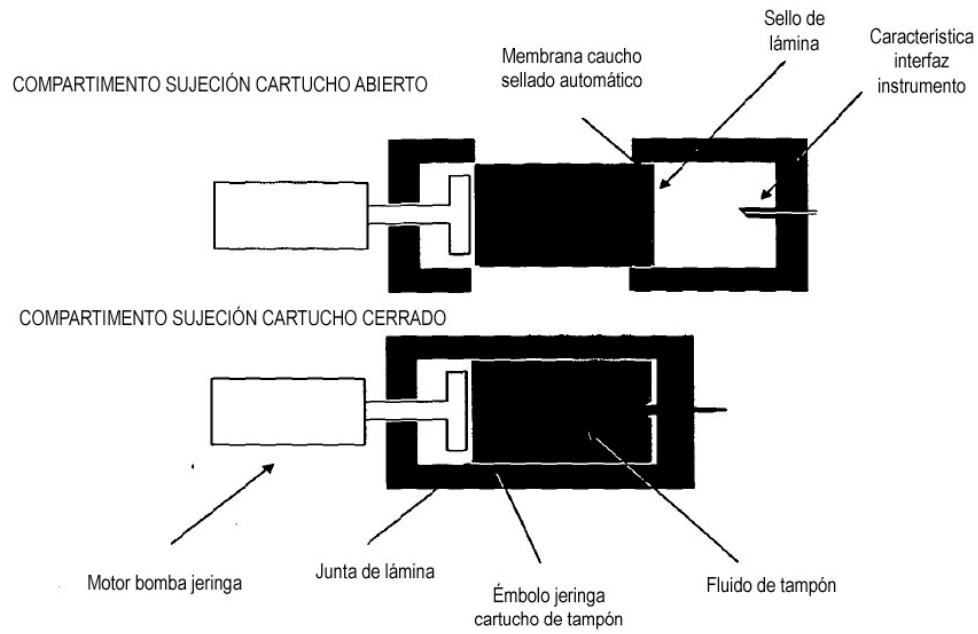


Figura 15



Cartucho de jeringa de 6 cámaras

