



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 347**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/497** (2006.01)  
**C12Q 1/24** (2006.01)  
**G01N 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05706792 .8**  
96 Fecha de presentación : **25.02.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1730518**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **Método, chip, dispositivo y sistema integrado para la detección de partículas biológicas.**

30 Prioridad: **26.02.2004 DK 2004 00303**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.12.2009**

73 Titular/es: **DELTA, Dansk Elektronik, Lys & Akustik  
Venlighedsvej 4  
2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es: **Jensen, Gert, Bolander;  
Thomsen, Lars y  
Veltman, Oene, Robert**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 330 347 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

Método, chip, dispositivo y sistema integrado para la detección de partículas biológicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de partículas biológicas. El procedimiento de la invención comprende típicamente recoger las partículas biológicas a partir de una muestra gaseosa, poner en contacto las partículas biológicas con un primer reactivo líquido, extraer el material biológico de las partículas biológicas recogidas y analizar el material biológico para determinar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana.

**Antecedentes**

Para facilitar una detección rápida de patógenos de transmisión área capaces de causar epidemias naturales o deliberadas es importante recoger partículas que contengan o consistan en dichos patógenos para facilitar una detección rápida. Las enfermedades que se propagan a través del aire representan un grave riesgo para la salud de los seres humanos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) hasta 1000 millones de personas pueden infectarse con tuberculosis entre 2002 y 2020, de las que aproximadamente 150 millones enfermarán y 36 millones de personas morirán de la enfermedad. La primera nueva enfermedad de transmisión aérea comunicable del siglo 21 es el Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS) que tiene el potencial de generar infecciones de rápida propagación. Pueden temerse paralelismos con la propagación de la peste (“la Muerte Negra”) en la Edad Media en Europa, cuando aproximadamente 25 millones de personas murieron en el periodo de 1347 a 1352. La forma más mortal de la peste es por inhalación de aerosoles infecciosos, donde una cantidad tan pequeña como 1-10 células de *Yersinia pestis* son suficientes para causar enfermedad. Los aerosoles pueden surgir por la respiración de seres humanos infectados o, lo que es más amenazador, por liberaciones deliberadas de *Y. pestis* por bioterroristas.

Los agentes de guerra biológica (BW) de interés crítico son esporas bacterianas, tales como *Bacillus anthracis* (ántrax), *Clostridium tetani* (tétanos) y *Clostridium botulinum* (botulismo). Las esporas, producidas por ciertos tipos de bacterias Gram-positivas en respuesta a privación de nutrientes, no están en desarrollo, son termorresistentes, están deshidratadas y son resistentes a extremos de temperatura, pH, desecación, radiación y agentes químicos. Esta estabilidad las hace una herramienta atractiva para su uso en armas BW.

Otros microorganismos que podrían usarse para generar epidemias deliberadas comprenden microorganismos que causan, por ejemplo, viruela, ébola, encefalitis y fiebre Q. También se temen los productos de recombinación de origen natural de la influenza de transmisión aérea con la mortífera gripe aviar. Estos virus recombinados tienen el potencial de causar pandemias facilitadas por un desplazamiento aéreo de dimensiones no observadas hasta ahora.

El documento US 5.674.742 describe un instrumento microfabricado integrado para manipulación, reacción y detección de muestras de microlitros a picolitros. El instrumento es adecuado para reacciones bioquímicas, particularmente reacciones basadas en ADN tales como la reacción en cadena de la polimerasa, que requieren termociclado, ya que el tamaño intrínsecamente pequeño del instrumento facilita tiempos de ciclos rápidos. La naturaleza integrada del instrumento proporciona un procesamiento preciso sin contaminación. El instrumento puede incluir depósitos de reactivo, agitadores y mezcladores, calentadores, bombas y detectores ópticos o electromecánicos. Pueden usarse dispositivos ultrasónicos de onda Lamb como detectores, bombas y agitadores.

El documento US 6.586.253 describe un procedimiento para la detección de contenido celular que contiene las etapas de introducir una célula en un canal en una microplaca; lisar la célula para liberar el contenido celular en el canal; desplazar el contenido de la célula hacia una zona de detección; y detectar el contenido celular en la zona de detección. Además se describe un aparato para la detección de contenido celular, comprendiendo el aparato: una microplaca; un canal de movilización de células formado en la microplaca, teniendo el canal de movilización de células un extremo de introducción de células y un extremo de detección; un movilizador de células conectado operativamente con el extremo de introducción de células para desplazar las células desde el extremo de introducción de células hasta el extremo de detección; medios para lisar células en el canal de movilización de células en una zona de lisis, localizándose la zona de lisis entre el extremo de introducción de células y el extremo de detección; y un detector, colocado adyacente al extremo de detector, dispuesto para detectar el contenido celular que aparezca en el extremo de detector que se ha desplazado desde la zona de lisis hasta el extremo de detector por el movilizador de células.

El documento US 6.673.621 describe un dispositivo adecuado para marcar una muestra recogida, que comprende medios de recogida para recoger la muestra y al menos un marcador detectable que está asociado con al menos una porción del medio de recogida, donde el al menos un marcador detectable puede entrar en contacto con la muestra tras la recogida de la muestra para marcar la muestra recogida tras el contacto de la muestra con al menos una porción del medio de recogida que tiene el al menos un marcador detectable asociado con el mismo, y donde el al menos un marcador detectable es distinto de un componente que está presente en la muestra antes de la recogida y es inerte a cualquier componente presente en la muestra antes de la recogida. Describe además kits que contienen el dispositivo, procedimientos para marcar muestras usando el dispositivo y procedimientos para determinar la integridad de una muestra marcada, y también se proporciona el uso de los marcadores para el ensayo de laboratorios y/o personal de laboratorio para fines de certificación, ensayo de competencia o acreditación.

## ES 2 330 347 T3

El documento WO00/26405 describe un aparato y un procedimiento para lisar una célula o una espora para exponer el material nuclear contenido en el interior de una membrana superficial de la célula o la espora. El procedimiento incluye la etapa de generar una descarga ionizante. Se proporciona una superficie en la que se coloca una célula que se va a lisar o que se ha lisado. La célula o la espora se exponen después a la descarga ionizante durante al menos un intervalo de tiempo predefinido, de modo que la descarga ionizante rompe la membrana superficial de la célula o la espora, exponiendo el material nuclear del interior de la célula o la espora.

