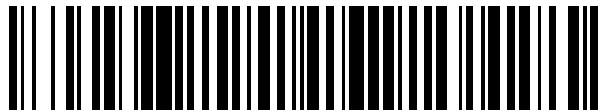


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 158**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2015 PCT/GB2015/052107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012778**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2015 E 15744286 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3172565**

54 Título: **Dispositivo de ensayo capilar con recubrimiento hidrófilo interno**

30 Prioridad:

**25.07.2014 GB 201413229**

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

**30.10.2019**

73 Titular/es:

**LOUGHBOROUGH UNIVERSITY (100.0%)  
Ashby Road, Loughborough  
Leicestershire LE11 3TU, GB**

72 Inventor/es:

**EDWARDS, ALEXANDER DANIEL y  
REIS, NUNO MIGUEL FERNANDES**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 729 158 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 capilar con recubrimiento hidrófilo interno

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a ensayos, procedimientos para realizar ensayos, kits de ensayo y procedimientos para fabricar kits de ensayo. La invención tiene relevancia para la tecnología de ensayos capilares (especialmente microcapilares).

**Técnica relacionada**

15 En las últimas décadas, se han desarrollado varias plataformas de ensayo de microfluidos incluyendo placas de micropocillos, microesferas, dispositivos microcapilares/microcanales y dispositivos de flujo lateral (tiras de ensayo).

20 Los microcapilares y los microcanales ofrecen altas relaciones superficie/volumen, distancias de difusión cortas y la posibilidad de operar ensayos de flujo continuo. Se pueden recubrir múltiples bandas a lo largo de la longitud de un microcapilar/microcanal mediante, por ejemplo, procedimientos fotolitográficos o de microjeringa que ofrecen la posibilidad de detección simultánea de un panel de analitos a partir de una sola muestra de alimento (Mastichiadis y col., 2002). También se pueden diseñar dispositivos de chip más sofisticados que tengan varios microcapilares o microcanales paralelos (Yacoub-George y col., 2007) que funcionan desde un único puerto de inyección. Las muestras pueden cargarse en los microcapilares/microcanales utilizando jeringas (Chin y col., 2011), electrocinética (Kawabata y col., 2008) o fuerzas centrífugas (Lee y col., 2009). En el caso de los dispositivos de flujo lateral, como las tiras de ensayo (hechas de fieltro) y los dispositivos de flujo lateral basados en papel, las muestras también se pueden recoger en el dispositivo mediante acción capilar (Gervais y Delamarche, 2009). Sin y col., (2011) presenta una revisión detallada de diferentes tipos de dispositivos de ensayo de microfluidicos actualmente en desarrollo.

30 Se puede realizar una amplia gama de ensayos en dispositivos microcapilares y microcanales, incluyendo ensayos directos y ensayos de aglutinación que se pueden usar, por ejemplo, para la determinación del grupo sanguíneo, la detección de patógenos o biomarcadores, así como inmunoensayos tales como los ensayos de captura. Los dispositivos microcapilares y microcanales se producen principalmente a partir de materiales de vidrio y plástico.

35 Los dispositivos de inmunoensayo que facilitan la interrogación de los capilares haciendo coincidir el índice de refracción del material a partir del cual se forma el dispositivo con el índice de refracción del fluido de muestra, y reduciendo así los efectos ópticos adversos, se describen en el documento WO2011/117579 y en Edwards y col. (2011). En estos dispositivos de inmunoensayo, una población de primeros miembros de un respectivo par unión específico se inmoviliza al menos en una porción de la superficie del orificio capilar. Por consiguiente, estos dispositivos de inmunoensayo no son adecuados para realizar ensayos que requieran la liberación de reactivos de ensayo, tales como anticuerpos, de la superficie del orificio capilar.

45 Además de la inmovilización, los reactivos de ensayo también pueden precargarse dentro de microcapilares y microcanales, utilizando, por ejemplo, reactivos líquidos en ampollas, bolsas de reactivos secos, etc. (Madou y col., 2001; van Oordt y col., 2013).

50 También se ha descrito el atrapamiento de reactivos de determinación del fenotipo inmune en una capa de gelatina seca intercalada entre dos portaobjetos de vidrio (Beck y col., 2001; Beck y col., 2012 - documento WO2011/143075A2). Sin embargo, esto no se ha aplicado a los microcapilares o microcanales. Además, el volumen de la capa de gelatina disponible después del recubrimiento de la superficie de microcapilares o microcanales sería extremadamente pequeño, lo que haría poco probable que una cantidad suficiente de reactivos de ensayo pudiera quedar atrapada en dicha capa de gelatina para realizar el ensayo. El documento WO2011/143075A2 deja claro, además, que la capa de gelatina se disuelve cuando se agrega una muestra de fluido. Por lo tanto, un dispositivo que comprende un recubrimiento de gelatina de este tipo solo se puede usar una vez. La incorporación de reactivos de ensayo en un hidrogel se menciona en Fujii y col. (2012), mientras que Uchiyama y col. (2012) describen el atrapamiento de sustratos fluorescentes dentro de un recubrimiento soluble basado en PEG en el interior de un microcanal. En Wakayama y col. (2012) se describe una red de hidrogel dentro de los microcapilares que contiene un sustrato fluorescente inmovilizado covalentemente y un segundo recubrimiento soluble que contiene un anticuerpo marcado con enzimas. Gervais y Delamarche (2009) describen microcanales de recubrimiento de un chip microfluidico para la realización de inmunoensayos de fluorescencia utilizando Pluronic® F108 para facilitar la retención de anticuerpos y la carga de muestras.

65 También se han descrito chips de flujo continuo hechos de material poroso tal como como el silicio o el vidrio funcionalizados con grupos químicos activos para permitir la inmovilización de anticuerpos en las paredes de los canales (documento US2008/020453), al igual que dispositivos ("platinas") hechos de vidrio con una serie de orificios pasantes, en los que las paredes interiores de los orificios pasantes pueden estar recubiertas de anticuerpos,

antígenos diana o con un recubrimiento hidrófilo (documento US2002/094533). El documento WO03/042697 describe, además, un dispositivo ("portador de ensayo") con orificios pasantes que pueden ser hidrófilos y estar recubiertos de anticuerpos.

5 El recubrimiento de esferas de fluorocarbono no poroso y la estabilización del recubrimiento mediante reticulación con glutaraldehído se describen en McCreath y col. (1997). También se ha descrito el recubrimiento de superficies de plástico (Carneiro-da-Cunha y col., 2010; Huang y col., 2011; y Lin y col., 2005). La modificación de la superficie de sustratos hidrófobos planos, incluyendo FEP, con alcohol polivinílico de alto peso molecular (PVA) se ha descrito en Kozlov y col. (2003) y en el documento US 7.179.506 B2. Sin embargo, los sustratos planos, como los descritos en Kozlov y col. (2003) y en el documento US 7.179.506 B2, no son adecuados para su uso como dispositivos de ensayo, tanto por su geometría plana como porque no hay ninguna indicación de cómo se pueden cargar los reactivos de ensayo en dicha superficie. Las técnicas de recubrimiento para sustratos planos descritas en Kozlov y col. (2003) y en el documento US 7.179.506 B2, tales como la inmersión en una solución de PVA, tampoco son adecuadas para el recubrimiento de capilares.

15

### Sumario de la invención

Los presentes inventores observan que hay una falta de dispositivos de ensayo microcapilares que permitan una manipulación sencilla de los fluidos, de manera similar a las tecnologías de flujo lateral basadas en membranas, que son capaces de absorber fluidos por acción capilar. La simplificación de la manipulación de fluidos no solo simplificaría el funcionamiento de los dispositivos de ensayo microcapilares, ya que normalmente se necesitan para estos fines equipos de manipulación de fluidos, tales como aspiradores o jeringas, sino que también reduciría el coste de dichos dispositivos.

25 Por consiguiente, los presentes inventores han ideado la presente invención con el fin de abordar esta desventaja.

Como se explicó anteriormente, los dispositivos de ensayo microcapilares normalmente requieren jeringas o aspiradores para la manipulación de los fluidos, tal como la absorción de fluidos en el microcapilar.

30 Los dispositivos de ensayo microcapilares están fabricados idealmente a partir de plásticos termoplásticos. Sin embargo, los materiales termoplásticos ópticamente transparentes, tales como los fluoropolímeros, que permiten la detección de reacciones a través de la pared microcapilar pueden ser altamente hidrófobos. Como resultado, los microcapilares o microcanales hechos de estos materiales requieren el uso de altas diferencias de presión para introducir líquidos de muestra acuosos en el microcapilar o microcanal.

35

Los presentes inventores han detectado que se pueden recubrir microcapilares de plástico muy largos con una capa hidrófila en la superficie interior del microcapilar sin afectar a las propiedades ópticas generales de la pared microcapilar (como ejemplo de inclusión de una capa hidrófila en la superficie interior de un orificio microcapilar). En particular, los presentes inventores advirtieron que tal capa hidrófila es eficaz para disminuir el ángulo de contacto de un fluido de muestra con la pared microcapilar y el aire, haciendo que la pared interior del capilar o canal sea lo suficientemente hidrófila para que un fluido de muestra pueda ser absorbido en el microcapilar por acción capilar. La posibilidad de recubrir la superficie interior de los microcapilares, en particular los microcapilares fabricados mediante extrusión por fusión, tales como los microcapilares de etileno propileno fluorado (FEP), es sorprendente, ya que la superficie de los orificios capilares es muy áspera, lo que significa que la carga superficial y las propiedades de los microcapilares de FEP no son las mismas que las de una lámina de FEP plana. Además, el recubrimiento de los microcapilares de fluoropolímero, tales como los microcapilares de FEP, con una capa hidrófila requiere que las soluciones se bombeen a través de los capilares; los capilares no pueden recubrirse simplemente mediante su inmersión en una solución, puesto que son muy hidrófobos y, por lo tanto, repelen los fluidos acuosos.

50 Además, los presentes inventores observaron que los reactivos de ensayo, tales como anticuerpos, enzimas, sustratos enzimáticos y colorantes, pueden retenerse de manera reversible en o sobre la misma capa hidrófila, de modo que cuando un extremo del microcapilar entra en contacto con un fluido de muestra, la muestra se eleva rápidamente en el capilar debido a las fuerzas capilares y el reactivo de ensayo retenido en la capa hidrófila se difunde en el fluido de muestra desde la capa hidrófila. Esto resulta particularmente valioso para los ensayos en los que se requiere mezclar la muestra con el reactivo de ensayo, incluyendo la determinación del grupo sanguíneo. Los presentes inventores también señalaron que cuando las propiedades ópticas y la geometría del microcapilar eran favorables para dirigir la interrogación óptica, se podían realizar ensayos cualitativos y cuantitativos en los microcapilares en un periodo de tiempo reducido, siendo el resultado detectable bien a simple vista o bien utilizando dispositivos de detección óptica simples, tales como sensores de imágenes digitales de dispositivos de carga acoplada (CCD) o de semiconductores complementarios de óxido metálico (CMOS).

60

Los inventores también observaron que la velocidad de elevación del líquido en el microcapilar se puede manipular controlando la forma y el diámetro interior del microcapilar y/o modificando las propiedades de humectación de la capa hidrófila. Las propiedades de humectación pueden modificarse seleccionando el tipo de polímero que se va a utilizar en el procedimiento de recubrimiento y tienen un impacto directo en el ángulo de contacto del fluido con la pared capilar. En situaciones en las que hay dos o más microcapilares, la muestra líquida se eleva simultáneamente

65

a través de todos los capilares, lo que permite realizar ensayos duplicados y/o ensayos diferentes en los microcapilares mediante la selección de reactivos de ensayo apropiados retenidos en la capa hidrófila de los capilares. Esto es relevante, por ejemplo, en la determinación del grupo sanguíneo, donde la aglutinación de los glóbulos rojos debe analizarse para detectar un panel de anticuerpos contra diferentes antígenos de grupos sanguíneos. Tal como se usa en el presente documento, los términos retención y retener incluyen, pero no se limitan a, adsorción y/o deposición de reactivos de ensayo en la capa hidrófila.

Por consiguiente, en un primer aspecto preferido de la invención, se proporciona un dispositivo de ensayo que comprende:

un cuerpo unitario con una superficie exterior, siendo el cuerpo unitario sustancialmente transparente a la luz visible y formado a partir de un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con luz de longitud de onda de 589 nm, y al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo unitario, en los que al menos una porción de la superficie de cada orificio capilar incluye una capa hidrófila para la retención de un reactivo de ensayo, y en el que la capa hidrófila también es sustancialmente transparente a la luz visible para permitir la interrogación óptica de los orificios capilares a través de la pared capilar.

Preferiblemente, al menos una porción de la superficie de cada orificio capilar está recubierta con una capa hidrófila para retener un reactivo de ensayo. Preferiblemente, un reactivo de ensayo se retiene al menos en una porción de la capa hidrófila o de la superficie recubierta con la capa hidrófila de uno o más orificios capilares del dispositivo de ensayo.

Como se mencionó anteriormente, los presentes inventores observaron que una capa hidrófila también resulta ventajosa para la retención de reactivos de ensayo. La retención es preferiblemente reversible en el sentido de que un reactivo de ensayo retenido en la capa hidrófila se libera cuando la capa hidrófila entra en contacto con un fluido de muestra. Esto permite que el reactivo de ensayo se difunda en el fluido de muestra, lo que permite la detección de una sustancia de interés presente en el fluido de muestra. Por ejemplo, cuando el fluido de muestra es sangre entera, un anticuerpo retenido en la capa hidrófila puede difundirse fuera de capa hidrófila y dentro de la muestra de sangre y provocar la aglutinación de los glóbulos rojos en la muestra de sangre donde los glóbulos rojos tienen el antígeno cognado del anticuerpo en su superficie.

Se señala aquí que la retención de un reactivo de ensayo por la capa hidrófila puede constituir un aspecto independiente de la presente invención. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo de ensayo que comprende:

un cuerpo unitario con una superficie exterior, siendo el cuerpo unitario sustancialmente transparente a la luz visible y formado a partir de un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con luz de longitud de onda de 589 nm, y al menos un orificio capilar que se extiende internamente a lo largo del cuerpo unitario, en el que al menos una porción de la superficie del orificio capilar incluye una capa hidrófila y, en el que un reactivo de ensayo se retiene al menos en una porción de la capa hidrófila del orificio capilar, y en el que la capa hidrófila también es sustancialmente transparente a la luz visible para permitir la interrogación óptica de los orificios capilares a través de la pared capilar.

Preferiblemente, al menos una porción de la superficie de cada orificio capilar está recubierta con una capa hidrófila para retener un reactivo de ensayo. Además de, o de manera alternativa a, uno o más reactivos de ensayo retenidos de manera reversible en la capa hidrófila, pueden retenerse de manera irreversible uno o más reactivos de ensayo en la capa hidrófila. Por ejemplo, los reactivos retenidos de manera irreversible pueden unirse covalentemente a la capa hidrófila. Esto permite, por ejemplo, que los inmunoensayos de captura se lleven a cabo usando el dispositivo de ensayo mediante la unión covalente de un anticuerpo de captura a la capa hidrófila y, opcionalmente, retener de manera reversible un anticuerpo de detección en la capa hidrófila. Por ejemplo, un reactivo de ensayo, tal como un anticuerpo, puede retenerse de manera irreversible en la capa hidrófila, tal como con el uso de reticulación, por ejemplo, utilizando glutaraldehído o mediante química de inmovilización covalente muy conocida por los expertos en la materia.

A menudo puede ser difícil interrogar de forma fiable los orificios capilares conocidos para su uso en técnicas de ensayo. Esto se debe principalmente a efectos ópticos adversos. Por ejemplo, cuando se visualiza un orificio capilar desde una dirección, la luz de la proximidad de los lados laterales del orificio tiende a estar sujeta a un mayor grado de refracción que la luz del centro del orificio.

La señal óptica que va a ser interrogada ópticamente se genera durante el ensayo y esto casi siempre tiene lugar en una solución/suspensión acuosa. La formación de un dispositivo de ensayo microcapilar a partir de un material con un índice de refracción próximo al del agua, es decir, un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm, tal como se ha indicado anteriormente,

permite evitar estos efectos ópticos adversos en la medida en que permiten una mejora significativa de la interrogación óptica del orificio capilar. Preferiblemente, el índice de refracción del material está dentro de más o menos 0,07, más preferiblemente 0,06, más preferiblemente 0,05, del índice de refracción del fluido de muestra cuando se mide a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm. Por ejemplo, en el caso de que el fluido de muestra sea acuoso, un límite inferior preferido para el índice de refracción del material del cuerpo del dispositivo es 1,28. Un límite superior preferido para el índice de refracción del material del cuerpo del dispositivo es 1,38. El índice de refracción se mide a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm. Más preferiblemente, el índice de refracción del material del cuerpo del dispositivo es sustancialmente idéntico al índice de refracción del fluido de muestra. Dicho dispositivo de ensayo se describe en el documento WO2011/117579 y en Edwards y col. (2011).

El índice de refracción del agua es 1,33 (cuando se mide a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm, correspondiente a la línea D amarilla del doblete de sodio). A modo de comparación, el índice de refracción de algunos otros materiales comúnmente utilizados en la fabricación de dispositivos de ensayo microcapilares en las mismas condiciones son: sílice fundida 1,46; poli (éter-uretano) 1,49; poli (metil metacrilato) 1,49; poli (alcohol vinílico) 1,50; polietileno 1,51; polietileno de baja densidad 1,51; tereftalato de polietileno 1,57-1,58; poliestireno 1,59; poli (cloruro de vinilo) 1,54.

Los presentes inventores también han descubierto que la capa hidrófila puede seleccionarse de modo que no cambie sustancialmente las propiedades ópticas generales de la pared capilar (por ejemplo, pared capilar recubierta con capa hidrófila) en comparación con, por ejemplo, una pared capilar no recubierta.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de realización de un ensayo para determinar la presencia de una sustancia de interés en un fluido de muestra utilizando un dispositivo de la presente invención, incluyendo el procedimiento los pasos de:

proporcionar un fluido de muestra en el/los orificio(s) capilar(es) del dispositivo, poniendo así el fluido de muestra en contacto con el/los reactivo(s) de ensayo retenido(s) en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con la capa hidrófila del/de los orificio(s) capilar(es); e  
interrogar ópticamente los orificios capilares a través de la pared capilar para determinar la presencia de la sustancia en el fluido de muestra. Proporcionar un fluido de muestra en el/los orificio(s) capilar(es) del dispositivo comprende preferiblemente poner un fluido de muestra en contacto con los orificios capilares del dispositivo y permitir la elevación del fluido de muestra en los orificios capilares por acción capilar. De manera alternativa, proporcionar un fluido de muestra en el/los orificio(s) capilar(es) del dispositivo comprende preferiblemente poner un fluido de muestra en contacto con los orificios capilares del dispositivo y permitir que el fluido de muestra llene los orificios capilares por gravedad. Preferiblemente, poner el reactivo de ensayo en contacto con una sustancia de interés provoca un cambio mensurable, y la presencia de la sustancia en el fluido de muestra se determina a partir del cambio medido. Cuando se permite que el fluido de muestra llene los orificios capilares por gravedad, se prefiere que la longitud del orificio capilar sea suficiente para mantener la mayor parte del orificio capilar lleno de fluido de muestra. Esto se puede lograr utilizando el equilibrio conocido de la carga de presión del líquido con fuerzas capilares.

El procedimiento puede ser un procedimiento para detectar la presencia de un microorganismo de interés en un fluido de muestra. Existen múltiples maneras de detectar la presencia de un microorganismo en un fluido de muestra. Por ejemplo, el reactivo de ensayo puede ser un sustrato para una enzima producida por el microorganismo de interés. En este caso, la reacción de la enzima con el sustrato puede provocar un cambio mensurable y la presencia de microorganismos en el fluido de muestra puede determinarse a partir del cambio medido. De manera alternativa, el reactivo de ensayo puede ser un sustrato metabolizado por el microorganismo de interés, por medio del cual el metabolismo del sustrato por el microorganismo puede dar lugar a un cambio mensurable y la presencia de microorganismos en el fluido de muestra puede determinarse a partir del cambio medido. En un ejemplo alternativo, el reactivo de ensayo puede ser una sustancia que inhibe o promueve el crecimiento del microorganismo de interés. En este caso, el aumento o la disminución del crecimiento, o la inhibición del crecimiento, del microorganismo de interés puede provocar un cambio mensurable y la presencia de un microorganismo en el fluido de muestra puede determinarse a partir del cambio medido. Como alternativa adicional, la unión del reactivo de ensayo al microorganismo de interés puede dar lugar a un cambio mensurable y la presencia del microorganismo en el fluido de muestra puede determinarse a partir del cambio medido. El microorganismo puede ser, por ejemplo, una bacteria o un hongo, tal como la levadura. Preferiblemente, el microorganismo es una bacteria.

De manera alternativa, el procedimiento puede ser un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de determinación de grupo sanguíneo utilizando un dispositivo de la presente invención, incluyendo el procedimiento los pasos de:

proporcionar una muestra de sangre en el/los orificio(s) capilar(es) del dispositivo; e  
interrogar ópticamente los orificios capilares para determinar si se ha producido aglutinación de glóbulos rojos en los orificios capilares;  
en el que la presencia de aglutinación en un orificio capilar indica que los glóbulos rojos tienen el antígeno, con el que los anticuerpos son capaces de unirse específicamente, en su superficie. Proporcionar una muestra de sangre en el/los orificio(s) capilar(es) comprende preferiblemente poner una muestra de sangre en contacto con los

orificios capilares del dispositivo y permitir que la sangre se eleve en los orificios capilares por acción capilar.

La interpretación fiable de los resultados es de suma importancia al determinar el grupo sanguíneo de un paciente debido a, por ejemplo, los peligros involucrados en una transfusión de sangre incompatible a un paciente. Además,

5 las pruebas de determinación de grupo sanguíneo deben ser rápidas y fáciles de usar para permitir la identificación del grupo sanguíneo de un paciente "in situ", lo que puede ser de vital importancia en situaciones de emergencia. La eficiencia de costes también es una cuestión importante. Los dispositivos de ensayo de la invención cumplen todos estos requisitos.

10 Preferiblemente, un fluido de muestra (por ejemplo, una solución acuosa o una suspensión acuosa, tal como sangre entera) que se eleva en los orificios capilares por acción capilar provoca la liberación del reactivo de ensayo retenido en la capa hidrófila. El reactivo de ensayo liberado se difunde preferiblemente en el fluido de muestra. La capa hidrófila es preferiblemente resistente a la disolución en presencia de un fluido de muestra; en otras palabras, un fluido de muestra que se eleva en los orificios capilares por acción capilar preferiblemente no provoca la disolución de la capa hidrófila.

15 Los presentes inventores también han detectado que puede ser difícil de lograr la fabricación a bajo coste de dispositivos de ensayo desechables, basados en capilares, tales como los dispositivos de determinación del grupo sanguíneo. En consecuencia, los inventores han ideado un procedimiento de fabricación que permite la producción fácil de dispositivos de ensayo capilares recubiertos previamente con una capa de polímero hidrófilo y opcionalmente también precargados con un reactivo de ensayo. Los inventores también han detectado que es posible recubrir, así como cargar, los primeros miembros de un par de unión específico en una longitud extensa de un cuerpo capilar (por ejemplo, 20 cm o más), y posteriormente cortar el cuerpo capilar a la longitud deseada para un dispositivo de ensayo. El cuerpo unitario del dispositivo puede ser un cuerpo extruido, preferiblemente un cuerpo extruido por fusión. El dispositivo puede ser un dispositivo desechable.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar un dispositivo de ensayo de la presente invención, incluyendo el procedimiento:

30 proporcionar un cuerpo extruido que tiene al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo, siendo el cuerpo sustancialmente transparente a la luz visible y formado a partir de un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda 589 nm; insertar un fluido de recubrimiento en los orificios capilares para recubrir al menos una porción de la superficie de cada orificio capilar con una capa hidrófila a fin de retener los reactivos de ensayo, en el que la capa hidrófila también es sustancialmente transparente a la luz visible; y formar un cuerpo extruido recubierto.

Preferiblemente, el procedimiento comprende además el paso de

40 insertar un fluido de carga respectivo en uno o más orificios capilares del cuerpo extruido recubierto, comprendiendo cada fluido de carga un reactivo de ensayo, para retener el/los reactivo(s) de ensayo al menos en una porción de la superficie recubierta con la capa hidrófila del/los orificio(s) capilar(es), y formar un cuerpo extruido recubierto y cargado.

45 Los presentes inventores han detectado que el uso de un fluido de carga con alta viscosidad aumenta la retención del reactivo de ensayo en la capa hidrófila al formar una capa de película fina en la pared. El fluido de carga puede tener una viscosidad de al menos 1,3 mPa·s, al menos 1,5 mPa·s, al menos 1,7 mPa·s, al menos 2 mPa·s, al menos 4 mPa·s, al menos 6 mPa·s, al menos 8 mPa·s, al menos 10 mPa·s, al menos 20 mPa·s, al menos 30 mPa·s, al menos 40 mPa·s, al menos 50 mPa·s, o al menos 60 mPa·s cuando se mide a 20 °C. Preferiblemente, el fluido de carga tiene una viscosidad de al menos 60 mPa·s cuando se mide a 20 °C. Más preferiblemente, el fluido de carga tiene una viscosidad de al menos 60 mPa·s cuando se mide a 20 °C. Los procedimientos para medir la viscosidad son muy conocidos en la técnica y están disponibles para el experto. Por ejemplo, el fluido de carga puede comprender al menos 10 % v/v, al menos 20 % v/v, al menos 30 % v/v, al menos 40 % v/v, al menos 50 % v/v, al menos 60 % v/v, al menos 70 % v/v, o al menos 80 % v/v de glicerol. Preferiblemente, la solución de carga comprende al menos 50 % v/v de glicerol. Más preferiblemente, la solución de carga comprende al menos 80 % v/v de glicerol. La viscosidad de una solución de glicerol al 50 % v/v es de 6,00 mPa·s cuando se mide a 20 °C, mientras que la viscosidad de una solución de glicerol al 80 % v/v es de 60,1 mPa·s cuando se mide a 20 °C.

60 El paso de insertar el fluido de carga se puede lograr mediante la inyección del fluido de carga en el capilar o la succión del gas desde el capilar a fin de extraer el fluido de carga en el capilar. En una realización, el capilar se llena sustancialmente a lo largo de su longitud con fluido de carga antes de eliminar el exceso de fluido de carga del orificio capilar. En estas realizaciones, el fluido de carga puede formar un cartucho de fluido de carga que llena el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, o prácticamente todo el volumen del orificio capilar. En una realización alternativa, solo una parte del orificio capilar se llena con fluido de carga antes de eliminar el exceso de fluido de carga del orificio capilar. En estas realizaciones, puede extraerse un cartucho de fluido de carga a lo largo del orificio capilar a cargando el reactivo de ensayo sobre el dispositivo. En estas realizaciones, el fluido de carga puede formar un cartucho de fluido

de carga que llena menos del 50 %, del 40 % o menos, del 30 % o menos, del 20 % o menos, del 10 % o menos, o del 5 % o menos del volumen del orificio capilar. Ambos procedimientos pueden depositar eficazmente reactivos de ensayo en los dispositivos de ensayo de la presente invención. El procedimiento preferiblemente incluye, además, el paso de eliminar el exceso de fluido de carga. El paso de eliminar el exceso de fluido de carga se puede lograr mediante la inyección del gas en el capilar o la aspiración del fluido de carga desde el capilar. Se puede inyectar gas inerte en el orificio capilar después de eliminar el exceso de fluido de carga (o como parte de la eliminación del exceso de fluido de carga). Dicha inyección de gas puede secar el interior del orificio capilar sobre el cual está depositado el reactivo de ensayo.

