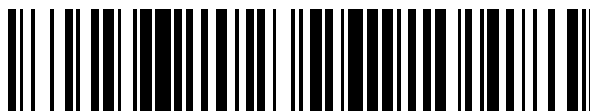


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 168**

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 10/00 (2011.01)
C12Q 1/18 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/561 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
B82Y 20/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2004** **PCT/US2004/022025**
87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2005** **WO05027714**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2004** **E 04809482 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 1648286**

54 Título: **Biodetección sensible y rápida**

30 Prioridad:

12.07.2003 US 486605 P
13.05.2004 US 571479 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2018

73 Titular/es:

ACCELERATE DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
3950 S. Country Club Road, Suite 470
Tucson, AZ 85714, US

72 Inventor/es:

GOLDBERG, DAVID, A.;
HOWSON, DAVID, C.;
METZGER, STEVEN, W.;
BUTTRY, DANIEL, A. y
SAAVEDRA, STEVEN, SCOTT

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 661 168 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

Biodetección sensible y rápida

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos y sistemas para la detección de microorganismos haciendo reaccionar los microorganismos con sondas inmovilizadas sobre superficies.

10 Antecedentes

La biodetección convencional utiliza sondas inmovilizadas para detectar dianas en solución. Tales sistemas frecuentemente incluyen sondas de ADN para detectar dianas de ADN y ARN, sondas de anticuerpo para detectar dianas proteináceas, de hidrato de carbono y de molécula orgánica pequeña, y sondas de aptámero para detectar dianas de ácido nucleico, proteináceas, de hidrato de carbono y de molécula orgánica pequeña. Estos sistemas pueden incluir ELISA convencional (un ensayo inmunoanalítico de adsorción) que puede tener lugar en un formato de macropocillo (por ejemplo, un pocillo de microtitulación), además de formatos de micromatriz en los que las sondas inmovilizadas pueden construirse o "imprimirse" en lugares de menos de cien micrómetros de diámetro. Tales métodos son hoy en día ampliamente puestos en práctica en las aplicaciones clínicas y de investigación (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.405.783 a Pirrung, et al., patente de EE.UU. N.º 6.054.270 a Southern, patente de EE.UU. N.º 6.101.946 a Martinsky, y Weeraratna et al. "Gene Expression Profiling From Microarrays to Medicine", J. Clin. Immunol. 24:213 (2004), "Packard Biochip Arrayer" de Perkin Elmer, Wellesley, MA).

En todos estos métodos, hay una reacción de unión entre la sonda y la diana, y esta reacción de unión está generalmente gobernada por la reacción cinética de sistemas de múltiples reactantes (generalmente bi-moleculares). Debido a que las sondas se inmovilizan, la velocidad de reacción está principalmente determinada por la concentración de la diana en solución.

En muchos de los sistemas, la velocidad de reacción es importante. Por ejemplo, en ciertas hibridaciones de ácidos nucleicos, la reacción puede requerir más de 48 horas para completarse, que puede aumentar el coste del análisis, o reducir el número de análisis que pueden tener lugar. Además, si no reaccionan todas las hibridaciones hasta el fin, entonces la cuantificación de los análisis puede ser incorrecta, mezcla que sería los resultados de hibridaciones a diferentes niveles de completitud.

En una aplicación importante, los resultados médicos de infecciones humanas (por ejemplo, neumonía adquirida por el respirador, meningitis infecciosa, bacteremia, y similares) pueden ser significativamente afectados por la duración de tiempo requerida para realizar el análisis de la cantidad y la identidad de bacterias y la susceptibilidad de las bacterias a diversos antibióticos. Convencionalmente, el tiempo para el análisis puede ser 24 a 48 horas o más, tiempo durante el cual la condición del paciente puede deteriorarse a medida que se multiplican las bacterias (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.778.758 a Ericsson et al., patente de EE.UU. N.º 3.935.073 a Waters, patente de EE.UU. N.º 6.043.048 a Johnston et al., y patente de EE.UU. N.º 4.259.442 a Gayral). El análisis microbiano contemporáneo empieza con el crecimiento de bacterias de un espécimen clínico, tal como esputo, sangre, y similares, a alta concentración en medio de cultivo, normalmente del orden de 100 millones de organismos por mililitro. Los especímenes clínicos pueden contener solo algunos organismos individuales (por ejemplo, en la sangre de prueba para bacteremia), y los umbrales de diagnóstico incluso para especímenes de alta concentración normalmente son varios miles de veces más bajos que los límites de detección cuantitativos del cultivo.

Después de conseguir el crecimiento en bloque inicial hasta una concentración de trabajo adecuado, el operario realiza entonces una o más pruebas bioquímicas o crecimiento en medios selectivos que incorporan reactivos bioquímicos selectivos. Así, los actuales procedimientos normalizados requieren al menos dos ciclos de crecimiento secuenciales, requiriendo cada uno normalmente muchas horas hasta completarse.

Adicionalmente, la prueba de susceptibilidad a fármacos requiere la determinación del fallo a crecer en medios selectivos. La prueba de la ausencia de crecimiento requiere tiempo adicional en cultivo con respecto al que podría requerirse de un indicador directo de muerte celular. Es bien reconocido en la comunidad médica que tales métodos, que intentan demostrar la ausencia de crecimiento, en ciertas circunstancias producen resultados que no se correlacionan adecuadamente con los actuales resultados de tratamiento.

Como resultado de estas y otras deficiencias graves, la práctica contemporánea fracasa en proporcionar al médico adjunto información de diagnóstico específica que el médico necesita con el fin de seleccionar un fármaco eficaz para tratar la infección dentro de la ventana de tiempo deseada. Por ejemplo, en la neumonía asociada al respirador, la investigación clínica ha demostrado que el cociente de probabilidades de elevada morbilidad y mortalidad después de 24 horas de tratamiento ineficaz sigue siendo 7:1 a pesar de un cambio a tratamiento eficaz. Es decir, a menos que el médico inicie tratamiento eficaz, es decir, fármacos antimicrobianos de un tipo y concentración adecuada para destruir rápidamente los organismos infecciosos, dentro de sustancialmente menos de 24 horas desde la aparición de los síntomas, un cambio de terapia ineficaz a eficaz no mejorará significativamente los desenlaces para

aproximadamente el 87 % de los pacientes así tratados.

Los médicos conocen muy bien el riesgo del retraso, y así prescriben tratamiento normalmente usando una combinación de fármacos de amplio espectro seleccionados empíricamente basándose en una historia hospitalaria o comunitaria particular de resistencia o susceptibilidad al fármaco microbiano. La investigación clínica ha demostrado que tal tratamiento con fármaco empírico es ineficaz en aproximadamente del 25 % al 50 % de los casos. Adicionalmente, la exposición de un paciente a terapia inadecuada no solo aumenta los costes individuales del paciente y los riesgos médicos, sino que también aumenta la probabilidad de fomentar la emergencia de organismos resistentes. El último problema aumenta el riesgo médico no solo para el paciente individual, sino para todos los otros individuos en el hospital y la comunidad que pueden después ser infectados con organismos resistentes.

Es bien reconocido en la bibliografía de investigación clínica que la exposición previa de un paciente a antibióticos ineficaces constituye un factor de riesgo significativo en la posterior emergencia de organismos resistentes en ese paciente. Por estos y otros motivos, se desea dentro de la comunidad médica idear métodos de diagnóstico que no sufran las deficiencias del retraso e inexactitud que caracterizan a las prácticas actuales.

En teoría, alternativas al cultivo de crecimiento microbiano incluyen métodos analíticos microbianos directos tales como inmunoensayos de diversos tipos. Anticuerpos contra diversos microbios están comercialmente disponibles o pueden ser fácilmente desarrollados. En realidad, muchos tipos diferentes de inmunoensayo se usan ahora rutinariamente en ciertos aspectos de diagnóstico para infección microbiana.

Sin embargo, ninguno existe todavía para identificación bacteriana rutinaria, cuantificación y prueba de susceptibilidad a fármacos para muchas enfermedades infecciosas graves.

Similarmente, también es deseable la rápida detección de diversos microbios tales como bacterias, virus, mohos y similares para probar contaminación en alimentos y agua, y en detectar la presencia de posibles agentes de guerra biológica. En la industria alimentaria, están comercialmente disponibles muchos productos para detectar contaminantes microbianos. En ciertas circunstancias, algunos de éstos proporcionan resultados en aproximadamente 24 horas para un conjunto limitado de organismos particulares. Sin embargo, todos los productos comerciales todavía requieren el enriquecimiento de muestras por medio de cultivo bacteriano antes aplicar las pruebas.

En la bibliografía de investigación referente a la defensa para guerra biológica, también se han descrito muchos dispositivos de detección rápida, que incluyen algunos que proporcionan resultados en una hora o incluso menos. Además, algunos de tales dispositivos no requieren los cultivos de crecimiento antes de ser usados.

Sin embargo, la sensibilidad de los dispositivos descritos hasta la fecha en la bibliografía para la prueba de alimentos o bio-defensa se queda corta de los requisitos para los diagnósticos médicos. Además, estas aplicaciones no de diagnóstico no requieren las pruebas de susceptibilidad a fármaco y así los dispositivos anteriores no lo proporcionan ni aparentemente se prestan a adaptación para un fin tal.

Una limitación clave con estos dispositivos y con los métodos de laboratorio tales como ELISA es su dependencia de la concentración de analito diana. Se basan en difusión pasiva de diana a una superficie de inmunocaptura u otra superficie de detección. La tasa de manifestación de eventos de proximidad íntima sonda a diana, y de ahí la velocidad de la reacción de detección, depende de la concentración de analito en la solución o suspensión de muestra.

Con el fin de aumentar la sensibilidad con estos dispositivos, es necesario aumentar sustancialmente la concentración de analito. Los investigadores han descrito varias estrategias para aumentar la concentración de analito diana y también acelerar el tiempo de respuesta para análisis de diversas dianas biomoleculares y microbianas. Por ejemplo, se ha descrito antes la electroforesis de diana con respecto a la sonda por Nanogen, Inc. de San Diego, CA (por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.849.486 a Heller, patente de EE.UU. N.º 6.017.696 a Heller, patente de EE.UU. N.º 6.051.380 a Sosnowski et al., patente de EE.UU. N.º 6.099.803 a Ackley et al., patente de EE.UU. N.º 6.245.508 a Heller et al., y patente de EE.UU. N.º 6.379.897 a Weidenhaimner et al.). Estos sistemas y métodos describen una matriz de electrodos direccionables a la que están unidas sondas individuales en cada electrodo individual, y entonces que reaccionan secuencialmente y muy rápidamente con sondas. El aumento informado en la velocidad de reacción entre la diana y las sondas es cientos o miles de veces. Estos sistemas, sin embargo, padecen varias limitaciones, que incluyen la necesidad de inmovilizar secuencialmente sondas sobre los electrodos direccionables, la necesidad de realizar reacciones secuenciales y limitaciones en los métodos de detección que pueden emplearse debido a los voltajes más altos que se requieren para la electroforesis, descartando el uso de electrodos transparentes (por ejemplo, mediante el uso de óxido de indio y estaño), que no pueden operar a los voltajes usados por el sistema Nanogen. Además, los voltajes más altos a los que el sistema Nanogen opera generan productos de oxidación que son posiblemente peligrosos para las sondas o dianas, y que, por tanto, requiere el uso de complejas superficies de pasivación para proteger las sondas y dianas. Sistemas que podrían hacer uso de la impresión de micromatrices de alta velocidad, que no requirieron complejas superficies de pasivación, y que no requirieron el control electrónico y otro control necesario para electrodos direccionables,

reducen enormemente el coste y la complejidad de tales sistemas.

El documento WO 02/088299 desvela un dispositivo en miniatura para separar y aislar objetos biológicos, el uso del dispositivo para aislar, separar, cultivar y/o analizar objetos biológicos, y un método de separación y aislamiento de objetos biológicos usando el dispositivo.

Con respecto al uso de sondas inmovilizadas para la detección de bacterias u otros microorganismos, también es útil determinar la actividad antimicrobiana de diferentes agentes terapéuticos, tales como antibióticos. Ha habido una abundancia de sistemas que usan sondas de ácido nucleico o de anticuerpo para determinar la identidad de bacterias en una muestra (por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.656.432 a Claverys et al. y la patente de EE.UU. N.º 6.403.367 a Cheng et al.). Es difícil con estos sistemas determinar la susceptibilidad a agentes antimicrobianos, dada la dificultad del hallazgo de marcadores de ácido nucleico o de anticuerpo que de forma fiable se correlacionen con resistencia o comportamiento antimicrobiano.

Es a la solución de estos y otros problemas a lo que se refiere la presente invención.

Sumario de la invención

En vista de las deficiencias de los sistemas y métodos de biodetección existentes, es un objetivo realizar rápidamente la detección de moléculas biológicas (es decir, microorganismos).

En algunas realizaciones, se minimiza la unión no específica que reduce la sensibilidad de biodetección.

En algunas realizaciones, puede distinguirse la unión específica de la unión no específica de un microorganismo diana a una superficie.

Es otro objetivo de la presente invención ser capaces de identificar microorganismos y determinar su susceptibilidad a agentes anti-organismos.

En realizaciones adicionales, sondas pueden ser capturadas rápidamente sobre una superficie con el fin de permitir su detección.

Objetivos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente invención deben exponerse en parte en la descripción que sigue, y en parte serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras el examen de la siguiente memoria descriptiva o pueden ser aprendidos por la práctica de la invención. Los objetivos y ventajas de la invención pueden realizarse y obtenerse por medio de las instrumentalidades, combinaciones y métodos descritos en el presente documento, y los métodos y sistemas particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas.

En resumen, como se describe en el presente documento son procesos y componentes que pueden ser usados individualmente o en combinación para el efecto beneficioso. Los métodos y sistemas resultantes de la presente invención pueden usarse en la biodetección de microorganismos. También en el presente documento se describen métodos y dispositivos usados en la biodetección de varios analitos diferentes dentro de una muestra, que incluyen ácidos nucleicos, proteínas, almidones, lípidos, y organismos y células (distintos de microorganismos). En las formas más generales, estas entidades se capturan sobre un sustrato, donde se detectan.

Un aspecto de la presente invención implica un método de detección de la respuesta de al menos un primer tipo de microorganismo a una condición en una muestra. Esto implica la detección de microorganismos sobre un sustrato fijo más de una vez. Cambios en las condiciones de los microorganismos en los diferentes momentos puede indicar su respuesta a agentes a los que se exponen los microorganismos. Las condiciones de las bacterias pueden incluir su aspecto con diversas tinciones, tales como tinciones vitales y mortales, o la aparición de crecimiento en el microorganismo, ya sea mediante su tamaño, capacidad para aceptar agente de tinción adicional, o la aparición de microorganismos "hija" cercanos que indican la duplicación de los microorganismos. Más generalmente, la condición puede incluir la identidad del microorganismo, como podría indicarse por una tinción serológica. Los agentes pueden incluir varios antibióticos diferentes, que pueden proporcionarse a los microorganismos a varias concentraciones diferentes con el fin de determinar propiedades de las bacterias tales como la concentración inhibitoria mínima o la concentración bactericida mínima. Los microorganismos pueden exponerse no solo a concentraciones constantes del agente, sino que el agente también puede exponerse a una concentración variable que puede imitar la farmacocinética del agente.

Debe observarse que examinar el crecimiento y comportamiento de microorganismos individuales tiene un gran efecto beneficioso, dado que la mayoría de los medios actuales de monitorización de microorganismos requiere un gran número de microorganismos, y pueden durar un periodo prolongado cultivar números suficientes de microorganismos. Monitorizando microorganismos individuales, incluso no se requiere que todos los microorganismos individuales muestren el efecto, sino solo una fracción suficiente de manera que el efecto se demuestre con respecto al fundamento estadístico. Esto puede permitir una prueba muy rápida.

Realizaciones de la presente invención implican el movimiento de los microorganismos (u otros analitos como se describe en el presente documento) a un sustrato donde pueden ser capturados. Este movimiento puede comprender varias fuerzas diferentes, que incluye electroforesis, dielectroforesis, centrifugación, captura de campo magnético, filtración, gravedad o difusión. En muchos casos, las fuerzas de gravedad que existen de forma natural y la difusión no son los suficientemente fuertes para que el movimiento se produzca en un tiempo práctico para la prueba, y, por tanto, es necesaria la aplicación de otras fuerzas artificiales. Las fuerzas pueden actuar ya sea directamente sobre el microorganismo (u otro analito como se describe en el presente documento), o el microorganismo (u otro analito como se describe en el presente documento) puede unirse a una marca que responde a la aplicación de la fuerza artificial. La marca puede comprender una marca electrostática, que puede incluir un polielectrolito, que entonces se mueve en un campo electroforético o dielectroforético. La marca también puede comprender una partícula paramagnética que responde a un campo magnético.

Se describe en el presente documento un movimiento del analito con un componente paralelo a la superficie donde el analito se captura, ya sea al mismo tiempo que o intercalado con el movimiento del analito hacia la superficie. Esto permite que el analito sea distribuido a lo largo de la superficie, y puede permitir además que una fracción más grande del analito se una donde hay múltiples regiones de posible unión. Si estas regiones tienen diferente especificidad por diferentes especies de analito dentro de la muestra, entonces esto permite que el analito se mueva de región a región hasta que se ponga en contacto con la región con la especificidad correspondiente. El movimiento paralelo a la superficie puede comprender electroforesis, filtración, o flujo global (que puede ser establecido, por ejemplo, por bombas, electrosmosis, u otros medios).

Como se describe en el presente documento, el analito puede ser marcado con un indicador que confiere detectabilidad al analito. El indicador puede comprender una partícula de dispersión de la luz, una partícula que contiene enzima, un fluoróforo, un fósforo de conversión ascendente, un punto cuántico, o un agente electroquímico. También puede ser muy útil tener una marca que confiere tanto detectabilidad, además de movimiento con una fuerza artificial (como se ha descrito anteriormente).

Como se describe en el presente documento, puede eliminarse el analito que no se une específicamente a la superficie. Este lavado puede utilizar las mismas fuerzas que mueven el analito hacia la superficie, pero ahora aplicadas en otra dirección. Tales fuerzas pueden incluir electroforesis, dielectroforesis y fuerzas magnéticas. Las fuerzas también pueden comprender condiciones físicas y químicas tales como pH, fuerza iónica y flujo global (laminar o de otro modo).

Como se describe en el presente documento, puede ser frecuente monitorizar el analito sobre la superficie. Por ejemplo, es preferible que haya varias rigurosidades diferentes de eliminación del material no específicamente unido, de manera que el material específicamente unido pueda distinguirse tanto del material no específicamente unido que está unido menos fuertemente, además del material que está unido más fuertemente. La frecuente monitorización puede entonces identificar material específicamente unido examinando la rigurosidad a la que se elimina diferente material de la superficie.

Se describe en el presente documento la monitorización en tiempo real usando métodos ópticos, que puede no solo identificar la presencia de un analito sobre la superficie, sino también guardar la localización de analitos individuales sobre la superficie de manera que su presencia pueda monitorizarse con el tiempo. La detección óptica puede comprender detectores de obtención de imágenes, tales como una cámara, pero también puede comprender un láser de barrido con un detector de luz, que puede ser un tubo fotomultiplicador. El detector puede detectar ya sea el propio analito, o como se ha descrito anteriormente, un indicador que está unido al analito. El detector puede comprender un campo brillante, campo oscuro, fase, fluorescente, u otro detector de luz emitida. Alternativamente, el detector puede comprender un detector de resonancia de plasmones superficiales, en el que la superficie comprende oro.

Una realización de la presente invención puede usar óxido de indio y estaño y otros recubrimientos conductores transparentes que facilitan el uso de detección óptica. En estos casos, es necesario que los voltajes que se usan no superen el orden de 2 voltios, potencial que no soporta la electroforesis y dielectroforesis con muchos tampones convencionales. Puede ser conveniente usar reactivos redox con el fin de soportar la electroforesis y dielectroforesis. Estos reactivos redox pueden estar en pares, en los que la oxidación del agente reductor da lugar al agente de oxidación, y la reducción del agente de oxidación da lugar al agente reductor. También son posibles otras disposiciones, por ejemplo en las que el producto de oxidación del agente reductor oxida el producto de reducción del agente de oxidación. También es conveniente que estos reactivos estén neutramente cargados, de manera que las especies iónicas no interfieran con la electroforesis y dielectroforesis.

En una realización de la presente invención, las soluciones en las que la electroforesis y dielectroforesis se producen pueden tener baja fuerza iónica, de manera que los electrolitos no reduzcan la eficacia de la electroforesis. En estos casos, es conveniente que las soluciones comprendan especies de ión bipolar tanto para el tamponamiento, para estabilizar las interacciones entre especies moleculares, como para proporcionar un entorno propicio para el crecimiento para los microorganismos.

Como se describe en el presente documento, la iluminación puede comprender iluminación de onda evanescente, ya que esta detecta solo que el analito que está yuxtapuesto con la superficie, y así el analito o indicadores que no están unidos pueden seguir en la solución encima de la superficie. La iluminación de onda evanescente puede acoplarse en el sustrato debajo de la superficie usando rejillas, acoplamientos terminales y prismas. Aunque la iluminación de onda evanescente puede rebotar múltiples veces dentro del sustrato, también es conveniente que la iluminación de onda evanescente tenga un único rebote contra la superficie, que se realiza convenientemente con prismas que pueden ser tanto desechables como estar permanentemente unidos o formados con el sustrato. Si es desechable, la interfase entre el prisma y el sustrato puede ser un material elástico transparente.

El uso de presentación de muestras, que puede comprender concentración del analito de un volumen de muestra grande, además de la eliminación de contaminantes, se describe en el presente documento. Esta preparación de muestras puede comprender centrifugación, perlas o columnas de intercambio iónico, filtración, electroforesis por apilamiento, o formas de separación bioquímica.

Como se ha descrito anteriormente, pueden ensamblarse numerosas realizaciones de la presente invención como se explica en el presente documento. Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección de un primer tipo de microorganismo en una muestra. Este método comprende poner en contacto la muestra con un sistema que comprende una cámara que comprende un primer electrodo y un segundo electrodo en paredes opuestas de la cámara, un puerto de entrada, un puerto de salida y un medio de transporte de fluido para transportar solución dentro la cámara a través del puerto de entrada y fuera de la cámara a través del puerto de salida. El sistema comprende además un primer componente de afinidad fijado al primer electrodo, al que se adhieren los microorganismos del primer tipo, un controlador eléctrico que controla el potencial entre el primer electrodo y el segundo electrodo, un detector automático que puede detectar la cantidad de microorganismos del primer tipo adheridos al primer componente de afinidad, y un controlador de información que guarda la cantidad de microorganismos del primer tipo como se ha determinado por el detector. En el sistema, la solución se introduce en la cámara a través del puerto de entrada, se aplica un potencial por el controlador entre el primer y el segundo electrodos suficiente para hacer que la electroforesis se produzca entre los electrodos, causando que ocurra el movimiento de microorganismos del primer tipo hacia el primer electrodo, de forma que cuando los microorganismos estén próximos al primer componente de afinidad, se unan al primer componente de afinidad y se determina su cantidad por el detector y se guarda en el controlador de información.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un sistema para detectar un primer tipo de microorganismo viable en una solución. El sistema comprende i) una cámara que comprende un primer electrodo de electroforesis y un segundo electrodo de electroforesis en paredes opuestas de la cámara, en el que los electrodos están configurados para hacer que dicho primer tipo de microorganismo viable migre hacia dicho primer electrodo cuando se aplica un potencial entre los electrodos; ii) una primera superficie de detección dispuesta sobre dicho primer electrodo, comprendiendo dicha superficie de detección una pluralidad de primeros componentes de afinidad que se unen a dicho primer tipo de microorganismo viable, en el que un microorganismo viable es un microorganismo que participa en el crecimiento y división; iii) un controlador eléctrico operativamente unido al primer y segundo electrodos, dicho controlador configurado para controlar el potencial entre el primer y segundo electrodos; y (iv) un detector óptico configurado para detectar la cantidad de dicho primer tipo de microorganismo viable unido a los primeros componentes de afinidad.

Los microorganismos pueden comprender bacterias seleccionadas de un conjunto de géneros tales como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, y otros patógenos humanos encontrados en la práctica médica. Similarmente, los microorganismos pueden comprender hongos seleccionados de un conjunto de géneros tal como *Candida*, *Aspergillus*, y otros patógenos humanos encontrados en la práctica médica. Todavía otros microorganismos pueden comprender virus patógenos humanos encontrados en la práctica médica.

En algunas realizaciones, el sistema comprende además la solución, que comprende un agente de oxidación o un agente reductor. El agente de oxidación puede comprender benzoquinona, un ditiol, una cetona, un ferrocenino, un ferricianuro, dihidroascorbato, glutatión oxidado, viológeno de metilo oxidado, o un halógeno. El agente reductor puede comprender ditiotreitolo, ditioeritritol, un ditioalcano, un ditioalqueno, un tioalcano, un tioalqueno, un tiol, una hidroquinona, un alcohol, un ferroceno, un ferrocianuro, ascorbato, glutatión, viológeno de metilo, o un haluro. Por tanto, el producto reducido del reactivo oxidante puede comprender el agente reductor.

La conductividad de la solución puede ser inferior a 100 microSiemens/cm o la conductividad de la solución puede ser inferior a 10 microSiemens/cm. La solución puede comprender un tampón de ión bipolar.

Un concentrador puede concentrar los microorganismos de una muestra. El concentrador puede comprender una centrifugadora. El concentrador puede comprender partículas de intercambio iónico.

La muestra puede tener una conductividad más alta que la solución.

El detector automático puede comprender un detector óptico. El sistema para detectar un primer tipo de microorganismo viable en una solución comprende un detector óptico. El detector óptico puede utilizar métodos de detección óptica que incluyen obtención de imágenes de dispersión de la luz, obtención de imágenes de campo brillante, obtención de imágenes de campo oscuro, resonancia de plasmones superficiales, obtención de imágenes de fase, obtención de imágenes de fluorescencia, obtención de imágenes de fósforo de conversión ascendente, obtención de imágenes de puntos cuánticos y obtención de imágenes de quimioluminiscencia.

Un electrodo seleccionado del conjunto que comprende el primer electrodo y segundo electrodo puede ser ópticamente transparente.

La diana puede ser iluminada por un láser.

El detector puede determinar además la posición de cada microorganismo adherido al componente de afinidad, en el que las localizaciones de los microorganismos pueden almacenarse en el controlador de información junto con la cantidad del microorganismo en esa localización.

El detector puede detectar cantidad total de microorganismos del primer tipo mediante el promedio de la señal de una porción de la superficie que comprende sustancialmente todos los microorganismos del primer tipo fijados al primer electrodo.

El primer electrodo puede estar comprendido de oro, y el detector puede utilizar resonancia de plasmones superficiales.

El detector puede comprender una cámara.

El campo de vista correspondiente a cada píxel puede comprender un eje largo que es inferior a 2 micrómetros, o puede ser inferior a 0,5 micrómetros.

La solución puede estar en movimiento en masa durante la electroforesis.

Pueden intercalarse dos periodos de electroforesis con un periodo en el que la solución está en movimiento en masa.

La solución puede incluir además microorganismos de un segundo tipo, en la que el detector puede distinguir microorganismos del primer tipo de microorganismos del segundo tipo.

Una primera marca puede estar comprendida de un primer agente de unión unido a un primer indicador que es detectable por el detector y una segunda marca puede estar comprendida de un segundo agente de unión unido a un segundo indicador que es detectable por el detector y en el que el primer indicador y el segundo indicador son distinguibles por el detector, en el que el primer agente de unión se une a microorganismos del primer tipo, y el segundo agente de unión se une a microorganismos del segundo tipo, en el que la primera marca y la segunda marca se hacen reaccionar con microorganismos del primer tipo y microorganismos del segundo tipo unidos al componente de afinidad, y el detector detecta sustancialmente simultáneamente la cantidad de los microorganismos basándose en las marcas que están unidas a los microorganismos.

Una primera marca puede estar comprendida de un primer agente de unión unido a un indicador que es detectable por el detector y una segunda marca comprende un segundo agente de unión unido al indicador, en el que el primer agente de unión se une a microorganismos del primer tipo, y el segundo agente de unión se une a microorganismos del segundo tipo, en el que la primera marca se hace reaccionar con microorganismos del primer tipo unidos al componente de afinidad y el detector detecta la cantidad y localización de los microorganismos del primer tipo basándose en las marcas que están unidas a los microorganismos, y posteriormente, la segunda marca se hace reaccionar con microorganismos del segundo tipo unidos al componente de afinidad y el detector detecta la cantidad y localización de los microorganismos del segundo tipo basándose en las marcas que están unidas a los microorganismos que están en localizaciones que no eran previamente detectadas por el detector.

Una marca puede estar comprendida de un agente de unión unido a un indicador, en el que el agente de unión puede comprender un anticuerpo que se une a microorganismos del primer tipo.

El detector puede distinguir microorganismos del primer tipo de microorganismos del segundo tipo basándose en las diferentes propiedades electroforéticas de los microorganismos.

El primer componente de afinidad puede comprender un polielectrolito. El polielectrolito puede comprender un polímero policatiónico. El polímero policatiónico puede comprender restos de amina. El polímero puede comprender polietilimina o polilisina.

La solución puede incluir además microorganismos de un segundo tipo, en la que los microorganismos del segundo

tipo no se unen al primer componente de afinidad. El componente de afinidad puede ser un anticuerpo o un aptámero.

5 Un segundo componente de afinidad puede unirse al primer electrodo, al que se adhieren microorganismos del segundo tipo, en el que el detector puede detectar la cantidad de microorganismos del segundo tipo adheridos al segundo componente de afinidad, en el que el sistema puede distinguir microorganismos del primer tipo de microorganismos del segundo tipo por si los microorganismos se adhieren al primer componente de afinidad o el segundo componente de afinidad.

10 El componente de afinidad puede comprender además un polímero que tiene afinidad intrínsecamente baja por microorganismos, en el que el polímero puede comprender polietilenglicol o poliácridamida.

El sistema puede comprender además un tercer electrodo, coplanario con el primer electrodo, al que puede unirse un segundo componente de afinidad y al que pueden adherirse microorganismos del segundo tipo, en el que el potencial en el primer electrodo y el tercer electrodo puede ser independientemente controlador por el controlador eléctrico.

20 El detector puede detectar si microorganismos del primer tipo están vivos o muertos. Los microorganismos pueden teñirse antes de ser detectados por el detector con una tinción mortal o los microorganismos pueden teñirse antes de ser detectados por el detector con una tinción vital. Posterior a la adhesión de los microorganismos del primer tipo al primer componente de afinidad, los microorganismos pueden colocarse en condiciones propicias para el crecimiento. Estas condiciones pueden comprender temperaturas entre 34 y 40 °C.

25 La solución puede sacarse de la cámara mediante el puerto de salida y puede sustituirse por medio de cultivo a través del puerto de entrada. Por tanto, el medio de cultivo puede tener una conductividad inferior a 1 miliSiemens/cm, y el controlador eléctrico puede mantener un potencial superior a 100 mV entre el primer electrodo y el segundo electrodo.

30 Los microorganismos del primer tipo puede ser detectados por el detector en un tiempo inicial, y también pueden ser detectados en un segundo tiempo después de que se deje tiempo suficiente a los microorganismos para que se dupliquen al menos el 10 % de los microorganismos, en los que diferencias en los microorganismos detectados del primer tipo en los dos puede proporcionar pruebas de la viabilidad de los microorganismos del primer tipo en las condiciones de crecimiento. Por tanto, puede añadirse un agente anti-microorganismos al medio de cultivo durante el tiempo de crecimiento. El detector puede detectar si los microorganismos del primer tipo están vivos o muertos en respuesta al agente anti-microorganismos, en el que antes de la detección por el detector los microorganismos se tiñen con una tinción seleccionada del conjunto que consiste en tinción mortal y tinción vital. El agente anti-microorganismos puede comprender agentes individuales o combinaciones de agentes seleccionados de familias de antibióticos tales como cefalosporinas, penicilinas, carbapenémicos, monobactámicos, otros antibióticos beta-lactámicos novedosos, inhibidores de beta-lactamasa, fluoroquinolonas, macrólidos, cetólidos, glucopéptidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, rifampina, y otras familias, que incluyen agentes novedosos, usados como antibióticos en la práctica clínica o en investigación. Por tanto, la concentración del agente anti-microorganismos puede cambiarse con el tiempo para reflejar la farmacocinética del agente anti-microorganismos en tejido animal.

45 Los microorganismos pueden hacerse reaccionar con un excedente de reactantes que se unen a la superficie del microorganismo en un primer periodo de tiempo, después del cual los reactantes se eliminan posteriormente, y en los que en un segundo periodo de tiempo los microorganismos pueden hacerse reaccionar con un excedente de moléculas de unión de la superficie del microorganismo modificadas por un indicador de manera que sean detectables por el detector, en los que la detección del indicador por el detector indica el crecimiento de los microorganismos.

50 La solución puede comprender además un contaminante que se une al primer componente de afinidad junto con los microorganismos del primer tipo, en la que se aplica una condición al primer componente de afinidad que libera el contaminante sin liberar el microorganismo, mientras que el contaminante se elimina por aplicación de la condición. La condición puede comprender temperatura, intensidad de campo magnético, fuerza electroforética, fuerza dielectroforética, flujo de fluidos de cizallamiento, fuerza iónica, pH, concentración de tensioactivo no iónico, concentración de tensioactivo iónico, o concentración de competidor. La solución puede comprender además un contaminante que se une al primer componente de afinidad junto con los microorganismos del primer tipo, en la que se aplica una condición al primer componente de afinidad que libera los microorganismos sin liberar el contaminante, mientras que los microorganismos pueden ser posteriormente unidos a un segundo componente de afinidad fijado al primer electrodo. La condición puede comprender temperatura, intensidad de campo magnético, fuerza electroforética, fuerza dielectroforética, flujo de fluidos de cizallamiento, fuerza iónica, pH, concentración de tensioactivo no iónico, concentración de tensioactivo iónico, o concentración de competidor.

65 Los microorganismos del primer tipo pueden concentrarse en la solución antes de ser unidos al primer componente de afinidad, en los que los microorganismos están presentes en un primer tampón de sal de fuerza iónica relativamente baja, y el primer tampón de sal está próximo a un segundo tampón de sal de fuerza iónica

relativamente más alta y el primer tampón de sal y el segundo tampón de sal se unen en una interfase, en la que un primer electrodo de concentración está localizado próximo a la interfase y un segundo electrodo de concentración está localizado distal a la interfase, en los que la aplicación de un potencial entre el primer electrodo de concentración y el segundo electrodo de concentración hace que los microorganismos migren a través del primer tampón de sal por electroforesis y su migración se reduce más de X veces tras encontrar la interfase. El segundo electrodo de concentración puede comprender el primer electrodo. Por tanto, la interfase puede estar localizada sustancialmente en el puerto de entrada. La relación de conductividad entre el primer tampón de sal y el segundo tampón de sal puede ser inferior a 1:50.

10 Breve descripción del dibujo

La FIG. 1 es un diagrama esquemático de un sistema de biodetección que utiliza una sonda que tiene afinidad por una diana.

La FIG. 2A, un diagrama esquemático de un sistema de biodetección que tiene lugar en el que diferentes sondas 116 están colocadas en una matriz de localizaciones sobre un sustrato.

La FIG. 2B es una vista lateral a través de la matriz de la FIG. 2A.

La FIG. 3 es un diagrama en perspectiva de un sistema de incubación electroforéticamente potenciado.

La FIG. 4A es un diagrama en perspectiva de un sistema de biodetección en el que un electrodo de una sola sonda está debajo de localizaciones de múltiples sondas que están colocadas en una matriz.

La FIG. 4B es un diagrama en perspectiva de un sistema de biodetección en el que los electrodos no están debajo de las localizaciones de sondas.

La FIG. 5 es un diagrama de intensidades de campo eléctrico de un primer electrodo, un segundo electrodo y un conjunto de electrodos de referencia parciales.

La FIG. 6 es un diagrama esquemático de una marca electroforética en una configuración de sándwich.

Las FIG. 7A a F son diagramas esquemáticos de marcas electroforéticas, que muestran diferentes disposiciones de componentes para proporcionar funcionalidad similar.

La FIG. 8 es un diagrama de flujo de bloques esquemático de las etapas de la presente invención.

La FIG. 9 es un gráfico de las cantidades de material unido frente a la fuerza de unión.

La FIG. 10 es un diagrama de flujo de bloques esquemático de un sistema que implica electrodos que no están debajo de las localizaciones de sondas.

La FIG. 11A es un diagrama de flujo de bloques esquemático de la operación de una célula que implica electrodos que están debajo de las localizaciones de sondas, y puede ser mejor entendido en relación con la FIG. 4A.

La FIG. 11B es un diagrama de flujo esquemático de la operación de una celda que implica electrodos bajo las localizaciones de sondas usando una diana marcada.

La FIG. 12A es un diagrama esquemático de tres electrodos dispuestos en dos ejes perpendiculares dentro de una celda de reacción.

La FIG. 12B es un gráfico de la diferencia de potencial entre los electrodos E2 y E4 a medida que varía con el tiempo, con el electrodo E4 positivamente polarizado hacia E2.

La FIG. 12C es un gráfico de la diferencia de potencial entre los electrodos E2 y cuatro a medida que varía con el tiempo, dispuestos alternativamente a aquellos en la FIG. 12B.

La FIG. 12D es un gráfico de diferencias de potencial entre electrodos espacialmente desplazados, tal campo eléctrico cambia no solo en magnitud, sino también en dirección.

La FIG. 13A es un diagrama esquemático con tres electrodos desplazados en dos dimensiones sobre un único electrodo 200.

La FIG. 13B es un gráfico de diferencias de potencial entre los electrodos de la FIG. 13A.

La FIG. 14A es un diagrama esquemático de un sistema cerrado para electroforesis.

La FIG. 14B es un diagrama esquemático de un sistema abierto para electroforesis.

La FIG. 15 es un esquema en vista desde arriba de una región en la que se han formado celdas de falta de homogeneidad.

La FIG. 16A es un diagrama de bloques esquemático de una reacción que implica tanto fuerzas verticales como fuerzas horizontales para acelerar la reacción de una diana marcada con la sonda 116.

La FIG. 16B es un gráfico del potencial eléctrico que causa el movimiento de la diana marcada verticalmente, en relación de tiempo con las fuerzas horizontales que causan la mezcla de la diana marcada.

La FIG. 17A es un diagrama de bloques esquemático del medio de control de las fuerzas horizontales y verticales.

La FIG. 17B es un diagrama de flujo de bloques esquemático de la operación del sistema de la FIG. 17A.

La FIG. 18A es un diagrama en perspectiva de un sistema de agitación mecánico que puede usarse dentro de un pocillo de placa de microtitulación.

La FIG. 18B es un diagrama en vista desde arriba del electrodo de sondas.

La FIG. 19A es un diagrama en perspectiva de una placa de microtitulación con un conjunto de electrodos 570 y árboles 552.

La FIG. 19B es una vista en perspectiva de una placa superior que comprende puertos de acceso.

La FIG. 20A es una vista desde arriba de la disposición de electrodos de pocillo sobre una placa inferior 592.

La FIG. 20B es una vista desde arriba de la disposición de electrodos de pocillo eléctricamente conectados sobre una placa inferior.

La FIG. 21 es un dibujo esquemático de una sección transversal de un sistema de detección que comprende un sándwich de detección sobre un sustrato.

La FIG. 22 es un diagrama de flujo de bloques esquemático de discriminación usando fuerza electroforética.

La FIG. 23A es un esquema en sección transversal de una realización de la presente invención en la que se usa un prisma sobre la superficie superior para introducir luz en la guía de onda del portaobjetos.

La FIG. 23B es un esquema en sección transversal de un prisma sobre la superficie superior de un portaobjetos, en el que la luz es internamente reflejada dentro del prisma antes de la introducción de la luz en la guía de onda del portaobjetos.

La FIG. 24A es un esquema en sección transversal de la disposición de prisma de la Figura 3, extendido de manera que pueda verse la disposición de las trayectorias de rayos paralelos distales.

La FIG. 24B es el esquema en sección transversal de la Figura 4A, modificado usando iluminación convergente en lugar de iluminación colimada.

La FIG. 24C es un diagrama en sección transversal esquemático de un iluminador de portaobjetos en el que el portaobjetos no está uniformemente iluminado.

La FIG. 25A es una sección transversal esquemática de una guía de onda de película delgada iluminada en el extremo integrada con un portaobjetos.

La FIG. 25B es una vista desde arriba esquemática del acoplador y el portaobjetos de la Figura 5A.

La FIG. 25C es una sección transversal esquemática de una guía de onda de película fina en la que la luz se acopla a la guía de onda mediante una rejilla.

La FIG. 25D es una sección transversal esquemática de una guía de onda de película fina en la que la luz se acopla a la guía de onda mediante un prisma de material de alto índice.

La FIG. 26A es una sección transversal esquemática de iluminación evanescente de una región sin uso de una guía de onda.

La FIG. 26B es una sección transversal esquemática de iluminación evanescente según la Figura 6A, en la que el prisma tiene una ventana a través de la que el detector detecta indicadores sobre la superficie superior del portaobjetos.

La FIG. 27A es una sección transversal esquemática de luz que se acopla con un prisma usando un acoplador flexible.

La FIG. 27B es un esquema en vista lateral de un prisma con un acoplador de cara curvada.

La FIG. 28A es un gráfico del potencial de lavado en función del tiempo para una función de lavado de etapa simple.

La FIG. 28B es un gráfico del potencial de lavado en función del tiempo para una función de lavado escalonada.

Las FIG. 29A-B es un diagrama esquemático de una diana marcada que comprende una diana de ADN monocatenario que se une a una sonda de ADN complementario, que está unida al sustrato en uno o más puntos de unión.

La FIG. 30A es un diagrama en vista lateral esquemático de dos electrodos de referencia con respecto al electrodo de sondas.

La FIG. 30B es un gráfico del potencial de electrodo con respecto a los dos electrodos de referencia como se muestra en la FIG. 30A para dos etapas en la rigurosidad de lavado.

La FIG. 31 es un diagrama de flujo de bloques del proceso para determinar la identidad, número y sensibilidad a antibióticos de bacterias en una muestra.

La FIG. 32A es un diagrama esquemático desde arriba de una celda de detección bacteriana.

La FIG. 32B es un diagrama esquemático en vista lateral de la celda de detección bacteriana de la FIG. 32A a través de la sección transversal X.

La FIG. 32C es un diagrama esquemático en vista lateral de la celda de detección bacteriana de la FIG. 32B con el uso de electrodos direccionables.

Las FIG. 33A-F son vistas esquemáticas laterales del transporte y captura de bacterias usando la cámara de la FIG 32A-B.

Las FIG. 34A-D son diagramas esquemáticos en vista lateral del transporte electroforético a las superficies de detección.

Las FIG. 35A-D son diagramas esquemáticos en vista lateral de una cámara en el que el material contaminante se distingue basándose en su comportamiento bajo campos electroforéticos.

Las FIG. 36A-E son diagramas esquemáticos en vista lateral de la detección de múltiples bacterias sobre una superficie no específica.

Las FIG. 37A-D son diagramas esquemáticos de detección del crecimiento en un organismo.

Las FIG. 38A-B son gráficos de la respuesta de bacterias a una concentración variable de un agente anti-organismos.

La FIG. 39A es una vista esquemática de un tubo de centrifugadora modificado para la concentración de bacterias sobre una superficie de captura.

La FIG. 39B es una vista en sección transversal del tubo de centrifugadora de la FIG. 39A.

La FIG. 39C es una vista lateral en sección transversal de un detector usando el trozo de captura de las FIG. 39A-B.

Las FIG. 40A-B son una vista desde arriba y vista lateral en sección transversal de un sistema de detección que usa un filtro de captura poroso.

Las FIG. 41A-B son secciones transversales esquemáticas de un sistema de detección usando múltiples fuerzas para efectuar la separación de la muestra bacteriana.

La FIG. 42 es un diagrama de bloques de una biodetección por la presente invención y como se describe en el presente documento.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

5

Ruido de fondo de la biodetección

La FIG. 1 es un diagrama esquemático de un sistema de biodetección 100 que utiliza una sonda 116 que tiene afinidad por una diana 114. La sonda 116 está fijada a un sustrato sólido 120 por un conector de sonda 118. El conector de sonda 118 generalmente comprenderá un recubrimiento que sirve además para reducir la unión accidental de moléculas diana al sustrato 120. La diana 114 está conectada mediante un conector de diana 112 a una marca 110, que puede ser detectada por un detector, no mostrado.

La diana 114 puede comprender varias biomoléculas, que incluye ácidos nucleicos, proteínas, almidones, lípidos, hormonas, y más. Además, la diana 114 puede comprender, como se tratará más adelante en mayor detalle, organismos enteros u orgánulos, que incluyen bacterias, hongos, virus, micoplasmas, fracciones celulares (mitocondrias, núcleos), células animales o vegetales, y otros organismos. En la presente invención, la diana 114 es un microorganismo. En cada caso, la sonda 116 se corresponderá con la diana 114, y ella misma puede comprender ácidos nucleicos (ambos para la hibridación y como aptámeros), proteínas, hidratos de carbono, y también puede incluir organismos enteros y orgánulos como se ha descrito anteriormente. En la presente invención, la sonda 116 es un componente de afinidad que se une al microorganismo. De hecho, en la mayoría de los casos, donde se tenga un par de diana-sonda, los constituyentes pueden generalmente ser cambiados de manera que la diana actúe de una sonda, y la sonda de una diana, basándose en la afinidad del uno por el otro.

En operación, la diana 114, que está conectada a la marca 110, se introduce en la solución que está en contacto con la sonda 116. Debido a la afinidad molecular de la sonda 116 por la diana 114, la diana 114 se une a la sonda 116. Debido a que la marca 110 está unida a la diana 114, la presencia de la marca 110 en proximidad a la superficie del sustrato 120 indica la presencia de la diana 114. Determinando la cantidad de la marca 110, puede estimarse la cantidad de la diana 114.

Alternativamente, la marca 110, en lugar de unirse directamente a la diana 114, puede unirse mediante un conector a una segunda molécula con afinidad por la diana 114. Después de la incubación con la sonda 116 y la diana 114, se forma un "sándwich" en el que la diana 114 está asociada con tanto la sonda 116 como la marca 110.

Una de las dificultades de los sistemas según la FIG. 1 es el tiempo que se necesita para la incubación de la diana 114 y la sonda 116 para llegar a la completitud dinámica. Considerando, por ejemplo, un formato de laboratorio de microplacas común en el que diferentes sondas están colocadas en una rejilla de pocillos dispuestos en un formato de pocillos de ocho columnas por doce filas (como se describirá en mayor detalle más adelante). La disposición de pocillos de placa se define por patrones industrial y los pocillos normalmente están en el orden de 9 mm de diámetro. La unión de la diana a la sonda requiere que las dos especies estén en estrecha proximidad medida en una escala de Angstroms. En un ensayo de microplaca típico, se utilizan la difusión y algunas veces la convección para aumentar la probabilidad de que las dos especies se aproximen para complejarse en la superficie. Esta estrategia genera señal significativa, a incubación de duración horas, con metodologías de detección convencionales típicas a concentraciones de pg/ml de una proteína modelo de 50 kd. Sin embargo, a concentraciones inferiores a o pocos pg/ml, la generación de señales está limitada por el transporte de masa del analito a la superficie, de manera que se requieren tiempos de reacción ilógicos medidos en días para que el ensayo alcance la completitud.

Además, el transporte de diana 114 a sonda 116 se agrava además en una matriz de escala de micrómetros de sondas (es decir, formato de micromatriz). FIG. 2A, un diagrama esquemático de un sistema de biodetección que tiene lugar en el que diferentes sondas 116 están colocadas en una matriz 140 de localizaciones 130 sobre un sustrato 120. Cada localización 130 normalmente está en el orden de 50 micrómetros a 500 micrómetros de diámetro, y con una matriz que comprende diez a decenas de miles de localizaciones 130, una dimensión de lado a lado típica para la matriz 140 puede ser milímetros o incluso centímetros. La unión de la diana 114 a la sonda 116 requiere que las dos especies estén en estrecha proximidad medida en Angstroms. Dado que la difusión pasiva de grandes macromoléculas biológicas es baja (por ejemplo, medida en nanómetros por segundo), el movimiento lateral de la diana 114 a la sonda 116 puede durar del orden de decenas de horas, a menos que se proporcione ayuda activa.

Incluso con movimiento ayudado de las moléculas lateralmente, la escala vertical de la incubación puede frustrar la unión de la diana 114 a la sonda 116. Considerar la FIG. 2B, una vista lateral a través de la matriz 140 de la FIG. 2A. Una tapa 111 comprende la parte superior de la celda de incubación, y si la diana 114 está cerca de la parte superior de la cámara de incubación (delimitada por el sustrato 120 y la tapa 111), la dimensión vertical es todavía grande por patrones moleculares. Considerar que el espesor vertical más pequeño usado en incubaciones convencionales normalmente es aproximadamente 50 micrómetros. Dado que la diana 114 y la sonda 116 necesitan estar dentro de algunos Angstroms, en general, con el fin de unirse la una a la otra, la escala vertical es 10.000 veces este tamaño. En el mejor de los casos, la diana 114 estaría limitada en su movimiento a un volumen muy pequeño en la

proximidad de la sonda inmovilizada 116 para aumentar su concentración aparente.

Una configuración de la técnica anterior de un medio para vencer este problema se proporciona en la FIG. 3, un diagrama en perspectiva de un sistema de incubación electroforéticamente potenciado. En este caso, las diferentes sondas 116 están fijadas directamente sobre electrodos eléctricamente conductores 150. Estos electrodos 150 son de voltaje independientemente polarizado con respecto a un electrodo de referencia 140 para producir una corriente dentro de la cámara de incubación, en la que las moléculas de diana 114 migran al electrodo 150. Considerar, por ejemplo, que el electrodo 150 A tiene el voltaje inicialmente polarizado para atraer la diana 114. Debido a la proximidad inmediata de la diana 114 y la sonda inmovilizada 116 en el electrodo 150, la unión entre las dos especies se produce muy rápidamente--en el orden de segundos a décimas de segundos. El voltaje en el electrodo 150 A se neutraliza entonces o se hace opuesto a su polarización previa, y entonces se polariza el electrodo 150 B. En este caso, las moléculas de diana 114 migrarían al segundo electrodo 150 B para permitir la interacción de la diana 114 con la sonda inmovilizada en la segunda localización.

Esta configuración ha sido ampliamente usada por Nanogen (San Diego, CA), y las enseñanzas de la técnica anterior están especificadas en una serie de patentes, que incluyen la patente de EE.UU. N.º 5.849.486 y la patente de EE.UU. N.º 6.017.696. Sin embargo, hay varias limitaciones de esta configuración. Por ejemplo, el área cubierta por la sonda 116 y el electrodo respectivo 150 debe ser exactamente coincidente. En general, esto significa que las sondas 116 se inmovilizan secuencialmente usando movimiento de las sondas 116 análogo al movimiento de la diana 114 durante la incubación. Además, cada electrodo 150 de sonda 116 debe establecer su propia conexión eléctrica a un controlador de potencia, que requiere tanto fabricación sofisticada como control de potencia.

Disposición de componentes

Realizaciones de la presente invención comprenden la aplicación de fuerzas electroforéticas en la diana 114 (es decir, el microorganismo). En el presente documento se describen disposiciones en las que los electrodos implicados en tales fuerzas no son necesariamente coincidentes con las localizaciones en las que la sonda 116 está unida. La aplicación de fuerza electroforética puede ser según varias realizaciones. En una disposición descrita en el presente documento, los electrodos no están debajo de las localizaciones de las sondas 116 en absoluto, y las fuerzas electroforéticas son principalmente laterales a la superficie del sustrato 120. En una realización, un único electrodo está debajo de una pluralidad de localizaciones de sondas 116. Debe observarse que la disposición estructural de las localizaciones de sondas y los electrodos que dan lugar a las fuerzas electroforéticas se considerará primero, junto con diversos componentes optimizados para su uso con la presente invención, y a partir de aquí se describirá la operación de los diversos componentes en concierto. Debe también observarse que puede usarse dielectroforesis en vez de electroforesis para mover dianas (o marcas que están unidas a las dianas) que son grandes y electrostáticamente polarizables. Estos métodos generalmente requieren el uso de electrodos que están formados ya sea en dos o tres dimensiones para crear campos eléctricos o electroforéticos que son no uniformes. Una descripción del uso de estos electrodos dielectroforéticos se presenta en G. H. Markx and R. Pethig, Dielectrophoretic Separation of Cells: Continuous Separation. Biotechnol. Bioeng. 45, 337-343 (1995) and G. H. Markx, Y. Huang, X.-F. Zhou and R. Pethig, Dielectrophoretic characterization and separation of micro-organisms, Microbiology, 140, 585-591 (1994).

Disposición que implica un único electrodo que está debajo de localizaciones de múltiples sondas

La FIG. 4A es un diagrama en perspectiva de una celda de biodetección en la que un electrodo de una sola sonda 200 está debajo de localizaciones de múltiples sondas 170 que están colocadas en una matriz 180. Las paredes de la celda no están colocadas en el diagrama, y generalmente comprenderán material de junta para formar un sello impermeable al agua. Un electrodo de referencia 190 está físicamente situado, preferentemente encima del electrodo de sondas 200 y de tamaño aproximadamente similar al electrodo de sondas 200, de manera que el campo eléctrico entre los dos electrodos sea sustancialmente uniforme. Sin embargo, también se describe en el presente documento que el electrodo de referencia 190 tiene diversas formas y posiciones que permiten uniformidad similar o incluso menor. En general, los electrodos son aproximadamente paralelos entre sí, de manera que los campos electroforéticos que se generan son aproximadamente perpendiculares a la superficie del electrodo de sondas 200, y dan lugar a deposición uniforme de las dianas sobre las localizaciones de sondas 170.

Esta disposición del electrodo de sondas 200 y las localizaciones de sondas 170 permiten métodos convencionales de colocación de sondas sobre la superficie del electrodo usando posicionadores de contacto o no de contacto (por ejemplo, de clavija o piezoeléctricos). Además, la asociación de la diana 114 con la sonda 116 puede realizarse en paralelo con todas las localizaciones de sondas 170 diferentes, en vez de en serie como se realiza con la técnica anterior.

Disposición que implica electrodos que no están debajo de las localizaciones de sondas

Una disposición alternativa como se describe en el presente documento se muestra en la FIG. 4B, un diagrama en perspectiva de una celda de biodetección en la que los electrodos no están debajo de las localizaciones de sondas 170. En este caso, las sondas 116 están colocadas en localizaciones de sondas 170 dispuestas en una matriz 180.

