

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 799**

51 Int. Cl.:

G01N 29/02 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 11/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2011 PCT/US2011/057147**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO12054758**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2011 E 11835164 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 2630479**

54 Título: **Aparato y método para medir la cinética de unión y concentración con un sensor resonador**

30 Prioridad:

20.10.2010 US 405048 P

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

09.02.2021

73 Titular/es:

**QORVO US, INC. (100.0%)
7628 Thorndike Road
Greensboro, NC 27409, US**

72 Inventor/es:

**JOHAL, GAGANBIR, SINGH;
HARMON, IAN, ROBERT y
VAN DEUSEN, RICHARD, ALLAN**

74 Agente/Representante:

FLORES DREOSTI, Lucas

ES 2 804 799 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

Aparato y método para medir la cinética de unión y concentración con un sensor resonador

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente invención hace referencia a la medición y ensayo, y más específicamente, a sensores resonadores piezoeléctricos y métodos asociados para pruebas o medición de diagnóstico utilizando el principio de un desplazamiento de frecuencia o fase desde un punto de resonancia inicial en respuesta a la exposición de los sensores a determinados materiales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0002]** Existen una variedad de instrumentos y técnicas de medición para pruebas de diagnóstico de materiales relativas a la salud humana, veterinaria, medio ambiental, peligros biológicos, bioterrorismo, productos agrícolas y seguridad alimentaria. Sin embargo, la solución para pruebas de diagnóstico y análisis de materiales químicos o biológicos en el momento de necesidad permanece limitada. Las pruebas de diagnóstico tradicionalmente requieren largos plazos de respuesta para obtener datos significativos, implica equipos de laboratorio complejos o remotos y caros que cuestan miles de dólares ubicados en un laboratorio centralizado, exigen grandes tamaños de muestra, utilizan varios reactivos, exigen usuarios altamente formados, pueden requerir numerosas etapas y/o implican costes significativos directos e indirectos. Por ejemplo, en los mercados de diagnóstico humano y veterinario, la mayoría de las pruebas requieren que se recoja una muestra del paciente y se envíe al laboratorio, pero los resultados no están disponibles hasta varias horas o días más tarde. Como resultado, el paciente puede irse de la consulta del profesional de la salud sin confirmación del diagnóstico y sin la oportunidad de comenzar un tratamiento inmediato.

20 **[0003]** Otros problemas relacionados con los dispositivos portátiles incluyen resultados de diagnóstico que están limitados en sensibilidad y reproducibilidad en comparación con las pruebas realizadas en el laboratorio. Son deseables tiempos de respuesta rápidos y a menudo resultan críticos para la identificación de materiales químicos y/o biológicos, como para proporcionar atención médica oportuna o para evitar la expansión o exposición de amenazas a la salud pública. Los costes directos hacen referencia a costes laborales, procedimientos y equipo necesario para cada tipo de análisis. Los costes indirectos resultan parcialmente del tiempo de retraso antes de que se pueda obtener información procesable, p.ej., en análisis médicos o en la monitorización de procesos químicos. Numerosos expertos creen que el diagnóstico y tratamiento simultáneos que permitiría un sistema de pruebas de diagnóstico efectivo donde sea necesario arrojaría beneficios clínicos, económicos y sociales.

30 **[0004]** A Hengerer *et al.*: "Determination of Phage Antibody Affinities to Antigen by a Microbalance Sensor System", BioTechniques, vol. 26, n.º 5, 1 enero 1999, págs. 956-964 divulga un método de microsensor sensible de masa que permite la estimación de afinidad de anticuerpos directamente desde el sobrenadante de fago.

35 **[0005]** Yang Liu *et al.*: "Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents", Biosensors and Bioelectronics, vol. 19, n.º 1, 1 octubre 2003, págs. 9-19 revela el uso de un biosensor de microbalanza de cristal de cuarzo integrado en un sistema de análisis de inyección de flujo para la investigación en tiempo real de reconocimiento molecular entre una proteína y agentes medicinales moleculares pequeños.

[0006]US 2002/115198 A1 revela un aparato y métodos para sensores microfabricados para su uso como sensores resonantes.

40 **[0007]** US 2010/207602 A1 revela un sensor resonante que utiliza resonancia mecánica como medio principal para la detección de analitos. Los biosensores basados en propiedades piezoeléctricas de materiales han sido utilizados en la detección de cantidades muy pequeñas de materiales. Los resonadores piezoeléctricos utilizados como sensores en estas aplicaciones se denominan a veces «microbalanzas». Un resonador piezoeléctrico se construye normalmente como una capa plana y delgada de material piezoeléctrico cristalino intercalado entre dos capas de electrodos.

45 Cuando se utiliza como sensor, se recubre el resonador con una capa de unión que, cuando se expone al material que se está detectando, permite que el material se una a la superficie del resonador. Los resonadores modernos se fabrican utilizando técnicas MEMS y pueden construirse para ser tan pequeños que su frecuencia resonante se encuentra en la escala de gigahercios. En general, los resonadores que tienen frecuencias resonantes más altas son más sensibles.

50 **[0008]** La forma convencional de detectar la cantidad del material unido sobre la superficie de un resonador de detección es hacer funcionar el resonador como un oscilador en su frecuencia resonante. A medida que el material que está siendo detectado se une a la superficie del resonador, la masa del resonador aumenta y la frecuencia resonante de oscilación se reduce en consecuencia. El cambio en la frecuencia resonante del resonador con el tiempo, supuestamente causado por la unión del material en la superficie del resonador, es indicativo de la cantidad del material unido sobre el resonador o el ritmo al que se acumula el material sobre la superficie del resonador. A partir de estos datos, puede calcularse una concentración del material de interés, o analito, presente en la muestra.

[0009] Tradicionalmente, los biosensores de este tipo incluyen generalmente un conjunto en el que un biosensor intrínseco está rodeado por al menos un canal fluídico, que es acoplado a un recipiente de muestras para presentar una muestra al biosensor de manera controlada. La mayoría de las configuraciones de biosensor convencionales también incluyen un mecanismo para controlar y mantener una temperatura deseada de la muestra como se presenta al biosensor intrínseco.

5 En funcionamiento, la muestra es extraída a través del canal fluídico y a través del biosensor intrínseco mediante aplicación de vacío o presión de accionamiento similar en una entrada de vacío. A menudo, la muestra debe ser refinada antes de la introducción en el conjunto mediante la adición de tampón o eliminación de determinados elementos como células de orificio u otras partículas, que pueden interferir con la precisión de las mediciones. Esta etapa de refinación puede ser costosa y compleja, haciendo dichas mediciones inviables para las aplicaciones de campo. Además, la

10 introducción de la muestra cambia el entorno físico en el que se realiza la medición. Por ejemplo, el resonador oscila a frecuencias resonantes diferentes cuando se expone a una muestra líquida y antes de la exposición cuando el resonador se encuentra en oscilación en aire libre debido a las diferencias en viscosidad entre los dos fluidos.

[0010] Otro enfoque implica estabilizar el entorno de la medición antes de la introducción del reactivo de muestra. Por ejemplo, un tipo de instrumento tiene dos recipientes de fluido separados en los que el primer recipiente contiene una solución tampón y el segundo recipiente contiene el reactivo de muestra. En funcionamiento, la solución tampón se introduce primero en el biosensor y se deja que el sistema se estabilice. A continuación, una válvula cambia al reactivo de muestra y se toman mediciones. La introducción de la solución tampón permite sintonizar la oscilación del sensor, o ajustarla según las condiciones de temperatura y viscosidad del tampón, que es muy próxima a la viscosidad y temperatura de la muestra. El objetivo de esta sintonización es hacer funcionar el resonador lo más cerca posible a su frecuencia resonante ideal para una sensibilidad máxima. Una desventaja de este enfoque es la complejidad introducida y los requisitos de tiempo de procesamiento, que pueden dar lugar a resultados de ensayo caros, largos y propensos a errores.

[0011] Otro reto al que se enfrentan los diseñadores de biosensores resonantes es la realización de mediciones de concentración cuantificable en muestras altamente concentradas. Una contrapartida de tener la sensibilidad aumentada de resonadores de microescala (o menores) es su susceptibilidad para saturarse rápidamente con analito. En determinados ensayos, un sensor puede saturarse en cuestión de segundos o incluso en una fracción de segundo. En este caso, aunque el sensor puede funcionar como un simple detector de la presencia de analito, no puede medir de manera precisa el ritmo al que el analito se une al sensor, comúnmente denominado cinética de unión. La medición de la cinética de unión es necesaria para la cuantificación de la concentración del analito, puede ser imposible de obtener con una precisión o repetibilidad adecuada en muestras altamente concentradas utilizando técnicas convencionales. Además,

25 cuando el analito comienza a unirse al resonador en una cantidad significativa inmediatamente desde el momento en el que el sensor resonante es introducido en la muestra, el instrumento puede no tener tiempo para lograr la estabilización requerida antes de tomar las mediciones, o llevar a cabo la sintonización del resonador bien antes o después de tomar las mediciones, agravando de este modo aún más el problema.

[0012] En vista de lo anterior, es necesaria una solución práctica para permitir la medición de cinética de unión en instrumentos sensibles, especialmente cinética de unión temprana desde el momento en el que la muestra es introducida al sensor. De manera adicional, sería deseable llevar a cabo tales mediciones sin tener que asumir la complejidad de estabilizar el sensor resonante utilizando una solución tampón o una muestra específicamente refinada.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0013] Según un primer aspecto de la invención según la reivindicación 1, se proporciona un aparato para medir la cinética de unión de una interacción de un material de analito presente en una muestra de fluido. El aparato comprende un resonador de detección que comprende sitios de unión para el material de analito, circuitos de accionamiento configurados para accionar el resonador de detección en un movimiento oscilante, circuitos de medición dispuestos para acoplarse al resonador de detección y configurados para medir una o más señales de salida del resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección y un controlador. El controlador está configurado para ajustar la frecuencia a la que los circuitos de accionamiento accionan el resonador de detección en respuesta a la puesta en contacto de la muestra de fluido con el resonador de detección para mantener un punto de resonancia que tenga una característica de resonancia, calcular la cinética de unión en respuesta al ritmo de cambio de la frecuencia para mantener la característica de resonancia y calcular una concentración de analito en respuesta al ritmo de cambio de la característica de resonancia.

[0014] Según un segundo aspecto de la invención según la reivindicación 7, se proporciona un método llevado a cabo por un aparato para medir la cinética de unión de una interacción de un material de analito presente en una muestra de fluido. El método comprende accionar un resonador de detección en un movimiento oscilante, medir una o más señales de salida de resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección, ajustar la frecuencia de accionamiento del resonador de detección en respuesta a la puesta en contacto de la muestra de fluido con el resonador de detección que comprende sitios de unión para que el material de analito mantenga un punto de resonancia que tenga una característica de resonancia, calcular la cinética de unión en respuesta al ritmo de cambio de la frecuencia para mantener las características de resonancia y calcular una concentración de analito en respuesta al ritmo de cambio de la característica de resonancia.

5 **[0015]** De manera opcional, se utiliza un resonador de referencia que produce una señal de salida de referencia. El resonador de referencia carece de sitios de unión para el analito. La introducción de una muestra de fluido en el sensor resonante es detectada automáticamente basándose en la detección de un cambio de característica en la señal de salida de sensor o una señal de salida de referencia, o ambos. En respuesta a la detección de la introducción de la muestra de fluido, se llevan a cabo mediciones automáticas de la cinética de unión del material de analito al sensor resonante.

[0016] Serán evidentes una cantidad de ventajas de la invención para los expertos en la técnica relevante basándose en la siguiente descripción de los modos de realización preferidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 **[0017]** La invención puede ser comprendida de forma más completa teniendo en cuenta la siguiente descripción detallada de diversos modos de realización de la invención en relación con los dibujos que acompañan, donde:

La FIG. 1A es un diagrama que ilustra un sistema de detector de desplazamiento de resonancia de mano según un modo de realización.

La FIG. 1B es un diagrama que ilustra el sistema de detector de desplazamiento de resonancia de mano de la FIG. 1A con el sensor separado del interconector y el interconector unido al instrumento.

15 La FIG. 2 es un diagrama que ilustra un sistema de detector de desplazamiento de resonancia para mesa de laboratorio según un modo de realización.

La FIG. 3 es una vista de diagrama de bloques de una implementación de ejemplo de un sistema detector de desplazamiento de resonancia que utiliza la detección del desplazamiento de fase según un modo de realización.

20 La FIG. 4 es una vista de diagrama de bloques de una implementación de ejemplo de un sistema detector de desplazamiento de resonancia que utiliza la detección del desplazamiento de fase utilizando un resonador de detección de una entrada y un resonador de referencia de una entrada según un modo de realización.

La FIG. 5 es un diagrama de bloques que ilustra una implementación de ejemplo de un sistema detector de desplazamiento de resonancia que utiliza la detección del desplazamiento de frecuencia según un modo de realización.

25 La FIG. 6A es una vista superior esquemática de un conjunto de resonador según un modo de realización.

La FIG. 6B es un esquema de una vista de capa parcial del conjunto de resonador de la FIG. 6A.

La FIG. 7 es un diagrama que ilustra un método de escala de frecuencia para determinar divisiones de frecuencia para manejar múltiples pares de resonador de referencia/sensor a frecuencias no interferentes en un modo de realización multiplexado.

30 La FIG. 8A es un diagrama esquemático que ilustra un modelo simplificado de un resonador en el sistema de detector de desplazamiento de resonancia según un modo de realización.

La FIG. 8B es un diagrama esquemático que ilustra un modelo más detallado de un sensor resonador en el sistema de detector de desplazamiento de resonancia según un modo de realización.

35 La FIG. 9A es un diagrama que ilustra una técnica de barrido de frecuencia multietapa para la sintonización *in situ* de un resonador según un modo de realización.

La FIG. 9B es un diagrama que ilustra una implementación práctica de la técnica de la FIG. 9A según un modo de realización.

40 Las FIG. 10A y 10B son gráficos que representan la evolución de señales de biosensor con el tiempo durante el funcionamiento del sistema para un biosensor de detección de desplazamiento de frecuencia y un biosensor de detección de desplazamiento de fase, respectivamente, según los modos de realización de la invención.

Las FIG. 11A y 11B son diagramas de flujo que ilustran un funcionamiento de ejemplo, respectivamente, de los sistemas que controlan y monitorizan el biosensor de detección de desplazamiento de frecuencia, y el biosensor de detección de desplazamiento de fase, cuyas salidas están representadas en las FIG. 10A y 10B anteriores según los modos de realización de la invención.

45 **[0018]** Aunque la invención es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, se muestran detalles de la misma a modo de ejemplo en los dibujos y se describirá en detalle. Sin embargo, se entenderá que la intención no es la de limitar la invención a los modos de realización concretos descritos. Por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que recaigan dentro del espíritu y alcance de la invención según se define en las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0019] Aunque esta invención puede ponerse en práctica de numerosas formas diferentes, se describen aquí en detalle modos de realización preferidos específicos de la invención. Esta descripción es una ejemplificación de los principios de la invención y no se pretende limitar la invención a los modos de realización concretos ilustrados.