El documento US 6.511.831 describe un procedimiento para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos a partir de una muestra, en particular un material biótico o abiótico. El procedimiento contiene las etapas de aislar ácidos nucleicos a partir de una muestra seleccionada del grupo que consiste en células procariotas, células eucariotas, virus, orgánulos celulares, núcleos celulares y liposomas, que comprenden disociar la muestra por aplicación a la misma de al menos un campo eléctrico, para liberar los ácidos nucleicos de la muestra, poner los ácidos nucleicos liberados en contacto con un material capaz de unirse a ácidos nucleicos en condiciones de unión; y separar los ácidos nucleicos unidos del resto de la muestra.

### Resumen de la invención

Un objeto de la presente invención se refiere al suministro de un procedimiento para realizar una detección rápida de partículas biológicas.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un suministro de un procedimiento para realizar una detección sensible de partículas biológicas.

Otro objeto más de la presente invención se refiere a un suministro de un procedimiento adecuado para realizar una detección descentralizada y preferiblemente totalmente automatizada de partículas biológicas.

Otro objeto más de la presente invención se refiere al suministro de un procedimiento para realizar la detección de partículas biológicas con una manipulación de muestra manual mínima.

Otro objeto más de la presente invención se refiere al suministro de un procedimiento para realizar la detección de partículas biológicas, usando el procedimiento un mínimo de energía para la detección.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere al suministro de la recogida directa de partículas biológicas a partir de muestras gaseosas tales como muestras de aire.

Otro objeto de la presente invención se refiere al suministro de procedimientos para sobreconcentrar partículas biológicas a partir de una muestra gaseosa de gran tamaño en un volumen mucho menor, es decir, aumentar la concentración de las partículas biológicas.

Otro objeto más de la presente invención se refiere al suministro de procedimientos en los que se realiza la recogida y sobreconcentración de las partículas biológicas en la misma estructura y preferiblemente también en la misma etapa.

Otro objeto más de la presente invención se refiere al suministro de procedimientos que permiten fácilmente un análisis adicional de partículas biológicas recogidas.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere al suministro de procedimientos que permiten fácilmente un análisis adicional de partículas biológicas recogidas.

Además, un objeto de la invención se refiere a un suministro de procedimientos que recojan partículas biológicas con una alta eficacia de captura.

Otros objetos de la invención serán evidentes cuando se lea la descripción y los ejemplos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar una partícula biológica a partir de una muestra gaseosa, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar una cámara de muestra y un primer y segundo electrodos, estando el primer y el segundo electrodo y la cámara de muestra situados de tal modo que al menos una parte de la cámara de muestra esté entre el primer y el segundo electrodo, siendo la distancia entre el primer y el segundo electrodo como máximo de 20 mm,
- b) proporcionar una muestra gaseosa en la cámara de muestra,
- c) aplicar un primer potencial al primer electrodo y un segundo potencial al segundo electrodo, produciéndose por lo tanto una diferencia de potencial y un campo eléctrico entre el primer y segundo electrodos para contribuir a la recogida electrostática en la cámara de muestra de una partícula biológica a partir de la muestra gaseosa,

## ES 2 330 347 T3

- d) poner en contacto la partícula biológica recogida con un primer reactivo líquido, obteniéndose de este modo una mezcla de reacción,
- 5 e) exponer dicha mezcla de reacción a un campo eléctrico alterno en dicha cámara de muestra, teniendo dicho campo eléctrico alterno una amplitud suficiente para extraer material biológico de la partícula biológica,
- f) realizar la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana, y
- 10 g) medir la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o de los productos resultantes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y, opcionalmente, inferir que la partícula biológica se ha detectado en la muestra si al menos está presente una copia de secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o si está presente al menos un producto resultante de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

15 Se describe una microplaca para detectar una partícula biológica a partir de una muestra gaseosa, comprendiendo la microplaca

- una cámara de muestra, por ejemplo, que comprende una primera abertura en conexión fluida con el aire circundante y
- 20 - una segunda abertura para formar una conexión fluida con un dispositivo, comprendiendo la cámara de muestra una muestra gaseosa.

25 Se describe un dispositivo para detectar una partícula biológica a partir de una muestra gaseosa, comprendiendo el dispositivo:

- un sitio de microplaca donde se va a localizar una microplaca para asociarse funcionalmente con el dispositivo,
- 30 - una interfaz eléctrica entre el dispositivo y la microplaca para aplicar un campo eléctrico alterno entre los electrodos de la cámara de muestra y
- una unidad programable que comprende un programa informático que logra que el dispositivo realice una o más acciones seleccionadas del grupo que consiste en:
  - 35 - proporcionar una muestra gaseosa en la cámara de muestra,
  - aplicar un primer potencial al primer electrodo y un segundo potencial al segundo electrodo, produciéndose por lo tanto una diferencia de potencial y un campo eléctrico entre el primer y segundo
  - 40 electrodos, para contribuir a la recogida electrostática en la cámara de muestra de una partícula biológica presente en la muestra gaseosa,
  - poner en contacto la partícula biológica recogida con un primer reactivo líquido,
  - 45 - exponer una mezcla de reacción a un campo eléctrico alterno en dicha cámara de muestra, teniendo dicho campo eléctrico alterno una amplitud suficiente para extraer material biológico de la partícula biológica,
  - realizar la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana,

50 medir la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o medir los productos resultantes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

55 Se describe un sistema para detectar una partícula biológica a partir de una muestra gaseosa, comprendiendo el sistema una microplaca como se define en este documento funcionalmente asociada con un dispositivo como se define en este documento.

### Breve descripción de las figuras

60 En lo siguiente se describirán algunas realizaciones de la presente invención con respecto a las figuras, en las que

La Figura 1 ilustra la sección transversal de dos realizaciones ejemplares de la microplaca,

La Figura 2 muestra el sustrato de silicio del Ejemplo 1,

65 La Figura 3 muestra la Capa de aislamiento térmico del Ejemplo 1,

La Figura 4 muestra la Capa calentadora del Ejemplo 1,

## ES 2 330 347 T3

La Figura 5 muestra la Capa de contacto 1 del Ejemplo 1,

La Figura 6 muestra la Capa de aislamiento eléctrico 1 del Ejemplo 1,

5 La Figura 7 muestra la Capa de platino 1 del Ejemplo 1,

La Figura 8 muestra la Capa de contacto 2 del Ejemplo 1,

10 La Figura 9 muestra la Capa de aislamiento eléctrico 2 del Ejemplo 1,

La Figura 10 muestra la Planarización 1 del Ejemplo 1,

La Figura 11 muestra el Espaciador del Ejemplo 1,

15 La Figura 12 muestra la Tapa del Ejemplo 1, y

La Figura 13 muestra la microplaca final del Ejemplo 1.