Un primer electrodo 210 y un segundo electrodo 220 son laterales a la matriz 180, y dispuesta debajo una matriz de electrodos de referencia parciales 195, marcada en esta figura P, Q y R. El número y tipo de electrodos de referencia parciales 195 puede variarse, y el objetivo de la colocación del primer electrodo 210, el segundo electrodo 220, y los electrodos de referencia parciales 195, es gestionar la intensidad y topología de los campos eléctricos ajustando los voltajes relativos de los electrodos. Por ejemplo, la colocación del segundo electrodo 220 y los electrodos de referencia parciales 195 P, Q y R a una polarización negativa, y el primer electrodo 210 una polarización relativamente positiva producirá un campo eléctrico esencialmente horizontal a través de la superficie de la matriz 180. La necesidad de los múltiples electrodos de referencia parciales 195 es debido al "cortocircuito" del campo eléctrico que se produciría con un gran electrodo continuo, que dificulta mantener un campo eléctrico a través de un electrodo mayor.

La FIG. 5 es un diagrama de intensidades de campo eléctrico de un primer electrodo 210, un segundo electrodo 220, y un conjunto de electrodos de referencia parciales 195. El segundo electrodo 220 y los electrodos parciales 195 tienen una polarización negativa, y el primer electrodo 210 tiene una polarización relativamente positiva. Como puede apreciarse, el componente vertical del campo eléctrico en la localización de la matriz 180 es relativamente constante con un componente hacia abajo. Ajustando las intensidades relativas de la polarización de voltaje en los diferentes electrodos, puede disponerse varias topologías de campo eléctrico diferentes para los fines que se describirán a continuación.

Marcas electroforéticas

La mayoría de las moléculas biológicas tienen asociada carga electrostática, que puede ajustarse por el pH de la solución en la que las moléculas se mantienen. Para los ácidos nucleicos, la carga es generalmente negativa y se determina por el esqueleto de fosfato, y está además directamente relacionada con la longitud del ácido nucleico. Para los fines descritos en el presente documento, esto tiene ciertas desventajas, ya que el tamaño de las moléculas de diana 114 puede variar. Considerar una aplicación en la que se medirán moléculas de ARN asociadas a diferentes genes. En tal caso, la longitud del ARN asociado a cada gen variará según la longitud del gen. Además, el ARN de organismos superiores está poli-adenilado, y la longitud de la cola de "poliA" varía de ARN a ARN. Esto significa que es difícil proporcionar una fuerza relativamente constante a través de todos los ARN diferentes, o incluso a través de los ARN asociados al mismo gen.

Un método para vencer esta dificultad es poner una "marca electroforética" en cada molécula. La carga electrostática de esta marca será grande en comparación con la carga de la variación de cola de poliA, y además puede ser considerable incluso con respecto a la carga global de las moléculas de ARN. En este caso, las variaciones de carga dentro de los ARN asociados a un gen particular debido a las cola de poliA serán mínimamente insignificativas, y las diferencias de carga entre ARN asociados a diferentes genes serán mínimamente pequeñas, aunque los ARN sean de tamaño significativamente diferente, en tanto que la carga de la marca electroforética sea suficientemente grande.

La FIG. 6 es un diagrama esquemático de una marca electroforética 270 en una configuración de sándwich. La marca electroforética 270 generalmente comprende tres componentes funcionales (o menos componentes, de los que uno o más componentes pueden comprender múltiples funciones). Un componente que se une a marca 272 une la marca 270 a la diana 114 a través de un medio que puede ser cualquiera específico para la diana específica 114 (por ejemplo, un anticuerpo específico o aptámero), o que puede ser común para un gran número de dianas 114 (por ejemplo, poliT, que se unirá a regiones de poliA de ARNm). Un componente de indicador 290 es detectable por un detector. Un componente electrostático 280 comprende un material cargado, en el que la carga es grande y coherente de marca a marca. Aunque la magnitud de la carga electrostática del componente electrostático 280 puede ser amplia, es preferible que la carga sea al menos 1.000 cargas netas, e incluso más preferible que la carga sea al menos 5.000 cargas netas, e incluso más preferible que la carga sea al menos 10.000 cargas netas. Además, es preferible que la carga en la marca electroforética 270 sea de la misma polaridad que la carga en la diana 114. Por ejemplo, para dianas de ácido nucleico 114 como se describe en el presente documento, es preferible que el componente electrostático 280 esté negativamente cargado.

Debe observarse que en ciertos momentos puede ser conveniente formar independientemente una asociación entre la marca electroforética 270 y la diana 114. Es decir, en lugar de asociar la diana 114 con la sonda 116, y entonces asociar la marca 270 con la diana 114, la marca 270 y la diana 114 se asocian primero, donde el componente asociado se llama una diana marcada 275.

La estructura de las marcas electroforéticas 270 puede ser bastante variada. Las FIG. 7A a F son diagramas esquemáticos de marcas electroforéticas 270, que muestran diferentes disposiciones de componentes para proporcionar funcionalidad dentro del alcance de la presente invención.

La FIG. 7A es un diagrama esquemático de una marca electroforética que comprende ADN reticulado 281 como el componente electrostático 280 y colorantes fluorescentes 291 como el componente de indicador 290. El ADN es mejor ampliamente bicatenario de manera que interfiera menos con las dianas de ácido nucleico 114 y las sondas 116 como se describe en el presente documento, y comprende convenientemente regiones de ADN bicatenario con

colas monocatenarias que interaccionan entre sí. Además, es preferible que las regiones de interacción estén químicamente unidas para proporcionar integridad a la marca 270 bajo varias condiciones físicas y químicas diferentes. Un ejemplo de esta forma de marca electroforética 270 es 3ADN (Genisphere, Hatfield, PA), que es una estructura dendrómica de ADN reticulado que puede unirse a tanto colorantes fluorescentes, además de a un componente de unión 272. El componente de unión 272 es convenientemente un anticuerpo con especificidad contra la diana 114, una molécula de avidina con especificidad por un resto de biotina unido a la diana 114 (o en cambio, un resto de biotina con especificidad contra una molécula de avidina unida a la diana 114), un aptámero seleccionado con especificidad por una diana, un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico diana 114 como se describe en el presente documento, u otros componentes de unión específica. Debe observarse que para su uso con dianas de ARN mensajero como se describe en el presente documento, el componente de unión 272 es convenientemente un oligómero de ADN monocatenaria de poliT, que se unirá a las colas de poliA del ARN, o alternativamente un ácido nucleico bloqueado con poliT (Exiqon, de Vedbaek, Dinamarca) que tiene mayor afinidad por poliA que poliT sin modificar.

Debe observarse que en muchos casos, la energía de unión entre el componente de unión 272 y la diana 114 se elegirá para ser superior a la de la energía de unión entre la diana 114 y la sonda 116. Esto puede disponerse o bien haciendo la unión de la diana 114 a la sonda 116 más débil, o bien más preferentemente, haciendo la unión del componente de unión 272 a la diana 114 más fuerte. Un método para garantizar esto es crear enlaces covalentes entre la diana 114 y el componente de unión 272. Esto puede conllevar, por ejemplo, la incorporación de BrdU en el conector de poliT del componente de unión 272, que puede ser foto-activado para producir enlaces covalentes. En el caso de proteínas, si el componente de unión 272 comprende una proteína (por ejemplo, un anticuerpo), la proteína puede modificarse con reactivos de reticulación foto-activables tales como arilazidas (por ejemplo, fenilazida, hidroxifenilazida y nitrofenilazida) y después de dejar que la diana 114 se asocie con el componente de unión 272, puede usarse luz para estimular la reticulación. El reactivo de reticulación sin reaccionar puede entonces ser consumido usando un reactivo de desactivación, que en el caso de arilazidas puede incluir agentes reductores tales como reactivos que contienen tiol.

Mientras que en la mayoría de los casos la energía de unión que se discrimina es aquella entre la sonda 116 y la diana 114, en una realización, la discriminación puede tener lugar considerando la energía de unión entre la diana 114 y el componente de unión a marca 272. Considerar, por ejemplo, un ensayo de sándwich de anticuerpo, en el que tanto la sonda 116 como el componente de unión a marca 272 comprenden anticuerpos o partes de anticuerpos. En ese caso, es igualmente útil que la energía de unión anticuerpo-ligando más débil - es decir, la energía de unión que está siendo discriminada en el ensayo - sea con cualquier anticuerpo. Esto simplifica el diseño de un ensayo tal, en la medida en que es innecesario determinar cuáles de los componentes de anticuerpo que van a usarse en el ensayo de sándwich tiene una afinidad más fuerte por la diana 114.

Esta capacidad de utilizar tanto la energía de unión diana 114-sonda 116, además de diana 114-componente de unión a marca 272 es igualmente aplicable a ácidos nucleicos también. Así, los métodos descritos en el presente documento serán eficaces, aunque la asociación diana 114-componente de unión a marca 272 sea más débil que la de la diana 114 a la sonda 116.

Además, este método todavía se aplica aunque la asociación entre la diana 114 y el componente de unión a marca no sea una asociación uno a uno específica. Considerar, por ejemplo, el caso donde el componente de unión a marca 272 comprende un oligonucleótido poliT de longitud fija, que puede estar comprendido de nucleótidos de ácido nucleico bloqueados, que se asocia con las "colas" poliadeniladas de ARN mensajero. La asociación específica de sondas 116 con sus dianas 114 puede proporcionar la especificidad espacial de la unión de las dianas 114-es decir, donde en la matriz 180 se unirá esa diana 114--mientras que la energía de unión entre la diana 114 y el componente de unión a marca 272 puede proporcionar una energía de unión constante que puede ser discriminada por el sistema.

En una realización, puede producirse reticulación covalente entre tanto la diana 114 como la sonda 116, además de entre la diana 114 y el componente de unión a marca 272, de manera que hagan un enlace continuamente covalente entre el sustrato y el componente de indicador 290. Es decir, dada la incorporación de componentes de reticulación activables apropiados en la sonda 116 (véase anteriormente para una discusión de reactivos de reticulación activables), después de la reacción entre la diana 114 y la sonda 116, puede realizarse la activación de el resto de reticulación unido a la sonda 116, de manera que se forman los enlaces cruzados covalentes entre la sonda 116 y la diana 114. Tal reacción puede producirse también entre la diana 114 y el componente de unión a marca 272, como se ha descrito anteriormente. En tales casos, la energía de unión que mantienen el componente de indicador 290 al sustrato es muy grande, de manera que la unión específica puede ser fácilmente distinguida por su gran fuerza de unión.

La FIG. 7B es un diagrama esquemático de una marca electroforética que comprende un polímero iónico 282 como componente electrostático 280 y fósforos de conversión ascendente 292 como el componente de indicador 290. El polímero iónico puede ser polianión convenientemente lineal o ramificado, comprendiendo los grupos iónicos cualquier grupo carboxilo (si el pH del tampón al que la marca 270 va a usarse es próximo o está por encima del pK del grupo carboxilo), o también puede ser un polifosfato, polisulfato (por ejemplo, poli(sulfonato de vinilo),

poli(sulfonato de estireno), almidones sulfatados, o sulfonato de dextrano) u otro polímero que contiene un resto de ácido inorgánico, que puede comprender fosfatos, aminas cuaternarias, aminas terciarias, aminas secundarias, aminas primarias, sulfatos, nitratos y carboxilatos. Estos polímeros iónicos pueden crearse mediante síntesis de novo a partir de reactivos monoméricos, o pueden generarse alternativamente por modificaciones de polímeros no iónicos o débilmente iónicos bien caracterizados tales como poli(alcohol vinílico) o diversos almidones. Debe observarse que los polímeros altamente iónicos serán altamente atraídos a especies altamente iónicas de la polaridad opuesta, y que, por tanto, el componente electrostático 280 necesita ser probado para comprobar la unión no específica al sustrato 120 u otras especies en la solución de analito que puede dar lugar a alto ruido de fondo en los ensayos de detección.

Los fósforos de conversión ascendente 292 son partículas que convierten luz de frecuencia más baja en luz de frecuencia más alta (véase Orasure Technologies, Inc. de Bethlehem, PA), y son convenientes de usar debido a los pocos compuestos naturales que tienen esta propiedad, que conduce a ruidos de fondo generalmente bajos en ensayos de detección.

La FIG. 7C es un diagrama esquemático de una marca electroforética que comprende un polímero iónico 282 como componente electrostático 280 y una partícula de visualización directa 293 como componente de indicador 290. La partícula puede ser metálica (por ejemplo, oro), cerámica, vidrio coloreado, u otro material opaco o en gran medida opaco y tiene convenientemente al menos 250 nanómetros, y más preferentemente al menos 500 nanómetros, de manera que es visible mediante microscopía óptica. El polímero iónico 282 puede comprender los mismos materiales que el polímero iónico 282 de la FIG. 7B.

La FIG. 7D es un diagrama esquemático de una marca electroforética que comprende un polímero iónico 282 conjuntamente con un polímero de unión no específica baja 284 como componente electrostático 280 y una partícula de dispersión de la luz 294 como componente de indicador 290 de la FIG. 6. El polímero iónico 282 es similar al mostrado en la FIG. 7B. Si este polímero 282 presenta unión no específica alta, puede recubrirse con un segundo polímero 284, tal como una forma de polietilenglicol o poli(acrilamida), que presentan unión no específica muy alta. Este recubrimiento implicará en general el enlace covalente entre el polímero iónico 282 y el polímero de unión no específica baja 284.

La partícula de dispersión de la luz 294 puede comprender varios materiales que dispersan la luz, que incluyen metales, cerámicas y vidrio. El tamaño de estas partículas es preferentemente más pequeño que 500 nm, e incluso más preferentemente más pequeño que 200 nm, e incluso más preferentemente más pequeño que 50 nm. Un ejemplo de una partícula de dispersión de la luz 294 tal es las partículas de dispersión de la luz por resonancia por Genicon (San Diego, California).

La FIG. 7E es un diagrama esquemático de una marca electroforética que comprende una molécula de ADN bicatenaria 285 como componente electrostático 280 y un punto cuántico 295 como componente de indicador 290. En este caso, el componente electrostático 280 es una molécula de ADN lineal, en vez de una ramificada o reticulada. El componente de indicador 290 y el componente de unión 272 están conectados en cualquier extremo de la molécula de ADN 285. La estructura puede ensamblarse uniendo el componente de unión 272 en un extremo de la molécula de ADN monocatenaria, y entonces uniendo el componente de indicador 290 a una molécula de ADN monocatenaria complementaria. Como las dos moléculas de ADN monocatenarias complementarias se hibridan entre sí, se genera la estructura deseada. Debe observarse que la molécula bicatenaria 285 puede sustituirse con una molécula de ADN monocatenaria o con un polímero poliiónico lineal.

Los puntos cuánticos 295 funcionan de la misma forma que los colorantes fluorescentes, pero con un desplazamiento considerablemente mayor entre las frecuencias de excitación y de admisión. Este gran desplazamiento permite el uso de filtros ópticos de eficiencia más alta que reducen la cantidad de ruido de fondo en un ensayo de detección. Un ejemplo de puntos cuánticos 295 es los nanocristales producidos por Quantum Dot Corp. (Hayward, California).

La FIG. 7F es un diagrama esquemático de una marca electroforética 270 que comprende un componente de conector 274 que une molécula de ADN bicatenaria 285 como componente electrostático 280 y un punto cuántico 295 como componente de indicador 290. El componente de conector 274 comprende sitios de unión para tres componentes: el componente de unión 272, el componente de indicador 290 y el componente electrostático 280. El componente de conector 274 generalmente tendrá tres grupos de unión diferentes que permiten la unión selectiva de cada grupo por los tres componentes por separado. Un ejemplo de un conector 274 tal incluye el aminoácido cisteína, que tiene componentes de carboxilo, amino y tiol de reactividades separables para la síntesis, o serina, que tiene componentes de carboxilo, amino e hidroxilo. Hay varios grupos funcionales que pueden usarse en el conector con el fin de permitir que interaccione con los componentes 272, 290 y 280. Estos grupos funcionales pueden comprender, por ejemplo, tioles, arilazidas, alcoholes, aminas, epoxis, n-hidroxi-succinimida, biotina, avidina, u otros grupos químicamente activos o grupos con altas afinidades (por ejemplo, avidina y biotina).

Debe entenderse que en la discusión anterior de una marca electroforética 270, el componente electrostático 280 y el componente de indicador 290 de los diferentes ejemplos pueden combinarse por separado para crear marcas de

beneficio útil. Se entiende además que los componentes electrostáticos 280 y los componentes de indicador 290 tratados no son exhaustivos, y cualquier componente químico o físico que proporcione función similar está dentro de la presente invención. Por ejemplo, el componente de indicador 290 puede comprender muchos materiales, tales como (y que incluyen los modos de detección tratados anteriormente) indicadores de enzima, indicadores quimioluminiscentes, indicadores electroquímicos (por ejemplo, redox), indicadores radiactivos, y otros tipos que se usan en ensayos de micromatrices, ELISA, y otros ensayos bioquímicos y químicos, fósforos de conversión ascendente, fluoróforos, puntos cuánticos, partículas de dispersión de la luz, partículas absorbentes de luz (por ejemplo, partículas coloreadas), o partículas de contraste de fase (es decir, para conferir diferencias del índice de refracción que pueden visualizarse en un microscopio de contraste de fase o por resonancia de plasmones superficiales).

Muchos de estos indicadores pueden usarse con medio de detección óptica que se hace corresponder con el del indicador. Así, para fluoróforos, puntos cuánticos y fósforos de conversión ascendente, se utiliza iluminación con excitación por pares (por ejemplo, iluminadores de excitación láser o de amplio espectro con filtros paso banda) y detectores específicos de emisión (por ejemplo, con filtro paso banda), junto con generadores de imágenes apropiados (por ejemplo, cámaras con o sin óptica de aumento). Las partículas de dispersión de la luz frecuentemente usarán iluminación incidente oblicua (incluyendo condensadores de campo oscuro estándar) o iluminación evanescente, o alternativamente pueden usar óptica de contraste de fases, ya que las partículas con suficiente diferencia en el índice de refracción que dan lugar a efectos ópticos de fases también darán lugar a dispersión de la luz. Además, las partículas de contraste de fases también serán generalmente visibles en la resonancia de plasmones superficiales. Puede usarse microscopía de fases para las partículas de contraste de fases, y pueden usarse partículas absorbentes de luz y reacciones enzimáticas en tanto la microscopía de contraste de fases como la obtención de imágenes de campo brillante (por ejemplo, con obtención de imágenes microscópicas u otras formas de magnificación). Puede detectarse quimioluminiscencia con aumento apropiado y detectores dispuestos para tener la receptividad apropiada para la señal quimioluminiscente. Las descripciones anteriores no son exhaustivas, y se desvela en el presente documento que hay otras combinaciones de indicador y detector.

Debe también observarse que es preferible que haya solo un único componente de unión 272 para cada marca electroforética 270 de manera que cada diana 114 se asocie a solo una única marca electroforética 270. Esto pueden ser manipulado asociando dianas 114 con un gran exceso numérico de marcas electroforéticas 270 de forma que, en promedio, la mayoría de las marcas electroforéticas 270 estén asociadas a diana, y que la mayoría de las dianas marcadas 275 tengan solo una única diana 114.

La cantidad de carga en la marca electroforética 270 debe ser generalmente comparable o superior a la carga en las dianas 114. Para proteínas como se describe en el presente documento, la carga puede no ser grande, aquellos ácidos nucleicos como se describe en el presente documento tienen en general aproximadamente una carga por nucleótido, y el tamaño de las dianas puede ser de cientos a miles de nucleótidos (en un número pequeño de casos decenas de cientos de nucleótidos o más). Aunque las bacterias y otros organismos diana pueden tener una gran carga, generalmente también hay varios sitios para que la marca 270 se una, y así la suma de muchas marcas 270 superará frecuentemente la carga en la superficie del organismo. En general, es preferible que la marca electroforética tenga una carga neta absoluta promedio superior a 1000, e incluso más preferentemente superior a 5000, y lo más preferentemente superior a 20000.

Debe además entenderse que en la mayoría de las aplicaciones de la presente invención, el uso de una marca electroforética 270 no es un requisito. Es decir, la mayoría de las dianas 114 comprenden intrínsecamente una carga electrostática que permite el movimiento de la diana 114 en campos electrostáticos o electroforéticos, y para el que las dianas 114 las marcas no requieren un componente electrostático. En algunas realizaciones de la presente invención, donde el término marca electroforética 270 se usa en esta descripción, puede usarse una marca no electroforética conjuntamente con la carga electrostática que existe de forma natural en la diana 114. Además, la carga de estas moléculas puede ajustarse frecuentemente por pH, y puede ser conveniente ajustar el pH al que se produce la electroforesis para alterar la carga electrostática en la diana 114.

Formatos de ensayo competitivo

Los formatos de ensayo descritos anteriormente se relacionaron principalmente con los formatos de ensayo de sándwich. Sin embargo, en el caso de dianas 114 muy pequeñas, tales como hormonas o fármacos de drogadicción como se describe en el presente documento, es difícil encontrar reactivos que permitan la unión de alta afinidad simultánea de tanto una sonda 116 como un componente de unión a marca 272. Sin dos de tales reactivos de unión, el ensayo de sándwich se realiza con dificultad.

Una alternativa es un ensayo competitivo, en el que una sonda de unión específica 116 para la diana 114 se inmoviliza, como antes, sobre el sustrato. Lo que se añade al analito que contiene la diana 114 es un competidor, que se une a la sonda 116 con afinidad similar a la de la diana 114, y a la que se une covalentemente un indicador 290. En ausencia de diana 114 en el analito, una cantidad dada del competidor se unirá a la sonda 116. Sin embargo, si el analito contiene la diana 114, la unión del competidor se reducirá. Así, en el ensayo de competidor, la diana 114 no se detecta directamente, sino que su abundancia se demuestra por la unión reducida del competidor.

El formato de ensayo competitivo se usa ventajosamente en la presente invención, dados los requisitos para la unión congruente y reproducible, que mejora mediante la aceleración de la reacción de la presente invención. Además, debido a que la presente invención usa reacciones relativamente cortas, además de lavado rápido, pueden usarse sondas de afinidad relativamente baja 116 que de otro modo conducirían a una pérdida de señal con métodos de lavado y detección convencionales. Obsérvese que esta última ventaja se corresponde no solo a formatos de ensayo competitivo, sino también a formatos de ensayo de sándwich.

Unión de sondas

Como se ha mencionado anteriormente, la sonda 116 está unida al sustrato 120 a través de un conector 118. Este conector 118 comprende convenientemente un recubrimiento con grupos funcionales, en el que los grupos funcionales permiten la unión de las sondas 116. Por tanto, el recubrimiento tiene preferentemente unión no específica baja, de manera que la diana 114 o indicador 290 en solución que no es específico para la sonda 116 no se une a la superficie. Ejemplos de tal material de recubrimiento incluye Codelink por Amersham y OptiChem por Accelr8, que comprenden recubrimientos de tipo hidrogel con tanto ruido de fondo no específico muy bajo, además de propiedades eléctricas. Alternativamente, el recubrimiento puede comprender un silano derivatizado.

Otros componentes

Hay varios otros componentes que comprenden los sistemas de competición según la presente invención, que incluyen controladores de potencia para establecer las diferencias de potencial entre los electrodos que se producirán y controlar la fuerza electroforética en las dianas 114, iluminadores para iluminar los indicadores 290, detectores para detectar las señales generadas por la iluminación de los indicadores 290, y controladores de almacenamiento (por ejemplo, controladores y controladores de disco duro) que guardan la información de los detectores y entonces la presentan al usuario o comparan la información de múltiples fuentes o tiempos. Algunos de estos componentes son muy conocidos en la técnica, tales como fuentes de alimentación para electroforesis (que pueden ser controladas por ordenador y que pueden ser establecidas para proporcionar tanto voltaje constante como corriente constante, y que pueden ser complementadas con circuitería electrónica digital o analógica para proporcionar formas de onda de frecuencia de baja a alta como se describe en cualquier parte en esta memoria descriptiva y que también puede usarse para dielectroforesis), iluminadores (por ejemplo, láseres, lámparas de arco, lámparas incandescentes, condensadores de luz de microscopio, y que pueden implicar métodos de acoplamiento de la luz en guías de onda de luz), indicadores (como se ha descrito anteriormente y más adelante), detectores (cámaras, lentes, conjuntos de filtros, software de análisis de imágenes), y similares, incluso si su disposición y uso es novedoso y para el efecto novedoso en la presente invención. Donde los componentes se diferencian de la técnica anterior, se tratarán tanto anteriormente como a continuación.

Descripción funcional de la presente invención

Puede considerarse que la presente invención comprende tres etapas como se muestran en la FIG. 8, un diagrama de flujo de bloques esquemático de las etapas de la presente invención.

En una primera etapa 300, se prepara la muestra que comprende la diana 114 para su uso en el ensayo. El método de preparación depende del tipo de material que se ensaye. Como se describe en el presente documento, puede incluir la maceración de tejido sólido, o alternativamente la lisis de células si el material que va a ensayarse es de origen intracelular. Puede eliminarse material sólido de la preparación por centrifugación, filtración u otros medios. Como se describe en el presente documento, si el ácido nucleico es la diana 114, el ácido nucleico puede purificarse del resto de los almidones, lípidos y proteínas de la preparación (de hecho, sea cual sea la naturaleza de la diana 114, puede ser conveniente eliminar componentes que pueden interferir con etapas posteriores del análisis). Si el material es ácido nucleico, puede amplificarse por medios tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o amplificación por círculo rodante u otros métodos de amplificación. Generalmente, el material debe mantenerse en una condición que preserve la reactividad de la diana 114 con la sonda 116, además de la reactividad de la marca electroforética 270 con la sonda 116. En general, se usará la mínima cantidad de preparación que permita tanto alta señal como bajo ruido de fondo, debido al coste, tiempo y artefactos que son generalmente introducidos mediante la preparación.

En esta etapa de preparación, la marca electroforética 270 puede hacerse reaccionar con la diana 114 con el fin de generar una diana marcada 275 como se describe en la FIG. 6. Alternativamente, esta reacción puede producirse después en el proceso como se describe más adelante.

En una segunda etapa 310, se hacen reaccionar la diana marcada 275 y la sonda 116. En el caso de ácidos nucleicos como se describe en el presente documento, esto puede comprender una etapa de hibridación. En el caso de proteínas diana 114 como se describe en el presente documento, esto puede comprender una reacción anticuerpo-hapteno, una reacción proteína-aptámero, o una reacción proteína-proteína.

Es una enseñanza de la presente invención acelerar la reacción entre la diana marcada 275 y la sonda 116. Si la reacción está incompleta, la cantidad de diana 114 unida a la sonda 116 será inferior a la óptima. Adicionalmente,

debido a que las tasas de reacción para diferentes dianas con respecto a diferentes sondas 116 son generalmente diferentes, y debido a que las cantidades de diana unidas a la sonda no serán lineales con el tiempo, es difícil cuantificar la cantidad de diana 114 unida a la sonda 116 sin que la reacción se haya completado.

- 5 El medio de aceleración de la reacción implica el movimiento de la diana marcada 275 bajo la influencia de una fuerza externamente aplicada, que puede ser convenientemente una fuerza electroforética, dielectroforética o magnetostática. Para esta descripción, se usarán fuerzas electroforéticas como un ejemplo. Esta fuerza puede aplicarse ya sea por la colocación de un electrodo 200 bajo las posiciones de la sonda 116, como a través de la influencia de los electrodos 210 y 220 que están colocadas a los lados de las localizaciones de sondas 170, de un modo que va a describirse más adelante.

10 En la tercera etapa 320, se separa la diana marcada sin reaccionar 275 de la sonda 116 y se detecta la diana marcada 275 que queda unida a la sonda 116. Y, lo que es más importante, se establecen condiciones de forma que no se elimine la diana marcada 275 que ha reaccionado apropiadamente con la sonda 116, y que se elimine otra diana marcada 275 que no se ha unido específicamente a la sonda 116 o al sustrato 120. Debe apreciarse que con múltiples pares de diana marcada 275 y sonda 116, la fuerza de unión será diferente en el caso de cada par. Con el fin de discriminar material específico de no específicamente unido, se usará óptimamente una fuerza de discriminación diferente para cada sonda 116. Esta metodología se explica brevemente en la FIG. 9, un gráfico de las cantidades de material unido frente a la energía de unión. La línea 340 representa la cantidad de material no específicamente unido, y se caracteriza por una cantidad muy grande de material que está unido de forma suelta, una cantidad variable de material unido con la energía intermedia, y alguna cantidad de material que está fuertemente unido. Debe observarse que la forma de esta curva será diferente dependiendo de los materiales que se ensayan, y que los argumentos hechos más adelante no son dependientes de la forma particular de la curva.

25 Se muestran dos dianas en la figura: la diana X se representa por la línea 344 y la diana Y se representa por la línea 346. La diana X tiene una energía de unión más baja con su sonda 116 correspondiente que la diana Y. En un ensayo convencional en el que se usa un único lavado de discriminación para todos los pares diana-sonda, la energía de discriminación debe elegirse de forma que sea inferior a la energía de unión de la diana menos fuertemente unida. Esta energía de unión se representa por la línea discontinua 342. Puede observarse, sin embargo, que el usar una única energía de discriminación produce un ruido de fondo representado por el total de toda la unión no específica 340 a la derecha de la línea 342. En la localización de la diana Y, por ejemplo, estará presente material no específicamente unido significativo con energía de unión tanto inferior como superior a la de la diana Y específicamente unida.

35 En la presente invención, se usarán lavados correspondientes a varias energías de unión. Estas energías de unión se representan por líneas discontinuas 350 en las fuerzas representadas por las líneas A, B, C, D y E, que se aplican sucesivamente. Por ejemplo, se aplica un primer "lavado" a la energía de discriminación A, y se detecta prácticamente todo el material marcado unido en la localización de sonda X. Entonces, se aplica lavado a la energía de discriminación B, y el material unido en la localización de sonda X es nuevamente determinado. La diferencia entre el material en el lavado A y el lavado B se considera que es el material específicamente unido correspondiente a la diana X. Después de lavados posteriores a las fuerzas de discriminación C, D y E, se considera que la cantidad de diana Y es el material presente en el lavado D y no presente en el lavado E en la localización de sonda Y. Así, se utiliza la energía de discriminación apropiada para cada par diana-sonda usando un par de agrupación de lavados de discriminación. En cada caso, el ruido de fondo no específico es solo aquella parte de la línea 340 que se encuentra entre el par de lavados de discriminación específicos para esa localización de sonda.

50 Debe observarse que la fuerza de rotura depende de la fuerza aplicada y la tasa de fuerza aplicada. Por ejemplo, en condiciones de no equilibrio, la tasa de fuerza aplicada por unidad de tiempo cambia en realidad la anchura del posible panorama energético aumentando eficazmente la energía integrada (fuerza a través aplicada a través de una distancia) requerida para romper la interacción. Otra forma de establecer esto es que la rápida separación no deja tiempo para el proceso de no unión relativamente más lento, de manera que se requiere una gran fuerza para destrozarse las moléculas y que el panorama energético o la barrera sea significativamente más alto a tasas de fuerza de carga rápida con respecto a de carga más baja. Así, dependiendo de la tasa de carga de fuerza, habrá múltiples fuerzas de rotura críticas. Además, la forma de la tasa de carga frente a la fuerza de rotura crítica es diferente para cada interacción receptor-ligando, ya que las interacciones intermoleculares son diferentes. Así, pueden resolverse múltiples interacciones anticuerpo-antígeno y no unión específica con el análisis de fuerzas dinámicas - es decir, observando la fuerza de rotura representada frente a la tasa de carga, pueden separarse las curvas de energía de unión de solapamiento dependiendo de la tasa de carga. Por tanto, es muy importante controlar la forma de la curva de voltaje aplicado.

60 Debe observarse que la etapa de reacción 310 y la etapa de lavado y de detección 320 pueden realizarse cíclicamente múltiples veces. Es decir, después de que la etapa de lavado y de detección 320 haya eliminado toda la diana 114 de la sonda 116 (o la marca 270 de la diana 114), puede tener lugar otro ciclo de reacción y lavado/detección. Esto tiene dos ventajas primarias. En primer lugar, si hay un pequeño número de dianas 114 en el analito, el número de eventos de unión detectado será pequeño. Repitiendo la reacción y las etapas de lavado/detección, puede contarse un mayor número de eventos de unión, que mejora la estadística de los

resultados.

Además, pueden utilizarse diferentes dinámicas de voltaje (por ejemplo, perfiles de rampa de voltaje) en cada ciclo de las dos etapas 310 y 320, con el fin de distinguir eventos de unión específica de no específica que podrían distinguirse solo por respuestas diferentes a la dinámica de voltaje. Por ejemplo, en un primer ciclo, la dinámica de voltaje puede implicar una función de etapa en la que los voltajes cambian rápidamente, mientras que en un segundo ciclo, la dinámica de voltaje puede implicar un aumento en rampa lento en el voltaje.

Debe observarse que con el fin de usar los métodos anteriores, debe estar disponible un medio de detección en tiempo real de la diana marcada 275 a la sonda. Es decir, si cada lavado fuera una durar una cantidad considerable de tiempo y requiriera muchas manipulaciones, solo podría usarse un pequeño número de lavados de discriminación diferentes. Con un método de detección en tiempo real, sin embargo, puede implementarse un gran número de lavados de discriminación, consiguiendo mejor definición del material unido específico frente a no específico.

Debe indicarse además que en la siguiente discusión puede usarse el uso de fuerzas electroforéticas en tanto acelerar la reacción, además de en proporcionar discriminación entre material específica y no específicamente unido. Debe entenderse, sin embargo, que en una aplicación dada, pueden usarse ambos usos de las fuerzas electroforéticas que actúan sobre complejos diana-sonda, o alternativamente, solo el uno o el otro de estos usos de fuerzas electroforéticas para el efecto beneficioso.

El número de lavados de discriminación usados para un ensayo dado puede depender de los pares diana-sonda específicos usados, pero en la mayoría de los casos, el número de lavados es preferentemente inferior a dos veces el número total de dianas 114 que se detectan (con dos etapas cada una para "agrupar" una diana particular 114). También es conveniente para espaciar las energías de discriminación que no estén uniformemente espaciadas, sino que se ajusten para agrupar individuos o grupos de energías de unión de diana-sonda. En una realización, el lavado puede realizarse como un gradiente continuo de rigurosidad, que puede ser de rigurosidad lineal frente al tiempo, o no lineal, realizándose la detección de la diana 114 a intervalos en los que el número de detecciones es preferentemente inferior a dos veces el número total de dianas 114 que se detectan.

Debido a la constante de disociación natural para cada uno de los pares diana-sonda, que se refiere a una disociación estocástica que es frecuentemente térmicamente conducida, es conveniente elegir condiciones para los lavados de discriminación en los que este componente estadístico de la disociación esté lo más atenuado posible. Estas condiciones implicarán, en el caso de ácidos nucleicos como se describe en el presente documento, por ejemplo, pH moderados, temperaturas bajas y concentraciones más altas de sales. Estas condiciones para las proteínas como se describe en el presente documento podrían incluir también fuerza iónica, gradientes de pH, hidrofobia y polaridad del disolvente.

Debe observarse que aunque la presente invención enseña el uso de posibilidades electroforéticas de discriminar lavados, una realización de la presente invención se refiere más generalmente a la detección en tiempo real de regímenes de lavado variables, en los que los regímenes de lavado pueden comprender varias condiciones físicas y químicas diferentes más allá de la fuerza electroforética. Estas fuerzas pueden comprender aumentar la temperatura, intensidad de campo magnético (si la diana marcada debe comprender una partícula paramagnética), dielectroforesis (para partículas, bacterias y otras dianas y dianas marcadas), flujo de fluidos de cizallamiento, fuerza iónica (tanto creciente como decreciente), pH (tanto creciente como decreciente), concentración de tensioactivo (tanto iónico como no iónico), o concentración de competidor (por ejemplo, si la diana 114 es una proteína, añadir cantidades crecientes de esa proteína de manera que cuando la diana unida 114 sea liberada, el competidor se unirá preferentemente a la sonda debido a su alta concentración). Además, puede aplicarse más de una de estas condiciones ya sea simultáneamente o en secuencia. Aunque generalmente es preferible que estas condiciones se apliquen con rigurosidad gradualmente creciente, en una realización, la rigurosidad puede aumentarse en una función de etapa, con aumentos discretos rápidos en la rigurosidad. Monitorizando la unión de la diana 114 a la sonda 116 a diversas rigurosidades elevadas de cualquiera de estas condiciones puede mejorarse la discriminación de unión específica de no específica.

Función que implica electrodos que no están debajo de localizaciones de sondas

La FIG. 10 es un diagrama de flujo de bloques esquemático de un sistema que implica electrodos que no están debajo de localizaciones de sondas como se describe en el presente documento. En una etapa 360, se añade una diana negativamente cargada 114 a una celda de reacción similar a la mostrada en la FIG. 4B. Para los fines de esta discusión, se considerará que la diana 114 es un ácido nucleico, y se considerará que la sonda 116 es una secuencia de ácidos nucleicos complementaria, aunque en la práctica, la sonda 116 también podría comprender proteínas, glucoproteínas, almidones, u otras moléculas de interés. En una etapa 362, el electrodo A será positivamente polarizado con respecto a los electrodos B, P, Q y R, atrayendo la diana negativamente cargada 114 a ese electrodo, sobre el que se recogerá. En una etapa 364, el electrodo B está positivamente polarizado con respecto a los electrodos A, P, Q y R, de manera que la diana 114 es atraída al electrodo B, tránsito durante el cual se pone en estrecha proximidad con las sondas 116 en las localizaciones 170 en la matriz 180, para facilitar que tenga lugar la reacción entre la diana 114 y la sonda 116. La polarización negativa en los electrodos P, Q y R

mantiene los vectores de campo eléctrico con componentes que apuntan hacia abajo durante el movimiento de la diana 114 de manera que la diana mantiene la estrecha proximidad con las sondas 116. Una vez más, debe observarse que la localización y los voltajes relativos en los electrodos superiores P, Q y R pueden ajustarse a la forma de los vectores de campo eléctrico en la célula. La magnitud de los vectores de campo eléctrico hacia arriba y lateral de las posiciones 170 debe ser más baja que la fuerza de unión que une las dianas 114 específicamente unidas a sus sondas 116 correspondientes.

En una etapa 366 opcional, puede eliminarse material no específicamente unido débilmente adherido de la matriz 180 poniendo una pequeña polarización positiva neta en los electrodos P, Q y R, que saca el material de la matriz 180. En una etapa 370, se añade un indicador de eventos, por ejemplo una marca electroforética 270, a la célula. Debido a la alta concentración de la marca electroforética 270, la reacción con la diana 114 se produce rápidamente. Además, la reacción de la marca electroforética 270 con la diana 114 puede ser acelerada por medios electroforéticos. En una etapa 372, el electrodo A está positivamente polarizado con respecto a los electrodos B, P, Q y R, transportando la marca electroforética 270 al electrodo A. En una etapa 374 posterior, el electrodo B se coloca positivamente polarizado con respecto a los electrodos A, P, Q y R, moviendo la marca electroforética 270 del electrodo A al electrodo B, con vectores de campo eléctrico que apuntan generalmente hacia abajo, de manera que las marcas electroforéticas 270 estén en estrecha proximidad a las dianas 114, con las que reaccionan. En una etapa 376, la polarización positiva del electrodo B aumenta de una forma generalmente escalonada a medida que se monitoriza la cantidad de material unido en las localizaciones de sondas 170 con el fin de determinar el material que se une específicamente y de discriminarlo del material que no está específicamente unido. Debe apreciarse que el indicador de eventos puede ser una marca sin propiedades electroforéticas particulares, si la diana 114 debe ella misma estar cargada. Además, puede no haber indicador de eventos en caso de que la propia diana 114 tenga propiedades de fluorescencia, absorción de luz, diferencia del índice con el medio, u otras propiedades de forma que sea detectable, convirtiendo la etapa 370 en opcional.

Debe también observarse que las dianas 114 pueden prepararse para moverse hacia adelante y hacia atrás múltiples veces entre los electrodos 210 y 220, aumentando en cada caso la cantidad de diana 114 que se une a las sondas.

Función que implica electrodos que están debajo de localizaciones de sondas

La FIG. 11A es un diagrama de flujo de bloques esquemático de la operación de una célula que implica electrodos que están debajo de localizaciones de sondas, y puede ser mejor entendida en relación con la FIG. 4A. En la etapa 360, se añade una diana negativamente cargada a la célula. En una etapa 382, el electrodo D está positivamente polarizado con respecto al electrodo C, causando que la diana migre sobre el electrodo donde está en estrecha proximidad con la sonda 116 dispuesta sobre localizaciones de matriz 170 sobre la matriz 180. Debido a la estrecha proximidad, la reacción entre la diana 114 y la sonda 116 se produce muy rápidamente. En una etapa 370, se añade un indicador de eventos, por ejemplo una marca electroforética 270, a la célula. En una etapa 386, el electrodo D está nuevamente positivamente polarizado con respecto al electrodo C. Bajo la influencia del campo eléctrico, la marca electroforética 270 migra al electrodo C en el que reacciona con la diana 114. En una etapa 388, el electrodo C se establece a un polarizado positivo con respecto al electrodo D. El polarizado positivos de los electrodos de C aumenta de un modo generalmente escalonado a medida que se monitoriza la cantidad de material unido en las localizaciones de sondas 170 con el fin de determinar el material que está específicamente unido y de discriminarlo del material que no está específicamente unido.

Debe apreciarse que la etapa 370 y la etapa 386 pueden eliminarse añadiendo la marca electroforética 270 a la diana 114 antes de añadir la diana 114 a la célula en la etapa 360. En este caso, la diana 114 se convierte en una diana marcada 275 antes de la aplicación de una polarización positiva en el electrodo C en la etapa 382. La creación de la diana marcada 275 puede producirse dentro de la celda como se muestra en la FIG. 11B, un diagrama de flujo esquemático de la operación de una celda que implica electrodos bajo las localizaciones de sondas usando una diana marcada 275. En la etapa 360, la diana negativamente cargada se añade a la célula, y en la etapa 370, se añade adicionalmente marca electroforética 270 a la célula. En este momento, se genera una diana marcada 275. En la etapa 382, el electrodo D está positivamente polarizado con respecto al electrodo C y la diana marcada 275 se mueve en estrecha proximidad con las sondas 116 en las localizaciones de dianas 170, donde se produce la reacción con las sondas 116. En la etapa 388, se realiza la discriminación de material específicamente unido frente a no específicamente unido como antes.

La monitorización de la unión de la diana 114 que se produce en la etapa 388 puede realizarse para un promedio de todo el material que se une - por ejemplo, midiendo la salida total de luz que es dispersada de una marca que tiene un indicador de dispersión de la luz. Sin embargo, en aquellas realizaciones donde el detector es un detector óptico, y el detector es un detector de obtención de imágenes tal como una cámara o un escáner de láser acoplado a un tubo fotomultiplicador, la unión puede determinarse para dianas 114 individuales (es decir, microorganismos). En este caso, el detector necesitará guardar las localizaciones de cada diana 114 entre detecciones secuenciales, y entonces puede determinarse la intensidad de la unión de cada diana 114 a cada sonda 116.

Uso de fuerzas magnetostáticas

Debe observarse en las discusiones anteriores que en ciertos casos las fuerzas electrostáticas pueden sustituirse por fuerzas magnetostáticas. Para el uso de fuerzas magnetostáticas, sin embargo, las dianas 114 deben ser marcadas con partículas paramagnéticas, dado que en general las moléculas biológicas u organismos que van a detectarse no son en sí magnéticos. Ejemplos de tales partículas incluyen partículas Estapor de Bangs Laboratories (Fishers, IN) y Dynabeads de Dynal, Inc. (Noruega). Así, las partículas 293 y 295 de las FIG. 7C, E y F serían sustituidas con partículas paramagnéticas, que son preferentemente inferiores a 1 micrómetro de diámetro, y más preferentemente inferiores a 250 nm de diámetro, y lo más preferentemente inferiores a 100 nm de diámetro; en general, cuando más pequeña sea la partícula, menos interfiere con la difusión de la diana 114 hacia la sonda 116, y más rápida es la reacción cinética. En lugar de electrodos, la colocación de imanes permanentes o electroimanes ya sea por encima o por debajo de la sonda 116 (en relación con el sustrato 120) proporciona la fuerza que mueve las dianas magnéticamente marcadas 114 hacia o lejos de la sonda 116. La magnitud de esta fuerza puede ajustarse ya sea cambiando la distancia de la fuente de campo magnético de la sonda 116 o la colocación de compensadores de diferente permeabilidad magnética, o en el caso de un electroimán, ajustando la corriente a través de las bobinas, la distribución física de las bobinas, la presencia de material magnéticamente permeable en o alrededor de las bobinas, y otros medios tal como se conocen en la técnica.

Detección en tiempo real

Como se ha descrito anteriormente, el uso de múltiples lavados de diferente discriminación, además de la monitorización de la unión de la diana a la sonda, requieren el uso de monitorización en tiempo real. Esto debe distinguirse de la situación convencional común en la que después de que la reacción haya avanzado durante un periodo de tiempo predeterminado, la reacción está completa, se realizan los lavados, y entonces se preparan los sustratos en los que la reacción se realizó para la detección. En muchas de las realizaciones preferidas de la presente invención, se emplea un medio óptico de detección. En realizaciones de la presente invención, los electrodos están opuestos entre sí (por ejemplo, paralelos y opuestos) y, con el fin de que la detección óptica tenga lugar, uno o ambos de los electrodos es preferentemente ópticamente transparente, con el fin de que un dispositivo óptico externo reciba la señal óptica que se genera entre los dos electrodos.

Con referencia a la FIG. 4B como se describe en el presente documento, esto se adapta fácilmente, en el que el sustrato sobre el que se coloca la matriz 180 puede ser transparente. Sin embargo, puede ser preferible para el detector en ese caso que se coloque por encima de los electrodos 195P, Q y R, o alternativamente en el caso de una disposición tal como la FIG. 4A, el detector generalmente será externo a los electrodos 190 y 200. En tales casos, se prefiere el uso de electrodos ópticamente transparentes, para los que el material preferido para estos electrodos es el óxido de indio y estaño (ITO). Debido a que el ITO no es generalmente estable a voltajes superiores a 2 V, esto significa que el potencial entre los electrodos en el caso de ITO debe ser preferentemente mantenido por debajo de este potencial, como se describirá más abajo en más detalle.

A continuación se proporcionará una discusión más general de la detección.

Control de la aceleración de reacción

Puede mejorarse la aceleración de reacción según los métodos anteriores variando los campos eléctricos tanto espacialmente como temporalmente de manera que mejore la reacción de la sonda 116 con la diana 114. La FIG. 12A es un diagrama esquemático de tres electrodos dispuestos en dos ejes perpendiculares dentro de una celda de reacción. El electrodo E1 y el electrodo E2 son representativos de los electrodos 195, mientras que el electrodo E4 es representativo de un electrodo 200. Es decir, la matriz 180 se coloca encima del electrodo E4. El potencial de voltaje entre los diferentes electrodos se variará de tal forma que mejoren las velocidades de reacción como se describe a continuación. En la discusión a continuación, el uso de los términos diana 114 y diana marcada 275 se usa aproximadamente indistintamente.

La FIG. 12B es un gráfico de la diferencia de potencial entre los electrodos E2 y E4 a medida que varía con el tiempo, con el electrodo E4 positivamente polarizado hacia E2. Hay tres periodos de tiempo representados en la gráfica, indicados como los tiempos T1, T2 y T3. En el periodo T1, el potencial de voltaje se mantiene durante un periodo considerable, de forma que la mayoría de la diana 114 se pone en yuxtaposición con la sonda 116. Debido a la diferencia de potencial, tanto la sonda 116 como la diana 114 pueden ser forzados hacia abajo sobre el sustrato 120, en el que el voltaje mantenido limita su capacidad para reaccionar entre sí. Esto se producirá cuando la sonda 116 y la diana 114 sean de la misma polaridad de carga eléctrica, tal como en el caso de hibridación de ácidos nucleicos, aunque en otros pares diana/sonda (por ejemplo, interacciones proteína-proteína), la polaridad de carga puede ser diferente en la diana 114 y la sonda 116. Incluso en tales casos, la diana 114 pueden entonces someterse a electroforesis más allá de la sonda 116, impidiendo la reacción entre la sonda 116 y diana 114. En ambos casos, es conveniente tener un periodo, descritas más adelante, que invierte o relaja los efectos de la electroforesis.

En el periodo T2, el potencial de voltaje puede eliminarse permitiendo el movimiento libre de la diana 114 y la sonda 116, acelerando las tasas de reacción. Sin embargo, durante este periodo T2, se deja que la diana 114 difunda lejos

de la sonda 116. Así, durante el periodo T3, el potencial de voltaje es nuevamente aplicado para mantener la estrecha proximidad de la diana 114 en la sonda 116. Los periodos T2 y T3 pueden ser cíclicamente repetidos, hasta tal momento en el que se reaccionan la mayoría de la diana complementaria 114 y la sonda 116. Pueden variarse las duraciones de los diversos periodos dependiendo de la topología de la celda de reacción, las características de las sondas 116 y dianas 114, además de las diversas cargas electrostáticas en los diferentes componentes, y el modo en el que la sonda 116 está fijada a la superficie 120. En general, para dimensiones verticales y laterales más grandes de la celda, el periodo T1 será más grande para permitir las distancias más grandes sobre las que la diana 114 debe moverse.

La FIG. 12C es un gráfico de la diferencia de potencial entre los electrodos E2 y E4 a medida que varía con el tiempo, dispuestos alternativamente a aquellos en la FIG. 12B. Nuevamente, como en la FIG. 12B, durante el periodo inicial T1, se deja que la diana 114 migre bajo la influencia de la fuerza electroforética a la sonda 116. En este caso, durante un periodo T4, el campo eléctrico se mantiene a un nivel muy bajo para mantener la yuxtaposición de diana 114 a sonda 116, pero con una fuerza más baja que la usada en la FIG. 12B. Esta fuerza más baja se usa con el fin de permitir más movimiento de tanto la diana 114 como la sonda 116 de manera que no estén topológicamente limitados durante la reacción. Durante un periodo opcional T5, el campo eléctrico puede ser invertido muy levemente, para liberar cualquier diana 114 que pueda haber llegado a enredarse sobre la superficie 120. La duración relativa de los periodos T4 y T5 dependerá del número de factores, que incluyen el tipo de superficie al que la sonda 116 está unida, la carga de la marca electroforética 270, la fuerza de unión entre la diana 114 en la sonda 116, el tamaño físico de la marca electroforética 270, y otros factores. Debe también observarse que la duración de los periodos sucesivos T4 o los periodos sucesivos T5 no necesita ser igual y puede cambiar con el tiempo.

La FIG. 12D es un gráfico de diferencias de potencial entre electrodos espacialmente desplazados, de forma que el campo eléctrico cambie no solo en magnitud, sino también en dirección. Con referencia a la FIG. 12A, el electrodo E2 está casi verticalmente desplazado (es decir, directamente opuesto) del electrodo 200 E4, y el electrodo E1 está tanto verticalmente como lateralmente desplazado del electrodo E4. Como puede apreciarse del gráfico, el electrodo E4 está alternativamente polarizado positivamente y negativamente con respecto a los electrodos E1 y E2 verticalmente desplazados. Además, en ciertos casos, la polarización es con respecto a E1 y en otros casos la polarización es con respecto a E2. Esto hace que el campo eléctrico varíe en polaridad, en magnitud y en dirección. Esta variación en la dirección significa que las dianas marcadas 275 que llegar a estar estéricamente atrapadas en la superficie 120 sentirán fuerza en diversas direcciones que pueden facilitar liberarlas de su aprisionamiento.

Esta disposición puede llevarse a cabo con diversas disposiciones topológicas. La FIG. 13A es un diagrama esquemático con tres electrodos 195 desplazados en dos dimensiones sobre un único electrodo 200. Los electrodos E1 y E3 están desplazados en direcciones perpendiculares del electrodo E2 que está verticalmente desplazado del electrodo E4. La FIG. 13B es un gráfico de diferencias de potencial entre los electrodos de la FIG. 13A. El electrodo E4 se mantiene a un potencial positivo aproximadamente constante. Los otros electrodos, sin embargo, pasan en ciclos entre un potencial casi neutro y un potencial negativo, causando que el campo eléctrico pase en ciclos en dirección con magnitud relativamente constante.

Debe observarse que las disposiciones topológicas de los electrodos E1, E2 y E3 variarán con la forma de la celda. Por ejemplo, si la celda está entre un portaobjetos de microscopio y un cubreobjetos, el espesor de la celda puede medirse en cientos de micrómetros, que produciría que un campo eléctrico entre los electrodos E1 y E4 fuera casi horizontal. Si la celda está dentro de un pocillo de microtitulación, la profundidad de la celda será comparable a la de su anchura, de forma que el campo eléctrico entre los electrodos E1 y E4 será más casi vertical.

Electroquímica para mejorar la aceleración electroforética

Puede realizarse la aceleración de la reacción electroforética en un tampón normal, usando la electrólisis del agua o los iones de sal constituyentes (por ejemplo, sodio y cloruro) para participar en las reacciones redox en los electrodos según se requiera para proporcionar la corriente para la electroforesis. Existen varias dificultades asociadas al uso de estos tampones, sin embargo, para ellos los presentes inventores usarán cloruro sódico como ejemplo. En primer lugar, si se usa óxido de indio y estaño (ITO) u otros materiales activos redox en uno o ambos electrodos (por ejemplo, para proporcionar un electrodo conductor ópticamente transparente o translucido), los potenciales redox que impulsan la electroforesis necesitan ser inferiores que aquellos a los que el electrodo participará en reacciones redox. En el caso de tampones con cloruro sódico, por ejemplo, el potencial al que se producen las reacciones redox a altas tasas es mayor que 2 voltios, potencial al que el ITO es inestable.

Además, los productos redox de la electroquímica de cloruro sódico incluyen metal Na que reacciona en agua para formar la base fuerte NaOH, y Cl₂, que reacciona con agua para formar reactivos oxidantes fuertes. Estos reactivos, que son muy activos, pueden ser perjudiciales para las dianas 114 y marcas 270 que se someten a electroforesis hacia los electrodos.

Por tanto, aunque la sal proporciona conductividad para la electroforesis, también compite con el material cargado que se mueve – cuanto mayor sea la conductancia del tampón, más baja es la fuerza electroforética que es

encontrada por el material. Así, es beneficioso limitar la conductancia del tampón. En general, es preferible, por tanto, que la conductividad del tampón sea inferior a 1 mS/cm, e incluso más preferible que el tampón sea inferior a 100 μ S/cm, e incluso más preferible que la conductividad del tampón sea inferior a 10 μ S/cm. En muchos casos, es importante que la fuerza iónica del tampón, sin embargo, se mantenga a un cierto nivel razonable (por ejemplo >10 mM), por ejemplo, para la viabilidad de células o para preservar la reacción de proteínas o ácidos nucleicos (por ejemplo, hibridación), o alternativamente que tenga un tampón para mantener un intervalo de pH. En estos casos, es conveniente usar moléculas de ión bipolar para mantener la fuerza iónica o pH. Específicamente, en el caso en el que se desee la hibridación de ácidos nucleicos como se describe en el presente documento, es conveniente usar tampón histidina (por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N.º 6.051.380).