5 **[0020]** Un modo de realización de la presente invención se dirige a un sensor simple, efectivo, rentable, fiable y replicable para la detección de desplazamiento de resonancia de materiales químicos y/o biológicos que compensa la variación de la frecuencia resonante única en resonadores individuales. En aras de la brevedad, estos dispositivos son denominados aquí biosensores, aunque debería entenderse que pueden utilizarse para detectar materiales en muestras distintas de las muestras biológicas. En diversos modos de realización, la detección de desplazamiento de resonancia puede basarse en
10 desplazamiento de fase o desplazamiento de frecuencia. Un tipo de modo de realización incluye un sensor y sistema de detección de desplazamiento de resonancia que puede compensar o ajustar la variación en frecuencia resonante individual y elementos ambientales que pueden influir en el funcionamiento de un resonador en su frecuencia resonante, al tiempo que proporciona resultados rentables, fiables, precisos y replicables. En algunos modos de realización de la invención, el sistema de detección de desplazamiento de resonancia incluye sistemas y métodos que evitan las
15 complicaciones creadas por un par de resonadores que no se encuentren idénticamente ajustados haciendo funcionar cada resonador en su propia frecuencia resonante potencialmente única. Al hacer funcionar cada resonador en su resonancia ideal, o cerca de ella, pueden lograrse beneficios de sensibilidad aumentada. Esto a su vez, facilita ensayos más rápidos y precisos.

20 **[0021]** En algunos modos de realización, se accionan de manera individual o separada múltiples resonadores montados en sensores a diferentes frecuencias resonantes. Además, se lleva a cabo una medición de desplazamiento de frecuencia o fase separada para cada resonador. A continuación, se compara cada desplazamiento con los desplazamientos de frecuencia o fase de otros resonadores. En otro modo de realización, el desplazamiento de fase o frecuencia se mide en relación con la señal de excitación proporcionada a cada resonador respectivo y no relacionada con los desplazamientos de frecuencia o fase de otros resonadores.

25 **[0022]** En algunos modos de realización, un sensor para la detección de desplazamiento de resonancia de materiales químicos y/o biológicos incluye una o más placas de circuito impreso, con uno o más chips resonadores montados en el mismo. Los chips resonadores en un modo de realización de ejemplo son dispositivos de onda acústica de volumen (BAW, por sus siglas en inglés). La estrecha proximidad de dos o más resonadores garantiza que los resonadores están sometidos a condiciones ambientales sustancialmente idénticas durante una operación de detección de material. El uso
30 de pares de referencia/sensor en los que un resonador es un sensor y el otro resonador es un resonador de referencia permite de manera efectiva mediciones de desplazamiento de resonancia precisas y cancelación de los efectos ambientales durante las operaciones de detección de material en uso del conjunto de detección.

35 **[0023]** Según diversas implementaciones, los sensores para la detección de desplazamiento de resonancia pueden incluir configuraciones de placa de circuito impreso (PCB, por sus siglas en inglés) espalda con espalda que utilizan dos PCB sustancialmente diferentes. En un enfoque, el resonador en una PCB se sitúa descentrado, mientras que el resonador en la otra PCB está centrado. En esta configuración, los resonadores de detección y de referencia pueden tener todavía suficiente distancia entre ellos para reducir la diafonía entre los dos resonadores. En otro modo de realización de la presente invención, los resonadores en las dos PCB son construidos de manera que la configuración de PCB espalda con espalda da lugar a que los resonadores de detección y referencia se encuentren directamente opuestos.

40 **[0024]** En algunos modos de realización, el resonador de detección está recubierto con un material diferente al de un resonador de referencia según el material que deba detectarse. Variando el recubrimiento de los resonadores, el sistema de detección de desplazamiento de resonancia permite el uso universal para diversas pruebas de diagnóstico de materiales químicos y/o biológicos sin cambiar ninguno de los otros componentes estructurales del sistema. Los sensores para la detección de desplazamiento de resonancia de materiales químicos y/o biológicos permiten de manera efectiva
45 tiempos de respuesta rápidos para la detección del material químico y/o biológico respectivo, en las capacidades de detección de campo, pequeños tamaños de muestra, sujetos mínimamente formados, bajos costes directos e indirectos y datos transmisibles electrónicamente.

50 **[0025]** En algunos modos de realización, el sistema de detección de resonancia incluye una fuente de energía integrada, como una batería, supercondensador, disposición de energía solar o cualquier combinación de los mismos, para alimentar el instrumento electrónico y un sensor desechable de fácil montaje que puede estar contenido dentro de un conjunto de alojamiento de sensor. El sensor tiene un revestimiento biológico que se une específicamente con la molécula objetivo deseada y proporciona el mecanismo de detección y cuantificación. Una muestra (sangre entera, orina, saliva o cualquier otro líquido) es conducida al conjunto de alojamiento de sensor y puesta en contacto con los resonadores del sensor, que puede o no ser un sensor de uso único, dentro del conjunto de alojamiento de sensor. Las mediciones eléctricas del
55 sensor (es decir, un cambio de fase o frecuencia resonante de la onda de radiofrecuencia) indican si el objetivo está presente y, si está presente, su concentración. Para cada análisis, se acopla un nuevo sensor al instrumento.

[0026] En algunos modos de realización, la sintonización del sensor puede llevar a cabo para determinar la frecuencia resonante exacta del resonador antes de la operación de detección de material. Esta sintonización puede representar las diversas propiedades eléctricas asociadas a la conexión física del sensor a un instrumento, así como las condiciones

ambientales inmediatas. También puede llevarse a cabo de manera opcional una segunda sintonización *in situ* inmediatamente después de que el sensor sea introducido en una muestra para la detección.

[0027] En general, el ritmo de cambio de las características de resonancia varía con la concentración del objetivo. El ritmo de cambio de las características de resonancia para la muestra más concentrada tiene lugar más rápido que la muestra con concentración más baja. La cinética de unión, como, por ejemplo, la pendiente de la respuesta de muestras conocidas, o una magnitud total de un cambio en la respuesta a la introducción de la muestra en función del tiempo, puede utilizarse después para generar una curva de calibración de manera que pueda determinarse la concentración de muestras no conocidas mediante interpolación de la respuesta del sensor frente a la curva. Durante la fabricación, los sensores pueden ser calibrados en fábrica por lote de producción, permitiendo al usuario la determinación sencilla de la concentración de una muestra no conocida sin calibración adicional.

[0028] Otro modo de realización de la invención se dirige a la rápida sintonización del sensor *in situ*, lo cual permite la determinación de la frecuencia de la señal de excitación de manera muy rápida desde el momento en que se expone un sensor a la muestra bajo ensayo.

[0029] En otro modo de realización de la invención, un sistema de sensor resonante es configurado para arrojar resultados de ensayo precisos incluso con introducción directa de muestra no refinada en una superficie del sensor resonante. El biosensor genera una señal de salida eléctrica en tiempo real proporcional a la unión de analito sobre la superficie del sensor. El ritmo de unión de analito, denominado cinética de unión, es proporcional a la concentración de analito en la muestra no refinada. En este modo de realización, la introducción de la muestra en la superficie del sensor resonante es detectada automáticamente como un cambio de etapa en las características de resonancia del sensor. Al iniciar muy rápidamente la medición en respuesta a la detección de la introducción de la muestra, puede medirse la tasa de asociación inicial de la cinética de unión. Asimismo, para medición de cambio total, tener un punto de comienzo preciso correspondiente a la introducción efectiva de la muestra en el sensor facilita la medición precisa de la cinética de unión.

[0030] En un modo de realización relacionado de la invención, aplicado a sistemas que utilizan señales de excitación que tienen una frecuencia establecida como sistemas de detección de desplazamiento de fase, para que el sistema biosensor arroje resultados de ensayo precisos, debe llevarse a cabo una sintonización rápida en el momento inicial en que la muestra no refinada es presentada al sensor. Algunos de los modos de realización descritos a continuación lo logran con una sintonización de aire inicial antes de la introducción de la muestra, detección electrónica prácticamente instantánea de la presentación de muestra a la superficie del sensor, seguido de rápida sintonización llevada a cabo en presencia de la muestra que se ha de analizar.

[0031] Pasando ahora a los dibujos, se ilustran los componentes del sistema detector de desplazamiento de resonancia según algunos modos de realización de la presente invención. En algunos modos de realización, el sistema detector de desplazamiento de resonancia puede ser relativamente pequeño en tamaño para ser portátil de manera que pueda utilizarse en el campo para aplicaciones de ensayo de diagnóstico específico. En algunos otros modos de realización, el sistema detector de desplazamiento de resonancia puede configurarse para ensayo de diagnóstico en un entorno de laboratorio. Como se muestra en las FIG. 1A y 1B, el sistema detector de desplazamiento de resonancia 10 es ilustrado en una configuración portátil o de mano que incluye un instrumento 12a capaz de ser conectado a un conjunto de sensor 30 mediante un interconector 20, que puede utilizarse para pruebas de diagnóstico donde sean necesarias en el campo.

[0032] Como se representa en la FIG. 2, el sistema detector de desplazamiento de resonancia es ilustrado en un banco de laboratorio o configuración más permanente que incluye un instrumento 12b, como un analizador de red, capaz de ser conectado a un conjunto de sensor 30 por un interconector 20. El conjunto de sensor 30 montado sobre un interconector 20 y acoplado a un instrumento de banco de laboratorio 12b, como un analizador de red, permite las pruebas de diagnóstico en un entorno de laboratorio, pruebas de control de calidad de un lote de sensores durante la producción y/o el desarrollo de revestimientos en el conjunto de sensor 30 para las pruebas de diagnóstico de material objetivo. El instrumento que incluye, sin carácter limitativo, instrumento de mano 12a e instrumento de banco de laboratorio 12b, puede tener medios para la conexión a internet u otra transferencia de información, como uno o más puertos USB, conexión inalámbrica o similares.

[0033] En algunos modos de realización, el interconector 20 puede contener un dispositivo de almacenamiento de datos como una ROM o EEPROM flash. El dispositivo de almacenamiento de datos puede servir para ajustar el instrumento para aplicaciones de mercado específicas incluyendo información de identificación o *software* que permite que el instrumento entienda el uso concreto del sistema de detector de desplazamiento de resonancia 10 en relación con el conjunto de sensor 30. Por ejemplo, la memoria de solo lectura puede contener información básica o instrucciones algorítmicas para la lógica interpretativa del instrumento relativa a la señal de salida del conjunto de sensor 30, que puede servir para limitar el sistema de detector de desplazamiento de resonancia 10 a aplicaciones específicas, como limitado solo al uso en uno de los siguientes: aplicaciones veterinarias, aplicaciones de toxicología, aplicaciones de drogas de abuso, aplicaciones de granos OMG, por ejemplo.

[0034] El dispositivo de almacenamiento de datos puede contener también información específica de un tipo de sensor como el intervalo de frecuencia general o frecuencia de resonancia aproximada del resonador determinada en pruebas posteriores a la producción. Esta información podría, por ejemplo, reducir el tiempo de ajuste de la calibración o detección del sensor cuando se acopla un nuevo sensor a un instrumento. En un modo de realización relacionado, el dispositivo de

almacenamiento de datos contiene tablas de búsqueda de constantes de corrección de calibración que son indexadas mediante códigos de búsqueda determinados individualmente para los sensores en la fábrica. En diversos modos de realización, el código de búsqueda puede suministrarse a través de una etiqueta impresa, etiqueta de código de barras o utilizando una etiqueta RFID.

5 **[0035]** En otro modo de realización relacionado, el sensor incluye una memoria de solo lectura (ROM) o dispositivo flash pequeño que tiene sus propias constantes de calibración específicas para el conjunto de sensor individual 30. Estos datos podrían suministrarse basándose en la calibración de fábrica llevada a cabo en una muestra representativa extraída del lote fabricado en el que se fabricó el conjunto de sensor individual 30. En otro modo de realización, el instrumento es configurado con un dispositivo de interfaz de red y *firmware*/controladores asociados, que permiten que el dispositivo inicie automáticamente una consulta en una red para obtener constantes de calibración para el sensor específico. Este modo de realización elimina la necesidad de mantener datos de calibración de manera local. En su lugar, cuando se une un nuevo sensor, el instrumento determina el número de serie asociado al sensor concreto (utilizando RFID, escaneo de código de barras, etc.) y utiliza esa información para formar su consulta. La base de datos que tiene datos de calibración de sensor específicos puede almacenarse en un servidor situado en las instalaciones del laboratorio o de manera remota (p. ej., en las instalaciones del fabricante), en cuyo caso la red en la que se coloca la consulta es una red de área amplia (WAN) como internet.

20 **[0036]** El conjunto de sensor 30 incluye uno o más resonadores como dispositivos de onda acústica de volumen, por ejemplo, descritos con mayor detalle a continuación. En diversos modos de realización, el conjunto de sensor 30 puede o no incluir circuitos que se conectan con el uno o más resonadores. Por ejemplo, en un tipo de modo de realización, los circuitos de accionamiento que provocan que el uno o más resonadores oscilen se incorporan en el conjunto de sensor 30. En otro modo de realización de este tipo, los circuitos de medición, incluyendo conversión analógico-digital, se incorporan en el conjunto de sensor 30. En otro tipo de modo de realización, los circuitos de medición y accionamiento están situados en la carcasa del instrumento 12a o 12b.

25 **[0037]** En un modo de realización de la invención, como se muestra en la FIG. 3, un sistema que detecta características de resonancia cambia de un resonador de detección a un resonador de referencia. En este modo de realización de ejemplo, el ángulo de fase de cada resonador es la característica de resonancia que se está monitorizando.

30 **[0038]** Un resonador de muestra 44 y un resonador de referencia 54 están conectados cada uno a acopladores direccionales independientes 52. Los acopladores direccionales 52 proporcionan a sus resonadores respectivos 44, 54 una señal generada por un microcontrolador 55, sintetizador de frecuencia controlado 56 y un amplificador de ganancia variable 58. Los acopladores direccionales 52 también generan cada uno la señal incidente y la señal de sensor reflejada 35 a un detector de señal vectorial 59. El detector de señal vectorial 59 para cada resonador procesa las señales para producir una señal de salida que indica una diferencia de fase entre las señales de frecuencia de entrada y salida. Estas señales se entregan a un convertidor analógico-digital y después son leídas por el microcontrolador 55.

35 **[0039]** En diversos modos de realización, el microcontrolador 55 utiliza la señal de salida para cualquiera de ellos, o ambos, del resonador de detección y el resonador de referencia para detectar un cambio brusco indicativo de la introducción de la muestra a los resonadores, como se describirá con mayor detalle a continuación.

40 **[0040]** De manera adicional, el microcontrolador 55 está programado para comparar cualquier diferencia en el cambio de fase, o el ritmo de cambio de fase con el tiempo, entre la señal incidente y la señal de sensor reflejada 35 de ambos el resonador de muestra y el resonador de referencia. Debido a que el cambio de fase del resonador de muestra 44 es provocado principalmente por la unión del material que se está detectando en la superficie del resonador de detección, se observará un mayor cambio de fase con el tiempo en comparación con cualquier cambio de fase con el tiempo, debido a efectos ambientales, observado en el resonador de referencia. Debido al efecto potencial que puede tener la temperatura en la frecuencia resonante de los resonadores, puede incluirse un sensor de temperatura 57 para proporcionar datos de temperatura al microcontrolador 55.