Figura 16

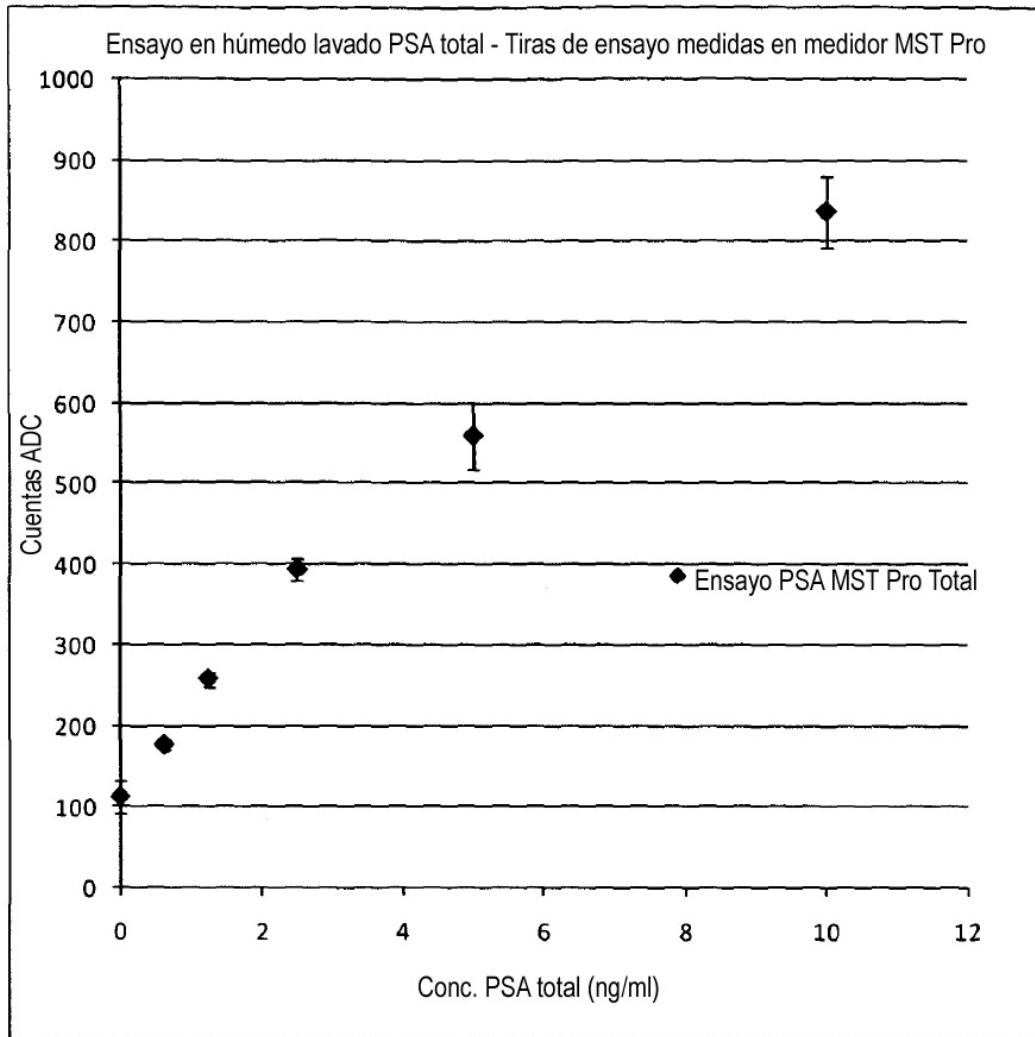


Figura 17