Elección de aceleradores redox apropiados

Con el fin de reducir estos efectos, es preferible proporcionar agentes redox que no padecen los problemas enumerados anteriormente. Un ejemplo de tales reactivos es el sistema benzoquinona/hidroquinona. En este caso, la hidroquinona se oxida en el ánodo a benzoquinona, y la benzoquinona se reduce en el cátodo a hidroquinona. Debido a que las reacciones son complementarias en los electrodos (es decir, tienen potenciales inversos), el único potencial de celda es debido a diferencias en la concentración en vez de a diferencias en el potencial estándar en los electrodos, y así la reacción redox de electroforesis se produce a potenciales relativamente bajos entre los dos electrodos. Además, debido a que las dos especies no están cargadas, los agentes redox no aumentan significativamente la conductividad de la solución y así no compiten con las moléculas cargadas (por ejemplo, ADN) o material (por ejemplo, bacterias) por el transporte mediante electroforesis.

El esquema redox como se ha descrito anteriormente puede operar ya sea con respecto a un sistema cerrado o uno abierto. La FIG. 14A es un diagrama esquemático de un sistema cerrado para electroforesis. En un sustrato superior 870 está un cátodo 850, y en un sustrato inferior 870 está un ánodo 860. En la región entre los electrodos están dos compuestos: una molécula oxidada (OX1) que según la discusión anterior podría ser benzoquinona, y una molécula reducida (RED1) que según la discusión anterior podría ser hidroquinona. En el cátodo 850, OX1 se reduce a RED1, que luego se mueve o bien por electroforesis o por difusión a la proximidad del ánodo 860. En el ánodo 860, RED1 se oxida entonces a OX1, que luego se mueve o bien por electroforesis o por difusión a la proximidad del cátodo 850, donde puede repetirse el ciclo.

Dependiendo de la cantidad de disponibilidad de portadores de carga (que pueden ser electrolito sin relacionar, RED1 y/o OX1, o moléculas cargadas o materiales que van a transportarse), la fuerza electrofórica, y por tanto la velocidad a la que las moléculas o materiales pueden ser transportados, puede limitarse a la velocidad de difusión de OX1 al cátodo y RED1 al ánodo. Esta velocidad de difusión puede mejorarse significativamente haciendo la distancia entre el cátodo 850 y el ánodo 860 pequeña - es preferible que esta distancia sea inferior a 2000 micrómetros, incluso más preferible que esta distancia sea inferior a 1000 micrómetros, e incluso más preferible que esta distancia sea inferior a 500 micrómetros.

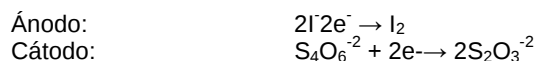
El sistema de la FIG. 14A está cerrado, y así el sistema puede cerrarse del entorno, y la electroforesis puede ser continuada indefinidamente sin reponer los reactivos redox. La FIG. 14B es un diagrama esquemático de un sistema abierto para electroforesis. La disposición de sustratos 870, cátodo 850 y ánodo 860 es la misma que la de la FIG. 14A. Sin embargo, en este caso, hay dos pares de reactivos que no se regeneran entre sí (ya sea directamente como en benzoquinona e hidroquinona, o por extinción mutua de productos redox, como se describe más adelante). En el cátodo 850, una molécula oxidada OX3 se reduce a la molécula red3, mientras que en el ánodo 860, una molécula reducida red2 se oxida a OX2. Los productos RED3 y OX2 no reaccionan entre sí para regenerar los reactantes, y así, tan pronto como se agotan OX3 y RED2, se terminará la electroforesis. Así, en este sistema abierto, con el fin de mantener la electroforesis, los reactantes OX3 y RED2 deben ser continuamente repuestos, que se lleva a cabo generalmente manteniendo un flujo de nuevos reactantes en el tampón de electroforesis en el espacio entre los electrodos. Debe observarse que este flujo también eliminará cualquier diana 114 que vaya a transportarse, a menos que tales dianas 114 sean inmovilizadas de alguna forma al cátodo 850 o ánodo 860 para cuando el tampón sale de la región entre los electrodos 850 y 860.

Hay numerosos pares redox que pueden operar dentro de la presente invención. Como se ha descrito anteriormente, la benzoquinona y la hidroquinona son muy adecuadas para esto, y se usan preferentemente en concentraciones superiores a 1 mM, más preferentemente se usan en concentraciones superiores a 10 mM, y lo más convenientemente se usan en concentraciones superiores a 30 mM. Debe observarse que el uso de benzoquinona e hidroquinona está limitado a un grado por su solubilidad limitada, y así derivados más polares o cargados pueden ser convenientemente usados para aumentar su solubilidad, incluyendo tales derivados la sustitución de los carbonos del anillo no unidos a carbono con halógenos, nitratos, hidroxilos, tioles, carboxilatos, aminas, y otros restos tales. Debe observarse que es óptimo para el sistema que los agentes redox resultantes no estén cargados (excepto como se mostrará más adelante), de manera que su distribución no esté afectada por la electroforesis del sistema, y así se equilibre la sustitución con un grupo positivamente cargado (por ejemplo, una amina) por una segunda sustitución con un grupo negativamente cargado (por ejemplo, un carboxilato), tal como en 2-amino-5-carboxi-para-benzoquinona. En tales casos de benzoquinonas e hidroquinonas derivatizadas, las concentraciones de los reactivos redox pueden ser convenientemente aumentadas.

Otros pares redox similares incluyen pares cetona/alcohol y aldehído/alcohol, cuyo grupo carbonilo de la cetona puede flanquearse por grupos alquilo o arilo, grupos que también puede ser derivatizados con halógeno, nitrato, hidroxilo, tiol, carboxilato, amino y otros grupos para modificar la carga en la molécula o para aumentar su solubilidad. Otro sistema conveniente es el de ditiotreitolo/ditioeritritol y sus formas oxidadas (que pueden formarse por la oxidación parcial de soluciones de las formas reducidas, por ejemplo, por peróxido de hidrógeno), o alternativamente por alcanos con grupos tiol terminales (por ejemplo 1,5-ditiobutano). En general, es preferible que los dos grupos tiol estén en la misma molécula (como en ditiotreitolo) a diferencia de en moléculas separadas (por ejemplo, como en beta-mercaptoetanol), de manera que la reacción de oxidación sea una reacción unimolecular que es relativamente menos sensible a la concentración (aunque los tioles individuales, tales como beta-mercaptoetanol, son agentes reductores aceptables para muchas aplicaciones).

Debe observarse que los pares redox anteriores se oxidan y reducen en pares de electrones de tal manera que la carga en ambos pares redox sea la misma, y es preferentemente neutra. El requisito de que pares de electrones sean transferidos puede, sin embargo, reducir la velocidad de la reacción, y así también puede ser conveniente usar pares en los que un electrón se transfiere en la reacción redox. Ejemplos de tales pares incluyen ferroceno/ferrocenino y sus derivados, y ferrocianuro/ferricianuro. En tales casos, es preferible usar pares en los que el producto reducido está neutramente cargado, y el producto oxidado está positivamente cargado en aquellos casos en los que las moléculas o materiales negativamente cargados se transportarán. El motivo de esto es que el producto oxidado suministra contracarga al transporte de las moléculas transportadas negativamente cargadas, y el producto reducido no está cargado, y así no compite por el transporte con las moléculas transportadas negativamente cargadas.

Otra configuración del sistema es aquella donde los productos de las reacciones redox se extinguen entre sí, tal como a continuación:



Los productos de esta reacción reaccionan espontáneamente entre sí según $2\text{S}_2\text{O}_3^{-2} + \text{I}_2 \rightarrow \text{S}_4\text{O}_6^{-2} + 2\text{I}^{-}$, regenerando el estado de partida. El uso de yoduro u otro haluro es conveniente, ya que el yoduro se mueve a través de la electroforesis hacia el ánodo, y el yodo resultante está neutramente cargado y puede moverse a través de osmosis hacia el otro electrodo donde se encontrará con el tiosulfato para la regeneración del sistema inicial.

En el sistema de bucle abierto sin recirculación, donde los pares redox no se regeneran entre sí durante sus reacciones respectivas, el intervalo de agentes redox es más ancho, y convenientemente incluye compuestos que incluyen glutatión, ascorbato, viológeno de metilo, metosulfato de fenazina, trolox, y otros, que incluyen sus pares redox (tales como GSSG para glutatión y deshidroascorbato para ascorbato, viológeno de metilo oxidado para viológeno de metilo). En este caso, algunas veces es conveniente que la carga de la molécula sea tal que el reactante sea atraído hacia el electrodo en el que participará en reacciones redox (es decir, reactantes que van a oxidarse en el ánodo deben estar negativamente cargados y reactantes que van a reducirse en el cátodo deben estar positivamente cargados). Esto puede generalmente llevarse a cabo derivatizando la molécula con uno o más restos apropiadamente cargados. La principal ventaja de esto es que un agente redox negativamente cargado, mientras que aumenta la velocidad de reacción, también puede competir con las moléculas de transporte negativamente cargadas, de forma que aumentar la cantidad de reactante redox puede incluso reducir el transporte global de las moléculas de transporte. Así, se necesita cuidado a través de la experimentación para garantizar que los reactivos redox negativamente cargados no tengan un efecto perjudicial global.

Debe observarse, sin embargo, que las moléculas pequeñas de un par redox, debido a sus altas tasas de difusión, solo están moderadamente afectadas por la electroforesis, y a lo largo de las cortas distancias que generalmente existen entre el cátodo y ánodo, muestran un gradiente modesto sobre los electrodos (frecuentemente solo 2-3 veces, y generalmente menos de 10 veces). En este caso, puede ser útil tener uno o ambos reactivos redox que sean neutros o positivamente cargados. En el caso en el que ambos agentes estén positivamente cargados, es preferible que el agente que reacciona en el ánodo positivamente cargado esté en concentraciones molares globales más grandes para compensar las concentraciones locales más bajas en el ánodo.

En aquellos casos en los que los microorganismos están siendo transportados en presencia de agentes redox, es importante tener en cuenta que algunos de los agentes redox mencionados anteriormente pueden tener toxicidad para los microorganismos. En realizaciones de la presente invención, se realiza el posterior crecimiento o monitorización de organismos vivos y la toxicidad puede ser un problema significativo. Por este motivo, es útil ya sea usar bajas concentraciones del reactivo redox tóxico (generalmente el agente de oxidación), para limitar la duración a la que el microorganismo se expone al agente, o usar un agente con toxicidad más baja, incluso debe ese agente tener propiedades redox menos deseables. Además, las bacterias que han sido expuestas a un agente redox tóxico pueden tratarse después de la exposición a un agente de compensación. Por ejemplo, si el agente redox tóxico es un agente de oxidación, la adición de un agente reductor tal como beta-mercaptoetanol o ditiotreitolo puede reducir los efectos del agente de oxidación.

Debe observarse que uno de los objetivos del uso de los agentes redox es permitir que se produzca la electroforesis a

un potencial más bajo, tanto para minimizar la producción de productos redox peligrosos (por ejemplo, productos de cloro de cloruro), como además de manera que pueda producirse detección óptica usando electrodos de ITO, que pueden ser peligroso por los altos potenciales. Así, el potencial de celda de los pares redox elegidos para la aplicación es preferentemente inferior a 2 V (el potencial al que el ITO empieza a afectarse), e incluso más preferentemente inferior a 1 V y lo más preferentemente inferior a 500 mV, ya que el intervalo de potenciales entre el potencial más bajo al que se produce la electroforesis (es decir, 500 mV) y el punto final (es decir, 2 V) dará alguna medida de control con respecto a las tasas de electroforesis. Incluso en aquellos casos en los que los potenciales de celda estándar de los agentes redox puedan estar fuera de estos intervalos, el uso de diferentes concentraciones de agente de oxidación y agente reductor puede proporcionar un potencial de celda que permite operación útil.

Pasivación

Los productos redox generados en el ánodo y cátodo pueden ser posiblemente peligrosos para las moléculas y materiales que se transportan a estas superficies. Por ejemplo, muchas de las reacciones redox generan iones H^+ en el ánodo, que produce una reducción local de pH. Esta reducción en el pH, si es lo suficientemente grande, puede afectar la hibridación de ácidos nucleicos, desnaturalizar proteínas, interrumpir las interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, o destruir bacterias. Otros productos redox que son de posible peligro también incluyen bases fuertes, y agentes oxidantes o reductores fuertes. Con el fin de prevenir que estos productos interfieran con las moléculas o materiales que van a detectarse en el ánodo o cátodo, es preferible tener una capa de pasivación sobre el electrodo.

En general, es conveniente que esta capa de pasivación sea de forma que las proteínas y ácidos nucleicos no sean perjudicialmente afectados por las propiedades químicas o físicas de la capa de pasivación directamente y que la capa de pasivación no tenga un efecto significativamente perjudicial sobre las reacciones redox que se producen en el electrodo. Es preferible que la capa de pasivación tenga al menos 2 nanómetros de espesor, y más preferible que la capa de pasivación tenga al menos 5 nanómetros de espesor, y lo más preferible que la capa de pasivación tenga al menos 25 nanómetros de espesor, de manera que se reduzca la interacción de las dianas 114 y sondas 116 con los productos de reacciones redox en los electrodos. Formas convenientes de capas de pasivación incluyen polímeros que comprenden ya sea con poliácridamida (por ejemplo, Codelink por Amersham) o constituyentes de polietilenglicol (por ejemplo, OptiChem por Accel8), modificados con grupos funcionales a los que pueden unirse las sondas para la detección.

Artefactos de falta de homogeneidad

Se ha observado que en condiciones de benzoquinona 10 mM e hidroquinona 10 mM, una separación del electrodo de óxido de indio y estaño (ITO) de 300 micrómetros y un potencial superior a 1,5 voltios e inferior al voltaje de ruptura del ITO, se desarrolla una falta de homogeneidad ya sea con marcadores solubles (por ejemplo, ácido nucleico acoplado a un colorante fluorescente) o insolubles (por ejemplo, esferas de poliestireno). La falta de homogeneidad se demuestra por áreas de concentración y rarefacción, donde las áreas de concentración empiezan como lugares aproximadamente circulares de cientos de micrómetros a través de los que se alargan y condensan en un patrón de celdas, en el que los bordes que las fronteras son áreas de concentración, y las regiones centrales de las celdas son áreas de rarefacción. La FIG. 15 es un esquema en vista desde arriba de una región de aproximadamente 1 cm de diámetro en la que tales células se han formado. En general, esta falta de homogeneidad puede ser un impedimento al uso de transporte acelerado mediante electroforesis.

Hay varios métodos de reducción de esta falta de homogeneidad. En un primer método de reducción, la intensidad de la fuerza electroforética puede reducirse, ya sea disminuyendo el voltaje, o aumentando la conductividad de la solución. Por ejemplo, en una solución de benzoquinona 10 mM e hidroquinona 10 mM y conductividad muy baja (por ejemplo, $<100 \mu S/cm$), las células no aparecen muy fuertemente por debajo de 1,4 voltios. En un segundo método de reducción, pueden intercalarse periodos de fuerza electroforética fuerte con periodos de menor fuerza electroforética o ninguna, en los que la cantidad de menor fuerza electroforética es preferentemente inferior al 50 % de la fuerza máxima, y más preferentemente inferior al 25 % de la fuerza máxima, y es lo más preferentemente inferior al 10 % de la fuerza máxima. En general, el periodo de fuerza electroforética fuerte debe ser inferior a aquél en el que las celdas se forman primero, y tales periodos son preferentemente no superiores a 5 segundos, y más preferentemente no superiores a 2 segundos, y lo más preferentemente no superiores a 1 segundo. Los periodos sin fuerza electroforética son convenientemente considerables suficientes para permitir la difusión de iones a distancias largas en comparación con el tamaño vertical de las celdas (es decir, la distancia entre los electrodos), y son preferentemente superiores a 100 milisegundos, y más preferentemente superiores a 300 milisegundos, y lo más preferentemente superiores a 1 segundo. En un tercer método de reducción, es conveniente permitir que el flujo de líquido rompa las células, tal como mediante el uso de convección de temperatura ayudada por calentamiento desigual de las paredes de la cámara 805, o a través de movimiento de fluido a través de la cámara 805.

Debe observarse que mientras que el ITO u otro material de electro transparente es preferible para la monitorización en tiempo real mediante indicadores visibles, esto no significa que tanto el cátodo como el ánodo necesiten estar comprendidos de ITO. En otros casos, puede ser preferible que uno de los electrodos sea transparente, que permite la observación en la celda de reacción, mientras que el otro electrodo es un electrodo opaco relativamente no

reactivo, tal como oro o un metal refractario, tal como platino, paladio, o iridio que son estables en electroforesis. En estos casos, la resistencia en el electrodo metálico será muy pequeña, que puede reducir los efectos de falta de homogeneidad anteriores, y además, el potencial en el electrodo metálico puede no tener el mismo efecto perjudicial que sobre el electrodo de ITO (por ejemplo, con un electrodo de Pt), permitiendo el potencial más alto que va a usarse en la celda.

Alternativamente, ambos electrodos pueden ser opacos, estando un electrodo recubierto con oro. En este caso, la detección puede hacerse ópticamente mediante resonancia de plasmones superficiales.

10 Combinación de mezcla y aceleración de la reacción electroforética

Dado que el electrodo 200 es pequeño con respecto a las dimensiones laterales de la celda, la aplicación de fuerza hacia el electrodo 200 producirá distribución relativamente uniforme de la diana marcada 275 en el electrodo. Si la localización específica 170 es pequeña con respecto al tamaño del electrodo 200, esto hará que solo una pequeña fracción de la diana marcada 275 se una a la sonda 116. Es, por tanto, ventajoso combinar la etapa de mezcla con o intercalarla con la aplicación de fuerzas hacia el electrodo 200. Esto se representa en la FIG. 16A, un diagrama de bloques esquemático de una reacción que implica tanto fuerzas verticales como fuerzas horizontales para acelerar la reacción de una diana marcada 275 con la sonda 116. Los métodos de proporcionar mezcla, tales como fuerzas horizontales, serán tratados en mayor detalle más adelante, pero puede considerarse que incluyen mezcla física del medio en la celda (por ejemplo, a través del uso de un mecanismo de agitación físico, bombas, flujo electroosmótico, acústica de ondas superficiales, y otros medios), el uso de fuerzas electroforéticas horizontales sobre las dianas 114, el uso de fuerzas magnéticas sobre las dianas 114, y otros medios convenientes. Aquellas fuerzas que comprenden flujo global de la solución (por ejemplo, electrosmosis, agitación, bombas y acústica de ondas superficiales) son particularmente fáciles de implementar. Las fuerzas verticales pueden comprender electroforesis, dielectroforesis, filtración, atracción de campo magnético y otras fuerzas tales que llevarán la diana marcada 275 (o una diana 114 adecuada que no está marcada) en proximidad con la sonda 116.

Debe observarse que el uso de "vertical" y "horizontal" se usa en relación con la superficie de los electrodos, y no está relacionado con la gravedad, arriba/abajo u otros esquemas de coordenadas. Dada la orientación de los diagramas, horizontal puede entenderse en este contexto que es paralelo al electrodo (o más generalmente, la superficie sobre la que la sonda reside), mientras que vertical puede entenderse en este contexto que es perpendicular al electrodo.

Para fines de ejemplo como se describen en el presente documento, la diana 114 es un ADN monocatenario 470, y la diana marcada 275 comprende además una marca electroforética 270. La sonda 116 comprende una sonda de ADN monocatenaria complementaria 480, que está unida al sustrato 120. Fuerzas verticales tenderán a mover la diana marcada 275 verticalmente hacia la sonda 480, mientras que las fuerzas horizontales permitirán que la diana marcada 275 interaccione con la sonda 480 en diversas localizaciones 170 dentro de la matriz 190.

La FIG. 16B es un gráfico del potencial eléctrico que causa el movimiento de la diana marcada 275 verticalmente, en relación de tiempo con las fuerzas horizontales que causan la mezcla de la diana marcada 275. Para los fines de este gráfico, se considera que una fuerza horizontal positiva está en una dirección arbitraria constante a lo largo del sustrato 120. Además, se considera que una fuerza vertical positiva está en una dirección que fomenta el movimiento de la diana marcada 275 hacia la sonda 480. Como puede apreciarse de la figura, la fuerza horizontal es relativamente constante. Sin embargo, la fuerza vertical varía con el tiempo, y algunas veces es aproximadamente neutra y otras veces muy fuerte. La fuerza vertical es liberada periódicamente con el fin de permitir que la diana marcada 275, que puede llegar a ser enredada sobre el sustrato 120 durante la aplicación de la fuerza vertical, se mueva lateralmente. La fuerza vertical se aplica inicialmente durante una larga duración T7 con el fin de acercar la diana marcada 275 a la sonda 480. Una vez la diana está en estrecha proximidad a la superficie del sustrato 120, aplicaciones posteriores de fuerza vertical pueden ser tanto de duración más corta, como de magnitud más baja, o ambos.

Considerar, por ejemplo, una fuerza horizontal que es suficiente en magnitud y en duración de forma que durante el transcurso de la reacción la diana marcada 275 se mueva aproximadamente la anchura de una localización 170. En tal caso, la localización 170 encontrará aproximadamente dos veces la diana marcada 275 de lo que sería sin la aplicación de fuerzas horizontales, suponiendo difusión mínima.

En una realización, las fuerzas horizontales pueden cambiar de dirección, de manera que la diana 275 se mueva hacia adelante y atrás sobre la sonda 116. En tal caso, la diana 275 tendrá múltiples posibilidades de interaccionar con la sonda, y así aumentará su unión. Por tanto, si la sonda se une a través de un recubrimiento de hidrogel, alguno de la sonda 116 puede ser estéricamente impedido de interaccionar con la diana 275 si la diana está moviéndose de una a otra dirección, y puede ser ventajoso que la diana 275 se mueva hacia adelante y atrás a través de la sonda de manera que se proporcionen diferentes movimientos de la diana 275. Por tanto, con el fin de aumentar la cantidad de unión, puede disminuirse la tasa de movimiento horizontal, o aumentar la tasa de movimiento vertical.

Control de fuerzas de reacción verticales/horizontales mixtas

La FIG. 17A es un diagrama de bloques esquemático de los medios de control de las fuerzas horizontales y verticales. El electrodo 200 se encuentra sobre el sustrato 120 y está rodeado por un aplicador de fuerza horizontal 520. Diferentes medios de aplicación de fuerza horizontal se describirán en detalle a continuación. El aplicador 520 está conectado a un controlador 510, que a su vez recibe la salida de un detector 500. El controlador controla tanto la magnitud de la fuerza horizontal aplicada por el aplicador 520, además de la fuerza vertical que es dirigida por los electrodos 195 y 200. El detector 500 monitoriza la diana marcada 275 que está en estrecha proximidad al electrodo 200 en tiempo real. Es decir, se detecta la diana marcada 275 que está dentro de decenas o cientos de nanómetros del electrodo 200, mientras que la otra diana marcada 275 a una distancia adicional del electrodo, no. Los medios por los que se realiza esta monitorización en tiempo real por el detector 500 serán tratados en mayor detalle más adelante.

La FIG. 17B es un diagrama de flujo de bloques esquemático de la operación del sistema de la FIG. 17A. En la etapa 530, el controlador 510 produce una fuerza vertical para ser ejercida entre los electrodos 195 y 200 de forma que la diana marcada 275 se mueva hacia el electrodo 200. En una etapa 532, la entrada del detector 500 es usada por el controlador 510 para determinar si una cantidad creciente de diana marcada 275 está siendo detectada que está yuxtapuesta al electrodo 200. Si cada vez está siendo detectada más diana, se aplican fuerzas verticales continuadas en la etapa 530. Si no se detecta diana marcada 275 nueva por el detector 500, el controlador relaja la fuerza vertical en una etapa 534. En una etapa 536, la fuerza horizontal o flujo es o bien mantenido o bien activado en este momento. Debido a la relajación de la fuerza vertical en la etapa 534, la diana marcada 275 que difunde de la superficie del electrodo 200 se pone bajo la influencia de la fuerza horizontal o flujo y se mueve lateralmente a lo largo de la superficie del electrodo 200. En una etapa 538, el detector 500 monitoriza la cantidad de diana marcada 275 yuxtapuesta a la superficie del electrodo 200. Si la cantidad de diana está todavía disminuyendo, se mantiene la relajación de la fuerza vertical en la etapa 534. Alternativamente, puede permitirse que transcurra una cantidad fija de tiempo. Una vez la cantidad de diana detectada por el detector 500 es relativamente estacionaria, o transcurre la cantidad fija de tiempo, se repite el ciclo empezando con la etapa 530.

Fuerzas y flujos horizontales

Existen varias fuerzas y flujos horizontales diferentes que pueden usarse en las realizaciones de la presente invención. Entre éstas incluyen fuerzas electroforéticas, electroosmosis, ondas acústicas, agitación mecánica y bombeo de fluidos. Por ejemplo, en la FIG. 4B como se describe en el presente documento, pueden usarse los electrodos laterales 210 y 220 para aplicar fuerzas horizontales a dianas marcadas 275. En tal caso, la magnitud del campo eléctrico vertical puede ajustarse por el potencial en los electrodos de referencia 195, en relación con la magnitud del campo eléctrico horizontal de los electrodos 210 y 220.

Con respecto a las ondas acústicas, pueden colocarse actuadores piezoeléctricos tanto sobre el sustrato 120 sobre la tapa 111 en una disposición topológica de forma que bajo una señal de control de alta frecuencia las ondas acústicas de la superficie en el vidrio produzcan transporte másico del fluido en el que está suspensa la diana marcada 275. En tal caso, se crea una corriente de convección dentro de la célula que mantiene un flujo laminar constante a través de la superficie del sustrato 120. Alternando el control de las señales piezoeléctricas, pueden alternarse periodos de mezcla turbulenta con periodos de flujo laminar.

También puede usarse bombeo mecánico o electroosmótico para crear flujo laminar a través de la superficie 120. Aunque el bombeo mecánico es conveniente para volúmenes más grandes, puede usarse bombeo electroosmótico para ayudar incluso en el caso de volúmenes extremadamente pequeños. En tal caso, las superficies electroosmóticas pueden incorporarse ya sea en el sustrato 120, o más convenientemente en la tapa 111, ya que el sustrato 120 está frecuentemente cubierto por una superficie habitual usada principalmente para unir la sonda 116 y para reducir la cantidad de unión no específica, y que puede ser una superficie menos eficaz para crear fuerzas electroosmóticas.

La FIG. 18A es un diagrama en perspectiva de un sistema de agitación mecánico que puede usarse dentro de un pocillo de placa de microtitulación 550. El pocillo de placa de microtitulación 550 tiene un electrodo de sondas 560 redondo sobre su superficie interior conectado al exterior del pocillo de microtitulación 550 por un trazado eléctrico 558. Se sumerge un electrodo de referencia 570 dentro del fluido de analito cuya altura se representa por la línea discontinua 556. El electrodo de referencia 570 está montado sobre un árbol 552 que tiene tanto conexiones mecánicas como eléctricas a actuadores no mostrados en la figura.

Durante la operación, el árbol 552 proporciona no solo conexiones eléctricas a través de las que puede ponerse una polarización de potencial en el electrodo de referencia 570, sino que además el árbol 552 hace que gire el electrodo de referencia 570. Debido a la viscosidad del fluido de analito, el fluido transfiere por convección un movimiento circular alrededor del pocillo de placa de microtitulación 550, con grados de movimiento aproximadamente iguales dentro de cada radio desde el centro del pocillo 550. Invertiendo la dirección de rotación del árbol 552 en el electrodo de referencia 570, puede inducirse flujo turbulento dentro del pocillo 550.

Debe observarse que debido a la simetría de la situación, y debido al deseo de tener cantidades aproximadamente iguales de flujo conductor para cada una de las localizaciones de sondas 170, puede ser preferible que el electrodo de sondas 560 tenga simetría circular. La FIG. 18B es un diagrama en vista desde arriba del electrodo de sondas 560. El electrodo 560 está dispuesto como un anillo anular de material conductor unido a la traza 558. Las localizaciones de sondas 170 están dispuestas alrededor del anillo, y son aproximadamente equidistantes del centro del pocillo de microtitulación 550. En esta disposición, no hay preferencia en el campo eléctrico o la asociación de dianas 114 a las sondas 116 basándose en la localización física. Además, el flujo laminar conductor inducido por el electrodo 570 hará que las dianas marcadas 275 se muevan en un movimiento circular alrededor del electrodo 560.

Alternativamente, puede ser conveniente que el electrodo de referencia 570 no esté simétricamente situado en el fondo del árbol 552, sino que esté dispuesto asimétricamente. En tal caso, la dirección del campo eléctrico girará con el árbol 552, proporcionando los beneficios de cambiar las direcciones del campo eléctrico, como se ha descrito anteriormente.

Los ensayos en placa de microtitulación pueden ser realizados ya sea de uno en uno, o múltiples ensayos de una vez. La FIG. 19A es un diagrama en perspectiva de una placa de microtitulación 590 con un conjunto de electrodos 570 y los árboles 552. Los electrodos 570 y los árboles 552 se ajustan cada uno en pocillos de microtitulación 550 individuales dispuestos en una rejilla. Los electrodos 570 y los árboles 552 pueden tanto girar como estar en una posición fija.

Dependiendo de la disposición, es conveniente tanto tener todos los electrodos 570 y los árboles 552 fijados los unos con respecto a los otros, que permite la operación paralela en todos los pocillos y para construcción simple y económica, como los electrodos 570 y árboles 552 individuales pueden estar independientemente controlados. Alternativamente, en lugar de una matriz bidimensional de los árboles 552 y electrodos 570 como se muestra, pueda haber una matriz unidimensional, en la que una sola fila de pocillos en la placa de microtitulación se procesa de una vez.

La placa de microtitulación 590 puede ser de construcción unitaria, o alternatively estar construida de una placa superior y una placa inferior, en la que la placa superior está hecha de plástico y define los lados de los pocillos, mientras que la placa inferior está hecha de plástico, vidrio u otro sustrato que sea sustancialmente plano, y que esté recubierto con un material que reduce la unión no específica y al que pueden unirse las sondas 116. En tal caso, la placa inferior se adhiere a la placa superior usando adhesivo, preferentemente después de la impresión de la matriz 180 de localizaciones de sondas 170. Para los fines descritos en el presente documento, es conveniente que los electrodos se coloquen sobre la placa inferior antes de la impresión de las sondas 116 o la adhesión de la placa inferior a la placa superior.

La FIG. 20A es una vista desde arriba de la disposición de electrodos de pocillo 598 sobre una placa inferior 592. Los electrodos de pocillo 598 pueden ser cuadrados (como se muestra), rectangulares, elipsoides, circulares o anulares (como en electrodo 560), y están conectados a almohadillas terminales 594 mediante trazados 558. Estas trazas pueden ser de anchura relativamente constante, pero son preferentemente más estrechos en las localizaciones de los pocillos (indicado por líneas de puntos), donde la mayor parte del área eléctricamente conductora es preferentemente la de los electrodos de pocillo 598. También se describe en el presente documento que los trazados eléctricamente conductores que no son parte del electrodo 598 pueden cubrirse con un recubrimiento no conductor (por ejemplo, materiales semiconductores, cerámicos, óxidos, y otros materiales), pero esto es una etapa y coste de fabricación adicionales y puede no siempre ser conveniente. Además, pueden existir múltiples trazas por pocillo, tal como sería conveniente con electrodos que no están debajo de localizaciones de sondas.

Existe una almohadilla de unión 594 para cada electrodo 598, al que está hecha la unión eléctrica. Ésta es menos conveniente cuando el número de pocillos 550 (y por tanto electrodos 598) llega a ser muy grande. Alternativamente, pueden conectarse múltiples electrodos 598 a una única almohadilla 593, como se muestra en la FIG. 20B, una vista desde arriba de la disposición de electrodos de pocillo eléctricamente conectados 598 sobre una placa inferior 592. En este caso, hay un único electrodo 593 al que todos los electrodos 598 están eléctricamente conectados. Aunque no todos los electrodos 598 están en uso simultáneo, esta disposición permite conectividad eléctrica simple, y no se produce daño con la conexión paralela con los electrodos 598 no usados. Otras disposiciones se describen en el presente documento, tales como la conexión de todos los electrodos 598 dentro de una única fila o columna de la matriz de pocillos 550, mientras que cada fila o columna está conectada a una almohadilla de unión 594 diferente.

Como se ha descrito anteriormente, la placa inferior 592 se adhiere a la placa superior. Si la placa inferior 592 es más pequeña que la placa superior, las almohadillas 594 o 593 pueden ser atrapadas por un dispositivo de unión eléctrica debajo de la placa (se previene el acceso a través de la parte superior y los lados por la placa superior). Una disposición alternativa que resulta bien independientemente de los tamaños relativos de la placa superior y la placa inferior 592 se muestra en la FIG. 19B, una vista en perspectiva de una placa superior 591 que comprende puertos de acceso 597. En esta disposición, los puertos de acceso 597 proporcionan acceso lateral para conectar con las almohadillas 593 o 594. Los puertos de acceso 597 están colocados según las localizaciones, número y tamaños de las almohadillas, y el acceso a múltiples almohadillas desde un puerto 597 individual se describe en el

presente documento.

Una disposición alternativa es para que la placa inferior 592 sea uniformemente conductora, y se mantenga a un potencial de tierra. En tal caso, el campo eléctrico dentro de cada pocillo de microtitulación 550 puede ajustarse independientemente del potencial en el electrodo 570 correspondiente. En el caso en el que un electrodo 570 esté operando en el momento, el uso de la placa inferior 592 uniformemente conductora es directo. Cuando múltiples pocillos 550 están siendo simultáneamente operados mediante una multiplicidad de electrodos de operación 570, es óptimo si la conductividad eléctrica de la solución de analito en cada pocillo es baja con respecto a la de la placa inferior 592. La conductividad eléctrica de la solución de analito puede ajustarse, por ejemplo, reduciendo la concentración de iones en solución.

Pueden usarse pocillos de microtitulación como se describe en el presente documento sin uso de electrodos permanentes en las placas inferiores 591. La FIG. 21 es un diagrama lateral en perspectiva de un electrodo integrado 600 para placas de microtitulación. El electrodo integrado 600 comprende tres conjuntos de electrodos independientemente modulables: un electrodo de referencia 606, un primer electrodo lateral 610 y un segundo electrodo lateral 612. Cada uno de estos electrodos puede, a su vez, comprender electrodos que pueden ser independientemente controlados.

Los electrodos 606, 610 y 612 están montados en un árbol que comprende miembros verticales 608 y la placa 602, que proporcionan tanto soporte físico, además de conexiones eléctricas. El control eléctrico de entrada se proporciona a través de los árboles 604, que comprenden tanto conexiones físicas como eléctricas también. El número de árboles 604 puede ser tan pequeño como uno. Los electrodos laterales 610 y 612 se corresponden aproximadamente con los electrodos 210 y 220 de la FIG. 4B, y el electrodo de referencia se correspondió aproximadamente con los electrodos 190. Estos electrodos comprenden convenientemente un metal relativamente no reactivo con alta conductividad, tal como oro. Es preferible que los electrodos laterales 610 y 612 sean relativamente finos, y también pueden disminuir gradualmente en sus bordes interiores para mantener una superficie más baja plana, permitiendo que los campos eléctricos sean controlados cerca de la parte inferior del electrodo 600.

El electrodo integrado 600 se coloca en un pocillo de placa de microtitulación 550 con la superficie inferior de los electrodos laterales 610 y 612 colocados sobre o muy cerca de la parte inferior del pocillo 550, estando situada la matriz 180 de sondas 116 entre los dos electrodos laterales. El electrodo 600 se presenta similarmente a la disposición de la FIG. 4B. Al fin de cada ensayo, el electrodo 600 se saca del pocillo 550 y se lava con fuertes potenciales eléctricos aplicados, agitación física en una solución, y posiblemente lavados químicos en ácidos fuertes, reactivos oxidantes y otras soluciones de limpieza. También se describe en el presente documento que el electrodo 600 se gira en un movimiento aproximadamente circular o en uno hacia adelante y atrás de manera que se mezcle y/o mueva la diana 114 según los métodos descritos anteriormente (por ejemplo, véanse las FIG. 33A y 33B).

Aceleración de la generación de señales usando manipulación electroforética

En algunos casos, la diana marcada requiere la posterior exposición al sustrato con el fin de generar señal que pueda ser detectada mediante varios medios. Por ejemplo, la quimioluminiscencia requiere la adición de sustrato a la marca de enzima con el fin de generar señal quimioluminiscente. Pueden usarse fuerzas electroforéticas para conducir la reacción enzimática poniendo el sustrato en estrecha proximidad a la enzima y entonces, tras la conversión enzimática de sustrato en el estado cargado eléctrico opuesto, puede usarse para conducir el sustrato convertido lejos de la enzima, que permite rápidamente conversión más rápida del sustrato por la enzima.

Lavado-detección

Visión general

En las secciones anteriores, se hacen numerosas referencias a discriminar material específicamente unido frente a no específicamente unido aumentando la polarización en un electrodo que atrae la marca electroforética 270 y la diana unida 114 lejos de la sonda 116 con cantidades crecientes de fuerza electrostática. Este proceso se describe en más detalle en la FIG. 22, un diagrama de flujo de bloques esquemático de discriminación usando fuerza electroforética.

En una etapa 400, se usan lavados químicos opcionales para eliminar material no específicamente unido libremente unido. Estos lavados químicos pueden incluir sal baja, pH alto, pH bajo, u otros tratamientos químicos que reducen la fuerza de unión entre la diana 114 y la sonda 116.

En una etapa 402, los lavados químicos realizados en la etapa 400 se sustituyen por un tampón de estabilidad que tiende a aumentar la fuerza de unión entre la diana 114 y la sonda 116. El tampón de estabilidad reduce las probabilidades de que la diana 114 y la sonda 116 se separen inesperadamente. Debe observarse que en ausencia de la etapa 400, la etapa 402 también puede eliminarse opcionalmente.

En una etapa 404, la diana marcada 275 unida a la sonda 116 se monitoriza visualmente. En general, esto implicará

tanto capturar una imagen de la matriz 180, como barrer la matriz 180 de un modo que se describe más adelante. En general, el medio de detección se corresponde con el tipo de componente de indicador usado en la marca electroforética 270. Es importante que la diana marcada 275 que no esté asociada a la sonda 116 no se monitorice en esta situación. Métodos de detección en tiempo real para discriminar marca electroforética 270 unida de no unida se describen anteriormente y más adelante. En una etapa 412, se almacenan los datos visuales que se capturan.

En una etapa 406, la polarización vertical neta lejos de la sonda 116 aumenta de un modo que va a describirse a continuación. Este aumento generalmente será gradual de un modo conocido en la FIG. 9. En una etapa 408, se determina si la rigurosidad máxima de la fuerza electroforética ha sido o no alcanzada. Si no se ha alcanzado, se capturan nuevos datos visuales en la etapa 404. Si la máxima rigurosidad ha sido alcanzada, se calculan las diferencias en la unión para cada rigurosidad electroforética a partir de las diferencias entre datos visuales capturados sucesivos en una etapa 410, como se describe más adelante.

Debe observarse que para la detección visual, hay varios esquemas de iluminación diferentes que pueden emplearse. Algunos de estos esquemas de iluminación requieren condensadores especializados para su uso en microscopía de fase y otros tipos de microscopía. Para su uso en la detección de luz dispersa, además de con el uso de modos de detección fluorescente, de puntos cuánticos y fósforos de conversión ascendente, y ciertos otros modos de detección, puede usarse el uso de otras formas de iluminación. En muchos casos, el uso de iluminación de onda evanescente puede ser de uso particular, debido a que frecuentemente puede prevenirse que la luz que no interacciona con la diana 114 o su marca 270 interfiera en la detección, y debido a las únicas marcas 270 que interaccionarán con la luz serán aquellas marcas que son proximales a las sondas 116 sobre la superficie o el sustrato. La siguiente discusión irá en detalle en los medios por los que la iluminación evanescente puede usarse en la detección visual de la diana marcada.

Detección de iluminación evanescente usando iluminación de haces paralelos

La FIG. 23A es un esquema en sección transversal de una realización de la presente invención en la que se usa un prisma 1140 sobre la superficie superior para introducir luz en la guía de onda del portaobjetos 1120. El prisma 1140 mostrado en la figura es un paralelepípedo triangular, en el que una superficie está colocada sobre la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120, y la superficie de aceptación 1142 está aproximadamente enfrente en la misma dirección que un borde 1123 del portaobjetos 1120. Rayos de luz 1132 aproximadamente paralelos, que son preferentemente casi perpendiculares a la superficie 1142 pero que pueden ser no normales y, por tanto, refractados en la superficie 1142, entran en la superficie 1142 con poca reflexión. Estos rayos de luz 1132 se encuentran con la superficie inferior del prisma 1140, y debido a la planitud y yuxtaposición de la superficie inferior del prisma y la superficie superior 1122 del portaobjetos, los rayos de luz 1132 se extienden en el hueco entre el prisma 1140 y el portaobjetos 1120, entrando en el portaobjetos 1120. La dirección de los rayos de luz 1132 se elige de manera que los rayos 1132, cuando se encuentran con la superficie inferior 1124 del portaobjetos 1120, casi todos se reflejarán de la superficie 1124, impactando a un ángulo superior al crítico entre la superficie 1124 y el medio (generalmente aire) de debajo.

La superficie superior 1143 del prisma 1140 se elige de manera que todos los rayos de luz 1132 que entren en el prisma 1140 sean capturados en el portaobjetos 1120, y es de alguna conveniencia que el ángulo entre la superficie de aceptación 1142 y la superficie superior 1143 del prisma 1140 deba ser aproximadamente perpendicular. Debe observarse, sin embargo, que si el vértice 1145 del prisma fuera a extenderse suficientemente lejos a lo largo del portaobjetos, esas trayectorias de rayos reflejados de la superficie inferior 1124, que se mueven hacia arriba a la superficie superior 1122, podrían encontrarse con la superficie inferior del prisma 1140, produciendo el "escape" de la luz del portaobjetos. Esto debe evitarse no extendiendo el vértice 1145 demasiado lejos distalmente a lo largo del portaobjetos 1120.

Mientras se muestra que los rayos paralelos 1132 son casi perpendiculares a la superficie de aceptación 1142, y por tanto casi no presentan refracción, en una realización, los rayos de luz 1132 pueden entrar no perpendicularmente a la superficie 1142, de forma que las trayectorias de rayos refractados tengan una trayectoria apropiada, produciendo la reflexión interna casi total dentro del portaobjetos.

La FIG. 23B es un esquema en sección transversal de un prisma 1140 sobre la superficie superior de un portaobjetos, en el que la luz es internamente reflejada dentro del prisma antes de la introducción de la luz en el portaobjetos 1120. En muchos casos, se prefiere mantener los componentes del dispositivo aproximadamente perpendiculares entre sí con el fin de ayudar en el alineamiento, y en este caso, los rayos de luz incidente 1132 pueden ser casi perpendiculares al borde 1123 del portaobjetos 1120 (y, por tanto, paralelos a la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120). La superficie de aceptación 1142 puede ser paralela al borde de portaobjetos 1123, de manera que los rayos 1132 sean perpendiculares a la superficie 1142, limitando así la reflexión en la superficie 1142.

Después de una reflexión interna sobre la superficie superior 1143 del prisma 1140, los rayos de luz 1132 tienen ahora el ángulo apropiado en el portaobjetos 1120, de manera que presentan reflexión interna total. Debe observarse que el ángulo de las trayectorias de rayos 1132 después de la reflexión sobre la superficie 1143 del

prisma 1140 será dos veces el de la pendiente del prisma 1140--por tanto, la pendiente de la superficie superior 1143 necesita ser razonablemente pequeña con el fin de mantener la reflexión interna total de las trayectorias de rayos 1132 dentro del portaobjetos 1120.

- 5 La FIG. 24A es un esquema en sección transversal de la disposición de prisma de la FIG. 23, extendida de manera que pueda verse la disposición de las trayectorias de rayos paralelos distales 1132. Las trayectorias de rayos paralelos 1132 entran en el prisma 1140, y entonces entran en el portaobjetos 1120. Debido a la naturaleza paralela de las trayectorias de rayos 1132, el patrón de reflexiones dentro de las paredes paralelas del portaobjetos 1120, que actúan de guía de onda, se mantienen a lo largo de la longitud del portaobjetos 1120. Si los rayos son rebotados por la trayectoria del rayo más alta paralela 1133 y la trayectoria del rayo más baja 1135, y la superficie superior 1122 y la superficie inferior 1124 son paralelas, secciones iluminadas 1146 serán repetidamente intercaladas con secciones no iluminadas 1148 a lo largo de la longitud del portaobjetos 1120. Esto producirá diferencias significativas en la iluminación del indicador 1110 a lo largo del portaobjetos 1120. Esta no uniformidad puede ser manipulada de algún modo usando un haz ancho de iluminación, pero generalmente será difícil de modular la anchura del haz de manera que la iluminación sea uniforme con precisión.

Detección de iluminación evanescente usando iluminación de haz convergente

- 20 La FIG. 24B es el esquema en sección transversal de la FIG. 24A, modificado usando iluminación convergente en lugar de iluminación colimada. La iluminación convergente 1131 entra en el prisma 1140, durante lo cual es refractada algo en la superficie de aceptación 1142. Es conveniente que el punto de convergencia de las trayectorias de rayos 1131 no esté en la interfase entre el prisma 1140 y el portaobjetos 1120, ya que cualquier imperfección en el vidrio o contaminantes (por ejemplo, polvo) en la interfase podría contribuir a la dispersión de la luz. La luz dispersa no mantendría necesariamente la reflexión interna total en el portaobjetos 1120, y así el punto de convergencia es preferentemente cualquiera antes o después del punto en el que la luz 1131 entra en el portaobjetos 1120.

- 30 Examinando la luz en el portaobjetos, pueden observarse las trayectorias de la trayectoria del rayo más alta 1133 y la trayectoria del rayo 1135. Como puede apreciarse, no hay naturaleza repetitiva a las áreas de iluminación y no iluminación para las trayectorias de rayos 1133 y 1135. De hecho, hay un gran intervalo de ángulos de la trayectoria del rayo dentro de la luz 1131, de manera que de hecho gran parte de la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120 es iluminada después de solo un pequeño número de reflexiones internas, y dado un número muy grande de reflexiones, la iluminación de la superficie superior 1122 llega a ser casi uniforme. Como antes, un haz más ancho generalmente producirá iluminación algo más uniforme en el caso de menos reflexiones.

- 35 Debe observarse que una diseminación divergente de la iluminación que entra en la superficie de aceptación 1142 tendría un efecto similar a una iluminación convergente, produciendo iluminación evanescente casi homogénea de la superficie superior 1122.

Detección de iluminación evanescente usando iluminación no uniforme

- 40 Aunque las realizaciones de las FIG. 23A y B y FIG. 24A y B pueden usarse con el prisma 1140 y/o fuente de iluminación asociada que está en una localización fija, posiblemente cerca del extremo del portaobjetos, en una realización, el prisma 1140 y/o su fuente de iluminación asociada puede moverse para iluminar áreas diferentes del portaobjetos, particularmente en las que la iluminación es intencionalmente no uniforme.

- 50 La FIG. 24C es un diagrama en sección transversal esquemático de un iluminador de portaobjetos en el que el portaobjetos no está uniformemente iluminado. El prisma 1140 está situado sobre la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120, y acepta rayos paralelos 1132 de un colimador 1170. Un cable de fibra óptica 1174 transporta la luz al colimador 1170, y los rayos de luz que divergen del extremo del cable de fibra óptica 1174 son capturados por y convergidos por una lente 1172, que produce rayos colimados 1132.

- 55 Como en la FIG. 24A, los rayos de luz 1132 entran en el prisma 1140, y de ahí en el portaobjetos 1120, en el que entonces se reflejan multiplicados contra la capa superior 1122 y la capa inferior 1124, iluminando la superficie superior 1122 a intervalos regulares de 1. La longitud 1 puede ser calculada para ser $2 \cdot d / \tan \theta$, donde d es el espesor del portaobjetos y θ es el complemento de ángulo del ángulo de incidencia de la luz sobre la superficie superior o inferior del portaobjetos.

- 60 Un detector 1160 está situado sobre el sitio de iluminación 1146 sobre la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120, y detecta una señal resultante de la iluminación evanescente de los indicadores 1110 que residen sobre la superficie superior 1122. Debe observarse que el detector 1160 también podría estar situado sobre múltiples integrales de l en distancia sobre la superficie superior, que es de especial conveniencia en caso de que deba haber limitaciones topológicas sobre la localización del detector 1160 con respecto, por ejemplo, al prisma 1140. Debe entenderse que la tecnología de detectores puede comprender tanto los dispositivos de obtención de imágenes (por ejemplo, cámaras CCD o CMOS que operan con una fuente de luz relativamente constante) como dispositivos no de obtención de imágenes (por ejemplo, un tubo fotomultiplicador (PMT) que opera conjuntamente con un escáner de

láser que ilumina la superficie a través del prisma u otro acoplamiento).

Aunque esta disposición es eficaz para iluminar material en una posición particular con respecto al prisma 1140, esta disposición también puede usarse para iluminar muchas áreas encima del portaobjetos 1120. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, deslizando el prisma 1140 y el colimador asociado 1170 en concierto sobre la superficie superior del portaobjetos 1120. Un movimiento del prisma 1140 y colimador 1170 produciría un movimiento concomitante del sitio de iluminación 1146 de una cantidad igual.

Alternativamente, el prisma puede mantenerse en una única localización, y el colimador 1170 puede ser trasladado horizontalmente o verticalmente, manteniendo su orientación, de forma que se altere el punto de entrada del rayo de luz 1132 en el prisma. Esto trasladará el rayo de luz 1132 lateralmente dentro del portaobjetos. Además, la rotación del colimador 1170 tendría un efecto traduccional sobre la posición del sitio de iluminación 1146. En una realización, puede ser una combinación de más de uno de los movimientos del colimador 1170, posiblemente en concierto con el movimiento del prisma 1140, con el fin de efectuar la traducción del sitio 1146 a lo largo de la superficie superior 1122.

Detección de iluminación evanescente usando guía de onda de película fina de superficie superior

Otra realización de la presente invención es preparar una guía de onda muy fina, en vez de usar el portaobjetos, que generalmente tiene un espesor de un milímetro o más. Esto puede llevarse a cabo en varias formas. Por ejemplo, el propio portaobjetos puede construirse como una película, posiblemente de un material de plástico de alto índice flexible. Esto puede no ser conveniente en ciertas aplicaciones, que incluyen casos tales en los que la película es para mantener la rigidez estructural; el material de plástico es inapropiado para las reacciones biológicas y químicas usadas en el proceso de detección, y que permiten que el material a flexionar permita posiblemente que la luz escape cuando los ángulos de reflexión interna llegan a ser inferiores al ángulo crítico.

Una realización alternativa se muestra en la FIG. 25A, una sección transversal esquemática de un guía de onda de película fina de alto índice 1180 depositada sobre un sustrato de portaobjetos por deposición física de vapor (por ejemplo, pulverización iónica o evaporación), por deposición química de vapor, por recubrimiento por centrifugación, recubrimiento por inmersión, o por otros medios que proporcionen una película de espesor aproximadamente uniforme. Además, pueden generarse películas finas de índice de refracción graduado usando métodos de sol-gel y de intercambio iónico. Una revisión de los métodos para producir tales guías de onda fina se proporciona en "Planar integrated optical methods for examining thin films and their surface adlayers" por Plowman, Saavedra and Reichert (Biomaterials (1998) 19, pg. 341-355).

La guía de onda de película fina 1180 comprende un material que tiene un índice de refracción sustancialmente más alto que el portaobjetos 1120 que está debajo. El material es convenientemente Ta_2O_5 , que se usa comúnmente en las capas de alto índice en la producción de filtros de interferencia de película fina, aunque pueden usarse otros materiales, tales como TiO_2 , nitruro de silicio, sílice dopada con iones y vidrios dopados con iones. El espesor de la guía de onda está generalmente en el orden de una longitud de onda de la luz guiada, que en este caso normalmente estará en el intervalo visible o ultravioleta (UV), y puede convenientemente estar en el orden de 100-5000 nm, y es más preferentemente 150-2000 nm. Debido al pequeño espesor, solo uno o algunos modos se transmiten en la guía de onda (es decir, unimodo) a diferencia de la transmisión de luz multi-modal en una guía de onda gruesa (por ejemplo, el portaobjetos).

El acoplamiento de la iluminación incidente en la guía de onda de película fina puede llevarse a cabo de varias formas. La FIG. 25A es una sección transversal esquemática de una guía de onda de película fina iluminada en el extremo 1180 integrada con un portaobjetos 1120. Un cable de fibra óptica 1174 transmite luz a lo largo de una fibra unimodal 1175, que termina en un acoplador 1182. El acoplador 1182 también puede observarse en la FIG. 25B, una vista desde arriba esquemática del acoplador 1182 y el portaobjetos 1120 de la FIG. 25A. La luz que sale de la fibra 1174 se encuentra con una lente de acondicionamiento 1177 que se usa para ajustar la divergencia de los rayos de luz emergentes, y puede ser tanto convergente como divergente. La luz se pasa entonces a través de una lente cilíndrica 1178 para converger el haz en una única dimensión, orientada de tal forma que la luz emergente se alinee aproximadamente con la guía de onda 1180. Óptimamente, el punto focal es aproximadamente coincidente con la superficie de borde de la guía de onda 1180. El haz así limitado gana admitancia significativa en la guía de onda 1180.

El acoplador 1182 encapsula el extremo del cable de fibra óptica 1174, además de la lente de acondicionamiento 1177 y la lente cilíndrica 1178. Se usa un borde de posicionamiento 1183 en la parte frontal superior del acoplador 1182 para situar el acoplador 1182 sobre el portaobjetos 1120 con la óptica dispuesta para acoplar la luz en la guía de onda 1180.

Debe observarse que la disposición óptica de lentes puede ser variada dentro de las enseñanzas de la presente invención. Por ejemplo, el cable de fibra óptica puede ser yuxtapuesto en extremos más gruesos directamente al borde de la guía de onda 1180. Alternativamente, la lente de acondicionamiento 1177 puede ser omitida, en parte dependiendo de la colocación del cable 1174. Por tanto, la lente cilíndrica 1178 puede ser omitida, dado que una

lente de acondicionamiento 1177 converge en el borde de la guía de onda.

Debe observarse que puede haber alguna fuga del haz tanto por encima de la guía de onda 1180 como en el portaobjetos 1120, que para guías de onda muy estrechas puede comprender la mayoría de la luz de la lente cilíndrica 1178, ya que el acoplamiento tiende a ser ineficiente. Con fuga por encima de la guía de onda, el acoplador 1182 tiene un saliente que se encuentra encima de la guía de onda 1180, tanto ayudando en el alineamiento del acoplador 1182 de manera que la luz del cable de fibra óptica 1174 entre en la guía de onda 1180, como en segundo lugar, bloqueando el escape de luz del acoplador 1182 hacia adelante. Con fuga en el portaobjetos 1120, pequeñas cantidades de luz que fugan en el portaobjetos 1120 tenderán a ser limitadas dentro del portaobjetos 1120 (que actúa de guía de onda). Otra luz con un ángulo más alto (de manera que no se refleje) encontrará primero la superficie inferior del portaobjetos 1120, donde escapará y tampoco afectará la iluminación evanescente u otra iluminación por encima de la guía de onda 1180.