45 **[0041]** Según un modo de realización de la presente invención, los resonadores de detección y de referencia separados se accionan independientemente a sus propias frecuencias resonantes individuales únicas, que se determinan por separado. El uso de frecuencias de accionamiento distintas proporciona una sensibilidad mejorada, debido a que los resonadores de detección y de referencia se operan a sus frecuencias resonantes exactas respectivas (o tan cerca de ellas como sea posible en un sistema dado), y cualquier cambio en la frecuencia resonante es más fácil de discernir.

50 **[0042]** La FIG. 4 ilustra una disposición de medición de ejemplo según un modo de realización, utilizando un resonador de detección de una entrada 44 y un resonador de referencia de una entrada 54, cada uno de los cuales recibe su propia señal de excitación independiente. Un resonador de una entrada tiene un electrodo 46, 48 que se utiliza tanto para entrada como para salida de señal. El otro electrodo 49, 50 de cada resonador de una entrada está normalmente conectado a tierra.

55 **[0043]** Este modo de realización incluye una fuente de señales 21, que incluye un oscilador controlado por tensión 60 y un multiplexor 62, proporciona una señal de entrada de una primera frecuencia que se encuentra en las bandas resonantes, o cerca de ellas, de la primera frecuencia resonante del primer resonador. La fuente de señales 21 proporciona también una señal de entrada de una segunda frecuencia que se encuentra en las bandas resonantes, o

cerca de ellas, de la frecuencia resonante del segundo resonador. En una variación de la disposición ilustrada en la FIG. 4, un oscilador independiente, como un VCO adicional (no mostrado), puede proporcionar una señal de entrada de una frecuencia para cada uno de los resonadores respectivos, lo que podría eliminar la necesidad del multiplexor 62.

5 **[0044]** La señal de entrada proporcionada por la fuente de señales 21 es dirigida por acopladores direccionales 23, 24 a sus resonadores de detección y de referencia respectivos 44, 54. Las señales de salida reflejadas de los resonadores 44, 54 son dirigidas a los detectores de fase 25, 26 por los acopladores respectivos 23, 24. Cada uno de los detectores de fase 25, 26 recibe adicionalmente una señal de referencia de un generador de señales de referencia interno correspondiente 27, 28. Los detectores de fase 25 y 26 procesan las señales de sensor y de referencia para producir
10 señales de salida que indiquen una diferencia de fase entre las señales de frecuencia de entrada y de salida de sus resonadores respectivos. La salida de los detectores de fase 25, 26 se selecciona mediante un multiplexor 63 (que opera generalmente de forma sincronizada con el multiplexor 62, ambos pueden implementarse en un único paquete con una entrada de control común, o pueden ser dispositivos separados, cada uno con su propia entrada de control), y es convertida a una representación digital por un convertidor analógico-digital (CAD) 64, que está conectado al controlador 55.

15 **[0045]** El controlador 55 está programado para aplicar lógica para interpretar las señales de salida. La introducción de la muestra en los resonadores generalmente provoca un cambio brusco común en las señales de salida del resonador de referencia y del resonador de detección, que el controlador 55 está programado para detectar. La unión del material que se está detectando en la superficie del resonador de detección 44 generalmente provoca un cambio de ángulo de fase $d\Phi/dt$ entre el resonador de detección y el resonador de referencia cuando el material detectado está presente.

20 **[0046]** Los detectores de fase 25, 26 del modo de realización ilustrado pueden incluir un mezclador doble compensado (o un multiplicador matemático) que recibe las señales del sensor y de referencia. La salida del mezclador atraviesa un filtro de paso bajo que elimina un término dependiente del tiempo y deja solo el término de CD como salida del detector de fase 25. Como se proporciona con más detalle en la patente estadounidense n.º 5,932,953, el cambio de desplazamiento de fase medido resultante puede utilizarse para derivar la cantidad total del material unido en la superficie del resonador de detección 44. En algunos modos de realización, la fuente de señales 21 genera una señal analógica y el detector de fase 25 genera una señal de salida analógica o una señal de salida digital después de recibir la señal y señales de referencia y procesar la información desde allí.

25 **[0047]** En el modo de realización ilustrado, la señal de cada resonador respectivo 44, 54 es dirigida a un detector de fase respectivo separado 25, 26, procesando cada detector de fase respectivo 25, 26 la señal de sensor o de referencia respectiva para producir una señal de fase que indique un desplazamiento de fase. Los datos de desplazamiento de fase se convierten a datos digitales que pueden ser comparados después entre sí, o con sus frecuencias de fuente respectivas, por el controlador 55 para determinar la diferencia neta en el desplazamiento de fase entre los resonadores de detección y de referencia. El desplazamiento de fase diferente está causado por la unión del material que se está detectando en la superficie del resonador de detección 44 y no en el resonador de referencia 54. El controlador 55 puede configurarse para
30 muestrear periódicamente la salida de los detectores de fase 25, 26 o cualquier otro mecanismo apropiado para observar y registrar el cambio de fase de las dos señales durante el funcionamiento.

[0048] El resonador de detección 44 está recubierto con un reactivo de prueba que se une al analito o lo captura para ser detectado durante las pruebas de diagnóstico. El resonador de referencia 54 está recubierto con un reactivo de referencia que no se une al analito ni lo captura durante las pruebas de diagnóstico.

35 **[0049]** La FIG. 5 es un diagrama de bloques que ilustra una disposición de medición con un resonador de prueba y de referencia según otro modo de realización en el que se utiliza un esquema de detección del desplazamiento de frecuencia para detectar un cambio de resonancia. El resonador de prueba 70 y el resonador de referencia 71 están conectados respectivamente a amplificadores 76 y 77 como se muestra. Los amplificadores 76, 77 están contruidos de manera que, al operarse con resonadores 70, 71, generan señales de salida a la frecuencia resonante de los resonadores 70, 71. Por lo tanto, los cambios en la frecuencia resonante del resonador de prueba 70 o el resonador de referencia 71 (como los inducidos por la captura de analito en la superficie del resonador de prueba, o por cambios ambientales localizados en la solución de muestra en la que se sumergen los resonadores de prueba y de referencia 70, 71) provocarán cambios en la frecuencia resonante entregada de los amplificadores 76, 77 a los contadores digitales 78, 79.

40 **[0050]** Las frecuencias resonantes son generadas por amplificadores 76 y 77 y pasadas a contadores de frecuencia digitales 78 y 79, cuyas salidas se conectan con el controlador 80. Por consiguiente, el controlador 80 tiene una lectura continua de cada frecuencia resonante, y los cambios en estas representan cambios en la resonancia del resonador de prueba 70 y el resonador de referencia 71. Como se describirá con mayor detalle a continuación, en un modo de realización, el controlador 80 está programado para detectar un cambio brusco en la característica de resonancia de uno, o ambos, del resonador de detección y el resonador de referencia, como un indicador de introducción de la muestra. El controlador 80 está programado además para determinar diferencias en los cambios de las características de resonancia entre el resonador de prueba 70 y el resonador de referencia 71, junto con el ritmo de cambio en la resonancia de esta diferencia. A partir de esta información, el controlador 80 está programado para determinar si el resonador de prueba 70 ha experimentado unión de analito y, a partir del ritmo de cambio en su característica de resonancia (en relación con la del resonador de referencia 71), para determinar la concentración de analito en el fluido de muestra.

[0051] Durante el proceso de muestreo, el conjunto de sensor 30 es introducido en una muestra líquida o gaseosa, o la alícuota de muestra puede ser introducida en los resonadores de detección y los resonadores de referencia 44, 54 mediante un conjunto de alojamiento de sensor. La muestra de líquido para la prueba diagnóstica puede incluir sangre, orina, suero, saliva, agua, o cualquier otra muestra líquida que pueda ser de interés. Tan pronto como la muestra entra en contacto con los resonadores de detección y de referencia 44, 54, se produce un cambio en la señal de los resonadores 44, 54. El instrumento 12 está esperando recibir el cambio de señal, y una vez que se detecta el cambio de señal, el instrumento 12 comienza la secuencia interpretativa de recogida de datos. El instrumento 12 continúa recogiendo datos hasta que bien (i) el instrumento 12 se para porque la señal no ha cambiado, o (ii) dependiendo de la velocidad con la que cambia la señal, el instrumento 12 dejará de recoger datos una vez que se hayan recibido suficientes datos para proporcionar una interpretación de la prueba de diagnóstico. Una interpretación de la prueba de diagnóstico puede incluir una indicación de que el material objetivo, o el analito, ha sido unido o capturado sobre el resonador de detección y una cuantificación del material objetivo.

[0052] Haciendo referencia ahora a la FIG. 6A, se ilustra la superficie superior de un conjunto de resonador de ejemplo, que representa el conjunto de resonador de detección y el conjunto de resonador de referencia. Para mayor referencia, la siguiente descripción se refiere al conjunto de resonador de detección 44, aunque la descripción es igualmente aplicable al conjunto de resonador de referencia 54. La superficie superior del conjunto de resonador de detección 44 contiene un conjunto de bolas de soldadura 45a-45d. Las bolas de soldadura 45a-45c están conectadas a tierra dentro del conjunto de resonador 44. La bola de soldadura 45d está conectada al resonador 45A mediante una vía a través de la capa piezoeléctrica y un conductor resonador entre ellos, que se ilustra de manera adicional mediante la vista de capa parcial en la FIG. 6B. El conjunto de resonador 44 también está en voladizo sobre el borde de la placa de circuito impreso para permitir que el resonador 45A se exponga al entorno circundante durante el proceso de prueba. En algunos modos de realización, las superficies de soldadura pueden estar en un lado diferente del conjunto de resonador 44 que el resonador 45A, de manera que el conjunto de resonador 44 no tiene necesariamente una configuración en voladizo. En otros modos de realización, la PCB puede estar configurada de manera que el conjunto de resonador está montado en una depresión en la PCB y la conexión eléctrica entre el conjunto de resonador y la PCB se consigue mediante un conductor, como una epoxi conductora.

[0053] En la construcción de los resonadores, la superficie relativa del resonador 44A está directamente relacionada con la frecuencia a la que resuena el resonador, teniendo los resonadores de frecuencia más altos una superficie más pequeña y teniendo los resonadores de frecuencia más bajos una superficie más grande. Por ejemplo, un resonador de tamaño más pequeño (p. ej., diámetro de 154,4 μm) tiene una frecuencia resonante de 2,25 GHz, mientras que un resonador de tamaño más grande (diámetro de 254 μm) tiene una frecuencia resonante de 900 MHz. Por consiguiente, se contempla que se pueden utilizar resonadores con diversas frecuencias resonantes dependiendo de la frecuencia resonante deseada y cualquier restricción regulatoria en las frecuencias disponible para utilizarse. El grosor de la capa piezoeléctrica también afecta a la frecuencia, resonando una capa piezoeléctrica más fina a una frecuencia más alta que una capa más gruesa. Como se ha analizado anteriormente, aunque diversos resonadores de tamaño similar tienen frecuencias resonantes generalmente similares, la ligera variación de tamaño, debida potencialmente a variaciones en la fabricación, puede dar lugar a resonadores similares con frecuencias resonantes cercanas, pero significativamente diferentes.

[0054] En algunos modos de realización, una configuración de paletas espalda con espalda permite colocar el resonador de detección 44 y el resonador de referencia 54 próximos entre sí, los dos resonadores está sometidos a condiciones ambientales sustancialmente idénticas durante una operación de detección de material, lo que permite mediciones de desplazamiento de resonancia precisas y una cancelación efectiva de los efectos ambientales. Los efectos ambientales que pueden cancelarse pueden ser un resultado de una viscosidad, pH, temperatura, partículas, y cualquier otra condición ambiental dentro de la muestra que afectará al resonador de detección 44 durante las pruebas de diagnóstico.

[0055] En otro modo de realización de la invención, se emplean múltiples pares de resonador de referencia/sensor. Cada par de sensor/resonador puede estar configurado para detectar un material diferente, o pueden utilizarse múltiples pares de sensor/resonador para proporcionar de forma redundante una precisión o fiabilidad mejorada del instrumento. En modos de realización relacionados, se toman medidas para reducir la diafonía entre los múltiples pares de pares de resonador de referencia/sensor.

[0056] Un enfoque es proporcionar una separación física entre pares. La separación física puede conseguirse colocando los diferentes pares de resonador de referencia/sensor en sustratos separados para proporcionar aislamiento mecánico y eléctrico. Otra forma de conseguir la separación física es colocar los diferentes pares de resonador de referencia/sensor lo suficientemente alejados para que cualquier acoplamiento mecánico o eléctrico sea nominal.

[0057] La diafonía entre los resonadores también puede reducirse o eliminarse operando los pares de pares de resonador de referencia/sensor a frecuencias diferentes. Por ejemplo, dos o más pares de resonadores montados en una única PCB pueden fabricarse para tener sus frecuencias resonantes nominales separadas en una cantidad suficiente para reducir cualquier diafonía a un nivel insignificante. La separación espectral suficiente para conseguir el aislamiento depende de varios factores, como el factor de calidad de la oscilación que, a su vez, depende de los materiales, construcción y geometría de los propios resonadores; de forma adicional, la separación espectral requerida para reducir la diafonía a un nivel aceptable puede depender de la selectividad de los circuitos de medición. La separación de frecuencia puede definirse en cuanto al porcentaje de frecuencia de accionamiento. Por ejemplo, la separación puede ser de

aproximadamente 1-5 % de frecuencia de accionamiento. Por lo tanto, en los modos de realización en los que la frecuencia resonante se encuentra en el rango de 750-1 000 MHz, la separación de frecuencia puede ser de aproximadamente 15 MHz entre los múltiples pares de resonador de referencia/sensor.

5 **[0058]** La FIG. 7 es un diagrama que ilustra un proceso de determinación de frecuencias resonantes para diferentes pares de resonador en una placa de multiresonador según un modo de realización. El enfoque de este modo de realización utiliza un diseño de escala de frecuencia fija (DeltaF). En un diseño multiplexado de un grupo de resonadores, la diferencia de frecuencia (DeltaF) entre dos resonadores cualesquiera en las etapas de escala adyacentes es tal que reduce la diafonía entre los resonadores a una cantidad insignificante. La diferencia de frecuencia entre las etapas de escala adyacentes puede ser fija o puede ser variable y está definida por la aplicación o prueba. Como se representa en la FIG. 7, cada par de resonador de referencia/sensor opera a una frecuencia similar. Sin embargo, otros pares de resonador de referencia/sensor operan cada uno a una diferencia de frecuencia DeltaF.

10 **[0059]** En otro tipo de modo de realización, se pueden utilizar grupos de más de dos sensores en una disposición de medición. En lugar de disponerse en pares, los grupos pueden estar compuestos por tres o más sensores, de los cuales hay más de un resonador de detección y/o más de un resonador de referencia. En un tipo de configuración, un grupo de resonadores se dispone muy cerca de manera que el grupo puede estar expuesto al mismo entorno de prueba. Uno de dichos grupos de sensores puede incluir un total de ocho resonadores, de los cuales siete son sensores y uno es una referencia. Como variación de este modo de realización de ejemplo, un grupo diferente de ocho resonadores incluye seis sensores y dos resonadores de referencia.