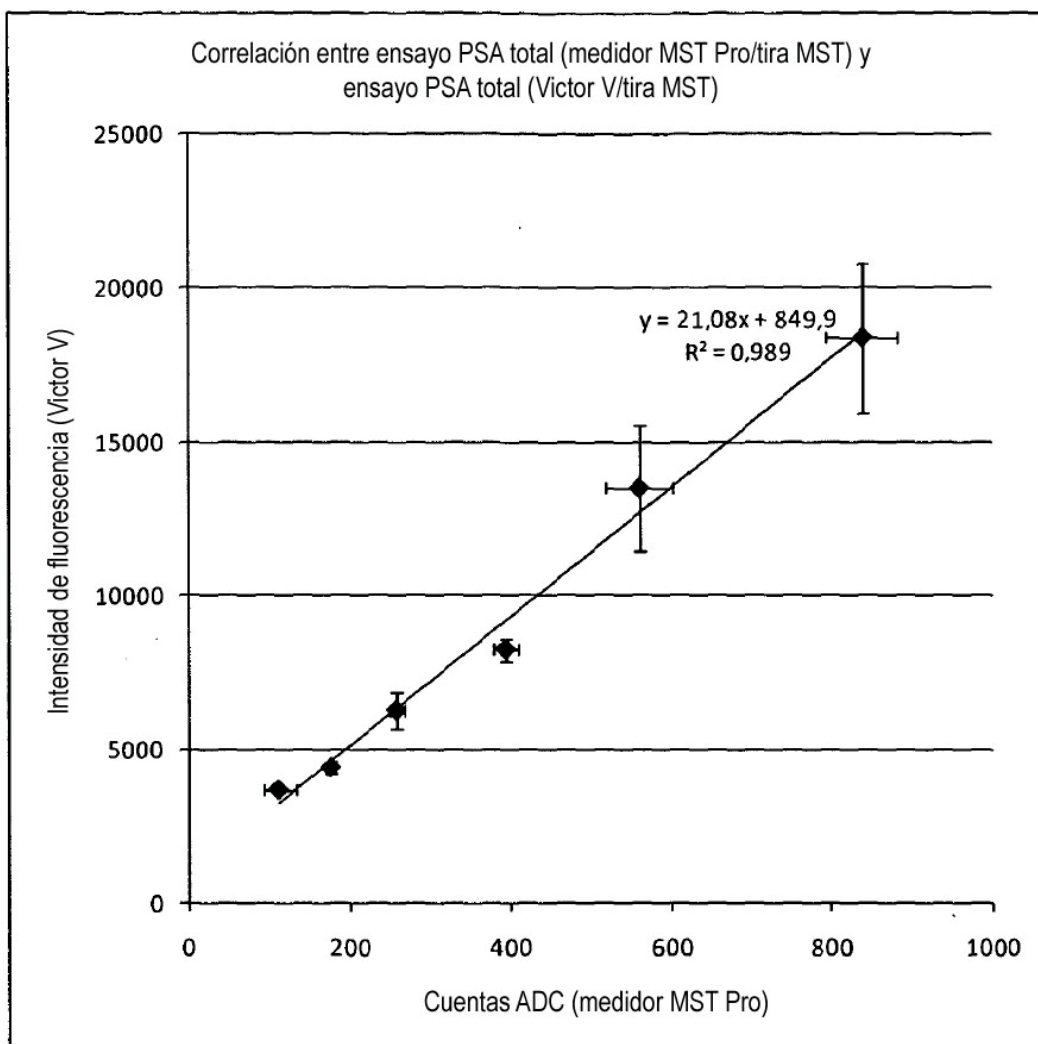


Figura 18

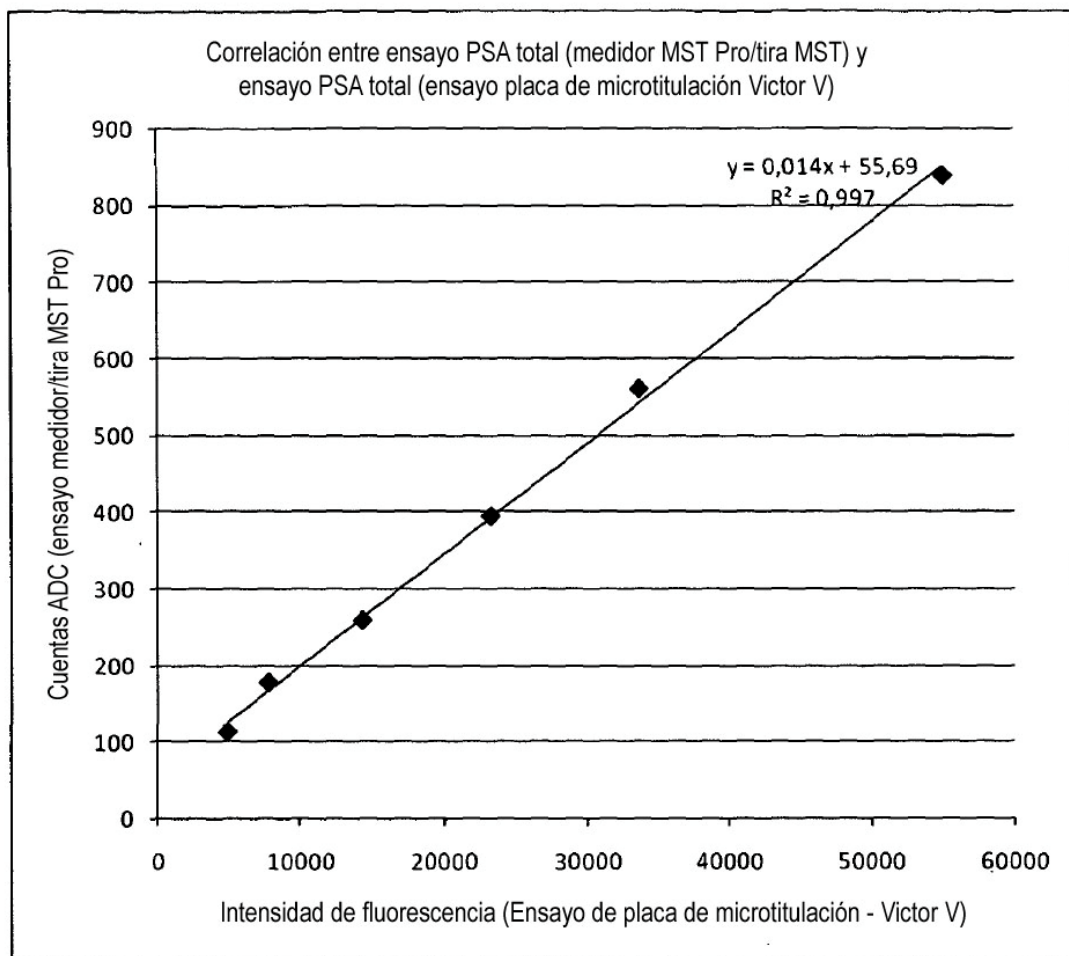