Un método alternativo de acoplamiento de la iluminación en la guía de onda de película fina 1180 es poner una rejilla sobre la superficie de la guía de onda 1180. El principio de operación y construcción de un acoplador de rejilla tal se proporciona en Plowman, et al. (referencia proporcionada anteriormente). La FIG. 25C es una sección transversal esquemática de una rejilla 1181 en la superficie de la guía de onda 1180, con iluminación incidente así capturada en la guía de onda 1180. La rejilla está situada sobre la superficie superior de la guía de onda de película fina 1180, con luz de entrada 1202 dirigida desde debajo sobre la guía de onda 1180. La rejilla también puede estar situada en la interfase guía de onda/sustrato, o en cualquier interfase en una guía de onda multi-capas 1180. Además, la guía de onda 1180 puede ser iluminada por encima, además de por debajo.

También puede usarse un prisma para acoplar luz en una guía de onda de película fina 1180. La FIG. 25D es una sección transversal esquemática de una guía de onda de película fina 1180 en la que la luz se acopla a la guía de onda 1180 mediante el prisma de material de alto índice 1200. Debe observarse que la luz de entrada 1202 entra en la guía de onda 1180 estrecha al borde del prisma 1200, ya que el material del prisma de alto índice de refracción 1200 que recubre la guía de onda 1180 más allá del punto de acoplamiento permitirá que escape la luz en la guía de onda 1180. La luz de entrada 1202 puede, por tanto, tanto ser un haz colimado estrecho que se dirige al vértice 1204 del prisma 1200, como puede ser un haz de luz que converge cerca del vértice 1204 (por ejemplo, mediante una lente convexa esférica o lente cilíndrica plano-convexa).

Debe observarse que la luz de entrada 1202 no necesita ser aproximadamente perpendicular a la cara del prisma 1200, y puede refractarse en esa superficie de manera que esté al ángulo incidente apropiado en la guía de onda 1180 en la localización apropiada. Debe también entenderse que está dentro de las enseñanzas de la invención que el prisma 1200 para el acoplamiento de la guía de onda 1180 tenga un sección transversal triangular, trapezoidal, u otra.

Detección de iluminación evanescente usando arquitecturas no de guía de onda de rebote único

En las realizaciones anteriores, la iluminación que se captura en la guía de onda 1180 se introduce en la dirección de la superficie superior del portaobjetos 1120, a partir de la que se realiza la detección. Debe también observarse que pueden crearse ondas evanescentes a través de sistemas en los que la luz no es capturada en una guía de onda 1180, sino que simplemente se refleja una vez contra la superficie superior del portaobjetos 1120. En la localización de la reflexión, se crea una onda evanescente. Debe observarse que esta arquitectura, aunque está organizada en una arquitectura algo similar, comparte solapamiento teórico considerable con la realización de reflexiones integrales como en la FIG. 24C, excepto que la luz, después de la iluminación de la localización de superficie superior apropiada, no está limitada con el portaobjetos 1120.

La FIG. 26A es una sección transversal esquemática de iluminación evanescente de una región sin uso de una guía de onda 1180. Un prisma trapezoidal 1190 está yuxtapuesto a la superficie inferior 1124 del portaobjetos 1120. La luz entrante 1132 entra en el prisma 1190 sobre una superficie de aceptación 1192, y atraviesa el prisma 1190, encontrándose con el portaobjetos en su superficie inferior 1124. El índice de refracción del prisma 1190 y el portaobjetos 1120 se eligen para ser similares, de manera que la luz entre en el portaobjetos 1120, generalmente con poca o ninguna refracción.

La luz 1132, reflejada en el límite del prisma 1190 y el portaobjetos 1120, atraviesa el portaobjetos 1120 donde se encuentra la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120, y el ángulo de incidencia se elige para ser superior al ángulo crítico en esa superficie 1122. Así, la luz se refleja de la superficie superior 1122. Como se muestra en la FIG. 26A, la luz 1132 vuelve entonces a entrar en el prisma 1190 y entonces sale mediante la superficie emergente 1194. Debe observarse que el objetivo es iluminar una región de la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120, de manera que la disposición de la luz después de la reflexión sobre la superficie superior 1122 preocupe menos. Así, en lugar de un prisma trapezoidal 1190, el prisma puede estar truncado de forma que la luz que entra en el portaobjetos 1120 desde el prisma 1190 quede entonces en el portaobjetos 1120, estando entonces el portaobjetos 1120 funcionando como una guía de onda.

De hecho, puede ser de alguna conveniencia para el prisma 1190 que se extienda solo hasta el punto donde la luz

1132 entra en el portaobjetos 1120, siendo de otro modo truncado. Esta disposición proporciona más espacio para un detector que va a montarse debajo, en vez de encima, del portaobjetos, que puede ser útil en ciertas aplicaciones. Alternativamente, dada la apropiada óptica de punto muerto, puede hacerse detección a través del prisma 1190.

Alternativamente, el prisma 1190 puede construirse para permitir una ventana para la detección. La FIG. 26B es una sección transversal esquemática de iluminación evanescente según la FIG. 26A, en la que el prisma 1190 tiene una ventana 1193 a través de la que el detector 1160 detecta eventos sobre la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120. La ventana 1193 o bien se fabrica durante la construcción del prisma 1190, o se esmerila en el prisma 1190 después de fabricar el prisma 1190. Por ejemplo, la ventana 1193 puede producirse por una rueda de esmerilado cónica, abriendo un orificio directamente debajo del área iluminada sobre la superficie superior 1122 del portaobjetos 1120. Dentro de las enseñanzas de la presente invención, la ventana 1193 puede ser de muchas topologías, que incluyen cónica, caja rectangular, depresión trapezoidal, o geometrías complejas que combinan diferentes formas. Además, en lugar de una ventana 1193, el prisma 1190 puede sustituirse con dos "semi-prismas" (o prismas de entrada y salida), que comprenden cada uno una región que se acopla con el portaobjetos 1120, y comprendiendo el espacio entre los semi-prismas un área de "ventana" donde puede colocarse un detector 1160.

Dentro de esta ventana 1193, el detector 1160 puede ser operado desde abajo sin interferencia del prisma 1190, o puede montarse dentro del perfil del prisma 1190 si debe limitarse la distancia de trabajo del detector 1160.

Debe observarse que los índices de refracción en el portaobjetos 1120 y el prisma 1190 pueden diferenciarse con la condición de que el ángulo de luz en la superficie inferior 1124 esté por debajo del ángulo crítico, que permite que la luz entre en el portaobjetos 1120, y que la luz refractada en el portaobjetos 1120 encuentre la superficie superior 1122 por encima del ángulo crítico de manera que se refleje de la superficie superior 1122. Además, sin embargo, como el ángulo de la luz en el límite del prisma 1190 y el portaobjetos 1120 se aproxima al ángulo crítico, la división de la luz entre la transmisión y la reflexión llega a estar cada vez más polarizada hacia la reflexión, de manera que es preferible que se minimice la diferencia en los índices de refracción entre el prisma 1190 y el portaobjetos 1120.

En muchos casos, el área de detección en el portaobjetos 1120 es grande en comparación con el área iluminada por el iluminador y el área de iluminación en el portaobjetos 1120 debe ser movida con respecto al portaobjetos. Hay tres medios primarios para realizar este objetivo. En el primero, el prisma 1190 y el detector 1160 mantienen posiciones fijas, y se mueve el portaobjetos 1120. En la segunda, el detector 1160 y la iluminación se mueven independientemente, la posición del sitio de iluminación puede ajustarse ya sea por traslación de la posición del colimador 1170, o, si el colimador 1170 está montado en el prisma, moviendo el prisma 1190. La disposición de la FIG. 26B tiene tanto el colimador 1170 como el detector 1160 que están situados en posición fija con respecto al prisma 1190, de forma que el movimiento del prisma 1190 recoloca naturalmente y convenientemente los medios de iluminación y detección en concierto, manteniendo una relación fija. Debe observarse que el montaje de los medios de iluminación y detección al prisma 1190 no depende de la presencia de la ventana 1193, y puede llevarse a cabo convenientemente con un prisma trapezoidal, tal como en la FIG. 26A, con el detector 1160 montado en la superficie inferior plana del prisma 1190.

El acoplamiento entre el prisma 1190 y el portaobjetos 1120 puede ser difícil, dado que está interferido por polvo y otras partículas, y el estrecho acoplamiento dificulta la separación de las dos interfases planas en un dispositivo operacional. Frecuentemente, se usa un fluido de correspondencia del índice con un índice de refracción similar al del vidrio del portaobjetos 1120 o el vidrio del prisma 1190, pero esta disposición padece polvo y otras partículas que pueden acumularse dentro del fluido. Además, el exceso de fluido transferido al portaobjetos (por ejemplo, frotando o que se expresa de entre el portaobjetos 1120 y el prisma 1190) puede permitir posiblemente que se fugue luz de la guía de onda.

Debe observarse que hay tres áreas superficiales distintas a través de las que la luz interacciona con: la superficie 1192, la superficie 1124 y la superficie 1192. Estas superficies pueden estar presentes sobre dos componentes cualquiera diferentes (como en la FIG. 26A), sobre tres componentes diferentes (como en la FIG. 26B), o pueden alternativamente estar sobre un único componente, como sería el caso en una pieza única moldeada que podría tener una sección transversal sustancialmente similar a la de las FIG. 26A o B. Todas estas disposiciones representan realizaciones de la presente invención.

Una disposición alternativa se presenta en la FIG. 27A, una sección transversal esquemática de un prisma 1190 que acopla luz usando un acoplador flexible 1250. El prisma 1190 acopla el rayo de luz 1132 en el portaobjetos 1120. Para facilitar el acoplamiento, el acoplador 1250 está situado entre el prisma 1190 y el portaobjetos 1120. El acoplador 1250 está hecho de material transparente flexible y su espesor puede oscilar de cientos de micrómetros generalmente hasta 2 milímetros. La composición del acoplador 1250 puede incluir geles de curado óptico tales como NyoGel, adhesivos ópticos flexibles, que pueden ser curados por UV, además de cauchos de sílicona curables transparentes. Es preferible que el índice de refracción de este acoplador 1250 deba ser similar al del material del portaobjetos 1120 o el material del prisma 1190, o ser de índice de refracción intermedio. En general, el acoplador se unirá al prisma 1190, y puede moldearse como un adhesivo sobre el prisma 1190.

Con el fin de reducir las posibilidades de que el aire quede atrapado entre el acoplador, es conveniente que el

prisma 1190 con el acoplador 1250 unido se ponga sobre el portaobjetos 1120 a un ligero ángulo, de manera que el aire sea presionado hacia afuera desde el punto inicial de contacto, ya que se hace un contacto completo entre el acoplador 1250 y el portaobjetos 1120. Alternativamente, la cara inferior del acoplador 1250 puede ser ligeramente curvada con el fin de tener en cuenta este problema. La FIG. 27B es un esquema en vista lateral de un prisma 1190 con un acoplador de cara curvada 1252. Dada la curvatura en una cara inferior 1254, como se muestra en la figura, como el prisma 1190 se baja sobre el portaobjetos 1120, el aire será forzado hacia la parte del acoplador 1252 para el que el contacto todavía no se ha completado. La diferencia en espesor de un extremo del acoplador 1252 al otro extremo del acoplador 1252 no necesita ser grande en este caso, aunque es preferentemente superior a 0,5 milímetros.

Otros métodos de iluminación y detección

Son convenientes otros métodos de detección en tiempo real y realizaciones incluyen microscopía confocal conjuntamente con dispersión, fluorescencia, fósforos de conversión ascendente, puntos cuánticos u otros indicadores, además de resonancia de plasmones superficiales (SPR). La microscopía confocal se aprovecha de una profundidad muy superficial del campo, de forma que marcas de indicador que son alejadas de las sondas 116 están fuera de foco y la energía luminosa es o bien dispersada o reducida a través del filtrado espacial. También es posible obtención de imágenes similar a la obtención de imágenes confocal usando objetivos de apertura numérica muy grandes que también tienen profundidad de campo superficial. La resonancia de plasmones superficiales usa una disposición de componentes similar a la de la detección usando arquitecturas de no guías de onda de rebote único, como se ha descrito anteriormente, en las que la superficie superior del vidrio está recubierta con una superficie metálica reflectante que es convenientemente oro. En este caso, la cantidad de luz reflejada por el oro está afectada por la presencia de material unido a las sondas 116. La resonancia de plasmones superficiales es muy adecuada para la presente invención, en la que la superficie de oro puede servir tanto de superficie reflectante, además de electrodo para su uso en la aceleración de la reacción y discriminación de fuerzas de unión.

Los métodos anteriores tienen la ventaja de que dianas 114 que se unen a las sondas 116 son visibles y distinguibles incluso en presencia de diana 114 no unida, ya que solo esa diana que se une es visible. Sin embargo, en algunas realizaciones, pueda haber disposiciones alternativas de iluminadores y detectores, dado que las dianas 114 no unidas pueden eliminarse de la región de la sonda 116, ya sea por eliminación de la solución en la que las dianas 114 se proporcionan (por ejemplo, como se muestra a continuación en el caso de cámaras para la detección de bacterias), o a través del secuestro de las dianas 114 en otra región. El último método puede implicar, por ejemplo, la electroforesis de diana 114 a otro electrodo que no está en la trayectoria óptica ya sea del detector y/o iluminador.

Algunas de las disposiciones que están disponibles dentro de la presente invención pueden entenderse con referencia a dos sustratos paralelos (un sustrato inferior y uno superior) con electrodos sobre estos sustratos orientados el uno al otro a través de un hueco interno. Los presentes inventores pueden entonces definir de abajo a arriba cuatro superficies diferentes—la superficie inferior más baja, la superficie inferior más alta (es decir, con un electrodo sobre el que se deposita sonda), la superficie superior más baja (es decir, con un electrodo sin sonda) y una superficie superior más alta. El detector en general estará o bien debajo de la superficie inferior más baja o encima de la superficie superior más alta (es decir, no está en el hueco entre los dos sustratos).

Si el detector está debajo de la superficie inferior más baja, entonces el electrodo sobre la superficie inferior más alta generalmente será transparente, excepto en el caso de resonancia de plasmones superficiales. En el caso de resonancia de plasmones superficiales, el detector debe también estar debajo de la superficie inferior más baja. La iluminación puede ser o bien debajo de la superficie inferior más baja, pasando a través del electrodo de sustrato inferior, con luz retrodispersada, luz evanescente (que se refleja de la superficie inferior más alta), o luz que pretende excitar fluoróforos, fósforos de conversión ascendente o puntos cuánticos. Alternativamente, la iluminación puede ser de dentro del sustrato inferior, como se ha descrito anteriormente. Por tanto, la iluminación puede ser de dentro del hueco entre los dos sustratos, que generalmente sería mejor para una dispersión de la aplicación de luz. Alternativamente, la iluminación puede ser desde encima de la superficie superior más alta, que pasa a través del sustrato superior, a través del hueco, y luego a la superficie inferior más alta donde interacciona con la diana o una diana marcada. En aquellos casos, una vez más, el detector puede detectar ya sea luz dispersada (por ejemplo, luz dispersada directa), o fluoróforos, fósforos de conversión ascendente, o puntos cuánticos, o las muestras pueden visualizarse para campo brillante, campo oscuro, fase u otras formas de obtención de imágenes microscópicas (generalmente usando luz de un condensador).

Si el detector está encima de la superficie superior más alta, que recibe luz de la diana marcada, en este caso el electrodo sobre la superficie inferior más alta no necesita ser transparente, mientras que el electrodo sobre la superficie superior más baja debe ser transparente. Si la superficie inferior más alta es opaca, entonces la iluminación debe o bien proceder de encima de esa superficie de electrodo, o generarse en la diana marcada, como podría producirse con quimioluminiscencia. Con una superficie inferior más alta opaca, la iluminación puede estar dentro de la tapa (lo más probablemente para el análisis de luz dispersada), y de otro modo lo más probablemente para luz dispersada o iluminación de excitación para fluoróforos, fósforos de conversión ascendente, o puntos cuánticos. Si el electrodo sobre la superficie inferior más alta es transparente, sin embargo, puede transmitirse luz

desde abajo, que incluye por iluminación de onda evanescente como se ha descrito anteriormente.

Aunque el detector es generalmente un generador de imágenes (por ejemplo, una cámara CCD o CMOS), también puede comprender un escáner de láser con un PMT u otro dispositivo de recogida de luz. En ciertos casos, el detector también puede implicar un dispositivo de recogida de luz general (PMT, fotodiodo, fotorresistor) con iluminación difusa. El último caso será principalmente usado en aquellos casos en los que la señal promedio con respecto a un área proporcione señal adecuada, como se trata más adelante.

Si se usa una cámara CCD o CMOS, la información se obtiene píxel por píxel, generalmente en escala de grises de 8-12 bit, aunque en ciertos casos (por ejemplo, con indicadores codificados por color para diferentes dianas) puede usarse alternativamente una imagen RGB. En aquellos casos en los que sea útil o importante registrar eventos de unión a diana individuales, posiblemente existen dos modos de operación. En un primer modo, la unión a diana está limitada de manera que solo una fracción de los píxeles se registre con una señal – la mayoría de los píxeles están a algún nivel de ruido de fondo, de manera que el cambio del nivel de ruido de fondo a un nivel significativamente por encima del nivel de ruido de fondo en un píxel indica un evento de unión. Dependiendo del tamaño de la diana (y/o su marca), un único evento de unión puede corresponderse con un aumento en la señal por encima del ruido de fondo en varios píxeles contiguos diferentes (la mayor parte del software de procesamiento de imágenes tiene rutinas que pueden agrupar juntas regiones de píxeles contiguos en "eventos" discretos). En este caso, el intervalo dinámico del sistema oscila de menos de 100 dianas y tan pequeño como 1 diana (y está limitado por la variación estadística del pequeño número de dianas), hasta aproximadamente tan alto como el número de píxeles en la cámara dividido entre el número promedio de píxeles por diana (con un suelo de uno), y entonces se divide entre un factor que se aproxima a 10, que es el "punto de saturación" al que nuevas dianas se solaparían más probablemente con dianas existentes en vez de ser depositadas sobre áreas con aproximadamente niveles de ruido de fondo de señal. Para una cámara con 5 megapíxeles, y una diana que engloba aproximadamente 2 píxeles, esto se corresponde con un intervalo dinámico que engloba aproximadamente de 10 a 250.000 dianas, o un alcance del intervalo de 25.000. Este intervalo es adecuado para muchas aplicaciones, y en aquellas aplicaciones para las que se requiere un mayor intervalo dinámico, pueden usarse múltiples diluciones.

En un segundo modo, pueden discriminarse las diferencias entre una única diana y diferentes números de dianas dentro de un píxel. Por ejemplo, si la señal se mide con un píxel de 8 bit, con 256 niveles, y una señal de ruido de fondo es 12, entonces un único evento de unión podría promediar 62, dos dianas en el mismo píxel podrían promediar 112, etc. En este caso, el intervalo dinámico es mucho más alto, y es aproximadamente el número de píxeles por el número de niveles que pueden ser discriminados dividido entre el número promedio de píxeles por diana (con un suelo de uno) y adicionalmente dividido entre un factor de aproximadamente 10, que representa la saturación a la que la unión a diana adicional podría aumentar los niveles en un número significativo de píxeles por encima del nivel de saturación de píxeles. En este caso, siendo 5 niveles capaces de ser discriminados y siendo un número promedio de píxeles por diana 1, el intervalo dinámico es todavía aproximadamente un mínimo de 10 (limitado únicamente por consideraciones estadísticas), pero el nivel superior se extiende ahora a aproximadamente 2,5 millones, o un intervalo dinámico de diez veces adicional del ejemplo previo. La dificultad encontrada con este segundo modo de operación es que cada vez es más difícil distinguir unión específica de no específica basándose en el análisis de imagen - tanto debido a que en promedio cada diana engloba un número más pequeño de píxeles, como debido a que el contraste entre diferentes niveles es generalmente malo.

Aunque estos métodos pueden distinguir eventos de unión individuales, debe observarse que el mayor valor de contar eventos de unión individuales se produce cuando hay unión no específica significativa u otras formas de ruido. Por ejemplo, puede sumarse el ruido de fondo de nivel bajo a lo largo de una gran área para comprender una gran señal de ruido, para la que se requiere que se muestre una gran cantidad de señal específica por encima del ruido de fondo. Sin embargo, en casos en los que las señales son generalmente grandes por encima del ruido de fondo, puede ser conveniente usar un método de suma de señal, en el que la señal se suma ya sea añadiendo los valores de señal en cada píxel, o usando una técnica de suma análoga tal como el uso de un fotodiodo o un fotorresistor o un tubo fotomultiplicador (PMT).

Dinámica de lavado controlada

En la siguiente discusión, se usa el potencial eléctrico entre los electrodos, y mediante el potencial la fuerza electroforética resultante, como un ejemplo de una fuerza vertical sobre la diana 114. Debe observarse, sin embargo, que la modulación de la fuerza también puede efectuarse de maneras similares si se usan otros medios de aplicación de fuerza, tales como fuerza magnética (por ejemplo, sobre las marcas 270 que comprenden partículas magnéticas). Además, las fuerzas también pueden incluir fuerzas horizontales, aplicadas tal como a través de la aplicación de electroforesis lateral, aplicación lateral de campos magnéticos, y diferentes medios de aplicación de fuerzas laterales. Debe observarse que la aplicación de estas fuerzas laterales también puede incluir la introducción de una burbuja de aire o interfase aire-agua similar, ya que estas interfases aplican fuerzas muy grandes a través de la tensión superficial sobre las dianas 114. Debe observarse que la aplicación de estas fuerzas puede ser con forma, de manera que las fuerzas no son ni verticales ni horizontales, pero pueden tener aspectos de ambas, tal como se muestra en la FIG. 5.

Como se describe en las FIG. 28A y 28B, la fuerza de lavado se aumenta gradualmente con el tiempo, con

detección en tiempo real de la unión que se produce como se ha descrito anteriormente. La dinámica de cambiar la rigurosidad de lavado se hace en etapas graduales fijas en su forma más simple. La FIG. 28A es un gráfico del potencial de lavado en función del tiempo para una función de lavado de etapa simple. El eje horizontal es el tiempo, y el eje vertical es el potencial del electrodo de sondas 200 con respecto al de un electrodo de referencia. En el periodo inicial, el potencial es cero o bajo, en cuyo caso no hay fuerza de lavado. La señal detectada representa la suma total de la unión específica y no específica de diana de marca a la sonda 116. Después de un tiempo T₉, el potencial negativo en el electrodo de sondas 200 se aumenta un valor V₁ en la función de escalón irregular. Después de algún periodo a este potencial más alto, generalmente en el orden de cientos de milisegundos (aunque un periodo tan pequeño como décimas de milisegundos y un periodo tan grande como segundos), se produce la detección en tiempo real. El aumento de etapa en el potencial negativo se repite varias veces hasta que se produce el potencial máximo requerido. El máximo potencial generalmente se determinará actualmente como la fuerza con la que toda la diana de marca específicamente unida se suelta de la sonda 116. El número de etapas de aumento de potencial es seleccionado por el usuario, y será determinado por factores tales como el intervalo de diferentes fuerzas de unión entre dianas de marca y sondas 116 presentes en el electrodo 200. Debe observarse que las etapas de potencial no necesitan ser de igual tamaño, ni los periodos de tiempo T₉ tampoco necesitan ser necesariamente iguales.

La unión entre la diana marcada 275 y la sonda 116 puede ser compleja. Considerar la FIG. 29A como se describe en el presente documento, un diagrama esquemático de una diana marcada 275 que comprende una diana de ADN monocatenario 470 que se une a una sonda de ADN complementario 480, que está unida al sustrato 120 en un único punto de unión 117. Como puede apreciarse, la fuerza electroforética ejercida sobre la marca electroforética 270 tenderá a un desenmarañamiento del ADN diana 470 de la sonda de ADN complementario 480 de una manera directa. La FIG. 29B, como se describe en el presente documento, es un diagrama esquemático de una diana marcada 275 que comprende una diana de ADN monocatenario 470 que se une a una sonda de ADN complementario 480, que está unida al sustrato 120 en múltiples puntos de unión 117. En este caso, la fuerza ejercida sobre la marca electroforética 270 no produce necesariamente directamente la liberación de la diana 470, debido a que la diana 470 está limitada por la sonda 480 dentro de los puntos de unión 117. Debido a las limitaciones topológicas y los múltiples puntos de fuerza, la diana 470 debe ser suavemente eliminada de la sonda 480. Esto puede llevarse a cabo por diversos medios como se describe a continuación.

Debe también apreciarse que los electrodos de la celda pueden posiblemente participar en reacciones electroquímicas que limitan los potenciales a los que la celda puede ser operada. Por ejemplo, si los electrodos comprenden óxido de indio y titanio, potenciales de solo por encima de 1 voltio pueden producir el deterioro del electrodo. Si se requieren potenciales de mayor voltaje con el fin de separar la diana 114 de la sonda 116, los potenciales de voltaje pueden aplicarse durante un periodo muy corto--que puede ser diez milisegundos, e incluso más preferentemente un milisegundo, e incluso más preferentemente 100 microsegundos, durante ese tiempo la diana 114 puede separarse de la sonda 116, pero que es una duración tan corta que puede producirse relativamente poca reacción del material del electrodo. En periodos intermedios, en los que se mantiene un potencial de voltaje que no produce reacciones electroquímicas que implican al electrodo, puede medirse la cantidad de diana 114 unida a la sonda 116.

La FIG. 28B es un gráfico del potencial de lavado en función del tiempo para una función de lavado escalonada. En este caso, el potencial global entre diferentes etapas de lavado es la misma diferencia de potencial V₁ que se usa en la FIG. 28A. Sin embargo, en lugar de una función de etapa, el potencial se aumenta gradualmente con el tiempo. El aumento en el potencial puede ser lineal, exponencial, o de otro modo. Alternativamente, el aumento en el potencial no necesita ser monótonico, y puede comprender una serie de etapas crecientes y decrecientes que llegan a las posibilidades deseadas de la rigurosidad prevista.

Además, las "mesetas" de potencial intermedio se dividen en dos etapas de tiempo discretas. En una primera etapa de tiempo, TD, se deja que la diana 114 y la sonda 116 se disocien al potencial más alto. Sin embargo, se desea reducir la tasa de disociación durante el proceso de detección, de manera que el potencial pueda reducirse durante un tiempo TC (por ejemplo, durante la captura de imágenes), mientras que se detecta la diana unida 114.

El vector de dirección del campo eléctrico usado para el lavado no necesita estar en una dirección, sino que puede ser útilmente variado para ayudar a eliminar la diana 470 de la sonda 480, como se ilustra en las FIG. 30A y B. La FIG. 30A es un diagrama en vista lateral esquemático de dos electrodos de referencia E10 y E11 con respecto al electrodo de sondas E12. La FIG. 30B es un gráfico del potencial de electrodo E12 con respecto a los dos electrodos de referencia E10 y E11 como se muestra en la FIG. 30A para dos etapas en la rigurosidad de lavado. El potencial relativo del electrodo E10 con respecto al electrodo E12 se da por una línea de puntos, el potencial relativo del electrodo E11 con respecto al electrodo E12 se da por una línea discontinua, y donde los potenciales relativos se solapan, se muestra una línea discontinua y de puntos. Durante un periodo inicial, el potencial con respecto al electrodo E10 es alto, y el potencial con respecto al electrodo E11 es cero. A continuación, el potencial con respecto al electrodo E11 es alto, mientras que el potencial con respecto al electrodo E10 es pequeño. A continuación, los potenciales para ambos electrodos E10 y E11 están dispuestos en un nivel intermedio. Durante estas tres etapas, la dirección del campo eléctrico varía de indicar al electrodo E10, al electrodo E11, a una posición intermedia entre los dos. La diana 470 que está estéricamente enmarañada, ya sea con la sonda 480, o alternativamente con los

conectores 118, u otro material que esté en la superficie 120, puede generalmente ser arrastrada en la dirección que la liberará, si está unida específicamente o no específicamente. En etapas de tiempo T10 posteriores, como se muestra en la figura, pueden aplicarse fuerzas más altas en las diferentes direcciones. Además, en lugar de aplicar las fuerzas como funciones de etapa, pueden aplicarse como funciones de tiempo escalonado (lineales, exponenciales, u otras) y también pueden ser no monotónicamente aplicadas y aplicadas durante duraciones variables para proporcionar el efecto deseado.

Debe observarse que el potencial necesario para separar la diana marcada 275 de la sonda 116 depende de la carga sobre la marca electroforética 270. Además, puede ser menos conveniente si el potencial que se necesita aplicar varía a lo largo de grandes órdenes de magnitud sobre las sondas 116 fijadas dentro de una matriz 180, ya que se requerirá un mayor número de diferentes lavados de rigurosidad. Así, es conveniente si la marca electroforética 270 se corresponde aproximadamente con la fuerza de unión entre la diana asociada 114 y la sonda 116. Por ejemplo, un par diana-sonda con una fuerza de unión más fuerte estará convenientemente emparejada con una marca electroforética de carga electrostática mayor, de manera que se necesitaría aplicar más de aproximadamente el mismo potencial de voltaje para separar el par diana-sonda.

Aunque las dinámicas de lavado de la sección previa tratan con fuerzas electrostáticas o electroforéticas, pueden aplicarse otras fuerzas de discriminación y condiciones con el uso de detección en tiempo real, que incluyen conductancia, pH, disolventes y ligandos de competición. Tales condiciones pueden aplicarse adicionalmente, ya sea de una forma escalonada, o en un gradiente continuo, y pueden aplicarse usando bombas mecánicas, mecanismos electroosmóticos, u otros mecanismos de transporte. Además, estas condiciones pueden aplicarse en combinación entre sí, o también en combinación con las fuerzas electrostáticas y electroforéticas descritas anteriormente. Debido a que es difícil a veces cambiar reproduciblemente, por ejemplo, el pH de una solución en un modo de gradiente, especialmente en los formatos muy pequeños usados en muchos de los métodos y sistemas de la presente invención, es útil poner dentro de la matriz 180 varios pares de diana 114-sonda 116 cuya unión se rompe a condiciones conocidas, sirviendo así de controles internos para verificar qué condiciones específicas están siendo alcanzadas.

Detección de organismos y determinación de la sensibilidad de agentes anti-organismos

Visión general

Es importante determinar la identidad de bacterias con respecto a los patógenos de los alimentos, agentes de guerra biológica, y varias enfermedades animales y humanas. Además de la rápida y sensible detección de estas bacterias, en el caso de enfermedad animal y humana, es de gran beneficio determinar adicionalmente la susceptibilidad de los microorganismos a antibióticos, antifúngicos, y otros agentes médicos. Bacterias que son de particular interés son patógenos humanos, que incluyen bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, y otros patógenos humanos encontrados en la práctica médica. La presente invención es muy adecuada para la presente aplicación.

Los métodos y sistemas de la presente invención se refieren a la detección de microorganismos y no se limitan a bacterias; pueden usarse también en la detección de algunos hongos (por ejemplo, *Candida* y *Aspergillus*), virus y micoplasma. También en el presente documento se describen sistemas y métodos de detección que pueden usarse en la detección de otros tipos de organismos, y pueden incluir la detección de células de animales, tales como en la detección de tipos de células metaplásicos u otros tipos de células de enfermedad. En la discusión más adelante, el uso de bacterias pretende ser un ejemplo solo, y que la discusión es para incluir otros microorganismos también. Debe observarse que en la discusión anterior, la diana 114 puede ser generalmente sin limitación bacterias y otros microorganismos, como se trata más adelante. La discusión a continuación expande el detalle e introduce nuevos métodos y dispositivos con los que la aplicación de los métodos y dispositivos anteriores se aplican a bacterias y otros microorganismos. Otros organismos también se describen en el presente documento.

La FIG. 31 es un diagrama de flujo de bloques del proceso para determinar la identidad, número y susceptibilidad a antibióticos de bacterias en una muestra. En una primera etapa 700, la muestra se concentra opcionalmente, que es necesario en muchos casos en los que la muestra bacteriana está presente en un gran volumen de líquido. Una etapa 700 tal generalmente se realizará cuando la muestra esté en un volumen de más de 10 mililitros, y frecuentemente cuando la muestra esté en un volumen de tan solo 500 microlitros. El motivo de esto es que, dependiendo del sistema, el volumen de muestra que va a ponerse en el sistema de detección puede limitarse a tan solo 100 microlitros, aunque otros sistemas pueden manipular cantidades mucho mayores, con muestras en los muchos mililitros. La concentración realiza dos funciones. En primer lugar, aumenta la relación de número de bacterias con respecto a volumen de la muestra, de manera que pueda usarse la mayor fracción posible de la muestra en el sistema. Un segundo motivo es que las bacterias pueden estar en un líquido cuyas propiedades eléctricas u otras son incompatibles o no óptimas para el sistema de detección. Por ejemplo, si posteriormente van a usarse métodos electroforéticos, la eficacia de tales métodos mejora generalmente usando tampones de bajo electrolito. En tal caso, el líquido de la muestra bacteriana se sustituirá por un líquido que es más compatible con el sistema.

En una etapa 710, las bacterias son transportadas a una zona de detección, que es donde se localiza el localizador para su uso en etapas posteriores. Las bacterias en este momento no están todavía inmovilizadas, sino que están libres para moverse alrededor en un volumen tridimensional. El transporte a la zona de detección puede llevarse a cabo de muchas formas diferentes, que incluyen transporte físico activo por bombas (por ejemplo, bombas de jeringa de desplazamiento positivo, bombas neumáticas, bombas peristálticas, u otras), por electroosmosis, por gravedad, por electroforesis de las bacterias, u otros medios. Además, la etapa de concentración 700 puede implicar la concentración de las bacterias directamente en la zona de detección, tal como centrifugación de las bacterias en la zona seguido de resuspensión.

En una etapa 720, las bacterias se inmovilizan sobre la superficie de detección. La superficie de detección, debe observarse, puede ser cualquiera específica para un subconjunto de bacterias (por ejemplo, a través de la superficie de unión de anticuerpos específicos para una o más bacterias), o puede alternativamente ser no específica de forma que la mayoría o todas las bacterias en una muestra se unan a la superficie.

Debe observarse que puede haber una única zona o múltiples zonas dentro del sistema. Por ejemplo, en una realización del sistema, puede haber una zona específica para cada cepa bacteriana – distinguida por las propiedades de las superficies de detección respectivas - y el sistema puede comprender incluso docenas de zonas separadas. Alternativamente, todas las bacterias pueden unirse en una única zona no específica. Por tanto, puede ser una combinación de zonas de detección específicas y no específicas, donde las bacterias son primero capturadas en zonas de detección específicas, para ser seguido de captura no específica de todas las bacterias que no se capturaron en las zonas de detección específicas. Debe observarse que si hay múltiples zonas, las bacterias pueden necesitar ser transportadas de una zona de detección a otra zona de detección entre uniones de las bacterias a las superficies de detección respectivas.

Ahora que las bacterias están unidas a la superficie, su disposición es aproximadamente en una distribución bidimensional. Debe observarse que el término bidimensional pretende incluir algún grado razonable de profundidad vertical, dado que la superficie de unión puede ser hasta micrómetros de profundidad (por ejemplo, a través de la incorporación de hidrogel de polímero o materiales similares). Sin embargo, dado que los medios de detección pueden incorporar detectores microscópicos con profundidad de campo limitada, es preferible que la superficie tenga una profundidad topológica de no más de 5 micrómetros, e incluso más preferible que la profundidad sea inferior a dos micrómetros.

La unión de las bacterias a la superficie puede producirse a través de la difusión de las bacterias a la superficie, donde están unidas específicamente o no específicamente. Sin embargo, debido a que la difusión puede ser lenta en las escalas de tiempo generalmente deseables en un sistema tal, se usan medios activos en las realizaciones de la presente invención para la unión de las bacterias. Estos medios pueden comprender el uso de electroforesis o dielectroforesis de las bacterias a la superficie, el uso de fuerzas centrífugas, o incluso la filtración de las bacterias sobre la superficie de detección, en la que la superficie es porosa, pero con poros más pequeños que los del diámetro más pequeño de las bacterias. Una vez las bacterias están en contacto directo con la superficie, se dispone generalmente que el proceso de unión proceso es rápido, que se produce en cuestión de segundos o minutos, si la unión es específica o no específica, aunque se dejan tiempos de unión más largos dentro de la presente invención. Debe observarse que la unión bacteriana generalmente aumenta durante un periodo de tiempo (minutos a horas), tanto con la secreción de moléculas de unión de las bacterias, además de un aumento en el número e intensidad de las uniones que normalmente se acumulan incluso con la unión de material no vivo a superficies - sin embargo, la unión anterior pretende indicar unión tal que las fuerzas de difusión típicas, convección, flujo de fluidos a través del sistema, y tales, sean insuficientes para desalojar las bacterias de la superficie, y que se requiera la aplicación específica de fuerzas deseadas para eliminar las bacterias.

En casos en los que se desea la unión específica de bacterias sobre la superficie de detección, es útil eliminar aquellas bacterias que no están unidas de forma específica a la superficie. Esto se realiza generalmente por la suposición de que todas las bacterias que están unidas específicamente están unidas con un intervalo relativamente estrecho de fuerzas de unión. Así, fuerzas fuera de ese intervalo de unión específico o bien eliminarán las bacterias no específicamente unidas (es decir, aquellas bacterias que están unidas con una fuerza más baja) o bien eliminarán bacterias específicamente unidas, pero no otras (es decir, aquellas bacteria que están unidas con una fuerza mayor). Los tipos de fuerzas que pueden emplearse a este efecto incluyen electroforesis, dielectroforesis, fuerza centrífuga, fuerzas hidrodinámicas (es decir, flujo de fluidos a través de la superficie) y otros medios de aplicación de fuerzas específicas. Además, puede alterarse la intensidad de la unión específica o no específica cambiando las características del medio, tales como la conductancia y el pH.

En una etapa 730, el número de bacterias en cada zona de detección, unidas a la superficie de detección respectiva, se detecta mediante medios automáticos. En general, los medios de contar bacterias serán a través de inspección visual automática de imágenes tomadas de la superficie de detección usando imágenes ampliadas, o a través de medición de la intensidad espectral o intensidad de luz dispersada. Debido a la falta de contraste del índice de refracción entre las bacterias y el medio circundante, la detección de las bacterias puede potenciarse mediante técnicas muy conocidas en la técnica anterior, que incluyen el uso de contraste de fases, contraste de interferencia

diferencial, fluorescencia u otros medios.

Debe observarse que la identificación del serotipo, cepa, especie, género, u otra tipificación específica de las bacterias, se ha llevado a cabo hasta el punto que la unión de las bacterias a la superficie de detección sea específica. Sin embargo, si la superficie de unión es no específica o ampliamente específica (por ejemplo, que tiene especificidad por un intervalo de tipos bacterianos), la identificación puede ser en ese momento incompleta. El uso de tinciones, que pueden incluir el uso de anticuerpos específicos con marcas ópticas (por ejemplo, fluorescencia, dispersión, absorción) o marcas que permiten otras formas de detección (por ejemplo, quimioluminiscencia, radiactivas, redox, conductividad u otros modos de detección), puede ser opcionalmente usado en este momento para determinar el tipo de bacterias unidas a la superficie de detección.

Debe también observarse que en este momento no solo se conocen los números de bacterias determinados por el sistema, sino que también las localizaciones específicas de las bacterias con respecto a la superficie de detección. Debido a que también se conoce el tipo de bacterias (debido a la unión a una superficie específica o debido al uso de una tinción específica), cada bacteria está ahora asociada a una localización y un tipo. Con la estrecha unión de bacterias, esta información será relativamente constante a través de la operación del sistema. La localización indicada anteriormente puede incluir tanto la localización de una bacteria individual, además de la localización de agrupaciones de bacterias, que pueden representar aglomeraciones aproximadamente esféricas, además de cadenas lineales de bacterias.

Debe además observarse que con el fin de que el número de bacterias detectadas por el sistema sea preciso, es preferible que al menos el 50 % de las bacterias en la muestra original de la etapa 700 se unan de forma acumulativa a unas o más de las superficies de detección, e incluso más preferible que se unan más del 80 % de las bacterias. El uso del transporte activo de las bacterias a la superficie de detección en la etapa 720 es un aspecto importante de esta exactitud.

Para su uso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedad, es de gran beneficio conocer no solo cómo muchas bacterias están presentes, sino también determinar la viabilidad de las bacterias, y también su susceptibilidad a diferentes antibióticos, individualmente y en combinación. Las siguientes etapas se emplean en realizaciones de la presente invención.

En una etapa 740, se determina la viabilidad de las bacterias sobre la superficie de detección. En general, esto se realiza en uno de dos medios. En un primer medio, la superficie de detección y las bacterias encima se incuban en presencia de un medio de cultivo, que permite que las bacterias crezcan y se dividan. Cualquier bacteria que pueda ser visualmente determinada que participa en el crecimiento y la división se indica entonces como viable. En un segundo medio, pueden emplearse tinciones vitales y mortales para detectar bacterias que son viables o no viables. Debe observarse que el número total de bacterias es igual a la suma de las bacterias viables y no viables, de manera que el uso de dos medidas de bacterias totales, bacterias viables y bacterias no viables, permitirá el cálculo de la tercera medida.

Debe observarse que ciertos organismos que serían detectados en el modo de la presente invención pueden no ser viables por sí mismos, sino que pueden requerir un hospedador (por ejemplo, para la detección de un virus). En ese caso, la superficie de detección puede comprender células hospedadoras que soportan el crecimiento del virus u otro organismo. En ese caso, la etapa 730 de contar las bacterias se sustituiría por una etapa en la que se contaría el número de células hospedadoras infectadas. Tal etapa de contar se lleva a cabo según las características del virus y el hospedador, y puede incluir la presencia de marcadores de superficie celular indicativos de infección, por cambios en la fisiología del hospedador que resulta de la infección, o a través de lisis o muerte del hospedador.

En una etapa 750, el antibiótico en un medio que soporta el crecimiento puede introducirse en el medio de la zona de detección, de manera que las bacterias estén entonces en presencia del antibiótico durante el crecimiento. Debe observarse que si el organismo que se detecta no es una bacteria, el tratamiento se corresponde con el del organismo. Así, la detección de hongos o levadura se correspondería con el uso de agentes antifúngicos, y la detección del virus se correspondería con el uso de agentes antivirales. Las bacterias se mantienen en presencia del antibiótico durante diferentes tiempos y concentraciones de interés clínico, y las etapas 730 y 740 se repiten después de un periodo de incubación apropiado o periodo de efecto (es decir, el tiempo para que el agente haga efecto, que podría tener lugar en ausencia del antibiótico). Puede realizarse la repetición de las etapas 730, 740 y 750 con el fin de probar la eficacia de diferentes agentes, o diferentes pautas de tratamiento.

Los métodos y el sistema del presente dispositivo se describirán ahora en más detalle.

Concentración de muestras

Las muestras pueden oscilar de un mililitro hasta un litro para ciertos lavados respiratorios, y pueden además oscilar en concentración bacteriana de 10 bacterias a más de 10^6 bacterias por mililitro. Además, la muestra puede estar presente en sangre, orina, esputo, líquido de lavado u otro medio. La concentración de muestras tanto concentra la muestra de manera que las bacterias que están presentes en pequeños números puedan todas ser eficazmente

introducidas en el sistema, además de que así el medio líquido con ruido de fondo pueda normalizarse para tener propiedades coherentes tras la introducción al sistema. Debe observarse, sin embargo, que pueden usarse ciertas muestras sin concentración u otra modificación dentro de la presente invención.

- 5 Pueden usarse métodos convencionales de preparación de muestras en la técnica anterior para este fin, que incluyen filtración y centrifugación, seguido de resuspensión de las bacterias en un fluido pequeño. Debe también observarse que la centrifugación puede ir acompañada de floculación, precipitación o adición de un co-precipitado, y tales métodos son fomentados por que permiten la manipulación de números muy pequeños de bacterias, y previenen la agregación de las bacterias. En cualquiera de estos casos, sin embargo, es preferible que no sea
10 añadido ningún material que quedará como una partícula, especialmente con propiedades (tamaño o densidad) similares a las de las bacterias (por ejemplo, el uso de perlas de polímero).

Otro método de acuerdo con la presente invención es el uso de recogida con un colector eluible. En un sistema tal, la muestra se filtra a través de una matriz que está densamente cargada con un material que no se
15 específicamente a las bacterias. Este material tiene la propiedad adicional de que la propiedad que une las bacterias puede ser invertida a través de medios químicos, enzimáticos o físicos, de forma que las bacterias puedan ser eluidas del material tras la unión. Puede usarse un colector tal tanto para poner las bacterias en un medio uniforme que es apto para etapas adicionales en el método, además de para eliminar material contaminante que tiene diferencias de tamaño o carga de las bacterias que se desean monitorizar.

20 Una realización preferida de esta preparación de muestras es la de un cartucho con volumen de 50-1000 microlitros, y preferentemente inferior a 250 microlitros, en la que está cargada una resina de intercambio iónico. Esta resina se suministra convenientemente en forma de perla, y pueden o bien estar permanentemente cargada (por ejemplo, a través del uso de aminas cuaternarias) o cargarse reversiblemente (por ejemplo, a través del uso de una amina
25 secundaria o terciaria). Además, el tamaño de las perlas (o tamaño de poro de la resina) debe ser tal que en ausencia del grupo de carga, las bacterias fluyan fácilmente a través de los intersticios de la perla, y que los caudales a través de las perlas sean razonables según el volumen de la muestra (las perlas preferentemente serán superiores a 10 micrómetros de diámetro, e inferiores a 2000 micrómetros, y más preferentemente superiores a 20 micrómetros e inferiores a 1000 micrómetros, e incluso más preferentemente superiores a 50 micrómetros e
30 inferiores a 500 micrómetros).

En esta realización preferida, la muestra puede ser comprimida a través del cartucho ya sea sin modificación, o con la adición de un tampón para regular el pH, y/o también en presencia de un detergente preferentemente no iónico, con el fin de reducir la unión no específica de las bacterias a los componentes del sistema o entre sí. Es preferible
35 que el pH sea relativamente neutro (en el intervalo de pH 6 a 8), y en cualquier caso suficiente para que las bacterias mantengan una carga negativa, y que la resina mantenga una carga positiva. Esta carga negativa es típica para la mayoría de las bacterias, pero debe observarse que para cualquier organismo que normalmente está positivamente cargado, una resina catiónica puede ser sustituida por la resina aniónica, y el control de pH será el opuesto al que se describe anteriormente y más adelante para organismos negativamente cargados. Debido a las polaridades opuestas del organismo y la resina, las bacterias que pasan próximas a la resina serán capturadas por
40 interacciones electrostáticas a su superficie y se pegarán. Esto sirve para concentrar las bacterias grandes de un gran volumen con respecto al volumen del cartucho.

Con el fin de liberar las bacterias de la resina, el pH de la solución puede cambiarse de manera que se reduzca la interacción de la resina y las bacterias. Por ejemplo, a un pH alto (es decir, superior al pK de los cationes sobre la resina aniónica), los cationes sobre la resina pierden su carga, y, por tanto, su capacidad relativa para capturar las bacterias. Alternativamente, a un pH bajo, los aniones sobre las bacterias que dan lugar a su carga negativa están protonados, y, por tanto, pierden su atracción a la resina.

50 Es importante encontrar condiciones en las que las bacterias se unan, y otras en las que las bacterias puedan ser liberadas. Con el fin de mediar en la intensidad de atracción de las bacterias y la resina, otros factores que pueden modularse incluyen la fuerza iónica de la solución (es decir, los contraiones tenderán a reducir la atracción electrostática), usándose el grupo funcional catiónico en la resina de intercambio aniónico (por ejemplo, amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria), o la densidad de los cationes sobre la superficie de la resina (es decir, el reducir la densidad generalmente reducirá la atracción de las bacterias a la resina).
55

Las bacterias pueden en general eluirse de la resina en un volumen no significativamente diferente de aquél del cartucho, y teniendo cuidado de no mezclar la solución que eluye, incluso más pequeña que la del cartucho. En general, después de la elución del cartucho, la solución se neutralizará, preferentemente con un tampón de ión
60 bipolar de manera que la conductancia del tampón no aumente demasiado. Otras propiedades del medio resultante puede ajustarse según se necesite, que incluye fuerza iónica, conductancia, la presencia de tensioactivos, la presencia de nutrientes o factores de crecimiento para las bacterias, y el pH. En general, como se tratará más adelante, es preferible que las bacterias estén en una solución de conductancia relativamente baja. Dado que la elución se realizará a pH ya sea por encima de 3 o por debajo de 11, es probable que la solución neutralizada resultante tenga una fuerza iónica inferior a sal 10 mM, que es preferible para las etapas posteriores.
65 También es conveniente como parte de o antes de la etapa de concentración realizar un pre-filtrado con el fin de

eliminar contaminantes más grandes, mientras que se permite el paso de las bacterias que van a monitorizarse. Tales filtros pueden comprender nitrocelulosa, nailon, celulosa, u otras membranas, filtros de perlas, u otros filtros como pueden ser convenientes. En una realización, el colector eluible anterior puede servir tanto como una resina de intercambio iónico, además de un filtro de tamaño. Incluso en casos en los que no se usen los colectores eluibles, es todavía conveniente usar un filtro de tamaño para eliminar contaminantes no bacterianos. Además, también es conveniente, dependiendo de la fuente de la muestra y la naturaleza de los contaminantes, usar un filtro de tamaño que elimine contaminantes más pequeños que las bacterias en la muestra; esto puede no ser un problema para el detector, pero los contaminantes más pequeños pueden competir con las bacterias por lugares sobre las superficies a las que bacterias pretenden unirse, reduciendo la unión de las bacterias.

Transporte a la zona de detección y unión a la superficie de detección

La zona de detección está convenientemente dentro de una celda cerrada, y comprende una o más superficies sobre las que las bacterias se inmovilizarán y detectarán. Un formato general para una celda de detección se muestra en la FIG. 32A, que es un diagrama esquemático desde arriba de una celda 804 de detección bacteriana, y en la FIG. 32B, que es un diagrama esquemático en vista lateral de la celda de detección bacteriana de la FIG. 32A a través de la sección transversal X.

La celda 804 comprende dos cámaras 805, de las que puede haber tan solo una y decenas o incluso cientos. Cada cámara se usará tanto para manipular una muestra bacteriana diferente, como para manipular una al lado de la otra una única muestra, en la que las bacterias se tratarán con diferentes medios de cultivo, antibióticos u otros agentes anti-organismos, perfiles de concentración de antibióticos, temperaturas, u otras condiciones físicas, químicas o biológicas a las que se someterán las bacterias. Las cámaras 805 se muestran como cerradas en todos los lados, pero es coherente con la presente invención que la cámara esté abierta, tal como en un formato de un pocillo de placa de microtitulación. Si la cámara 805 está cerrada, se proporcionan un puerto de entrada 803 y un puerto de salida 802 para cambiar la solución dentro de la cámara 805.

El tamaño de la cámara 805 puede variar, pero es preferible que la anchura sea 200-5000 micrómetros, y más preferentemente 500-2000 micrómetros, y lo más preferentemente 500-1000 micrómetros, y es preferible que la altura (es decir, la distancia entre los electrodos) sea 100-2000 micrómetros, y más preferentemente 200-1000 micrómetros, y lo más preferentemente 250-500 micrómetros, y es preferible que la longitud sea preferentemente de 0,5-20 mm (dependiendo, en parte, del número de zonas de captura, como se tratará después). Estas dimensiones están principalmente relacionadas con la manipulación de fluidos (por ejemplo, cuanto más grande sea el volumen, más fácil es manipular volúmenes de muestra más grandes), la óptica del detector (por ejemplo, si se desea ver bacterias individuales, entonces el aumento debe ser de una cierta cantidad, que reduce el campo de vista), la velocidad a la que las bacterias pueden moverse verticalmente (por ejemplo, dependiendo del flujo de las bacterias a través de la cámara, la velocidad de movimiento debe ser lo suficiente grande para permitir la deposición sobre las superficies apropiadas antes de que las bacterias abandonen la celda), y el intervalo dinámico del detector (por ejemplo, el número de bacterias que pueden "estar planas" sobre la superficie y ser distintas en el detector).

La aplicación de dispositivos de microfluídica es muy conocida en la técnica, y puede observarse, por ejemplo, en los servicios y productos de Micronics, Inc. de Redmond, WA, y CFD Research Corporation of Huntsville, AL. Estos dispositivos pueden manipular cantidades muy pequeñas de material, que pueden ser fracciones de un nanolitro, y que comprenden componentes que pueden tener múltiples funciones que incluyen inyección de muestras, microdispensación, concentradores, multiplicadores, separadores, sensores, flujo accionado por presión, electroosmosis, electroforesis, dielectroforesis, transporte de partículas, detección electroquímica, electromagnética para mover partículas paramagnéticas, y más. Estas tecnologías de microfluídica son muy adecuadas para la presente invención.

En las cámaras 805, se usan un ánodo 816 y un cátodo 815 para crear una zona en la que la colocación de un potencial sobre los electrodos 816 y 815 hará que se produzca, en presencia de un tampón adecuado, la electroforesis. Aunque no se requiere, es preferible que los electrodos 815 y 816 sean paralelos; en la presente invención, los electrodos están en paredes opuestas de la cámara. Esto se proporciona para facilitar la fabricación, además de causar que los campos electroforéticos que se generarán sean perpendiculares a la superficie de los electrodos y que produzcan incluso el movimiento de bacterias a los electrodos respectivos. Al menos uno de los electrodos 815 o 816 será en gran medida transparente, hasta el punto que las bacterias puedan ser detectadas a través del electrodo por medios de detección visual, como se describirá más adelante. Superficies conductoras transparentes que pueden servir de electrodo transparente incluyen películas pulverizadas de ITO, y tintas conductoras transparentes impresas, tales como las tintas S-100 y P-100 proporcionadas por Sumitomo Osaka Cement. El electrodo no transparente puede comprender recubrimientos metálicos evaporados (oro, plata, aluminio), pero el material de electrodo preferido es platino u otros metales refractarios, que pueden ser chapados por diversas formas de deposición química o física de vapor.