15 **[0060]** En funcionamiento, para cada grupo de resonadores, el desplazamiento de resonancia de cada resonador de detección puede compararse cada uno con un determinado resonador de referencia individual. De manera alternativa, un desplazamiento de resonancia medio (u otro agregado estadísticamente) de más de un sensor puede compararse con un desplazamiento de resonancia medio (o agregado de otra manera) de más de un resonador de referencia del grupo. En diversos instrumentos que implementan los modos de realización de la invención, se pueden emplear varias disposiciones de medición diferentes utilizando grupos de más de dos resonadores de referencia/sensor para conseguir una exactitud o precisión mejorada, o para proporcionar una prueba más completa que pueda detectar una pluralidad de materiales diferentes en la muestra que se está analizando.

20 **[0061]** También se contemplan diversos modos de realización, que incluyen uno o más resonadores montados en una pluralidad de placas de circuito impreso conectadas. Uno de dichos modos de realización incluye un sensor con múltiples capas de PCB, incluyendo cada capa o subgrupo de capas uno o más resonadores montados en una configuración escalonada o de rejilla a través de las múltiples capas de PCB, teniendo cada resonador el mismo eje de resonancia. En otros modos de realización, los múltiples sensores individuales con uno o más resonadores se construyen en cualquiera de diversas configuraciones que incluyen, sin carácter limitativo, orientaciones en cruz, diamante, triángulo, cuadrado, pentagonal o circular formadas a partir de tres o más capas de PCB apiladas. Se puede emplear un interconector adecuado para acoplar la pluralidad de capas de PCB a un instrumento configurado para operar un sensor multiresonador.

25 **[0062]** La FIG. 8A es un diagrama de circuito que ilustra un modelo de sensor resonador simplificado 40. El modelo 40 proporciona una conexión entre la propiedad física del cristal resonador y el oscilador. Las constantes físicas del cristal determinan los valores equivalentes de R1, C1, L1 y C0 del dispositivo. La resistencia (R1) es un resultado de las pérdidas de volumen, C1 es la capacitancia de movimiento, L1 es la inductancia de movimiento determinada por la masa, y la capacitancia estática (C0) está formada por los electrodos, el soporte y los cables. Al operarse lejos de la resonancia, la estructura es simplemente un condensador con capacitancia C0, pero a la frecuencia resonante precisa del cristal, el circuito se convierte en un condensador y una resistencia en paralelo. La reactancia del cristal se aproxima a cero en el punto de resonancia en serie y alcanza un máximo en la frecuencia antirresonante fA.

30 **[0063]** Un ejemplo de determinación de las diversas propiedades del resonador es un método de elementos concentrados que incluye las siguientes etapas realizadas en datos recogidos en un archivo de datos SnP de 1 entrada:

- 1) Convertir $s_{11}(f)$ en $z_{11}(f)$ para todas las frecuencias medidas.
- 2) El real(z_{11}) a la frecuencia más alta (fh) es la resistencia de contacto $R_c = \text{real}(z_{11}(f_h))$.
- 3) La capacitancia parásita C_0 también se calcula a la frecuencia más alta (fh)

$$C_0 = 1 / [2 * \pi * f_h(\text{hz}) * \text{imag}(z_{11}(f_h))]$$

- 35
- 4) Eliminar los efectos de R_c sustrayéndolo de z_{11} . $z_{11}'(f) = z_{11}(f) - R_c$
 - 5) La frecuencia resonante en serie f_s puede determinarse cuando la señal de $\text{Imag}[z_{11}'(f)]$ cambia de neg. a pos.
 - 6) La inductancia de movimiento se calcula como

$$L_s = (1 / (4 * \pi)) * (\text{imag}[z_{11}'(f_s)] - \text{imag}[z_{11}'(f_s - \Delta f)]) / \Delta f \text{ donde } \Delta f = 500 \text{kHz}$$

7) La resistencia de movimiento es $R_s = \text{real}[z_{11}''(f_s)]$

8) La capacitancia de movimiento es $C_s = 1/[(2\pi f_s)^2 L_s]$

[0064] La FIG. 8B es un diagrama que ilustra un modelo de resonador más sofisticado 42 que incluye una resistencia de contacto (R_c). Tanto la resistencia de contacto R_c como la capacitancia estática C_0 son variables importantes que deberían desintegrarse para observar los cambios que suceden en la superficie del resonador. Como entenderán los expertos en la materia, el interconector 20 también puede introducir un efecto de traslación y rotación en las mediciones de los sensores resonadores. Debido a que el hecho de montar un cristal en un sensor puede afectar a la resistencia de contacto R_c y la capacitancia estática C_0 del resonador, es importante que se tengan en cuenta estos parámetros en la calibración, sintonización y uso de los sensores resonadores.

[0065] Un método de ejemplo de determinación de las diversas propiedades del resonador con C_0 eliminada incluye las siguientes etapas:

1) Convertir $s_{11}(f)$ en $z_{11}(f)$ para todas las frecuencias medidas.

2) El $\text{real}(z_{11})$ a la frecuencia más alta (f_h) es la resistencia de contacto $R_c = \text{real}(z_{11}(f_h))$.

3) La capacitancia parásita C_0 también se calcula a la frecuencia más alta (f_h)

$$C_0 = 1/[2\pi f_h(\text{Hz}) \cdot \text{imag}(z_{11}(f_h))]$$

4) Eliminar los efectos de R_c sustrayéndolo de z_{11} . $z_{11}'(f) = z_{11}(f) - R_c$

5) Eliminar los efectos de C_0 sustrayéndolo de

$$y_{11}'(f) \text{ o } z_{11}''(f) = 1/[(1/z_{11}'(f)) - j(2\pi f C_0)]$$

6) La frecuencia resonante en serie f_s puede determinarse cuando la señal de $\text{Imag}[z_{11}''(f)]$ cambia de neg a pos.

7) La inductancia de movimiento se calcula como

$$L_s = (1/(4\pi)) \cdot (\text{imag}[z_{11}''(f_s)] - \text{imag}[z_{11}''(f_s - \Delta f)]) / \Delta f \text{ donde } \Delta f = 500\text{kHz}$$

8) La resistencia de movimiento es $R_s = \text{real}[z_{11}''(f_s)]$

9) La capacitancia de movimiento es $C_s = 1 / [(2\pi f_s)^2 L_s]$

[0066] Las etapas anteriores pueden modificarse en un tercer ejemplo para dar lugar al siguiente método de modelado de un resonador:

1) Convertir $s_{11}(f)$ en $z_{11}(f)$ para todas las frecuencias medidas.

2) El $\text{real}(z_{11})$ a la frecuencia más alta (f_h) es la resistencia de contacto

$$R_c = \text{real}(z_{11}(f_h)).$$

3) La capacitancia parásita C_0 también se calcula a la frecuencia más alta (f_h),

$$C_0 = 1/[2\pi f_h(\text{Hz}) \cdot \text{imag}(z_{11}(f_h))]$$

4) Eliminar los efectos de R_c sustrayéndolo de z_{11} .

$$z_{11}'(f) = z_{11}(f) - R_c$$

5) La inductancia de movimiento se calcula como

$$L_s = (1/(4\pi)) \cdot (\text{imag}[z_{11}'(f_s)] - \text{imag}[z_{11}'(f_s - \Delta f)]) / \Delta f \text{ donde } \Delta f = 500\text{kHz}$$

6) La resistencia de movimiento es $R_s = \text{real}[z_{11}'(f_s)]$

7) La capacitancia de movimiento es $C_s = 1/[(2\pi f_s)^2 L_s]$

Los modelos de resonador se pueden utilizar para cribar los resonadores fabricados con el fin de evaluar y seleccionar resonadores adecuados.

[0067] En un modo de realización, se puede utilizar el siguiente método para evaluar resonadores:

1) Cargar archivos S1p para todos los resonadores.

ES 2 804 799 T3

2) Convertir $s_{11}(f)$ en $Z_{11}(f)$ para todas las frecuencias medidas.

3) Calcular la resistencia de contacto a la frecuencia más alta (f_h)

$$R_c = \text{real}(z_{11}(f_h))$$

4) Eliminar los efectos de R_c sustrayéndolo de z_{11} .

5

$$z_{11}'(f) = z_{11}(f) - R_c$$

5) Calcular la capacitancia parásita C_0 a la frecuencia más alta (f_h).

$$C_0 = 1/[2 * \pi * f_h(\text{hz}) * \text{imag}(z_{11}(f_h))]$$

6) Calcular la inductancia de movimiento

$$L_s = (1/(4 * \pi)) * (\text{imag}[z_{11}(f_s)] - \text{imag}[z_{11}(f_s - \Delta f)]) / \Delta f$$

10

7) Calcular la resistencia de movimiento

$$R_s = \text{real}[z_{11}'(f_s)]$$

8) Calcular la capacitancia de movimiento

$$C_s = 1/[(2 * \pi * f_s)^2 * L_s]$$

9) Calcular valores Q

15

$$Q = 1. / (2 * \pi * f_s * C_1 * (R_s + R_c))$$

[0068] Después, se puede emplear un método de desviación estándar variable para reducir la selección de resonadores.

10) Encontrar resonadores que tengan la resonancia en serie definida

11) Encontrar resonadores que tengan valores $Q > 80$

12) Encontrar la subpoblación de resonadores que hayan pasado ambas etapas 10 Y 11.

20

13) Calcular la desviación estándar y media de las frecuencias resonantes medidas a partir de la subpoblación de resonadores de la etapa 12

14) Calcular la desviación estándar y media de la resistencia de contacto calculada de los resonadores a partir de la subpoblación de resonadores de la etapa 12

25

15) Calcular la desviación estándar y media de la resistencia de movimiento calculada de los resonadores a partir de la subpoblación de resonadores de la etapa 12

16) Calcular la desviación estándar y media de la inductancia de movimiento calculada de los resonadores a partir de la subpoblación de resonadores de la etapa 12

17) Calcular la desviación estándar y media de la capacitancia de movimiento calculada de los resonadores a partir de la subpoblación de resonadores de la etapa 12

30

18) Calcular la desviación estándar y media de la capacitancia estática calculada de los resonadores a partir de la subpoblación de resonadores de la etapa 12

[0069] Una vez se ha calculado la desviación estándar y media como se ha descrito, se aplica una condición límite en cada parámetro según las siguientes etapas llevadas a cabo en la subpoblación de resonadores de la etapa 12:

19) Calcular la distribución de la resistencia de contacto

35

20) Calcular la distribución de la resistencia de movimiento

21) Calcular la distribución de la inductancia de movimiento

22) Calcular la distribución de la capacitancia de movimiento

23) Calcular la distribución de la capacitancia estática

24) Seleccionar un valor SD distinto para cada variable de las etapas 19-23

25) Encontrar el subconjunto de resonadores que pasa todas las condiciones límite de SD seleccionadas por el usuario en la etapa 24

26) Calcular el rendimiento e inspeccionar visualmente los círculos del diagrama de Smith en busca de resonadores periféricos

5 27) Modificar los valores SD para cada variable en la etapa 24 hasta que todos los resonadores no deseables se excluyan de la subpoblación.

Una implementación de ejemplo del proceso de cálculo de valores Q se realiza en el siguiente código:

```

Ref_Coeff=10.^(MA./20);
RE=Ref_Coeff.*cos(PA.*pi/180);
IM=Ref_Coeff*sin(PA.*pi/180);
Admittance=(.02*1-RE-j*IM)/(1+RE+j*IM);
Real_Adm=real (Admittance);
Imag_Adm=imag (Admittance);
DEN=1-(2*RE) + (RE.*RE) + (IM.*IM);
REZ = (50*(1-(RE.*RE) - (IM.*IM)))./DEN;
IMZ = (50*2*IM)./DEN;
for L = 1:1:length(RE(1,:))
    QMAX = 0;
    for I = 1:length(Freq)
        if (I>=6)
            A=((2*Freq(I)) / (Freq (5) - Freq (1)));
            B=(REZ (I-5,L) * IMZ (I,L)) - (REZ (I,L)*IMZ (I - 5,L));
            C=(REZ (I,L) + REZ (I-5,L) ^ 2+(IMZ (I,L) + IMZ (I - 5,L))^ 2;
            Q(I,L) = A*B/C;
            if (abs(Q(I,L)) >QMAX)
                QMAX = abs(Q(I,L));
                FMAX = Freq(I);
            end
        end
    end
end
end
FINALQ=[FINALQ Q];

```

[0070] El siguiente proceso es un ejemplo para la determinación del factor de calidad de un resonador según un modo de realización:

25 Etapa1: Calcular pérdidas de reflexión.

$$\text{Ref_pérdidas}=10^{(\text{Mag}/20)};$$

Etapa2: Calcular los coeficientes de reflexión

$$\text{RE}=\text{Ref_pérdidas}.*\cos(\text{ Fase }.*\pi/180);$$

$$\text{IM}=\text{Ref_pérdidas}.*\sin(\text{ Fase }.*\pi/180);$$

30 Etapa3: Calcular la admitancia de los coeficientes de reflexión

$$\text{Admitancia}=(.02*(1-\text{RE}-j*\text{IM})/(1+\text{RE}+j*\text{IM}));$$

$$\text{Real_Adm}=\text{real}(\text{Admitancia});$$

$$\text{Imag_Adm}=\text{imag}(\text{Admitancia});$$

Etapa4: Calcular la IMP real e imaginaria

35 $\text{DEN}=1-(2*\text{RE})+(\text{RE}.*\text{RE})+(\text{IM}.*\text{IM});$

$$\text{REZ}=(50*(1-(\text{RE}.*\text{RE})-(\text{IM}.*\text{IM})))./\text{DEN};$$

$$\text{IMZ}=(50*2*\text{IM})./\text{DEN};$$

Etapas: Calcular Q para cada frecuencia y cada punto de tiempo de medición

```

for L=1:1:length(RE(1,:))
    QMAX = 0;
    for I=1:length(Freq)-1
        if (I>=6)
            A=(2*Freq(I))/(Freq(5) - Freq(1));
            B=(REZ(I-5,L)*IMZ(I,L)-(REZ(I,L)*IMZ(I-5,L)));
            C=(REZ(I,L)+REZ(I-5,L))^2+(IMZ(I,L)+IMZ(I-5L))^2;
            Q(I,L) = A*B/C;
            if (abs(Q(I,L)) > QMAX)
                QMAX=abs(Q(I,L));
                FMAX=Freq(I);
            end
        end
    end
end
end
end

```

[0071] El método anterior puede modificarse de forma adicional con las siguientes ecuaciones para mejorar la velocidad de cálculo:

1:

$$Z = \frac{50 * (1 + 10^{(\text{Mag}/20)}) * e^{i\text{Fase}}}{(1 - 10^{(\text{Mag}/20)}) * e^{i\text{Fase}}}$$

15 2: Factor de escala:

$$A = (2 * \text{Frec}) / (\text{Frec}(5) - \text{Frec}(1))$$

3:

$$Q = A * 1.2 * \frac{\text{real}(Z) * \text{dif}(\text{Imag}(Z)) - \text{Imag}(Z) * \text{dif}(\text{Real}(Z))}{\text{Abs}(Z)^2}$$

20 [0072] En el esquema de detección del desplazamiento de frecuencia como en el modo de realización descrito con referencia a la FIG. 5, el circuito de control ajusta automáticamente la frecuencia de accionamiento de los resonadores de referencia y sensor para mantener siempre su punto resonante, y el ajuste de la frecuencia de accionamiento indica el cambio en la característica de resonancia. Por el contrario, la disposición de la detección del desplazamiento de fase de los modos de realización de las FIG. 3 y 4 implica la determinación de la frecuencia de accionamiento óptima para los resonadores de referencia y sensor.