Figura 19

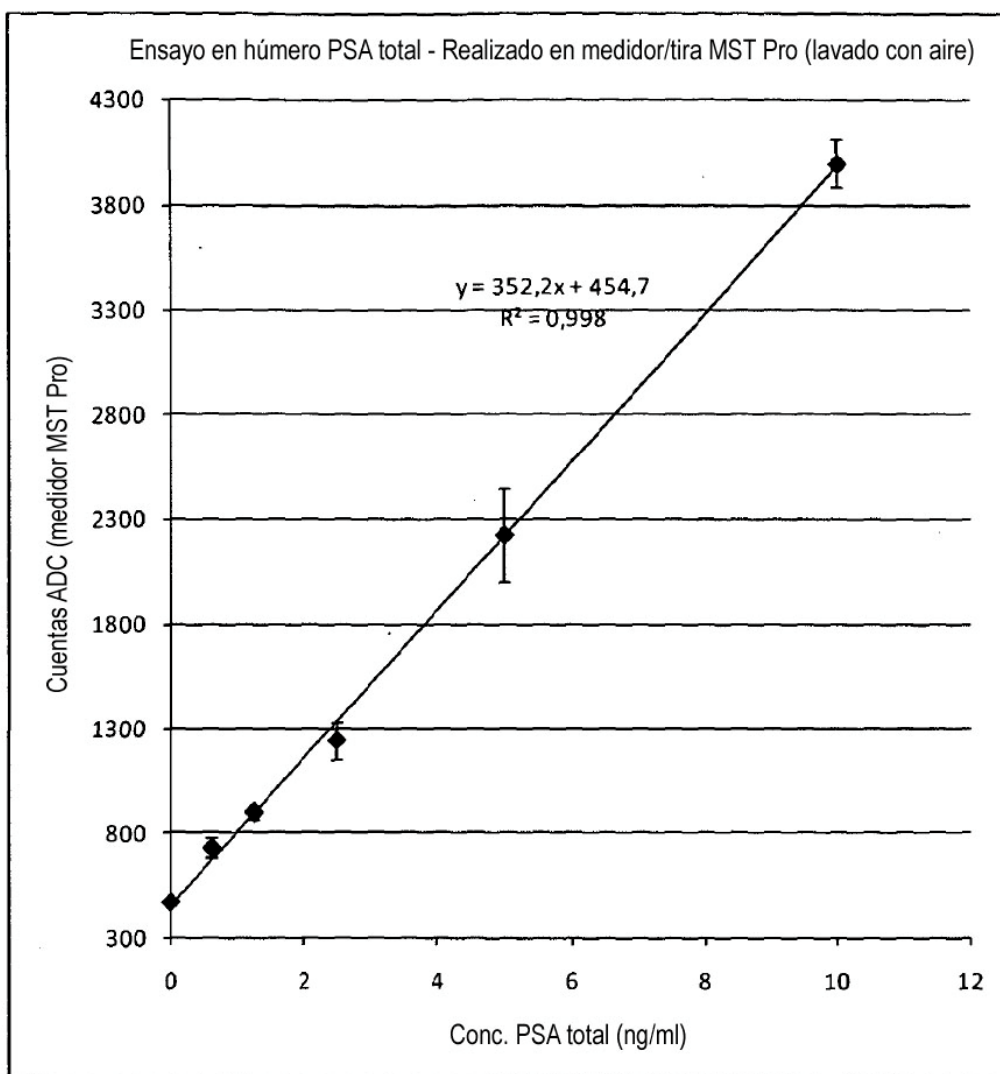


Figura 20