En el ánodo 816 están colocadas superficies de captura 820, sobre las que se adherirán las bacterias. Estas superficies de captura tendrán agentes de captura con afinidad específica por diferentes bacterias, aunque algunos de los agentes de captura tendrán, como se describirá después, afinidad general por las bacterias o por grandes

agrupaciones de bacterias. Para afinidad específica, la afinidad se proporciona generalmente por preparaciones de anticuerpo, que pueden ser policlonales o monoclonales, con especificidad por un pequeño número de bacterias, o puede alternativamente proporcionarse mediante aptámeros, u otras moléculas de afinidad específica. También está presente una superficie de carga 810, sobre la que las bacterias pueden opcionalmente concentrarse antes del movimiento a las superficies de captura 820. La superficie de carga 810 puede tener una atracción débil o reversible por las bacterias, que residirán sobre la superficie 810 durante un periodo de tiempo, o la superficie de carga 810 puede tener atracción específica muy baja o no específica por las bacterias. Alternativamente, la superficie de carga 810 puede no tener atracción por las bacterias, pero se mantendrá próxima a la de la superficie de carga mediante campos electroforéticos, como se tratará más adelante. En general, otras superficies de la cámara 805, que incluyen aquellas áreas del ánodo 816 entre la superficie de carga 816 y las superficies de captura 820, o entre las diferentes superficies de captura 820, tendrán muy baja unión a bacterias, tal como aquella proporcionada por recubrimientos OptiChem (Accelr8 Technology Corporation, Denver, Colorado). Esta baja unión se confiere generalmente por un recubrimiento aplicado a los electrodos 815 y/o 816, en los que el recubrimiento tiene preferentemente componentes de polietilenglicol, poliácridamida u otro polímero de baja energía superficial. Preferentemente, este polímero ha sido funcionalizado (por ejemplo, con N-hidroxisuccinimida, tiol, epoxi, hidracina, o grupos amino, o con biotina o avidina) de forma que puedan unirse agentes que se enlazan específicamente o no específicamente con las bacterias, para conferir a las superficies de captura sus atractivas características con bacterias.

Las bacterias pueden presentar alta unión no específica después del contacto con una superficie relativamente no atractiva, especialmente después de estar en contacto con esa superficie durante un periodo de tiempo. Algo de esta unión viene con la expresión de proteínas de unión a bacterias, y puede incluir, por ejemplo, diversas proteínas adhesinas. Con el fin de reducir la cantidad de unión no específica, en aquellos casos en los que no se desea la unión no específica (por ejemplo, a la superficie de carga 810, o a medida que las bacterias están siendo movidas entre superficies de captura específicas 820 a las que normalmente no se unen), puede ser conveniente usar diversos agentes que pueden reducir esta unión no específica no deseable, que incluye el uso de anticuerpos bloqueantes que se unen a las adhesinas, el uso de diversos agentes de unión a adhesina, tales como galabiosidos, globotetraosas y tetrasacáridos, o el uso de diversos detergentes (y preferentemente detergentes no iónicos) para reducir esta unión. Además, la unión de las bacterias a superficies es sensible a tanto el tiempo de residencia, además de a la fuerza con la que las bacterias son dirigidas sobre la superficie. Reduciendo la fuerza electroforética, o reduciendo el tiempo durante el cual las bacterias se dirigen al electrodo por electroforesis, puede modularse la fuerza de unión no específica. Además, se ha encontrado que colocando una carga sobre el electrodo que tiene la misma polaridad que la de las bacterias también puede reducirse la unión no específica.

La atracción de la superficie de captura 820 por las bacterias puede ser altamente específica o relativamente no específica, considerando el tipo de bacterias. Por ejemplo, la superficie 820 puede comprender polímeros policatiónicos no específicos (por ejemplo, polietilenimina o polilisina), anticuerpos específicos para serotipo, género, especies o clase, aptámeros, proteínas de unión a glucoproteína, u otros.

Aunque se muestra que solo hay un único cátodo 815 y un único ánodo 816, en una realización, puede haber múltiples electrodos, que pueden ser direccionables por separado, especialmente en el caso del ánodo 816. En tal caso, pueden colocarse ánodos 816 individuales aproximadamente en las mismas localizaciones que las diferentes superficies de captura 820. En la siguiente discusión, donde se indica que las bacterias están siendo electroforéticamente transportadas a una superficie de captura 820 particular o superficie de carga 810, o una fuerza está siendo dirigida lejos de dicha superficie, esto puede llevarse a cabo tanto activando el único electrodo 815 y 816 como se muestra, o alternativamente activando electrodos separados que se encuentran debajo de las superficies respectivas. La FIG. 32C es un diagrama esquemático en vista lateral de la celda de detección bacteriana de la FIG. 32B con el uso de electrodos direccionables. Debe también observarse que el uso de estos electrodos direccionables puede usarse para crear fuerzas electroforéticas horizontales, de forma que las bacterias que están unidas a la superficie de carga 810, por ejemplo, bajo la influencia de un electrodo direccionable 817A y un electrodo direccionable 819A, puedan ser movidas a la primera superficie de captura 820 colocando ambos electrodos 817A y 819A bajo un potencial negativo relativo, además del electrodo 817B, mientras que se coloca el electrodo 819B a un potencial positivo relativo, de forma que las líneas de campo de fuerza electroforética transporten las bacterias de la superficie de carga 810 a la primera superficie de captura 820. Debe observarse que hay varias disposiciones de electrodos diferentes que tendrían efectos similares, que incluyen el uso de cátodos direccionables 817 y ánodos direccionables 819 que están desplazados el uno del otro horizontalmente, o que hay una multiplicidad de cátodos direccionables 817 que se activan a diferentes grados con el fin de formar los campos de fuerza electroforética de manera que se proporcione una distribución relativamente uniforme de bacterias sobre la superficie de captura 820. También puede ser beneficioso en ciertas circunstancias tener las bacterias distribuidas en una forma no uniforme sobre la superficie de captura 820. Por ejemplo, en el caso en el que el número de bacterias pueda oscilar en números mayores del intervalo nominal del sistema con distribución de bacterias uniforme, por tener una distribución no uniforme sobre la superficie de captura 820, pueden usarse áreas de escasez relativa de bacterias cuando el número de bacterias en la muestra sea alto, mientras que pueden usarse áreas de concentración relativa cuando el número de bacterias en la muestra sea bajo.

Debe observarse que las distancias verticales representadas por los electrodos 815 y 816 y por las superficies 810 y 820 no están dibujadas a escala. Aunque la separación entre los electrodos generalmente será cientos de

micrómetros, las dimensiones verticales de los electrodos 815 y 816 generalmente se medirán en décimas de nanómetros, y las superficies 810 y 820 serán nanómetros a décimas de nanómetros de espesor. El tamaño de la superficie 810 y 820 puede variar enormemente dentro de la presente invención, pero es preferentemente cientos de micrómetros hasta 5 milímetros en cualquier dimensión del diagrama en vista desde arriba. Asimismo, la distancia que separa las superficies 810 y 820 puede variar enormemente, pero preferentemente será entre 5 micrómetros o de hasta 1 milímetro, y más preferentemente será entre 50 y 200 micrómetros.

Las FIG. 33A-D son vistas esquemáticas laterales del transporte y captura de bacterias usando la cámara de las FIG. 32A-B. En la FIG. 33A, se introducen bacterias de dos tipos (indicadas por las estrellas 830 y 835 y los diamantes 840) en la cámara 805 mediante el puerto de entrada 803 (la diferencia entre los símbolos de bacterias que están rellenos o son blancos se describirá más adelante).

Se aplica un potencial a través del ánodo 816 y el cátodo 815 de forma que se cree la electroforesis entre los dos electrodos. Esta electroforesis puede ser acelerada usando agentes químicos como se ha descrito anteriormente. Opcionalmente, puede colocarse un cátodo adicional fuera del otro puerto 803 para crear un campo de inyección que promueve el movimiento de las bacterias en la cámara 805, como se tratará más abajo en más detalle.

A medida que las bacterias 830, 835 y 840 pasan el principio del ánodo 816, se mueven hacia el ánodo basándose en su carga generalmente negativa. Debe observarse que la carga negativa de las bacterias puede, de algún modo, ser modificada por el pH del medio en el que tiene lugar la electroforesis. Hasta el punto que algunas bacterias pueden tener una carga neutra o ligeramente positiva en un medio, es conveniente elevar el pH del medio para conferir a las bacterias una carga más negativa.

El movimiento de las bacterias 830, 835 y 840 es a una velocidad dependiente de muchos factores, que incluyen el potencial entre los electrodos 815 y 816, la conductancia del medio y la presencia de agentes químicos para acelerar la electroforesis, y simultáneamente, hay movimiento del medio a través del nuevo medio (con o sin bacterias) en el puerto de entrada 803 y fuera del puerto de salida 802. Como se ha mencionado anteriormente, el uso de electrodos direccionables 815 y/o 816 puede usarse para también promover el movimiento de las bacterias. El equilibrio del movimiento vertical (por ejemplo, mediante electroforesis) y movimiento horizontal (por ejemplo, mediante movimiento de fluidos, electroforesis, u otros medios) debe ser tal que las bacterias se pongan en contacto con la superficie de carga 810. Sobre la superficie de carga, las bacterias pueden o bien ser prevenidas del movimiento horizontal ya sea por fuerzas electrostáticas débiles (por ejemplo, mediante una carga electrostática débil sobre la superficie) sobre la superficie de carga 810, o mostrarán movimiento reducido debido a flujo de fluidos más bajo cerca de la superficie en presencia de una fuerza electroforética hacia abajo a la superficie de carga 810. Estas fuerzas generalmente serán ortogonales o casi, que es conveniente ya que esto permite el ajuste independiente del movimiento de las bacterias en tanto las direcciones verticales como horizontales. En aquellos casos en los que es necesario mayor movimiento horizontal, por ejemplo, una mayor fuerza vertical puede compensar parcialmente o completamente.

El fin de la superficie de carga 810 es poner las bacterias en un volumen muy pequeño sobre la superficie de captura, como se muestra en la FIG. 33B, y compensar una muestra diluida. Una vez se recogen todas las bacterias sobre la superficie 810, entonces se realiza más fácilmente su movimiento sobre superficies de captura 820 específicas.

En la FIG. 33C, las bacterias se mueven desde la superficie de carga sobre una superficie de captura específica 820. Si la superficie de carga 810 tiene una atracción electrostática por las bacterias, la fuerza electrostática se invierte, como se tratará más abajo en más detalle. Si las bacterias se mantienen cerca de la superficie de carga 810 únicamente en virtud del campo electroforético, este campo es o bien apagado, reducido, o incluso invertido.

Las bacterias se mueven entonces horizontalmente a lo largo de la cámara 805 mediante el movimiento del fluido, movimiento que puede llevarse a cabo mediante electrosmosis, bombas de desplazamiento positivo, bombas peristálticas, u otros medios. Este movimiento está coordinado con la aplicación adicional de electroforesis vertical, coordinación que puede ser simultánea o secuencial. Es decir, en la coordinación secuencial, el movimiento de fluidos puede realizarse durante un cierto periodo, y entonces seguido de un periodo de no movimiento de fluidos durante el cual se aplica la electroforesis, o la electroforesis puede aplicarse durante el movimiento en coordinación simultánea. En el último caso, la velocidad del movimiento o la magnitud de la fuerza electroforética puede variarse, de forma que las bacterias no se muevan más de la anchura de una superficie de captura 820 antes de ponerse en contacto con la superficie 820. De hecho, es preferible que todas las bacterias no se pongan en contacto con la superficie de captura 820 en su borde delantero (es decir, a la izquierda en la figura), de manera que haya una distribución más uniforme de bacterias sobre la superficie de captura 820.

En lugar de las bacterias 840 que se mueven horizontalmente a través de la cámara 805, las bacterias pueden alternativamente moverse en un modo en "zig-zag" si se usan electrodos direccionables correspondientes a las diversas superficies 810 y 820A-E. Es decir, las bacterias 840 pueden moverse de la superficie de carga 810 al electrodo 815 por el apropiado potencial que se pone sobre el electrodo direccionable debajo de la superficie de carga 810, y después, las bacterias 840 pueden moverse a la primera superficie de captura 820A poniendo un

potencial positivo sobre el electrodo debajo de la superficie 820A y un potencial negativo sobre el electrodo 815. Entonces, las bacterias 840 pueden moverse sucesivamente de las superficies de captura 820A-E al electrodo 815 y de ahí a la siguiente superficie de captura 820B-E. Esto tiene la ventaja de que las bacterias 840 no se acumulan en los bordes delanteros de las diversas superficies de captura 820 (es decir, se pegan a la primera parte de la superficie que encuentran), sino que están más uniformemente distribuidas sobre las superficies de captura 820. Este efecto puede ser adicionalmente fortalecido usando electrodos direccionables que sustituyen el único electrodo 815, en los que estos electrodos direccionables pueden estar o bien directamente encima de los electrodos direccionables correspondientes debajo de las superficies de captura 820, o alternativamente pueden estar escalonados con respecto a las superficies de captura 820 en la dirección horizontal.

Como puede apreciarse en la FIG. 33C, en la superficie de captura 820A más a la izquierda, solo las bacterias 840 están unidas, mientras que las bacterias 830 y 835 no se unen en esta superficie. En la FIG. 33D, como el proceso se repite y la muestra bacteriana se pone en contacto con superficies de captura 820 adicionales, las bacterias 830 y 835 están ahora unidas a la superficie de captura 820C.

Una realización alternativa se muestra en las FIG. 34A-D, que son diagramas esquemáticos en vista lateral del transporte electroforético a las superficies de detección. En la FIG. 34A, se pone en contacto una muestra bacteriana en medio de bajo electrolito 882 con un medio de alto electrolito 880 con una interfase 890 formada entre ellos en aproximadamente la localización donde un puerto de entrada de muestra 895 cruza la cámara, que tiene un puerto de entrada alternativo 896. Esta interfase puede formarse por el movimiento de la muestra de medio de bajo electrolito a través del puerto de entrada de muestra 895 hasta que cruce aproximadamente la cámara, y entonces por el movimiento del medio de alto electrolito a través del puerto de entrada alternativo, mientras que se previene la retro-presión del movimiento del medio de bajo electrolito 882 de nuevo en el puerto de entrada de muestra 895. Debe observarse que aunque la interfase 890 se muestra como afilada y perpendicular al puerto de entrada de muestra, la orientación y posición específicas de la interfase 890 pueden variarse dentro de la presente invención. Por tanto, las diferencias en la velocidad de movimiento de bacterias entre el medio de alto electrolito y el medio de bajo electrolito están relacionadas con la relación de las conductividades en los dos medios. Es preferible que la diferencia en las conductividades sea superior a 10 veces, e incluso más preferible que la diferencia sea superior a 50 veces, e incluso más preferible que las diferencias sean superiores a 200 veces.

Se coloca un cátodo 910 en la muestra perfectamente dentro del puerto de entrada de muestra 895, distal con respecto a la cámara de muchas o todas las bacterias 830 y 840. Se coloca un ánodo 900 después de la última superficie de captura 820. La colocación del ánodo 900 y el cátodo 910 puede variarse dentro de la operación de la presente invención, pero debe ser tal que las bacterias 830 y 840 y superficies de captura 820 deban estar entre el ánodo 900 y el cátodo 910. De hecho, tanto el ánodo 900 como el cátodo 910 pueden estar fuera de la cámara.

En la primera etapa de operación, mostrada en la FIG. 34B, se aplica un potencial entre el ánodo 900 y el cátodo 910. Debido a que la resistencia en el medio de alto electrolito 880 es muy baja, la caída de potencial es principalmente a través del medio de bajo electrolito 882. Por lo tanto, las bacterias 830 y 840 se moverán rápidamente a través del medio de bajo electrolito, hasta que lleguen a la interfase 890, punto en el que su movimiento es significativamente ralentizado. De hecho, usando una gran diferencia en la conductancia de los dos electrolitos 880 y 882, es posible que el movimiento en los dos electrolitos se diferencie en el movimiento muchos órdenes de magnitud. Así, las bacterias 830 y 840 tenderán a concentrarse en la interfase 890 como se muestra en la FIG. 34B.

En la FIG. 34C, las bacterias 830 y 840 se mueven en una dirección inversa (de nuevo hacia el electrodo 910) invirtiendo el potencial, de manera que las bacterias se muevan lejos de la interfase. La distancia que las bacterias pueden moverse puede ser bastante corta (por ejemplo, cientos de micrómetros) o lejos (por ejemplo, centímetros) dentro de la presente invención. En este momento, el medio de alto electrolito se elimina empujando el medio de bajo electrolito a través del puerto alternativo 896, de forma que el sistema entero sea ahora medio de bajo electrolito, y el sistema esté en una posición similar a la mostrada en la FIG. 33A, con las bacterias que van a introducirse en el sistema.

Otra realización de la presente invención se muestra en las FIG. 35A-D, que son diagramas esquemáticos en vista lateral de una cámara en la que se distingue el material contaminante basándose en su comportamiento bajo campos electroforéticos. En este caso, se muestran cuatro tipos de material, que incluyen bacterias 830 y 840, además de un primer contaminante 837 y un segundo contaminante 839. En la FIG. 35A, los cuatro materiales son transportados a la superficie de carga 810, produciendo una situación similar a la de la FIG. 33B. En este caso, la superficie de carga 810 está establecida de forma que tenga una atracción por los materiales 830, 840, 837 y 839, y que todos los materiales se unan a la superficie 810.

En la FIG. 35B, la polaridad de los electrodos 815 y 816, de forma que el material se dirija hacia el electrodo 815. El material 837 tiene o bien una atracción generalmente más baja a la superficie de carga 810, o experimenta una fuerza electrostática mayor con respecto a los otros materiales, de forma que se elimine de la superficie 810 aunque los otros materiales sigan unidos. En la FIG. 33C, el potencial sobre los electrodos 815 y 816 aumenta de forma que las bacterias 830 y 840 se eliminan de la superficie de carga 810, pero el material 839, que tiene una atracción más

alta por la superficie 810, siga unido a la superficie 810. Las bacterias 830 y 840 son ahora capaces de ser transportadas a través de la cámara 805, y de unirse a las superficies de captura 820.

Debe observarse que la fuerza de unión requerida para eliminar bacterias de una superficie puede ser variada por la cuidadosa selección de materiales que comprenden la superficie de carga 810 o la superficie de captura 820. Por ejemplo, para unión no específica, puede variarse la concentración del agente de unión no específica (por ejemplo, polietilenglicol u otro polímero), puede variarse la longitud de la cadena de polímero, puede variarse el tipo de carga iónica (por ejemplo, amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria, o los grupos que sustituyen al nitrógeno), la densidad lineal o volumétrica de la carga iónica en el polímero, u otros cambios. Además, en el caso de unión específica, si el agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) no proporciona en sí mismo fuerza de unión suficiente para mantener las bacterias en su sitio durante la operación del sistema, el agente de unión específica puede ser complementado por un agente de unión no específica más fuerte, de manera que la fuerza de unión total sea una combinación de fuerzas no específicas y específicas. En una realización, puede ser una secuencia de superficies de captura 820 que son distinguidas no basándose en la diferente unión específica (por ejemplo, por anticuerpos o aptámeros), sino por los diferentes niveles de unión no específica, a las que se unen diferentes bacterias con diferentes afinidades globales. Así, en general, la primera superficie de captura encontrada por las bacterias tendría unión no específica más baja global, y las superficies 820 posteriormente encontradas tendrían entonces niveles de unión no específica crecientes.

Detección de organismos

La detección de los organismos puede tener lugar en varios medios diferentes, aunque se realiza generalmente por medios de detección visual. En este caso, se obtiene una imagen ampliada de las superficies de detección 820, con o sin la adición de tinciones, y esta imagen se analiza preferentemente por medios electrónicos automáticos. Para discusiones más generales de detección en la presente invención, véase también anteriormente.

La detección puede incluir el uso de métodos de microscopía, que incluyen campo brillante, campo oscuro, fluorescencia, quimioluminiscencia, fase, contraste de interferencia diferencial y otros métodos, además de métodos de medición de la intensidad de luz global y respuesta espectral sin obtención de imágenes. Tales métodos pueden ser además potenciados usando iluminación de láser dirigido o iluminación de luz incoherente sin el uso de iluminación de condensador convencional, tal como puede usarse para respuesta de luz dispersa o luz fluorescente. Además, puede emplearse iluminación de luz reflejada, luz transmitida o luz evanescente. Aunque pueden emplearse métodos de microscopía en la presente invención, es ventajoso que el sistema use sistemas ópticos que no requieren calibración cuidadosa y repetida. Por tanto, se prefiere emplear ópticas que empleen una gran profundidad de campo, y que sean de aumento relativamente bajo. Además, está dentro de las enseñanzas de la presente invención usar múltiples métodos en la misma muestra, que incluyen, por ejemplo, el uso de obtención de imágenes de fase de campo brillante y realizar secuencialmente obtención de imágenes reflejadas de fluorescencia, con el fin de obtener diferente información sobre el mismo campo de vista de obtención de imágenes.

El sistema frecuentemente implicará el movimiento horizontal de o bien la cámara en la que se capturan las bacterias, o el detector, dado que las mediciones se harán durante un periodo de tiempo significativo, y generalmente implicará horas para aquellas mediciones que implican crecimiento bacteriano (véase a continuación). En aquellos casos, es conveniente que el sistema sea capaz de restablecer su relación original de bacterias con respecto al detector, de manera que puedan compararse las imágenes obtenidas durante un periodo de tiempo. Aunque esto puede realizarse algunas veces con un sistema de control de "bucle abierto", en general, se prefiere un sistema de "bucle cerrado", que implica retroalimentación. Dos métodos preferidos para esta retroalimentación implican el uso de fiduciales visuales en la cámara, fiduciales que son fácilmente detectados por el sistema visual, siendo tal información usada para ajustar el movimiento horizontal del sistema hasta que se establezca la relación original de la cámara con respecto a las bacterias. Un segundo método de conveniencia es hacer una estimación mecánica de "bucle abierto" aproximada de la localización original, para obtener una imagen, y entonces en ese momento usar análisis de imágenes para registrar las bacterias y otros aspectos visuales de la cámara (que posiblemente también implican fiduciales visuales). Tales formas de registro pueden implicar el uso de transformada de Fourier u otros métodos de correlación (tales como el desplazamiento de matriz) para hacer corresponder las imágenes.

En general, el sistema detectará la presencia y características de organismos a través de un programa automático, tal como el software LabView con el software de visión IMAQ de National Instruments (Austin, TX), secuencia de comandos ImagePro, o análisis de imágenes de alta velocidad usando software informático personalizado. El sistema guardará no solo la presencia de una bacteria, sino también la localización de la bacteria. Dado que la bacteria se fija en una localización sobre una superficie de captura 820, se considera que durante un periodo de tiempo, que incluye el crecimiento del organismo, la bacteria no se moverá significativamente. Adicionalmente, si se observa una bacteria en una localización en la que una bacteria no estaba previamente localizada, se supone que cualquiera de estas bacterias fue sacada de otra localización, o que esta bacteria fue recientemente cultivada a partir de otra bacteria. Además, cambios en el tamaño, la tinción con tinciones mortales o vitales, u otros factores, pueden correlacionarse entonces con el cambio en el estado del organismo que fue previamente observado en esa misma localización.

En general, habrá al menos una superficie de captura 820 no específica, con el fin de capturar todos los organismos que esas superficies de captura 820 específica no capturan. Como se mencionó antes, esta superficie es preferentemente una superficie policatiónica, dado que la mayoría de las bacterias tienen una carga electrostática negativa global, o puede hacerse que tengan una carga tal a un pH apropiado. Sin embargo, también pueden usarse superficies que tienen carga polianiónica, características hidrófobas, anticuerpos únicos o múltiples contra las bacterias, agentes de unión a glucoproteína, además de componentes policatiónicos y otros componentes activos, individualmente o en combinación. También es posible dentro de la presente invención que solo haya una única superficie de captura 820, y se prefiere en ese caso que la superficie tenga características de unión no específica.

En el caso de una superficie de captura no específica, es todavía deseable ser capaces de identificar uno o varios organismos diferentes. Esta identificación generalmente se realizará por indicadores que son específicos para un serotipo, género, especie, clase, u otro subconjunto de bacterias u otro organismo que está siendo detectado, y es convenientemente un anticuerpo, aptámero, u otra molécula. El uso de tales indicadores en la presente invención se demuestra en las FIG. 36A-E, que son diagramas esquemáticos en vista lateral de la detección de múltiples bacterias sobre una superficie no específica. Obsérvese que el ánodo y el cátodo no están indicados en esta figura.

En la FIG. 36A, las bacterias 830 y 840 están unidas a una superficie no específica 825 en la cámara 805. Un indicador 842 que es específico para las bacterias 840 se introduce en la cámara en la FIG. 36B a través de flujo de fluidos a través del puerto de entrada 802 al puerto de salida 803. Este indicador 842 se une a las bacterias 840, y entonces el indicador 842 no unido se elimina de la cámara como en la FIG. 36C. Debe observarse que la unión del indicador 842 a las bacterias 840 puede ser acelerada a través del uso del ánodo y cátodo (no mostrado) que pueden usarse para acelerar la unión de las bacterias 830 y 840 a la superficie 825. En este momento, la presencia del indicador 842 se determina a través de los métodos de detección como se ha descrito anteriormente, y las localizaciones específicas se registran en el sistema (por ejemplo, en una lista, base de datos, u otro formato que puede o bien almacenarse en memoria informática y/o en algún medio de almacenamiento físico tal como un disco duro). En la FIG. 36D, se introduce un segundo indicador 832 que es específico para las bacterias 830 en la celda 805 y se deja que se una a las bacterias 830, y entonces se elimina por flujo de fluidos a través de los puertos 802 y 803, dejando el sistema en el estado de la FIG. 36E.

Debe observarse que los medios de los medios de detección usados para detectar el indicador 832 y el indicador 842 pueden ser los mismos. Por ejemplo, si los indicadores 832 y 842 se detectan usando fluorescencia, puede usarse el mismo colorante fluorescente en ambas detecciones. Es decir, en el estado de la FIG. 36E, el sistema puede detectar la presencia de ambos indicadores 842 y 832 juntos. Debido a que se ha establecido previamente la localización de las bacterias 830 determinando las localizaciones del indicador 832 como en la FIG. 36C, entonces las localizaciones de las bacterias 840 serán en aquellas nuevas localizaciones en las que los indicadores 832 y 842 se detectan. De hecho, este método puede ser extendido en serie para permitir la detección de un gran número de bacterias específicas usando indicadores específicos, aún cuando las bacterias se inmovilizaran sobre una superficie no específica 825.

En aquellos casos en los que los medios de detección son diferentes (por ejemplo, donde el indicador 832 se detecta por la fluorescencia de un fluoróforo, mientras que el indicador 842 se detecta por la fluorescencia de otro fluoróforo, separable por longitudes de onda de excitación y/o emisión), entonces los indicadores 832 y 842 pueden introducirse en la cámara 805 simultáneamente, lavarse de la cámara simultáneamente, y entonces detectarse en serie o simultáneamente.

Debe observarse que además del uso de agentes que distinguen bacterias específicas (por ejemplo, a través del uso de anticuerpos marcados fluorescentes), hay muchas otras características intrínsecas a las bacterias u organismos que pueden distinguirlos. Tales otras características incluyen la morfología de las bacterias individuales (por ejemplo, esférica frente a bacilo frente a helicoidal), morfología de colonias (por ejemplo, una aglomerada frente a en cadena), absorción o dispersión de diferentes frecuencias de luz, su resistencia o susceptibilidad a diferentes clases de fármacos (por ejemplo, véase más adelante), su capacidad para crecer en un medio de cultivo particular, su velocidad de crecimiento, su tamaño, y más. Estos agentes pueden usarse para distinguir múltiples tipos de bacterias unidos a una superficie de captura no específica 820. Dado también que hay frecuentemente contaminantes en la muestra que dará lugar a señales con, por ejemplo, dispersión de la luz o medios de absorción óptica de detección, estos métodos también pueden usarse para distinguir bacterias de contaminantes no bacterianos.

Aunque el sistema puede operar a través de la identificación y monitorización de bacterias específicas, en una realización, el detector puede sumar la respuesta total de todas las bacterias sobre la superficie de captura 820 (por ejemplo, la luz dispersa). Esto también puede usarse para indicar el número total de bacterias, y el crecimiento en el número de bacterias será evidenciado por un aumento en la respuesta total.

Detección de la viabilidad de organismos

La viabilidad de organismos puede determinarse mediante varios métodos, y pueden incluir tanto métodos que resaltan organismos viables (tinciones vitales), además de organismos muertos (tinciones mortales). Estas tinciones pueden comprender colorantes de etidio o propidio, yoduro de hexidio, tinciones de ácidos nucleicos SYTO, 7-aminiactinomicina D, tinciones de ácidos nucleicos SYTOX Green/Orange/Blue y otros. Una buena introducción a estas y otras tinciones están disponibles de Molecular Probes Handbook, en www.probes.com.

Puede ser útil detectar la presencia de nuevos organismos o el aumento en tamaño de organismos existentes. Un método para llevar a cabo esto se muestra en las FIG. 37A-D, que son diagramas esquemáticos de detección del crecimiento en un organismo.

En la FIG. 37A, las bacterias 831 están unidas a una superficie no específica 825. Las bacterias 831 tienen varios sitios 843 para la unión de una molécula 844. Estos sitios 843 podrían representar regiones de alta carga electrostática negativa, glucoproteínas, epítopes para antibióticos de amplio o estrecho espectro, etc. En la FIG. 37B, los sitios 843 son unidos por la molécula 844 en un gran exceso de la molécula 844, de manera que todos los sitios 843 están ocupados por la molécula 844, después de que se lave el exceso de molécula 844.

En la FIG. 37C, las bacterias 831 experimentan crecimiento, ya sea en tamaño, o como se indica en la figura, en el número de bacterias 831, creando nuevas bacterias 833. Debe apreciarse que las nuevas bacterias frecuentemente se unirán a la superficie 825 cerca de la localización de las bacterias originales 831, y que la proximidad puede mejorarse usando una fuerza electroforética durante el crecimiento que conduce las bacterias 831 y 833 hacia la superficie 825. Esta proximidad no es necesaria para detectar el nuevo crecimiento bacteriano 833, sino para asociar las nuevas bacterias 833 con las bacterias 831 de las que derivaron, con el fin de demostrar la viabilidad y crecimiento de las bacterias 831.

Las nuevas bacterias 833 tendrán sitios de unión 843 a los que la molécula 844 no está unida. En el diagrama, todos los sitios 843 que no están unidos por la molécula 844 están localizados en las nuevas bacterias 833, aunque dependiendo del modo de crecimiento bacteriano, también es posible que aquellos sitios de unión 843 estén distribuidos en ambas bacterias hijas que surgen de la fisión de las bacterias originales 831. Debe también observarse que incluso en ausencia de separación entre nuevas bacterias - por ejemplo, que el área superficial de las bacterias 831 ha aumentado, sin la creación de nuevas bacteria 833 - el aumento en el área superficial generalmente implicará la creación de nuevos sitios 843.

En la FIG. 37D, las bacterias 831 y 833 son ahora incubadas con la molécula 844, que está opcionalmente modificada de manera que pueda detectarse con un indicador 846 que puede ser detectado por el sistema, y entonces se lava la molécula 844 con indicador 846 que no está unida a las bacterias 831 y 833. Así, cualquier indicador 846 será indicativo de nuevo crecimiento bacteriano o cambio en el número de sitios sobre las bacterias a las que puede unirse el indicador 846.

Crecimiento de organismos

Las bacterias pueden ahora cultivarse con el fin de determinar su viabilidad, características de crecimiento y susceptibilidad a diversos agentes (tales como antibióticos). El crecimiento se produce por la incubación de las bacterias en presencia de un medio adecuado a temperaturas adecuadas y saturación o agotamiento de oxígeno (por ejemplo, para bacterias anaerobias o aerobias, dependiendo generalmente de la fuente de la muestra). El medio de incubación se corresponderá en general con las bacterias que se monitorizan - por ejemplo, aspirados de pulmón, muestras de orina y muestras de sangre se incubarían todos con medios que son muy aptos para bacterias u otros organismos de los orígenes respectivos, como es muy conocido en la técnica. Además, los agentes anti-crecimiento que van a probarse para los efectos también son muy conocidos en la técnica, y cambiarán con el descubrimiento de nuevos agentes y a medida que la mezcla de los actuales agentes en uso cambie con la aparición de resistencia.

Durante el crecimiento de las bacterias, puede ser conveniente aplicar una fuerza electroforética continua o frecuente, con el fin de que las bacterias hijas o nuevas bacterias 833 estén en aproximadamente la misma localización que las bacterias originales 831 de las que derivaron, permitiendo que se determine la procedencia de las bacterias 833. Esto permitirá entonces la determinación de que las bacterias originales 831 están creciendo, y en segundo lugar permite la determinación del tipo de bacterias a las nuevas bacterias 833 sin tener que hacer pruebas adicionales (por ejemplo, tinción de anticuerpos).

Debe observarse que la fuerza electroforética experimentada por las bacterias está inversamente relacionada con la conductancia del medio, y por tanto es conveniente tener un medio de cultivo de baja conductancia. La mayoría de los medios usados para el crecimiento de bacterias, levadura, y otros organismos, sin embargo, generalmente tiene Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} , NO_3^- y otros iones como tanto nutrientes, además de para mantener una fuerza iónica del medio. Es preferible que el medio de cultivo tenga una conductividad inferior a 5 mS/cm, y más preferible que el medio de cultivo tenga una conductividad inferior a 2 mS/cm, e incluso más preferible que el medio de cultivo tenga

una conductividad inferior a 1 mS/cm. Debe observarse que estas conductividades son generalmente superiores a las usadas en el movimiento de bacterias y otras moléculas para la concentración de éstas en el electrodo, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, debido a que las bacterias 833 se crean en o próximas a los electrodos, el movimiento requerido es pequeño en distancia y se requieren cantidades más bajas de fuerza electroforética.

Además, la aplicación de la fuerza electroforética no necesita ser constante, y puede aplicarse intermitentemente, especialmente en aquellos casos en los que el medio de cultivo no está bajo movimiento global constante. Debido a la lenta difusión de microorganismos, es preferible aplicar fuerza electroforética cuando el medio no está en movimiento global no más frecuentemente que cada 10 segundos, e incluso más preferible no más frecuentemente que cada 60 segundos. En general, muchos medios de cultivo contienen grandes cantidades de sal (por ejemplo, 0,5 % de NaCl en caldo L), y se prefiere que esta sal se sustituya por una especie de ión bipolar, tal como alanina o cisteína, que contribuye muy poco a la conductancia. También es preferible que la intensidad osmótica del medio sea suficientemente alta, de manera que las bacterias no experimenten choque osmótico. Pueden usarse componentes osmóticos no iónicos, tales como glicerol o sacarosa, para este fin.

El crecimiento por sí mismo indica principalmente la viabilidad del organismo, y posiblemente las velocidades de crecimiento relativas de las bacterias. Sin embargo, también puede usarse para estudiar la susceptibilidad del organismo a diversos agentes anti-organismos tales como agentes bactericidas y bacteriostáticos. Ejemplos de tales agentes incluyen agentes individuales o combinaciones de agentes seleccionados de familias de antibióticos tales como cefalosporinas, penicilinas, carbapenémicos, monobactámicos, otros antibióticos beta-lactámicos novedosos, inhibidores de beta-lactamasa, fluoroquinolonas, macrólidos, cetólidos, glucopéptidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, rifampina, y otras familias, que incluyen novedosos agentes, usados como antibióticos en la práctica clínica o en investigación. En el caso más simple, esto implicaría la incubación del organismo en una concentración constante de agente anti-organismos (AOA), y determinar la velocidad de crecimiento y/o la velocidad de muerte del organismo.

La FIG. 33E muestra cómo se realizaría esto con la presente invención. En la FIG. 33D, las bacterias 830, 835 y 840 han sido específicamente unidas a superficies de captura 820. Después de un periodo de incubación en una concentración de un AOA en un medio de cultivo (indicado por punteado de la luz), las bacterias 840 han aumentado en número, y las bacterias 830 y 835 no, que indica que las bacterias 840 no son susceptibles a AOA a la concentración usada, y que las bacterias 830 y 835 son susceptibles a las concentraciones de AOA usadas. Debe observarse que las bacterias 835 son del mismo tipo que las bacterias 830, excepto que están muertas. Dada una tinción mortal o vital, por tanto, puede determinarse que las bacterias 830 no han sido destruidas por la concentración de AOA, que indica ya sea que AOA previene el crecimiento pero no destruye las bacterias 830, o que a las concentraciones usadas, AOA solo actúa deteniendo el crecimiento.

En la FIG. 33F, la concentración de AOA es elevada, y el número de bacterias 840 todavía aumenta, que indica que las bacterias 840 son no susceptibles a las bacterias incluso a esta concentración. Sin embargo, ahora las bacterias 830 han sido destruidas (indicado por las bacterias muertas 835), que indica que a esta concentración, AOA es letal. Así, como se indica en las FIG. 33E-F, usando concentraciones crecientes de AOA en el medio de cultivo, puede determinarse la respuesta de concentración de las bacterias a AOA. Claramente, aumentando la cantidad de AOA en las etapas durante un periodo de tiempo, puede determinarse la concentración mínima inhibitoria (MIC). Además, debido a que la viabilidad de las bacterias también puede determinarse a cada concentración, también puede determinarse la concentración bactericida mínima (MBC).

Debe observarse que la detección del crecimiento y viabilidad a diferentes concentraciones de AOA puede realizarse ya sea usando una serie de cámaras 805 en la celda 804, cada una de las cuales expone las bacterias a una concentración específica de AOA, o alternativamente, aumentando la concentración dentro de una cámara 805 dada. En el primer caso, la respuesta de tiempo de las bacterias puede ser fácilmente establecida, además de la respuesta persistente de las bacterias una vez el AOA ha sido eliminado (por ejemplo, un efecto post-antibiótico). Es decir, las bacterias también pueden exponerse a una concentración dada de AOA durante un breve periodo, y entonces el medio sustituirse con un medio que carece de AOA, y puede monitorizarse la falta de crecimiento o la muerte de las bacterias con el tiempo.

Como se ha descrito anteriormente, para no usar cámaras separadas 805 para cada concentración diferente de AOA, la concentración de AOA dentro de una cámara 805 puede aumentarse con el tiempo. Las FIG. 38A-B son gráficos de la respuesta de las bacterias a concentraciones cambiantes de AOA. En la FIG. 38A, la concentración de AOA aumenta con el tiempo, generalmente según un aumento exponencial con el tiempo, aunque también es conveniente que la concentración aumente linealmente o según otras relaciones de concentración/tiempo, que incluyen funciones de etapa que aumentan la concentración; estas funciones de etapa pueden ponerse a intervalos de concentración regulares, o alternativamente a concentraciones estándar como se indica o sugiere por los patrones de laboratorio clínico como podría ser establecido por organizaciones tales como the National Committee for Clinical Laboratory Standards. El sistema se usa entonces para determinar el número total de bacterias, el número de bacterias muertas y el número de bacterias vivas (como se ha descrito anteriormente, cualquiera dos de estos números da lugar al tercer número).

El momento en el que el número total de bacterias no sigue creciendo, indicado en la figura a la concentración A, se

considera que es la MIC. El punto donde el número de bacterias vivas empieza a disminuir (a la concentración B) se considera que es MBC. Debe observarse que MIC y MBC reales puede ser más bajas que las concentraciones A y B, respectivamente, y será solo MIC y MBC en aquellos casos en los que la velocidad de aumento en la concentración es muy lenta con respecto al crecimiento de las bacterias. Así, dado que se desea determinar MIC y MBC de AOA dentro de un factor de X, es preferible que la concentración de AOA aumente un factor de X no más rápido que la mitad del tiempo de duplicación de las bacterias en las condiciones de la incubación que carece de AOA, y es más preferible que la concentración de AOA aumente un factor de X no más rápido que el tiempo de duplicación de las bacterias, y es lo más preferible que la concentración de AOA aumente un factor de X no más rápido que dos veces el tiempo de duplicación de las bacterias.

El menor crecimiento de bacterias requerido con el fin de que haya alta seguridad de que ha ocurrido el crecimiento reducirá el tiempo necesario para realizar una prueba. Monitorizando bacterias individuales, puede observarse el crecimiento con el duplicado de solo un pequeño número de bacterias. Es decir, si se examina la masa como en ensayos de turbidez convencionales, por ejemplo, el límite de sensibilidad de detección del crecimiento bacteriano está limitado por la relación de señal con respecto a ruido en la medición de turbidez. Sin embargo, la fisión de una bacteria es un evento discreto que puede detectarse, aunque esa bacteria sea una de muchas miles de bacterias. Así, la presente invención pueden tener una sensibilidad muy alta, con el sistema preferentemente capaz de detectar la duplicación de menos del 25 % de bacterias, más preferentemente capaz de detectar la duplicación del 10 % de las bacterias, y lo más preferentemente capaz de detectar la duplicación del 5 % de bacterias. Obsérvese que el tiempo de duplicación para una fracción de las bacterias puede ser o bien predeterminado (por ejemplo, por calibración en un laboratorio con especímenes experimentales), o más preferentemente, comparando las bacterias en ausencia de AOA con aquellas en presencia de AOA - esto controla los resultados internamente.

Los puntos de corte de la medición para determinar la susceptibilidad a antibióticos pueden, como se trata anteriormente, expresarse en términos absolutos, tales como la duplicación de un porcentaje dado de las bacterias. Sin embargo, el número de bacterias requeridas para hacer un criterio estadísticamente válido puede ser dependiente del número de bacterias presentes en la muestra. Por ejemplo, si hay solo 10 bacterias presentes en cada cámara, representando una única duplicación de bacterias que representa el 10 % de la muestra. Alternativamente, con números muy grandes de bacterias sobre la superficie (por ejemplo, superiores a 100.000), la duplicación de incluso 1.000 bacterias (es decir, el 1 %) es probablemente estadísticamente significativa. Así, es en muchos casos preferible analizar el número de bacterias requeridas para mostrar la duplicación en la condición de control (es decir, medio de cultivo ausente de AOA) con respecto al número de bacterias que muestran duplicación en la condición experimental (es decir, medio de cultivo con AOA) como que es estadísticamente relevante. Por ejemplo, un método convencional sería aplicar una prueba de la chi al cuadrado a estos dos números, y decidir si los resultados cumplen una probabilidad particular de significancia. En general, es preferible que esta probabilidad sea inferior a 0,05, y es incluso más preferible que esta probabilidad sea inferior a 0,025 y lo más preferible que esta probabilidad sea inferior a 0,01. Debido a que números pequeños de bacterias no permitirán probabilidad de la chi al cuadrado muy pequeñas, los patrones de probabilidad pueden ser convenientemente reducidos para casos de números muy pequeños de bacterias (por ejemplo, menos de 20 bacterias viables en el control de medio de cultivo).

Debe entenderse que el tiempo de duplicación de las bacterias es un fenómeno de poblaciones, y que dentro de una población de bacterias, algunas bacterias se dividirán más rápidamente que otras. Esto podría ser debido tanto a las ligeras diferencias genéticas en una población, como a efectos puramente estadísticos. Sin embargo, también puede ser debido a la etapa en la que cada bacteria está creciendo durante su preparación, ya que las bacterias presentarán tiempos de latencia sustancialmente diferentes en su crecimiento cuando se pongan en un nuevo medio dependiendo de esa etapa. Aunque generalmente está transcurriendo un periodo de tiempo más largo para proporcionar más información sobre las características de crecimiento y la susceptibilidad de AOA de las bacterias, existe una necesidad de suministrar al personal médico información sobre las bacterias y su susceptibilidad a AOA. Dado que los tiempos de latencia para la mayoría de las bacterias de interés son del orden de 2-6 horas, y el tiempo de duplicación de las bacterias es generalmente 1-2 horas, es preferible que las mediciones de crecimiento bacteriano y la susceptibilidad a AOA usen la detección de las bacterias en no más de 8 horas, y más preferentemente menos de 6 horas. Aunque no todas las bacterias en una muestra tienen la probabilidad de demostrar la duplicación, la tendrá una fracción suficientemente grande de aquellas bacterias, de manera que sean capaces de indicar susceptibilidad y crecimiento.

En este caso, es útil tener toda la información disponible para bacterias individuales con respecto a la tinción vital y/o mortal (que indica bacterias vivas frente a muertas), además de crecimiento en presencia de medio de cultivo con y sin la presencia de AOA. Cualquier observación en la que la fracción de bacterias vivas disminuye una primera fracción predeterminada en presencia de AOA, o en la que el crecimiento de bacterias (evidenciado ya sea por duplicaciones o por aumento en el tamaño de las bacterias) disminuya por una segunda fracción predeterminada en presencia de AOA, son evidencia de la acción de AOA. En general, la primera fracción determinada, debido a su evidencia de mayor muerte, generalmente será más pequeña que la segunda fracción predeterminada. Un valor preferible de la primera fracción predeterminada es el 20 %, y un valor más preferible es el 33 % y el valor más preferible es el 50 %. Un valor preferible para la segunda fracción predeterminada es el 50 %, y un valor más preferido es el 66 %, y un valor más preferido es el 80 %.

Como se indica anteriormente, la mayoría de los estudios sobre la susceptibilidad de AOA se refieren a la

concentración a la que se encuentra un efecto particular, en vez de la cinética específica y efectos que se observan. Es decir, en pruebas convencionales, las bacterias son normalmente expuestas a varias concentraciones diferentes (o incluso concentraciones variables) de AOA para determinar la concentración a la que las bacterias presentan muerte o bajas velocidades de crecimiento, a partir de las que puede determinarse MIC o MBC. Considerar, por ejemplo, una prueba de antibióticos convencional que emplea una placa de agar con un disco de antibiótico. Alrededor del disco están colonias de diversos tamaños, que representan no simplemente muerte, sino crecimiento más lento en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico. Por esta medida, la MIC no es fácil de definir, ya que incubar las placas durante un periodo de tiempo prolongado permitiría que las colonias se parecieran a concentraciones que se consideran inhibitorias.

Sin embargo, tanto desde un punto de vista del tiempo como de coste, puede ser conveniente en algunos casos exponer mejor las bacterias a dosis constantes únicas de AOA, y luego observar el efecto específico y la velocidad del efecto del fármaco, con el fin de determinar la susceptibilidad. En la presente invención, puede proporcionarse una dosis constante de AOA, y la velocidad a la que las bacterias son destruidas, o el grado al que su crecimiento se reduce, puede usarse para calibrar los probables efectos a una multiplicidad de dosis terapéutica. Estas respuestas pueden describirse con nuevas mediciones del efecto de AOA, tal como el tiempo de duplicación bacteriano en presencia de un AOA dividido entre el tiempo de duplicación bacteriano en ausencia de AOA. En este caso, por las bacterias que son resistentes a un AOA pero cuyo tiempo de duplicación es triplicado en presencia de AOA, el tratamiento con AOA puede todavía ser significativo. Estos valores pueden proporcionarse ya sea a una dosis única, o a múltiples dosis. Hasta el punto que puedan aislarse y estudiarse las bacterias de diferentes niveles de susceptibilidad, la información a una o más concentraciones de AOA puede ser útil en entonces predecir la respuesta a otras concentraciones.

Debe observarse que la concentración de AOA en un humano o animal se determina por la cantidad y frecuencia de tratamiento (por ejemplo, inyección), además de la farmacocinética de AOA. En muchos casos, la farmacocinética es muy conocida para seres humanos sin enfermedad, y puede ser modelada basándose en el estado médico conocido (por ejemplo, insuficiencia hepática) de la persona que se monitoriza. Usando esta información, puede estimarse la concentración de AOA con el tiempo en el órgano diana (por ejemplo, sangre, vías urinarias, pulmones). Esta concentración de AOA puede ser aproximada en la cámara mezclando medio con AOA en partes relativas con medio que carece de AOA, para producir el perfil de AOA estimado tal como el mostrado en la FIG. 38B. En general, la concentración de AOA aumentará, alcanzará el máximo y luego disminuirá exponencialmente. Como antes, pueden monitorizarse el número total de bacterias, las bacterias muertas y las bacterias vivas con el tiempo. En este caso, los parámetros farmacodinámicos MIC y MBC no están bien definidos, ya que se está examinando la respuesta a las bacterias que incluyen la farmacocinética de AOA, y se examina, por tanto, a la dosis mínima inhibitoria y la dosis bactericida mínima realizando duplicados del sistema a diferentes dosis, y entonces se monitoriza si el perfil de concentración de AOA global produce el cese del crecimiento o la muerte de las bacterias. Debe observarse que aunque el análisis de la FIG. 38B trata de solo una dosis única de AOA (es decir, aumento, pico, disminución), también es posible continuar el análisis en dosis secuencial de AOA como se usaría frecuentemente en el tratamiento (por ejemplo, inyección 4 veces al día).

Debe observarse que los métodos de la presente invención pueden aplicarse no solo a la respuesta de los organismos a AOA, sino también a la respuesta a otras condiciones, tales como bacteriófagos, virus de animales, ARN bicatenario, ADN o fármacos (por ejemplo, para la prueba de sensibilidad a fármacos). La respuesta a condiciones adicionales tales como hormonas, agentes ambientales u otros se describe en el presente documento. Estos agentes pueden ser así analizados, en tanto que la respuesta sea detectable por el detector empleado. En muchos casos, puede requerirse una tinción de algún tipo con el fin de hacer la respuesta a la condición visible.

En la discusión anterior, el momento exacto de la aplicación de AOA puede estar relacionado ya sea con el momento en el que las bacterias se colocan primero en medio de cultivo, o alternativamente, con el momento en el que se detecta primero el crecimiento bacteriano (por ejemplo, a través de cambios en el tamaño de las bacterias, o la presencia de células hija). En el último caso, el crecimiento puede ser monitorizado continuamente, y añadirse AOA a la incubación en el momento en el que se determina que se ha completado el tiempo de latencia. La completitud del tiempo de latencia generalmente será aquél punto en el que alguna fracción predeterminada de células ha mostrado signos de crecimiento, que es preferentemente menos del 50 % de las células, y más preferentemente menos del 30 % de las células, y lo más preferentemente menos del 20 % de las células.

Ejemplos de uso de microscopía para demostrar el crecimiento celular se proporcionan por J. R. Lawrence, D. R. Korber, y D. E. Caldwell (1989) "Computer-Enhanced Darkfield Microscopy for the Quantitative Analysis of Bacterial Growth and Behavior on Surfaces", J. Microbiol. Methods 10: 123-138 y A. Elfving, Y. LeMarc, J. Baryani, and A. Ballagi (2004) "Observing Growth and Division of Large Numbers of Individual Bacteria by Image Analysis", Applied and Environmental Microbiology 70(2):675-678. Debe observarse de Elfving et al. que el crecimiento de bacterias puede medirse bajo flujo laminar por el que células hija son cortadas, dando un perfil óptico de diente de sierra en el que el tamaño celular aumenta, y entonces con la eliminación de la célula hija, el tamaño de la célula disminuye bruscamente. En la presente invención, además del tamaño de la célula (por ejemplo, el número de píxeles), también puede usarse la cantidad de fluorescencia o la cantidad de dispersión de luz.

Transporte a la superficie de detección usando medios alternativos

Anteriormente, ha sido tratado el transporte a la superficie de detección usando medios electroforéticos; otros medios se tratan aquí. Por ejemplo, las bacterias pueden transferirse a la superficie de detección usando fuerza centrífuga. La FIG. 39A es una vista esquemática de un tubo de centrifugadora 900 modificado para la concentración de bacterias sobre una superficie de captura 905, y la FIG. 39B es una vista en sección transversal del tubo de centrifugadora 900 de la FIG. 39A. El tubo 900 comprende tres trozos separables, un tubo de muestra 903, un trozo de captura 910 y un trozo inferior 912. El tubo de muestra 903 comprende una estructura externa 904 que es un cilindro de diámetro que se ajusta ceñidamente en un elemento fijo de la centrifugadora para una centrifugadora capaz de suministrar fuerza centrífuga preferentemente por encima de 200×g, y más preferentemente por encima de 1000×g e incluso más preferentemente por encima de 2500×g. El tubo de muestra 903 comprende además una estructura interna 907 que se pone en contacto con la estructura externa 904 para los fines de intensidad, y la estructura interna 907 tiene ya sea una sección transversal cuadrada o rectangular. Debe observarse que el tubo de muestra 903 contendrá una muestra 916 que contiene una muestra bacteriana, que cuando se centrifuga depositará las bacterias en la muestra sobre una superficie de captura 905 que es preferentemente o bien cuadrada o rectangular (aunque se describen otras formas en el presente documento), y cuya forma se corresponde con la forma de la estructura interna 907. La forma en sección transversal de la estructura interna 907 está limitada por la forma de la superficie de captura 905, y en lugar de tener una estructura interna 907 y una estructura externa 904, puede ser solo una estructura interna 907 dado que o bien la fuerza centrífuga y los materiales del tubo de muestra 903 son tales que la estructura interna 907 puede mantener su integridad dimensional sin necesidad de la estructura externa 904, o que el elemento fijo de la centrifugadora en el que se ajusta el tubo de centrifugadora 900 se corresponde aproximadamente con la forma del tubo 900 (por ejemplo, es cuadrado o rectangular).

El tubo de muestra 903 se ajusta ceñidamente sobre el trozo de captura 910, que puede incluir una junta 914 de manera que bajo centrifugación, la muestra bacteriana 916 no es forzada a salir del tubo de muestra 903. El tubo de muestra 903 tiene generalmente interfases para tanto el tubo de muestra 903 como el trozo inferior 912, y tiene una superficie superior en contacto con la muestra bacteriana dentro del tubo de muestra 903 que tiene una superficie de captura que generalmente tiene unión no específica por las bacterias u otros organismos sobre la muestra. Tales superficies no específicas se han descrito en detalle anteriormente. Debe observarse que la superficie de captura puede o bien colocarse directamente sobre un trozo de captura integrado 910 (por ejemplo, un trozo de plásmido moldeado), o alternativamente puede ser un trozo superior extraíble que, tras al quitarse, es un trozo cuadrado o rectangular plano que tiene preferentemente entre 100 micrómetros y 1500 micrómetros de espesor y está hecho de un plástico o vidrio adecuado. La siguiente discusión se refiere a un trozo de captura integrado 910.

El trozo inferior 912 está moldeado para ajustarse ceñidamente en el elemento fijo de centrifugadora para la centrifugadora usada, y normalmente es semiesférico o cónico. Una vez más, dependiendo del elemento fijo de la centrifugadora, la forma del trozo inferior puede ser diversa. Además, si el elemento fijo de la centrifugadora es plano sobre el fondo, puede prescindirse del trozo inferior 912, y la superficie inferior del trozo de captura 910 se pondría entonces en contacto con el fondo del elemento fijo de la centrifugadora.

Tras ser centrifugadas las bacterias en la muestra 916 sobre la superficie de captura 905, el trozo de captura 910 se separa del tubo de muestra 903, y se pone entre un elemento fijo superior 922 y un elemento fijo inferior 924 como se muestra en la FIG. 39C, una vista lateral en sección transversal de un detector 930 usando el trozo de captura 910 de las FIG. 39A-B. Los elementos fijos 922 y 924 se mantienen juntos con tornillos 932 y tuercas 936 u otros medios (por ejemplo, pinzas), proporcionando una junta 934 un sellado hermético al agua entre el trozo superior 922 y el trozo de captura 910. En el trozo superior 922, por encima del trozo de captura 910, está una serie de paredes lineales 923 que se ajustan ceñidamente sobre la superficie de captura 905 de forma que se creen cámaras aisladas 920 por encima de la superficie de captura 905. Estas cámaras 920 tienen puertos de entrada y salida (no mostrados) que permiten la introducción de medios de cultivo, AOA, indicadores (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes) para el tipo de célula, tinciones mortales y vitales, y otros medios tales según se necesite para ejecutar las etapas 730, 740 y 750 de la FIG. 6. La detección se proporciona a través del elemento fijo superior 922; sin embargo, si la superficie de captura 905 es extraíble del trozo de captura 910 como se ha descrito anteriormente, la detección puede tener lugar a través de la superficie de captura dado un elemento de fijo adecuado.