### Descripción detallada de la invención

20

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar una partícula biológica a partir de una muestra gaseosa, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

25

a) proporcionar una cámara de muestra y un primer y un segundo electrodos, estando el primer y el segundo electrodos y la cámara de muestra situados de modo que al menos una parte de la cámara de muestra esté entre el primer y el segundo electrodos, siendo la distancia entre el primer y el segundo electrodos, como máximo, de 20 mm,

30

b) proporcionar una muestra gaseosa en la cámara de muestra,

35

c) aplicar un primer potencial al primer electrodo y un segundo potencial al segundo electrodo, produciéndose una diferencia de potencial y un campo eléctrico entre el primer y el segundo electrodos para contribuir a la recogida electrostática en la cámara de muestra de una partícula biológica a partir de la muestra gaseosa,

40

d) poner en contacto la partícula biológica recogida con un primer reactivo líquido, obteniéndose de este modo una mezcla de reacción,

e) exponer dicha mezcla de reacción a un campo eléctrico alterno en dicha cámara de muestra, teniendo dicho campo eléctrico alterno una amplitud suficiente para extraer material biológico de la partícula biológica,

45

f) realizar la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana, y  
g) medir la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o productos resultantes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana e inferir opcionalmente que la partícula biológica se ha detectado en la muestra si está presente al menos una copia de secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o si está presente al menos un producto resultante de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

50

De acuerdo con la presente invención, la expresión “partícula biológica” se refiere a una partícula que comprende, por ejemplo, un microorganismo y/o un virus y/o un fragmento del mismo.

El término “y/o” usado en el contexto de “X y/o Y” debe interpretarse como “X” o “Y”, o “X e Y”.

55

El microorganismo, por ejemplo, puede seleccionarse del grupo que consiste en un microorganismo arqueobacteriano, un microorganismo eubacteriano o un microorganismo eucariota.

Por ejemplo, el microorganismo puede seleccionarse del grupo que consiste en una bacteria, una espora bacteriana, un virus, un hongo y una espora fúngica.

60

En una realización preferida de la invención, el microorganismo es un microorganismo de transmisión aérea.

La partícula biológica también puede comprender una espora vegetal o un fragmento de la misma.

65

En una realización preferida de la invención, el microorganismo es una espora bacteriana.

Por ejemplo, la espora bacteriana puede formarse por una bacteria seleccionada del género *Bacillus* y/o del género *Clostridium*.

## ES 2 330 347 T3

En una realización preferida de la invención, la espora bacteriana es una espora formada por *Bacillus anthracis*. La partícula biológica puede comprender, por ejemplo, una espora bacteriana formada por *Bacillus anthracis*. Además, la partícula biológica puede consistir esencialmente en una o más esporas bacterianas formadas por *Bacillus anthracis*.

5 La expresión “muestra gaseosa” se refiere a una muestra que comprende uno o más gases y posiblemente también partículas biológicas. La muestra gaseosa puede ser, por ejemplo, una muestra de aire, tal como muestras de aire ambientales, una muestra de aire resultante de una succión al vacío de materiales en polvo tales como tierra, arena, polvo o polvo no identificado. La muestra gaseosa a examinar puede tener su origen en una persona que exhala una muestra respiratoria que contiene o es susceptible de contener microorganismos.

10 De acuerdo con la presente invención, las expresiones “cámara de muestra”, “recipiente” y “cámara de reacción” se usan indistintamente.

15 En una realización preferida de la invención, la cámara de muestra está compuesta por una microplaca, es decir, un cartucho o una biomicroplaca. La cámara de muestra puede estar compuesta, por ejemplo, por una microplaca como se define en este documento.

20 En una realización preferida, el primer y segundo electrodos están situados en lados opuestos de la cámara de muestra.

25 En una realización de la invención, el primer y/o el segundo electrodos tienen una forma sustancial seleccionada del grupo que consiste en una lámina, una placa, un disco, un alambre, una varilla o cualquier combinación de los mismos. En la presente invención se prefiere que al menos un electrodo tenga una forma de lámina y se prefiere aún más que tanto el primer como el segundo electrodos tengan formas de láminas.

30 En una realización de la invención, el primer y el segundo electrodos están separados por una distancia que es, como máximo, de 20 mm, que preferiblemente es como máximo de 20 mm, tal como de 15 mm, 10 mm, 9 mm, 8 mm, 7 mm, 6 mm o 5 mm como máximo o de 4 mm como máximo, siendo la distancia más preferiblemente como máximo de 3 mm, y aún más preferiblemente como máximo de 0,5 mm, tal como de 0,3 mm, 0,2 mm o 0,1 mm como máximo, tal como de 0,05 mm como máximo.

35 Por ejemplo, el primer y el segundo electrodos pueden estar separados por una distancia en intervalo de 0,05-20 mm, tal como en el intervalo de 0,05-0,1, 0,1-0,2, 0,2-0,3, 0,3-0,4, 0,4-0,5, 0,5-1, 1-2, 2-5, 5-10, o 10-15 mm, tal como en el intervalo de 15-20 mm.

Típicamente, el primer y segundo electrodos pueden estar separados por una distancia que es de al menos 0,02 mm, tal como de al menos 0,03 mm o 0,05 mm.

40 En la etapa c), se recogen una o más partículas biológicas a partir de la muestra gaseosa. La recogida de partículas biológicas puede realizarse de acuerdo con el procedimiento y usando la microplaca, dispositivo y sistema descritos en la solicitud PCT en trámite junto con la presente “Method, chip, device and system for collection of biological particles” (Procedimiento, microplaca, dispositivo y sistema para recoger partículas biológicas).