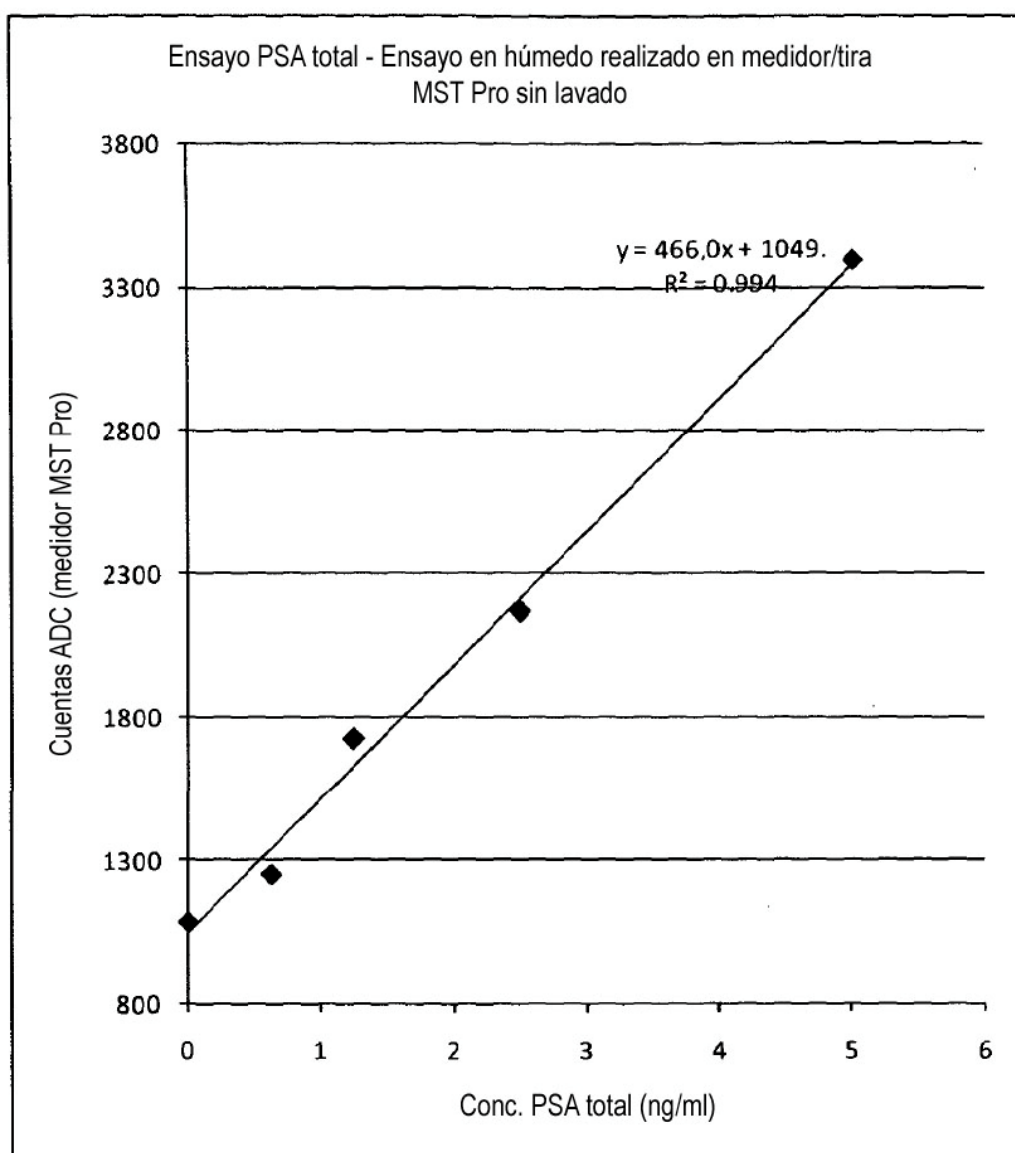


Figura 21

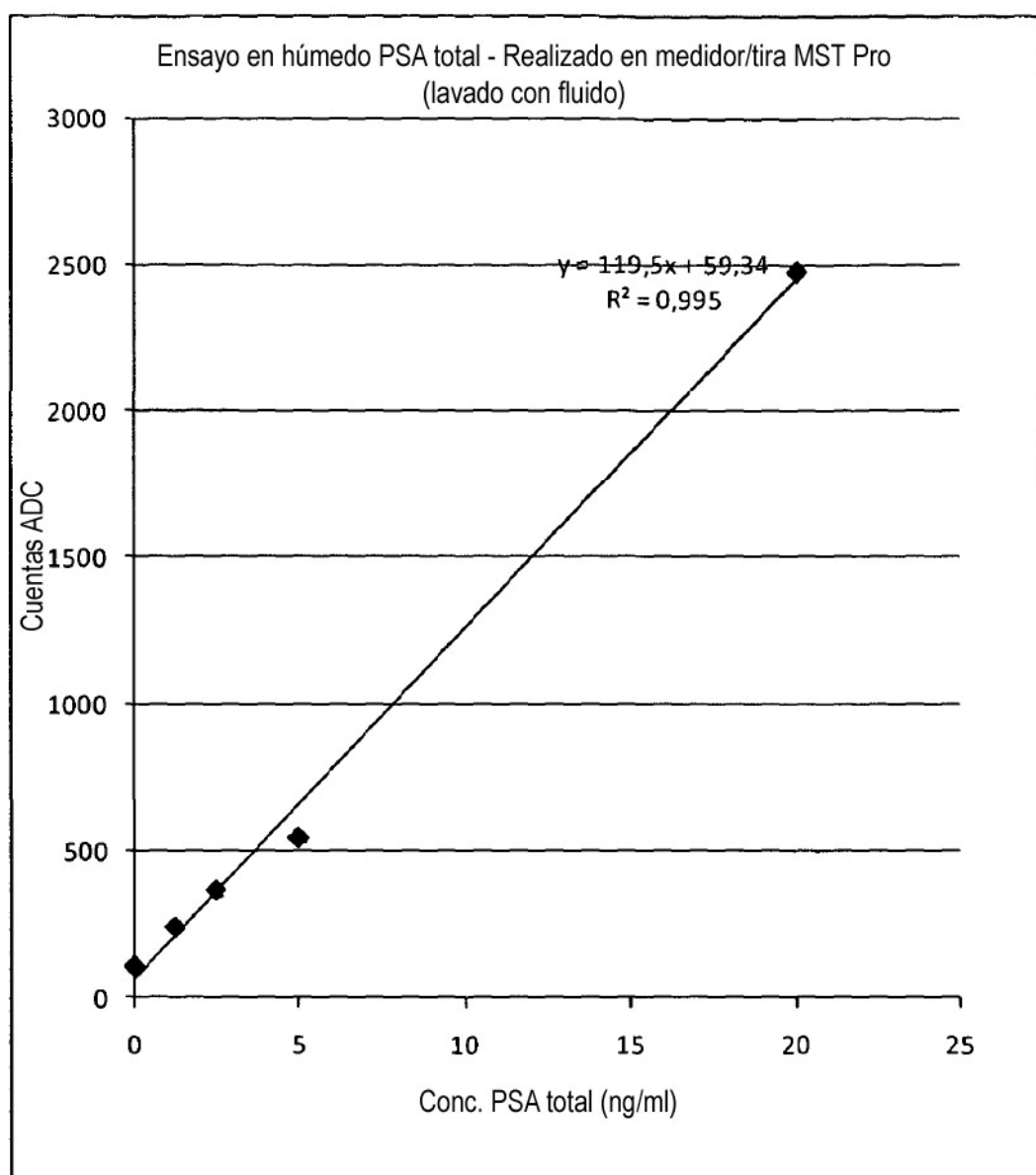