Una configuración alternativa se proporciona en las FIG. 40A-B, que son una vista desde arriba y vista lateral en sección transversal de un dispositivo de detección basado en el filtro 950 que usa un filtro de captura poroso 960, siendo la FIG. 40B mostrada a través de la sección transversal W de la FIG. 40A. El dispositivo 950 comprende una serie de canales de detector (de los que se muestran cuatro, pero que pueden comprender decenas de canales), cada uno de los cuales comprende el filtro poroso 960, que conjuntamente con un separador 962, separa una cámara superior 964 y una cámara inferior 966. El filtro 960 está en el extremo del canal, con movimiento de medio a través de un puerto de entrada 952, a través de la superficie superior del separador 962, a través del filtro 960, de nuevo a través de la superficie más baja del separador 962 y luego fuera a través de un puerto de salida 954. El canal está unido en otros lados por la estructura externa 970, que puede comprender un único trozo (como se muestra), o un trozo superior unido sobre un trozo inferior, en el que el trozo superior, que se encuentra por encima del filtro 960, es generalmente transparente de manera que bacterias unidas a la superficie superior del filtro 960 puedan ser detectadas visualmente. Aunque puede haber un puerto de salida separado 954 para cada canal, los

puertos de salida pueden ser compartidos, como se muestra en la figura.

El filtro 960 puede comprender una membrana con surcos grabados (por ejemplo, policarbonato, poli(tereftalato de etileno), vidrio, aluminio u otro material), óxido de aluminio, Teflon®, nitrocelulosa, y otros materiales. En ciertos casos, los filtros 960 se fabrican por separado, siendo de material diferente del separador y la estructura externa 970, y, por tanto, se colocan sobre el elemento estructural poroso (no mostrado) que contiene el filtro en su sitio y previene que el medio fluya de la cámara superior 964 a la cámara inferior 962 sin pasar a través del filtro 960.

El filtro tiene preferentemente tamaño de poro medio inferior a 500 nm, y más preferentemente inferior a 250 nm y lo más preferentemente inferior a 100 nm, que generalmente será más pequeño que el organismo bacteriano más pequeño que va a detectarse. En general, tales poros son difíciles de hacer sustancialmente de menos de 50 nm, y para organismos muy pequeños (por ejemplo, partículas de virus) que son del orden de o más pequeños del diámetro de los poros, es conveniente unir partículas a los organismos (por ejemplo, partículas que comprenden poliestireno u otro polímero, oro, cerámica, u otro material) usando anticuerpos, aptámeros, o atracción electrostática (por ejemplo, donde las partículas se cubren con una superficie policatiónica), de forma que la combinación de organismo y partículas sea mayor que los poros. Debe observarse, sin embargo, que estas partículas no deben usarse en cantidad tan grande tal que cuando estén en configuración cargada tengan un área superior a la del filtro 960.

Generalmente, se preparan muestras bacterianas como se ha descrito anteriormente para eliminar contaminantes en partículas (por ejemplo, polvo), células de mamífero, moco y otros agentes interferentes, y en general para reducir el volumen de muestra a un mililitro o menos (los caudales de muestra a través del filtro pueden ser muy bajos en ciertos casos, tales como filtros con surcos grabados). Las bacterias introducidas en una muestra a través del puerto de entrada 952 circulan a través del filtro 960, y se capturan sobre su superficie. Las bacterias se detectan sobre la superficie a través de la estructura externa 970 a través de los medios descritos anteriormente. Entonces, medios que comprenden nutrientes, tinciones mortales y vitales, indicadores, AOA, y otros materiales como se describe en las secciones sobre crecimiento y detección anteriores, se introducen a través del puerto de entrada 952 y se sacan a través del puerto de salida 954. Si se desea que una fuerza constante se ponga en el sistema de forma que las bacterias que surgen nuevamente a través de crecimiento en medios no se muevan lejos de su sitio de origen, puede mantenerse el movimiento de medio a través del sistema.

En otra configuración, puede lograrse la concentración de muestra, transporte y unión simultáneamente sobre una superficie de captura no específica donde se aplican múltiples fuerzas para efectuar la separación de las bacterias en diferentes fracciones basándose en el tamaño (volumen o sección transversal), relación carga a masa, unión relativa de marcas electrostáticas o magnéticas, movilidad electroforética y otras características. En una configuración, las bacterias se mueven horizontalmente a lo largo de la cámara a través del movimiento del fluido, movimiento que puede llevarse a cabo mediante electrosmosis, bombas de desplazamiento positivo, bombas peristálticas, u otros medios, o alternativamente, las bacterias pueden moverse bajo la aplicación de una fuerza direccional (por ejemplo, electroforesis, campos magnéticos, etc.). La fuerza direccional vertical sobre las bacterias puede ser realizada mediante flujo de fluidos (por ejemplo, mediante filtración), electroforesis, electrosmosis, medios centrífugos u otros medios. Debe observarse que la fuerza en una dirección cualquiera puede ser el resultado de fuerzas aditivas u opuestas de una (por ejemplo, el flujo de fluidos puede aplicarse en direcciones opuestas en diferentes localizaciones en sección transversal), dos o más de las fuerzas descritas anteriormente. Por tanto, las fuerzas pueden ser orientadas de manera que sean paralelas, ortogonales, o una combinación de las dos.

Las FIG. 41A-B son secciones transversales esquemáticas de un sistema de detección usando múltiples fuerzas para efectuar la separación de la muestra bacteriana. En la FIG. 41A, un movimiento de fluido horizontal y vertical combinado producido por presión de desplazamiento positivo en la entrada 803 hace que el flujo salga del puerto de salida 802 a la cámara 805 mediante un filtro con surcos grabados 1001. Este movimiento de fluido global está coordinado con la aplicación adicional de electroforesis horizontal usando un ánodo 815 y un cátodo 816, que opone el flujo de fluidos de una manera simultánea o secuencial. Es decir, en coordinación secuencial, el movimiento de fluidos puede realizarse durante un cierto periodo, y entonces ir seguido de un periodo de no movimiento de fluido durante el que se aplica la electroforesis, o la electroforesis puede aplicarse durante el movimiento en coordinación simultánea. En el último caso, la velocidad de movimiento o la magnitud de la fuerza electroforética puede variarse, de forma que bacterias de dos tipos (indicadas por las estrellas 830 y 835 y diamantes 840), agrupaciones de los tipos de bacterias (indicados por 830B y 835B), y contaminantes de muestras 1000 se separen por diversas características físicas tales como tamaño, forma y movilidad electroforética.

En la FIG. 41B, al final de la separación, las fuerzas electroforéticas y de fluido de flujo global han sido equilibradas de manera que las bacterias 830, 835 y 840 y contaminantes 1000 se separen basándose en tamaño y carga. Las bacterias 830 se separan en regiones de bacterias individuales 830 y bacterias aglomeradas 830B. Por tanto, hay una separación de bacterias vivas 830 de bacterias muertas 835, separación que se produce debido a cambios en el tamaño, propiedades de superficie y carga (debido en parte a cambios en la permeabilidad). Estas áreas separadas ayudan en la identificación de bacterias sobre el filtro 1001 y la separación o eliminación de contaminantes 1001 de la muestra.

Aunque el cátodo 816 está en la parte superior del sistema mostrado (es decir, el cátodo 816 y el ánodo 815 están sobre el mismo lado del filtro 1001), en una configuración, el cátodo 816 puede colocarse en la parte más baja del sistema mostrado, de manera que el cátodo 816 y el ánodo 815 estén en lados opuestos del filtro 1001. En este caso, las bacterias que se mueven a través del filtro 1001 son afectadas por un flujo de fluidos, que tanto mueve las bacterias a través del filtro 1001 y con el tiempo bajan sobre el filtro 1001, además de una fuerza electroforética que mueve las bacterias solo hacia abajo (y a los poros, a través de los que se aplica la fuerza electroforética). Así, las fuerzas de flujo de fluidos y electroforesis pueden ser independientemente aplicadas, efectuando una separación de bacterias y contaminantes dependiendo de sus respuestas a estas dos fuerzas. De hecho, en este caso, puede ser conveniente que el puerto de salida 802 esté en la parte superior del sistema, de manera que las fuerzas del flujo de fluidos sean casi completamente horizontales, mientras que la fuerza electroforética es vertical. Puede usarse el uso de cualquier membrana permeable que soporte la electroforesis en este aparato en lugar del filtro con surcos grabados 1001.

Debe observarse que hay muchas configuraciones de los canales en el dispositivo como se describe en el presente documento. Por ejemplo, aunque pueda haber filtros separados 960 para cada canal, es conveniente que haya un único filtro 960 que esté separado por paredes entre cada canal. Además, aunque se muestra que el filtro 960 es rectangular dentro de cada canal, también es conveniente que el filtro 960 esté en una relación de aspecto (cuadrada o ligeramente rectangular) que se corresponda con el campo de vista del sistema óptico usado para detectar bacterias sobre la superficie del filtro 960. Además, aunque los puertos de entrada 952 y los puertos de salida 954 se muestran en el mismo lado del dispositivo 950, también pueden localizarse en lados opuestos del dispositivo 950, u orientados perpendicularmente el uno al otro.

Muchas realizaciones de la presente invención

Debe ser evidente para un experto en la materia que las realizaciones anteriormente mencionadas son simplemente ilustraciones de algunas de las muchas posibles realizaciones específicas de la presente invención. Debe también apreciarse que los métodos de la presente invención proporcionan un número casi incontable de disposiciones de indicadores, marcas, detectores, medios de mezcla, medios de aplicación de fuerza y más.

Algunas de las realizaciones se describen de forma combinatoria en la FIG. 42, un diagrama de bloques de una biodetección por la presente invención y como se describe en el presente documento.

Como se muestra en Identidad de dianas, las dianas pueden comprender ADN, ARN, proteína, almidón, lípidos (por ejemplo, hormonas esteroideas), y pueden comprender además combinaciones de éstos (por ejemplo, glucoproteínas). Además, las dianas pueden comprender organismos o tejidos, que incluyen bacterias, hongos, virus, micoplasma, protozoos, o diversos tipos de células de animal o vegetal (por ejemplo, células circulantes, o células de cultivo de tejido). Más generalmente, las dianas pueden comprender cualquier material o molécula para el que pueda desarrollarse una sonda específica. En la presente invención, la diana es un microorganismo.

En una Preparación de muestras opcional, la diana en la que la diana está presente puede prepararse para el análisis posterior, por motivos que pueden incluir eliminación de contaminantes, concentración a un volumen más fácilmente manipulado, o colocación de las dianas en un tampón cuyas características sean más apropiadas para las posteriores etapas de análisis. Esta preparación de muestras puede comprender centrifugación (ya sea para centrifugar la diana de la muestra para resuspensión en otro tampón o para centrifugar contaminantes en partículas de las dianas en solución), intercambio iónico (por ejemplo, filtración a través de una resina de intercambio iónico o mezclar la muestra con perlas de intercambio iónico), filtración, electroforesis (por ejemplo, electroforesis de apilamiento o electroforesis en gel con extracción), y otras formas de separación bioquímica, química o física (columnas de afinidad, reparto de fases, precipitación, etc.).

En un Marcado opcional, la diana se marca para mejorar ya sea su movimiento hacia la sonda, o para hacerla más detectable por el detector. Aquellas marcas que afectan la movilidad comprenden marcas electrostáticas (por ejemplo, para el movimiento bajo campos electroforéticos), marcas magnéticas (por ejemplo, para el movimiento en campos magnéticos), marcas electrostáticamente polarizables (por ejemplo, para el movimiento en campos dielectroforéticos) y otras marcas con propiedades físicas que cambian el movimiento de dianas en diferentes entornos físicos o químicos. Las marcas también pueden comprender marcas de indicador, tales como partículas de dispersión de la luz, marcas electroquímicas, marcas fluorescentes, marcas de fósforo de conversión ascendente, marcas de puntos cuánticos, o marcas de enzima (por ejemplo, peroxidasa) que mejorarán la visibilidad de la diana marcada en una etapa posterior. Debe observarse que la marca puede incorporar ambas funcionalidades (movimiento y detección), ya sea dentro de una única entidad (por ejemplo, una partícula de dispersión de la luz que también es electrostáticamente polarizable o una partícula magnética que dispersa la luz), o resultante de la unión de dos entidades diferentes con diferente funcionalidad.

Debe también observarse que el Marcado puede producirse múltiples veces, por ejemplo, en un primer caso para potenciar la movilidad y en un segundo caso para potenciar la detección. De hecho, el Marcado puede producirse ya sea antes de la Captura de diana (tratado más adelante), después de la Captura de diana, o ambos, antes y después de la Captura de diana.

En Captura de diana, la diana se captura sobre una superficie. Esta captura generalmente implica un movimiento de la diana a la superficie, y puede comprender electroforesis, dielectroforesis, centrifugación, captura de campo magnético, filtración, gravedad, u otras fuerzas que producen la captura de la diana sobre la superficie. La superficie pueden tener ya sea una afinidad natural por la diana, o puede tratarse de tal forma que tenga una afinidad específica por alguna dianas (por ejemplo, recubrimiento de la superficie con un anticuerpo), o una afinidad general por muchas dianas (por ejemplo, recubrimiento de la superficie con un polímero policatiónico).

En concierto con la Captura de diana, puede realizarse Movimiento horizontal opcional, en el que el Movimiento horizontal usa electroforesis, filtración, flujo global (por ejemplo, de bombas o electroendosmosis), u otros medios para afectar la distribución de la diana sobre la superficie. La distribución pueden o bien hacerse más uniforme (por ejemplo, para permitir que la diana se aproxime más a la superficie), o alternatively, puede usarse para poner dianas con diferentes características en diferentes localizaciones sobre la superficie (por ejemplo, para "fraccionar" bacterias basándose en sus movilidades electroforéticas).

En Lavado, se elimina la diana no unida, y puede hacerse un intento por eliminar material no específicamente unido. El Lavado puede comprender electroforesis, dielectroforesis, químico (por ejemplo, sal, pH, tensioactivo, competidor de afinidad), físico (por ejemplo, temperatura), campo magnético, u otros medios que afectan la unión de la sonda (o agente de captura no específica) a la diana capturada. Debe observarse que alguna fracción del material no específicamente unido puede estar más ceñidamente unido que el de la diana específicamente unida. El Lavado también puede distinguir diana específicamente unida como el material que es liberado entre dos niveles de rigurosidad.

En Tinción opcional, la diana unida puede ser teñida con el fin de afectar su visibilidad, y puede usarse para determinar el estado de la diana. Esto es particularmente útil en el caso de células (bacterianas, animal o planta), donde el uso de tinciones mortales y vitales indica si las células están vivas o muertas, y el uso de serotipificación (generalmente con el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales marcados) puede establecer la identidad de las células (por ejemplo, género, especie, tipo de célula). Debe observarse que la Tinción puede realizarse alternatively como parte del Marcado (por ejemplo, una marca fluorescente puede unirse mediante un anticuerpo específico de serotipo), antes de la Captura de diana, entre la Captura de diana y el Lavado, o después del Lavado. El momento en el que mejor se realiza la Tinción depende de la persistencia de la tinción, el grado al que la tinción interfiere con otras etapas, y otros motivos.

Alternatively o conjuntamente con la Tinción está la Incubación opcional, en la que la diana se incuba, que se realiza generalmente con dianas vivas (por ejemplo, bacterias). En este caso, la incubación se realiza convenientemente en un medio de cultivo propicio para el crecimiento, y puede ser realizada con una condición biológica, tal como la aplicación de un AOA, exposición a una hormona, fármaco, temperatura, u otro mediador biológico. Es mejor si la respuesta esperada de la diana a la condición es visible por el detector, que puede implicar el uso de una tinción. La tinción también puede emplearse después de la incubación, y debe apreciarse que la aplicación de la tinción puede producirse múltiples veces en un análisis (por ejemplo, de manera que las células que están creciendo nuevamente en la Incubación puedan teñirse con la tinción, o de manera que la respuesta de las células a la condición).

En Detección, las dianas son detectadas por el detector. El detector puede ser un detector óptico, que puede ser un generador de imágenes/cámara, que puede visualizar las dianas mediante campo brillante, campo oscuro, cambio de frecuencia (por ejemplo, fluorescencia, fósforos de conversión ascendente, octetos cuánticos), fase, luz emitida (por ejemplo, quimioluminiscencia), u otros medios de obtención de imágenes. La detección también puede comprender un tubo fotomultiplicador, conjuntamente con un escáner de láser, o con óptica de promediación que disemina la luz desde el campo entero o una porción considerable del campo sobre la fuente de agrupación de luz (que podría también utilizar un fotodiodo, fotorresistor u otro dispositivo de medición de la luz). Por tanto, la detección puede implicar SPR, ya sea en un modo de obtención de imágenes, o en modo de promediación. Debe observarse que hay medios no ópticos de detección, que usan, por ejemplo, medición de corriente eléctrica, que puede usarse con ciertas realizaciones de la presente invención.

En algunos casos, es conveniente realizar la detección múltiples veces a diferentes rigurosidades de lavado, en cuyo caso la detección puede ir seguida de otro ciclo de lavado y detección. Por tanto, como se muestra, puede ser conveniente realizar múltiples tiempos de detección después de la Incubación continuada o Tinción múltiple (por ejemplo, para determinar la susceptibilidad de organismos a AOA).

En Análisis, se analizan los datos del detector. El Análisis puede comprender rastrear dianas individuales, o la medición y análisis de propiedades globales de la señal generada por el detector. Adicionalmente, el análisis puede examinar el cambio de señal con el tiempo (por ejemplo, en respuesta al crecimiento de organismos, su viabilidad en diferentes concentraciones de AOA, o la unión de diana a diferentes rigurosidades de lavado).

Debe observarse que las realizaciones de la presente invención no son exhaustivamente enumeradas en la FIG. 42, y que las numerosísimas realizaciones integradas de forma combinatoria en la figura son solo ilustrativas.

Pueden ser fácilmente ideadas numerosas y variadas otras disposiciones por aquellos expertos en la materia. Además, todas las declaraciones en el presente documento que citan principios, aspectos y realizaciones de la presente invención, además de ejemplos específicos de las mismas, pretenden englobar tanto equivalentes estructurales como funcionales de las mismas. Además, se pretende que tales equivalentes incluyan tanto

5 equivalentes actualmente conocidos, además de equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura.

En la memoria descriptiva de este documento, cualquier elemento expresado como un medio para realizar una función especificada pretende englobar cualquier forma de realizar esa función. La invención como se define por tal

10 memoria descriptiva reside en el hecho de que las funcionalidades proporcionadas por los diversos medios citados se combinan y se ponen juntas en el modo que exige la memoria descriptiva. El solicitante considera así cualquier medio que pueda proporcionar aquellas funcionalidades como equivalentes a aquellas mostradas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un primer tipo de microorganismo en una muestra, que comprende:

a) poner en contacto dicha muestra con un sistema que comprende:

- i) una cámara que comprende un primer electrodo y un segundo electrodo en paredes opuestas de la cámara, en donde los electrodos están configurados para hacer que dicho primer tipo de microorganismo migre hacia dicho primer electrodo cuando se aplica un potencial entre los electrodos;
- ii) una primera superficie de detección dispuesta sobre dicho primer electrodo, comprendiendo dicha superficie una pluralidad de primeros componentes de afinidad que se unen a dicho primer tipo de microorganismo;
- iii) un puerto de entrada configurado para transportar dicha muestra a la cámara entre los electrodos;
- iv) un puerto de salida configurado para transportar dicha muestra fuera de dicha cámara;
- v) un controlador eléctrico operativamente unido al primer y al segundo electrodos, dicho controlador configurado para controlar el potencial entre el primer y el segundo electrodos;
- vi) un detector automático configurado para detectar la cantidad de dicho primer tipo de microorganismo unido a los primeros componentes de afinidad;
- vii) un controlador de información que guarda la cantidad del primer tipo de microorganismo como se ha determinado mediante el detector automático;

b) capturar dicho primer tipo de microorganismo sobre dicha superficie de detección, en donde una pluralidad de dicho primer tipo de microorganismo se une a dicha superficie de detección;

c) dejar que crezca dicha pluralidad de dicho primer tipo de microorganismo; y

d) detectar una cantidad de microorganismos en crecimiento como una indicación de la presencia de dicho primer tipo de microorganismo en la muestra.

2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho potencial se aplica utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en electroforesis y dielectroforesis.

3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que dichos primeros componentes de afinidad sobre dicha superficie de detección comprenden anticuerpos específicos para dicho primer tipo de microorganismo.

4. El método según las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que dicha superficie de detección comprende una superficie no específica.

5. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que se establece la identidad de al menos un microorganismo.

6. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha detección se hace detectando la presencia de microorganismos hija.

7. El método según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha detección comprende además añadir una marca, y dicha detección se hace monitorizando alteraciones en la unión de dicha marca a dicho primer tipo de microorganismo a medida que crece, en donde la marca es una tinción mortal o una tinción vital o una tinción serológica.

8. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el microorganismo está seleccionado del grupo que consiste en *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Candida*, *Aspergillus* y *Neisseria*.

9. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el detector automático está configurado para detectar el primer tipo de microorganismo por un método seleccionado de un conjunto que consiste en obtención de imágenes de dispersión de la luz, obtención de imágenes de campo brillante, obtención de imágenes de campo oscuro, obtención de imágenes de fase, obtención de imágenes de fluorescencia, obtención de imágenes de fósforo de conversión ascendente, obtención de imágenes de puntos cuánticos, obtención de imágenes de quimioluminiscencia.

10. El método de la reivindicación 9, en el que el detector automático está además configurado para determinar la posición de al menos una porción de dicho primer tipo de microorganismos sobre dicha superficie de detección.

11. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la muestra comprende además un segundo tipo de microorganismo, en donde el detector automático está configurado para distinguir el primer tipo de microorganismo del segundo tipo de microorganismo.

12. El método de la reivindicación 11, que comprende además:

una primera marca unida al primer tipo de microorganismo; y
una segunda marca unida al segundo tipo de microorganismo;
5 en donde el detector automático está configurado para distinguir entre la primera marca y la segunda marca.

13. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el detector automático está configurado para detectar al menos una de:

la cantidad del primer tipo de microorganismo, la cantidad del segundo tipo de microorganismo, eventos de unión individuales, la cantidad de la primera y la segunda marcas, la diferencia de crecimiento entre dicho primer tipo de microorganismo en un primer tiempo y un segundo tiempo, y la morfología de dicho primer tipo de microorganismo en un primer tiempo y un segundo tiempo.

14. Un método de detección de la respuesta de al menos un primer tipo de microorganismos a una condición en una muestra, que comprende:

a) poner en contacto dicha muestra con un sistema que comprende:

i) una cámara que comprende un primer electrodo de electroforesis y un segundo electrodo de electroforesis en paredes opuestas de la cámara, en donde los electrodos están configurados para hacer que dicho primer tipo de microorganismo migre hacia dicho primer electrodo cuando se aplica un potencial entre los electrodos;
ii) una primera superficie de detección dispuesta sobre dicho primer electrodo, comprendiendo dicha superficie una pluralidad de primeros componentes de afinidad que se unen a dicho primer tipo de microorganismo;
25 iii) un puerto de entrada configurado para transportar dicha muestra a la cámara entre los electrodos;
iv) un puerto de salida configurado para transportar dicha muestra fuera de dicha cámara;
v) un controlador eléctrico operativamente unido al primer y al segundo electrodos, dicho controlador configurado para controlar el potencial entre el primer y el segundo electrodos;
30 vi) un detector automático configurado para detectar la cantidad de dicho primer tipo de microorganismo unido a los primeros componentes de afinidad;
vii) un controlador de información que guarda la cantidad del primer tipo de microorganismo como se ha determinado mediante el detector automático;

b) capturar dicho primer tipo de microorganismo sobre dicha superficie de detección, en donde una pluralidad de dicho primer tipo de microorganismo se une a dicha superficie de detección para convertirse en microorganismos unidos;

c) detectar con el detector automático en un primer tiempo una propiedad de dichos microorganismos unidos sobre la superficie;

d) añadir al menos una condición a dicha superficie de detección;

e) detectar con el detector automático en un segundo tiempo una propiedad de dichos microorganismos unidos sobre la superficie;

f) determinar la respuesta de los microorganismos unidos a la condición por la cantidad de diferencia de la propiedad en los microorganismos unidos entre el primer tiempo y el segundo tiempo

en donde la propiedad comprende al menos una de una cantidad de tinción que se detecta, el tamaño, la forma o la cantidad de los microorganismos unidos o la presencia de un microorganismo adicional en el segundo tiempo adyacente a la localización de los microorganismos unidos, en donde el microorganismo adicional no está presente en el primer tiempo,

en donde la condición comprende la presencia de un agente seleccionado de un antibiótico, un bacteriófago, un virus animal, ARN bicatenario, ADN, un fármaco antineoplásico, un fármaco antifúngico, un fármaco antipalúdico y un fármaco antiprotozoario.

15. Un sistema de detección de un primer tipo de microorganismo viable en una solución, que comprende:

i) una cámara que comprende un primer electrodo de electroforesis y un segundo electrodo de electroforesis en paredes opuestas de la cámara, en donde los electrodos están configurados para hacer que dicho primer tipo de microorganismo viable migre hacia dicho primer electrodo cuando se aplica un potencial entre los electrodos;
ii) una primera superficie de detección dispuesta sobre dicho primer electrodo, comprendiendo dicha superficie de detección una pluralidad de primeros componentes de afinidad que se unen a dicho primer tipo de microorganismo viable, en donde un microorganismo viable es un microorganismo que participa en el crecimiento y la división;
iii) un controlador eléctrico operativamente unido al primer y al segundo electrodos, dicho controlador configurado para controlar el potencial entre el primer y el segundo electrodos; y
65 (iv) un detector óptico configurado para detectar la cantidad de dicho primer tipo de microorganismo viable unido a los primeros componentes de afinidad.

16. El sistema de la reivindicación 15, en el que el primer tipo de microorganismo está seleccionado del grupo que consiste en *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Candida*, *Aspergillus* y *Neisseria*.

5 17. El sistema de la reivindicación 15, que comprende además la solución, en donde la solución comprende un agente de oxidación o un agente reductor.

10 18. El sistema de la reivindicación 17, en el que el agente de oxidación está seleccionado del conjunto que consiste en benzoquinona, un ditiol, una cetona, un ferrocenilo, un ferricianuro, dihidroascorbato, glutatión oxidado, viológeno de metilo oxidado, agua y un halógeno, y en donde el agente reductor está seleccionado del conjunto que consiste en ditiotreitolo, ditioeritritolo, un ditioalcano, un ditioalqueno, un tioalcano, un tioalqueno, un tiol, una hidroquinona, un alcohol, un ferroceno, un ferrocianuro, ascorbato, glutatión, viológeno de metilo, agua y un haluro.

15 19. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, que comprende además un puerto de entrada configurado para transportar dicha solución a la cámara entre los electrodos y un puerto de salida configurado para transportar dicha solución fuera de dicha cámara.

20 20. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19, que comprende además un concentrador dispuesto antes del puerto de entrada que concentra el primer tipo de microorganismos en la solución.

25 21. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 15-20, en el que el detector óptico está configurado para detectar el primer tipo de microorganismo por un método seleccionado del conjunto que consiste en obtención de imágenes de dispersión de la luz, obtención de imágenes de campo brillante, obtención de imágenes de campo oscuro, obtención de imágenes de fase, obtención de imágenes de fluorescencia, obtención de imágenes de fósforo de conversión ascendente, obtención de imágenes de puntos cuánticos, obtención de imágenes de quimioluminiscencia.

30 22. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 15-21, en el que el detector óptico comprende una cámara.

23. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 15-22, en el que la solución comprende además un segundo tipo de microorganismo, en donde el detector óptico es capaz de distinguir el primer tipo de microorganismo del segundo tipo de microorganismo.

35 24. El sistema de la reivindicación 23, que comprende además: un primera marca unida al primer tipo de microorganismo y una segunda marca unida al segundo tipo de microorganismo; en donde el detector óptico es capaz de distinguir la primera marca y la segunda marca.

40 25. El sistema de la reivindicación 23, que comprende además un segundo componente de afinidad unido al primer electrodo, en donde el segundo componente de afinidad es capaz de unir el segundo tipo de microorganismo, y en donde el detector óptico puede detectar la cantidad del segundo tipo de microorganismo unido al segundo componente de afinidad, en donde el detector óptico está configurado para distinguir el primer tipo de microorganismo del segundo tipo de microorganismo distinguiendo si un microorganismo se une al primer componente de afinidad o el segundo componente de afinidad.

45 26. El sistema de la reivindicación 19, en donde el sistema se configura además para proporcionar medio de cultivo a través del puerto de entrada, en donde el medio de cultivo comprende además un agente anti-microorganismos seleccionado del conjunto que consiste en cefalosporinas, penicilinas, carbapenémicos, monobactámicos, beta-lactámicos, inhibidores de beta-lactamasa, fluoroquinolonas, macrólidos, cetólidos, glucopéptidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y rifampina.

50 27. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 15-26, en el que el detector óptico está configurado para determinar la posición de al menos una porción de dicho primer tipo de microorganismos sobre dicha superficie de detección, o para medir la diferencia de crecimiento entre el primer tipo de microorganismo en un primer tiempo y un segundo tiempo, o para contar la diferencia de crecimiento entre dicho primer tipo de microorganismo en un primer tiempo y un segundo tiempo, o para contar la cantidad del primer tipo de microorganismo, o para contar eventos de unión individuales.

55 28. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 15-27, que comprende además un controlador de almacenamiento que guarda la cantidad del primer tipo de microorganismo viable como se ha determinado mediante el detector óptico y en donde el controlador de almacenamiento está configurado para determinar el número de microorganismos individuales o para determinar la morfología.

60 29. Un método de detección de la respuesta de un primer tipo de microorganismo viable a una condición en una solución, que comprende:

introducir el primer tipo de microorganismo viable a un sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 15-27, capturar el microorganismo sobre la primera superficie de detección usando una fuerza aplicada de forma que el microorganismo se convierta en un microorganismo capturado, en donde la superficie tiene una afinidad por el microorganismo y la fuerza aplicada es electroforesis;

5 detectar ópticamente en un primer tiempo una propiedad del microorganismo capturado sobre la superficie; poner el microorganismo capturado en la condición;

detectar ópticamente en un segundo tiempo la propiedad del microorganismo capturado sobre la superficie; y determinar la respuesta del microorganismo capturado a la condición mediante la cantidad de diferencia de la propiedad del microorganismo capturado entre el primer tiempo y el segundo tiempo

10 en donde la propiedad comprende al menos una de una cantidad de tinción detectada, el tamaño, la forma o la cantidad del microorganismo capturado o la presencia de un segundo microorganismo en el segundo tiempo adyacente a la localización del microorganismo capturado, en donde el segundo microorganismo no está presente en el primer tiempo,

15 en donde la condición comprende la presencia de un agente seleccionado de un antibiótico, un bacteriófago, un virus animal, ARN bicatenario, ADN, un fármaco antineoplásico, un fármaco antifúngico, un fármaco antipalúdico y un fármaco antiprotozoario.

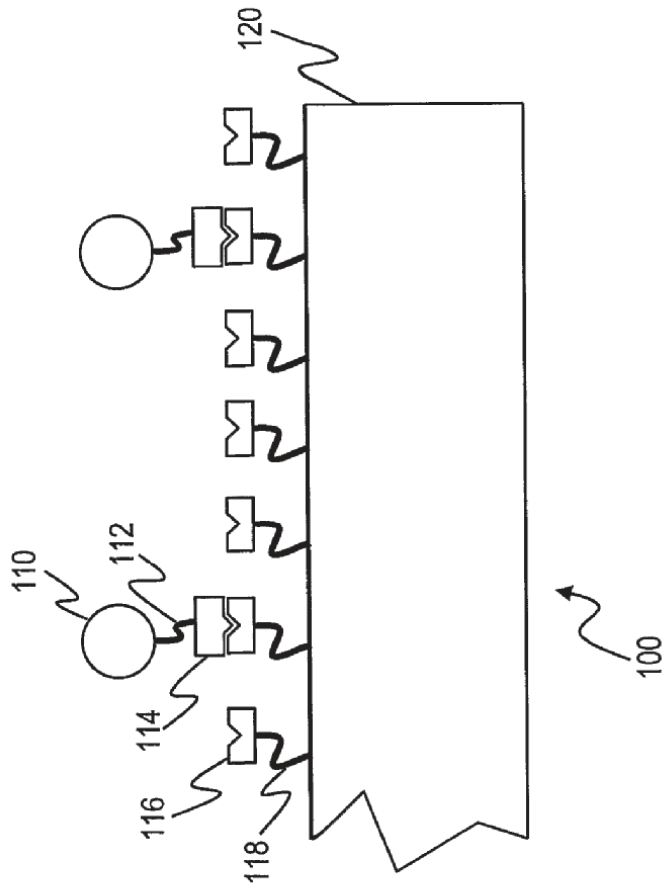


Fig. 1

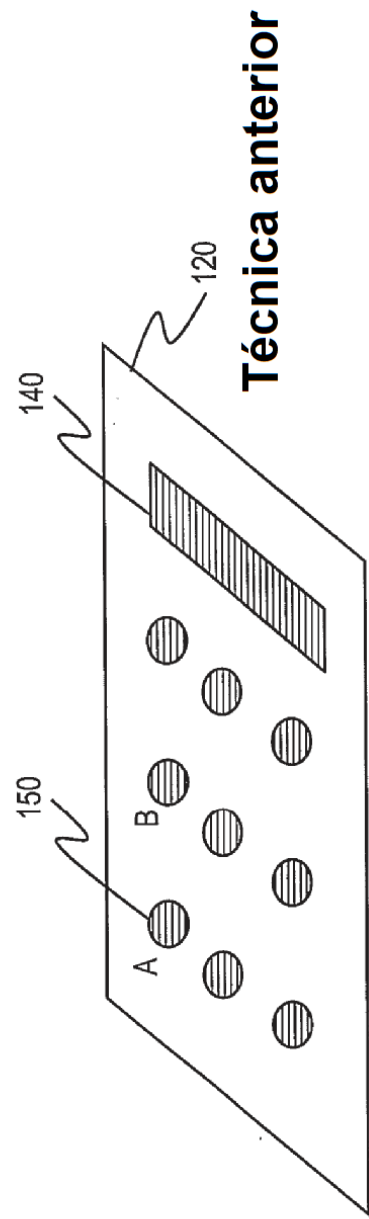


Fig. 3

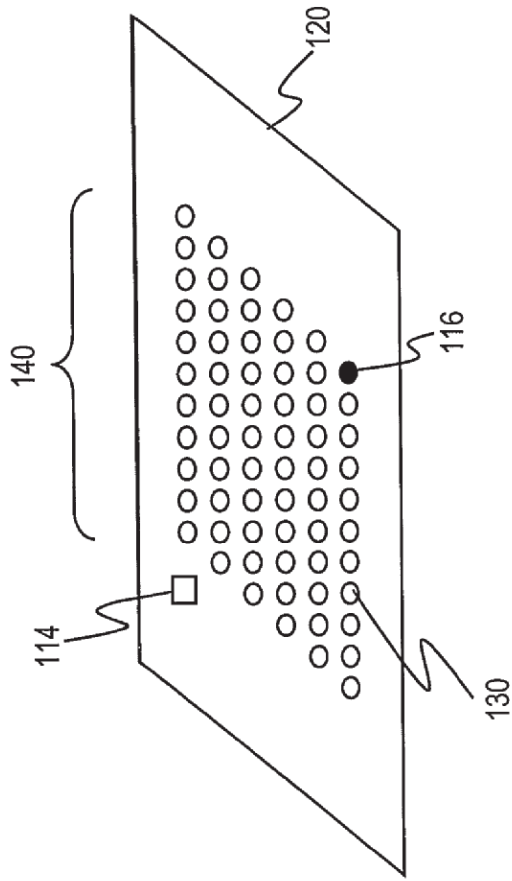


Fig. 2A

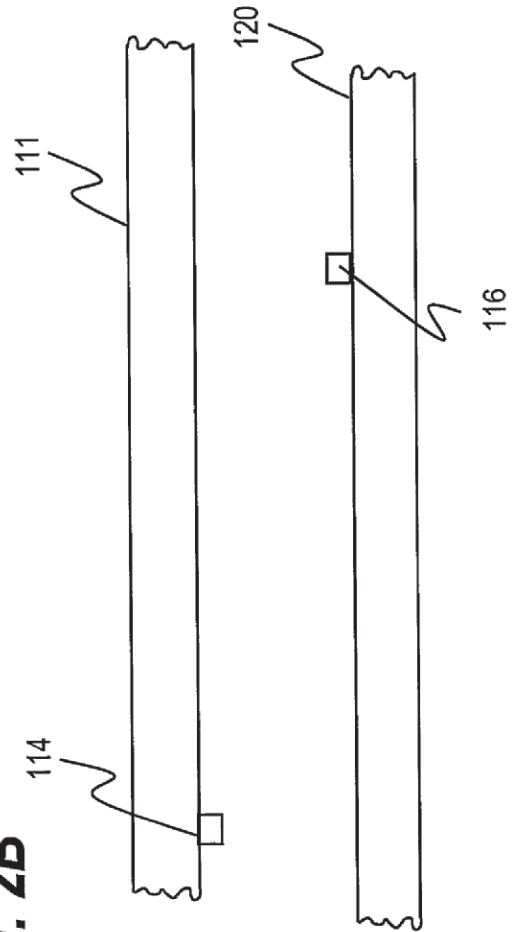
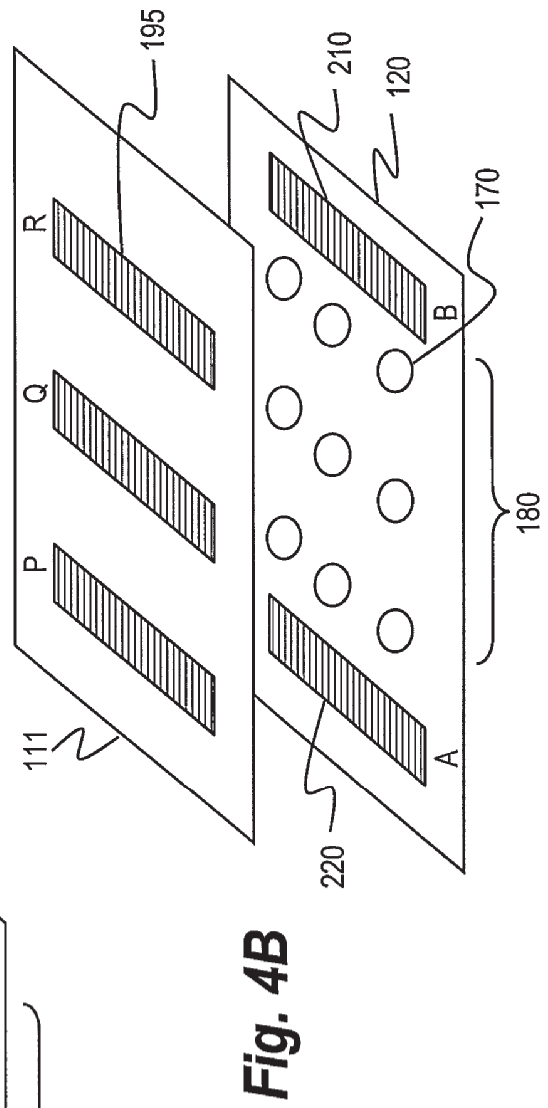
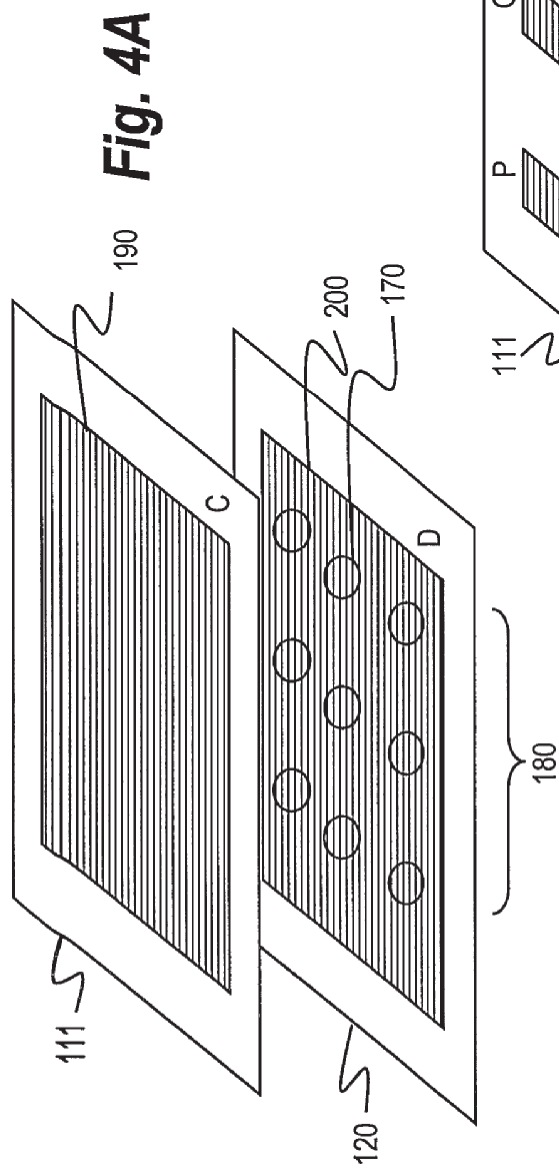


Fig. 2B



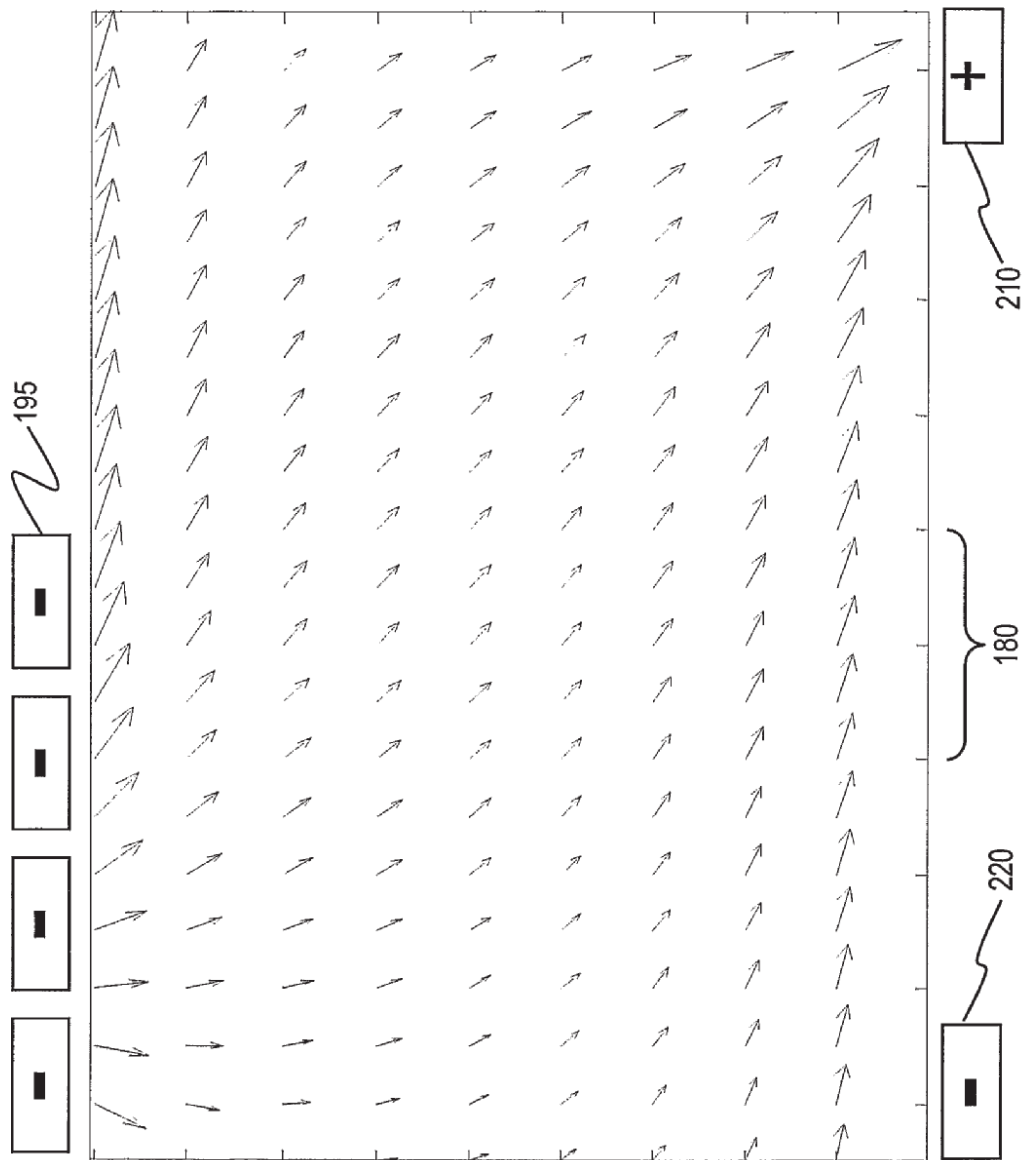
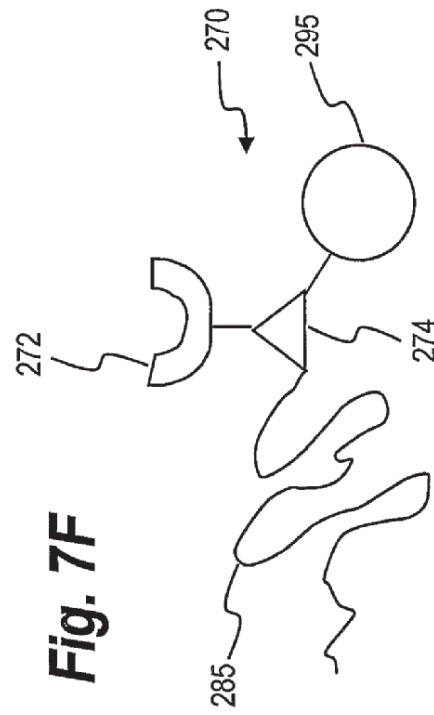
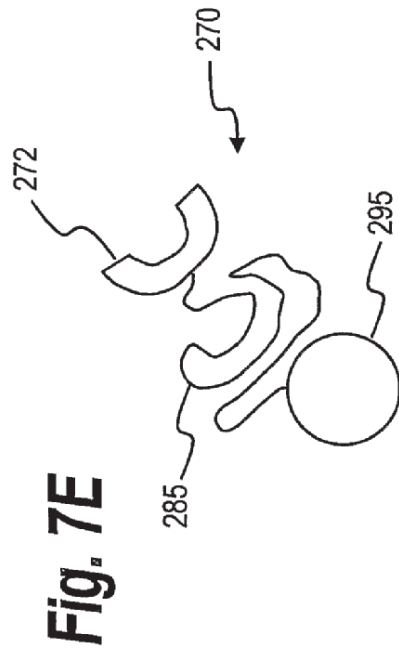
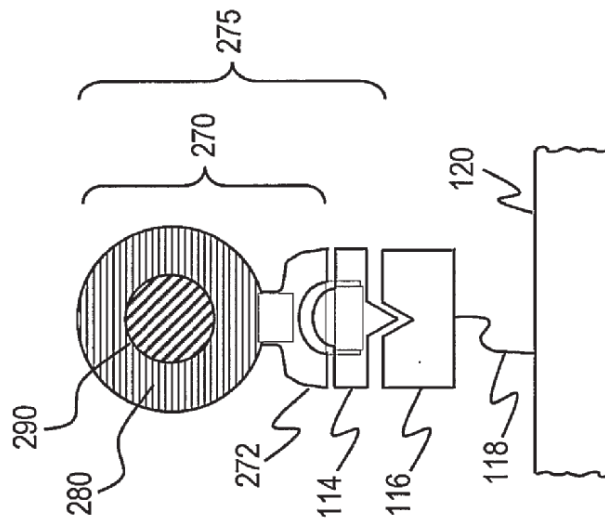


Fig. 5

Fig. 6



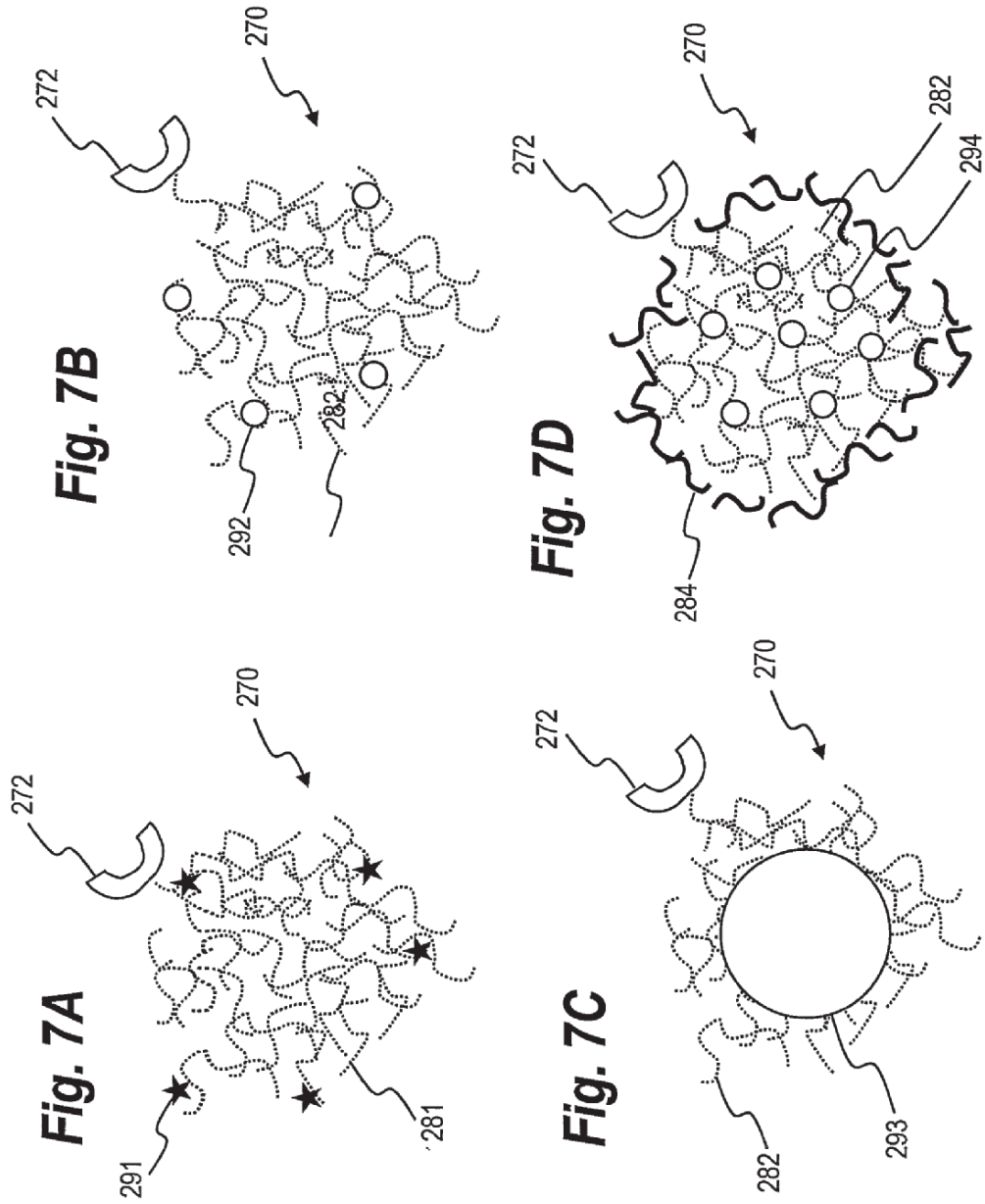


Fig. 8

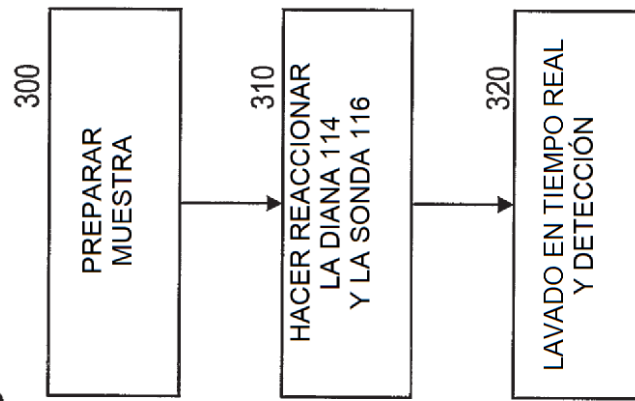


Fig. 9

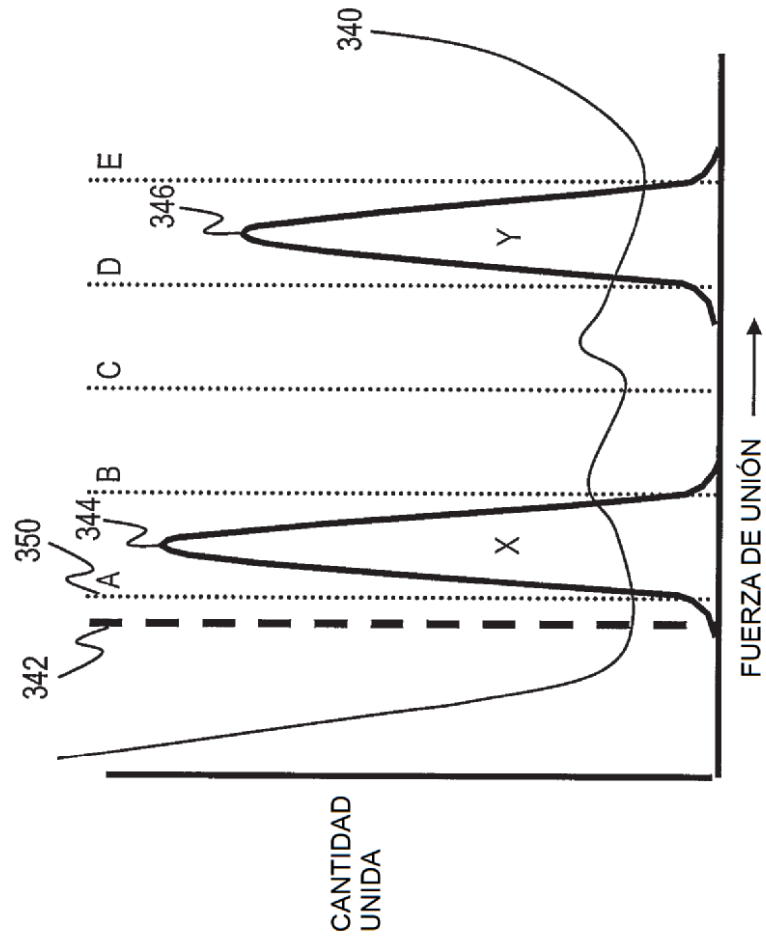
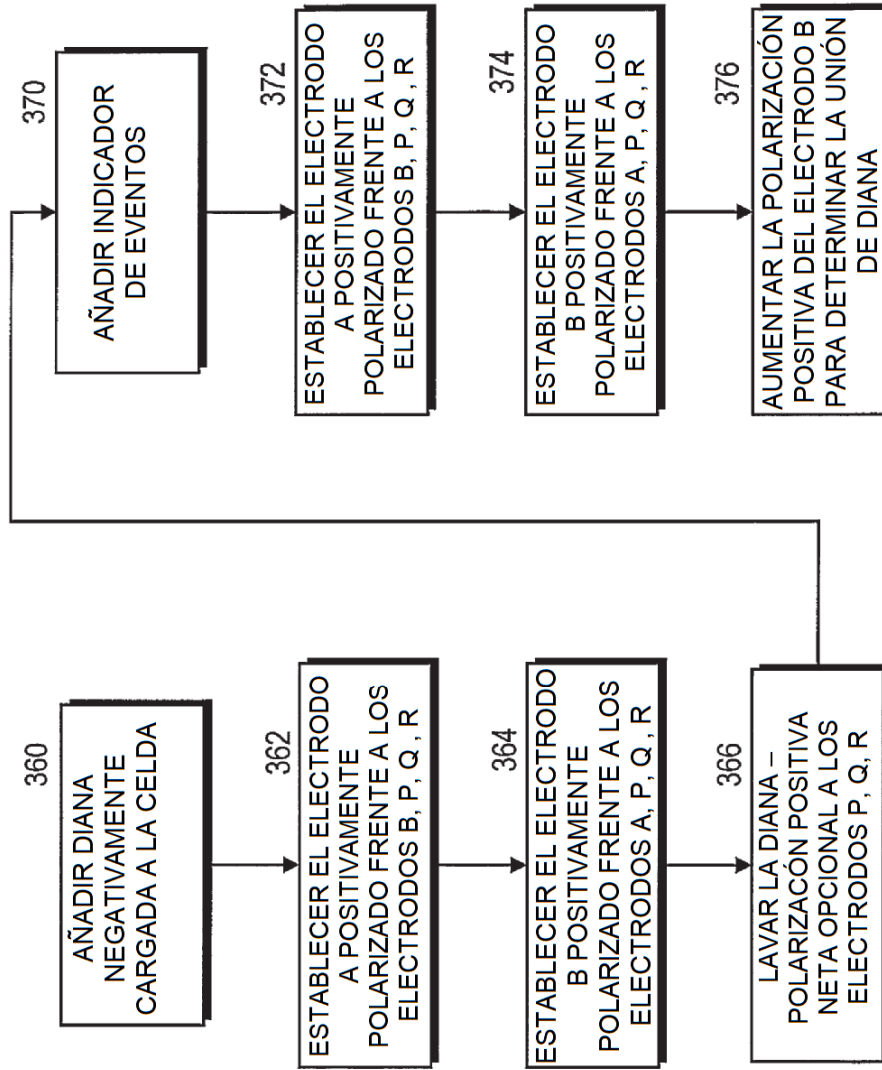