25 [0073] Se contemplan diversas maneras de determinar la frecuencia de funcionamiento óptima del resonador. Este proceso, denominado sintonización, o calibración de punto de funcionamiento, se lleva a cabo rápidamente según diversos modos de realización. Esto permite el uso de esquemas de detección de desplazamiento de fase para medir muestras con altas concentraciones de analito.

30 [0074] En un enfoque, la determinación de la frecuencia de funcionamiento de un resonador se encuentra mediante el procesamiento posterior de los datos recogidos, en el que se determina el retardo de fase de grupo para cada frecuencia de señal suministrada a un resonador, y la frecuencia de resonancia operativa se define como la frecuencia de retardo de grupo máximo.

35 [0075] En otro enfoque, la frecuencia de resonancia operativa del resonador puede determinarse de manera eficiente en un cálculo utilizando características de oscilación reales medidas representadas por los coeficientes de reflexión real e imaginario. En este enfoque, la frecuencia (f1) se determina en que Real(Z) tiene su valor máximo y la frecuencia (f2) en que Imaginario(Z) tiene su valor máximo. Utilizando este enfoque, la frecuencia de resonancia operativa del resonador se define como la media de f1 y f2. Este enfoque proporciona una eficacia computacional mejorada con respecto a las técnicas utilizadas anteriormente. A su vez, la eficacia computacional permite una sintonización más rápida, lo que puede ser muy importante en aplicaciones en las que el material que se está midiendo se une rápidamente al sensor resonador.

40 [0076] En un ejemplo de cómo se puede aplicar este cálculo, se acopla un sensor al instrumento y el instrumento sintoniza inmediatamente el resonador en el aire barriendo las frecuencias en un ancho de banda amplio. Esta sintonización inicial puede conseguirse determinando el retardo de grupo en cada frecuencia e identificando la frecuencia a la que se produce el retardo de grupo máximo, o utilizando el cálculo en cada frecuencia y encontrando la media de f1 y f2 utilizando el método dado a conocer anteriormente. La frecuencia operativa en el aire se utiliza después para definir un ancho de

banda estrecho, por ejemplo, ± 5 MHz, o ± 1 MHz, de cada frecuencia operativa del resonador, que se utilizará para una segunda etapa de sintonización que puede llevarse a cabo una vez que los resonadores están expuestos a la muestra de prueba. La segunda etapa de sintonización se consigue utilizando el método de cálculo descrito para la etapa de sintonización inicial, anterior, junto con un intervalo de muestreo más fino que el utilizado para barrer la ventana de frecuencia utilizado para la primera etapa de sintonización mientras que el sensor estaba en el aire.

[0077] En un modo de realización relacionado, se realiza un barrido de frecuencia adaptable en lugar de un barrido básico utilizando intervalos de muestreo predeterminados. Por ejemplo, a cada frecuencia operativa durante el barrido adaptable, las características de oscilación (p. ej., Real(Z) e Imaginario(Z)) se miden y se comparan con los valores correspondientes a frecuencias anteriores o posteriores. El resultado de esta comparación determina si la dirección del barrido se aproxima o se aleja del punto de resonancia. Este enfoque puede producir una sintonización más rápida del resonador a su frecuencia resonante, puesto que se puede evitar el barrido completo en algunos casos.

[0078] En diversos modos de realización, el barrido de frecuencia, los cálculos, la interpretación de los parámetros medidos y el control del proceso de sintonización son llevados a cabo por un controlador conectado a los circuitos de medición y detección y programado para ejecutar la rutina de sintonización. El controlador puede incluir un sistema digital con dispositivos principalmente de *hardware* como un circuito integrado de aplicación específica (ASIC) o matriz de puertas de campo programable (FPGA), por ejemplo, o puede incluir una combinación de *hardware* y *software*, como mediante un sistema de microprocesador y un conjunto de instrucciones para implementar la funcionalidad del controlador. En otros modos de realización, el controlador puede implementarse como una combinación de los dos, con determinadas funciones facilitadas por el *hardware* solo, y otras funciones facilitadas por una combinación de *hardware* y *software*. Se puede utilizar una serie de sistemas de microprocesador adecuados, entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, uno o más microcontroladores, uno o más procesadores de señales digitales, y similares, junto con circuitos de interfaz adecuados, almacenamiento de datos, sistema de acondicionamiento de energía, etc., según sea necesario para implementar la funcionalidad del controlador.

[0079] Haciendo referencia ahora a la FIG. 9A, se ilustra una técnica eficiente según un modo de realización para conseguir un barrido de sintonización en poco tiempo. Una primera etapa de sintonización (llevada a cabo mientras el resonador está en el aire, es decir, no colocado todavía en la muestra) realiza un rango de barrido relativamente amplio con un ajuste de tamaño de etapa de frecuencia más grande para el VCO, o generador de frecuencia. Una sintonización precisa posterior (llevada a cabo después de colocar el resonador en la muestra) reduce progresivamente el rango de barrido de frecuencia con un tamaño de etapa de frecuencia progresivamente más pequeño. El número de etapas que se emplean se basa en las características de ensayo y otras variables como la velocidad del microcontrolador y el rendimiento de comunicación del bus. La FIG. 9B es un diagrama que ilustra un ejemplo de dicho esquema utilizando un VCO ADF4360 como generador de frecuencia.

[0080] En un modo de realización relacionado, se consigue una sintonización aún más rápida una vez que el sensor se encuentra en una muestra de prueba con una modificación de la segunda etapa de sintonización utilizando un intervalo de muestreo más amplio que es intermedio entre los intervalos utilizados en la primera y la segunda etapa de sintonización en el ejemplo descrito anteriormente, para barrer la ventana de ± 5 MHz con el fin de identificar, por ejemplo, una ventana de 1 MHz dentro de la que se utiliza un intervalo de muestreo mucho más fino para lograr una sintonización más precisa. Se pueden utilizar etapas de sintonización «anidadas» adicionales según sea necesario y como permitan las velocidades de procesamiento del *hardware* para mejorar de forma adicional la precisión y la velocidad de la sintonización.

[0081] Este método más eficiente puede ser importante en determinadas aplicaciones en las que la muestra de prueba se une muy rápidamente al sensor. Cuando un sensor entra en contacto con una muestra de prueba, la reacción del ligando de captura en la superficie del sensor con el objetivo en la muestra comienza inmediatamente. Por lo tanto, es deseable que se determinen las frecuencias operativas óptimas del resonador en el menor tiempo posible después del contacto con la muestra de prueba. La utilización del ancho de banda estrecho determinado al sintonizar en el aire y la posterior utilización de la técnica dada a conocer anteriormente aborda esta necesidad de una manera no descrita anteriormente al permitir conseguir la sintonización en un segundo o menos de contacto de la muestra. En un modo de realización, se consigue la sintonización en 10 milisegundos. En un modo de realización adicional, se consigue la sintonización en 5 milisegundos. En otro modo de realización, con suficiente capacidad de procesamiento, la sintonización del sensor se consigue en menos de un milisegundo.

[0082] En un modo de realización de la invención, se determina la frecuencia resonante precisa de cada resonador en el aire justo antes de la introducción del sensor en un medio de prueba. Al sintonizar la frecuencia resonante barriendo un rango de aproximadamente ± 3 -5 % de la frecuencia del resonador antes de probar una primera aproximación de la frecuencia resonante de cada resonador se puede conseguir con los métodos analizados anteriormente utilizados para analizar la respuesta al barrido de frecuencia.

[0083] De manera adicional, en algunos modos de realización se lleva a cabo un proceso de sintonización adicional inmediatamente después de (y en respuesta a) la introducción de la muestra al sensor según el proceso de ejemplo analizado anteriormente. En un modo de realización de ejemplo de la invención, cada resonador se sintoniza para accionarse a su frecuencia resonante ideal al primer segundo de introducirse en el medio de prueba. Al sintonizar la frecuencia resonante barriendo un rango estrecho, por ejemplo, ± 5 MHz de la primera frecuencia resonante de

aproximación, se puede utilizar una frecuencia resonante más exacta para la prueba. Otros rangos pueden ser adecuados dependiendo de la frecuencia base del resonador.

[0084] Esta sintonización *in situ* tiene la ventaja de refinar aún más la frecuencia resonante de accionamiento de cada resonador para tener en cuenta la transición del aire al medio de prueba, como una solución líquida. En el caso en el que se supo que la sustancia objetivo se unía instantáneamente a un recubrimiento en el resonador de detección podía no ser posible realizar una sintonización *in situ*, pero los recubrimientos conocidos actualmente y las sustancias objetivo proporcionan muchos ejemplos en los que la reacción de unión puede llevar más tiempo del necesario para realizar la sintonización *in situ*.

[0085] A continuación, se describirán ejemplos del funcionamiento de los modos de realización del detector de desplazamiento de fase y desplazamiento de frecuencia del instrumento 12 con referencia a las FIG. 10A-11B.

[0086] Las FIG. 10A y 10B son gráficos que representan la evolución de señales de biosensor con el tiempo durante el funcionamiento del sistema para un biosensor de detección de desplazamiento de frecuencia y un biosensor de detección de desplazamiento de fase, respectivamente, según los modos de realización de la invención. La señal de biosensor puede ser fase, frecuencia, o alguna otra medida indicativa del comportamiento resonante del biosensor. El biosensor en estos ejemplos está destinado a la medición de un analito en muestras líquidas.

[0087] Haciendo referencia primero a la FIG. 10A, inicialmente, el biosensor está expuesto al aire (de manera similar, el biosensor puede exponerse inicialmente a otro medio). En el tiempo t_1 , el funcionamiento del sistema se inicia por aplicación de energía, detección automática de conexión del biosensor, activación externa por un usuario, u otro mecanismo de este tipo. Después de la iniciación en el tiempo t_1 , la salida del biosensor indicada en 90 es monitorizada por los componentes electrónicos del sistema mientras que se encuentra todavía en el aire o medio original (que no es la muestra).

[0088] Como se ha detallado anteriormente, el aparato de monitorización según diversos modos de realización comprende generalmente un sistema basado en microcontrolador o similar que recoge la señal del biosensor a intervalos regulares. El aparato de monitorización puede o no registrar la señal del biosensor recogida. El aparato de monitorización continúa monitorizando la salida del biosensor de referencia hasta que se mide un cambio de etapa brusco 91. El cambio de etapa brusco se produce debido a la introducción de una muestra líquida en contacto con la superficie del biosensor, provocando que las propiedades resonantes del biosensor cambien en respuesta al cambio en la viscosidad del medio. Para un biosensor dado de una construcción conocida, se conocerá la magnitud aproximada del cambio brusco para una transición de aire a medio líquido, proporcionando de esta manera un umbral, o rango objetivo de valores, cuyo logro se considera un acontecimiento de introducción de muestra. La utilización de umbrales o un rango objetivo de valores proporciona una ventaja de ignorar pequeños cambios o ruido para evitar indicaciones falsas.

[0089] Por lo tanto, en el tiempo t_2 , la muestra líquida con concentración de analito desconocida se coloca en contacto físico con el biosensor. En un modo de realización, el cambio brusco de etapa de señal del biosensor 91 se utiliza como una referencia de tiempo que representa el inicio de la exposición de la muestra líquida en la superficie del biosensor. El cambio brusco de señal 91 se producirá normalmente en menos de 1 segundo, y a menudo se produce en menos de 0,1 segundos de la introducción de la muestra. Una vez se detecta el cambio brusco de etapa 91, se monitoriza la salida del biosensor para medir la cinética de unión del analito en la superficie del biosensor, como se indica en 92. En este modo de realización, la sintonización del resonador es manejada automáticamente por un circuito de control. Por lo tanto, la medición de la cinética de unión puede comenzar tan pronto como se estabilice la salida en respuesta a la introducción de la muestra. Esta estabilización puede producirse en cuestión de milisegundos y, en algunos modos de realización, en menos de un milisegundo.

[0090] La unión del analito en la superficie puede utilizarse para determinar la concentración del analito en la muestra mediante cualquiera de una multitud de métodos. Uno de dichos métodos según un modo de realización implica la medición del ritmo de cambio de la salida del biosensor en el paso 92. Al medir la concentración de analito por ritmo de cambio, es preferible según un modo de realización medir el ritmo de cambio inicial en un periodo de tiempo breve poco después de introducir inicialmente la muestra líquida en la superficie del biosensor. Esta medición de fase temprana se denomina comúnmente el ritmo inicial. Como se ha analizado antes, especialmente para altas concentraciones de analito y/o altos índices de asociación entre el analito y el ligando de captura en la superficie del biosensor, un registro de tiempo electrónico del contacto de la muestra líquida inicial con la superficie del biosensor (desde la salida brusca del biosensor transitoria 91 en el tiempo t_2) proporciona una precisión de medición mejorada y capacidad para medir más rápido los índices de unión.

[0091] La pendiente de la salida del biosensor en 92 es proporcional al índice de eventos de unión del analito en la superficie del biosensor. En un rango de concentraciones de analito, el índice de eventos de unión del analito en la superficie del biosensor está relacionado con la concentración de analito en la muestra líquida. Esta relación puede ser proporcional o no lineal, aunque se puede preferir la proporcionalidad en aras de precisión y simplicidad en los modos de realización prácticos. De esta manera, el sistema utiliza un registro de tiempo t_2 preciso para derivar una medición precisa de concentración de analito en muestra líquida que es precisa en un rango amplio de concentraciones de analito.

[0092] Un segundo método de determinación de la concentración de analito según un modo de realización relacionado es medir la cantidad total de analito unido en un intervalo de tiempo fijo t_3-t_2 por el cambio total de la salida del biosensor (es decir, el nivel en el tiempo t_3 menos el nivel inicial en el tiempo t_2). Al medir la concentración de analito por el cambio total en un intervalo de tiempo fijo, es preferible tener una medición precisa del tiempo de comienzo inicial para la interacción entre el analito y el biosensor. Como el intervalo de tiempo de prueba fijo se vuelve más pequeño (para tiempos de prueba reducidos intencionadamente como en una situación de emergencia o para altas concentraciones de analito), la medición precisa del analito y el tiempo de interacción del biosensor se vuelven cada vez más importantes para realizar mediciones de concentración de analito precisas. Referenciando el tiempo inicial del intervalo de tiempo al cambio de etapa detectado, el sistema de este modo de realización utiliza un registro de tiempo t_2 preciso para derivar una medición precisa de concentración de analito en muestra líquida que es precisa en un rango amplio de concentraciones de analito.