5  
10 Preferiblemente, el procedimiento incluye además el paso de cortar el cuerpo extruido recubierto, o recubierto y cargado, para formar el dispositivo de ensayo de una longitud requerida, en el que el cuerpo extruido recubierto, o recubierto y cargado, antes del corte, tiene opcionalmente una longitud de al menos 20 cm.

15 De manera alternativa, el procedimiento puede ser un procedimiento para fabricar un conjunto de n dispositivos, incluyendo además el procedimiento cortar el cuerpo extruido recubierto, o recubierto y cargado, para formar el conjunto de n dispositivos, teniendo cada dispositivo una longitud de al menos X, en el que el cuerpo extruido cargado, antes del corte, tiene una longitud de al menos nX, o una longitud de al menos 20 cm.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un sistema de ensayo para llevar a cabo ensayos, teniendo el sistema al menos un dispositivo de ensayo de acuerdo con la presente invención, y un soporte para sostener la pluralidad de dispositivos de ensayo. El soporte proporciona preferiblemente medios de observación para permitir observar al menos una parte del dispositivo de ensayo.

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit de ensayo que incluye un cuerpo unitario extruido que tiene al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo, siendo el cuerpo unitario sustancialmente transparente a la luz visible y formado a partir de un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm, y teniendo además el cuerpo unitario una longitud de al menos 20 cm, en el que al menos una porción de la superficie de cada orificio capilar está recubierta con una capa hidrófila para retener un reactivo de ensayo, pudiendo cortarse el cuerpo unitario extruido a una longitud requerida para el ensayo. Preferiblemente, un reactivo de ensayo se retiene al menos en una porción de la capa hidrófila o de la superficie recubierta con la capa hidrófila de cada orificio capilar.

El kit puede proporcionarse en forma de bobina del cuerpo unitario extruido recubierto, o recubierto y cargado.

35 A continuación, se exponen características preferidas (o al menos opcionales) adicionales. A menos que el contexto exija lo contrario, estas pueden combinarse individualmente o en cualquier combinación con cualquier aspecto de la invención. De manera similar, cualquier aspecto de la invención se puede combinar con cualquier otro aspecto de la invención.

40 Preferiblemente, durante el uso, el ángulo de contacto ( $\theta$ ) del fluido de muestra presente en los orificios capilares con la capa hidrófila y el aire es inferior a 90 grados, más preferiblemente inferior o igual a 85 grados, inferior o igual a 80 grados, inferior o igual a 75 grados, inferior que igual a 70 grados, o inferior o igual a 65 grados. Más preferiblemente, el ángulo de contacto ( $\theta$ ) del fluido de muestra con la capa hidrófila y el aire es inferior o igual a 65 grados. El fluido de muestra puede ser una solución acuosa o una suspensión acuosa, tal como sangre entera.

45 Cuando los orificios capilares son circulares, el ángulo de contacto ( $\theta$ ) se mide preferiblemente poniendo un extremo de un orificio capilar en contacto con un fluido de muestra (por ejemplo, una solución acuosa o una suspensión acuosa, tal como sangre entera) y midiendo la altura máxima ( $h$ ) que alcanza el fluido de muestra en el orificio capilar y calculando el ángulo de contacto ( $\theta$ ) mediante el uso de la ecuación de (Young-Laplace)

$$50 \quad h = 4\gamma \cos(\theta) / \rho g d,$$

en la que  $\gamma$  es la tensión superficial del fluido,  $\rho$  es la densidad del fluido en  $g/cm^3$ ,  $g$  es la aceleración gravitatoria y  $d$  es el diámetro capilar interior promedio. La densidad del fluido se mide preferiblemente a 20 °C.

55 Cuando los orificios capilares no son circulares (por ejemplo, elípticos u ovalados), el ángulo de contacto ( $\theta$ ) se mide poniendo un extremo de un orificio capilar en contacto con un fluido de muestra (por ejemplo, una solución acuosa o una suspensión acuosa, tal como sangre entera) y midiendo la altura máxima ( $h$ ) que alcanza el líquido de la muestra en el orificio capilar y calculando el ángulo de contacto ( $\theta$ ) mediante el uso de la ecuación

$$60 \quad h = (2\gamma \cos(\theta) / \rho g) * (1/a + 1/b)$$

en la que  $\gamma$  es la tensión superficial del fluido,  $\rho$  es la densidad del fluido en  $g/cm^3$ ,  $g$  es la aceleración gravitatoria,  $a$  través del eje menor (diámetro conjugado) del capilar y  $b$  es el eje mayor (diámetro transversal) del capilar. La densidad

del fluido se mide preferiblemente a 20 °C.

De manera alternativa, el ángulo de contacto ( $\theta$ ) puede medirse bombeando el fluido de muestra (por ejemplo, sangre entera) a través de un orificio capilar a una velocidad de flujo superficial constante promedio y tomando una instantánea del frente de aire líquido con un microscopio u otro equipo de formación de imágenes y el ángulo de humectación,  $\theta_1$  se determina a partir de la tangente del menisco en el punto de contacto del líquido con la pared capilar. Como alternativa adicional, todo el menisco puede ajustarse con un semicírculo y, en este caso,  $\theta_1$  se puede determinar utilizando reglas de trigonometría. Luego se repite el procedimiento para hacer un receso en el flujo, y se determina  $\theta_2$ . El ángulo de humectación "dinámico" en los capilares es propenso a la histéresis; por lo que el ángulo de contacto  $\theta$  se toma como el valor promedio de  $\theta_1$  y  $\theta_2$ .

Preferiblemente, el espesor de la capa hidrófila es tal que no altera sustancialmente las propiedades ópticas generales, incluyendo el índice de refracción, de la pared capilar. La capa hidrófila puede tener un espesor inferior o igual a 20  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, el espesor de la capa hidrófila es inferior o igual a 15  $\mu\text{m}$ , inferior o igual a 10  $\mu\text{m}$ , inferior o igual a 5  $\mu\text{m}$ , inferior o igual a 4  $\mu\text{m}$ , inferior o igual a 3  $\mu\text{m}$ , inferior o igual a 2  $\mu\text{m}$ , inferior o igual a 1  $\mu\text{m}$ , inferior o igual a 900 nm, inferior o igual a 800 nm, inferior o igual a 700 nm, inferior o igual a 600 nm, inferior o igual a 500 nm, inferior o igual a 400 nm, inferior o igual a 300 nm, inferior o igual a 200 nm, o inferior o igual a 100 nm. Más preferiblemente, el espesor de la capa hidrófila es inferior o igual a 500 nm, o inferior o igual a 300 nm, más preferiblemente inferior o igual a 300 nm. Además, o de manera alternativa, el espesor de la capa hidrófila es preferiblemente al menos 10 nm, al menos 20 nm, al menos 30 nm, al menos 40 nm, al menos 50 nm, al menos 60 nm, al menos 70 nm, al menos 80 nm, al menos 90 nm, o al menos 100 nm. El espesor puede referirse al espesor promedio, o a la media, del espesor de la capa hidrófila.

La capa hidrófila puede ser porosa, preferiblemente microporosa.

Preferiblemente, la capa hidrófila comprende, o consiste en, un polímero tal como un polímero hidrosoluble. La capa hidrófila puede comprender, o consistir en, alcohol polivinílico (PVA), preferiblemente alcohol polivinílico (PVA) reticulado; un derivado de celulosa, tal como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o carboximetilcelulosa; colágeno; polilisina (poli-D-lisina, poli-L-lisina, o una combinación de las mismas); gelatina; PVA y dextrina; PVA y dextrano; PVA y gelatina; quitosano reticulado; o alginato y calcio, y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la capa hidrófila comprende, o consiste en, PVA reticulado, gelatina, HPMC, PVA y dextrina o PVA y dextrano. Más preferiblemente, la capa hidrófila comprende, o consiste en, PVA reticulado. Más preferiblemente, la capa hidrófila comprende, o consiste en, PVA de bajo peso molecular reticulado. Las capas hidrófilas, tales como las capas hidrófilas que comprenden, o que consisten en, PVA o quitosano, se pueden reticular utilizando glutaraldehído, por ejemplo.

El PVA puede ser un PVA de bajo peso molecular. Por ejemplo, el PVA puede tener un peso molecular de al menos 10.000 g/mol, al menos 11.000 g/mol, al menos 12.000 g/mol, o al menos 13.000 g/mol. Preferiblemente, el PVA tiene un peso molecular de al menos 13.000 g/mol. Además, o de manera alternativa, el PVA puede tener un peso molecular de hasta 25.000 g/mol, hasta 24.000 g/mol o hasta 23.000 g/mol. Preferiblemente, el PVA tiene un peso molecular de hasta 23.000 g/mol. El peso molecular de PVA en este contexto se refiere al peso molecular de PVA antes de cualquier reticulación.

De manera alternativa, el PVA puede ser un PVA de alto peso molecular. El PVA puede tener un peso molecular de al menos 100.000 g/mol, al menos 110.000 g/mol, al menos 120.000 g/mol, al menos 130.000 g/mol o al menos 140.000 g/mol. Preferiblemente, el PVA tiene un peso molecular de al menos 140.000 g/mol. Además, o de manera alternativa, el PVA puede tener un peso molecular de hasta 210.000 g/mol, hasta 200.000 g/mol o hasta 190.000 g/mol. Preferiblemente, el PVA tiene un peso molecular de hasta 190.000 g/mol. De nuevo, el peso molecular del PVA en este contexto se refiere al peso molecular del PVA antes de cualquier reticulación.

Preferiblemente, la superficie del orificio capilar recubierto con la capa hidrófila está recubierta de manera sustancialmente homogénea, o sustancialmente uniforme, con la capa hidrófila. En otras palabras, la capa hidrófila se distribuye preferiblemente de manera sustancialmente homogénea, o sustancialmente uniforme, sobre la porción del orificio capilar recubierto con la capa hidrófila. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que un recubrimiento sustancialmente homogéneo o uniforme mejora la absorción de los fluidos de muestra por el capilar mediante acción capilar. Un recubrimiento sustancialmente homogéneo, o sustancialmente uniforme, puede referirse a una capa hidrófila continua o discontinua. Preferiblemente, la capa hidrófila es continua.

De manera alternativa, la capa hidrófila comprende, o consiste en, un tensioactivo. Los ejemplos de tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, éteres de polietilenglicol, ácido oleico, sulfonatos de alquilo, succinatos de alquilo y óxido de polietileno.

La capa hidrófila es adecuada para retener un reactivo de ensayo. La "retención" o "retener", tal como se menciona en el presente documento, es preferiblemente reversible. Preferiblemente, la retención de un reactivo de ensayo por la capa hidrófila se revierte cuando la capa hidrófila se pone en contacto con un fluido de muestra, por ejemplo, una solución acuosa, o una suspensión acuosa, tal como sangre entera. Durante el uso, un reactivo de ensayo retenido por la capa hidrófila se pone a disposición de un fluido de muestra presente en el orificio capilar. Por lo tanto, cuando



un reactivo de ensayo se retiene al menos en una porción de la capa hidrófila o de la superficie recubierta con una capa hidrófila de cada orificio capilar, dicho reactivo de ensayo se pone a disposición de un fluido de muestra presente en el orificio capilar. Cuando la capa hidrófila comprende un polímero, un reactivo de ensayo puede, por ejemplo, ser retenido por la capa hidrófila a través de atrapamiento dentro de las cadenas de polímero y liberarse por difusión cuando entra en contacto con un fluido de muestra.

Como se mencionó anteriormente, la capa hidrófila puede estar reticulada. La reticulación puede aumentar la hidrofiliidad de la capa hidrófila, aumentando así la velocidad con la que una muestra que entra en contacto con un extremo del orificio capilar se absorbe en el orificio capilar por acción capilar. La capa puede, por ejemplo, reticularse por medio de un agente de reticulación química, calor o radiación ultravioleta. Agentes de reticulación química a modo de ejemplo incluyen glutaraldehído y paraformaldehído, y reticulantes reactivos bifuncionales tales como bis-epoxi polietilenglicol. También se pueden usar procedimientos de reticulación no covalentes, tal como con el uso de enlaces de hidrógeno entre cadenas de polímeros, interacciones electrostáticas entre cadenas de polímeros (por ejemplo, polímero de carga positiva reticulado con polímero de carga negativa), reticulación con un ion divalente, en particular un catión divalente (por ejemplo, reticulación de calcio de polímero de alginato).

Preferiblemente, durante el uso, un fluido de muestra puesto en contacto con un extremo de los orificios capilares se eleva en los orificios capilares por acción capilar.

Además de ser sustancialmente transparente a la luz visible, el material del cuerpo del dispositivo también puede ser sustancialmente transparente a la radiación electromagnética en el espectro invisible, por ejemplo, luz ultravioleta (UV).

Preferiblemente, el cuerpo unitario se forma a partir de un material hidrófobo. El material hidrófobo es preferiblemente un polímero, más preferiblemente un fluoropolímero. El fluoropolímero puede ser etileno propileno fluorado (FEP), tetrafluoroetileno hexafluoropropileno fluoruro de vinilideno (THV), perfluoroalcoxi (PFA), politetrafluoroetileno (PTFE), etileno tetrafluoroetileno (ETFE) o poli (clorotrifluoroetileno) (PCTFE). Más preferiblemente, el cuerpo unitario se forma a partir de FEP.

Los orificios capilares pueden tener un diámetro interior de al menos 10  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, el diámetro interior es de al menos 50  $\mu\text{m}$ . El diámetro interior puede ser de hasta 1 mm. Más preferiblemente, el diámetro interior es de 100 a 500  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 100-200  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, el diámetro interior de los orificios capilares puede ser de 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$  o 500  $\mu\text{m}$ . Cuando los orificios capilares son elípticos u ovalados, pueden tener un eje menor (diámetro conjugado) de al menos 10  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, el eje menor es de al menos 50  $\mu\text{m}$ . El eje menor puede ser de hasta 1 mm. Más preferiblemente, el eje menor es de 100 a 2500  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 100-200  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, el eje menor de los orificios capilares puede ser de 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$  o 500  $\mu\text{m}$ . Cuanto más pequeño sea el diámetro o el eje menor de los orificios capilares, mayor será la elevación del fluido de muestra en los orificios capilares por acción capilar. Esto se puede calcular de acuerdo con la ecuación de Young-Laplace presentada anteriormente. Cuando el eje menor y el eje mayor difieren sustancialmente (es decir,  $a \ll b$ ), el eje menor controla la altura del líquido en el capilar.

La altura máxima del fluido en el orificio capilar y la velocidad del fluido de muestra que se eleva en el orificio capilar se pueden controlar por el diámetro y la forma del capilar y por la capa hidrófila, ya que ambos factores influyen en el ángulo de contacto de la muestra de fluido con la capa hidrófila o la superficie del orificio capilar recubierto de una capa hidrófila y el aire.

Un pequeño diámetro interior o eje menor para los orificios capilares también es ventajoso, ya que los reactivos de ensayo, tal como anticuerpos retenidos dentro de o en la capa hidrófila, requieren tiempo para difundirse y reaccionar con el fluido de muestra que se eleva en los orificios capilares por acción capilar. Por ejemplo, el tiempo para la difusión de un reactivo de ensayo, tal como un anticuerpo (suponiendo que  $D = 1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) en un orificio capilar con un diámetro o eje menor de 200  $\mu\text{m}$  es inferior a 100 s, donde D es la difusividad de la molécula a través del agua. Esto permite, por ejemplo, que se produzca una reacción de aglutinación en el orificio capilar en las mismas escalas de tiempo en que la sangre tarda en elevarse en el orificio capilar por acción capilar (generalmente de 30 a 120 s). La liberación rápida de reactivos de ensayo de la capa hidrófila en combinación con los tiempos de difusión muy cortos permite, de ese modo, que se generen reacciones entre el reactivo de ensayo y una sustancia de interés presente en un fluido de muestra a medida que el fluido de muestra se eleva en el orificio capilar por acción capilar.

La forma en sección transversal de los orificios capilares puede ser circular. Sin embargo, más preferiblemente es ovalada o elíptica, en vista de la técnica de fabricación preferida para el dispositivo. En ese caso, el "diámetro interior" debe tomarse como el eje menor del orificio capilar en sección transversal.

El dispositivo puede tener más de dos orificios capilares formados en el cuerpo unitario. Por ejemplo, el dispositivo puede tener 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más orificios capilares. Es posible fabricar un dispositivo adecuado con 20 orificios capilares, o más.

Preferiblemente, los orificios capilares están formados sustancialmente paralelos entre sí.

Preferiblemente, un reactivo de ensayo se retiene al menos en una porción de la capa hidrófila o de la superficie recubierta con una capa hidrófila de uno o más orificios capilares.

5 Un orificio capilar en el dispositivo puede tener una superficie tratada de manera diferente de al menos otro orificio capilar en el dispositivo. Esto puede proporcionar una diferencia medible en el rendimiento del ensayo entre los orificios. Por ejemplo, un orificio puede tener un reactivo de ensayo diferente, o una concentración diferente de reactivo de ensayo, retenido en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con una capa hidrófila del orificio capilar que otro orificio.

10 Un reactivo de ensayo, tal como se menciona en el presente documento, puede ser cualquier sustancia adecuada para detectar o determinar la presencia de una sustancia de interés en una muestra. Preferiblemente, poner el reactivo de ensayo en contacto con una sustancia de interés directa o indirectamente, provoca un cambio medible. El cambio medible puede ser, por ejemplo, un cambio en el color, un cambio en la fluorescencia o la aglutinación de la sustancia de interés.

15 Por ejemplo, el reactivo de ensayo puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: una población de primeros miembros de un respectivo par de unión, siendo cada primer miembro capaz de unirse específicamente a un segundo miembro del respectivo par de unión; una enzima; un sustrato enzimático; un colorante; un indicador de pH (tal como un colorante indicador de pH); una sustancia que inhibe o promueve el crecimiento de un microorganismo (tal como una bacteria); reactivos de partículas (tales como micropartículas, nanopartículas y microesferas, incluyendo, pero sin limitarse a, partículas de látex, nanopartículas doradas y esferas fluorescentes); y un sustrato metabólico para un microorganismo (tal como una bacteria).

20 Cuando el reactivo de ensayo es una población de primeros miembros de un respectivo par de unión, un orificio en el dispositivo de ensayo puede tener primeros miembros de un par de unión específico diferente, o una concentración diferente de primeros miembros, retenidos en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con una capa hidrófila del orificio capilar en comparación con otro orificio.

25 En algunas realizaciones, al menos un orificio capilar de referencia se puede proporcionar sin dicho reactivo de ensayo retenido en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con una capa hidrófila del orificio capilar. El orificio de referencia se puede tratar con una proteína de referencia, tal como BSA. Además, es posible que dos o más orificios capilares tengan el mismo reactivo de ensayo retenido en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con una capa hidrófila del orificio capilar, con el fin de proporcionar redundancia de medición en el dispositivo. En este caso, se dice que los orificios capilares han recibido un tratamiento idéntico.

30 Además, es posible que dos o más orificios capilares reciban un tratamiento idéntico y que uno o más orificios en el mismo dispositivo reciban un tratamiento diferente, para proporcionar combinaciones de estas ventajas.

35 Preferiblemente, un dispositivo de ensayo, tal como se menciona en el presente documento, es un dispositivo de ensayo portátil, por ejemplo, un dispositivo de ensayo de mano.

40 Un dispositivo de ensayo, tal como se menciona en el presente documento, puede ser un dispositivo de ensayo para llevar a cabo un ensayo de determinación de grupo sanguíneo. La población de los primeros miembros puede ser una población de anticuerpos y dichos anticuerpos pueden ser capaces de unirse específicamente a un antígeno presente en la superficie de algunos tipos de glóbulos rojos, provocando así la aglutinación de dichos glóbulos rojos. Los glóbulos rojos son preferiblemente glóbulos rojos humanos. De manera similar, la sangre o sangre entera, tal como se menciona en el presente documento, es preferiblemente sangre humana o sangre entera humana. Un dispositivo de ensayo preferido es el utilizado para determinar un grupo sanguíneo ABO de un individuo y comprende al menos dos orificios capilares, en el que un orificio tiene anticuerpos anti-A retenidos en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con la capa hidrófila del orificio capilar y al menos otro orificio tiene anticuerpos anti-B retenidos en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con la capa hidrófila del orificio capilar. El dispositivo de ensayo puede tener un orificio capilar adicional, en el que dicho orificio capilar tiene anticuerpos anti-D retenidos en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con una capa hidrófila del orificio capilar para determinar si un individuo es Rh positivo o Rh negativo.

45 Los anticuerpos alternativos o adicionales que pueden retenerse en la capa hidrófila son anticuerpos específicos para antígenos del sistema sanguíneo Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, P, Lewis o Lutheran. Los anticuerpos para la determinación del grupo sanguíneo son comercializados, por ejemplo, por Alba Bioscience. Preferiblemente, los anticuerpos a los que se hace referencia en el presente documento son anticuerpos monoclonales.

50 "Aglutinación" se refiere a la acumulación de partículas, por ejemplo, glóbulos rojos, suspendidos en un líquido en presencia de un anticuerpo u otro primer miembro de unión de un par de unión específico capaz de unirse a más de un segundo miembro de unión del par de unión específico presente en las partículas simultáneamente. Al unir múltiples partículas, el anticuerpo u otro primer miembro de unión se une a las mismas, creando un complejo más grande.

55 Preferiblemente, la superficie exterior del cuerpo incluye una primera superficie de medición y una segunda superficie

de medición. Durante el uso, se pretende que la luz se transmita a través del dispositivo desde la primera superficie de medición hasta la segunda superficie de medición. Estas superficies pueden ser, por ejemplo, superficies superiores e inferiores del cuerpo. Preferiblemente, una o ambas de la primera superficie de medición y la segunda superficie de medición se extienden sustancialmente paralelas a los ejes principales de los orificios capilares. Una o ambas de la

5 primera superficie de medición y la segunda superficie de medición pueden extenderse sustancialmente paralelas a la dirección de disposición de los capilares.

Una o ambas de la primera superficie de medición y la segunda superficie de medición pueden ser sustancialmente planas. La ventaja de esto es que las distorsiones ópticas debidas a la refracción en las superficies de medición se pueden reducir o evitar. A su vez, esto puede mejorar la relación señal-ruido de una medición tomada por la interrogación óptica de los orificios capilares. Debe tenerse en cuenta que normalmente el cuerpo también incluye superficies laterales. La forma de las superficies laterales no se considera crítica, ya que, preferiblemente, la interrogación óptica de los orificios capilares no tiene en cuenta la luz desde o próxima a las superficies laterales.

10

Preferiblemente, la longitud del cuerpo extruido recubierto, o recubierto y cargado, antes del corte, es de al menos 50 cm. La longitud puede ser mayor, por ejemplo, al menos 1 m, preferiblemente al menos 2 m, 3 m, 4 m, o 5 m. Más preferiblemente, la longitud del cuerpo extruido, antes del corte, es de al menos 5 m.

15

El ensayo puede realizarse incluyendo un paso de interrogación óptica. Preferiblemente, esto se lleva a cabo para proporcionar una imagen pixelada de uno o más, o de todos, los capilares. Por ejemplo, se puede usar una cámara digital, tal como una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD), un microscopio digital o un escáner de superficie plana. En general, se prefieren dispositivos de imagen de carga acoplada o dispositivos que comprenden sensores de imagen digital de semiconductores de óxido metálico (CMOS).

20

En el caso de un ensayo para la determinación del grupo sanguíneo, cuando la sangre entra en contacto con un dispositivo de ensayo de la presente invención, la sangre se eleva en los orificios capilares por acción capilar hasta que alcanza la altura máxima posible en las condiciones particulares en ausencia de aglutinación. Esto se denomina en el presente documento como  $h_{max}$ . Si los anticuerpos presentes en el recubrimiento hidrófilo de un orificio capilar provocan la aglutinación de los glóbulos rojos, el flujo de la sangre en el orificio capilar se retrasa, con el resultado de que la sangre no alcanza  $h_{max}$ . Por lo tanto, la aglutinación puede detectarse midiendo la intensidad en escala de grises a lo largo de una sección corta del (o de cada) capilar cerca de  $h_{max}$ . Para los capilares en los que la sangre no se aglutinó (y, por lo tanto, fue capaz de alcanzar  $h_{max}$ ), el gráfico revelará una señal fuerte correspondiente a una fuerte absorción de luz, mientras que para los capilares en los que los glóbulos rojos se han aglutinado, el gráfico no mostrará ninguna señal en comparación con el fondo debido a la ausencia de glóbulos rojos en el área escaneada. De manera alternativa, la aglutinación se puede detectar trazando la escala de grises a lo largo de una sección corta, preferiblemente de 5 mm o menos de longitud, del (o de cada) capilar a una distancia de referencia, por ejemplo,  $h_{max}/2$ . En este caso, la aglutinación de los glóbulos rojos produce una alta variabilidad de señal, mientras que la sangre no aglutinada se presenta como un gráfico de intensidad de color muy homogéneo a lo largo de la sección de formación de imágenes.

25  
30  
35

De manera alternativa, la interrogación óptica puede ser por observación óptica directa, es decir, a simple vista. En este caso, se puede ver una sección corta del capilar, preferiblemente de 5 mm o menos de longitud, a través del conjunto de microcapilares a una distancia de referencia, por ejemplo,  $h_{max}/2$ , y el resultado del ensayo se detecta ópticamente. Por ejemplo, en el caso de un ensayo para determinar el grupo sanguíneo, la sangre aglutinada se presentaría como parches de glóbulos rojos. En el caso de dicha observación óptica directa, se puede usar un dispositivo de aumento, tal como un amplificador plástico o una lente de aumento.

40  
45

El ajuste del índice de refracción del cuerpo del dispositivo al del fluido de muestra es ventajoso tanto para la detección digital (por ejemplo, con una cámara digital o un escáner de superficie plana) como para la detección a simple vista de las reacciones de ensayo.

50

Un sistema de ensayo puede comprender una pluralidad de dispositivos de ensayo de la invención y el soporte puede usarse para sostener la pluralidad de dispositivos de ensayo. Preferiblemente, en un sistema de ensayo de este tipo, el soporte sostiene los dispositivos de ensayo en una disposición sustancialmente plana. Además, preferiblemente el soporte proporciona medios de observación (tales como una ventana de observación) para permitir que se observe al menos una parte del (o de cada) dispositivo de ensayo. Por ejemplo, los medios de observación pueden permitir que el (o cada) dispositivo de ensayo se observe en  $h_{max}$  y/o  $h_{max}/2$ . Los medios de observación también pueden permitir que cada dispositivo de ensayo sea interrogado ópticamente para la medición.

55

Preferiblemente, el soporte también permite que el ensayo proceda mientras el/los dispositivo(s) de ensayo se sostienen en el soporte.

60

El sistema puede incluir, además, una bandeja que tiene una disposición de pocillos adaptados para recibir reactivos, fluidos de muestra u otros líquidos requeridos para el ensayo. La bandeja se adapta, además, preferiblemente para recibir al menos un extremo del (o de cada) dispositivo de ensayo cuando el/los dispositivo(s) de ensayo se sostienen en el soporte. Esto permite que un extremo de cada orificio capilar esté en comunicación de fluidos con un líquido

65

contenido en el correspondiente pocillo.

La expresión "par de unión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un primer miembro y un segundo miembro que son capaces de unirse específicamente entre sí. Ejemplos de pares de unión incluyen antígeno-anticuerpo. Un primer miembro de un par de unión específico puede, por ejemplo, ser un anticuerpo. Un segundo miembro de un par de unión específico puede ser un antígeno, por ejemplo, un antígeno presente en la superficie de algunos glóbulos rojos que es indicativo de un grupo sanguíneo particular.

El término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina producida ya sea de forma natural, o de forma parcial o totalmente sintética. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que comprenda un sitio de unión a antígenos de anticuerpo. Por lo tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados y moléculas químicas que comprenden un sitio de unión a antígenos de anticuerpo, o equivalente, fusionado a otro polipéptido (por ejemplo, derivado de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo).

Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión a antígenos de anticuerpo incluyen, pero sin limitarse a, moléculas de anticuerpo tales como Fab, Fd, Fv, dAb, regiones aisladas de CDR, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab'-SH, scFv, reguladores Fv de cadena única biespecíficos; y diacuerpos. Tales fragmentos de anticuerpos son muy conocidos en la técnica.

Un sitio de unión a antígeno al que se hace referencia en el presente documento es la parte de una molécula que se une y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se denomina sitio de unión a antígenos de anticuerpo y comprende la parte del anticuerpo que se une y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo puede unirse a una parte particular del antígeno, parte que se denomina epítipo. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de anticuerpos. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera de anticuerpos (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpos (VH).

Un antígeno, tal como se menciona en el presente documento, es cualquier sustancia que puede unirse específicamente con un anticuerpo. Tales sustancias incluyen: proteínas, péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas (por ejemplo, haptenos). Los antígenos pueden ser proteínas, carbohidratos, glicoproteínas y glicolípidos, en particular, proteínas, carbohidratos, glicoproteínas y glicolípidos presentes en la superficie de algunos tipos de glóbulos rojos. La detección de tales antígenos permite la determinación del grupo sanguíneo de un individuo, o la medición del antígeno disuelto en una muestra biológica.

Los términos "específico" y "específicamente", tal como se usan en el presente documento, pueden referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) pare(s) de unión específicos, por ejemplo, el otro miembro del par de unión específico. Estos términos también se aplican cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que es portado por varios antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específico que porta el dominio de unión a antígeno podrá unirse a los diversos antígenos portadores del epítipo.

El término "comprende" se usa generalmente en el presente documento en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes adicionales.

El término "y/o" cuando se usa en el presente documento se debe tomar como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se contemplara individualmente en el presente documento.

A menos que el contexto indique lo contrario, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

Algunos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras que se describen a continuación.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un aparato de extrusión para uso en la fabricación de dispositivos de ensayo de acuerdo con una realización preferida de la invención.

La Figura 2 es una sección transversal esquemática a través de la matriz que se muestra en la Figura 1.

La Figura 3 es una vista esquemática desde abajo de la matriz que se muestra en la Figura 1.

Las Figuras 4A-D ilustran el efecto del índice de refracción del cuerpo del dispositivo de ensayo capilar en

distorsiones ópticas durante la interrogación óptica.

La Figura 5A resume la variación de la señal y el ruido con el índice de refracción para MCF de FEP (película microcapilar de etileno propileno fluorado) y MCF de EVA (película microcapilar de etileno vinil acetato).

5

La Figura 5B resume la variación de la relación señal a ruido en MCF de FEP y MCF de EVA.

La Figura 6 refleja una muestra de fluido que se extrae mediante acción capilar en un microcapilar de FEP recubierto previamente con un polímero hidrófilo y precargado con un reactivo de ensayo. Los reactivos de ensayo se liberan por conexión de fluidos y difusión molecular rápida en el microcapilar de diámetro pequeño.

10

La Figura 7A muestra que el ángulo de contacto medio en una película microcapilar de FEP de 10 orificios se puede reducir recubriendo los microcapilares durante toda la noche con PVA de bajo peso molecular y reticulando durante un periodo de 0,5 a 2 horas. Las Figuras 7B y 7C muestran que el ángulo de contacto de equilibrio no cambia cuando el microcapilar se usa varias veces, lo que demuestra que el recubrimiento es estable cuando está reticulado como cuando no está reticulado. La Figura 7D muestra el ángulo de contacto medio de los capilares con respecto al tiempo en que los capilares se incubaron con la solución de recubrimiento. Los capilares se recubrieron con un PVA de bajo peso molecular (BPM) reticulado o no reticulado, o PVA de alto peso molecular (APM) reticulado o no reticulado. La Figura 7E muestra datos de espectroscopía fotoelectrónica por rayos X de capilares recubiertos con PVA reticulado o no reticulado de bajo peso molecular (BPM) o PVA reticulado o no reticulado de alto peso molecular (APM) con respecto al tiempo en que los capilares fueron incubados con la solución de recubrimiento.

15

20

La Figura 8 muestra la elevación del capilar (en cm) en microcapilares de FEP recubiertos con diferentes capas de polímero hidrófilo.

25

La Figura 9 muestra imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica 10×10 μm en modo de roscado de la superficie interior de un microcapilar de FEP recubierto con gelatina (polímero B), HPMC (polímero C) y PVA (polímero A) reticulado con glutaraldehído. La reducción en el ángulo de contacto está relacionada con la cobertura de la superficie del recubrimiento, siendo el PVA reticulado el más eficaz para reducir el ángulo de contacto. Un recubrimiento uniforme es ventajoso para lograr un aumento capilar constante.

30

La Figura 10 muestra el anticuerpo marcado con FITC (IgM) retenido en el recubrimiento de PVA reticulado dentro de un microcapilar seco (panel de la izquierda). Cuando el capilar está parcialmente lleno, una alta concentración de anticuerpo se transporta a través del capilar por el líquido en la interfaz líquido-aire (panel central). En el capilar lleno, el anticuerpo se difunde fuera del recubrimiento de PVA reticulado dentro el volumen capilar (panel de la derecha).

35

La Figura 11 muestra que las moléculas de IgG e IgM (que tienen diferentes pesos moleculares) se liberan a diferentes velocidades en el volumen capilar desde un recubrimiento de PVA reticulado.

40

Las Figuras 12-14 ilustran un procedimiento para fabricar un dispositivo de ensayo de acuerdo con una realización de la presente invención. La Figura 12 muestra la inmovilización en masa de los reactivos de determinación del grupo sanguíneo en un conjunto largo de microcapilares.

45

La Figura 13 muestra el corte de un conjunto largo de capilares previamente recubiertos con solución de anticuerpo inmovilizada en la pared interior de los capilares para producir tiras de ensayo individuales.

La Figura 14 muestra la fabricación de una varilla de inmersión múltiple para la determinación instantánea del grupo sanguíneo a partir de una gota de sangre.

50

La Figura 15 muestra la liberación de la solución de anticuerpos de la capa hidrófila retenida en la pared microcapilar.

La Figura 16A muestra los resultados de las pruebas anti-A, anti-B y anti-D (Rhesus) de un grupo sanguíneo A+ en una película microcapilar hidrófila previamente recubierta producida a partir de FEP.

55

La Figura 16B muestra el gráfico del perfil en escala de grises que muestra una alta variabilidad en escala de grises y una disminución en la concentración de glóbulos rojos a lo largo de la película, lo que representa una prueba de aglutinación positiva con anti-A.

60

La Figura 16C muestra el gráfico del perfil en escala de grises que muestra una variabilidad reducida en la escala de grises y una concentración constante de glóbulos rojos a lo largo de la película, lo que representa una prueba de aglutinación negativa con anti-B.

65

La Figura 16D muestra el gráfico del perfil en escala de grises que muestra una alta variabilidad en escala de

grises y una disminución en la concentración de glóbulos rojos a lo largo de la película, lo que representa una prueba de aglutinación positiva con anti-A.

5 La Figura 17A muestra el resultado de una prueba anti-A para un grupo sanguíneo A+ en formato de varilla de medición de nivel.

La Figura 17B muestra la separación de los glóbulos rojos del suero sanguíneo tras una aglutinación sanguínea positiva (ilustrada con la prueba anti-A para un grupo sanguíneo A+).

10 La Figura 17C muestra el gráfico del perfil en escala de grises que muestra la separación del plasma/tampón de los glóbulos rojos a lo largo de un capilar.

15 La Figura 18A muestra pruebas de determinación de grupos sanguíneos multiplexados en MCF de FEP previamente recubiertos para diferentes tipos de sangre (A+, B+ y O+). Los capilares se recubrieron de acuerdo con el patrón de recubrimiento que se muestra en la Figura 12.

La Figura 18B muestra la detección directa (es decir, la detección a simple vista) de la aglutinación en los capilares recubiertos de acuerdo con el patrón de recubrimiento que se muestra en la Figura 12.

20 Las Figuras 18C-L muestran gráficos de perfil en escala de grises a lo largo de los capilares en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. Específicamente, la Figura 18C muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 1 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18D muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 2 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18E muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 3 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18F muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 4 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18G muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 5 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18H muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 6 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18I muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 7 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18J muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 8 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18K muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 9 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B. La Figura 18L muestra el gráfico del perfil en escala de grises a lo largo del capilar 10 en la sección de formación de imágenes de la muestra de sangre 1 en la Figura 18B.

40 La Figura 19 muestra la elevación de sangre en el capilar recubierto con PVA por acción capilar. Cualquiera del BSA (control), anti-A, anti-B o anti-D por acción capilar se retienen en el recubrimiento de PVA, como se indica. Esta Figura demuestra la cinética muy rápida de un ensayo realizado en un dispositivo de ensayo de la presente invención.

45 La Figura 20 muestra los resultados de un ELISA de tipo sándwich realizado en microcapilares de FEP recubiertos con PVA de bajo peso molecular reticulados.

La Figura 21 muestra un esquema de un procedimiento para la deposición eficaz de reactivos de ensayo en la superficie interior de los capilares recubiertos.

50 La Figura 22A muestra la deposición de líquido en la pared de un microcapilar de 200 micras de diámetro interior recubierto con PVA de APM reticulado. La Figura 22B muestra el porcentaje de reducción en la longitud del cartucho con el número de capilares para un cartucho de agua de 10 mm de longitud.

55 La Figura 23 muestra un esquema de un procedimiento alternativo para la deposición eficaz de reactivos de ensayo en la superficie interior de los capilares recubiertos, que consiste en cargar toda la longitud del capilar con el reactivo de ensayo disuelto en un fluido, y luego eliminar el exceso de reactivo de ensayo.

La Figura 24 muestra tiras de ensayos enzimáticos y de fermentación, que permite la identificación colorimétrica de diferentes cepas de bacterias.

60 La Figura 25 muestra un esquema de un dispositivo de ensayo para inmunoensayos que consiste en inmovilizar un conjunto de anticuerpos o antígenos de captura en el recubrimiento hidrófilo y luego interconectar una tira con un micropocillo en el que se depositan la muestra y otros reactivos, y los fluidos de ensayo se conducen por acción capilar.

65 La Figura 26 refleja un esquema que muestra el concepto de cargar diferentes reactivos de ensayo en una serie de capilares.

**Descripción detallada de realizaciones preferidas y otras características preferidas de la invención**

- 5 En una realización preferida de la presente invención, se proporciona una plataforma para ensayos. Los presentes inventores han mostrado que la superficie interior de los capilares se puede recubrir con una capa hidrófila para facilitar la retención de los reactivos de ensayo, y para aumentar la velocidad a la que los capilares absorben las muestras de fluidos por acción capilar.
- 10 El conjunto es preferiblemente un conjunto de 10 microcapilares, teniendo cada capilar una sección transversal elíptica y un eje menor o diámetro del conjugado de 100-200  $\mu\text{m}$ , incorporado en una única película plástica sustancialmente plana extruida de un material de fluoropolímero.
- 15 La geometría plana y las excelentes propiedades ópticas de la película plástica permiten la interrogación cruzada directa de los capilares para la detección de señales o bien a simple vista o utilizando sistemas ópticos convencionales, tales como una cámara CCD o un escáner de superficie plana. El pequeño volumen interior y diámetro de los capilares acortan el tiempo requerido para que los reactivos de ensayo retenidos en la capa hidrófila se difundan y reaccionen con cualquier sustancia de interés presente en el capilar.
- 20 Esta nueva plataforma de ensayo encuentra una aplicación importante en varios ensayos diferentes, incluyendo, por ejemplo, una herramienta clínica para la determinación del grupo sanguíneo de un paciente y la detección de bacterias en un fluido de muestra para llevar a cabo pruebas serológicas o inmunoensayos, por ejemplo, para la cuantificación de biomarcadores.
- 25 En una realización preferida, la presente invención utiliza un cuerpo capilar fabricado de acuerdo con la divulgación del documento WO 2005/056272, cuyo contenido se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.
- 30 El documento WO 2005/056272 divulga un aparato para producir un producto extruido, incluyendo el producto extruido una pluralidad de canales capilares a través del mismo, comprendiendo el aparato una extrusora que tiene una entrada, una matriz que incluye un orificio que tiene una forma exterior predeterminada, una pluralidad de agujas cada una de las cuales tiene un cuerpo que incluye un conducto interior para el flujo de fluidos, comprendiendo, además, cada aguja una salida del conducto interior en un extremo de salida, estando dispuesto el extremo de salida de cada aguja en un patrón predeterminado sustancialmente dentro del orificio de la matriz, estando el conducto de cada aguja conectado de manera fluida a una fuente de fluido, en el que, durante el uso:
- 35 a) se alimenta material extruible a la extrusora a través de la entrada;
- b) la extrusora funde y fuerza el material extruible alrededor de los cuerpos de las agujas hacia la matriz y a través del orificio en la matriz para producir un producto extruido que tiene sustancialmente la forma exterior predeterminada;
- 40 c) las agujas permiten que el líquido que se extrae de la fuente de fluido a través del conducto sea arrastrado en el producto extruido para formar capilares de manera que el producto extruido incluya capilares a lo largo del mismo en el patrón predeterminado.
- 45 Se ha descubierto que el problema de expansión de la matriz dentro del capilar se reduce sustancialmente o se anula cuando se permite que el fluido entre en el capilar. Esto permite que los orificios capilares se controlen con mayor precisión para que puedan producirse de manera fiable capilares de orificio pequeño. Se prevé que los capilares que tengan un diámetro de entre aproximadamente 2 mm y 10 micras se puedan producir en un único paso de procesamiento de masa fundida. Sin embargo, se prevé que un paso de procesamiento adicional permitiría producir capilares con un diámetro inferior a 1 micra. Debe entenderse que los orificios capilares también se denominan microcapilares.
- 50 Se prefiere que las salidas de la aguja se distribuyan sustancialmente de manera regular en el orificio de la matriz, ya que esto ayuda a evitar la mala distribución del extruido. Es preferible que cada salida de aguja esté a una distancia sustancialmente igual de otras salidas y del orificio de la matriz. Por ejemplo, si el orificio de la matriz es sustancialmente rectangular y el patrón predeterminado de las salidas de la aguja es una línea simple de salidas dentro del orificio, se prefiere que la línea esté dispuesta de manera sustancialmente central en el lado corto del rectángulo y que las distancias entre las salidas de las agujas sean sustancialmente idénticas a la distancia entre las salidas de la aguja exterior y los bordes cortos del orificio y la línea de salidas y los bordes largos del orificio. La salida de la aguja puede ser de cualquier tamaño adecuado, pero está, preferiblemente, entre 2 mm y 0,1 mm y más preferiblemente entre 0,6 mm y 0,2 mm. Por ejemplo, con un tamaño de salida de aguja de 0,3 mm, pueden producirse fácilmente orificios capilares de entre 200 micras y 20 micras dependiendo de las condiciones de procesamiento.
- 55 Se prefiere que la presión del fluido que entra en los capilares a través de las agujas sea sustancialmente igual a la presión del ambiente en el que se extruye el producto extruido, ya que se ha detectado que esto produce un producto extruido más estable. Es preferible que el flujo de material extruible arrastre el fluido en el capilar, pero debe entenderse que el fluido puede entrar en los capilares por encima o por debajo de la presión del ambiente en el que se extruye el producto extruido, y que puede ser necesario un mayor control. El fluido que se permite que entre en los capilares
- 60
- 65

normalmente será aire a temperatura y presión ambiente, pero la extrusión puede estar en un baño líquido u otro entorno atípico. La fuente de fluido puede ser aire a temperatura y presión ambiente si el producto extruido se extruye en un entorno de este tipo y se puede extraer directamente de la atmósfera local. Sin embargo, debe entenderse que la fuente de fluido puede ser un gas o líquido inerte, o un gas o líquido de muestra que debe quedar atrapado dentro de los capilares en el producto extruido.

Se prefiere el uso de una bomba de engranajes para estabilizar el flujo de material extruible entre la extrusora y la matriz. Esto ayuda a reducir cualquier anomalía de flujo que pueda resultar de variaciones en el funcionamiento de la extrusora.

La matriz se usa para tomar la alimentación de material de la extrusora y cambiar la forma del flujo de material hasta que tenga la forma exterior deseada y pueda salir a través del orificio de la matriz que tiene sustancialmente la forma exterior predeterminada. Debe entenderse que, debido a la expansión de la matriz, la forma exterior del extruido puede no corresponderse exactamente con la forma predeterminada del orificio. Se prefiere que la matriz sea una matriz convergente. La matriz tiene una forma preferible para garantizar que el flujo sobre las agujas sea sustancialmente uniforme, ya que esto ayuda a crear un extruido regular bien formado.

Se prefiere que el orificio de la matriz sea sustancialmente rectangular, de modo que la forma exterior resultante del producto extruido sea sustancialmente rectangular. Las dimensiones del orificio rectangular son preferiblemente tales que el producto extruido es una lámina o película. Preferiblemente, el orificio rectangular tiene un lado largo con una longitud que es al menos superior a la del lado corto. Preferiblemente, la relación es mayor que 10, ya que esto puede permitir que la película se flexione más fácilmente. Debe entenderse que el orificio podría tomar cualquier otra forma adecuada, incluyendo un anillo, un cuadrado o un círculo. Se ha observado que con una matriz no circular, por ejemplo, una matriz rectangular puede haber efectos de borde que alteran la forma de los capilares en o cerca de un borde de la película. Dicho efecto de borde puede ser anulado mediante el uso de una matriz anular que es, en efecto, una película continua que no tiene bordes. Una matriz anular puede permitir que la producción de un producto extruido tenga una mayor consistencia en el tamaño y la forma de los capilares.

Por simplicidad, el aparato se describirá ahora con referencia a una realización preferida en la que la matriz tiene un orificio sustancialmente rectangular en el que se dispone un conjunto de salidas de agujas en una línea sustancialmente paralela al lado largo del rectángulo y sustancialmente en el centro de los lados cortos del orificio. Esto produce una película extruida que tiene una pluralidad de capilares a lo largo de la misma.

Debe entenderse que podrían emplearse diferentes conjuntos y formas de orificio.

Se prefiere que las salidas de las agujas tengan una forma sustancialmente circular. Esta forma de salida es fácil de formar, pero se pueden usar otras formas si se desea. También se prefiere que el cuerpo de cada aguja sea sustancialmente cilíndrico y alargado a lo largo de un primer eje. Los cuerpos están dispuestos preferiblemente de manera que el primer eje del cuerpo cilíndrico sea sustancialmente paralelo al flujo de material, ya que esto proporciona una baja resistencia al flujo de material y es fácil de fabricar.

Debe entenderse que la pluralidad de agujas puede formarse individualmente, integralmente, o en grupos de dos o más agujas. Por ejemplo, podría usarse un monolito sólido de metal para formar una pluralidad de agujas. El monolito puede incluir orificios a través del mismo para formar las agujas requeridas por la invención. Las agujas pueden incluir una entrada común que luego se divide en una pluralidad de conductos que conducen a una pluralidad de salidas. Las salidas de las agujas del monolito pueden sobresalir del monolito permitiendo que el producto extruido fluya alrededor del saliente antes de que el gas se extraiga de la salida, o puede que no haya saliente. El extruido fluirá alrededor del monolito y extraerá el gas a través de las salidas, tal como se describió anteriormente.

Aunque se ha mencionado anteriormente que la expansión de la matriz dentro de los capilares se reduce o se anula sustancialmente, la expansión de la matriz todavía se produce en la salida de la matriz. La forma exterior del producto extruido se expandirá a medida que salga del orificio. En el caso de la película, se ha descubierto que la expansión es mayor a lo largo del eje corto del orificio rectangular que a lo largo del eje largo. El resultado es que los capilares sustancialmente circulares dentro del extruido antes de la expansión se distorsionan en una forma elíptica con el eje largo sustancialmente paralelo al eje corto de la sección transversal rectangular de la película.

Debe entenderse que, con variaciones en la forma de salida y el procesamiento, la sección transversal de los capilares puede variar.

El producto extruido se extrae preferiblemente del orificio a una velocidad mayor que la velocidad a la que se produce el producto. La relación de estiramiento es la relación entre la velocidad de producción de extruido y la velocidad a la que se drena el producto extruido. En algunas relaciones de estiramiento (entre 16 y 20) parece que el efecto de expansión de la matriz predomina y los capilares son sustancialmente elípticos.

A velocidades de estiramiento más altas (por encima de 30), el cambio en la geometría debido al estiramiento del extruido predomina. Como se ha mostrado en la literatura, durante el estiramiento de un extruido que tiene una sección



transversal rectangular, la longitud del eje corto disminuye a una velocidad mayor que la longitud del eje largo del extruido y, por lo tanto, los capilares se distorsionan para formar capilares sustancialmente elípticos cuyo eje largo es sustancialmente paralelo al eje largo de la sección transversal rectangular. El procedimiento de estiramiento normalmente reduce las dimensiones generales de la sección transversal del producto extruido y, por lo tanto, reduce las dimensiones de los capilares dentro del producto.

También se ha descubierto que es posible procesar adicionalmente el producto extruido después del estiramiento. Este procesamiento adicional puede ser tanto un estiramiento en frío como un estiramiento en caliente a una temperatura elevada. Se ha descubierto que el estiramiento en frío puede reducir las dimensiones del producto entre dos y tres veces y cabe esperar una reducción mayor cuando se utiliza el estiramiento en caliente.

El aparato y un procedimiento que emplea el mismo permiten producir un producto extruido de sección rectangular con múltiples capilares que se extienden a lo largo del producto.

El documento WO 2005/056272 divulga la producción de extruidos con múltiples capilares elípticos de longitud de eje mayor de aproximadamente 65  $\mu\text{m}$  y longitud de eje menor de aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ . Cabe señalar que la relación de aspecto y el diámetro capilar promedio se pueden variar a través de cambios en las condiciones de procesamiento. Los productos extruidos normalmente toman forma de película. Cada película tiene generalmente una longitud y una sección transversal sustancialmente rectangular perpendicular a dicha longitud, incluyendo dicha sección transversal dos lados largos y dos lados cortos, incluyendo la película una pluralidad de orificios capilares sustancialmente paralelos a la longitud de la película.

El documento WO 2005/056272 divulga además que la producción de una longitud de material extruido de aproximadamente 20 m de longitud permitió una investigación de las dimensiones de los capilares en cinco secciones a lo largo del material extruido mediante microscopía electrónica de barrido. Esto reveló que la variación en las dimensiones de los capilares no era superior a aproximadamente el 10 % a lo largo de la longitud del producto.

El documento WO 2005/056272 divulga adicionalmente la formación de productos extruidos utilizando, por ejemplo, LLDPE. Se detectó que dichos polímeros tienen buena transparencia óptica, a pesar de cualquier contenido cristalino presente dentro del polímero. El documento WO 2005/056272 sugiere que se podría lograr una transparencia óptica total, o al menos significativamente mayor, utilizando un polímero amorfo tal como el poliestireno. Sin embargo, debe observarse que estos materiales no son necesariamente los materiales preferidos para uso con las realizaciones de la presente invención.

La Figura 1 muestra el aparato de extrusión 1 para crear un producto extruido 2 que tiene orificios capilares a lo largo del mismo. El aparato de extrusión comprende una extrusora de tornillo 4 accionada por un motor 6. El material extruible 8 se alimenta al tornillo de la extrusora 4 a través de una tolva 10. A medida que el material extruible pasa a través del tornillo de la extrusora 4, el material se funde para formar una masa fundida (no mostrada). El tornillo extrusor 4 alimenta la masa fundida a una bomba de engranajes 12 que mantiene un flujo sustancialmente constante de masa fundida hacia una matriz 14. La bomba de engranajes 12 está conectada al tornillo extrusor 4 por una brida 16 que incluye un filtro de pantalla para eliminar las impurezas del flujo de fusión. El motor 6 se controla mediante un enlace de retroalimentación de presión 18 entre la entrada de la bomba de engranajes y el motor 6.

La masa fundida pasa a la matriz 14 a través de un barril extrusor 20 que está conectado a la bomba de engranajes mediante una brida 22. En esta realización, el barril extrusor incluye una curva de 90° 24. Se usan calentadores de banda 26 para controlar la temperatura a diferentes etapas en el aparato de extrusión 1. Los calentadores de banda 26 pueden ubicarse dentro de la extrusora, en las bridas 16,22, en la bomba de engranajes 12, en el barril de extrusión 5 20 y también en la matriz 14.

El detalle de la disposición de la matriz 14 se mostrará con mayor precisión en las siguientes figuras.

La masa fundida pasa a través de la matriz 14 y se conforma en la forma y sección transversal deseadas. A medida que la masa fundida sale de la matriz, se convierte en un extrudido 28. El extrudido 28 se estira sobre y entre los rodillos 30. El procedimiento de estiramiento, como se describió anteriormente, altera la sección transversal del extrudido 28 para formar el producto extruido 2. Se define una longitud de estiramiento (L) 29 entre el orificio y el primer rodillo 30. Se ha descubierto que L tiene un mayor efecto sobre el producto extruido 2 formado por este aparato.

La Figura 2 muestra una sección transversal esquemática a través de la matriz 14 de la Figura 1. La matriz incluye una porción de entrada 32, una porción convergente 34 y un orificio 36 que tiene una forma exterior predeterminada. La masa fundida entra en la porción de entrada 32 de la matriz 14, está formada gradualmente por la porción convergente 34 hasta que la masa fundida sale del orificio 36.

La matriz 14 incluye además agujas 38 (una sola de las cuales se muestra en esta Figura) colocadas en la misma. La aguja 38 tiene una porción del cuerpo 40 que tiene un conducto 42 en su interior que está conectado de manera fluida a una fuente de fluido 44 por medio de un segundo conducto 43 que pasa a través de una pared de la matriz 14 alrededor de la cual debe fluir la masa fundida para pasar al orificio 36. La aguja 38 incluye además una salida 46 en

un extremo 48 de la aguja 38. La aguja 38 está dispuesta de manera tal que la salida 46 está situada dentro del orificio 36.

La Figura 3 muestra una vista esquemática de la matriz 14 desde abajo. Este dibujo muestra que el orificio 36 tiene una forma exterior rectangular. El orificio tiene un lado corto 50 sustancialmente paralelo a un eje corto 51 y un lado largo 52 sustancialmente paralelo a un eje largo 53.

En este ejemplo, la matriz incluye diez agujas 38 con las salidas 46 distribuidas sustancialmente de manera uniforme a lo largo del eje largo 53 dentro del orificio y sustancialmente de manera central en el orificio a lo largo del eje corto 51. En este ejemplo, el orificio de la matriz tiene una dimensión de lado corto de 1,5 mm, una dimensión de lado largo de 18 mm y las agujas tienen un diámetro exterior de 0,5 mm y un orificio interior de 0,3 mm.

En un procedimiento de ejemplo, se produce una masa fundida de polímero en una extrusora de tornillo 4 y su velocidad de flujo resultante se estabiliza por medio de una bomba de engranajes 12. Esta masa fundida se alimenta luego a una matriz 14 en cuyo orificio está dispuesta una pluralidad de salidas de agujas 38 en un patrón predeterminado. Un conducto 42 a través de cada aguja 38 se alimenta desde un conducto de alimentación orientado horizontalmente 43, cuya entrada está abierta a la atmósfera fuera de la matriz, que es la fuente de fluido 44. El producto extruido resultante se pasa luego sobre una serie de rodillos 30 a un dispositivo de arrastramiento (no mostrado). La velocidad del dispositivo de arrastramiento puede modificarse para que se puedan producir productos extruidos 2 con diferentes relaciones de estiramiento.

La matriz 14 está diseñada de tal manera que el flujo entrante desde la extrusora, que está contenido en un tubo circular, se altera de manera que pueda pasar a través del orificio 36 de la matriz 14. La matriz 14 debe efectuar este cambio de geometría, y esto se logra actualmente utilizando una matriz convergente 14.