45 En una realización de la invención, las partículas biológicas se recogen a partir de la muestra gaseosa mientras que la muestra gaseosa está fluyendo a través de la cámara de muestra. En otra realización, las partículas biológicas se recogen a partir de la muestra gaseosa mientras que la muestra gaseosa se hace recircular a través de la cámara de muestra, es decir, la muestra gaseosa pasa a través de la cámara de muestra más de una vez, para aumentar la eficacia de captura. Por ejemplo, cuando se recircula, la muestra gaseosa puede fluir a través de la cámara de muestra al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o 75 veces, tal como al menos 100 veces. La muestra gaseosa puede fluir, por ejemplo, a través de la muestra un número de veces en el intervalo de 2-200, tal como 2-50 veces, 50-100 veces o 100-200 veces.

55 En una realización de la invención, la muestra gaseosa se proporciona en la cámara de muestra por medio de un flujo de gas. Durante la recogida de partículas biológicas, el flujo de gas tiene típicamente una velocidad de flujo que varía preferiblemente de aproximadamente 5-1000 ml/minuto.

En una realización de la invención, el flujo de gas se ha interrumpido antes de que se recojan las partículas biológicas a partir de la muestra de gas.

60 Normalmente, al menos una parte de la muestra gaseosa en la cámara de muestra se sitúa o fluye entre el primer y el segundo electrodos. Por ejemplo, al menos el 40% del volumen de la muestra gaseosa se sitúa o fluye entre el primer y segundo electrodos, tal como al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97,5, 99, 99,5 ó 99,9% del volumen de la muestra gaseosa se sitúa o fluye entre el primer y el segundo electrodos, tal como al menos el 100% del volumen de la muestra gaseosa se sitúa o fluye entre el primer y el segundo electrodos.

65 En una realización más de la invención, el campo eléctrico del primer y segundo electrodos se selecciona para dar una eficacia de captura de al menos el 50% para partículas biológicas que tienen una longitud eficaz en el intervalo de 1-10 micrómetros.

## ES 2 330 347 T3

La magnitud del campo eléctrico puede seleccionarse del grupo de: 50 V/mm, 100 V/mm, 200 V/mm, 300 V/mm, 400 V/mm, 500 V/mm, 600 V/mm, 700 V/mm, 800 V/mm, 900 V/mm, 1000 V/mm, 1100 V/mm, 1200 V/mm, 1300 V/mm, 1400 V/mm, 1500 V/mm, 1600 V/mm, 1700 V/mm, 1800 V/mm, 1900 V/mm, 2000 V/mm.

5 Por ejemplo, la magnitud del campo eléctrico puede estar en el intervalo de 50-2000 V/mm, tal como en el intervalo de 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1000, 1000-1200 V/mm, 1200-1500 V/mm, tal como en el intervalo de 1500-2000 V/mm.

10 En una realización preferida de la invención, el primer y el segundo electrodos están cargados respectivamente negativa y positivamente o viceversa. Por ejemplo, si la diferencia de potencial entre los dos electrodos es de 400 V, el electrodo cargado negativamente puede tener un potencial de -200 V con respecto a tierra y el electrodo cargado positivamente puede tener un potencial de 200 V con respecto a tierra.

15 En una realización altamente preferida de la invención, el primer potencial del primer electrodo y el segundo potencial del segundo electrodo, y por lo tanto el campo eléctrico entre el primer y el segundo electrodos, se seleccionan para dar una eficacia de captura de al menos el 50% para partículas biológicas que tiene una longitud eficaz en el intervalo de 1-10 micrómetros, tal como una eficacia de captura de al menos el 70%, preferiblemente de al menos el 80% y más preferiblemente de al menos el 90%, tal como de al menos el 95%, 97,5%, 99, 99,5 ó 99,9%, tal como aproximadamente del 100%.

20 Preferiblemente, la eficacia de captura se determina de acuerdo con el procedimiento estandarizado del Ejemplo 2.

25 De acuerdo con la presente invención, la expresión “longitud eficaz” de una partícula es el diámetro aerodinámico de la partícula, por ejemplo, medido por dispersión de luz láser (O'Brien *et al* 1986). El diámetro aerodinámico de una partícula,  $d_{pa}$ , puede estimarse mediante la fórmula

$$d_{pa} = d_{ps} \cdot \sqrt{\rho_o}$$

30 donde  $d_{ps}$  es el diámetro de Stoke en  $\mu\text{m}$  y  $\rho_p$  es la densidad de partículas en  $\text{g/cm}^3$ .

35 En una realización preferida de la invención, las partículas biológicas recogidas de la cámara de muestra entran en contacto con un primer reactivo líquido. Puede preferirse que las partículas biológicas entren en contacto mientras aún están localizadas entre el primer y el segundo electrodos.

En la etapa d), la partícula biológica recogida se pone en contacto con un primer reactivo líquido y la mezcla resultante se denomina la mezcla de reacción.

40 El primer reactivo líquido comprende uno o más reactivos necesarios para realizar una amplificación de ácido nucleico.

El primer reactivo líquido puede comprender uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en un cebador, un ácido nucleico, un nucleótido trifosfato y una polimerasa de ácido nucleico.

45 El primer reactivo líquido puede comprender además aditivos tales como 2-mercaptoetanol, por ejemplo, en una concentración de 10 mM, BSA, por ejemplo, en una concentración de 1 mg/ml y/o un detergente, por ejemplo, en una concentración del 0,5% al 6% (p/v). El detergente puede seleccionarse del grupo que consiste en Triton X-100, Triton X-114, NP-40, Tween20, Tween80 y detergentes no iónicos similares.

50 En el presente contexto, la expresión “ácido nucleico”, “secuencia de ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” debe interpretarse ampliamente y, por ejemplo, puede ser un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Esta expresión incluye moléculas compuestas por nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos (estructurales) covalentes, así como moléculas que tienen nucleobases no naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos (estructurales) covalentes que funcionan de forma similar o combinaciones de los mismos. Dichos ácidos nucleicos modificados o sustituidos pueden preferirse sobre las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una mayor afinidad por la molécula diana de ácido nucleico y mayor estabilidad en presencia de nucleasas y otras enzimas, y se describen en el presente contexto mediante las expresiones “análogos de ácidos nucleicos” o “miméticos de ácidos nucleicos”. Son ejemplos preferidos de miméticos de ácidos nucleicos moléculas que comprenden ácido peptidonucleico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), xilo-LNA-, fosforotioato-, 2'-metoxi-, 2'-metoxietoxi-, morfolino- y fosforamidato- o derivados de ácidos nucleicos funcionalmente similares.