[0093] La FIG. 10B es un gráfico que representa un funcionamiento similar utilizando una disposición de detección de fase como los modos de realización descritos anteriormente con referencia a la FIG. 3 y la FIG. 4. En el tiempo t_4 , el funcionamiento del sistema se inicia (p. ej., por aplicación de energía, detección automática de conexión del biosensor, activación externa por un usuario, u otro medio). Después de la iniciación en el tiempo t_4 , el sistema comienza a realizar una sintonización del biosensor. Esto puede realizarse para fines de verificación del funcionamiento adecuado u optimización de funcionamiento en una condición preferida como la determinación de una frecuencia resonante. La sintonización comienza en el tiempo t_5 y se completa en el tiempo t_6 . La salida del biosensor en 94 puede anotarse como parte del registro de prueba y puede resultar útil para determinar la condición del resonador o instrumento. En un modo de realización relacionado, el intervalo entre t_4 y t_5 puede eliminarse con una activación inicial que comprende la operación de sintonización.

[0094] En función de la sintonización del biosensor, se ajusta la condición de funcionamiento deseada para un funcionamiento óptimo en el tiempo t_6 y la salida del biosensor en 95 es monitorizada por los componentes electrónicos del sistema mientras que se encuentra todavía en el medio original (p. ej., aire). El aparato de monitorización continúa monitorizando la salida del biosensor hasta que se mide un cambio de etapa brusco 96. En el tiempo t_7 , una muestra líquida con concentración de analito desconocida se coloca en contacto físico con el biosensor. Una vez se ha detectado la transición brusca 96, el sistema realiza una resintonización para funcionamiento en la muestra líquida. La resintonización se realiza entre los tiempos t_7 y t_8 . En el tiempo t_8 , se ajusta la condición de funcionamiento para un funcionamiento óptimo (p. ej., en el punto de resonancia) y la salida del biosensor en 97 es monitorizada para medir la cinética de unión del analito en la superficie del biosensor.

[0095] En particular para altas concentraciones de analito y/o altos índices de asociación entre el analito y el ligando de captura en la superficie del biosensor (es decir, avidéz), un registro de tiempo electrónico del contacto de la muestra líquida inicial con la superficie del biosensor (desde la salida brusca del biosensor transitoria 96 en el tiempo t_7) proporciona una precisión de medición mejorada y capacidad para medir más rápido los índices de unión. Además, es preferible que la resintonización se realice en un periodo de tiempo breve de manera que no se pierda el ritmo inicial durante el proceso de resintonización. En un modo de realización, la resintonización se realiza en menos de 1 segundo y, más preferiblemente, la resintonización se realiza en menos de 0,1 segundos. En general, la pendiente de la salida del biosensor 97 es proporcional al índice de eventos de unión del analito en la superficie del biosensor. En un rango de concentraciones de analito, el índice de eventos de unión del analito en la superficie del biosensor está relacionado con la concentración de analito en la muestra líquida (preferiblemente, en proporción). De esta manera, el sistema utiliza un registro de tiempo t_7 preciso y una rápida resintonización para derivar una medición precisa de concentración de analito en muestra líquida que es precisa en un rango amplio de concentraciones de analito.

[0096] El segundo método de determinación de la concentración de analito midiendo la cantidad total de analito unido en un intervalo de tiempo fijo t_9-t_8 también está disponible en el instrumento de detección de cambio de fase. Al medir la concentración de analito por el cambio total en el intervalo de tiempo fijo, es preferible tener una medición precisa del tiempo de comienzo inicial para la interacción entre el analito y el biosensor. También es preferible tener un tiempo de exposición de analito-biosensor mínimo consumido por la resintonización. Como el intervalo de tiempo de prueba fijo se vuelve más pequeño (para tiempos de prueba reducidos intencionadamente como en una situación de emergencia o para altas concentraciones de analito), la medición precisa del analito y el tiempo de interacción del biosensor se vuelven cada vez más importantes para realizar mediciones de concentración de analito precisas. De esta manera, el sistema según este modo de realización utiliza un registro de tiempo t_8 preciso y una resintonización rápida para derivar una medición precisa de concentración de analito en muestra líquida que es precisa en un rango amplio de concentraciones de analito.

[0097] Las FIG. 11A y 11B son diagramas de flujo que muestran un funcionamiento de ejemplo, respectivamente, de los sistemas que controla y monitoriza el biosensor de detección de desplazamiento de frecuencia, y el biosensor de detección de desplazamiento de fase, cuyas salidas están representadas en las FIG. 10A y 10B anteriores según los modos de realización de la invención. En diversos modos de realización, las funciones de bloque en las FIG. 11A y 11B se llevan a cabo bajo control de programa, p. ej., como *firmware* de microcontrolador ejecutado en un microcontrolador o procesador de señales digitales, con velocidad de ejecución de características relacionada con la arquitectura del circuito y la frecuencia del reloj. Las operaciones de adquisición de datos como el bloque 104 que mide y registra la salida del biosensor también pueden implicar conversiones analógico-digital (CAD) que requieren múltiples ciclos de reloj o retardos. En general, se contempla que cada uno de los bloques puede ser ejecutado en mucho menos de 1 segundo, y,

preferiblemente, menos de 1 milisegundo. El funcionamiento electrónico rápido en cada bloque funcional proporciona mediciones muy precisas de la concentración de analito en muestras líquidas.

5 **[0098]** Haciendo referencia a la FIG. 11A, el funcionamiento del sistema se inicia en 102, por aplicación de energía, detección automática de conexión del biosensor, activación externa por un usuario, u otro mecanismo de este tipo. En 104, el sistema monitoriza y registra la salida del biosensor, midiendo normalmente el desplazamiento del ángulo de fase o la frecuencia resonante en relación con la señal de excitación. Después de cada medición, el sistema compara la medición más reciente con una medición previa para determinar si se ha producido un cambio brusco de señal del biosensor en la decisión 106. Se ejecuta una función de elección (que normalmente incluye la diferencia entre la medición actual y una medición previa en comparación con un umbral o rango objetivo de valores mínimos y máximos correspondiente al rango de valores de cambio de etapa anticipada) para decidir si la muestra líquida ha entrado en contacto con la superficie del biosensor.

10 **[0099]** Si no se ha producido un cambio brusco de señal del biosensor, la ejecución vuelve a la monitorización y registro de valores de salida del biosensor adicionales en el bloque 104. El bucle 106-104 realiza una operación de «espera» en la que el sistema monitoriza la señal de salida de los biosensores y espera un cambio brusco en la señal del biosensor indicativo de una transición del aire al medio líquido en la interfaz del biosensor. La constante del tiempo del bucle, o ritmo de repetición, es en general inferior a 1 segundo, y, preferiblemente, inferior a 1 milisegundo. Las constantes de tiempo del bucle más pequeñas proporcionan una medición más precisa del tiempo inicial de introducción del líquido en la superficie del biosensor.

15 **[0100]** Si se ha producido un cambio brusco de señal del biosensor que coincide con el umbral u otros criterios, el control de ejecución pasa a 108 para monitorizar la unión del analito en la superficie del biosensor. En este punto, el sistema ejecuta una monitorización continua de la salida de la señal del biosensor en el bucle 110-108. Después de cada medición en el bloque 108, se evalúa el tiempo total de exposición al líquido en la decisión 110 para determinar si se ha completado la prueba. Por ejemplo, en la operación representada en la FIG. 10A, la prueba se ha completado en el tiempo t_3 . Este bucle 110-108 presenta una periodicidad característica en el tiempo, o ritmo de repetición que es normalmente inferior a 20 1 segundo, y, preferiblemente, inferior a 1 milisegundo. Una vez se ha completado el tiempo de prueba deseado, el proceso continúa al bloque 112, donde se calcula la concentración de analito en función de los datos registrados, a partir del ritmo de cambio inicial o como valor de parámetro final (es decir, 93 en la FIG. 10A). El cálculo de la concentración de analito puede incluir el registro o la transmisión de datos, seguido de la transferencia al control de ejecución hasta la terminación o finalización del programa en 114.

25 **[0101]** Haciendo referencia ahora a la FIG. 11B, se representa un proceso similar para un biosensor de detección de desplazamiento de fase. Los bloques numerados 102-114 representan los bloques correspondientemente numerados descritos anteriormente con referencia a la FIG. 11A. Sin embargo, en este proceso, los subprocesos adicionales de sintonización se realizan en 116 y 118. La sintonización se realiza en el aire en 116 antes de iniciar la operación de medición y registro en 104. La colocación de esta primera operación de sintonización en este paso puede maximizar la sensibilidad del sensor de manera que las comparaciones con el umbral en 106 en la determinación del cambio de etapa sean fiables. En un modo de realización, la primera operación de sintonización se realiza inmediatamente en respuesta a la iniciación de la operación.

30 **[0102]** La segunda operación de sintonización tiene lugar en respuesta a la detección de la exposición del resonador a la muestra líquida en 106. En un modo de realización preferido, esta segunda operación de sintonización en 118 se realiza lo antes posible tras la detección del cambio de etapa. La segunda operación de sintonización puede realizarse perfectamente en menos de un segundo, y, preferiblemente, en un milisegundo de la detección del cambio de etapa. La duración del procedimiento de sintonización en sí debe realizarse también en el menor tiempo posible según un modo de realización. Por lo tanto, por ejemplo, la sintonización en 118 se realiza en un segundo y, preferiblemente, en 35 0,1 segundos. Aún más preferiblemente, la sintonización en 118 se consigue en 50 milisegundos. Por ejemplo, en el modo de realización descrito anteriormente con referencia a la FIG. 9B, la sintonización se consigue en 37,5 milisegundos. Se contempla que los avances en la capacidad de procesamiento y en microelectrónica analógica permitirán un rendimiento más rápido de las operaciones de sintonización.

40 **[0103]** En un modo de realización relacionado, la operación de medición y registro de la salida del sensor en 108 se inicia inmediatamente, es decir, lo más rápido posible, en respuesta a la finalización de la operación de sintonización en 118. En un modo de realización práctico, esto ha de realizarse en un segundo y, preferiblemente, en un milisegundo. La primera y la segunda operación de sintonización 116 y 118, en diversos modos de realización, puede realizarse como se detalla anteriormente con referencia a las FIG. 9A y 9B.

45 **[0104]** En un modo de realización relacionado, donde se utiliza un resonador de referencia y un resonador de detección, las operaciones de sintonización 116 y 118 se realizan en cada uno de los resonadores. En un sistema de este tipo, los resonadores se sintonizan a aproximadamente el mismo tiempo, en lugar de secuencialmente uno tras otro.

50 **[0105]** En otro modo de realización de resonador de detección y de referencia, la salida de resonador individual del resonador de detección solo, el resonador de referencia solo, o de ambos resonadores en el modo común (es decir, no en el modo diferencial), se monitoriza para detectar la introducción de la muestra. Por otro lado, la medición de la cinética

de unión se basa en el modo diferencial entre los dispositivos de sensor y de referencia, como se ha analizado anteriormente.

5 [0106] Más en general, el cambio de etapa detectado en 106 representa de manera más general un cambio de una característica de viscosidad de fluido a otra. Por ejemplo, el cambio puede ser de líquido a gas, o de un líquido de una primera densidad a un líquido de una segunda densidad diferente. En un modo de realización relacionado, el instrumento está configurado con un rango objetivo de valor de cambio de etapa o umbral adecuado correspondiente al cambio esperado de viscosidad desde el inicio de la operación en 104 y la introducción de la muestra. Esta información puede almacenarse, por ejemplo, junto con las constantes de calibración u otros parámetros específicos del conjunto de biosensor o protocolo de prueba en un dispositivo de almacenamiento de datos como el descrito anteriormente, o en una localización remota pero accesible como una estación de trabajo informática personal o servidor.

10 [0107] Los modos de realización anteriores pretenden ser ilustrativos y no limitantes. Los modos de realización adicionales se encuentran dentro de las reivindicaciones. Además, aunque los aspectos de la presente invención se han descrito con referencia a modos de realización particulares, los expertos en la materia reconocerán que se pueden realizar cambios en la forma y los detalles sin alejarse del alcance de la invención, como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Aparato para medir la cinética de unión de una interacción de un material de analito presente en una muestra de fluido, que comprende:
- un resonador de detección (44) que comprende sitios de unión para el material de analito;
- 5 circuitos de accionamiento (21) configurados para accionar el resonador de detección (44) en un movimiento oscilante;
- circuitos de medición (25, 26) dispuestos para acoplarse al resonador de detección y configurados para medir una o más señales de salida de resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección (44); y
- 10 un controlador configurado para:
- ajustar la frecuencia a la que los circuitos de accionamiento (21) accionan el resonador de detección en respuesta a la puesta en contacto de la muestra de fluido con el resonador de detección (44) para mantener un punto de resonancia que tenga una característica de resonancia;
- 15 calcular la cinética de unión en respuesta al ritmo de cambio de la frecuencia para mantener la característica de resonancia; y
- calcular una concentración de analito en respuesta al ritmo de cambio de la característica de resonancia.
2. Aparato de la reivindicación 1, donde la frecuencia a la que los circuitos de accionamiento accionan el resonador de detección es una frecuencia de retardo de grupo máximo.
3. Aparato de la reivindicación 1, donde el controlador es configurado para:
- 20 procesar datos de los circuitos de medición (25, 26) para determinar una frecuencia de retardo de grupo máximo, donde la frecuencia a la que los circuitos de accionamiento (21) accionan el resonador de detección (44) es la frecuencia de retardo de grupo máximo.
4. Aparato de la reivindicación 1, que comprende además un resonador de referencia (54) libre de sitios de unión para el material de analito, donde el resonador de referencia (54) es acoplado de manera operativa a los circuitos de accionamiento (21) y los circuitos de medición (25, 26).
- 25 5. Aparato de la reivindicación 4, donde los circuitos de accionamiento (21) son configurados para accionar de manera independiente el resonador de referencia (54) y el resonador de detección (44) en un movimiento oscilante.
6. Aparato de la reivindicación 1, donde el resonador de detección (44) es un resonador de onda acústica de volumen que tiene una frecuencia resonante entre varios cientos de megahercios y varios gigahercios.
- 30 7. Método llevado a cabo por un aparato para medir la cinética de unión de una interacción de un material de analito presente en una muestra de fluido, comprendiendo el método:
- accionar un resonador de detección (44) en un movimiento oscilante;
- medir una o más señales de salida de resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección (44);
- 35 ajustar la frecuencia de accionamiento del resonador de detección (44) en respuesta a la puesta en contacto de la muestra de fluido con el resonador de detección (44) que comprende sitios de unión para el material de analito para mantener un punto de resonancia que tenga una característica de resonancia;
- calcular la cinética de unión en respuesta al ritmo de cambio de la frecuencia para mantener la característica de resonancia; y
- 40 calcular una concentración de analito en respuesta a un ritmo de cambio de la característica de resonancia.
8. Método de la reivindicación 7, donde ajustar la frecuencia de accionamiento del resonador de detección (44) comprende ajustar la frecuencia a una frecuencia de retardo de grupo máximo.
9. Método de la reivindicación 8, que comprende además determinar una frecuencia de retardo de grupo máximo basándose en los datos obtenidos de la medición de la una o más señales de salida del resonador, y donde ajustar la frecuencia de accionamiento del resonador de detección (44) comprende ajustar la frecuencia a la frecuencia de retardo de grupo máximo.
- 45 10. Método de la reivindicación 7, que comprende, además:

poner en contacto un resonador de referencia (54) con la muestra de fluido, donde el resonador de referencia (54) está libre de sitios de unión para el material de analito

accionar el resonador de referencia (54) en un movimiento oscilante;

5 medir una o más señales de salida de resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de referencia (54); y

ajustar la frecuencia de accionamiento del resonador de referencia (54) para mantener un punto de resonancia del resonador de referencia (54).