La matriz 14 también está diseñada de modo que el flujo sobre el conjunto de agujas 38 sea sustancialmente uniforme. Un flujo de fusión uniforme alrededor de las agujas 38 facilita la creación de un extruido bien formado 28. Sin embargo, si hay un flujo desigual, la fusión se canalizaría preferiblemente a lo largo de un trayecto de menos resistencia. Esto genera un extruido distorsionado 28.

En el documento WO 2005/056272, el procedimiento se realiza a aproximadamente 165 °C utilizando polietileno lineal de baja densidad (LLDPE). El motor 6 se controla mediante un circuito de retroalimentación de presión que se ajusta a 300 PSI y esto, a su vez, provoca una presión de alrededor de unos pocos bares en la matriz 14. El aire es arrastrado como resultado del flujo de polímero sobre el conjunto de agujas 38 y la alimentación a este conjunto de agujas 38 se deja abierta a la atmósfera. La velocidad del polímero fundido en el orificio de la matriz 36 es del orden de un centímetro por segundo, la velocidad del dispositivo de arrastramiento se puede establecer en cualquier lugar entre cero y 9 metros por minuto.

El parámetro que se determinó que tenía una influencia sustancial en el producto final fue la distancia L 29, que se muestra en la Figura 1 y que se define como la distancia entre la salida de la matriz y el primer rodillo 30. De hecho, en este caso, el primer rodillo es una varilla fija de acero inoxidable pulida sumergida en un baño de agua.

El efecto de la variación de L se explica con más detalle en el documento WO 2005/056272.

Un inconveniente de muchos ensayos basados en capilares conocidos se relaciona con la interrogación óptica del orificio capilar. Esto se ilustra en la Figura 4A-D.

La Figura 4A: muestra un dispositivo capilar habitual formado a partir de sílice fundida. La Figura 4B muestra un capilar producido a partir de material FEP. Un fluido de muestra acuoso (en este caso, agua) se coloca en el orificio capilar. Como se muestra en la Figura 4A, la refracción de la luz que atraviesa el dispositivo ocurre en la interfaz entre el aire y el cuerpo del dispositivo y también en la interfaz entre el cuerpo del dispositivo y el fluido de muestra en el orificio. Esto se debe a los cambios en el índice de refracción en esas interfaces. El índice de refracción del aire es 1,0, el índice de refracción del agua es 1,33 y el índice de refracción de la sílice fundida es 1,46. El índice de refracción del suero sanguíneo cuando se mide a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm es de 1,33 a 1,36.

Sin embargo, tal como se muestra en las Figuras 4C y 4D, el efecto de la refracción en la interfaz entre el cuerpo del dispositivo y el orificio puede reducirse o incluso evitarse mediante la formación del cuerpo del dispositivo utilizando un material que tenga un índice de refracción cercano o igual al del fluido de muestra (en este caso, agua). Se espera que los resultados sean similares cuando, por ejemplo, se utiliza sangre entera como fluido de muestra, ya que el índice de refracción del suero sanguíneo es muy similar al del agua. Materiales adecuados incluyen etileno propileno fluorado (FEP) con un índice de refracción de 1,34; tetrafluoroetileno hexafluoropropileno fluoruro de vinilideno (THV) con un índice de refracción de 1,35; perfluoroalcoxi (PFA) con un índice de refracción de 1,34; politetrafluoroetileno (PTFE) con un índice de refracción de 1,35 a 1,38; etileno tetrafluoroetileno (ETFE) con un índice de refracción de 1,40; y poli (clorotrifluoroetileno) (PCTFE) con un índice de refracción de 1,39.

La Figura 5A resume la variación de la altura del pico promedio determinada a partir de los gráficos de perfil para mezclas de agua-glicerol incoloras (ruido) y teñidas de azul (señal) en MCF de FEP (etileno propileno fluorado, diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$ , 10 capilares, índice de refracción: 1,34) y MCF de EVA (etileno vinil acetato, diámetro interior promedio de los capilares 142  $\mu\text{m}$ , 19 capilares, índice de refracción: 1,48) a un índice de refracción del fluido creciente.

La Figura 5B resume la variación de la relación señal/ruido media en MCF de FEP y MCF de EVA a mezclas de agua-glicerol con índice de refracción creciente.

El etileno propileno fluorado (FEP) se considera particularmente adecuado para aplicaciones de ensayo puesto que tiene un índice de refracción muy cercano al del agua. Sin embargo, el uso de fluoropolímeros, tales como FEP, tiene varios inconvenientes. En primer lugar, los fluoropolímeros, incluyendo el FEP, son muy hidrófobos y, por lo tanto, no son capaces de absorber fluidos de muestra por acción capilar. En su lugar, los fluidos de muestra se deben extraer en el capilar mediante, por ejemplo, aspiradores o jeringas, lo que complica la manipulación del fluido y aumenta el costo de dichos dispositivos de ensayo. Además, los dispositivos de ensayo hechos de fluoropolímeros, tales como FEP, no se pueden usar para llevar a cabo ciertos tipos de ensayos, tales como la determinación del grupo sanguíneo, ya que la naturaleza hidrofóbica del material hace que los reactivos de ensayo, tales como los anticuerpos, se inmovilicen en la pared capilar, evitando así que se difundan en un fluido de muestra presente en el capilar. La difusión de reactivos es esencial para muchos tipos de ensayos. Por ejemplo, en la determinación del grupo sanguíneo, los anticuerpos deben ser capaces de difundirse fuera de la capa hidrófila para unirse a los glóbulos rojos y, por lo tanto, provocar su aglutinación.

Los presentes inventores han superado estos problemas recubriendo la pared capilar internamente con una capa hidrófila.

Específicamente, los inventores han demostrado que el recubrimiento de los capilares con una capa hidrófila puede disminuir el ángulo de contacto de un fluido de muestra presente en el capilar con la pared capilar, facilitando así la absorción de muestras en el capilar por acción capilar.

En los experimentos descritos en el presente documento, el ángulo de contacto de equilibrio de los capilares se determinó sumergiendo microcapilares secos en un depósito transparente con agua desionizada (DI) y registrando la altura máxima de elevación del líquido,  $h$ , en los capilares con respecto a la superficie de líquido libre en el depósito. Los capilares se secaron de nuevo con nitrógeno gaseoso y la altura del líquido se midió una segunda y una tercera vez para evaluar la estabilidad del recubrimiento hidrófilo.

El ángulo de contacto de equilibrio,  $\theta$  (en grados) para los capilares circulares con diámetro interior promedio,  $d$  se calculó con base en la ecuación de Laplace-Young,

$$h = 4\gamma \cos(\theta) / \rho g d$$

asumiendo una tensión superficial,  $\gamma$  para agua-aire de 72,8 mN/m y densidad específica,  $\rho$  de agua de 1.000 kg/m<sup>3</sup>.  $g$  se refiere a la aceleración gravitatoria.

Para capilares elípticos, el eje menor del capilar,  $a$  y el eje mayor,  $b$  del capilar se midieron usando análisis de imagen de microfotografías de secciones transversales finas de los microcapilares, y el ángulo de contacto de equilibrio,  $\theta$  (en grados) calculado basándose en una ecuación de Laplace-Young modificada:

$$h = (2\gamma \cos(\theta) / \rho g) * (1/a + 1/b)$$

asumiendo una tensión superficial,  $\gamma$  para agua-aire de 72,8 mN/m y densidad específica,  $\rho$  de agua de 1.000 kg/m<sup>3</sup>.  $g$  se refiere a la aceleración gravitatoria.

En primer lugar, se investigó el ángulo de contacto de los microcapilares recubiertos con PVA o PVA reticulado. Una solución de 20 mg/ml de PVA con un peso molecular bajo (Mwt: 13.000-23.000) se bombeó a través de una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP con un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  usando una bomba de HPLC a una velocidad de flujo constante de 0,5 mL/min. La solución de PVA se dejó recircular durante toda la noche para asegurar una buena adsorción del polímero en las paredes del microcapilar. Para reticular el PVA adsorbido sobre la superficie interior de los capilares, se recirculó una solución de glutaraldehído de 0,5 mg/ml durante 30 minutos a 0,5 ml/min mientras se calentaba la película microcapilar a 40 °C. Luego se continuó la reticulación hasta 2 horas más después de la adición de 10 ml de una solución de 5 M HCl a la solución de glutaraldehído. El material se lavó luego con 500 ml de agua desionizada caliente (60 °C) y posteriormente con 200 ml de agua desionizada a temperatura ambiente. La película microcapilar se secó luego usando nitrógeno gaseoso.

El ángulo de contacto de equilibrio después del recubrimiento de PVA era  $\theta=88\pm 1,9$  grados. Se descubrió que el

ángulo de contacto de equilibrio disminuía rápidamente con el tiempo de reticulación tal como se muestra en la Figura 7A. Después de 2 horas de reticulación, el ángulo de contacto se redujo a  $\theta = 62 \pm 2,5$  grados (Figura 7A). En contraste, el ángulo de contacto de equilibrio para los microcapilares de FEP no recubiertos era de  $\theta = 123 \pm 1,6$  grados. Los valores de ángulo de contacto que se muestran en la Figura 7 representan la media de tres mediciones de ángulo de contacto con los mismos capilares, lo que demuestra que el recubrimiento de PVA es estable y no se disolvió durante las mediciones.

El efecto del tiempo de incubación, la reticulación y el peso molecular relativo del PVA en el ángulo de contacto medio se sometió a luego a prueba en una película microcapilar de FEP de 10 orificios. Se probaron PVA de bajo peso molecular (BPM; 13.000-23.000 Da) y de alto peso molecular (APM; 146.000-186.000 Da) utilizando soluciones de PVA con una concentración de 20 mg/ml. Los tiempos de incubación se mantuvieron constantes. Las soluciones se aspiraron con la ayuda de una jeringa y luego se incubaron las tiras durante el tiempo de incubación que se muestra en las figuras. Cuando resultó relevante, el polímero se reticuló con glutaraldehído utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente. Las barras de error muestran 2<sup>a</sup> desviaciones estándar entre 3 mediciones de aumento de líquido consecutivas en la tira de fluoropolímero de 10 orificios. La Figura 7D muestra que el PVA reticulado con BPM es más efectivo para reducir el ángulo de contacto, sin embargo, fue posible producir capilares con recubrimientos hidrófilos, es decir, capilares con un ángulo de contacto medio inferior a 90 grados, con todos los recubrimientos de PVA de BPM y APM probados. Fuera de los recubrimientos probados en este experimento, el PVA de BPM fue el menos eficaz para reducir el ángulo de contacto medio, lo que se cree está relacionado con la disolución del recubrimiento de PVA de BPM depositado en la superficie capilar y posiblemente con el hecho de que el recubrimiento es más fino (véanse también los datos de espectroscopía fotoelectrónica por rayos X [XPS] en la Figura 7E). La disolución del recubrimiento da como resultado un aumento en el ángulo de contacto cuando se toman mediciones consecutivas y, por lo tanto, grandes desviaciones estándar para las mediciones del ángulo de contacto. En general, todos los recubrimientos probados fueron eficaces en la producción de capilares de FEP hidrófilos. Los datos de XPS mostrados en la Figura 7E soportan la deposición del polímero sobre la superficie de los microcapilares de FEP (lo que se traduce en un aumento de la relación molar oxígeno: flúor [O:F]), que varía con el tiempo de incubación. La relación molar O:F proporciona la relación molar entre los grupos de oxígeno y flúor (que incluye CF<sub>2</sub> y CF<sub>3</sub>) depositados sobre la superficie del fluoropolímero. La relación molar O:F no diferencia el espesor de la cobertura de la superficie, sino que es una estimación de la cantidad de polímero depositado sobre la superficie del fluoropolímero.

A continuación, se determinó el ángulo de contacto de los capilares recubiertos con gelatina. Una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP con un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  se llenó con una solución de gelatina al 0,2 % y se incubó durante toda la noche. La solución de gelatina residual se extrajo de los microcapilares con una jeringa manual. Los microcapilares se lavaron y/o secaron posteriormente utilizando nitrógeno gaseoso. El ángulo de contacto de los microcapilares lavados y secos fue de  $\theta = 87 \pm 8,8$  grados, y de los microcapilares secos (sin lavar) fue de  $\theta = 74 \pm 12,0$  grados. La desviación estándar promedio entre 3 mediciones de ángulo de contacto consecutivas en los mismos microcapilares recubiertos fue de 1,60, lo que demuestra que el recubrimiento es estable y no se disolvió durante las mediciones en agua.

También se midió el ángulo de contacto de los capilares recubiertos con hidroxilpropilmetilcelulosa (HPMC). Se preparó una solución de HPMC al 6 % dispersando la HPMC en agua desionizada caliente (80 °C) para evitar la aglomeración. Después de que la mezcla se enfrió, se obtuvo una solución clara. Luego, la solución se inyectó manualmente en una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP con un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  y se incubó durante toda la noche. La película microcapilar se secó luego usando nitrógeno gaseoso. El ángulo de contacto de equilibrio medio de los capilares recubiertos con HPMC fue  $\theta = 78 \pm 2,9$  grados.

Para determinar el ángulo de contacto de los capilares recubiertos con una mezcla de PVA-dextrina, se mezclaron previamente volúmenes iguales de solución de PVA al 2 % (Mwt 146.000-186.000) y solución de dextrina al 1 % y se inyectaron en un microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP que tenía un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  y se incubó durante toda la noche, después de lo cual los microcapilares recubiertos se secaron con nitrógeno gaseoso. El ángulo de contacto de equilibrio medio medido fue  $\theta = 67 \pm 8,0$  grados.

El ángulo de contacto de los capilares recubiertos con gelatina-PVA se midió de la siguiente manera. Primero, se prepararon soluciones madre individuales de gelatina y PVA (Mwt de 146.000-186.000) a una concentración de 0,2 mg/ml y 2 mg/ml, respectivamente. Luego se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones madre para producir la solución de recubrimiento de gelatina-PVA (1:10 p/p). Una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP tenía un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$ . La película microcapilar se llenó con la solución de recubrimiento y se incubó durante toda la noche. Finalmente, la solución de gelatina se aspiró desde los microcapilares y los capilares se secaron utilizando nitrógeno gaseoso. El ángulo de contacto de equilibrio medio medido fue  $\theta = 80 \pm 4,6$  grados.

Se determinó además el ángulo de contacto de los capilares recubiertos con recubrimientos a base de quitosano. Se probaron tres procedimientos diferentes para los recubrimientos a base de quitosano, que exploraron las propiedades químicas de este polisacárido.

Para un recubrimiento de baja concentración de quitosano, se permitió que una solución de quitosano al 0,2 % en

ácido acético al 1 % recirculara durante toda la noche a 0,5 ml/min a través de una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP con un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$ . Los microcapilares se lavaron luego con agua desionizada a pH 7,0 y se secaron con nitrógeno gaseoso.

- 5 Un recubrimiento de alta concentración de quitosano se basó en el procedimiento de Lin y col. (2005) para el recubrimiento de tubos de PE. Una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP con un diámetro interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  se llenó con una solución de quitosano al 2 % en ácido acético al 1 % y luego se selló y se incubó durante 2 horas. La solución se reemplazó luego por metanol y se incubó durante 30 minutos más. Después de eliminar el metanol, la película microcapilar se secó a 40 °C durante 2 h y se secó con nitrógeno gaseoso.
- 10 Finalmente, la película microcapilar se neutralizó usando una solución de NaOH al 5 % en peso durante 10 minutos y se secó nuevamente a 40 °C durante 2 horas.

Se adaptó un recubrimiento de quitosano reticulado a partir del procedimiento presentado por Huang y col. (2011) para recubrir columnas capilares. Una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP con un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  se llenó con una solución de quitosano al 1 % en ácido acético al 1 % y luego se selló y se incubó durante 2 horas. El contenido de los capilares se sustituyó luego con una solución de glutaraldehído de 1 mg/ml y se dejó que la reticulación continuara durante 15 minutos. Los microcapilares se secaron luego utilizando nitrógeno gaseoso. Los pasos anteriores se repitieron dos veces más para obtener un total de tres capas de polisacárido reticulado. El ángulo de contacto de equilibrio medio medido fue  $\theta = 80 \pm 9,8$  grados.

Por último, se determinó el ángulo de contacto de los capilares recubiertos con recubrimientos a base de alginato. Para el recubrimiento de alginato/calcio (alginato/ $\text{CaSO}_4$ ), se incubó una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP con un diámetro interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  durante toda la noche con una solución de alginato de sodio al 1 %. La solución de alginato se lavó cuidadosamente con una jeringa manual. Luego se inyectó una solución de sulfato de calcio (1 %) en los microcapilares para reticular el alginato adsorbido y se incubó durante 30 minutos, después de lo cual los microcapilares se secaron con nitrógeno gaseoso. El ángulo de contacto de equilibrio medio medido fue  $\theta = 88 \pm 4,6$  grados.

Para el recubrimiento de la mezcla de alginato y quitosano: se cargó una película microcapilar de 10 orificios fabricada a partir de FEP con un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  con volúmenes iguales de una solución madre (0,25 %) de alginato de sodio premezclada vigorosamente durante 20 min con una solución madre de quitosano. Los microcapilares se incubaron durante toda la noche y luego se secaron utilizando nitrógeno gaseoso. El ángulo de contacto de equilibrio medio medido fue  $\theta = 93 \pm 4,5$  grados.

35 El recubrimiento multicapa de alginato/quitosano (Alg/Ch/Alg/Ch) se basó en el trabajo de Carneiro-da-Cunha y col. (2010) para la fabricación de películas de PET con nanocapas de quitosano/alginato. Una película microcapilar de calibre 10 fabricada a partir de FEP con un diámetro capilar interior promedio de 206  $\mu\text{m}$  se llenó con una solución de alginato de sodio al 0,2 % (pH 7) y se incubó durante toda la noche. Luego se vació la película microcapilar y se llenó con una solución de quitosano al 0,2 % en ácido acético al 1 % (pH 3) y se incubó durante 4 horas, después de lo cual la solución se eliminó manualmente. Esto se repitió manteniendo cada solución dentro de la película microcapilar durante al menos 2 horas. Los microcapilares recubiertos se secaron luego usando nitrógeno gaseoso. El ángulo de contacto de equilibrio medio medido fue  $\theta = 93 \pm 2,6$  grados.

45 La Figura 8 muestra la elevación capilar (en cm) en microcapilares de FEP recubiertos con algunas de las diferentes capas hidrófilas descritas anteriormente. Como se puede ver en esta Figura, solo capas hidrófilas compuestas de alcohol polivinílico (PVA) de bajo peso molecular, alcohol polivinílico (PVA) de bajo peso molecular reticulado, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), PVA y dextrina, PVA y gelatina, quitosano reticulado, o alginato y calcio, fueron capaces de promover la elevación capilar en los capilares recubiertos. No se probó PVA de alto peso molecular en este experimento. Incluso una pequeña elevación capilar puede, por ejemplo, ser suficiente cuando los capilares de un dispositivo de ensayo son cortos. De manera alternativa, los capilares capaces de promover solo una pequeña elevación capilar pueden incubarse horizontalmente, permitiendo así que el fluido de muestra se eleve aún más en el capilar por acción capilar. Como una alternativa adicional, la parte superior (en lugar de la parte inferior) del capilar puede entrar contacto con un fluido de muestra, permitiendo así que la muestra fluya hacia abajo del capilar por acción capilar. Ninguna de estas opciones está disponible cuando los capilares son hidrófobos.

55 Para todos los experimentos posteriores, se utilizaron capilares recubiertos con PVA de bajo peso molecular reticulado.

La Figura 9 muestra además que el recubrimiento uniforme de la pared capilar por la capa hidrófila mejora la elevación capilar de las muestras en el capilar. El recubrimiento más uniforme se logró con PVA reticulado (PVA reticulado con glutaraldehído) ("polímero A" en la Figura 9). Por lo tanto, preferiblemente, la capa hidrófila comprende, o consiste en, PVA reticulado, tal como PVA reticulado con glutaraldehído.

65 A continuación, se determinó el efecto de retener reactivos de ensayo, tales como anticuerpos, en la capa hidrófila sobre el ángulo de contacto del recubrimiento. Específicamente, los ángulos de contacto se midieron después de la incubación de microcapilares recubiertos con un anticuerpo. Las películas microcapilares de FEP de 10 orificios recubiertas previamente con PVA reticulado, gelatina, HPCM o PVA-dextrina, tal como se describió anteriormente, se

incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución de anticuerpo IgM (1 mg/ml). Los microcapilares se secaron luego utilizando nitrógeno gaseoso y se midió el ángulo de contacto de equilibrio. El ángulo de contacto de equilibrio medio se mantuvo sin cambios en el caso del PVA reticulado ( $\theta = 60 \pm 2,8$  grados) y los recubrimientos de gelatina ( $\theta = 70 \pm 1,3$  grados) aumentaron ligeramente en el caso de los capilares recubiertos con HPCM ( $\theta = 84 \pm 1,9$  grados) y se redujo ligeramente en los capilares recubiertos con PVA-dextrina ( $\theta = 58 \pm 2,3$  grados). Sin embargo, en todos los casos, el ángulo de contacto de equilibrio permaneció significativamente mejorado en comparación con los microcapilares de FEP no recubiertos, lo que indica que los reactivos pueden retenerse en las capas hidrófilas mientras se mantienen las propiedades ventajosas de los capilares recubiertos con respecto a la promoción de la elevación capilar de un fluido de muestra introducido en el capilar.

Con el fin de demostrar la posibilidad de cargar reactivos de ensayo en capilares recubiertos secos y liberar reactivos rápidamente durante la captación de la muestra por acción capilar, se cargó una película microcapilar de FEP de 10 orificios recubierta internamente con PVA reticulado con 1 mg/ml de IgM marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), se incubó durante 2 horas y luego se secó con nitrógeno gaseoso. Un extremo del capilar se sumergió luego en un tampón de pH 7,4 de 20 mM PBS y se monitorizó la fluorescencia usando un microscopio de fluorescencia confocal utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm. La Figura 10 muestra (de izquierda a derecha) un capilar seco y cargado, un capilar cargado parcialmente lleno de tampón y un capilar cargado completamente lleno de tampón. La interfaz afilada en los capilares parcialmente llenos mostró una alta concentración de anticuerpo que se transporta durante la elevación del líquido a través del capilar por acción capilar. Tanto en el capilar parcialmente lleno como en el totalmente lleno, se puede ver la difusión del anticuerpo fuera de la capa hidrófila en el tampón, lo que demuestra que el anticuerpo se libera rápidamente de la capa hidrófila en el fluido de muestra.

El efecto del peso molecular sobre la liberación de reactivos se determinó de la siguiente manera. Una película de microcapilar de FEP de 10 orificios recubierta con PVA reticulado se cargó con una solución de 1 mg/ml de IgG-FITC o IgM-FITC y se incubó durante 2 horas. El exceso de líquido se aspiró manualmente con una jeringa de plástico. Un extremo de la tira se sumergió luego en un tampón de pH 7,4 de 20 mM PBS y se monitorizó la fluorescencia usando un microscopio de fluorescencia confocal usando una longitud de onda de excitación de 488 nm, después de que la interfaz líquido-aire hubiese alcanzado el punto de equilibrio. La concentración de anticuerpo marcado con fluorescencia se midió a lo largo de la altura del capilar lleno de tampón. Los resultados se muestran en la Figura 11. Esta Figura demuestra que el anticuerpo IgM de mayor peso molecular se liberó de la capa hidrófila más lentamente que el anticuerpo IgG de inferior peso molecular. El anticuerpo IgG mostró un pico de concentración en la interfaz aire-líquido. Sin embargo, estos resultados demuestran que incluso los reactivos de ensayo de muy alto peso molecular, tales como IgM, pueden retenerse utilizando un recubrimiento hidrófilo como PVA reticulado.

La carga y la liberación de reactivos de la capa hidrófila se cuantificó utilizando un colorante fluorescente y sustratos de enzimas colorimétricos. Para este propósito, se recubrió una película microcapilar de FEP con PVA reticulado y se cargó con dos reactivos de ensayo, el orto-nitrofenil-p-galactósido (ONPG) del sustrato enzimático que produce un color amarillo en presencia de beta-galactosidasa, y la fluoresceína del colorante fluorescente. La carga se realizó mediante incubación con una solución de reactivo a base de agua o dimetilformamida (DMF) durante entre 5 minutos y 2 horas, y luego se eliminó la solución de carga con una jeringa, seguido del secado al aire de los capilares mediante la aspiración repetida de aire a través de la película utilizando una jeringa. Tras la carga de los capilares, se cuantificó la cantidad de reactivo cargado utilizando tres procedimientos diferentes.

En primer lugar, se probaron tiras de 60 mm de largo cargadas durante 1 hora con ONPG disuelto en agua a concentraciones de 0,5 a 5,0 mg/ml o disuelto en DMF a una concentración de 150 mg/ml mediante su inmersión en agua, lo que dio lugar a la absorción de agua en los capilares. Luego, el agua absorbida se eliminó con una jeringa y la concentración de ONPG se midió mediante un análisis de parámetros enzimáticos en un pocillo de placa de micropocillos mediante la adición de un exceso de enzima beta-galactosidasa y la monitorización de la absorbancia a 420 nm utilizando un lector de placa de micropocillos. Las concentraciones liberadas se determinaron por comparación de la absorbancia con una curva de calibración de concentraciones conocidas de ONPG. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Compuesto	Concentración de carga (mg/ml)		Concentración liberada (mg/ml)
ONPG	En agua	0,0	0
		0,5	0,07
		1,0	0,01
		5,0	0,06
	En DMF	150,0	4,67

En segundo lugar, la concentración de ONPG cargado se determinó dentro de la película capilar sumergiendo una película microcapilar de FEP recubierta con PVA reticulado, y se cargó durante 5 minutos con 150 mg/ml de ONPG disuelto en DMF, en soluciones acuosas de enzima beta-galactosidasa (a 0,2 U/ $\mu$ L). La solución se introdujo en la tira de ensayo y se incubó durante 1 hora para permitir la conversión enzimática completa del ONPG cargado. Posteriormente, la solución se retiró de las tiras de ensayo de MCF con una jeringa y se leyó la absorbancia con un lector de microplacas a 420 nm, y la absorbancia se comparó con una curva de calibración de concentraciones conocidas de ONPG convertido enzimáticamente. En esta prueba, se descubrió que una concentración promedio de 3,4 mg/ml de ONPG estaba cargada dentro de estas tiras de ensayo cargadas de ONPG.

En tercer lugar, se cargó una película microcapilar de FEP recubierta con PVA reticulado con colorante fluorescente a través de una incubación de 5 minutos con 100  $\mu$ g/ml de fluoresceína disuelta en agua, seguido de la eliminación de la solución y secado al aire por repetición del paso de aire a través de las tiras con una jeringa. Luego, se probaron películas microcapilares cargadas de 80 mm de largo sumergiéndolas en agua, y se midió la concentración de fluoresceína cargada dentro de la tira de ensayo mediante la obtención de imágenes de las tiras iluminadas con luz azul de 450 nm y la fluorescencia verde de imágenes usando una cámara digital a través de un filtro de paso largo con un límite de 500 nm. La intensidad de fluorescencia dentro de las tiras de ensayo sumergidas en agua se comparó con una curva de calibración de intensidad de fluorescencia observada en películas de microcapilares de FEP llenas con concentraciones conocidas de fluoresceína. La concentración de fluoresceína en las tiras de ensayo sumergidas varió a lo largo de la tira de ensayo, lo que indica una liberación muy rápida de reactivo, de modo que en la entrada en la que el agua entró en la tira, la concentración de fluoresceína era demasiado baja para medirse utilizando el sistema de formación imágenes de fluorescencia usado. En contraste, en la parte superior de la tira de ensayo, se observó una alta concentración de fluoresceína, con un gradiente de fluoresceína (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con el patrón de liberación observado con IgM e IgG indicado anteriormente.