60 La expresión “polimerasa de ácido nucleico” se refiere a una enzima ADN polimerasa dependiente de ADN o ARN que preferiblemente es termoestable, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de la extensión de cebadores complementarios a un molde y no se desnaturaliza de forma irreversible cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para lograr la desnaturalización de ácidos nucleicos de molde bicatenarios. Generalmente, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y avanza en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena molde. Se han aislado polimerasas termoestables a partir de cepas termófilas o extremadamente termófilas tales como *Ther-*

## ES 2 330 347 T3

*mus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Thermococcus litoralis*, *Pyrococcus furiosus*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. No obstante, también pueden emplearse polimerasas que no sean termoestables en la amplificación de ácidos nucleicos siempre que se reponga la enzima.

5 El primer reactivo líquido puede comprender además una oligosonda de ácido nucleico degradable por exonucleasa 5'-3', dando como resultado la degradación de dicha sonda de ácido nucleico la liberación de un componente redox activo.

El componente redox activo puede ser, por ejemplo, un metaloceno, tal como, por ejemplo, ferroceno.

10

En la etapa e), la mezcla de reacción se expone a un campo eléctrico alterno. El campo eléctrico alterno puede proporcionarse por el primer y segundo electrodos que proporcionan el campo eléctrico para la recogida o pueden proporcionarse por otro conjunto de electrodos.

15 La extracción del material biológico puede realizarse de acuerdo con el procedimiento y usando la microplaca, dispositivo y sistema descritos en la solicitud PCT en trámite junto con la presente "Method, chip, device and system for extracción of biological material" (Procedimiento, microplaca, dispositivo y sistema para la extracción de material biológico).

20 En una realización preferida de la invención, la parte de la mezcla de reacción expuesta sobre la que se realiza un análisis genético adicional constituye al menos el 20% de la mezcla de reacción en la cámara de muestra, tal como al menos el 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97,5, 99, 99,5, ó 99,9% de la mezcla de reacción en la cámara de muestra, tal como al menos aproximadamente el 100% de la mezcla de reacción en la cámara de muestra.

25 De acuerdo con la presente invención, los términos "extracción" y "extraer" se refieren a liberar material biológico de dicha una o más células biológicas, es decir, por ejemplo, hacer que esté disponible para un análisis adicional en la mezcla de reacción. Los términos "extracción" y "extraer" también se refieren, por ejemplo, a abrir o romper la pared celular o barrera celular de la partícula biológica.

30 El material biológico extraído a partir de la partícula biológica comprenderá típicamente un componente seleccionado del grupo que consiste en un orgánulo celular, un material genético y una proteína.

El material genético puede comprender, por ejemplo, ADN cromosómico y/o ADN plasmídico y/o cualquier tipo de ARN.

35

La proteína puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en enzimas, proteínas estructurales, proteínas de transporte, canales iónicos, toxinas, hormonas y receptores.

Preferiblemente, el material biológico comprende ADN y/o ARN.

40

De acuerdo con la presente invención, la expresión "campo eléctrico alterno" se refiere a campos eléctricos que cambian con el tiempo. El campo eléctrico alterno puede ser, por ejemplo, el campo eléctrico que se produce por un cambio periódico de la polaridad de dos electrodos entre positivo/negativo y negativo/positivo, es decir, por conexión de una fuente de CA a los electrodos. El campo eléctrico alterno puede comprender o ser, por ejemplo, un campo de CA. El campo eléctrico alterno puede comprender, por ejemplo, uno o más pulsos de CC.

45

Es importante que el campo eléctrico alterno tenga una amplitud suficiente y se aplique durante un tiempo suficiente para extraer el material biológico. También puede ser importante que el campo eléctrico alterno tenga además una frecuencia suficiente para extraer el material biológico.

50

En una realización preferida de la invención, la frecuencia del campo eléctrico alterno es de al menos 5 kHz, siendo preferiblemente de al menos 20 kHz y, siendo más preferiblemente de al menos 50 kHz.

55 En otra realización preferida de la invención, la frecuencia del campo eléctrico alterno es de al menos 100 kHz, siendo preferiblemente de al menos 250 kHz y siendo más preferiblemente de al menos 500 kHz.

Por ejemplo, la frecuencia del campo eléctrico alterno puede ser de al menos 5 kHz, tal como de al menos 10, 20, 50, 100, 200, 300 ó 400 kHz, tal como de al menos 500 kHz. Se prevén frecuencias incluso mayores tales como de 1000 kHz, 2000 kHz o 5000 kHz.

60

Preferiblemente, la frecuencia del campo eléctrico alterno es como máximo de 750 kHz, tal como de 500 kHz como máximo.

65 Por lo tanto, la frecuencia del campo eléctrico alterno puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 5-750 kHz, tal como en el intervalo de 5-10, 10-20, 20-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400 ó 400-500 kHz, tal como en el intervalo de 500-750 kHz. Preferiblemente, la frecuencia del campo eléctrico alterno puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 60-750 kHz, tal como 70-750 kHz, 80-750 kHz, 90-750 kHz o 100-750 kHz.

## ES 2 330 347 T3

La amplitud del campo eléctrico alterno, es decir, la diferencia de potencial máxima entre el primer y el segundo electrodos es típicamente, como máximo, de 30 V, tal como de 25, 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3 ó 2 V como máximo, tal como de 1 V como máximo.

5 La amplitud del campo eléctrico alterno, es decir, la diferencia de potencial máxima entre el primer y el segundo electrodos, puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1-30 V, tal como en el intervalo de 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-8, 8-10, 10-15, 15-20 ó 20-25 V, tal como en el intervalo de 25-30 V.

10 Una medida interesante de la extracción de material biológico es el porcentaje de liberación de ADN/ARN. El “porcentaje de liberación de ADN/ARN” es el porcentaje de células biológicas en la cámara de muestra que liberan su ADN y/o ARN debido a la exposición en la etapa c) al campo eléctrico alterno. El porcentaje de liberación de ADN/ARN se determina de acuerdo con el procedimiento estandarizado descrito en el Ejemplo 3.

15 La extracción, y por lo tanto el porcentaje de liberación de ADN/ARN de células biológicas en la cámara de muestra o en una microplaca que comprende la cámara de muestra, depende enormemente del diseño de y de la distancia entre el primer y el segundo electrodos, la estructura y materiales de la cámara de muestra y los potenciales aplicados al primer y segundo electrodos.