Figura 22

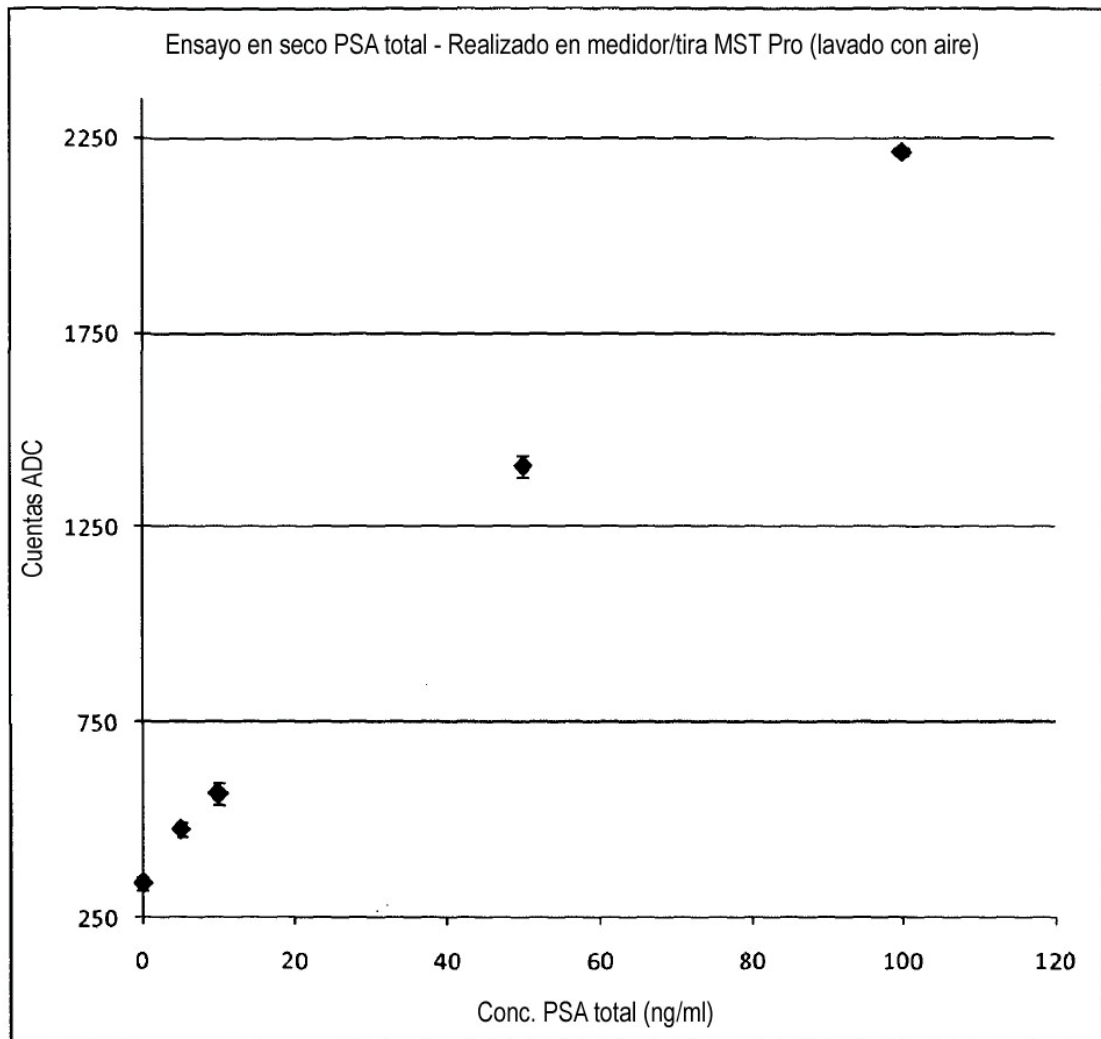


Figura 23