Tabla 2

Distancia desde la entrada:	Tira de ensayo 1				Tira de ensayo 2
	30 mm	40 mm	60 mm	70 mm	70 mm
Número de capilar	Concentración de fluoresceína mg/ml				
1	0,1	0,4	1,9	2,2	1,1
2	0,2	0,3	1,0	1,2	1,1
3	0,1	0,4	1,0	1,2	1,1
4	0,1	0,4	1,0	1,2	1,3
5	0,1	0,3	1,0	1,3	1,1
6	0,2	0,4	1,1	1,2	1,1
7	0,2	0,8	1,4	1,1	1,1
8	0,3	0,5	1,0	1,0	1,4
9	0,2	0,6	1,2	1,2	1,1
10	0,1	0,4	1,4	2,4	1,0

Los resultados anteriores muestran que pueden retenerse en los capilares diferentes clases de reactivos con diferentes propiedades fisicoquímicas, tales como diferentes pesos moleculares, utilizando capas hidrófilas, tales como PVA reticulado, con eficacia similar. Esto demuestra que no existen requisitos fisicoquímicos específicos para retener los reactivos de ensayo.

La Tabla 2 muestra además que un reactivo de ensayo retenido en la capa hidrófila se libera de manera uniforme en todos los capilares de una única tira de ensayo. En segundo lugar, el reactivo se mezcla rápidamente con el fluido de muestra y forma un gradiente de reactivo en el fluido de muestra, como también se ve en la Figura 11. La Tabla 2 también demuestra que la concentración del reactivo de ensayo liberado de la capa hidrófila es generalmente el 1 % de la concentración de la solución de carga.

Para demostrar adicionalmente que pueden retenerse reactivos de ensayo de diferentes tipos en la capa hidrófila, se cargó glucosa en las tiras de ensayo para permitir la detección de microorganismos capaces de fermentar la glucosa en una muestra de prueba. Como anteriormente, se cargó una película microcapilar de FEP recubierta con PVA reticulado utilizando una solución de carga de 700 mg/ml de glucosa en agua. Después de retirar la solución de carga y secar los capilares, se cortaron las tiras de ensayo y se sumergieron en agua. El agua que se recogió en las tiras de

ensayo se eliminó con una jeringa y la concentración de glucosa liberada en el agua se midió con un ensayo enzimático de glucosa disponible comercialmente, utilizando hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La concentración de glucosa liberada fue de 2,9 mg/ml, lo que demuestra que la glucosa puede retenerse en una capa hidrófila, tal como PVA reticulado.

5 También se investigó el efecto de la viscosidad de la solución de carga sobre la capacidad de la solución de carga para cargar una capa hidrófila con reactivo de ensayo. En este ejemplo, una solución de 100 µg/ml de fluoresceína disuelta en agua sola o agua más glicerol a una concentración de 0 % v/v, 10 % v/v, 50 % v/v o 80 % v/v se introdujo en una película microcapilar de FEP recubierta con PVA reticulado. La viscosidad de estas soluciones de glicerol fue de 1,31 mPa·s, 6,00 mPa·s y 60,1 mPa·s, respectivamente, cuando se midió a 20 °C. Después de una incubación de 10 5 minutos, la solución de carga se eliminó y los capilares se secaron mediante la eliminación de la solución de carga mediante succión con una jeringa. La película de FEP cargada se cortó en tiras de 10 cm de largo y se sumergió en agua que se extrajo rápidamente en los capilares. La concentración de fluoresceína liberada en el agua se midió dentro de la tira de ensayo mediante la formación de imágenes de las tiras iluminadas con luz azul de 450 nm y la formación de imágenes de fluorescencia verde usando una cámara digital a través de un filtro de paso largo con un límite de 15 500 nm. Al comparar la intensidad de fluorescencia verde con las tiras de control llenas con concentraciones conocidas de fluoresceína, se descubrió que la concentración de colorante a 4 cm desde el extremo de los capilares sumergidos en el agua depende de la concentración de glicerol en la solución utilizada para cargar capilares con fluoresceína, de la siguiente manera: a medida que la concentración de glicerol en la solución de carga aumentó de 0 % a 10 %, 50 % y 20 80 % v/v, la cantidad de fluoresceína liberada aumentó de 1,9 µg/ml a 4,5 µg/ml, de 6,3 µg/ml a 14,4 µg/ml, respectivamente. Estos resultados demuestran que al aumentar la viscosidad de la solución de carga aumenta la cantidad de reactivo de ensayo retenido en la capa hidrófila. Esto sugiere que una película del reactivo de ensayo se deposita sobre la capa hidrófila. Se cree que el aumento de la viscosidad de la solución de carga hace que esta capa de reactivo sea más gruesa al aumentar el número de capilares, Ca, lo que produce una mayor retención de reactivo.

25 La película microcapilar (MCF) extruida recubierta internamente con una capa hidrófila se puede usar para formar la base de una nueva plataforma para ensayos, tales como los ensayos para la determinación del grupo sanguíneo y la identificación de bacterias, lo que proporciona un procedimiento simple y rentable. Los principales aspectos de las realizaciones preferidas de la presente invención implican:

30 1. Recubrir cada microcapilar internamente con una capa hidrófila. Esto se puede hacer mediante la adsorción de polímeros como el alcohol polivinílico en la superficie interior de la película microcapilar (MCF), opcionalmente seguido de reticulación. Por ejemplo, los capilares se pueden recubrir con 20 mg/ml de solución de PVA en agua y luego se puede aspirar el líquido dejando una película delgada en la superficie del orificio capilar. El polímero recubre la superficie plástica por adsorción pasiva.

35 2. Cargar cada microcapilar individual con un reactivo de ensayo específico. Esto se puede hacer inyectando las soluciones apropiadas en los canales respectivos de una MCF que puede tener varios metros de longitud. Las soluciones se dejan luego reposar dentro del capilar a una temperatura constante durante unos minutos (Figura 12). Luego, la solución se seca permitiendo que un gas inerte, tal como el nitrógeno, fluya suavemente a través de los capilares o limpiando la solución con un material absorbente tal como papel de seda.

40 2. La MCF se puede cortar en longitudes de, por ejemplo, 1 cm (Figura 13). Esto representa una ruta de fabricación muy eficaz para dispositivos de ensayo.

45 3. La operación se realiza permitiendo que una muestra de fluido aumente en los canales de la MCF por acción capilar. El/los reactivo(s) de ensayo incorporado(s) en la capa hidrófila se difunde(n) y reacciona(n) con cualquier sustancia de interés presente en el fluido de muestra.

50 4. La detección puede ser a simple vista o automatizada.

La MCF de FEP extruida está disponible en Lamina Dielectrics, Ltd., Daux Road, Billingshurst, West Sussex RH14 9SJ, Reino Unido.

55 Las Figuras 12-14 ilustran un procedimiento para fabricar un dispositivo de ensayo de acuerdo con una realización de la presente invención.

60 En la Figura 12, se proporciona una longitud de película microcapilar 200 en una bobina 202. Los capilares están recubiertos con una capa hidrófila. La película se fabrica a partir de FEP, tal como se analizó anteriormente. La longitud total de la película microcapilar puede ser, por ejemplo, al menos 1 m. Longitudes mayores, por ejemplo, de hasta 5 m, 10 m, 20 m, o más, se puede fabricar mediante el procedimiento de extrusión descrito anteriormente.

65 Posteriormente, es posible cargar cada microcapilar con un reactivo de ensayo, tal como un anticuerpo. Esto se puede hacer, por ejemplo, utilizando la acción capilar o una jeringa y una aguja. De manera conveniente, el paso de carga puede llevarse a cabo mientras la MCF permanece en una bobina. Cuando se desea cargar cada microcapilar de manera idéntica, esto se puede realizar sumergiendo un extremo de la MCF en una sola solución de carga, esta



solución de carga se absorbe en cada orificio capilar mediante acción capilar o se aspira en cada orificio microcapilar utilizando un único aspirador (no mostrado) en el extremo opuesto de la MCF. Cuando se desea cargar uno o más microcapilares de manera diferente, los microcapilares se pueden separar en un extremo de la MCF, ya sea en microcapilares individuales o en un conjunto de microcapilares.

5 La separación puede lograrse cortando la película entre los capilares. La separación de los microcapilares de esta manera, facilita el contacto de cada microcapilar, o conjunto de microcapilares, con una solución de carga diferente. Esto es útil cuando cada microcapilar o conjunto de microcapilares debe cargarse de manera diferente. La solución de carga se puede absorber en cada orificio capilar por acción capilar o aspirar en cada orificio microcapilar o conjunto de orificios microcapilares, utilizando un solo aspirador. De manera alternativa, se puede usar un aspirador separado para cada capilar o conjunto de capilares. El aspirador puede ser, por ejemplo, una pipeta o una jeringa.

10 Como se muestra en la Figura 12, pueden cargarse duplicados de orificios microcapilares con el mismo reactivo de ensayo, por ejemplo, anticuerpo, para proporcionar redundancia de medición en el dispositivo.

15 Posteriormente, el microcapilar cargado se corta a una longitud deseada (por ejemplo, 5-50 mm), como se muestra en la Figura 13, para formar un dispositivo de ensayo 204. Como se entenderá, la bobina larga de MCF se puede usar para formar muchos dispositivos de ensayo. Por lo tanto, solo se requiere un recubrimiento y un solo paso de carga, aunque se producen muchos dispositivos de ensayo.

20 A continuación, como se muestra en la Figura 14, el dispositivo de ensayo 204 puede colocarse en un estuche de plástico 206 y usarse para llevar a cabo un ensayo de determinación de grupo sanguíneo sumergiendo uno de los extremos de la tira de ensayo en una pequeña gota de sangre u otra muestra líquida. Cuando el extremo libre del dispositivo 204 se sumerge en una muestra de sangre, la acción capilar hace que la sangre se introduzca y aumente en los orificios capilares. La ventana de observación 208 permite que la aglutinación se detecte ópticamente cerca de  $h_{max}$ .

25 Como se muestra en la Figura 15, los anticuerpos retenidos en el recubrimiento hidrófilo de los capilares de MCF se liberan rápidamente. El recubrimiento hidrófilo se reticula, preferiblemente, con agentes de reticulación conocidos por los expertos en la materia, para reducir el ángulo de contacto de la muestra con la pared y aumentar la velocidad de elevación de la sangre en los capilares.

30 Los experimentos mostrados en las Figura 16-19 se realizaron todos en una MCF de FEP recubierta con PVA como capa hidrófila. El espesor de la capa hidrófila era de 1-2  $\mu\text{m}$ . El peso molecular del PVA utilizado para recubrir los orificios capilares de MCF de FEP era de 13.000 a 23.000 g/mol.

35 Cuando los glóbulos rojos presentes en la muestra de sangre no tienen el antígeno al cual el anticuerpo retenido en la capa hidrófila se une específicamente en su superficie, se descubrió que la sangre fluía en el interior y se elevaba en el orificio capilar de modo normal. Sin embargo, cuando los glóbulos rojos presentes en la muestra de sangre tenían el antígeno al cual el anticuerpo retenido en la capa hidrófila se une específicamente en su superficie, se produjo una reacción de aglutinación. Esto dio lugar a la aglutinación de glóbulos rojos en el capilar con una separación visible de los glóbulos rojos y el suero sanguíneo a lo largo del capilar (Figuras 16A-D y 17A-C). Además, la muestra de sangre aglutinada alcanzó una altura más baja en el orificio capilar y luego los glóbulos rojos aglutinados (Figura 16C). En ausencia de aglutinación, la sangre puede alcanzar una altura máxima,  $h_{max}$ , en los capilares dictada por la relación de las fuerzas de tensión superficial a resistencia (viscosa), que según la ecuación de Young-Laplace se pueden determinar a partir del ángulo de contacto de equilibrio y la tensión superficial de sangre entera con aire.

40 Tanto en la respuesta óptica como de altura de la muestra de sangre en cada capilar se puede detectar una prueba de aglutinación después de unos pocos segundos, preferiblemente después de 120 segundos e idealmente después de 30 segundos (Figura 19) de diferentes maneras.

45 Por ejemplo, se puede medir una intensidad de escala de grises a través del conjunto de microcapilares cerca de  $h_{max}$  (Figura 18A). Para los capilares en los que la sangre no se aglutinó (por lo tanto, capaz de alcanzar la altura máxima en el capilar, es decir,  $h_{max}$ ), el gráfico revelaría una fuerte señal correspondiente a una fuerte absorción de luz, mientras que para los capilares en los que los glóbulos rojos se aglutinaron con la liberación del anticuerpo complementario, el gráfico no mostraría ninguna señal en comparación con el fondo debido a la ausencia de glóbulos rojos en el área escaneada.

50 De manera alternativa, se puede formar una imagen de una sección corta del capilar, preferiblemente de 5 mm o menos de longitud a través del conjunto de microcapilares a una distancia de referencia, por ejemplo,  $h_{max}/2$  (Figura 18B) y el resultado de la aglutinación detectada ópticamente por una persona experta, como sangre aglutinada presente como parches de glóbulos rojos (por ejemplo, Figuras 16B y 18E), mientras que los no aglutinados se presentan como un gráfico de intensidad de color muy homogéneo a lo largo de la sección de captura imágenes (Figuras 16C y 18G).

65 Como alternativa adicional, la aglutinación se puede detectar mediante el trazado de la escala de grises a lo largo de cada capilar individual en el área escaneada, con los glóbulos rojos aglutinados dando una alta variabilidad de señal.

Por ejemplo, se pueden tomar imágenes de los capilares iluminando el fondo de la película capilar con un LED y escaneando la parte superior de la película capilar con un detector CCD, como un escáner de superficie plana con tecnología CCD en modo de transmitancia a una resolución mínima de 1.200 ppp, como en el caso de las Figuras 16A-18L. Las imágenes RGB de los capilares se adquirieron con el escáner de superficie plana con tecnología CCD y luego se dividieron en tres canales diferentes, rojo, verde y azul, y se convirtieron a 8 bits con el software de análisis de imágenes ImageJ, un programa gratuito proporcionado por el Instituto Nacional de Salud de EE.UU. Ese fue el caso de la Figura 16A y la Figura 18A. Utilizando las mismas imágenes de 8 bits, se trazó un perfil en escala de grises a lo largo de cada capilar individual. Un valor de escala de grises de 255 representa el color blanco (100 % de transmitancia de luz), mientras que un valor de escala de grises de 0 representa el negro (0 % de transmitancia de luz). La sangre no aglutinada se presenta como un perfil de escala de grises suave (véase, por ejemplo, la Figura 16C), mientras que un perfil de escala de grises variable indica la presencia de sangre aglutinada en el capilar (véase, por ejemplo, la Figura 16D).

Preferiblemente, la presencia de aglutinación se determina utilizando un dispositivo que incorpora un detector de CCD, que también es capaz de realizar un análisis de imágenes y se presenta al usuario una respuesta de sí/no con respecto a la presencia de sangre aglutinada en cada capilar.

Las superficies planas del material de MCF junto con una equivalencia estrecha en el índice de refracción entre el material de la pared y la muestra líquida permiten medir la concentración de glóbulos rojos a lo largo y ancho de cada capilar individual utilizando sistemas de detección óptica baratos como (pero sin limitarse a) cámaras CCD, microscopios digitales, cámaras digitales, cámaras de teléfonos inteligentes o escáneres de superficie plana. Por lo tanto, los capilares se pueden interrogar de forma individual utilizando detectores ópticos rentables. La equivalencia estrecha en el índice de refracción entre el material de la pared y la muestra líquida también mejora la facilidad de detección de muestras de sangre aglutinadas en los capilares a simple vista.

Además de la determinación del grupo sanguíneo, los dispositivos de ensayo de la invención se pueden usar para otras aplicaciones, incluyendo la identificación de bacterias presentes en una muestra de prueba.

Por ejemplo, *E. coli* puede identificarse por su capacidad para expresar de manera inducible la actividad de beta-galactosidasa en presencia de un sustrato para esta enzima. Por el contrario, la *Salmonella*, que de otro modo son bacterias gramnegativas similares a *E. coli*, no puede expresar la beta-galactosidasa. La capacidad de convertir sustratos de beta-galactosidasa tal como el orto-nitrofenil-p-galactósido (ONPG), por lo tanto, se usa ampliamente como prueba de identificación para distinguir *E. coli* de *Salmonella*. Cuando la *E. coli* se cultiva durante toda la noche en caldo LB, se observan bajos niveles de actividad de beta-galactosidasa, sin embargo, después del cultivo en presencia de un sustrato como ONPG, lactosa, isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), o galactosa, se expresan niveles altos de enzima beta-galactosidasa.

Una película microcapilar de FEP de 10 orificios se recubrió internamente con PVA reticulado. La película microcapilar de prueba se preparó cargando primero los capilares con ONPG mediante el llenado de los capilares con una solución de 150 mg.ml<sup>-1</sup> de ONPG en DMF e incubando durante 5 minutos. Luego se retiró la solución de sustrato y la película microcapilar se secó al aire con una jeringa para pasar el aire repetidamente a través de los capilares. Se cortaron siete tiras de ensayo de esta película microcapilar cargada con ONPG y se sumergieron en una de 7 muestras acuosas diferentes. Estas comprendían agua (1); medio de caldo de lisogenia Luria-Bertani estéril (LB) (2); una solución de 0,1 U/μl de enzima β-galactosidasa (3); un cultivo durante toda la noche de *E. coli* (número de registro ATCC: 25922) suspendido en LB (4); un cultivo durante toda la noche de *Salmonella typhimurium* (cepa SL3261) suspendido en LB (5); un cultivo durante toda la noche de *E. coli* suspendido en una solución salina tamponada con fosfato PBS (6); un cultivo durante toda la noche de *S. typhimurium* suspendido en PBS (7). Las tiras de ensayo de control negativo que consisten en PVA recubierto con PVA reticulado, pero no cargado con ONPG se sumergieron en las mismas muestras (a continuación, denominadas no sustrato). A modo de comparación, también se realizaron ensayos similares en placas de 96 pocillos con solución de sustrato de ONPG (concentración final 1 mg.ml<sup>-1</sup>) agregada a las diferentes muestras en un volumen final de 100 μl.

En los experimentos de control realizados en placas de 96 pocillos, no se observó color amarillo (lo que indicaría la conversión enzimática de ONPG) en ninguna suspensión bacteriana. Después de la incubación durante toda la noche para permitir la inducción de la actividad de beta-galactosidasa, los pocillos que contenían suspensiones de *E. coli* pero no de *S. typhimurium* se volvieron amarillos, lo que indica la inducción de la actividad de beta-galactosidasa y, por lo tanto, permite la identificación de *E. coli*.

Cuando se usaron las tiras de ensayo de MCF recubiertas con PVA reticulado cargadas con ONPG, se observó un patrón similar de producción de color amarillo. Cuando se sumergieron en las muestras, las tiras de ensayo absorbieron rápidamente muestras acuosas en todos los capilares, como cabía esperaba. Después de 5 minutos de incubación, las tiras sumergidas en la muestra (3) se volvieron amarillas, lo que indica una reacción rápida entre ONPG y la solución de enzima beta-galactosidasa de control positivo. En contraste, ninguna otra tira de ensayo cambió de color, lo que indica que se esperaba que ni el caldo LB, ni las suspensiones bacterianas, contuvieran la enzima beta-galactosidasa. Sin embargo, las tiras de ensayo se sumergieron en cultivos durante toda la noche de *E. coli* (suspensiones (4) y (6)), se volvieron amarillo oscuro, lo que indica la presencia de la enzima beta-galactosidasa. En

contraste, las tiras de ensayo se sumergieron en LB (2) o suspensiones de *S. typhimurium* (5) y (7) no cambiaron de color, lo que indica que ni el medio de crecimiento bacteriano, ni el tampón, contenían beta-galactosidasa. Como se esperaba, no se observó color amarillo en ninguna de las tiras de ensayo de control recubiertas con PVA reticulado pero no cargadas con ONPG. Estos resultados se resumen en la Tabla 3.

5

Tabla 3 - Detección cualitativa de *E. coli* en microcapilares de FEP recubiertos con PVA reticulado y cargados con ONPG

Muestra	Periodo de incubación			
	Capilares cargados con ONPG		Capilares no cargados (control)	
	5 min	Toda la noche	5 min	Toda la noche
(1) Agua	-	-	-	-
(2) Caldo LB	-	-	-	-
(3) Solución beta-galactosidasa	+	+	-	-
(4) <i>E. coli</i> en caldo LB	-	+	-	-
(5) <i>S. typhimurium</i> en caldo LB	-	-	-	-
(6) <i>E. coli</i> en PBS	-	+	-	-
(7) <i>S. typhimurium</i> en PBS	-	-	-	-

Se realizó un experimento adicional para demostrar la detección rápida de la actividad enzimática bacteriana. Cultivos durante toda la noche de *E. coli* y *S. typhimurium* se diluyeron en 1:100 en caldo LB con la inclusión del inductor de beta-galactosidasa IPTG (concentración final 1 mM) durante 3 horas, y luego se probó con tiras de ensayo de microcapilares de FEP cargados con ONPG recubiertas con PVA reticulado. En estas condiciones, algunas cepas bacterianas, incluyendo *E. coli*, son capaces de producir altos niveles de beta-galactosidasa, mientras que otras, incluyendo *S. typhimurium*, no.

10

15

Como se ha indicado anteriormente, las tiras de ensayo se cargaron con ONPG y se probaron sumergiéndolas en muestras bien sin ninguna bacteria, o con *E. coli* cultivada en IPTG, o *S. typhimurium* cultivada en IPTG. El color de las tiras de ensayo cargadas con ONPG sumergidas en estas tres muestras se examinó después de 1 hora de incubación a 37 grados C. En las tiras de ensayo sumergidas en muestras de *E. coli* cultivada en IPTG, se observó un color amarillo, lo que indica la presencia de altos niveles de beta-galactosidasa. En contraste, en las tiras de ensayo sumergidas en muestras de *S. typhimurium* inducida por IPTG o ninguna bacteria, no se observó color amarillo, y las tiras de ensayo permanecieron incoloras, lo que indica que estas bacterias no pudieron producir beta-galactosidasa. Esto demuestra que las tiras de ensayo cargadas con ONPG son útiles para distinguir rápidamente bacterias muy similares que tienen una capacidad enzimática beta-galactosidasa diferente.

20

25

La capacidad de las bacterias para fermentar azúcares específicos también se usa con frecuencia para distinguir especies similares de bacterias. Por ejemplo, las *E. coli* son capaces de fermentar la lactosa y la glucosa y producir ácido cuando se incuban en presencia de cualquiera de estos azúcares. Por el contrario, la *Salmonella* tal como *S. typhimurium* solo es capaz de fermentar la glucosa y producir ácido en presencia de glucosa, pero no puede fermentar la lactosa y no produce ácido cuando se incuban en presencia de lactosa.

30

Se recubrió internamente una película microcapilar de FEP de 10 orificios con PVA reticulado. La película microcapilar de prueba se preparó cargando primero los capilares con glucosa o lactosa llenando los capilares con una solución de 1 g/l en agua e incubando durante 5 minutos. Las soluciones de azúcar se eliminaron y la película microcapilar se secó al aire con una jeringa para hacer pasar el aire repetidamente a través de los capilares. Se cortaron tres tiras de ensayo de cada uno de los microcapilares cargados de glucosa o lactosa y se sumergieron en una de 3 muestras acuosas diferentes. La primera muestra fue una muestra de control que no contenía bacterias. La segunda muestra contenía una suspensión de *E. coli*. La tercera muestra contenía una suspensión de *Salmonella typhimurium*. Las tres muestras acuosas también contenían caldo de rojo de fenol (peptona de caseína 1 g/l; NaCl 0,5 g/l; rojo de fenol 1 g/l). Todas las muestras se iniciaron con un pH de 7 y eran de color rojo brillante. Cuando se sumergió, cada muestra acuosa se extrajo rápidamente de las tiras de ensayo, y los microcapilares resultaron ser claramente de color rojo brillante debido al colorante indicador de rojo de fenol en la muestra. Todas las tiras de ensayo se incubaron luego durante 1 hora a 37 grados C. En presencia de glucosa o lactosa, las tiras sumergidas en la muestra de control sin células permanecieron de color rojo brillante. Como cabía esperar, las tiras de ensayo cargadas con glucosa y lactosa se sumergieron en muestras con color amarillo brillante, lo que indica una reducción del pH y, por lo tanto, demuestra la presencia de bacterias capaces de fermentar tanto glucosa como lactosa en estas muestras. Por el contrario, solo la tira de ensayo cargada de glucosa sumergida en la muestra que contenía *S. typhimurium* se volvió amarilla, mientras que las tiras cargadas de lactosa permanecieron de color rojo brillante, confirmando la presencia de una cepa bacteriana que es capaz de fermentar la glucosa, pero no la lactosa.

40

45

50

Para demostrar que también se pueden usar recubrimientos hidrófilos distintos del PVA reticulado para la retención de los reactivos de ensayo, se recubrió la película microcapilar de FEP con los polímeros HPMC (hidroxil propil metilcelulosa) y gelatina incubando películas de microcapilares de FEP rellenas con un 0,2 % p/v de solución de gelatina o una solución de 0,6 % p/v de HPMC durante toda la noche. Las soluciones de polímero se retiraron de la película microcapilar y la película se secó aspirando repetidamente aire a través de la tira de película con una jeringa.

55

Se usó una película microcapilar de FEP recubierta con PVA reticulado como control. Las longitudes de 8 cm de cada película recubierta con polímero se cargaron luego con reactivo ONPG sumergiendo la película en una solución de ONPG a 150 g/l. Después de 5 minutos de incubación, la solución de ONPG se eliminó y los capilares se secaron con una jeringa. Las películas de prueba se sumergieron luego en agua, y la cantidad de reactivo ONPG liberado en el agua se midió mediante una determinación colorimétrica de parámetros utilizando la enzima beta-galactosidasa. Con las tiras de ensayo recubiertas con PVA, se liberaron 7,8 mg/ml de ONPG, con las tiras de ensayo recubiertas de gelatina se liberaron 7,2 mg/ml de ONPG y con las tiras de ensayo recubiertas con HPMC se liberaron 21,5 mg/ml de ONPG. Estos resultados demuestran que se puede usar un intervalo de diferentes recubrimientos hidrófilos para retener los reactivos de ensayo en los capilares, y que estos reactivos de ensayo se liberan rápidamente en una muestra líquida extraída en los capilares por acción capilar.

A continuación, se probó si los reactivos de ensayo pueden inmovilizarse en la capa hidrófila. Esto es útil, por ejemplo, para los ELISA cuantitativos donde el anticuerpo de captura debe inmovilizarse en una superficie.

Se recubrió una película microcapilar de FEP de 10 orificios con PVA de bajo peso molecular y se reticuló con glutaraldehído durante 2 h, tal como se describe para otros ejemplos anteriores. Luego se agregó una solución de 40 µg/ml de un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno específico de la próstata (PSA) humano a los capilares y el anticuerpo se unió covalentemente a la capa hidrófila incubándose secuencialmente en glutaraldehído al 5 % v/v y luego 1 mg/ml NaBH<sub>4</sub>, y luego bloqueado con BSA al 3 %. La película microcapilar se cortó luego en un número de tiras de ensayo de 8 cm de largo y se conectó a varios micropocillos a través de sellos de ajuste a presión. El dispositivo se colocó en posición vertical y las soluciones de inmunoensayo se cargaron secuencialmente en los pocillos. Debido a la naturaleza hidrófila de los capilares recubiertos, las soluciones funcionaron por gravedad hasta que no quedaba solución en los pocillos. La secuencia de soluciones en el ensayo ELISA de tipo sándwich incluyó proteínas recombinantes con los estándares durante 5 minutos, 1 µg/ml de anticuerpo marcado con biotina durante 5 minutos, 1 µg/ml de conjugado de enzima estreptavidina-HRP de alta sensibilidad durante 5 minutos. Luego se lavaron las tiras 4 veces con PBS-Tween, después de lo cual se añadieron 4 mg/ml de sustrato cromogénico OPD. El volumen de reactivo agregado a los pocillos en cada paso fue de 200 microlitros. La unión del anticuerpo de detección al PSA unido por el anticuerpo de captura se determinó a partir de la escala de grises de la división del canal azul de la imagen RGB de la película microcapilar capturada con un escáner de superficie plana durante 2 minutos de incubación del sustrato OPD. La Figura 20 muestra que a medida que aumentaba la cantidad de proteína PSA recombinante en la muestra, aumentaba la señal de absorbancia absoluta, demostrando que tanto el anticuerpo de captura se había inmovilizado con éxito en la capa hidrófila como que era posible la detección cuantitativa del antígeno.