10 **11.** Método de la reivindicación 10, que comprende además comparar la una o más señales de salida de resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de detección (44) con la una o más señales de salida de resonador que representan características de resonancia del movimiento oscilante del resonador de referencia (54).

12. Método de la reivindicación 7, donde el resonador de detección (44) es un resonador de onda acústica de volumen que tiene una frecuencia resonante entre varios cientos de megahercios y varios gigahercios.

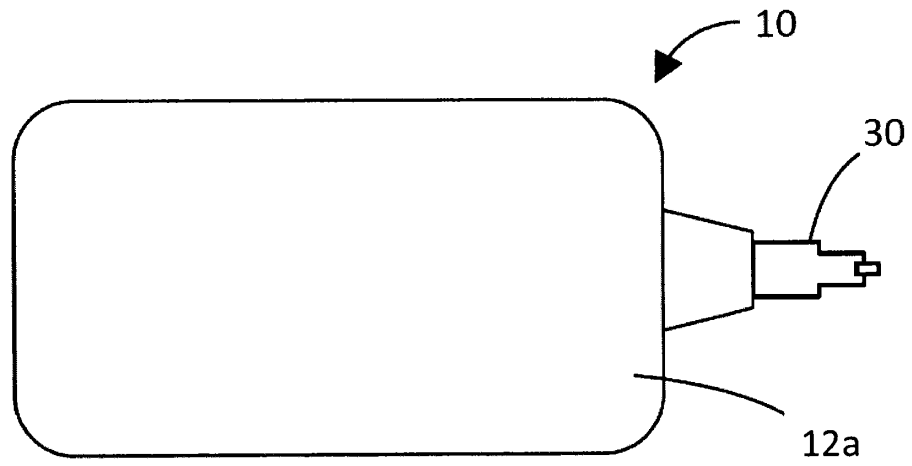


FIG. 1A

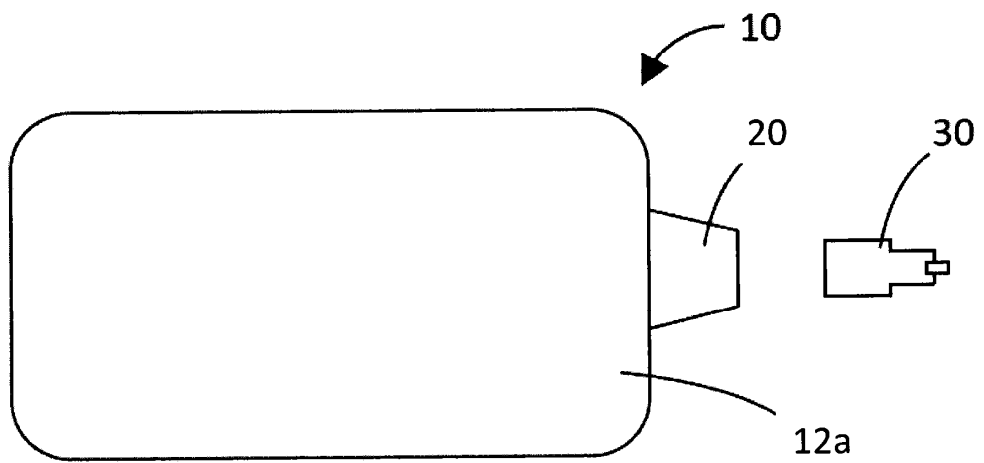


FIG. 1B

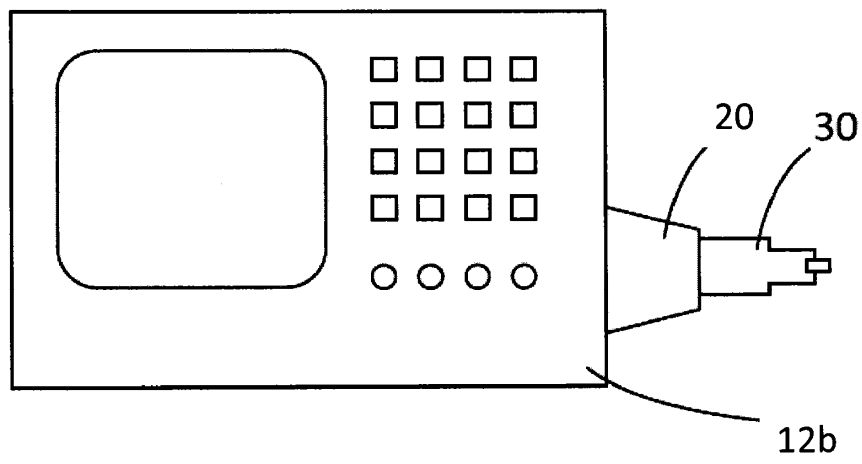


FIG. 2