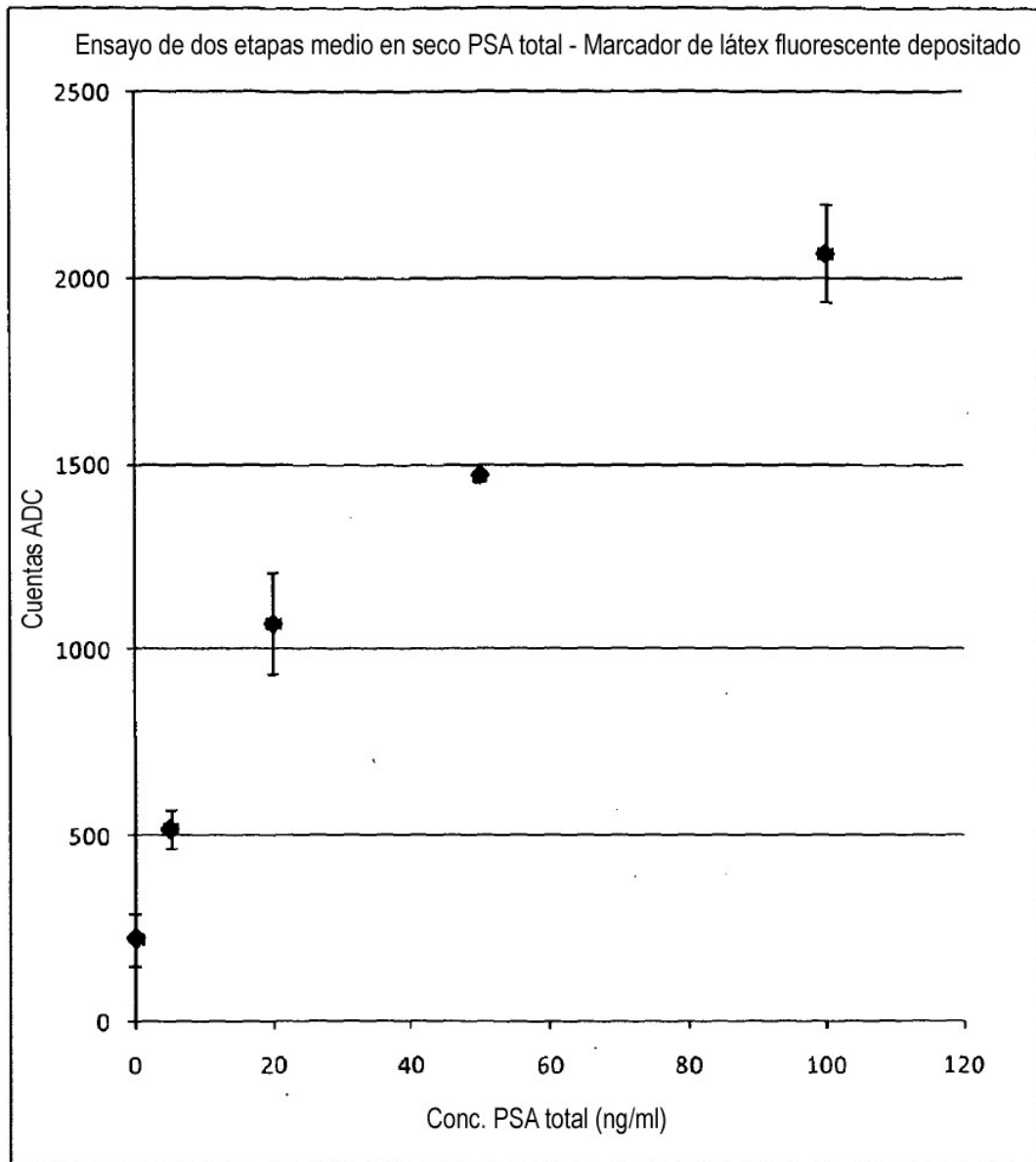


Figura 24

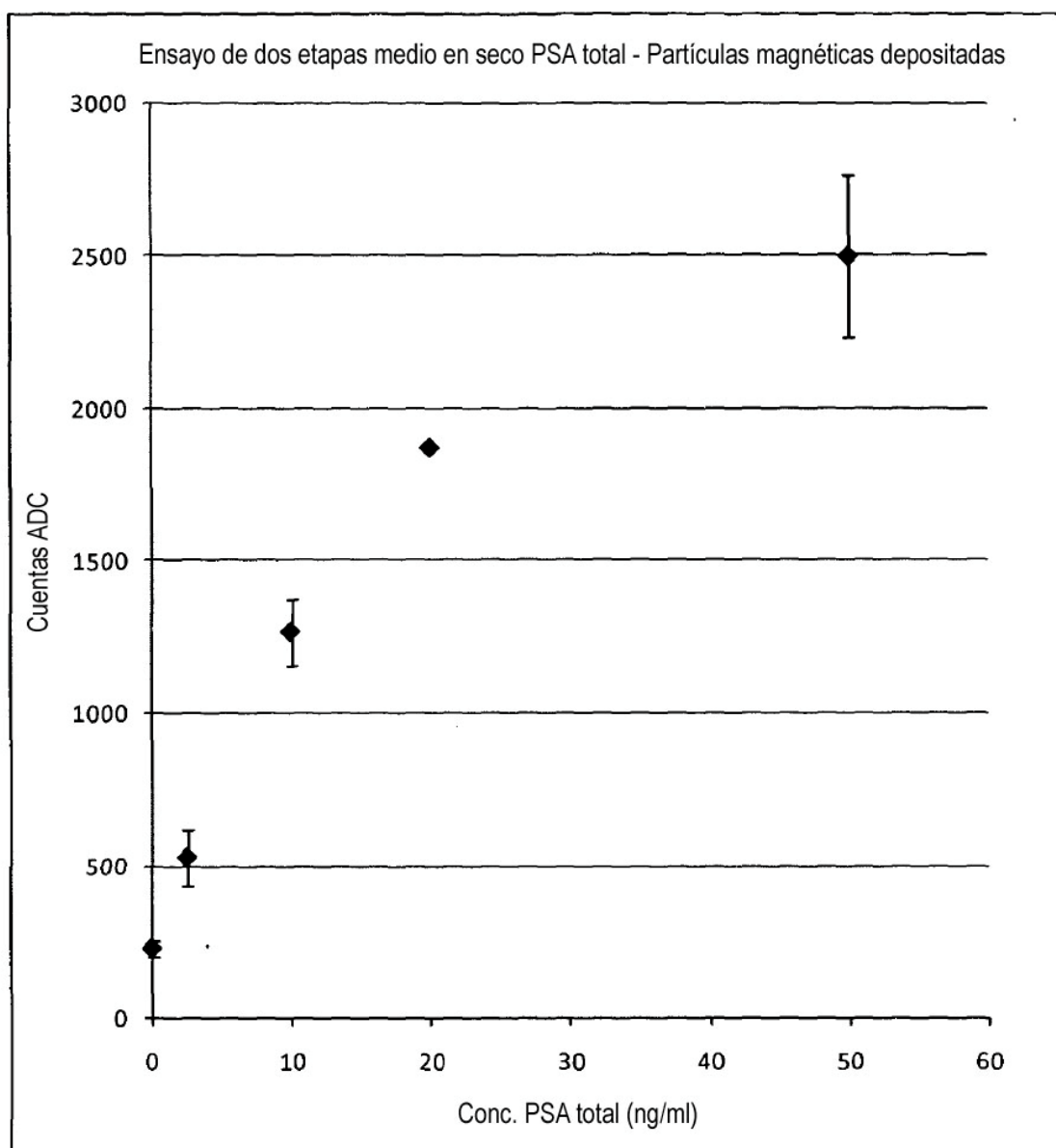