Se probaron dos procedimientos para incluir un reactivo en la capa de recubrimiento hidrófilo. Primero, se inyectó manualmente un cartucho fluido de 30 mm de largo que contenía reactivo de ensayo a un microcapilar de teflón de FEP de 200 micras de diámetro interno y 30 cm de largo recubierto con PVA de APM reticulado, como se muestra en la Figura 21A. El cartucho fluido se aspiró luego desde el otro extremo del capilar utilizando una bomba de vacío como se muestra en la Figura 21B.

Se midió tanto el tiempo que el cartucho tarda en recorrer los 30 cm de distancia como la correspondiente longitud final del cartucho. La velocidad de flujo superficial líquida media,  $v$ , y la viscosidad aparente del fluido,  $\eta$ , se variaron al repetir los experimentos en presencia de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 % v/v de glicerol. Los datos en la Figura 22 muestran que el espesor de la película depositada sigue de cerca la ley de Taylor, en la cual la reducción en la longitud es proporcional al número capilar, dado por:  $Ca = \eta v / \gamma$ , donde  $\gamma$  es la tensión superficial de las mezclas de glicerol:agua.

Sorprendentemente, la cantidad de fluido depositado aumenta linealmente con la velocidad de flujo superficial media. Tal resultado es sorprendente cuando se toman en cuenta las fuerzas convectivas solas. Cabe señalar que el cizallamiento aumenta con la velocidad del fluido, lo que se cree que hace que la película sea más fina.

La deposición completa del cartucho de fluido es posible usando longitudes de microcapilares más largas o longitudes de cartucho más cortas. El volumen total de un cartucho de agua de 10 mm de largo se depositó al 100 % en un capilar de 30 cm de largo utilizando una velocidad de flujo superficial de 30 mm/s. La película líquida fina depositada puede secarse pasando un gas inerte como el nitrógeno a través del microcapilar.

Un procedimiento alternativo de deposición consiste en cargar completamente los microcapilares con el reactivo de ensayo disuelto en un fluido, tal como el agua (Figura 23A). Luego, el fluido se expulsa del microcapilar con aire presurizado o gas inerte, tal como el nitrógeno. El espesor de la película se controla mediante el número de capilar, que depende de la viscosidad del fluido, la tensión superficial y la velocidad de flujo superficial media del aire/gas durante la eliminación del exceso de reactivo (Figura 23B). La película líquida fina depositada puede secarse pasando un gas inerte, tal como el nitrógeno, a través del microcapilar. Además, el exceso de reactivo de ensayo eliminado puede ser reutilizado.

Se realizó un experimento para probar una combinación de ensayos de fermentación de azúcar y ensayos enzimáticos para la identificación específica de bacterias. Los capilares individuales de 200 micras de diámetro interior recubiertos con PVA de APM reticulado se cargaron individualmente con diferentes reactivos para realizar una combinación de ensayos de fermentación colorimétrica de azúcar y ensayos enzimáticos tal como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Reactivos cargados en capilares individuales

Reactivos cargados		
Número de capilar	Ensayos de fermentación	Ensayos enzimáticos
1	Ninguno	Ninguno
2	Glucosa	Ninguno
3	Maltosa	4- Nitrofenil fosfato
4	Manitol	4- Nitrofenil fosfato
5	Manosa	4-Nitrofenil $\beta$ -D-glucurónido
6	Sacarosa	4-nitrofenil $\beta$ -D-glucurónido
7	Trehalosa	4-Nitrofenil $\beta$ -D-glucopiranosido
8	N-acetil glucosamina	4-Nitrofenil $\beta$ -D-glucopiranosido
9	Arginina	4-Nitrofenil $\beta$ -D-galactopiranosido
10	Urea	4-Nitrofenil $\beta$ -D-galactopiranosido

5 Las tiras de fermentación de azúcar tenían los capilares cargados individualmente con azúcares a una concentración de 750 mg/ml con la excepción de manosa (450 mg/ml) o arginina (700 mg/ml) que contenía glucosa (10 mg/ml) y piridoxal (0,1 mg/ml) o una solución de urea a 500 mg/ml; las tiras de ensayo enzimático se cargaron con sustratos enzimáticos a una concentración de 500 mg/ml (tal como se resume en la Tabla 4).

10 Las tiras se recortaron para producir tiras cortas de 30 mm de largo, que se sumergieron en muestras que contenían bacterias, ya sea *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus Epidermidis* ATCC 12228 o *Staphylococcus Saprophyticus* ATCC 15305 resuspendidas en medio de suspensión Microbatch™ Staph 12S. Las tiras se incubaron durante toda la noche a 37 °C y la identificación positiva/negativa de los ensayos en capilares individuales se realizó mediante la obtención de imágenes de las tiras con una cámara CCD.

15 Fermentación de azúcar: si se fermenta un azúcar, las bacterias producirán productos finales ácidos y el pH del medio disminuirá. El medio contiene un indicador de pH para indicar la producción de ácido. Una prueba positiva para la fermentación de azúcar consiste en un cambio de color de naranja a amarillo, que indica un cambio de pH a ácido.

20 Degradación de arginina y urea (detección de arginina dihidrolasa/ureasa): cuando está presente arginina o urea, el pH del medio aumenta. Por consiguiente, una prueba positiva para la detección de arginina dihidrolasa o ureasa consiste en un cambio de color de naranja a púrpura que indica un cambio de pH a alcalino.

25 Detección de enzimas: los sustratos enzimáticos son normalmente incoloros. Si las bacterias tienen las enzimas seleccionadas, los sustratos se hidrolizarán, liberando compuestos que producirán un color amarillo que indica una reacción positiva.

Las tiras con imágenes se muestran en la Figura 24 y la identificación de las bacterias resultante de la interpretación de los datos se resume en la Tabla 5.

30 **Tabla 5.** Resultados de la fermentación colorimétrica y ensayos enzimáticos. N - naranja; A - amarillo; P - púrpura; T - transparente

Ensayos de fermentación	Número de capilar (de izquierda a derecha)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 25923	N	A	A	A	A	A	A	A	A	N/P	P
<i>Staphylococcus Epidermidis</i> ATCC 12228	N	A	A	N	N	A	N	N	P	P	
<i>Staphylococcus Saprophyticus</i> ATCC 15305	N	A	A	A	N	A	A	N	N	P	
<i>Staphylococcus Aureus</i>	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T	

(continuación)

		Número de capilar (de izquierda a derecha)									
<b>Ensayos enzimáticos</b>	ATCC 25923										
	<i>Staphylococcus Epidermidis</i>	T	T	T	T	A	A	T	T	T	T
	ATCC 12228										
	<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	T	T	T	T	T	T	T	T	A	A
	ATCC 15305										

En otra realización, se muestra en la Figura 25 un dispositivo para realizar inmunoensayos que consisten en múltiples capilares recubiertos con la capa de polímero y en los cuales los antígenos o anticuerpos se inmovilizan covalentemente en la capa. El ensayo puede realizarse sobre la base de la gravedad, sin necesidad de ningún sistema hidráulico. La muestra y los reactivos se pueden cargar manualmente con un gotero, pipeta, jeringa u otro dispositivo de manipulación de líquidos manual, o usando de forma automática, por ejemplo, una bomba de jeringa. Un dispositivo de este tipo proporciona una funcionalidad similar al ensayo de captura PSA descrito anteriormente (e ilustrado en la Figura 20) con un procedimiento de carga alternativo.

## Referencias

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan al mismo por referencia en su totalidad.

- 15 Beck, M.; Brockhuis, S.; van der Velde, N.; Breukers, C.; Greve, J.; Terstappen, L. W. M. M. *Lab on a chip* 2012, 12, 167-173.
- 20 Carneiro-Da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Carvalho, S., Quintas, M. A. C., Teixeira, J. A. & Vicente, A. A. 2010. *Physical and thermal properties of a chitosan/alginate nanolayered PET film. Carbohydrate Polymers*, 82, 153-159.
- Chen, W., *Surface Modification of solid phase objects by poly(vinyl alcohol)*, Patente de Estados Unidos n.º US 7.179.506 B2, 20 de febrero de 2007..
- 25 Chin y col., *Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world*, *Nat. Med.*, (2011) 17:1015-1019.
- Edwards, A. D.; Reis, N. M.; Slater, N. K. H.; Mackley, M. R. *Lab on a Chip* 2011, 11, 4267-4273.
- 30 Fujii, Y.; Henares, T. G.; Kawamura, K.; Endo, T.; Hisamoto, H. 2012,12, 1522-1526.
- Gervais and Delamarche, *Toward one-step point-of-care immunodiagnostics using capillary-driven microfluidics and PDMS substrates*, *Lab Chip*, (2009) 9:3330-3337.
- 35 Hitzbleck M., Gervais L., Delamarche E., *Controlled release of reagents in capillary-driven microfluidics using reagent Integrators*, *Lab Chip*, (2011) 11:2680-2685.
- Huang, X., Foss Jr, F. W. & Dasgupta, P. K. 2011. *Multilayer chitosan-based open tubular capillary anion exchange column with integrated monolithic capillary suppressor*. *Analytica Chimica Acta*, 707, 210-217.
- 40 Kawabata y col., *Electrokinetic analyte transport assay for alpha-fetoprotein immunoassay integrates mixing, reaction and separation on-chip*, *Electrophoresis*, (2008) 7:1399-406.
- 45 Kozlov, M.; Quarmyne, M.; Chen, W.; McCarthy, T. J. 2003. *Adsorption of Poly (vinyl alcohol) onto Hydrophobic Substrates. A General Approach for Hydrophilizing and Chemically Activating Surfaces. Macromolecules* 2003, 36, 6054-6059.
- Lee y col., *A fully automated immunoassay from whole blood on a disc*, *Lab Chip*, (2009) 9:1548-1555.
- 50 Lin, C.-H., Lin, J.-C., Chen, C.-Y., Cheng, C.-Y., Lin, X.-Z. & Wu, J.-J. 2005. *Feasibility evaluation of chitosan coatings on polyethylene tubing for biliary stent applications*. *Journal of Applied Polymer Science*, 97, 893-302.
- Madou, M. J.; Lee, L. J.; Daunert, S.; Lai, S.; Shih, C. *Biomedical Microdevices* 2001, 3, 245-254.
- 55 Mastichiadis y col., *Simultaneous Determination of Pesticides Using a Four-Band Disposable Optical Capillary Immunosensor*, *Anal. Chem.*, (2002) 74:6064-6072.
- Mccreath, G. E., Owen, R. O., Nash, D. C. & Chase, H. A. 1997. *Preparation and use of ion-exchange*

- chromatographic supports based on perfluoropolymers.* Journal of Chromatography A, 773(1-2), 73-83.
- Mohidus y col., *Paper Diagnostics for Instantaneous Blood Typing*, Anal. Chem., (2010) 4158-4164.
- 5 Sin y col., *System Integration - A Major Step toward Lab on a Chip*, Journal of Biological Engineering, (2011) 5:6.
- Uchiyama, Y.; Okubo, F.; Akai, K.; Fujii, Y.; Henares, T. G.; Kawamura, K.; Yao, T. *Lab on a chip* 2012, 12, 204-208.
- 10 van Oordt, T.; Barb, Y.; Smetana, J.; Zengerle, R.; von Stetten, F. *Lab on a chip* 2013, 13, 2888-2892.
- Wakayama, H.; Henares, T. G.; Jigawa, K.; Funano, S.; Sueyoshi, K.; Endo, T.; Hisamoto, H. 2013,13, 4304-4307.
- 15 Yacoub-George y col., *Automated 10-channel capillary chip immunodetector for biological agents detection*, Biosens. Bioelectron., (2007) 22:1368-1375.

## REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de ensayo que tiene:

5 un cuerpo unitario con una superficie exterior, siendo el cuerpo unitario sustancialmente transparente a la luz visible y formado a partir de un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm, y en donde el cuerpo unitario está formado a partir de un material hidrófobo, y  
 10 al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo unitario, en donde al menos una porción de la superficie de cada orificio capilar incluye una capa hidrófila para la retención de un reactivo de ensayo, y en donde la capa hidrófila también es sustancialmente transparente a la luz visible para permitir la interrogación óptica de los orificios capilares a través de la pared capilar.

15 2. Dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la capa hidrófila está recubierta sobre la superficie de uno o más orificios capilares.

3. Dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que un reactivo de ensayo está retenido al menos en una porción de la capa hidrófila o de la superficie recubierta con una capa hidrófila de uno o más  
 20 orificios capilares, y opcionalmente uno o más reactivos de ensayo están retenidos de manera reversible en la capa hidrófila, y/u opcionalmente uno o más reactivos de ensayo están retenidos de manera irreversible en la capa hidrófila.

4. Dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que un orificio capilar tiene un reactivo de ensayo diferente retenido en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con una capa hidrófila del orificio capilar en  
 25 comparación con al menos otro orificio capilar.

5. Dispositivo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que dos o más orificios capilares tienen el mismo reactivo de ensayo retenido en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con la capa hidrófila del  
 30 orificio capilar, para proporcionar redundancia de medición en el dispositivo.

6. Dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en: una población de primeros miembros de un par de unión respectivo, siendo cada primer miembro capaz de unirse específicamente a un segundo miembro del respectivo par de unión; un sustrato  
 35 enzimático; un colorante; un indicador de pH; una sustancia que inhibe o promueve el crecimiento de un microorganismo; reactivos de partículas; y un sustrato metabólico para un microorganismo, y opcionalmente la población de primeros miembros es una población de anticuerpos.

7. Dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en el que la capa hidrófila comprende, o consiste en, alcohol polivinílico (PVA), alcohol polivinílico (PVA) reticulado, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC), polilisina, colágeno, PVA y dextrina, PVA y dextrano,  
 40 PVA y gelatina, quitosano reticulado, o alginato y calcio.

8. Dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en el que el material hidrófobo es un fluoropolímero seleccionado del grupo que consiste en etileno propileno fluorado (FEP), tetrafluoroetileno hexafluoropropileno fluoruro de vinilideno (THV), perfluoroalcoxi (PFA), politetrafluoroetileno (PTFE),  
 45 etileno tetrafluoroetileno (ETFE) y poli (clorotrifluoroetileno) (PCTFE).

9. Sistema de ensayo, teniendo el sistema al menos un dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las anteriores reivindicaciones y un soporte para sostener el dispositivo de ensayo,  
 50 y, opcionalmente, el soporte proporciona medios de observación para permitir observar al menos una parte del dispositivo de ensayo.

10. Procedimiento de realización de un ensayo para determinar la presencia de una sustancia en un fluido de muestra utilizando un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, incluyendo el procedimiento los  
 55 pasos de:

poner una muestra de fluido en contacto con los orificios capilares del dispositivo;

60 (i) permitir que el fluido de muestra se eleve en los orificios capilares por acción capilar, poniendo así en contacto el fluido de muestra con el/los reactivo(s) de ensayo retenido(s) en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con la capa hidrófila de/de los orificio(s) capilar(es); o  
 (ii) permitir que el fluido de muestra llene los orificios capilares por gravedad, poniendo así el fluido de muestra en contacto con el/los reactivo(s) de ensayo retenido(s) en la capa hidrófila o en la superficie recubierta con la  
 65 capa hidrófoba del orificio capilar; e  
 interrogar ópticamente los orificios capilares a través de la pared capilar para determinar la presencia de la



sustancia en el fluido de muestra,  
y, opcionalmente, llevándose a cabo el paso de interrogación óptica con una cámara digital, un microscopio digital y un escáner de superficie plana.

5 11. Procedimiento para fabricar un dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, incluyendo el procedimiento:

10 proporcionar un cuerpo extruido que tiene al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo, siendo el cuerpo sustancialmente transparente a la luz visible y estando formado por un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm; insertar un fluido de recubrimiento en los orificios capilares para recubrir al menos una porción de la superficie de cada orificio capilar con una capa hidrófila a fin de retener los reactivos de ensayo, en el que la capa hidrófila también es sustancialmente transparente a la luz visible; y  
15 formar un cuerpo extruido recubierto.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además el paso de

20 insertar un fluido de carga respectivo en uno o más orificios capilares del cuerpo extruido recubierto, comprendiendo cada fluido de carga un reactivo de ensayo, para retener el/los reactivo(s) de ensayo al menos en una porción de la superficie recubierta con la capa hidrófila del/de los orificio(s) capilar(es), y formar un cuerpo extruido recubierto y cargado,  
y, opcionalmente, el paso de insertar un respectivo fluido de carga en uno o más orificios capilares del cuerpo extruido recubierto incluye llenar el orificio capilar con fluido de carga de modo que (i) el orificio capilar se llene sustancialmente a lo largo de su longitud con fluido de carga antes de eliminar el exceso de fluido de carga del orificio capilar; o (ii) solo una parte del orificio capilar se llene con fluido de carga antes de eliminar el exceso de fluido de carga del orificio capilar.  
25

30 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en: una población de primeros miembros de un par de unión respectivo, siendo cada primer miembro capaz de unirse específicamente a un segundo miembro del respectivo par de unión; una enzima; un sustrato enzimático; un colorante; un indicador de pH; una sustancia que inhibe o promueve el crecimiento de un microorganismo; reactivos de partículas; y un sustrato metabólico para un microorganismo, y opcionalmente la población de primeros miembros es una población de anticuerpos.

35 14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que incluye, además, el paso de cortar el cuerpo extruido recubierto, o recubierto y cargado, para formar un dispositivo de ensayo de una longitud requerida, en donde el cuerpo extruido recubierto, o recubierto y cargado, antes del corte, tiene opcionalmente una longitud de al menos 20 cm.

40 15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que es un procedimiento para fabricar un conjunto de n dispositivos de ensayo y que incluye, además, cortar el cuerpo extruido recubierto, o recubierto y cargado, para formar el conjunto de n dispositivos, teniendo cada dispositivo una longitud de al menos X, en donde el cuerpo extruido recubierto, o recubierto y cargado, antes del corte, tiene una longitud de al menos nX, o una longitud de al menos 20 cm.  
45

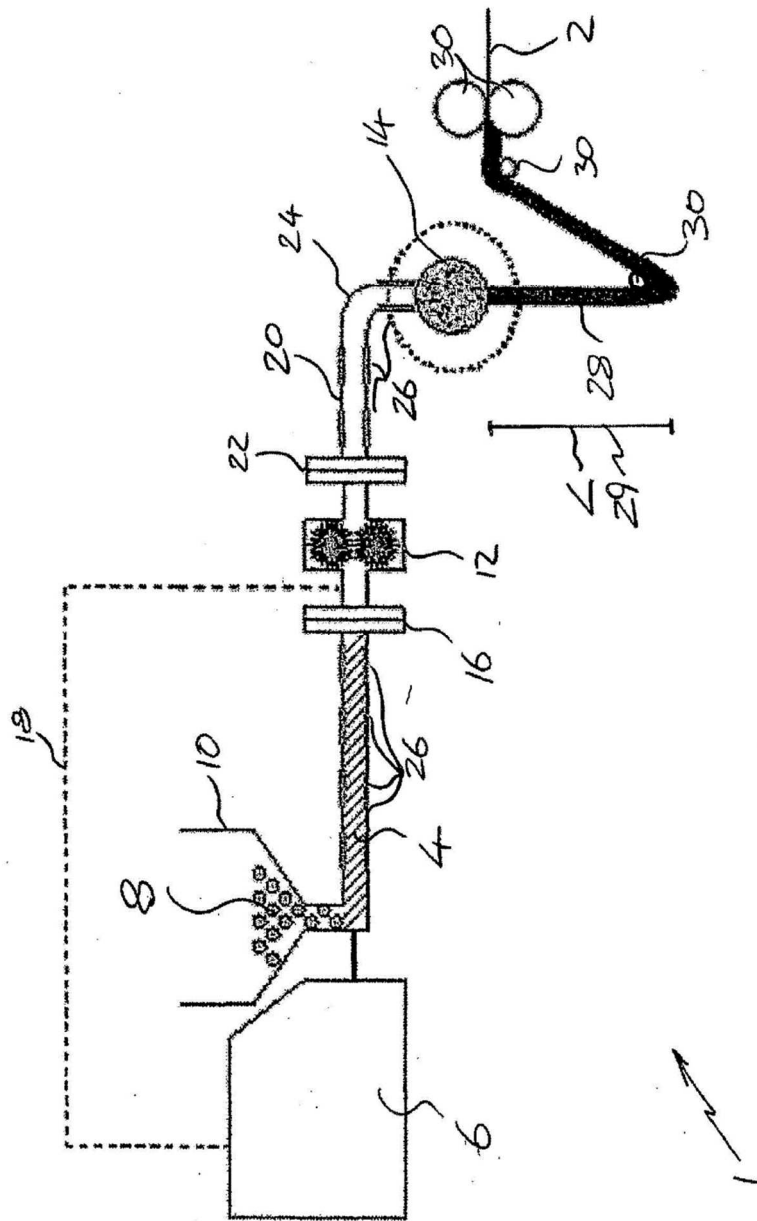


Fig. 1

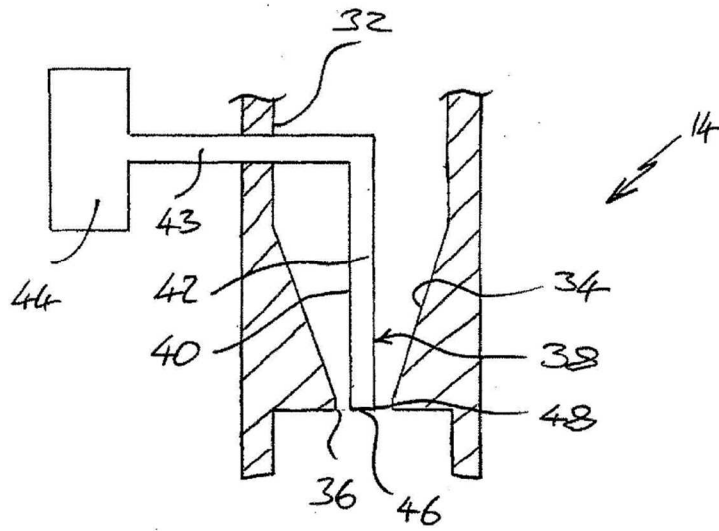


Fig. 2

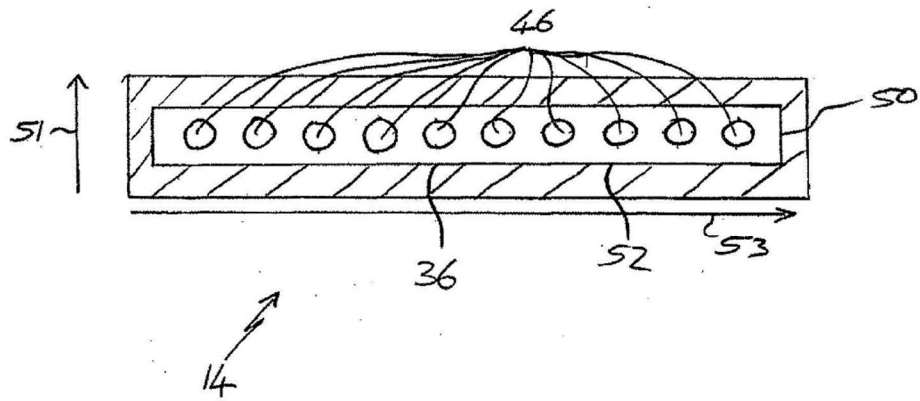
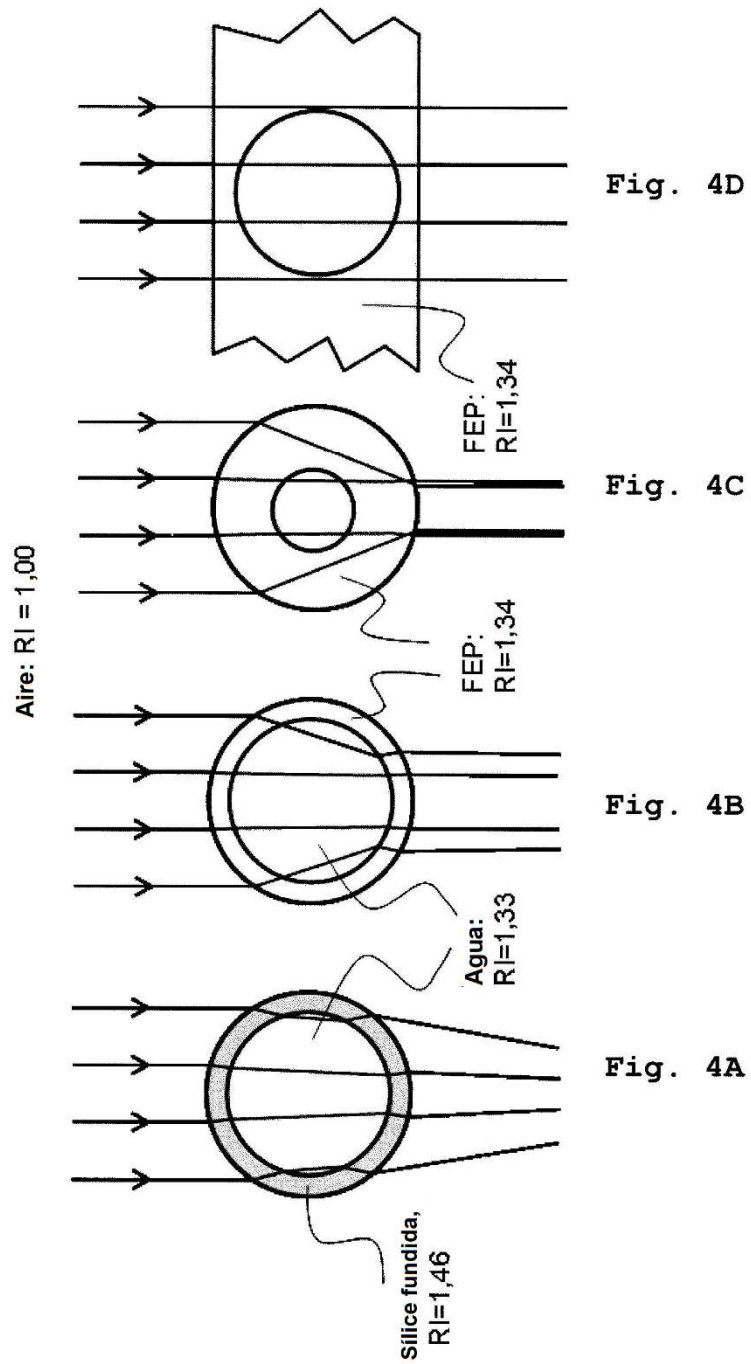