Fig. 10



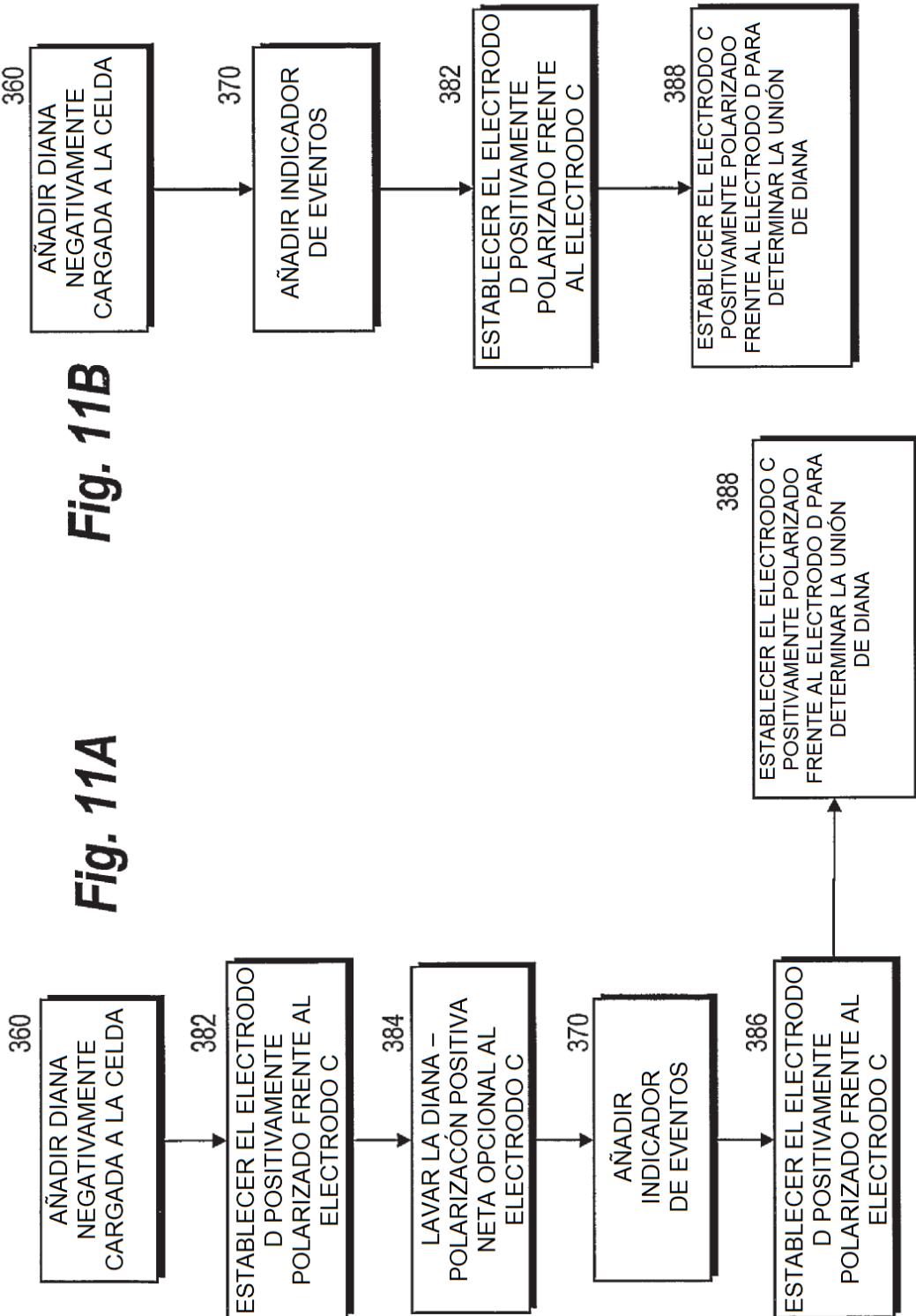


Fig. 12A

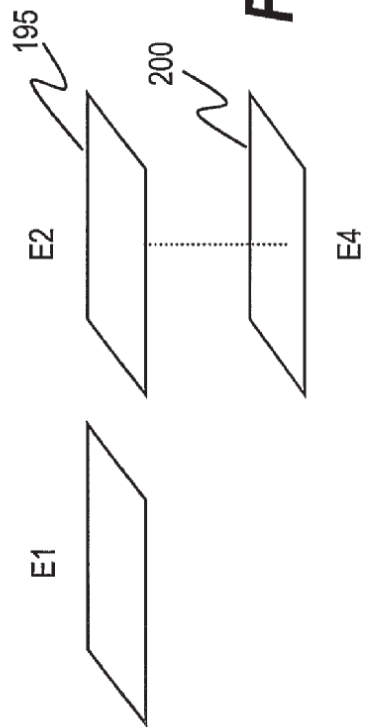


Fig. 12B

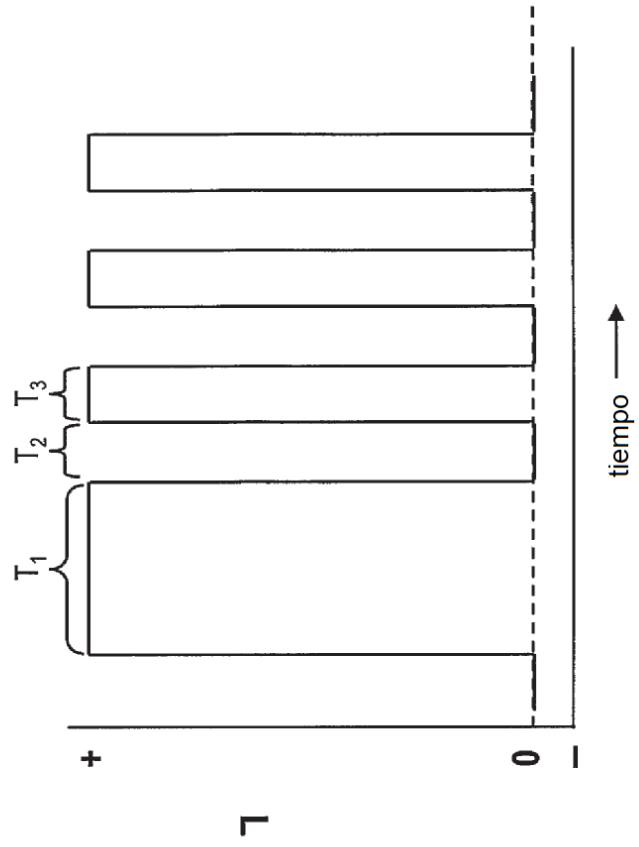


Fig. 12C

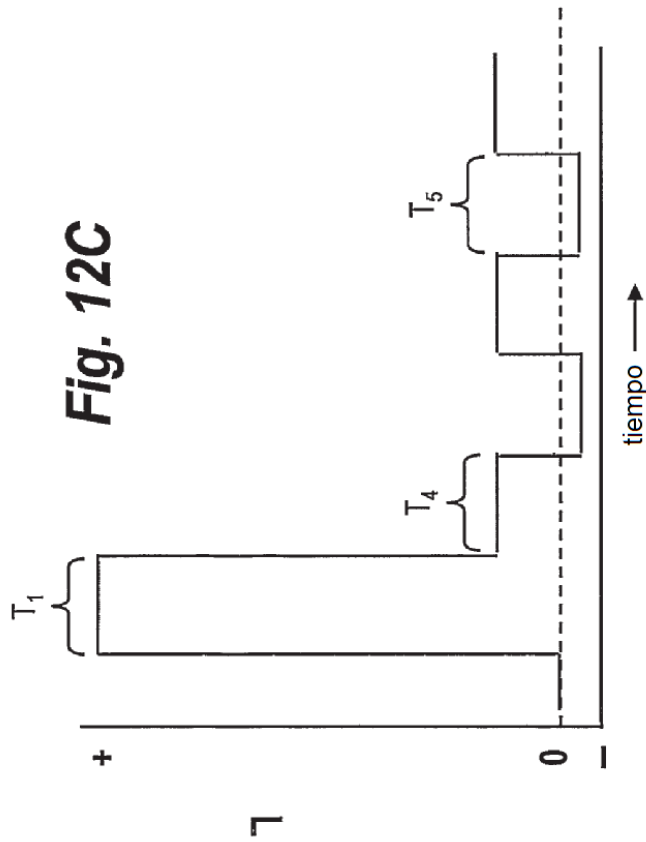


Fig. 12D

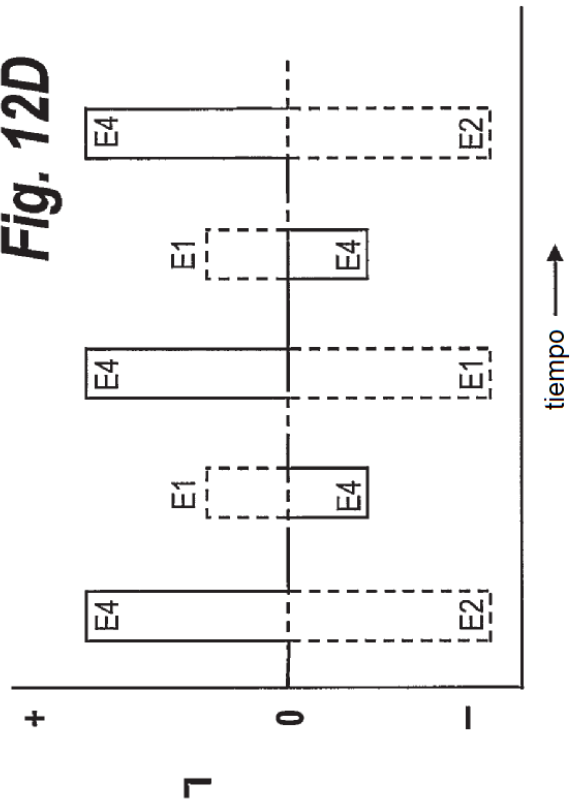


Fig. 13A

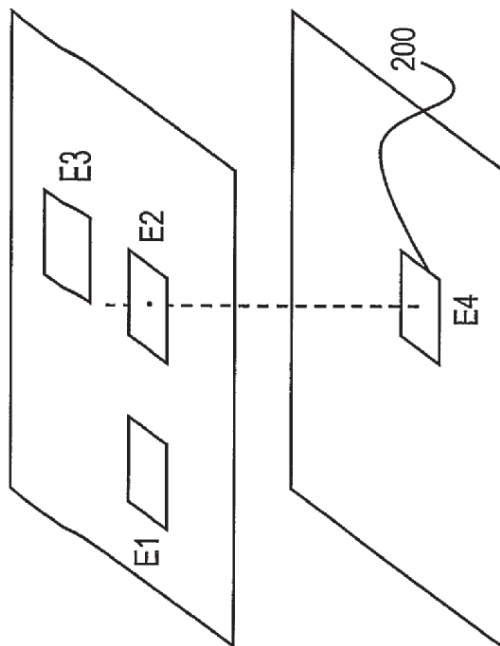
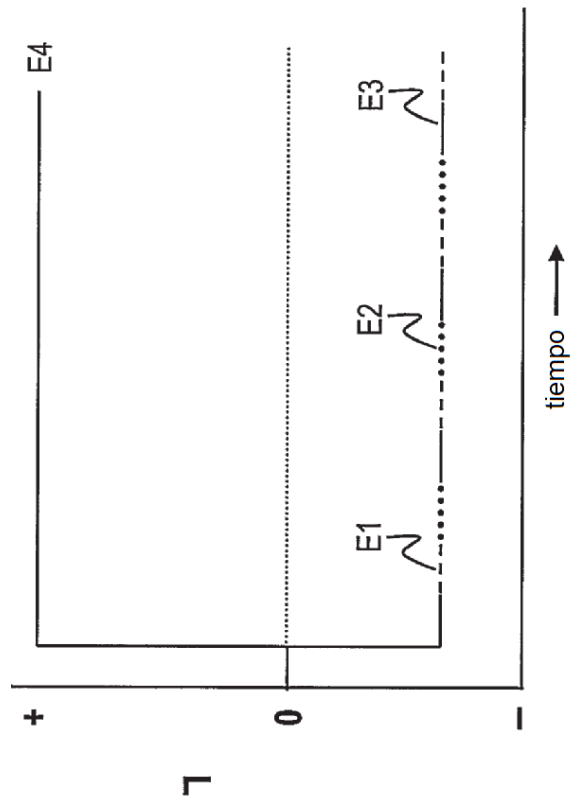


Fig. 13B



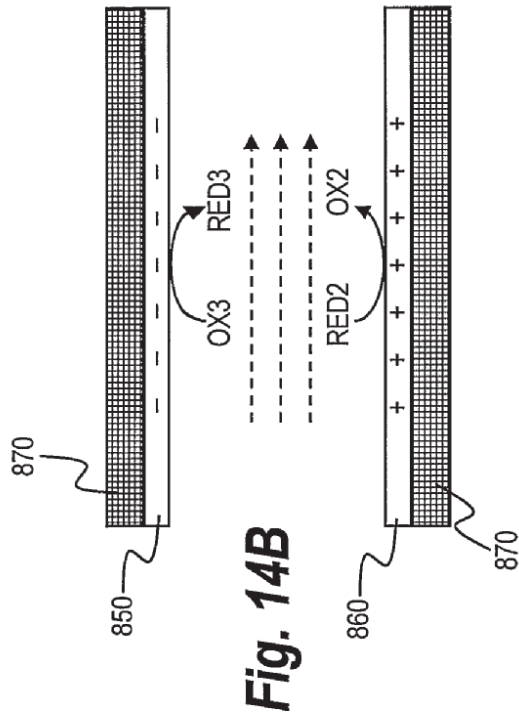


Fig. 14A

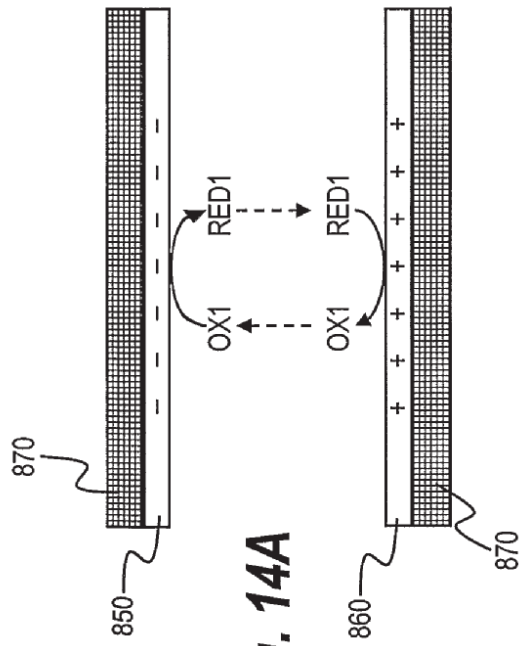


Fig. 14B

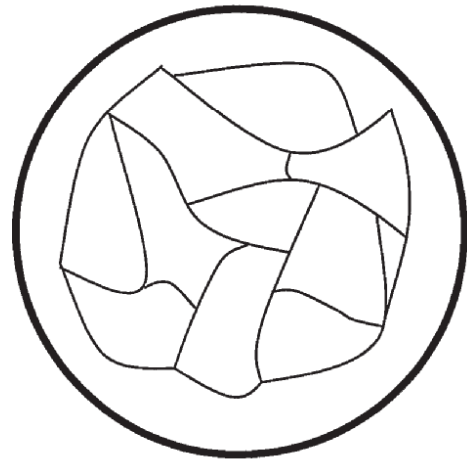


Fig. 15

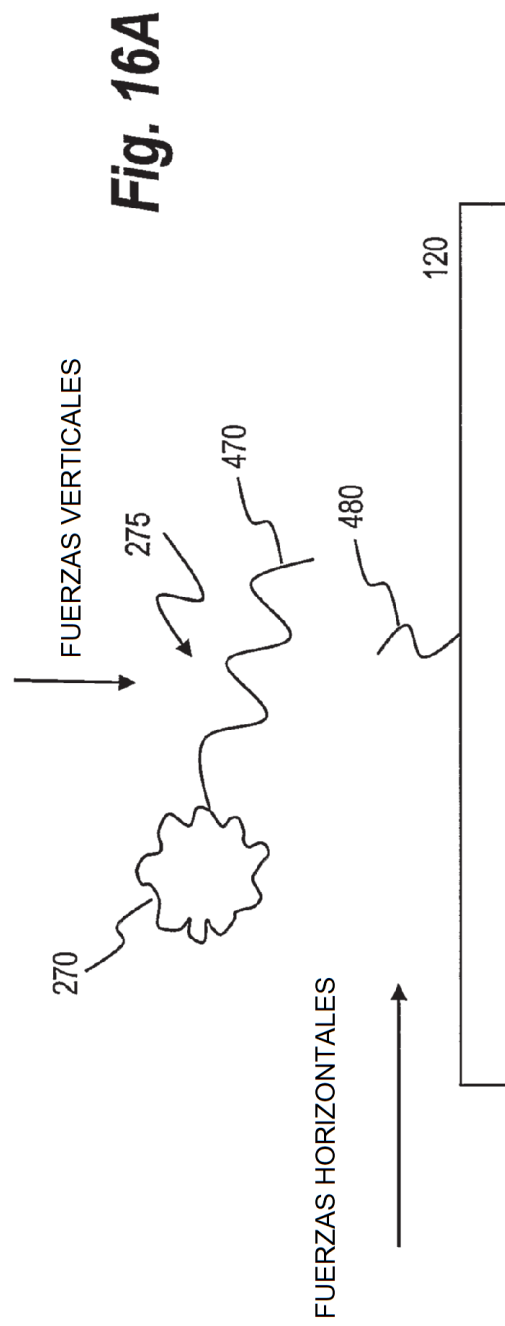


Fig. 16B

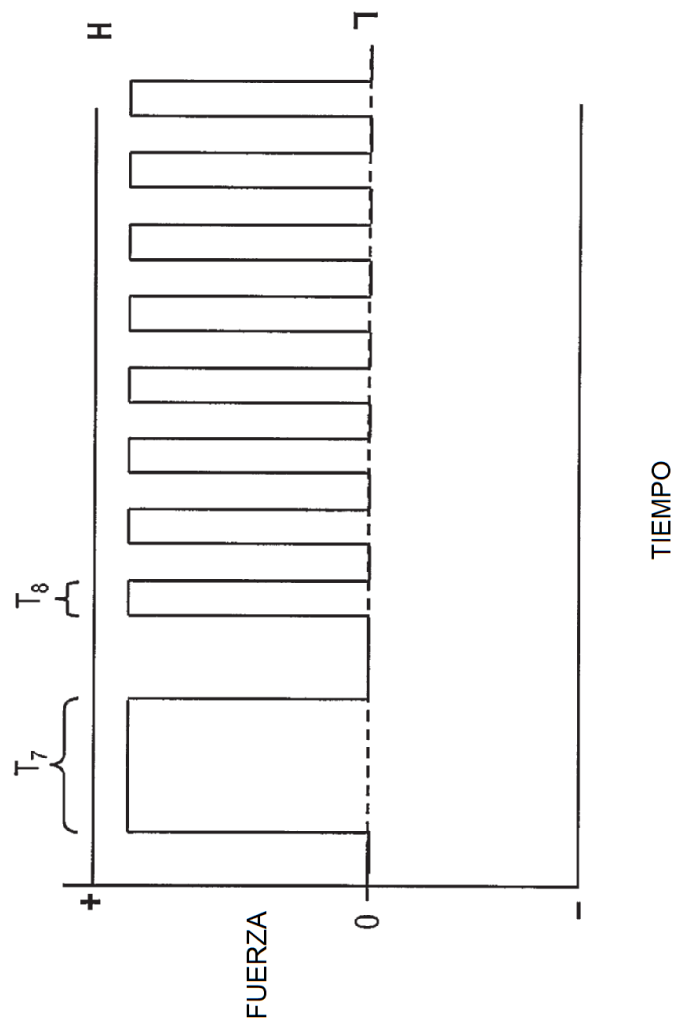


Fig. 17B

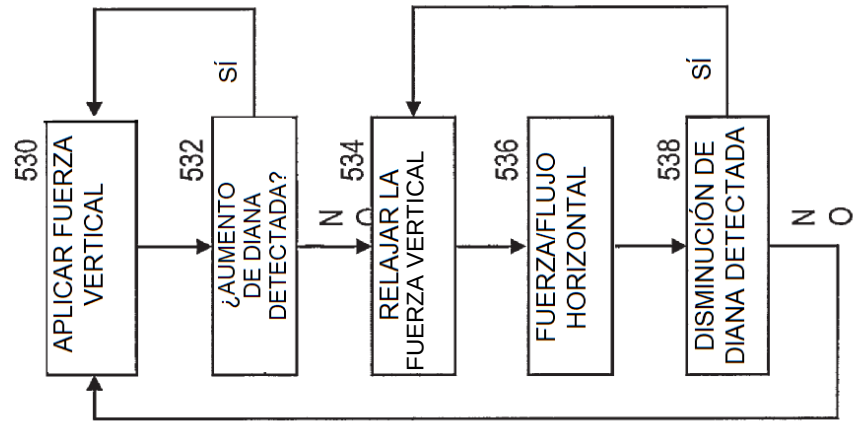


Fig. 17A

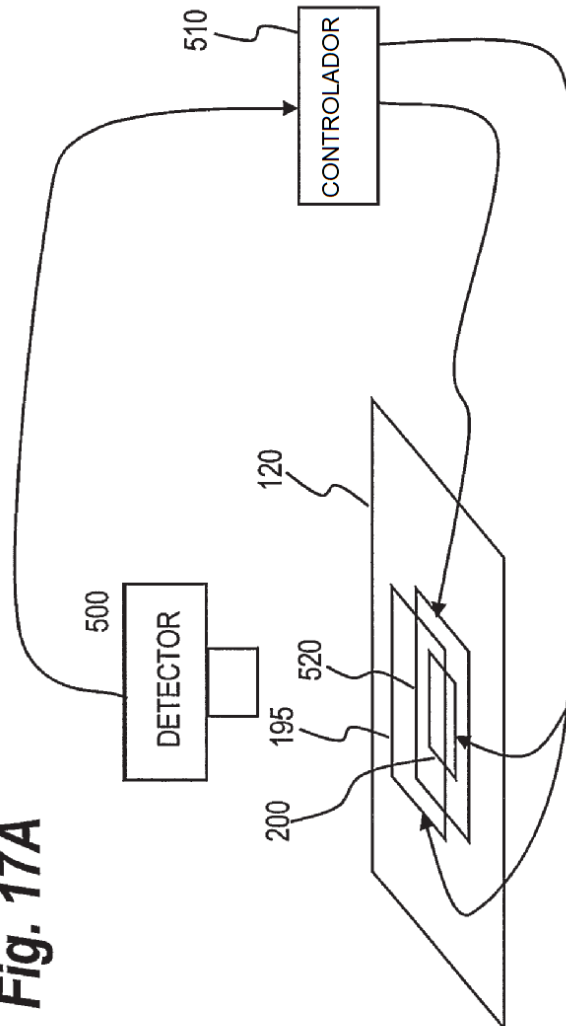


Fig. 18A

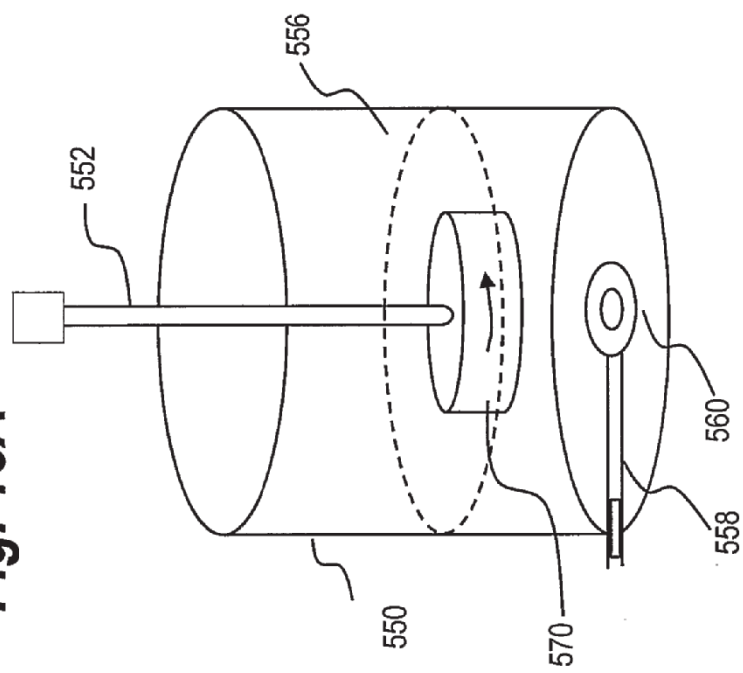


Fig. 18B

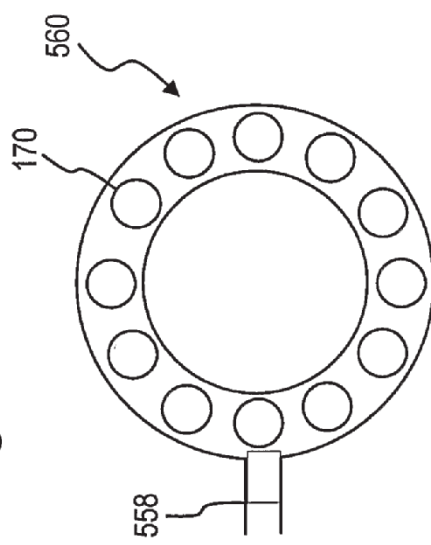


Fig. 19A

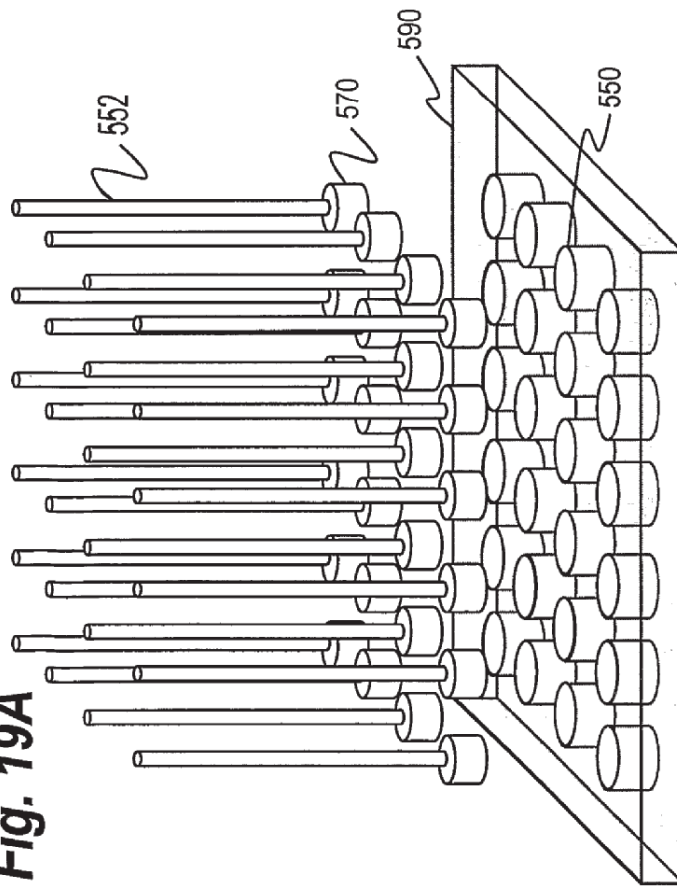


Fig. 19B

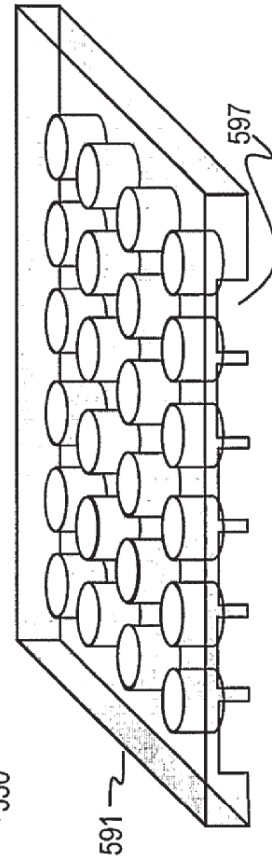


Fig. 20A

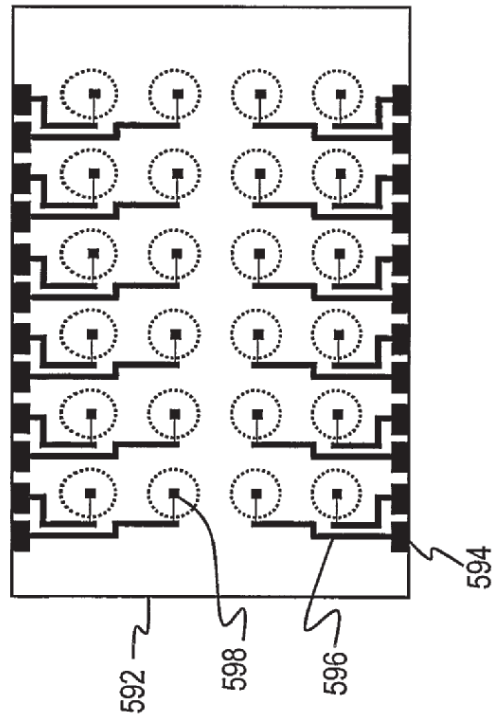
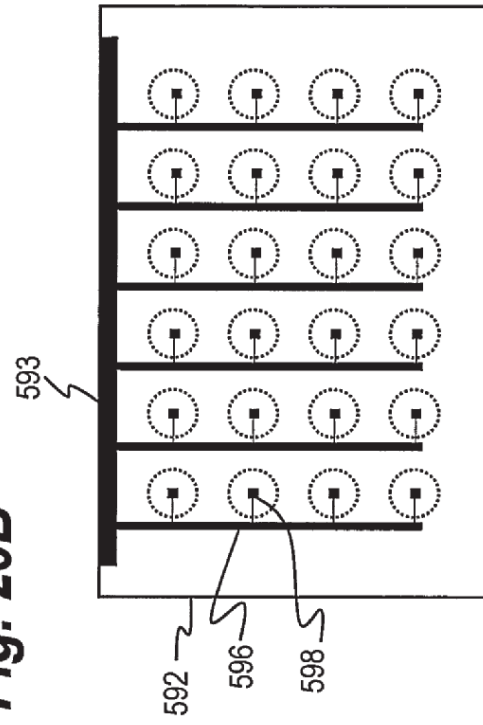
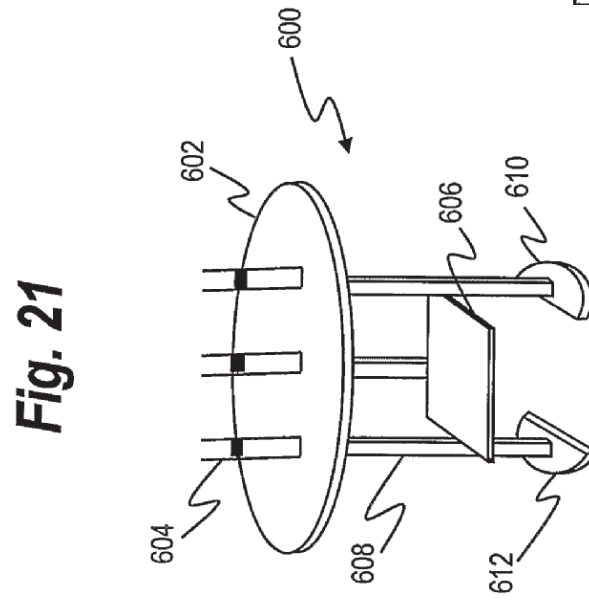
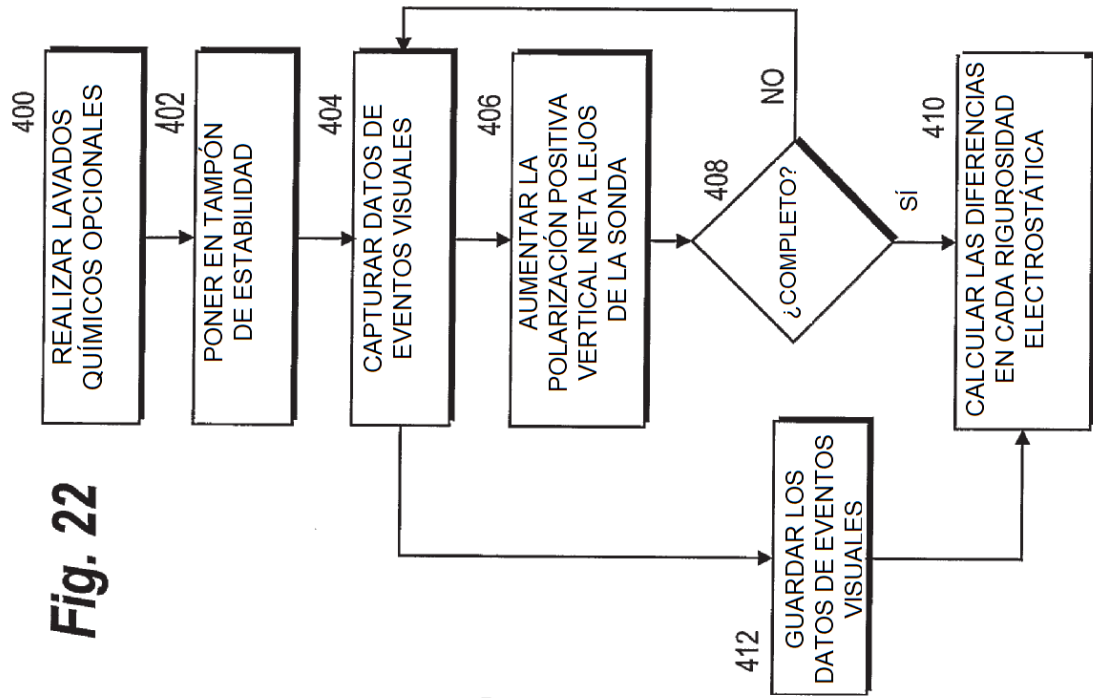


Fig. 20B





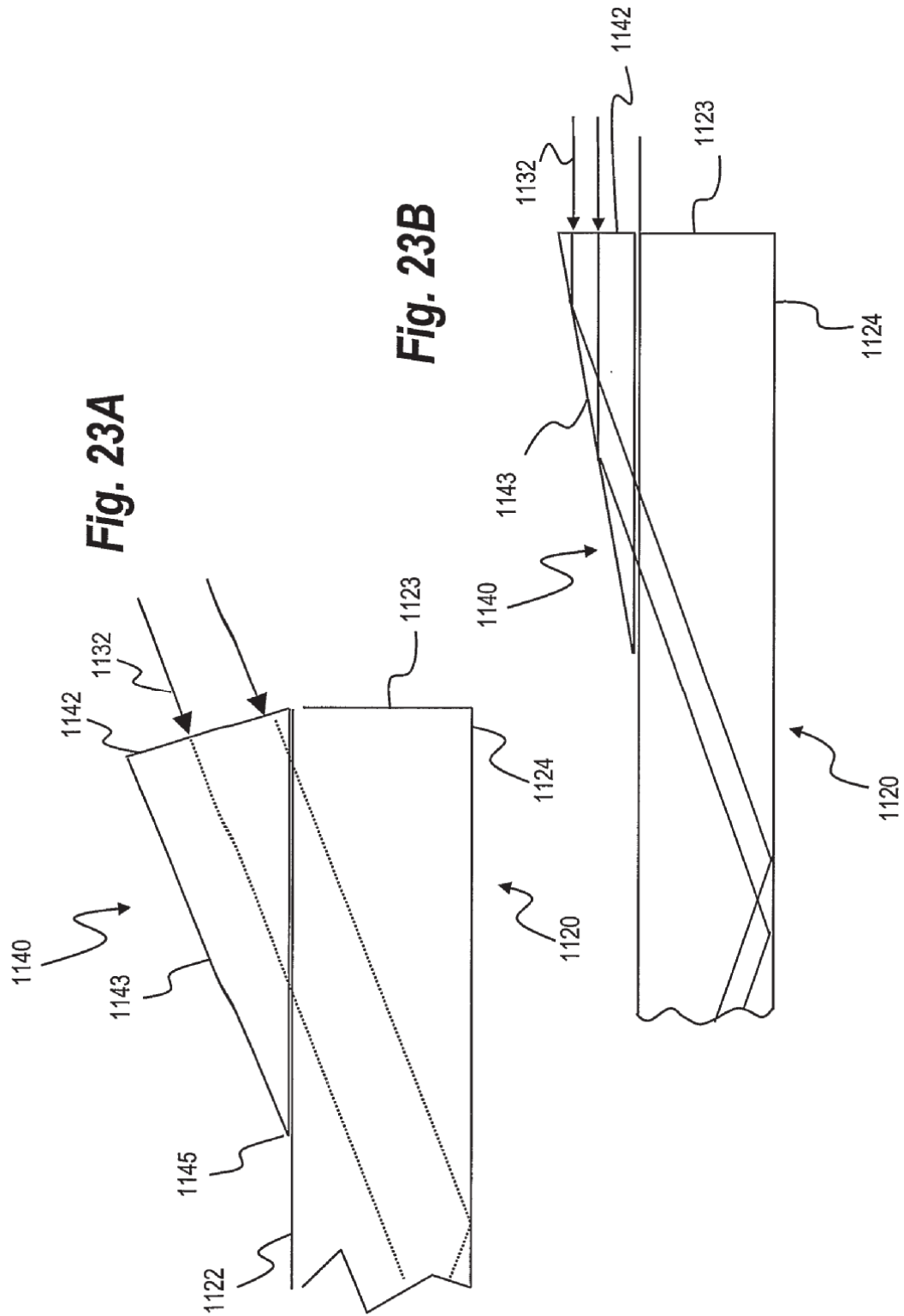


Fig. 24A

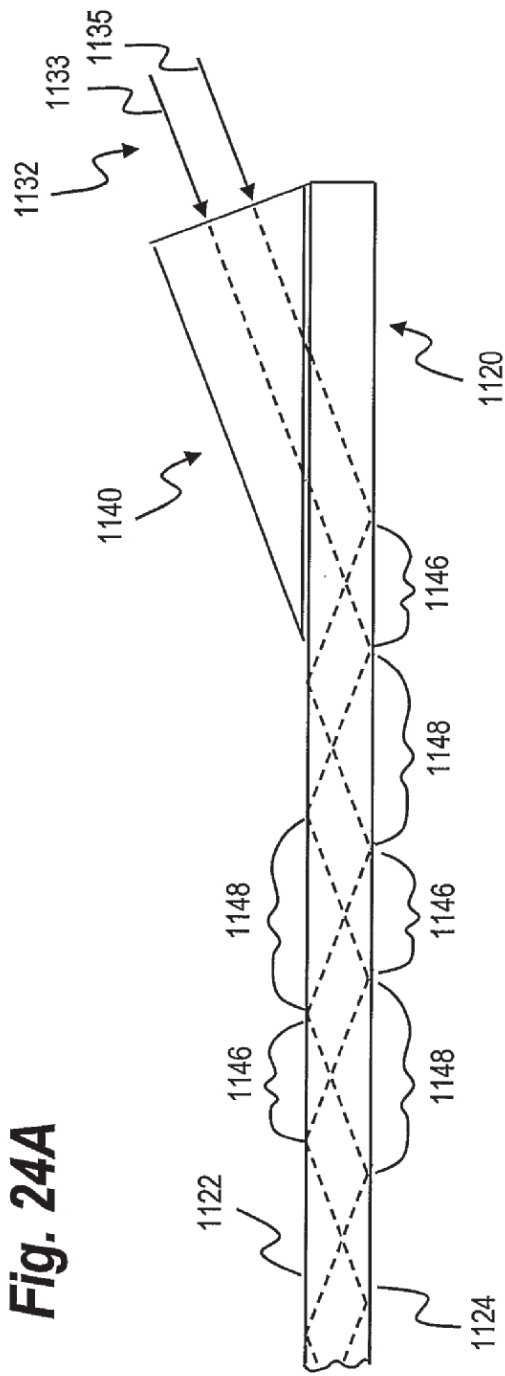


Fig. 24B

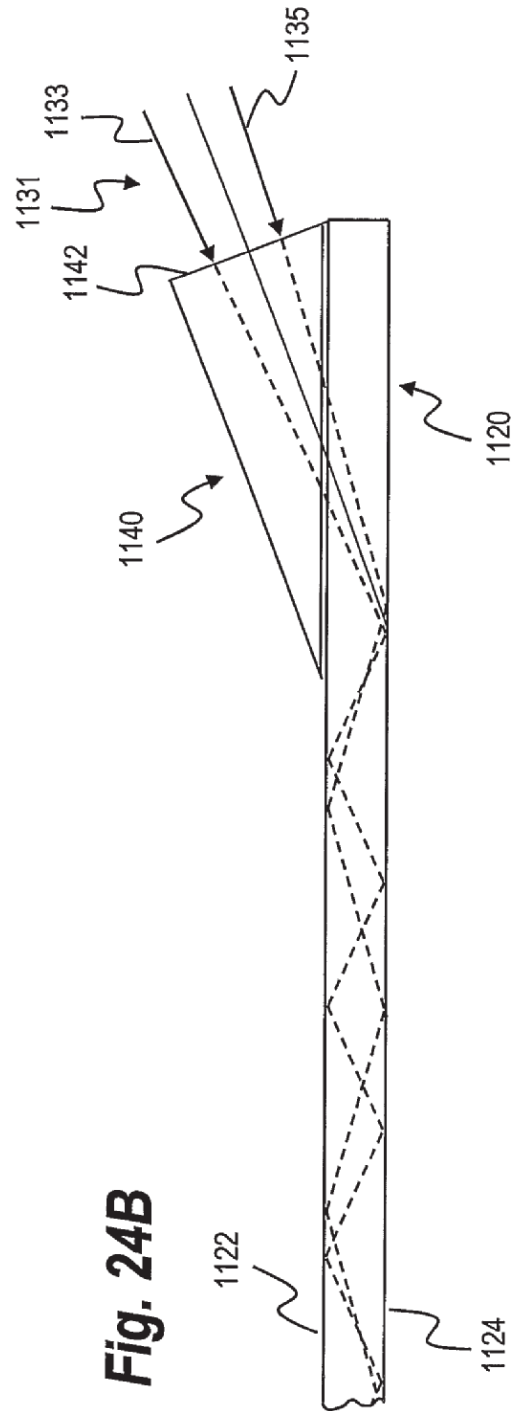
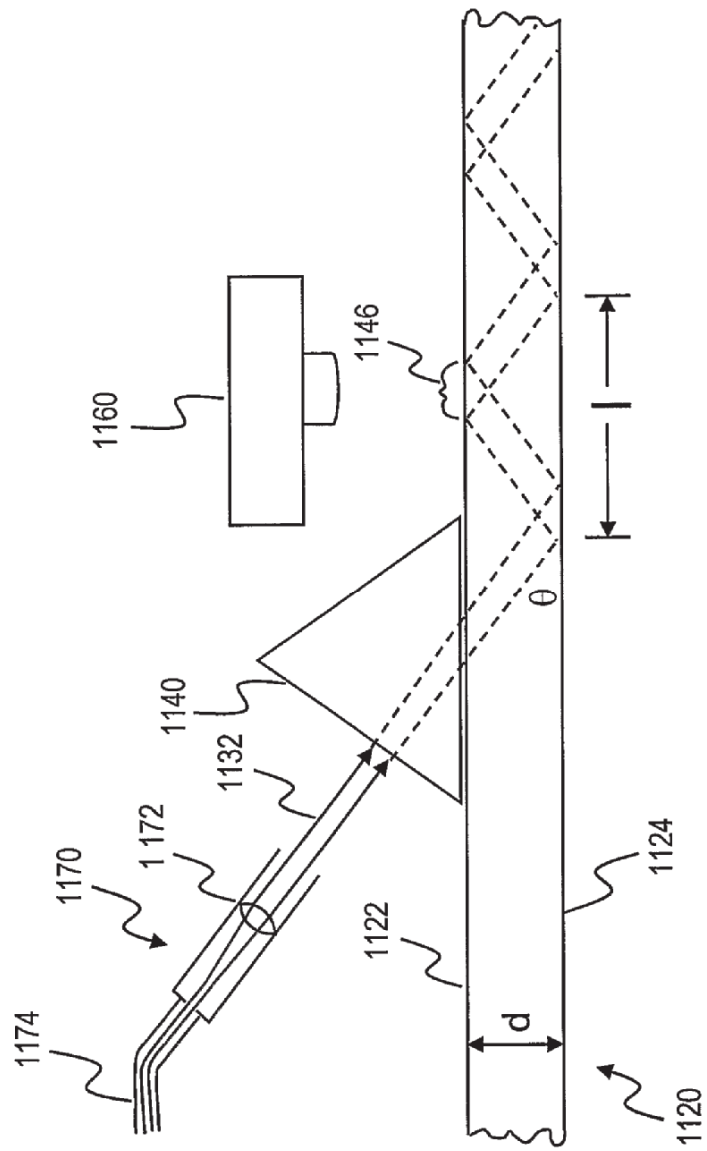