Figura 25

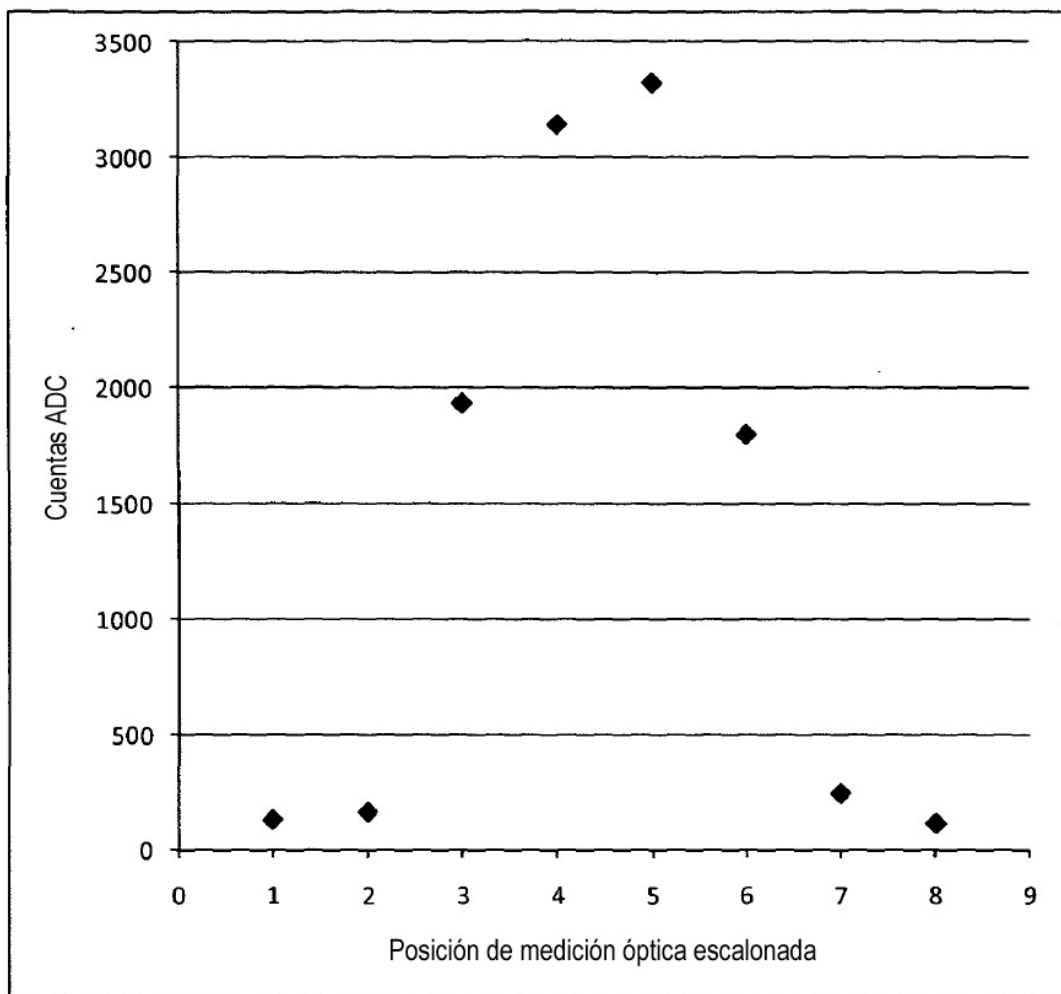


Figura 26