Fig. 3



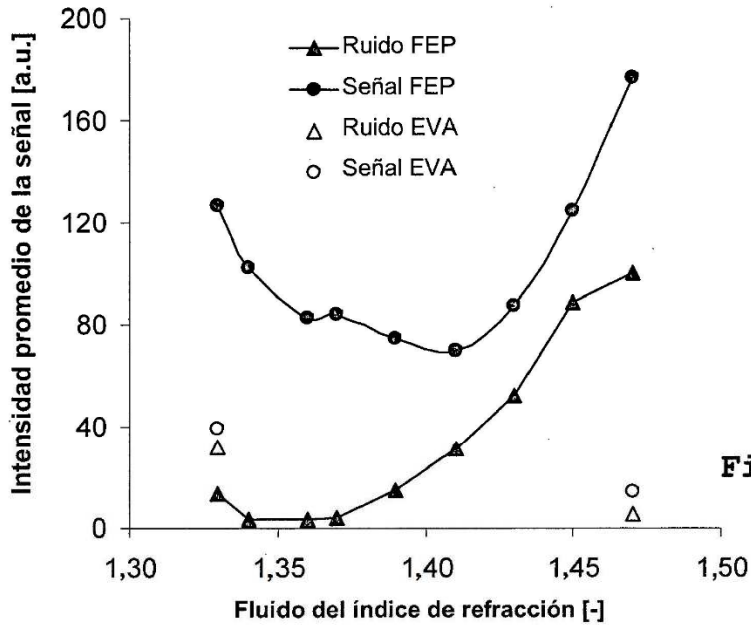


Fig. 5A

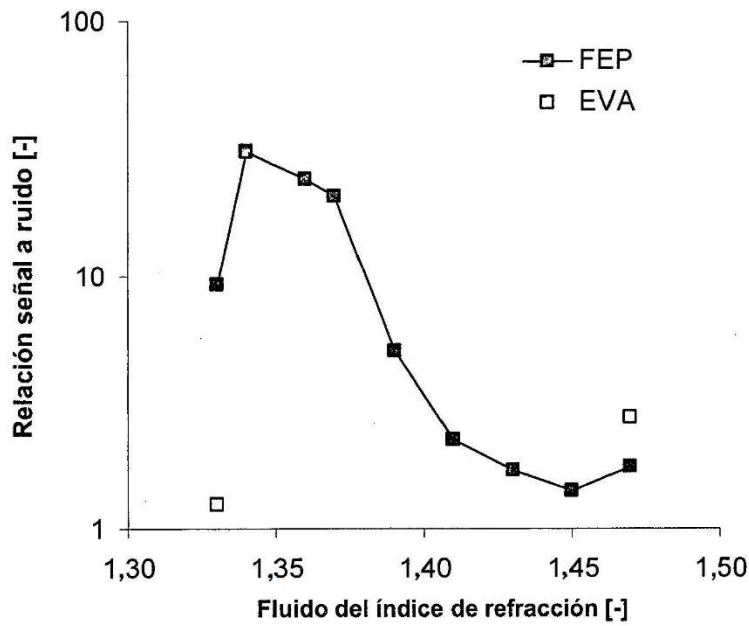


Fig. 5B

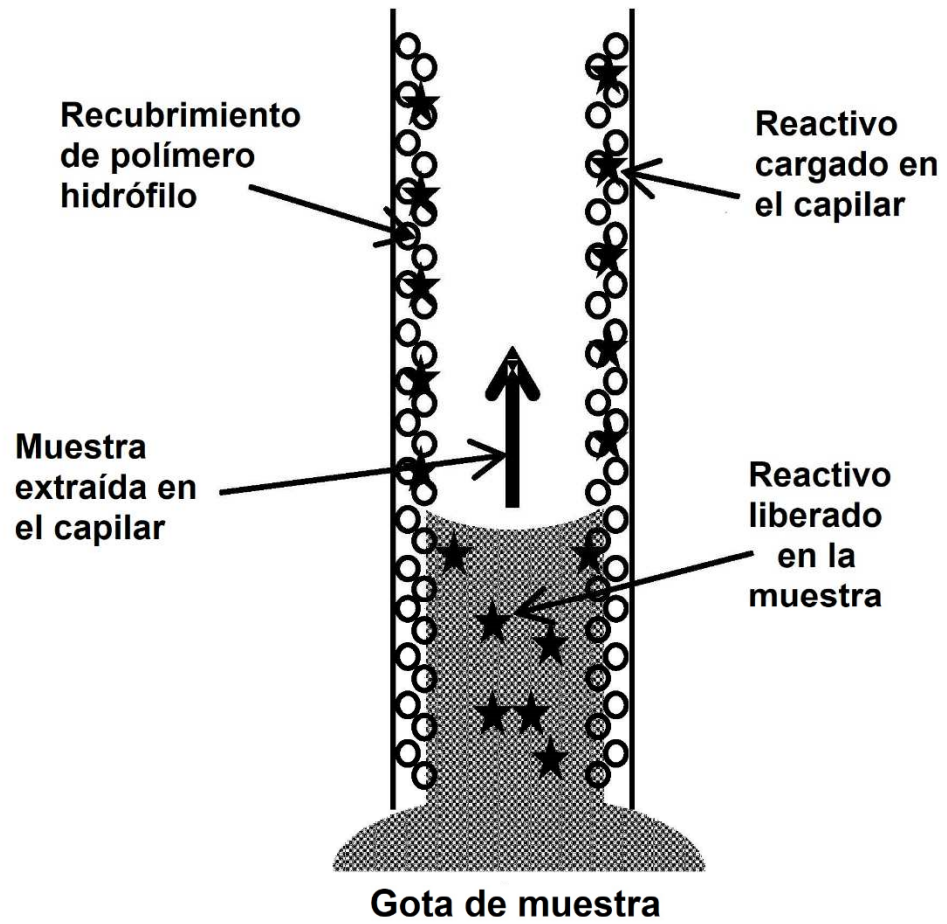


Fig. 6

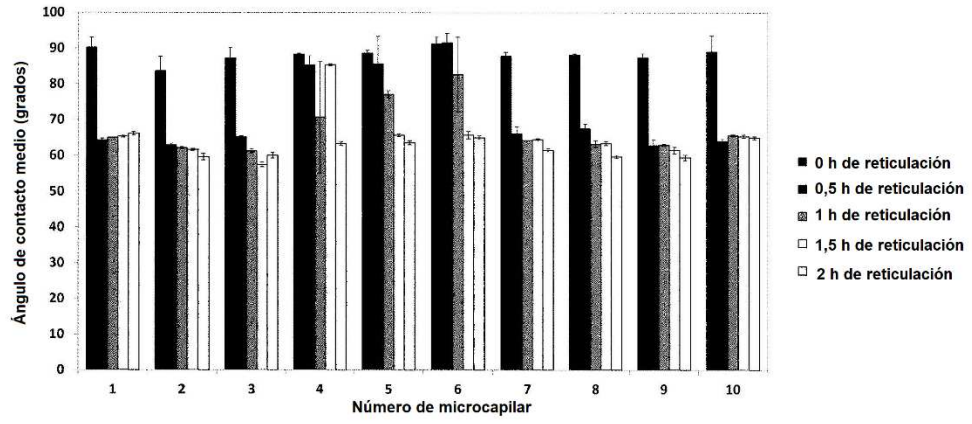
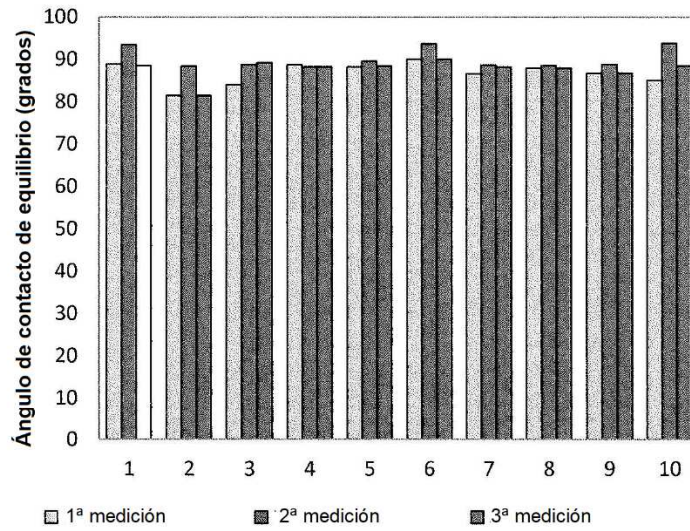


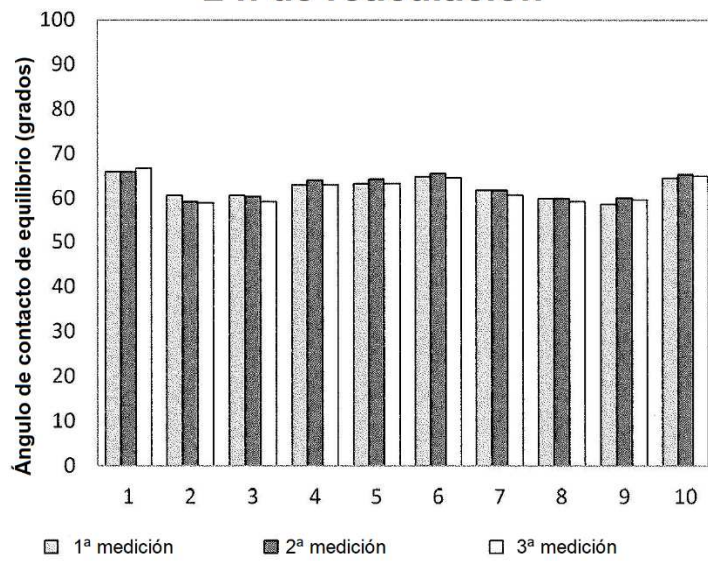
Fig. 7A

**Sin reticulación**



**Fig. 7B**

**2 h de reticulación**



**Fig. 7C**



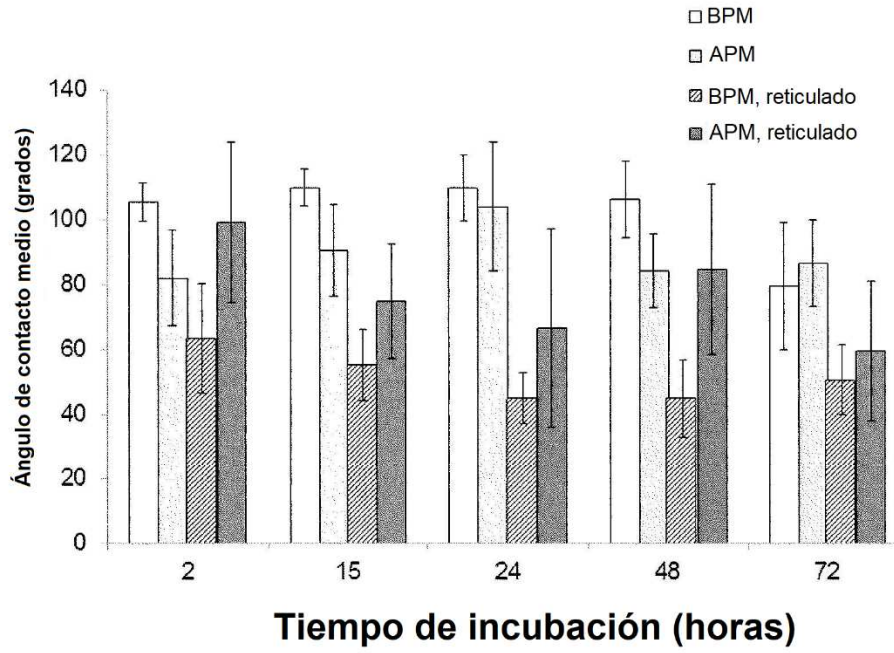


Fig. 7D

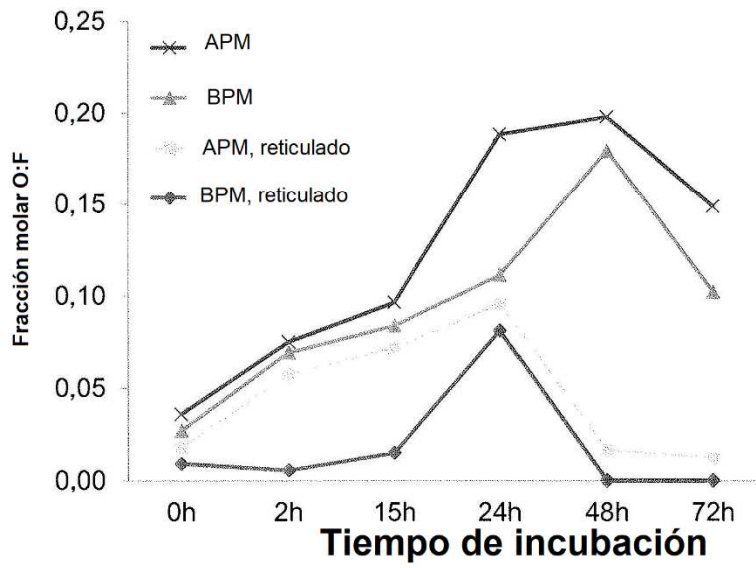


Fig. 7E

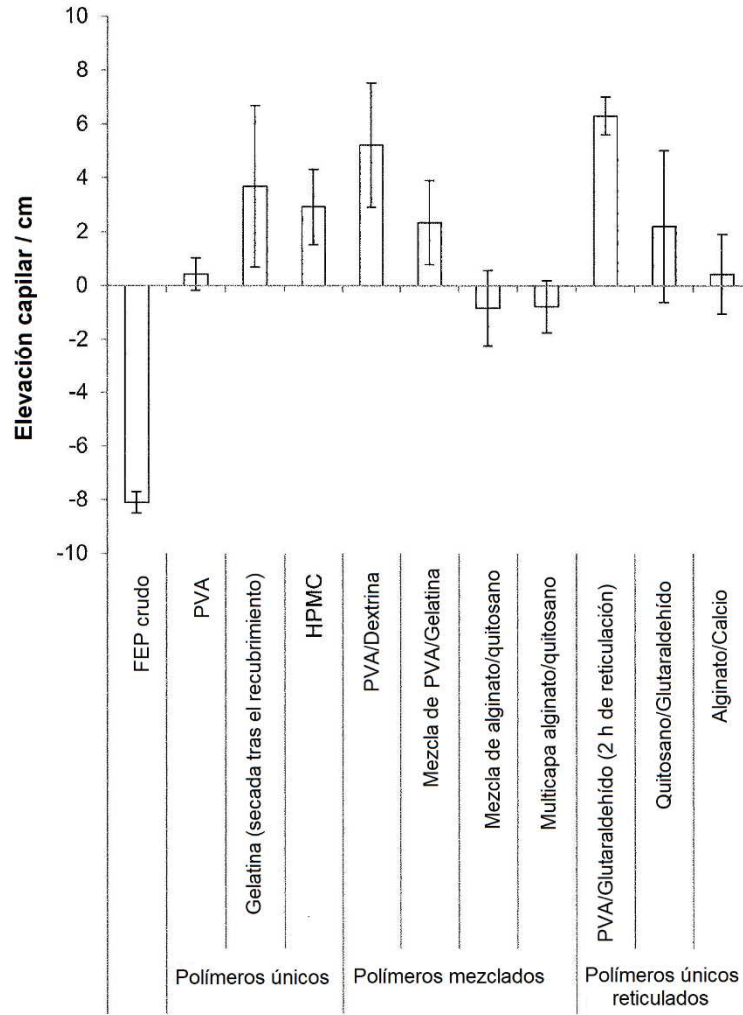
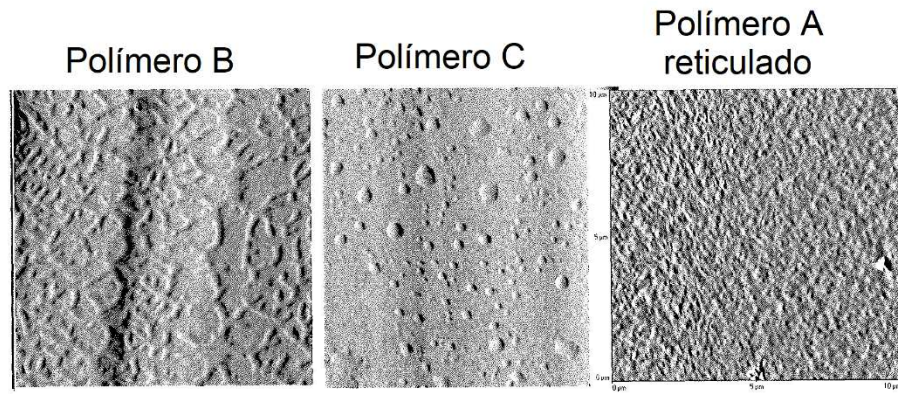


Fig. 8



**Fig. 9**

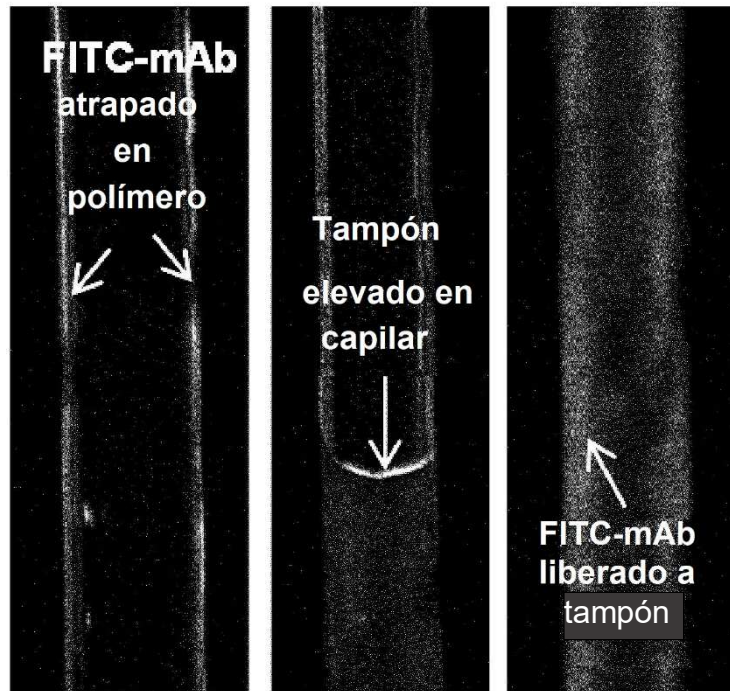


Fig. 10

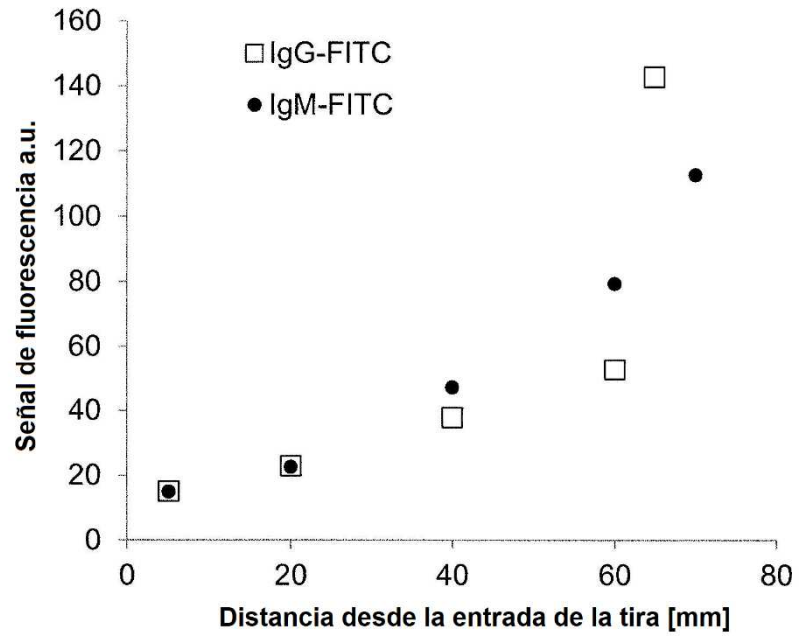
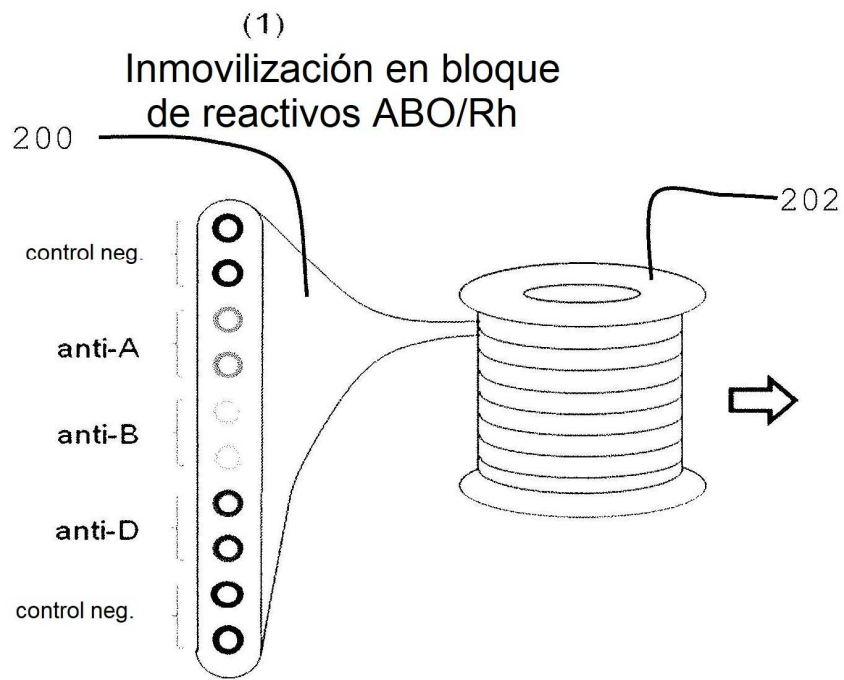
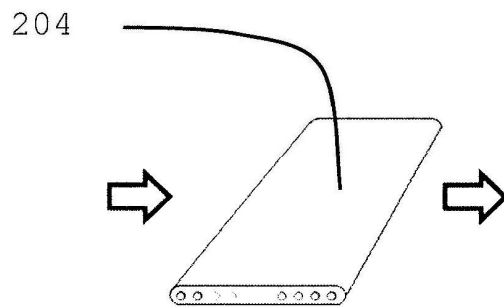


Fig. 11

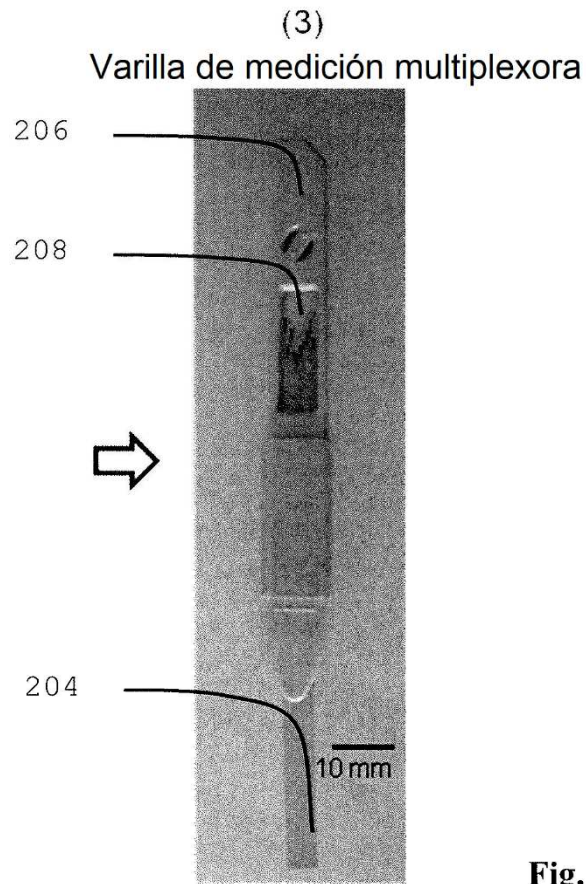


**Fig. 12**

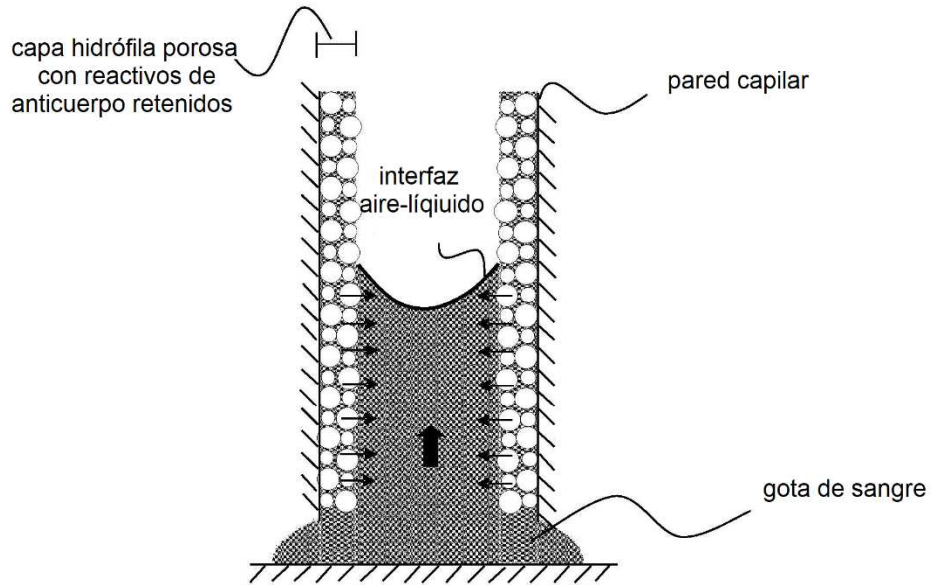
(2)  
Corte en tiras de prueba  
de 100 mm de largo