Fig. 24C



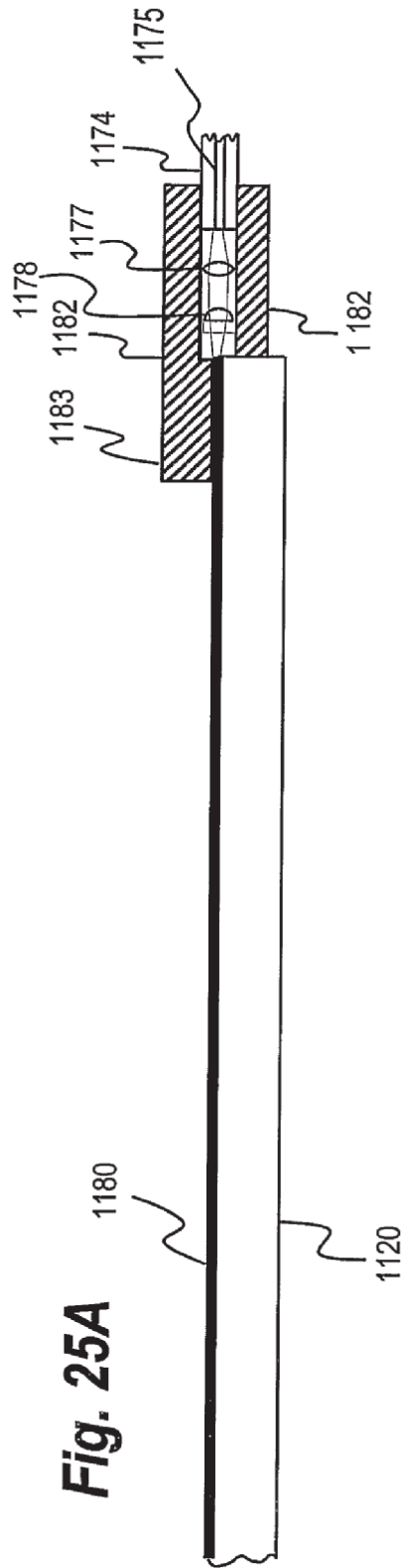


Fig. 25B

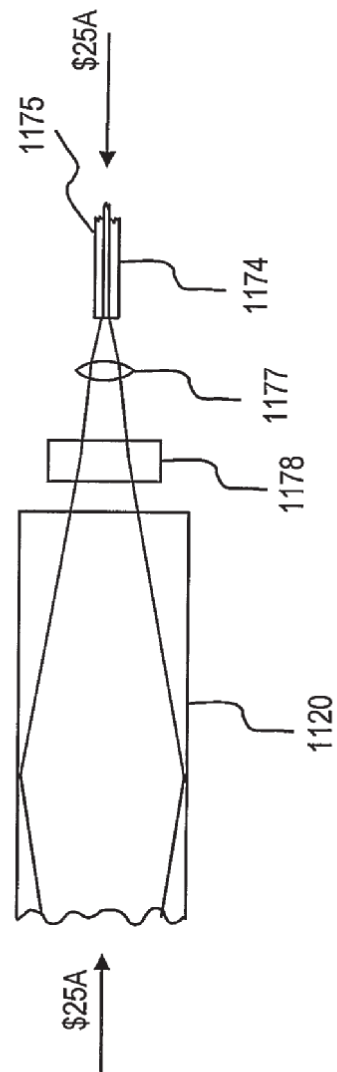


Fig. 25C

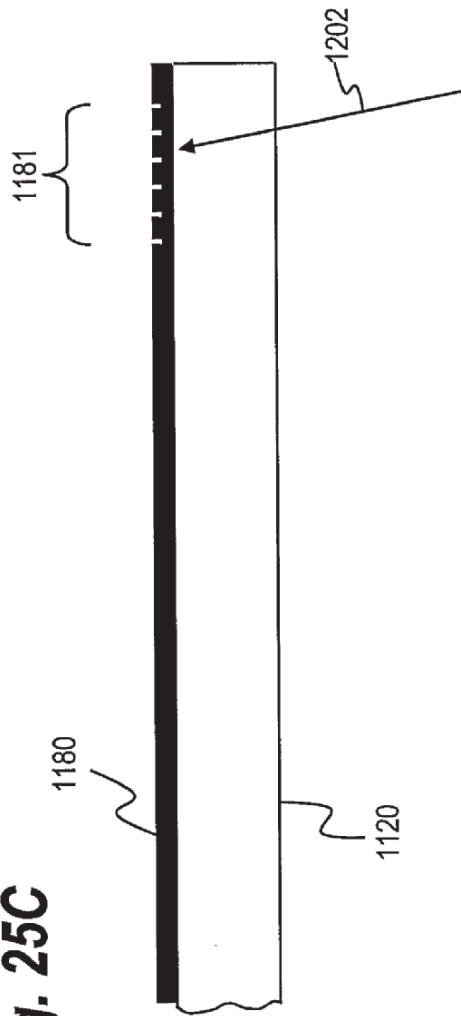


Fig. 25D

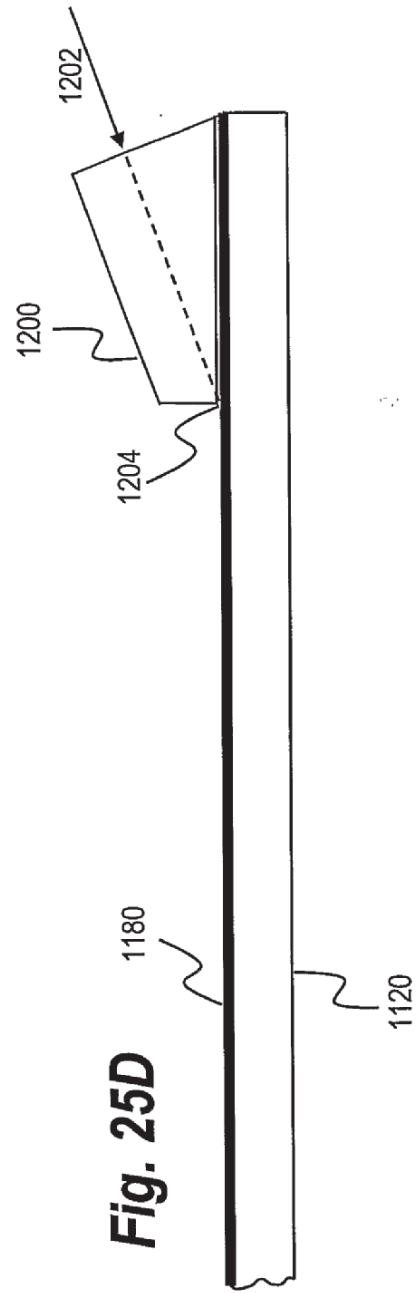


Fig. 26A

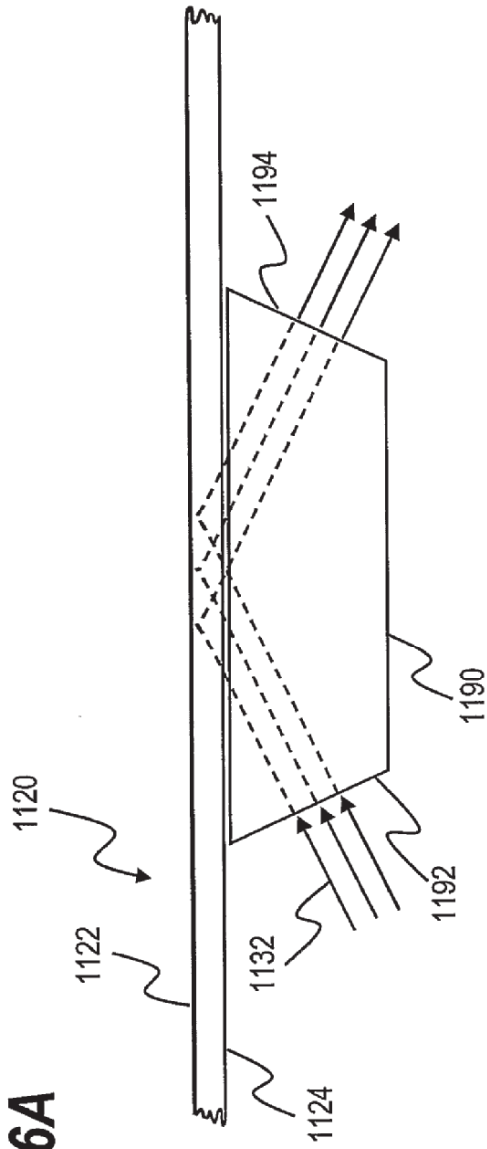


Fig. 26B

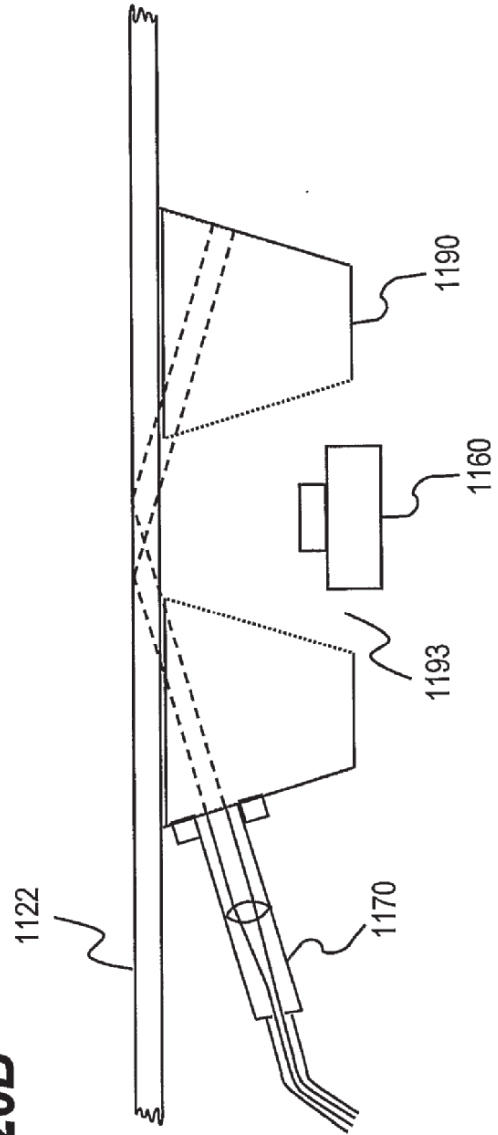


Fig. 27B

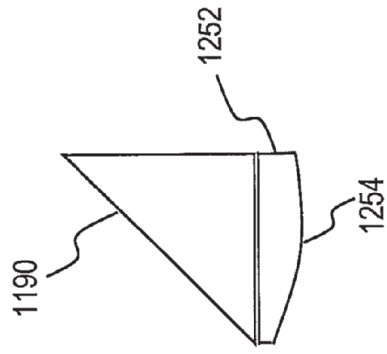


Fig. 27A

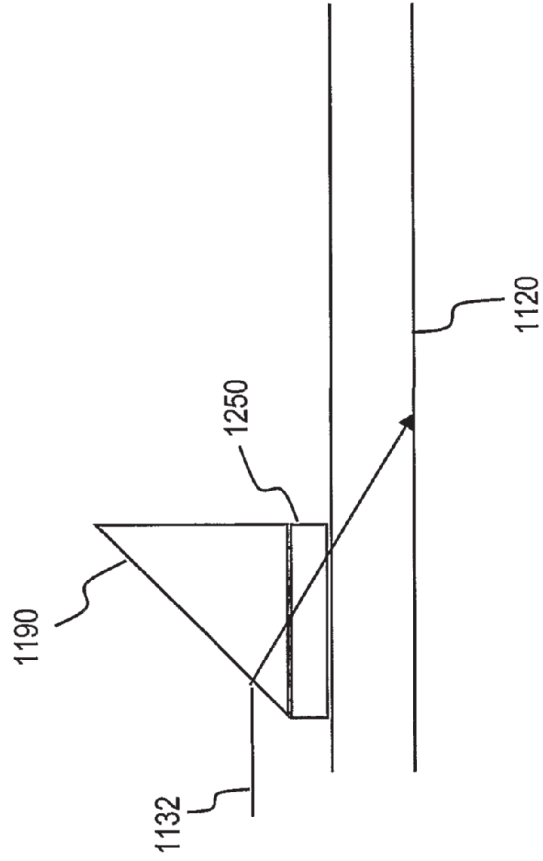


Fig. 28A

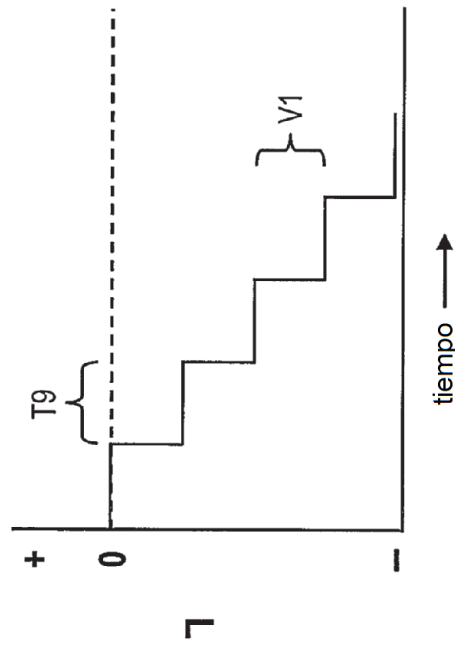


Fig. 28B

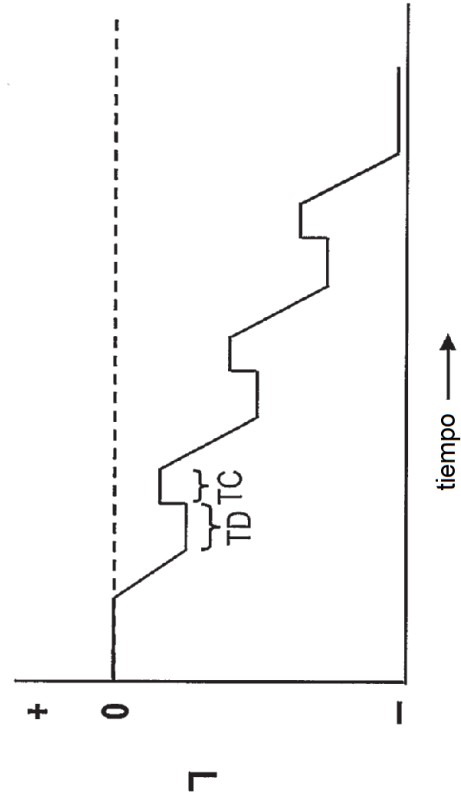


Fig. 29A

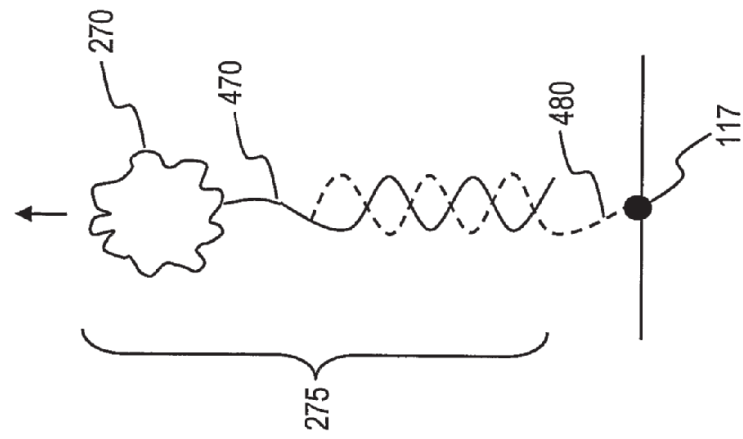


Fig. 29B

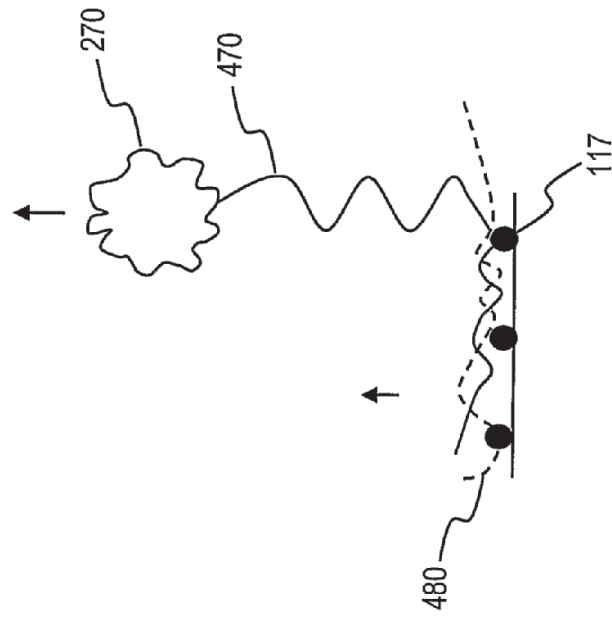


Fig. 30A

E10
 E11 ---
 E12 —

Fig. 30B

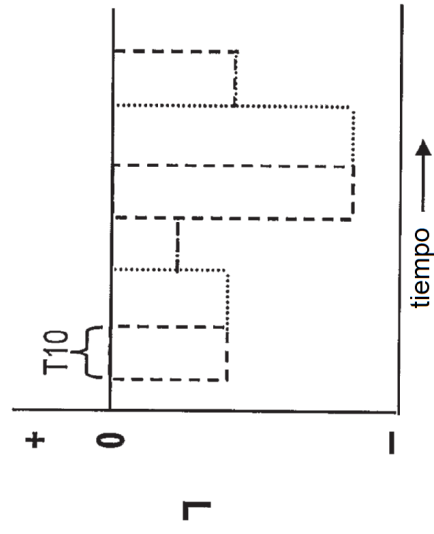
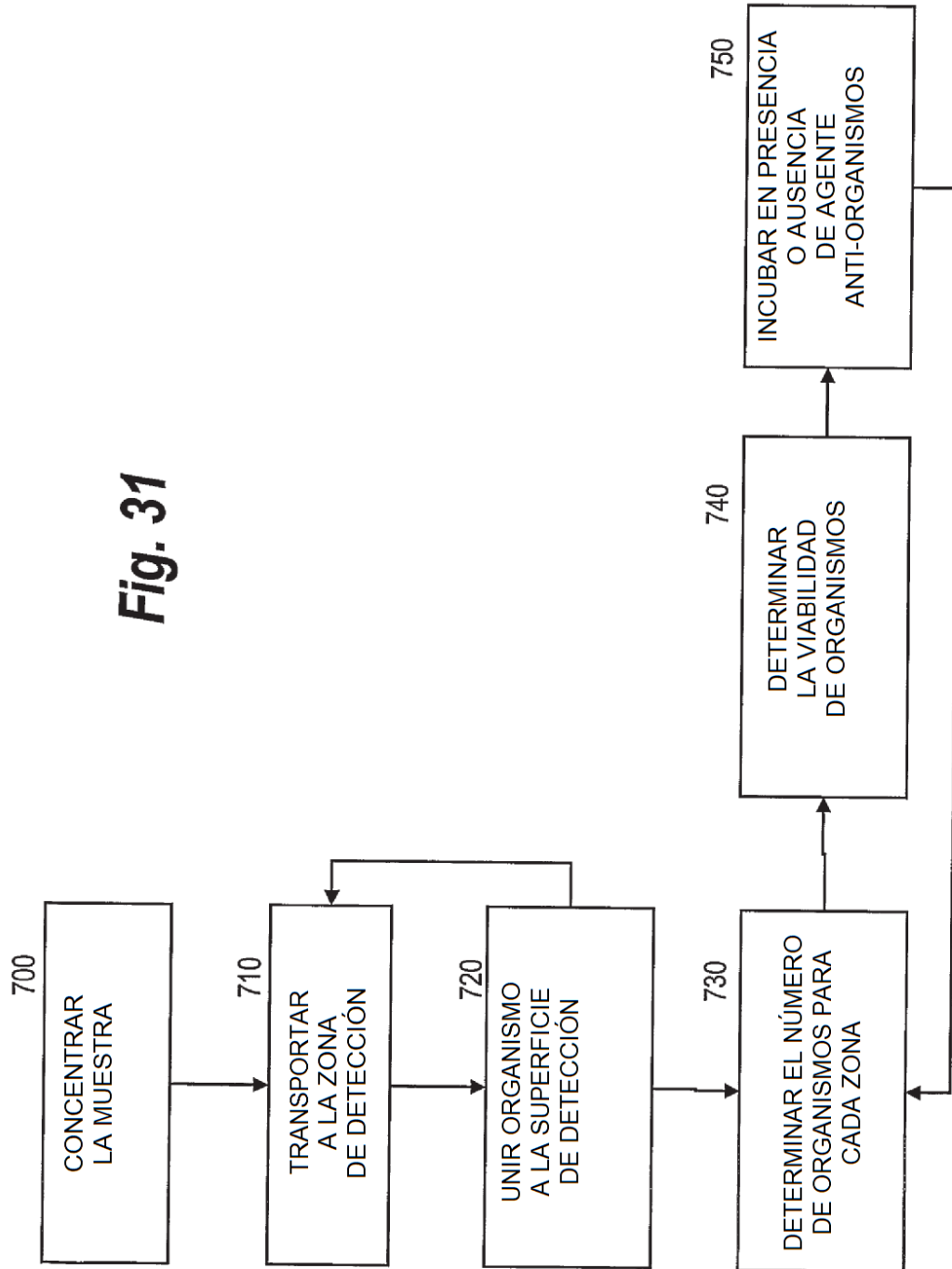
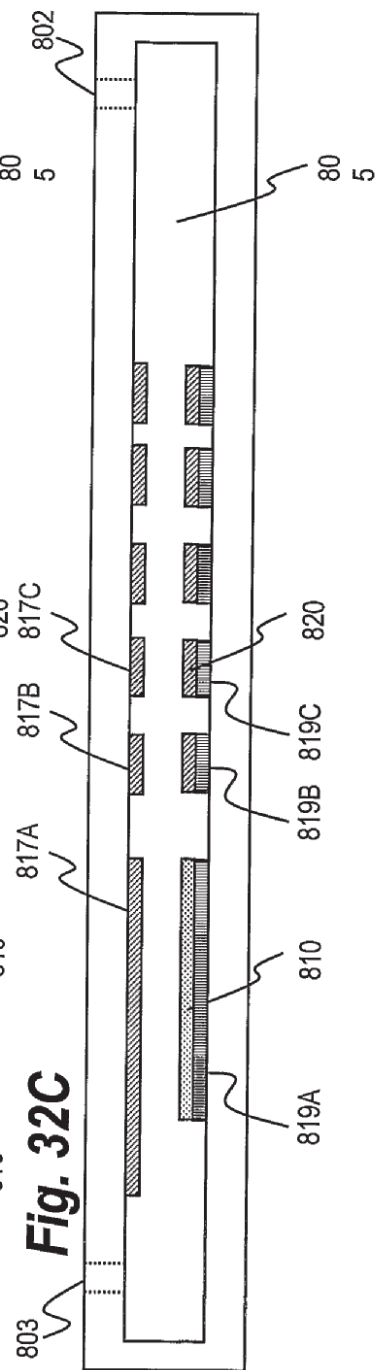
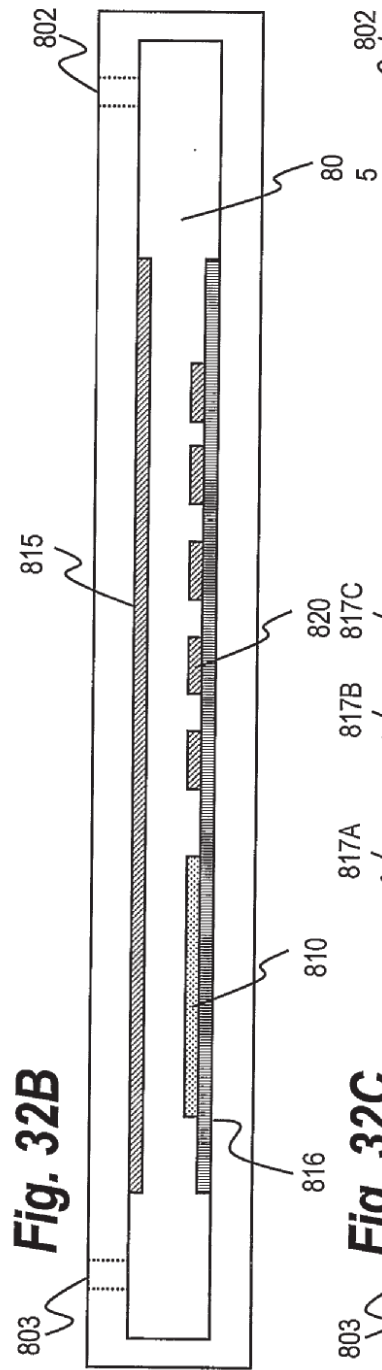
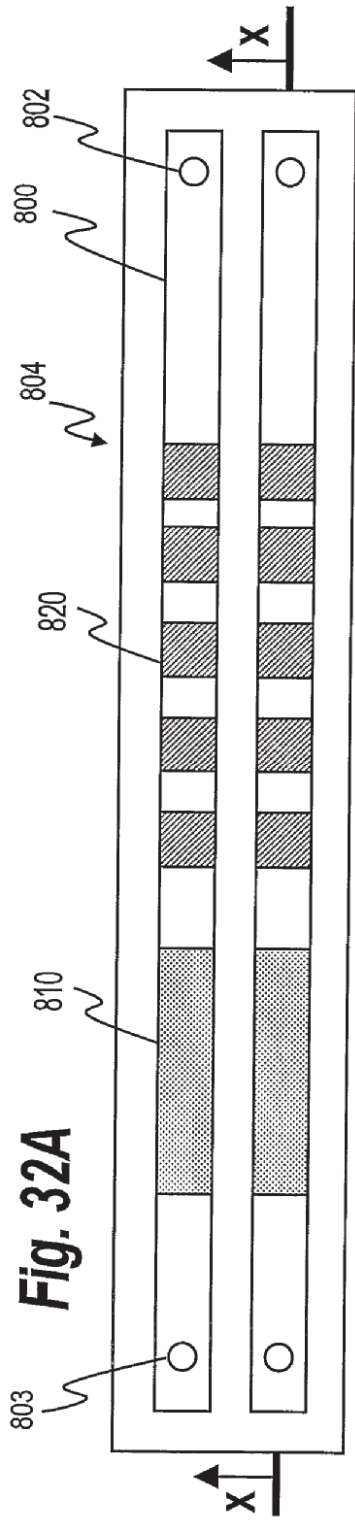


Fig. 31





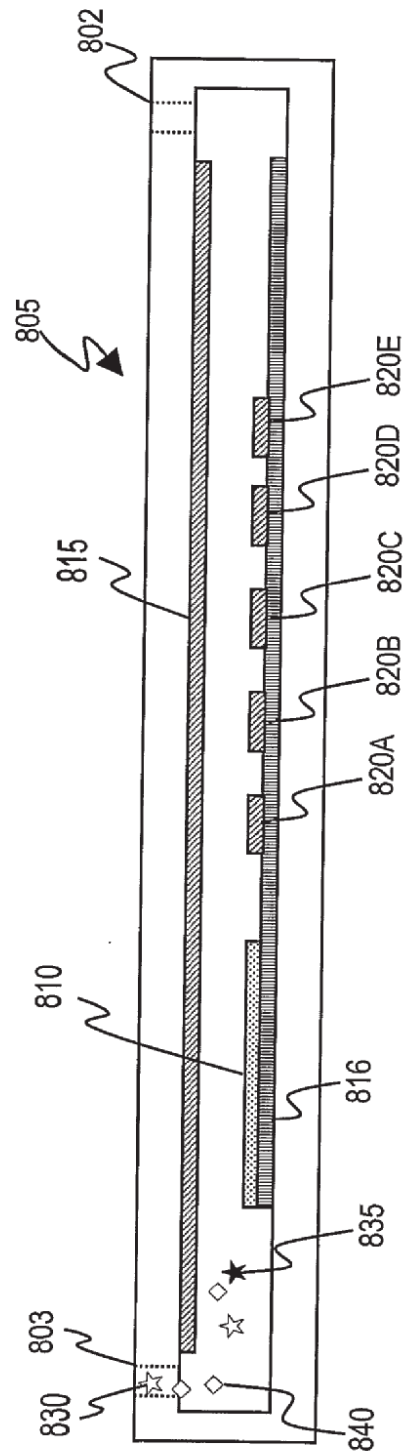


Fig. 33A

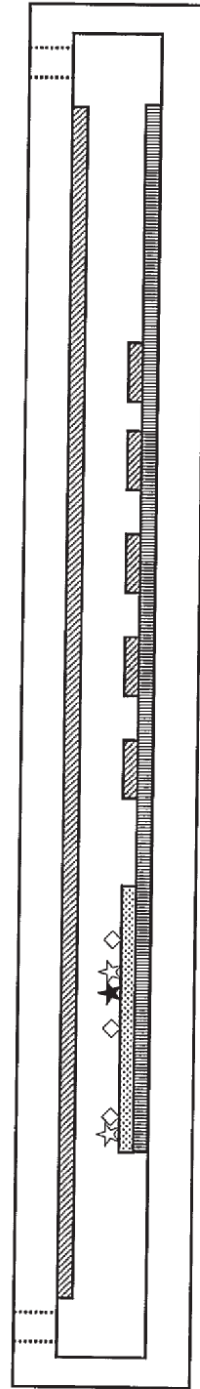


Fig. 33B

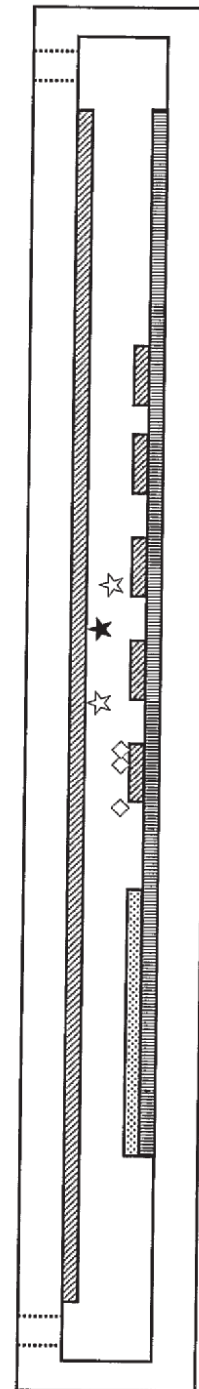
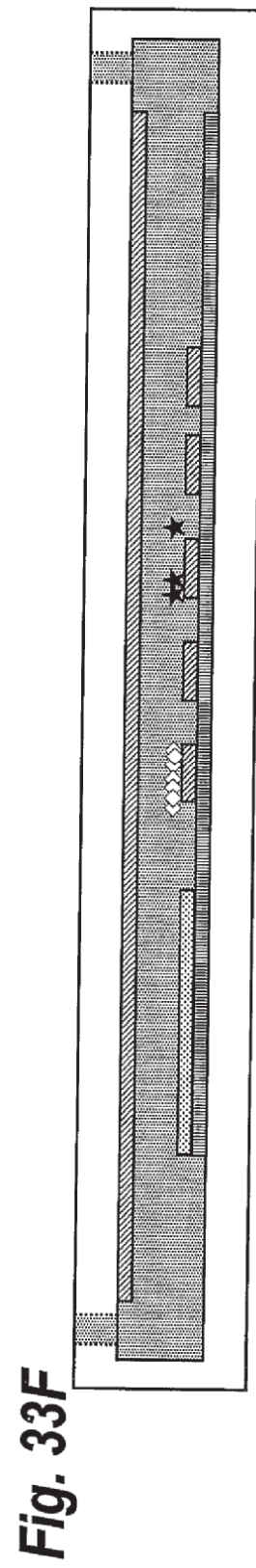
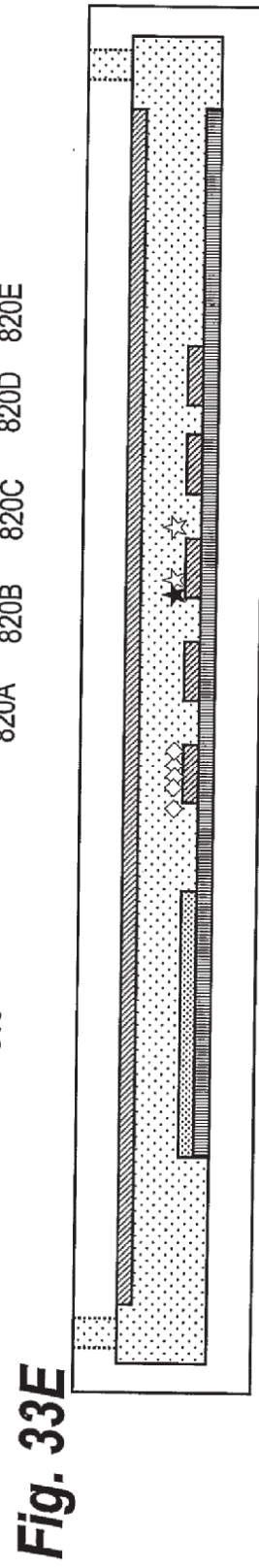
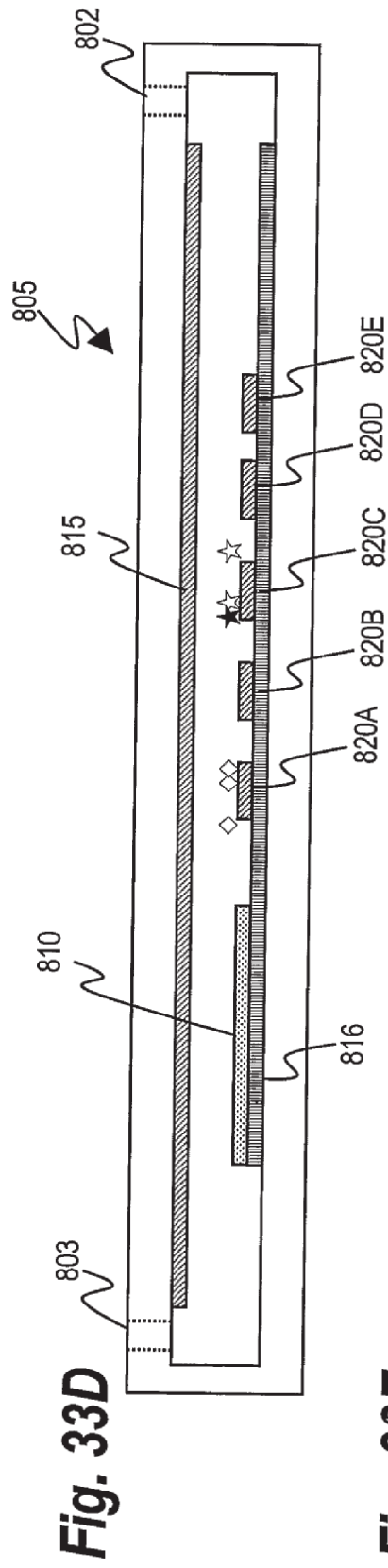
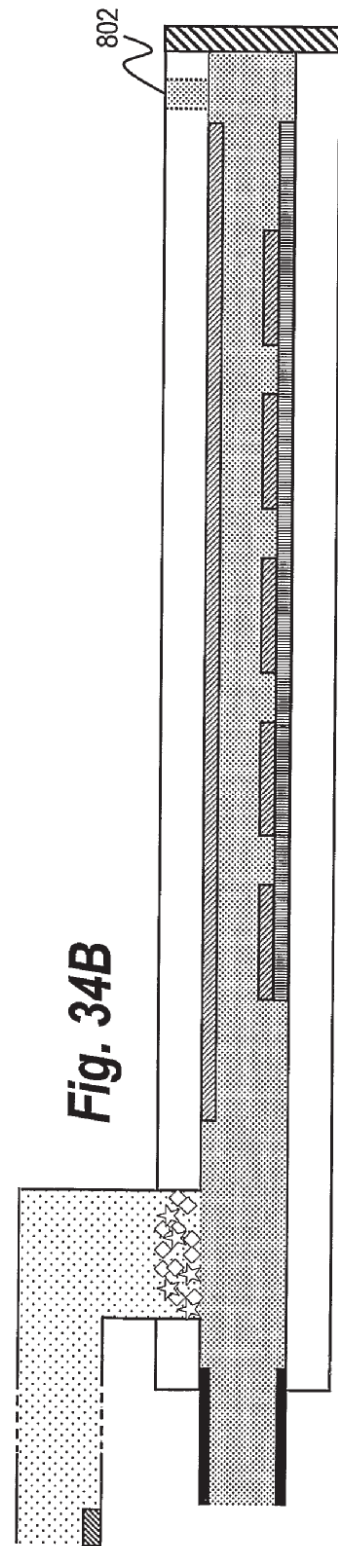
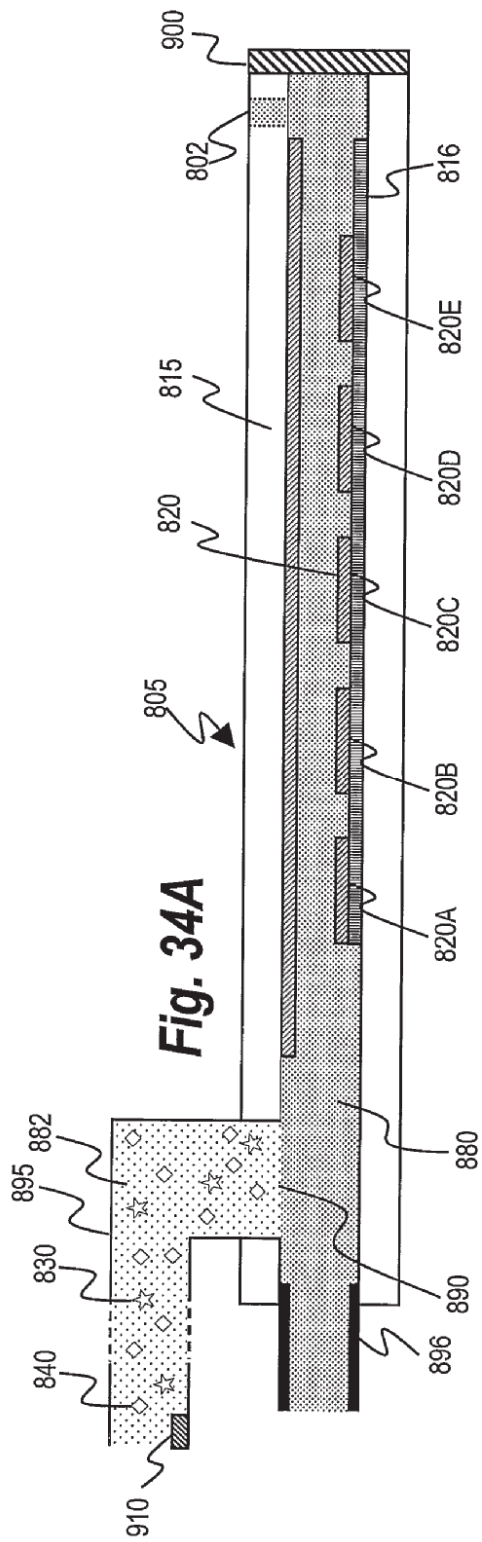
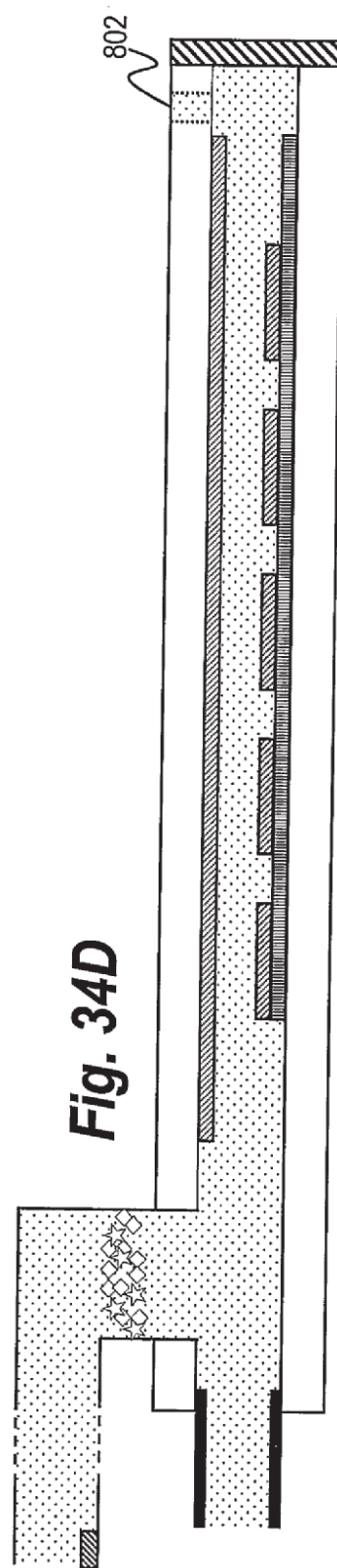
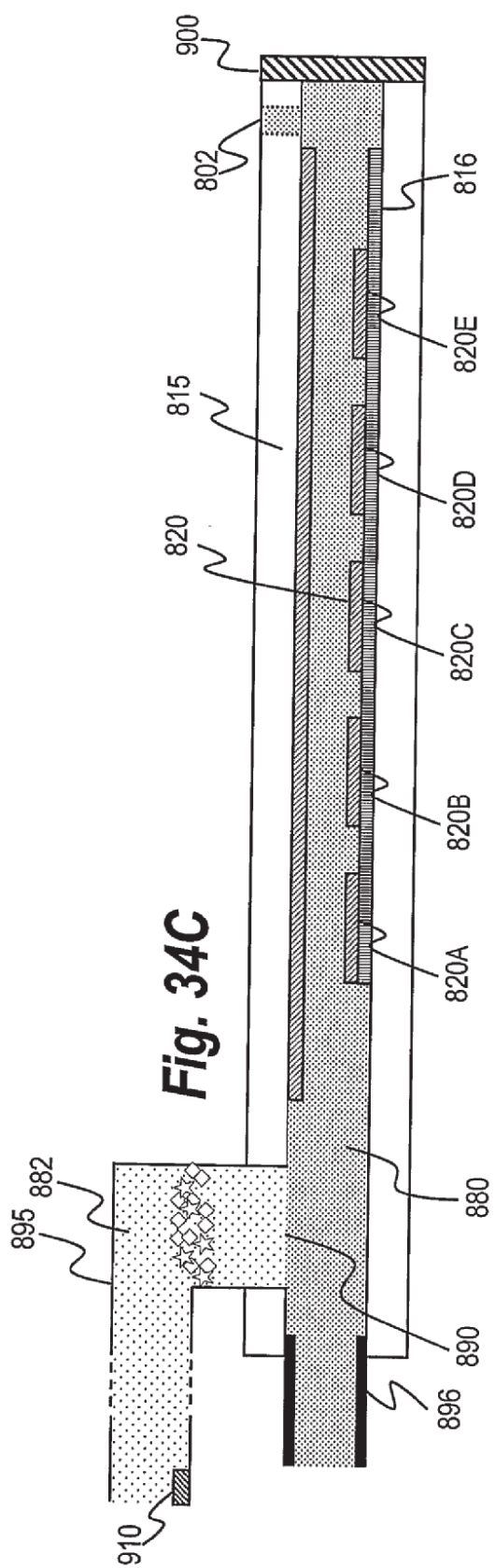


Fig. 33C







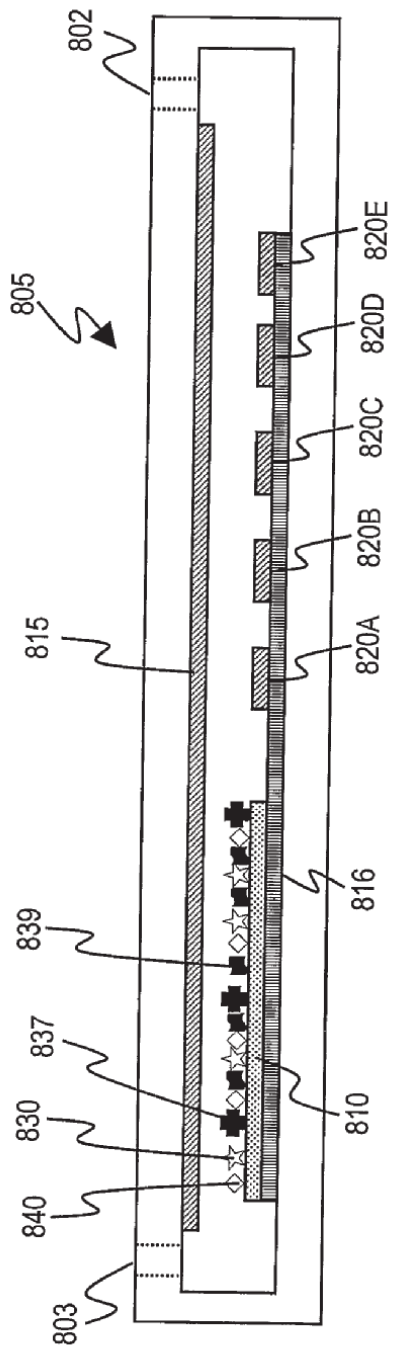


Fig. 35A

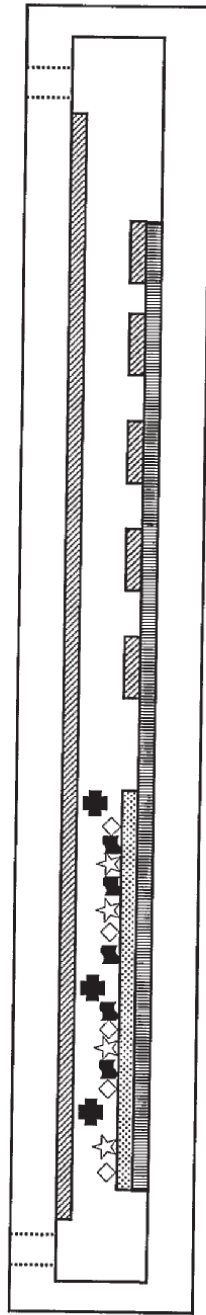


Fig. 35B

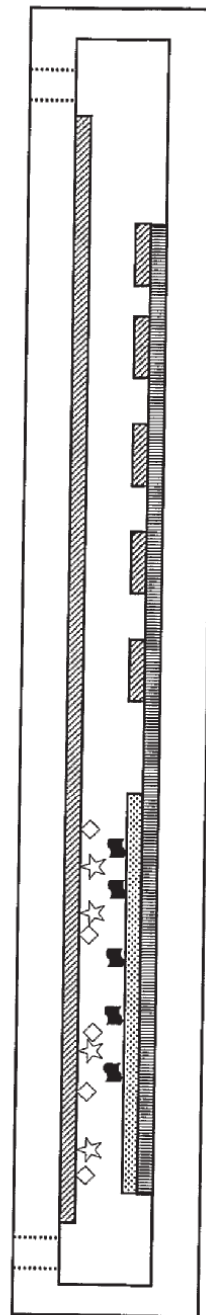


Fig. 35C

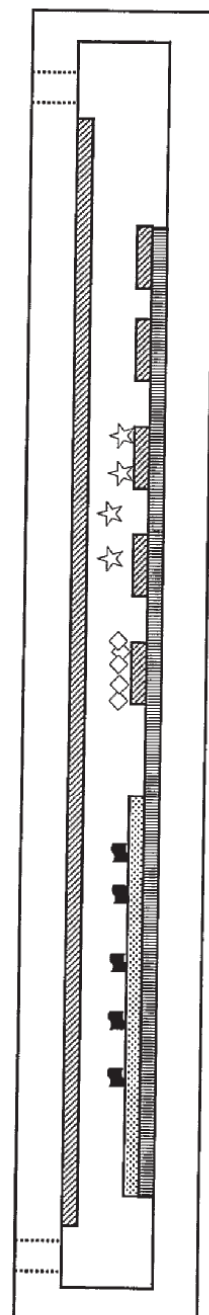
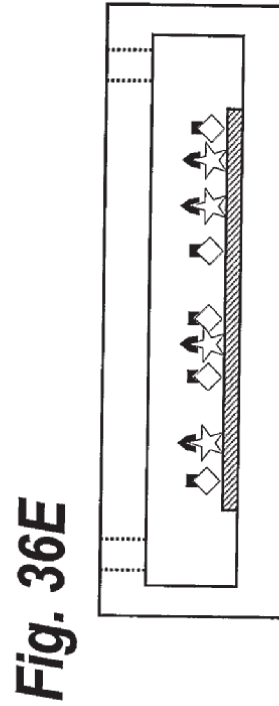
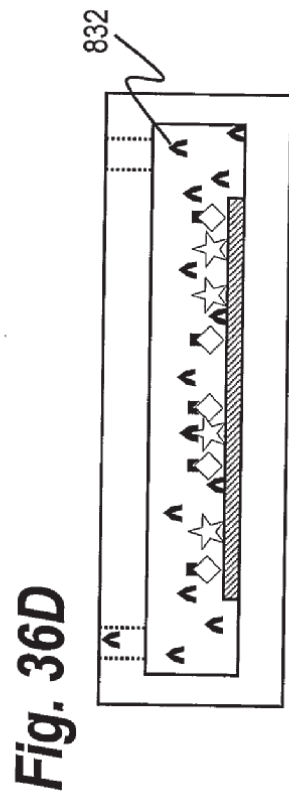
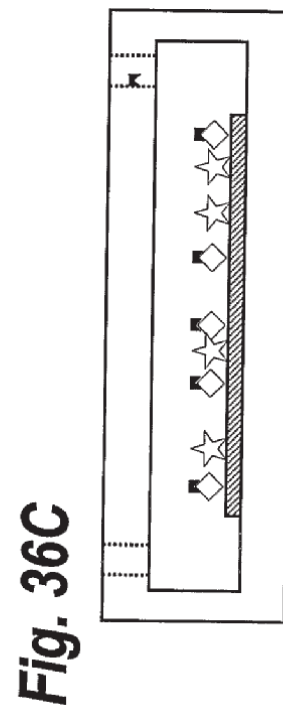
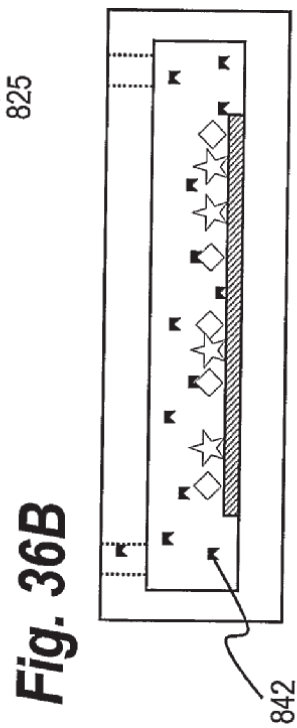
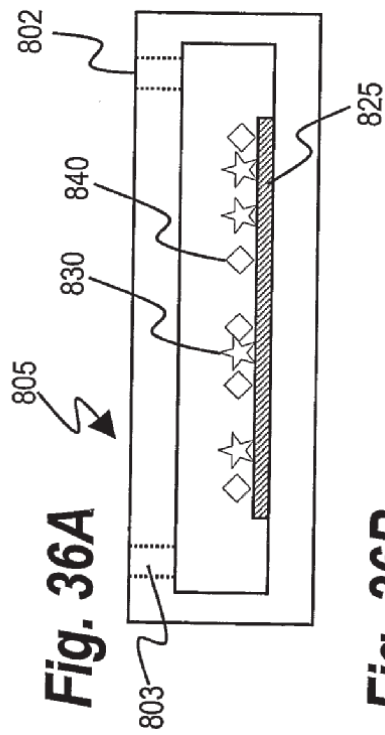


Fig. 35D



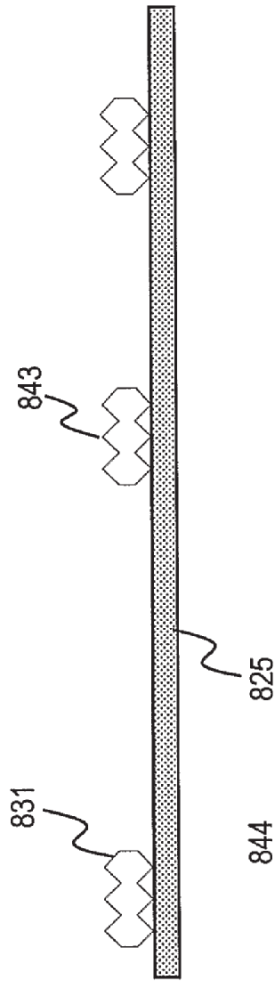


Fig. 37A

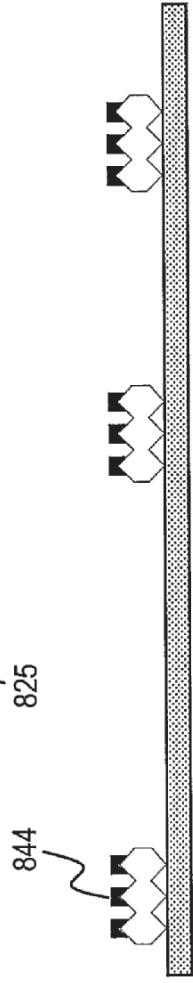


Fig. 37B

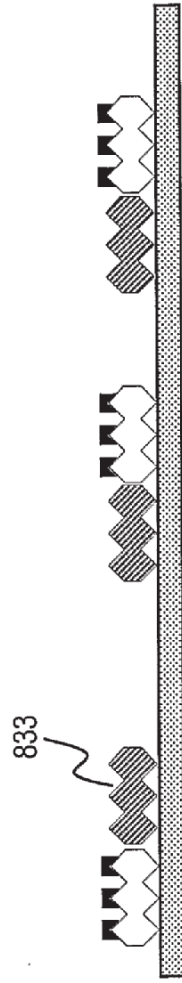


Fig. 37C

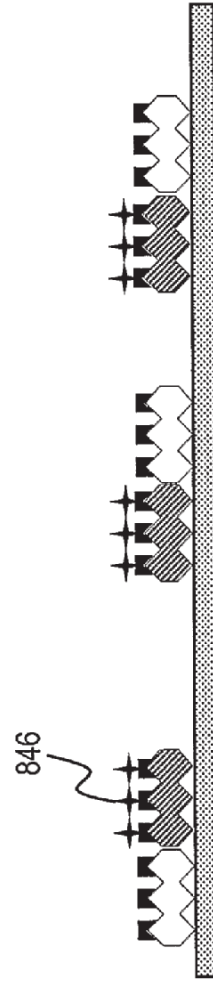


Fig. 37D

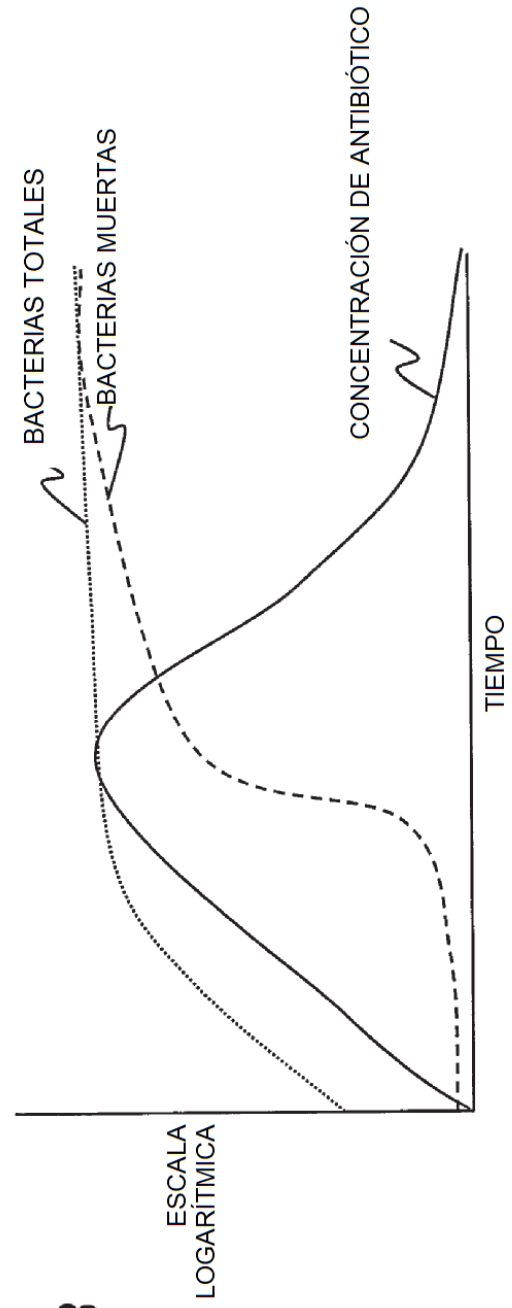
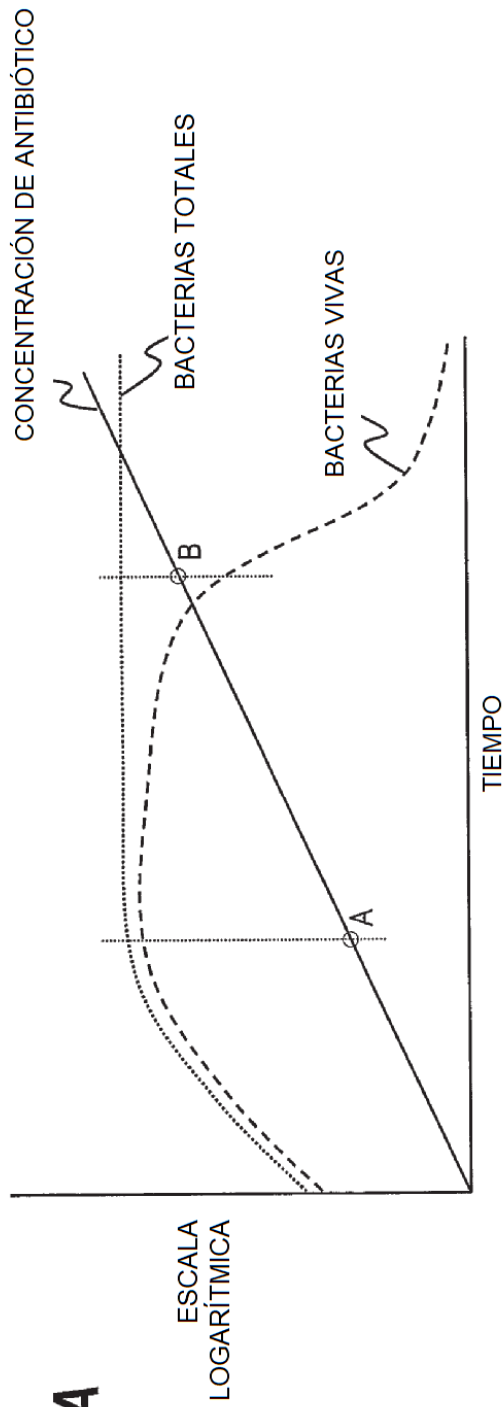


Fig. 39A

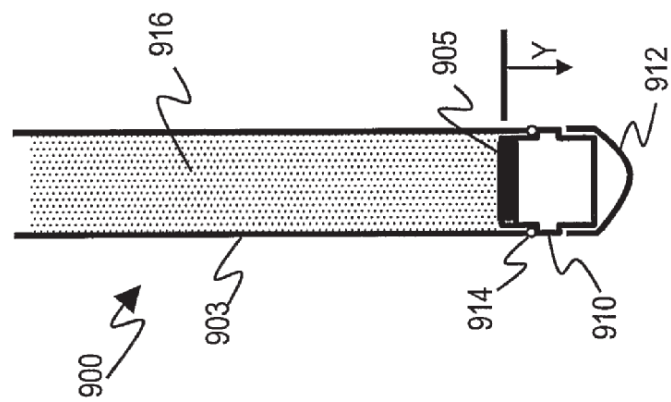


Fig. 39B

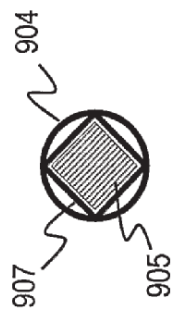


Fig. 39C

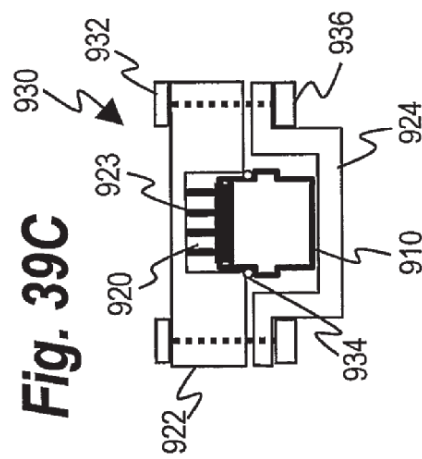


Fig. 40A

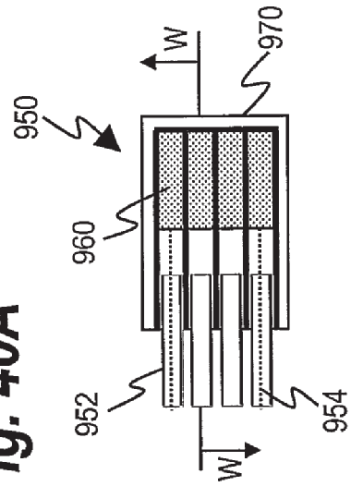


Fig. 40B