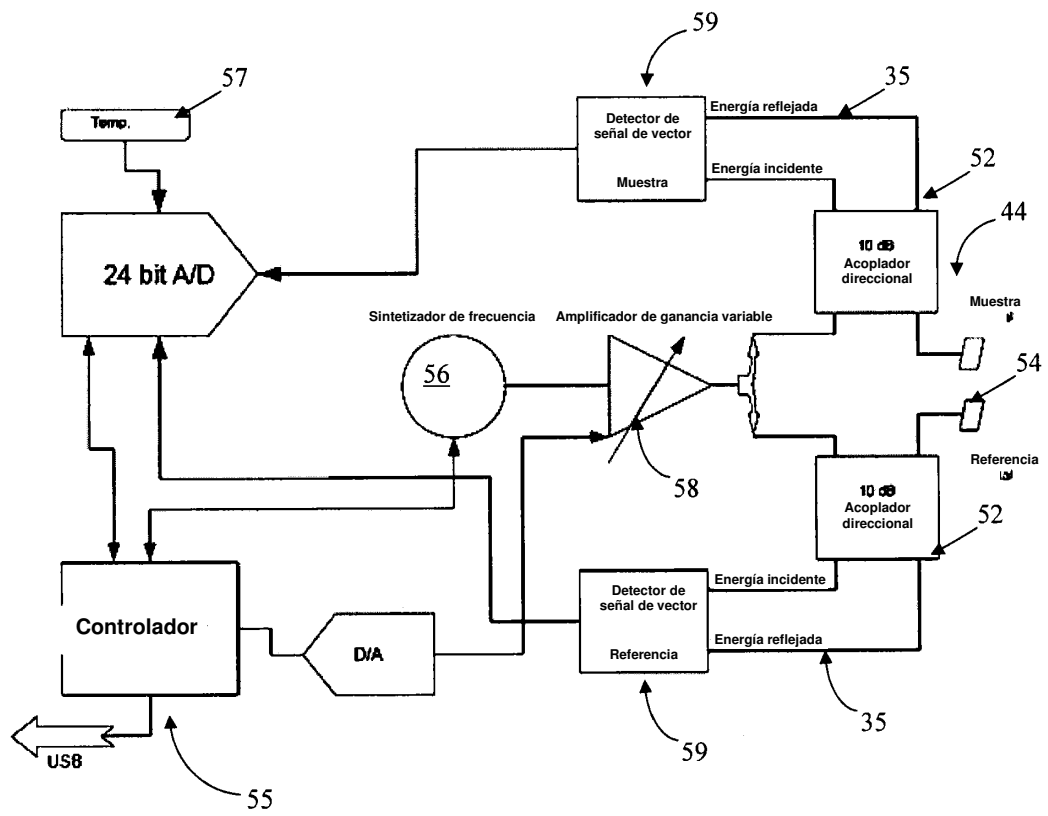


FIG. 3

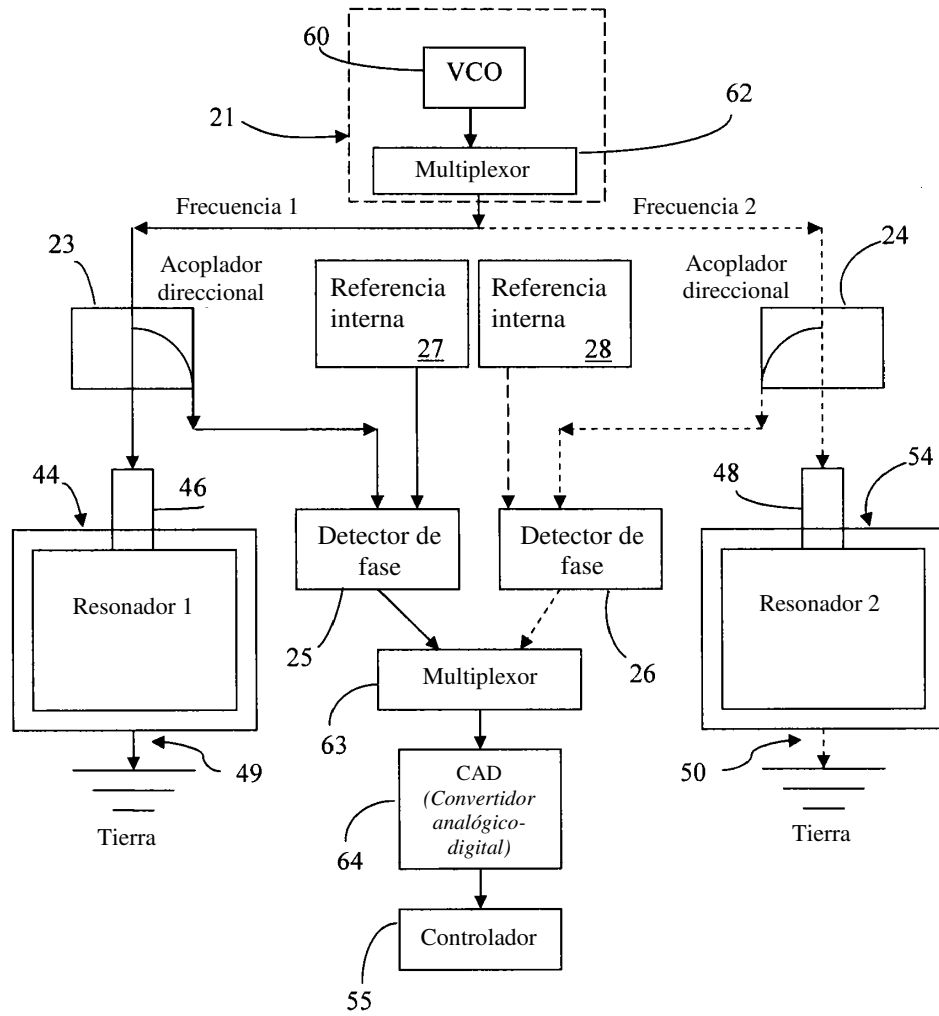


FIG. 4

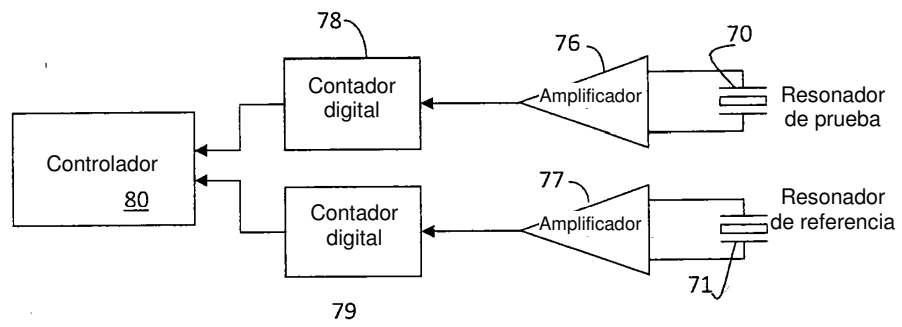


FIG. 5

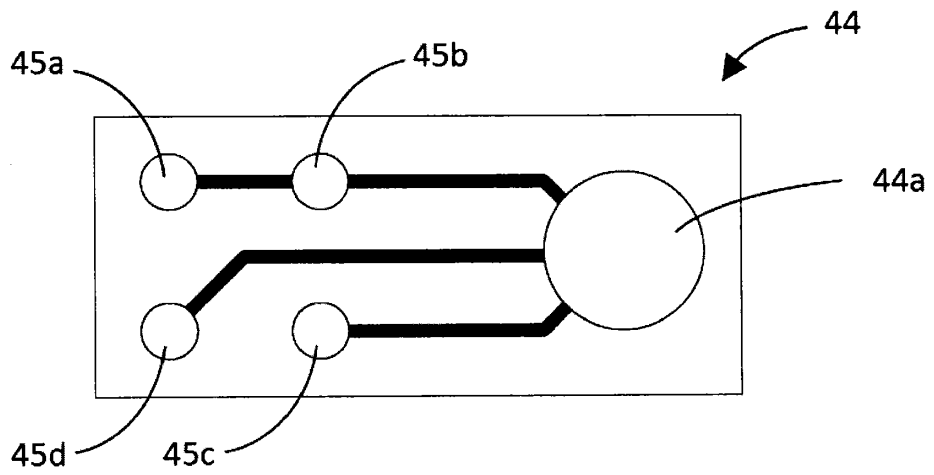


FIG. 6A

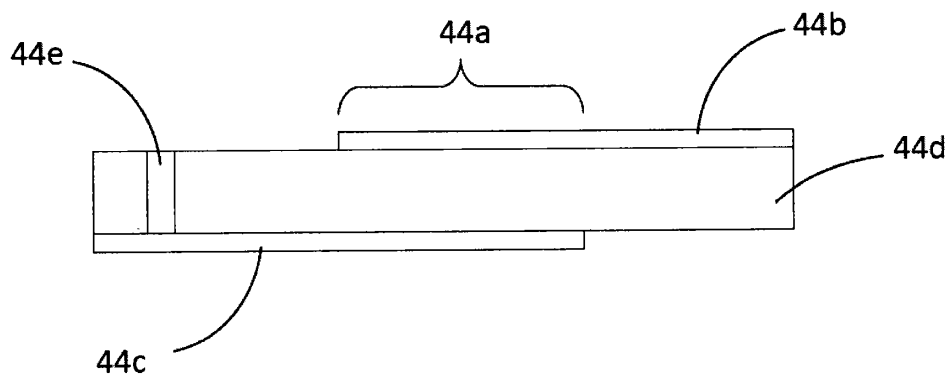


FIG. 6B

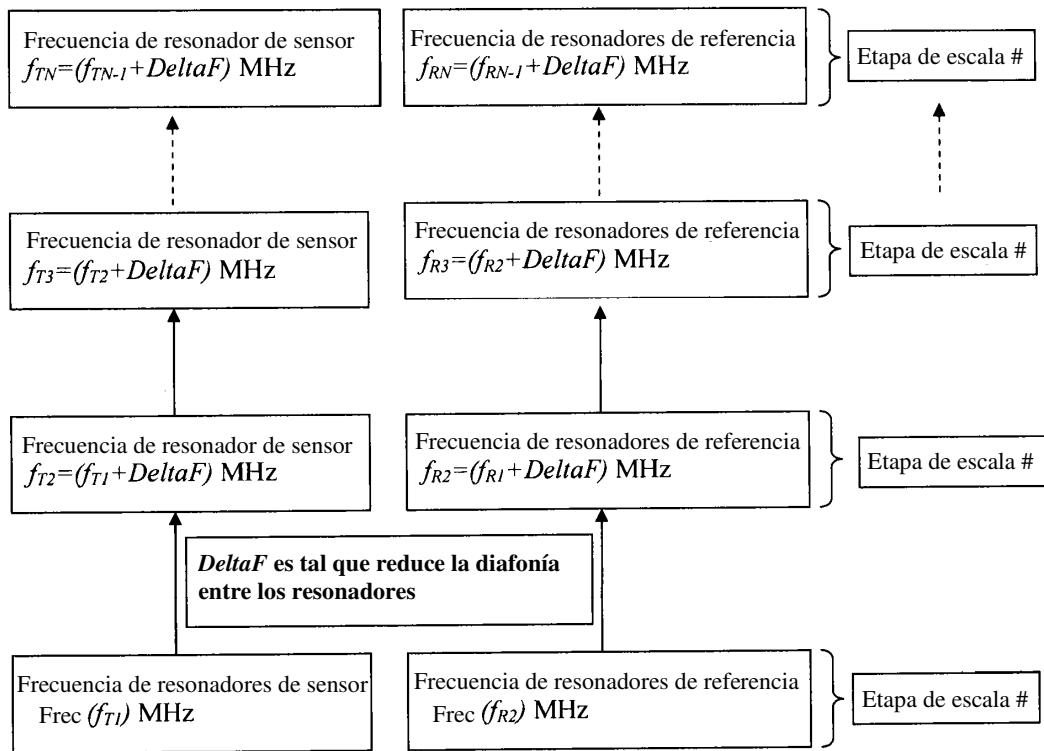


FIG. 7

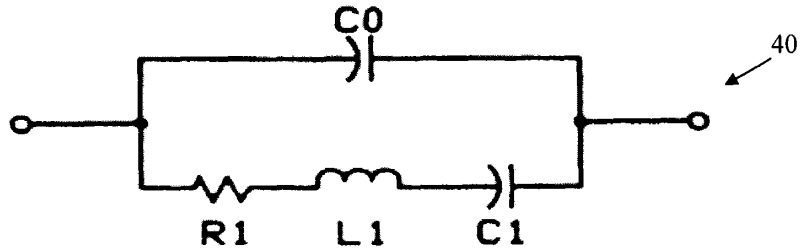


FIG. 8A

Modelo eléctrico de sensor

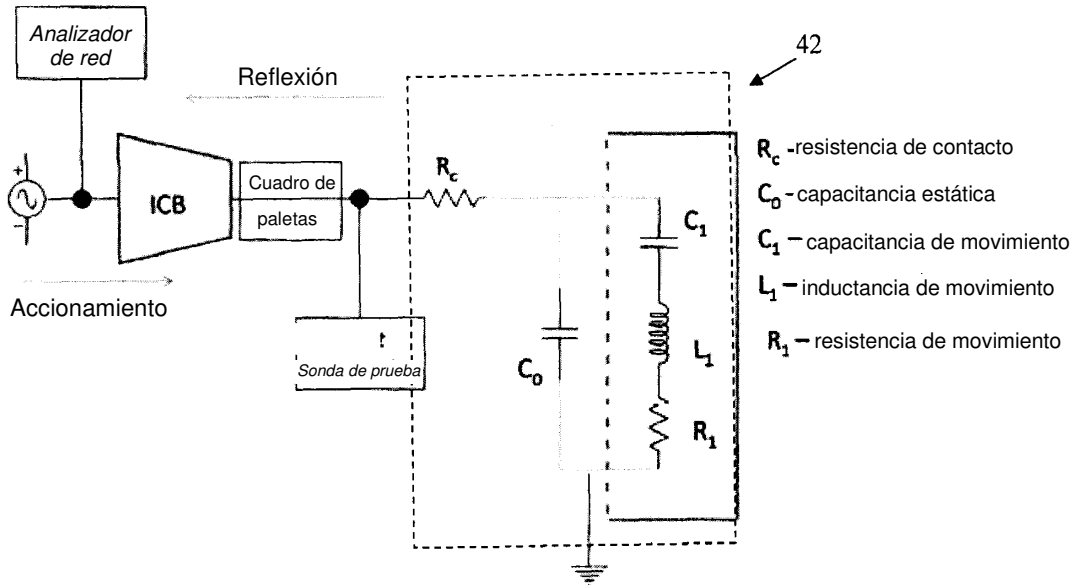
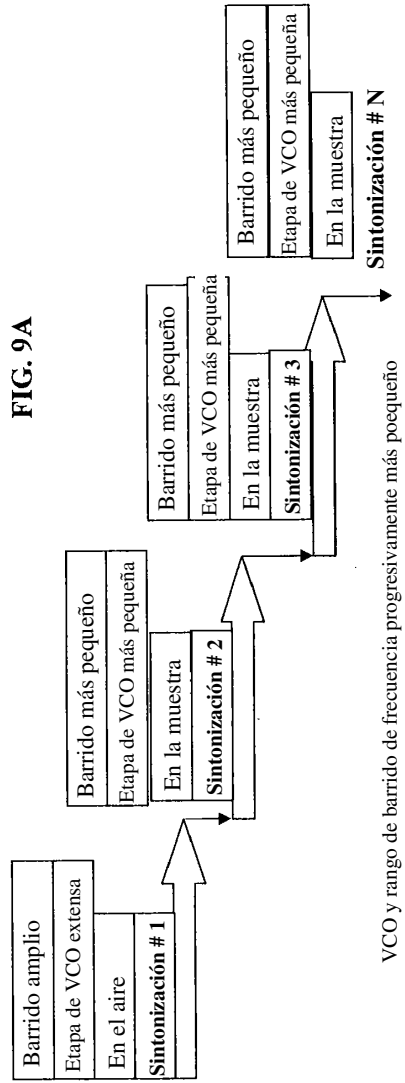
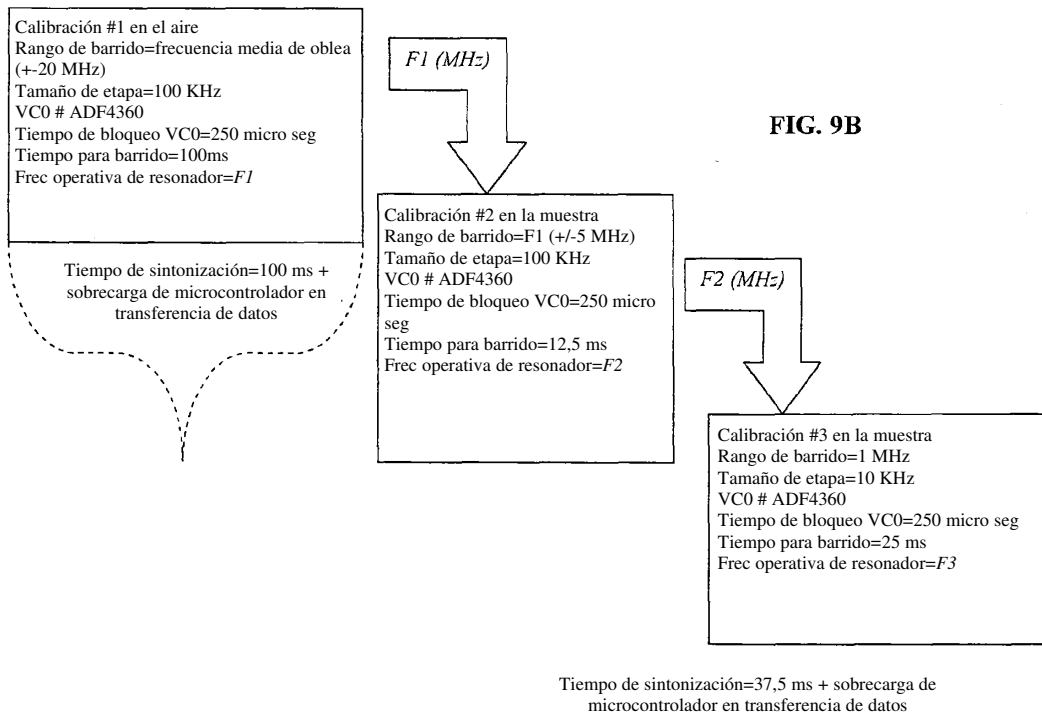


FIG. 8B





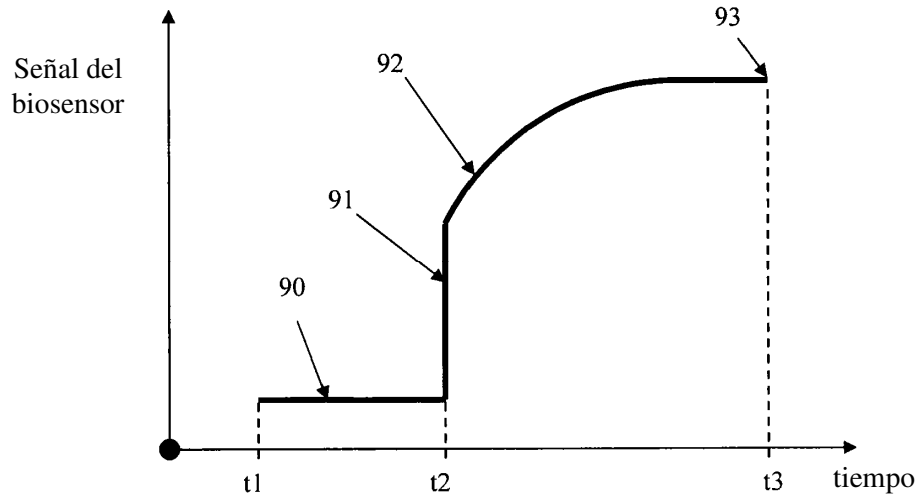


FIG. 10A

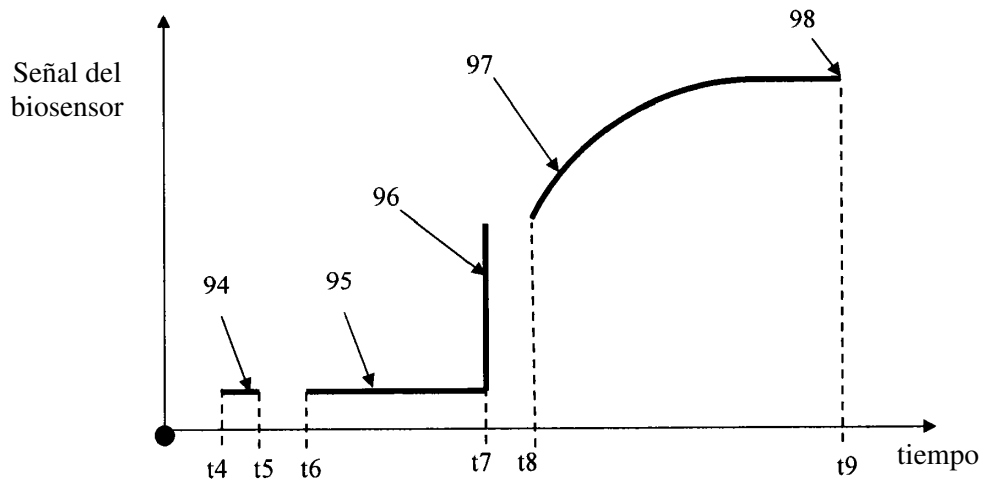


FIG. 10B

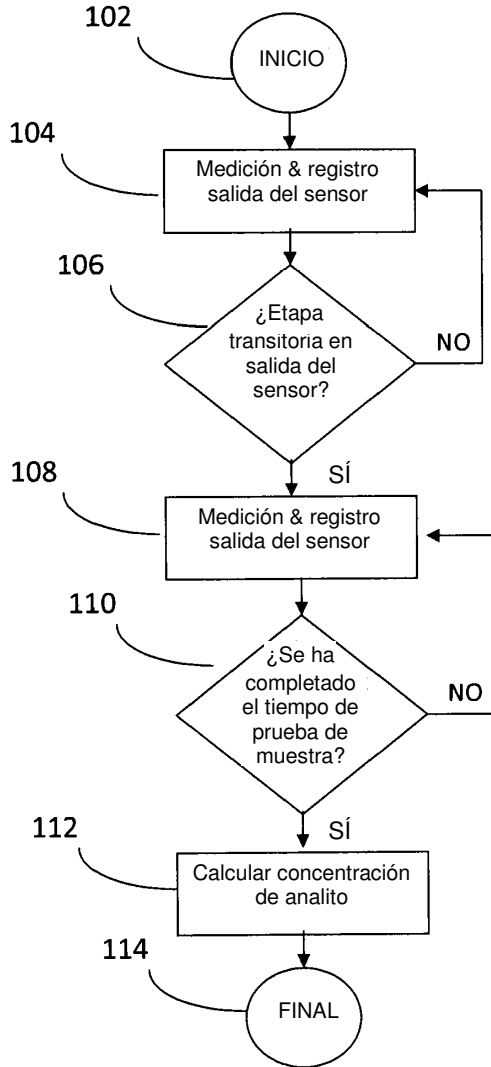


FIG. 11A

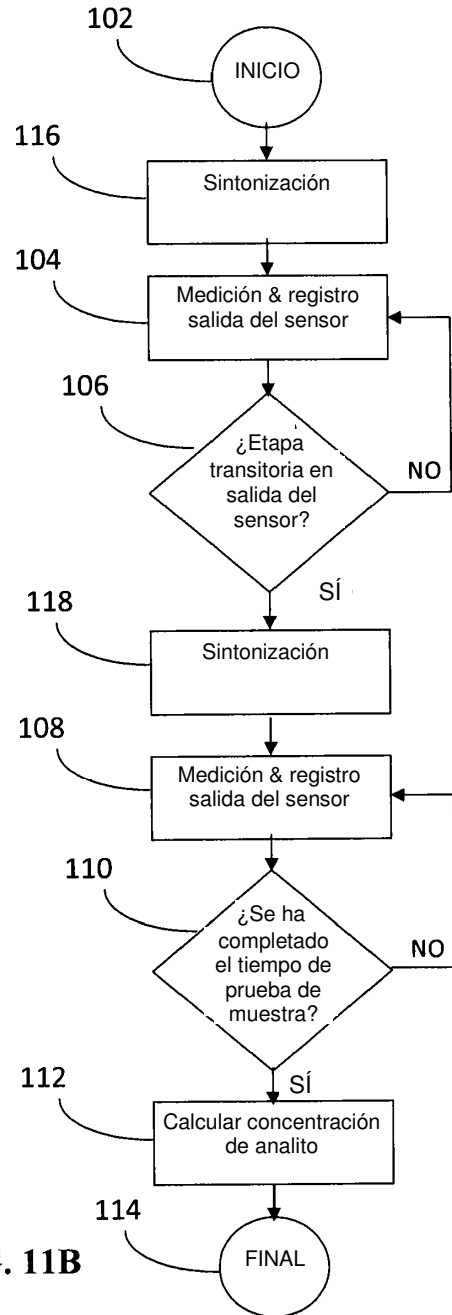


FIG. 11B