20 En una realización altamente preferida de la invención, el primer potencial del primer electrodo y el segundo potencial del segundo electrodo, y por lo tanto el campo eléctrico alterno entre el primer y el segundo electrodos, se modulan para dar un porcentaje de liberación de ADN/ARN de al menos el 30%, tal como un porcentaje de liberación de ADN/ARN de al menos el 40%, preferiblemente de al menos el 50%, y más preferiblemente de al menos el 60%, tal como de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99, 99,5 ó 99,9%, tal como de aproximadamente el 100%.

25 En otra realización preferida de la invención, el primer potencial del primer electrodo y el segundo potencial del segundo electrodo, y por lo tanto el campo eléctrico alterno entre el primer y el segundo electrodos, se modulan para dar un porcentaje de liberación de ADN/ARN de al menos el 30% de las esporas bacterianas en la cámara de muestra, tal como un porcentaje de liberación de ADN/ARN de al menos el 40%, preferiblemente de al menos el 50% y, más preferiblemente, de al menos el 60% de las esporas bacterianas en la cámara de muestra, tal como de al menos el 70%,  
30 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99, 99,5 ó 99,9%, tal como de aproximadamente el 100% de las esporas bacterianas en la cámara de muestra.

En una realización preferida, el campo eléctrico alterno se proporciona por modulación de la polaridad de los dos electrodos.

35 El campo eléctrico alterno puede tener una forma sustancial seleccionada del grupo que consiste en: rectangular, sinusoidal, diente de sierra, triangular asimétrica, triangular simétrica; o cualquier combinación de las mismas.

40 Además, el campo eléctrico alterno, en el dominio de frecuencia, puede comprender al menos un primer y un segundo componentes de frecuencia.

En una realización de la invención, la mezcla de reacción se expone al campo eléctrico alterno durante 3600 segundos como máximo, tal como durante 3000, 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4 ó 3 segundos como máximo, tal como durante 1 segundo como máximo.

45 Por ejemplo, la mezcla de reacción puede exponerse al campo eléctrico alterno en el intervalo de 0,01-3600 segundos, tal como en el intervalo de 0,1-1, 1-5, 5-10, 10-25, 25-50, 50-100, 100-250, 250-500, 500-1000 ó 1000-2000 segundos, tal como en el intervalo de 2000-3600 segundos.

50 En una realización preferida de la invención, la mezcla de reacción se expone al campo eléctrico alterno durante 250 segundos como máximo, preferiblemente durante 100 segundos como máximo, tal como durante 30 segundos como máximo.

55 La etapa f) comprende realizar una amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico diana se selecciona para que sea específica para la partícula biológica.

60 De acuerdo con la presente invención, la expresión “secuencia de ácido nucleico diana” (TNAS) se refiere a una secuencia de ácido nucleico de especial interés, por ejemplo, para fines analíticos o de diagnóstico. La TNAS puede ser, por ejemplo, un gen o un fragmento de un gen.

De acuerdo con la presente invención, la expresión “amplificación de ácido nucleico” se refiere a un proceso en el que un molde, por ejemplo un fragmento del ácido nucleico que comprende la TNAS, se copia en varias copias.

65 En una realización preferida de la invención, la amplificación de ácido nucleico de la etapa f) se realiza usando una técnica de amplificación seleccionada del grupo que consiste en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA), amplificación por círculo rodante mediada por ligación (L-RCA) y sus combinaciones/modificaciones. Estos procedimientos, así como la PCR, son bien conocidos por el especialista en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*

## ES 2 330 347 T3

Preferiblemente, la amplificación de ácido nucleico de la etapa f) es PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos más usada comúnmente. Las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 describen realizaciones de la técnica de PCR. LA PCR emplea típicamente dos cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Un cebador puede purificarse a partir de un producto de digestión de restricción por procedimientos convencionales o puede producirse sintéticamente. Preferiblemente, el cebador es monocatenario para una eficacia máxima de amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios primero se desnaturalizan, es decir, se tratan para separar las cadenas. Un procedimiento de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento.

Después de desnaturalizar por calor el ácido nucleico bicatenario, la mezcla de reacción se deja enfriar a una temperatura que promueva la hibridación de cada cebador a la secuencia de ácido nucleico que comprende la TNAS. La temperatura para la hibridación es habitualmente de aproximadamente 35°C a aproximadamente 65°C. El tiempo de hibridación es típicamente de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 min. Después, la mezcla de reacción se ajusta a una temperatura a la que se promueva u optimice la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión a partir del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se hibride con un molde de ácido nucleico pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión a partir de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para la extensión varía generalmente de aproximadamente 40°C a 80°C). El tiempo de extensión es normalmente de aproximadamente 5 segundos (ajustes en laboratorio en microplaca) a aproximadamente 5 minutos.

De acuerdo con la presente invención, el término “cebador” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridar, por ejemplo, con la TNAS, con una secuencia de ácido nucleico próxima a la secuencia diana o con una secuencia de ácido nucleico que solape con la TNAS. Como alternativa, un cebador puede ser capaz de hibridar con la secuencia complementaria de la TNAS, con la secuencia complementaria de una secuencia de ácido nucleico próxima a la TNAS o con la secuencia complementaria de una secuencia de ácido nucleico que solape con la TNAS.

Los cebadores comprenden típicamente oligonucleótidos, es decir, moléculas de ácido nucleico que comprenden en el intervalo de 5-30 nucleótidos, tal como en el intervalo de 5-10 nucleótidos, 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos y 25-30 nucleótidos. También se prevé que pueden usarse moléculas de ácido nucleico de mayor longitud como cebadores. Por lo tanto, un cebador puede comprender una molécula de ácido nucleico que comprenda en el intervalo de 30-50 nucleótidos, tal como en el intervalo de 30-35 nucleótidos, 35-40 nucleótidos, 40-45 nucleótidos y 45-50 nucleótidos.

Por ejemplo, un cebador puede consistir esencialmente en un oligonucleótido, es decir, moléculas de ácido nucleico que consisten esencialmente en el intervalo de 5-30 nucleótidos, tal como en el intervalo de 5-10 nucleótidos, 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos y 25-30 nucleótidos. Además, un cebador puede ser una molécula de ácido nucleico que consista esencialmente en el intervalo de 30-50 nucleótidos, tal como en el intervalo de 30-35 nucleótidos, 35-40 nucleótidos, 40-45 nucleótidos y 45-50 nucleótidos.