**Fig. 13**

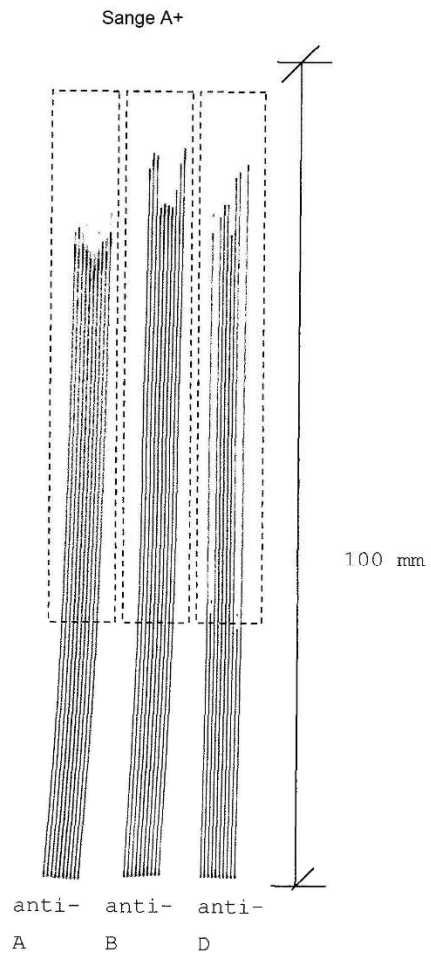


**Fig. 14**

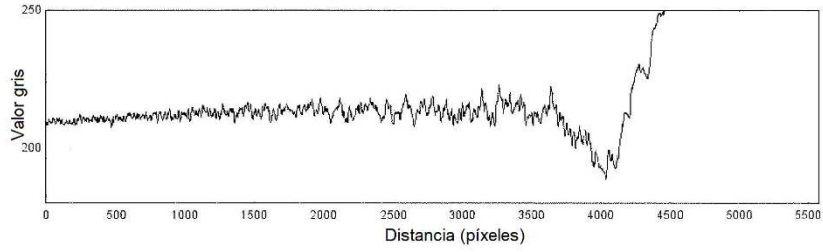


**Fig. 15**

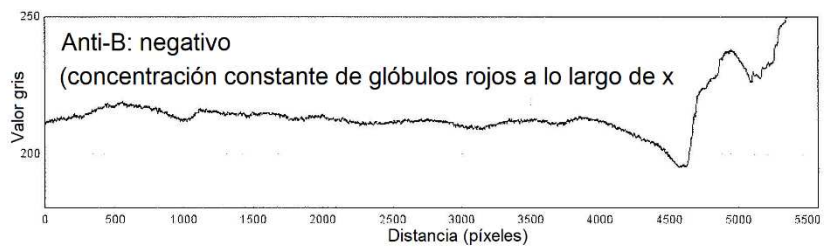




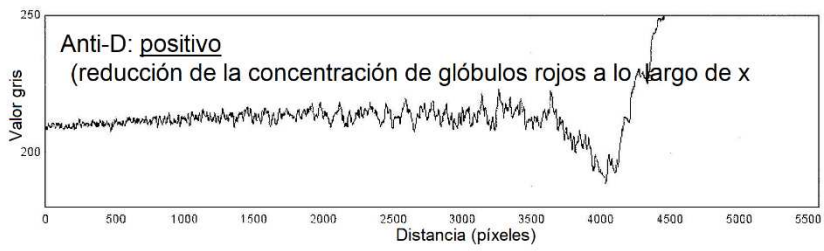
**Fig. 16A**



**Fig. 16B**



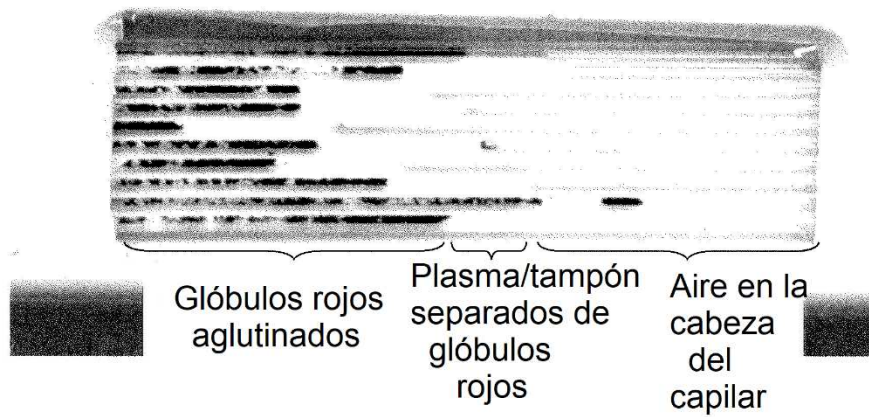
**Fig. 16C**



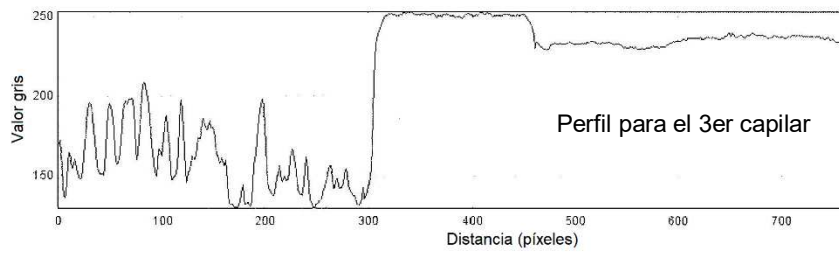
**Fig. 16D**



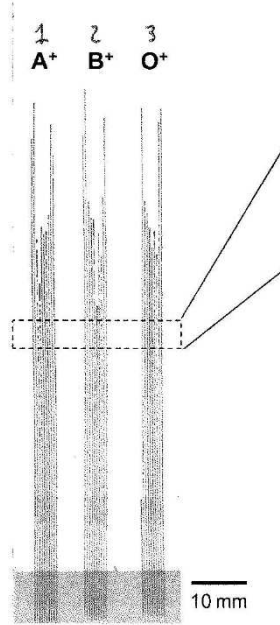
**Fig. 17A**



**Fig. 17B**



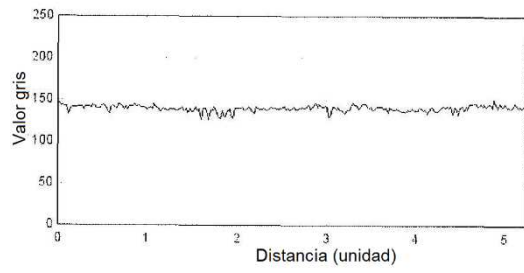
**Fig. 17C**



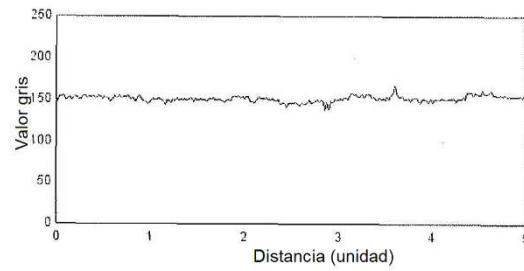
**Fig. 18A**

Muestra de sangre	n.º 1	n.º 2	n.º 3
Control	0	0	0
Anti-A	+	0	0
Anti-B	0	+	0
Anti-D	+	+	+
Grupo sanguíneo detectado	A <sup>+</sup>	B <sup>+</sup>	O <sup>+</sup>

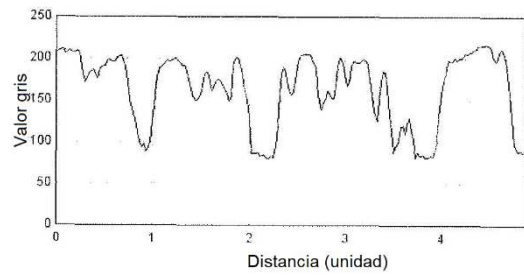
**Fig. 18B**



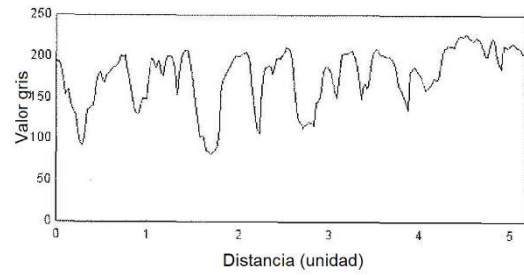
**Fig. 18C**



**Fig. 18D**



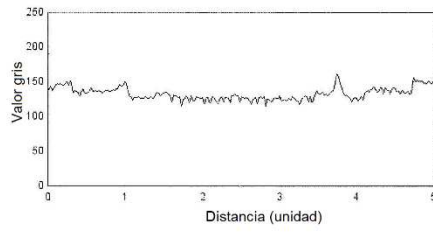
**Fig. 18E**



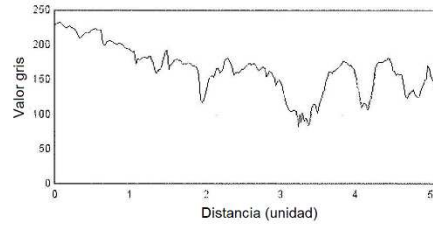
**Fig. 18F**



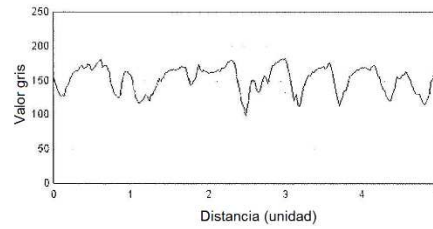
**Fig. 18G**



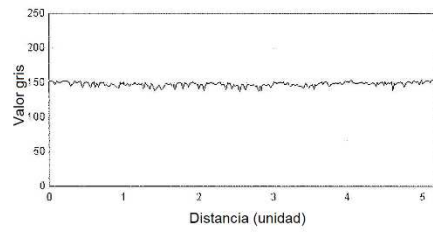
**Fig. 18H**



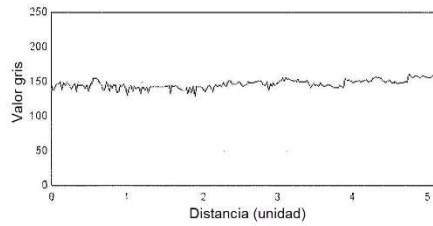
**Fig. 18I**



**Fig. 18J**



**Fig. 18K**



**Fig. 18L**

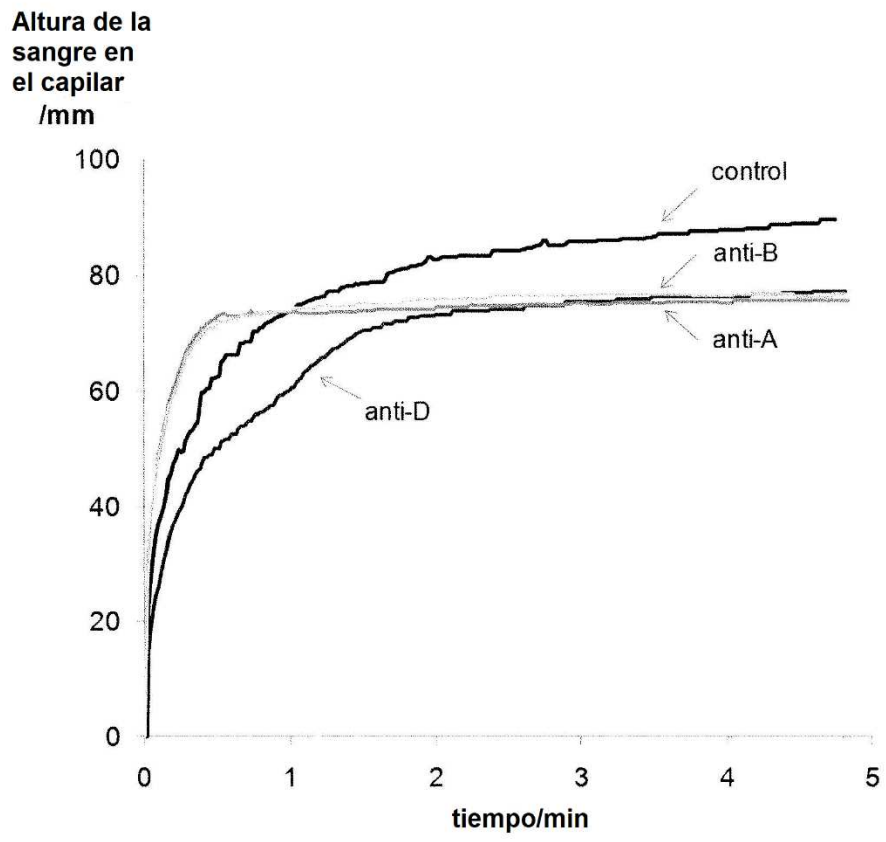
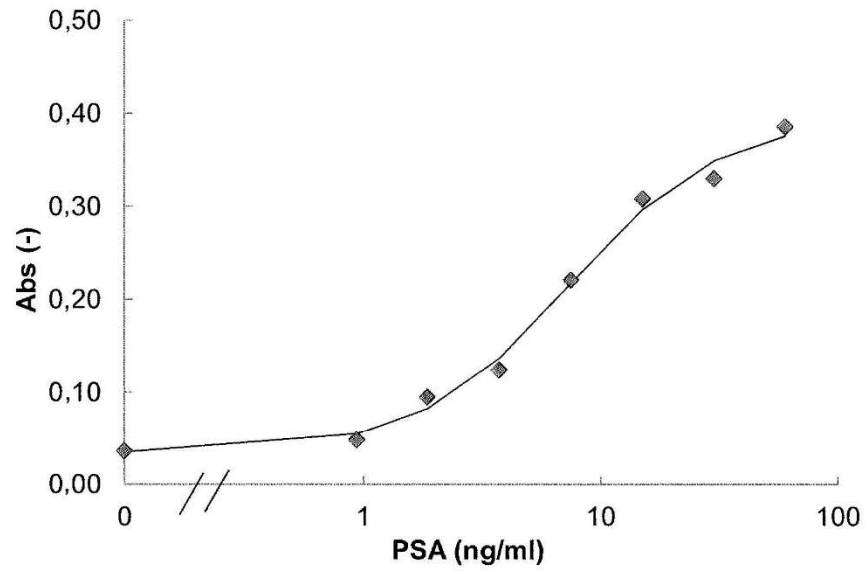


Fig. 19



**Fig. 20**



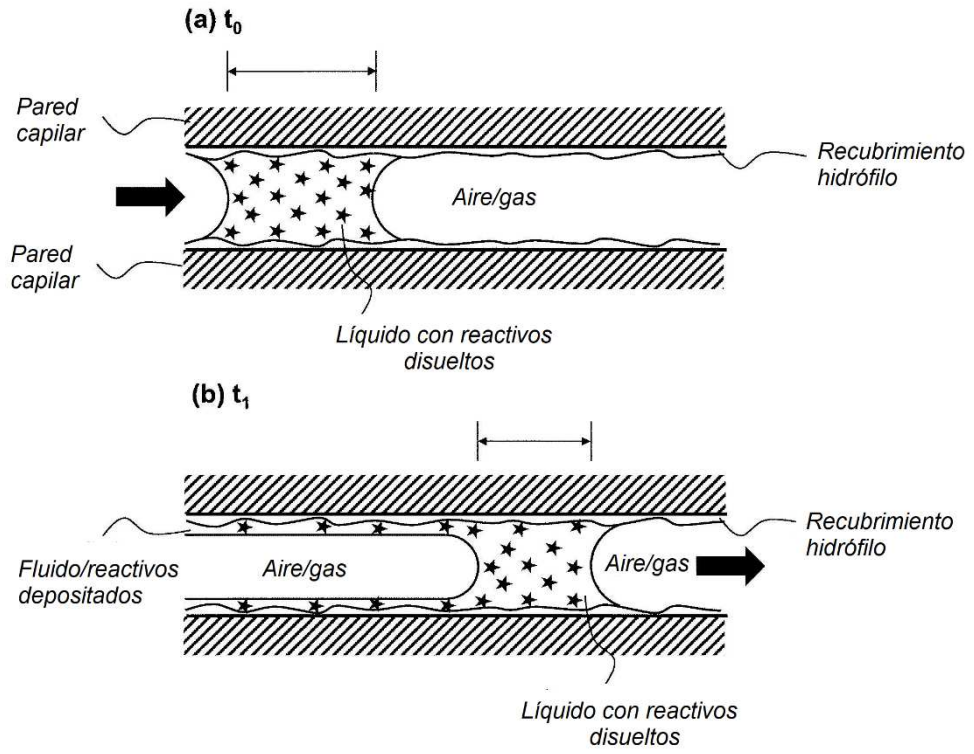


Fig. 21

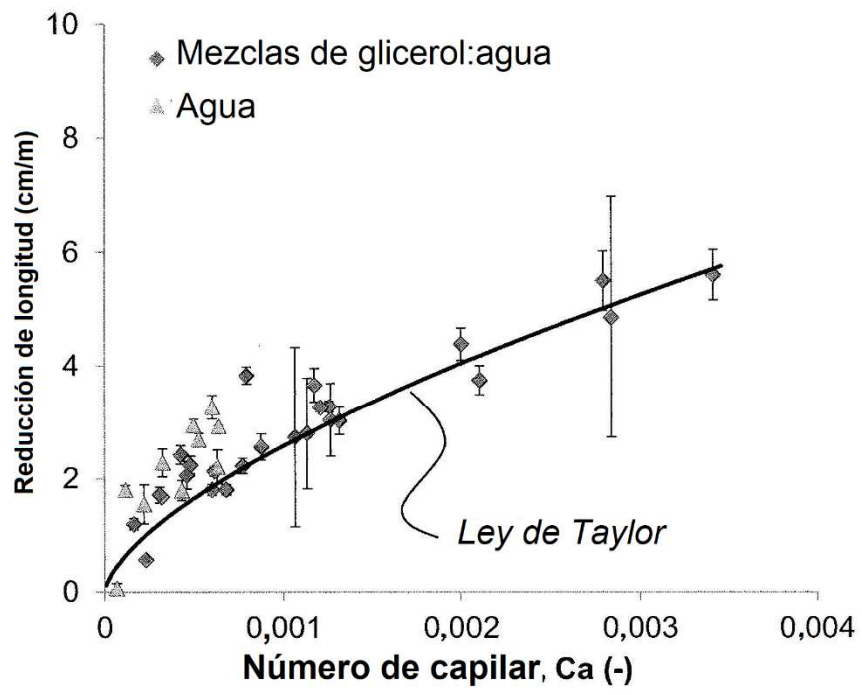


Fig. 22a

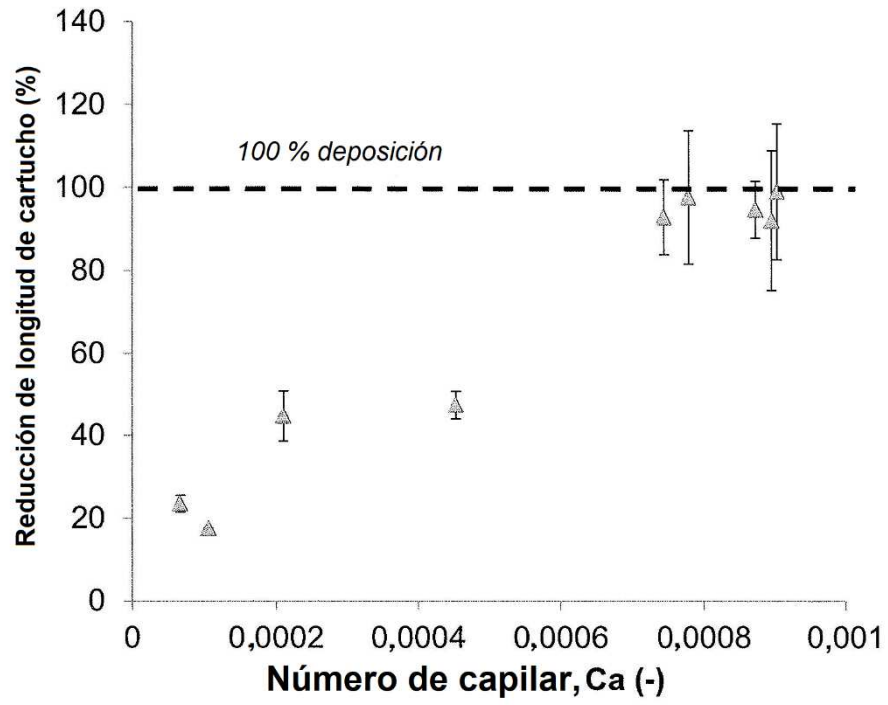


Fig. 22B

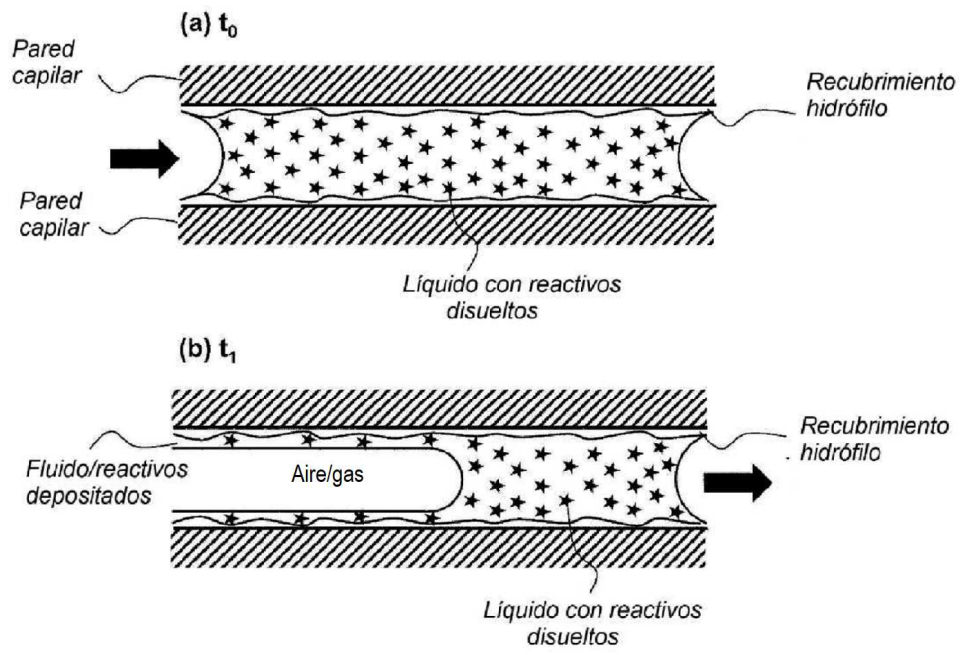


Fig. 23

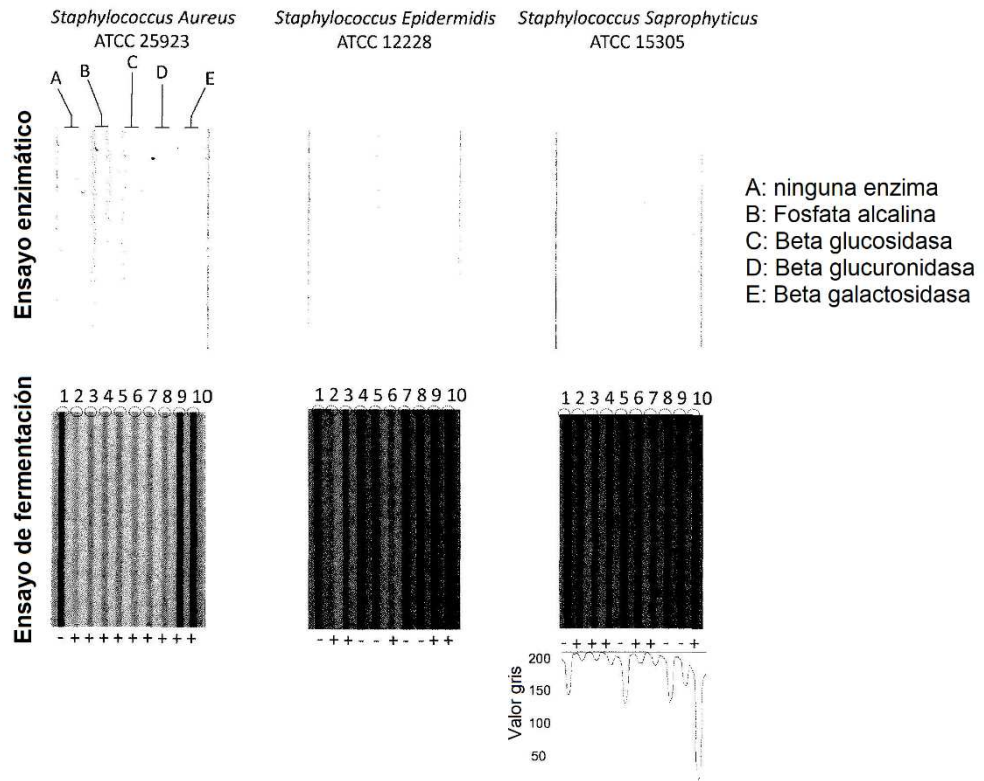


Fig. 24

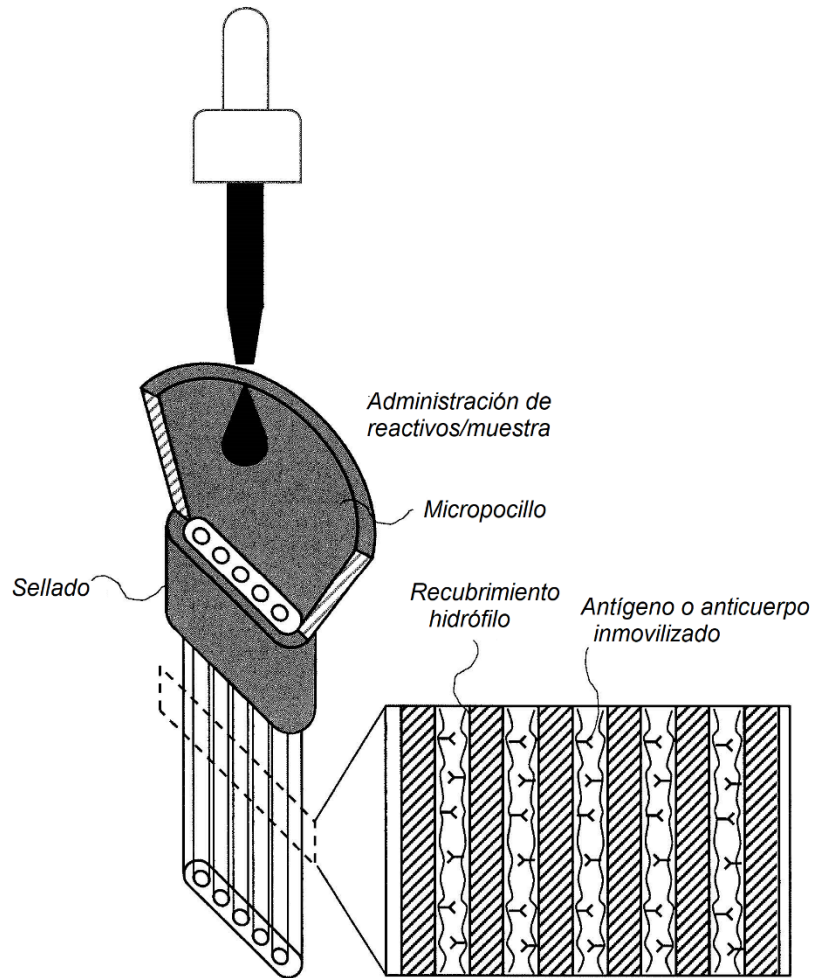


Fig. 25

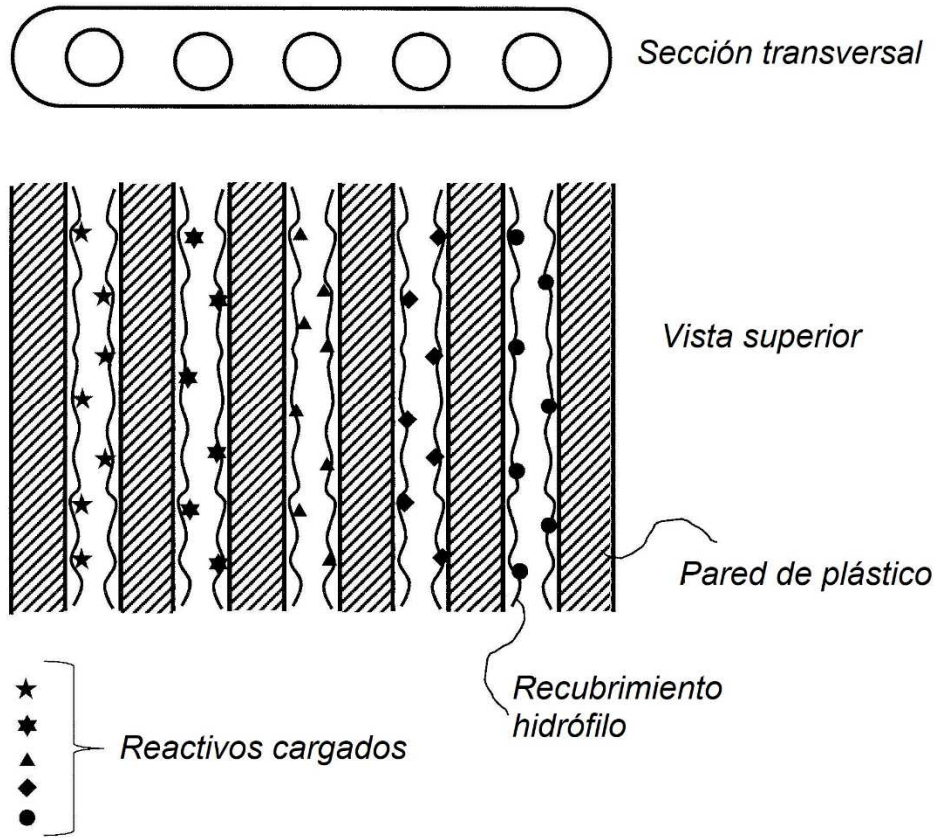


Fig. 26