Se prefiere especialmente que la amplificación de ácido nucleico de la etapa f) sea una PCR anidada. La PCR anidada usa al menos dos pares de cebadores, es decir, un par de cebadores externos y un par de cebadores internos. En un par de cebadores, un cebador, el cebador con sentido, se diseña típicamente para ser capaz de hibridar con la cadena de ácido nucleico que comprende la cadena de TNAS. El otro cebador, el cebador antisentido, se diseña típicamente para ser capaz de hibridar con la cadena de ácido nucleico complementaria de la cadena de ácido nucleico que comprende la cadena de TNAS. En primer lugar se realiza un proceso de PCR que implica al par externo de cebadores, enriqueciendo de este modo la mezcla de reacción con moléculas de ácido nucleico que comprenden la TNAS o fragmentos de la misma y reduciendo la interferencia de otras secuencias de ácido nucleico de la mezcla de reacción. A continuación se realiza un proceso de PCR que implica al par interno de cebadores, amplificando por lo tanto específicamente la TNAS un fragmento de la misma.

Se prefiere aún más realizar una PCR anidada en un formato de un solo tubo, es decir, una PCR anidada en la que tanto el par de cebadores externos como el par de cebadores internos estén presentes en la mezcla de reacción al mismo tiempo. Una ventaja principal del uso de PCR anidada en un solo tubo en el contexto de sistemas de detección automatizados y, por ejemplo, basados en microplacas, es que la complejidad de la manipulación de líquido se reduce espectacularmente en comparación con una PCR anidada convencional en la que los pares de cebadores externo e interno tienen que añadirse en la mezcla de reacción de forma secuencial.

Típicamente, la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del par de cebadores externos es al menos 2°C superior a la  $T_m$  del par de cebadores internos. Esta diferencia en la  $T_m$  hace posible realizar el proceso de PCR exclusivamente con el par de cebadores externos manteniendo la temperatura de hibridación por encima de la  $T_m$  del par de cebadores internos. El proceso de PCR que implica el par de cebadores internos se inicia por reducción de la temperatura de hibridación por debajo de la  $T_m$  del par de cebadores internos.

## ES 2 330 347 T3

Por ejemplo, puede realizarse una PCR anidada en un solo tubo, por ejemplo, mediante el procedimiento que comprende las etapas de:

- 5 i) ciclar, al menos dos veces, la temperatura de la mezcla de reacción entre una primera temperatura de desnaturalización, una primera temperatura de hibridación y una primera temperatura de extensión, siendo la primera temperatura de hibridación similar a o inferior a la menor  $T_m$  del par de cebadores externos y superior a la mayor  $T_m$  del par de cebadores internos y
- 10 ii) ciclar, al menos dos veces, la temperatura de la mezcla de reacción entre una segunda temperatura de desnaturalización, una segunda temperatura de hibridación y una segunda temperatura de extensión, siendo la segunda temperatura de hibridación similar a o inferior a la menor  $T_m$  del par de cebadores internos.

15 El proceso de PCR anidada en un solo tubo y la detección pueden realizarse, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos y usando los kits que se describen en la solicitud PCT en trámite junto con la presente "Method, kit and system for enhanced Nested PCR" (Procedimiento, kit y sistema para una PCR anidada mejorada).

20 La etapa g) implica medir la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o productos resultantes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y, opcionalmente, inferir que la partícula biológica se ha detectado en la muestra si está presente al menos una copia de secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o está presente al menos un producto resultante de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

25 En una realización preferida de la invención, la medición de la etapa g) comprende una medición electroquímica, tal como, por ejemplo, una medición amperométrica o una medición voltamétrica.

En una realización especialmente preferida de la invención, la medición voltamétrica se realiza usando voltimetría pulsada diferencial u otro medio de resta de la señal de referencia para aumentar la relación entre la señal y las interferencias.

30 Preferiblemente, la medición voltamétrica se realiza usando electrodos de detección situados en la cámara de muestra. La señal de referencia puede recuperarse, por ejemplo, de otra cámara lejana a la cámara de muestreo.

35 La detección voltamétrica se realiza preferiblemente por medio de una sonda oligonucleotídica degradable por exonucleasa 5'-3', dando como resultado la degradación de dicha sonda de ácido nucleico la liberación de un componente detectable tal como un componente redox activo.

40 El componente redox activo puede ser, por ejemplo, un metaloceno tal como, por ejemplo, ferroceno, que puede medirse con alta sensibilidad y especificidad en un programa de detección voltamétrica. Preferiblemente, el componente redox activo es un grupo metalocenilo. Más preferiblemente es un grupo ferrocenilo. Un componente redox activo representativo para la sonda es ferroceno o metaloceno, más ventajosamente carboxamidas de ferroceno o metaloceno N-sustituídas. El anillo de ferroceno o metaloceno, que constituye el resto marcador, puede no estar sustituido. En la técnica se conocen los componentes redox activos anteriores, así como componentes redox activos útiles adicionales y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 03/074 731 y EP 1 481 083.

45 En solución, la sonda digerida acumulada puede distinguirse de la sonda no digerida debido a su diferente actividad redox; por lo tanto, el procedimiento incluye además la detección de la presencia o ausencia de un pico de voltaje específico de sonda que usa un sistema de detección basado en el análisis voltamétrico de la actividad redox.

50 En una realización más preferida de la invención, la medición de la etapa g) comprende una medición óptica tal como, por ejemplo, una medición de fluorescencia o una medición de quimioluminiscencia. El uso de medición óptica puede requerir que la cámara de muestra, por ejemplo, la cámara de muestra de la microplaca, comprenda una ventana que es transparente para las longitudes de onda pertinentes.

55 Existen varias técnicas de fluorescencia bien descritas diferentes. Por ejemplo, la medición de fluorescencia puede emplear la denominada TaqMan<sup>®</sup> que, por ejemplo, se describe en la Patente de Estados Unidos 5.723.591.

60 Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de partículas biológicas, por ejemplo, excluyendo esporas, comprendiendo el procedimiento la etapa a), b), c), d), f), g) como se describe en este documento y una etapa sustituta e1) que sustituye a la etapa e). La etapa sustituta e1) comprende extraer material biológico a partir de las partículas biológicas por tratamiento térmico de la mezcla de reacción a una temperatura en el intervalo de 80°C-105°C, tal como 90°C-100°C. La duración del tratamiento térmico está típicamente en el intervalo de 5 segundos - 3 horas, tal como 5 minutos - 60 minutos.

65 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para extraer material biológico a partir de partículas biológicas, comprendiendo el procedimiento las etapas anteriores a), b), c), d), e) y f) como se han descrito en este documento.

## ES 2 330 347 T3

A continuación se describe una microplaca para detectar una partícula biológica en una muestra gaseosa, comprendiendo la microplaca

- una cámara de muestra, por ejemplo, que comprende una primera abertura en conexión fluida con el aire circundante y
- una segunda abertura para formar una conexión fluida con un dispositivo, comprendiendo la cámara de muestra una muestra gaseosa.

La cámara de muestra, por ejemplo, la cámara de muestra de la microplaca es típicamente una cámara de muestra a escala microscópica. El volumen de la cámara de muestra es de 500  $\mu\text{l}$  como máximo, tal como de 400  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$ , 15  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$  o 3  $\mu\text{l}$  como máximo, o de 2  $\mu\text{l}$  como máximo, tal como de 1  $\mu\text{l}$  como máximo. Por ejemplo, el volumen de la cámara de muestra puede ser de 500 nl como máximo, tal como de 400 nl, 300 nl, 200 nl, 100 nl, 50 nl, 25 nl, 15 nl, 10 nl, 5 nl, 4 nl o 3 nl como máximo o de 2 nl como máximo, tal como de 1 nl como máximo.

Típicamente, el volumen de la cámara de muestra es de al menos 10 nl. En una realización preferida, el volumen de la cámara de muestra está en el intervalo de 1  $\mu\text{l}$ -50  $\mu\text{l}$ , tal como 5  $\mu\text{l}$ -30  $\mu\text{l}$ .

La menor distancia entre un par de paredes opuestas es de 20 mm como máximo, tal como de 15 mm, 10 mm, 8 mm, 6 mm, 4 mm, 3 mm o 2 mm como máximo, tal como de 1 mm como máximo. Por ejemplo, la menor distancia entre un par de paredes opuestas es de 800  $\mu\text{m}$  como máximo, tal como de 600  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$  o 3  $\mu\text{m}$  como máximo o de 2  $\mu\text{m}$  como máximo, tal como de 1  $\mu\text{m}$  como máximo.

Típicamente, la menor distancia entre un par de paredes opuestas es de al menos 5  $\mu\text{m}$ . En una realización preferida, la menor distancia entre un par de paredes opuestas está en el intervalo de 50  $\mu\text{m}$ -500  $\mu\text{m}$ , tal como 100  $\mu\text{m}$ -400  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$ -350  $\mu\text{m}$ .

La longitud de la cámara de muestra, por ejemplo, la cámara de muestra de la microplaca, está en el intervalo de 1 mm-50 mm, tal como en el intervalo de 1 mm-10 mm, 10 mm- 20 mm, 20 mm-30 mm, 30 mm-40 mm, o 40 mm-50 mm. En una realización preferida, la longitud de la cámara de muestra está en el intervalo de 2 mm-8 mm, tal como 3 mm-7 mm o 4 mm-6 mm. Por ejemplo, la longitud de la cámara de muestra puede ser de aproximadamente 4,5 mm.

En una realización, la anchura de la cámara de muestra, por ejemplo, la cámara de muestra de la microplaca, está en el intervalo de 0,2 mm-10 mm, tal como en el intervalo de 0,2 mm-1 mm, 1 mm-3 mm, 3 mm-5 mm, 5 mm-7 mm o 7 mm-10 mm. En una realización preferida, la anchura de la cámara de muestra está en el intervalo de 0,2 mm-2 mm, tal como 0,5 mm-1,5 mm y 0,75 mm-1,25 mm. Por ejemplo, la anchura de la cámara de muestra puede ser de aproximadamente 1 mm.

En una realización, la altura de la cámara de muestra, por ejemplo, la cámara de muestra de la microplaca está en el intervalo de 50  $\mu\text{m}$ -2 mm, tal como en el intervalo de 100  $\mu\text{m}$ -1 mm, 200  $\mu\text{m}$ -900  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ -800  $\mu\text{m}$  o 500  $\mu\text{m}$ -700  $\mu\text{m}$ . En una realización preferida, la altura de la cámara de muestra está en el intervalo de 100  $\mu\text{m}$ -400  $\mu\text{m}$ , tal como 200  $\mu\text{m}$ -300  $\mu\text{m}$ .

En una realización, la longitud de la cámara de muestra, por ejemplo, la cámara de muestra de la microplaca, es de aproximadamente 4,5 mm, la anchura de la cámara de muestra es de aproximadamente 1 mm y la altura de la cámara de muestra es de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ .

En una realización, la microplaca comprende además un primer y un segundo electrodos.

El primer y/o el segundo electrodos pueden tener formas o dimensiones diferentes. Por ejemplo, el primer y/o el segundo electrodos pueden tener una forma sustancial seleccionada del grupo de una lámina, una placa, un disco, un alambre, una varilla; o cualquier combinación de las mismas.

En una realización preferida, el primer y el segundo electrodos pueden ser electrodos de tipo lámina.

Una realización preferida, el primer electrodo y el segundo electrodo están enfrentados entre sí. Por ejemplo, pueden situarse en lados opuestos de la cámara de muestra.

El primer electrodo y/o el segundo electrodo pueden situarse, por ejemplo, en el interior de la cámara de muestra, estando libres en la cámara de muestra o unidos a una o más de las paredes de la cámara de muestra.

El primer y/o el segundo electrodos pueden estar embebidos en la pared o paredes de la cámara de muestra. Por ejemplo, el primer y el segundo electrodos pueden estar embebidos en las paredes de la cámara de muestra. Como alternativa, el primer y/o el segundo electrodos pueden estar situados en la superficie o superficies externas de la microplaca.

## ES 2 330 347 T3

Preferiblemente, el primer electrodo y el segundo electrodo se sitúan en lados opuestos de la cámara de muestra.

Un electrodo, por ejemplo, el primer electrodo y/o el segundo electrodo pueden formarse de varios materiales diferentes. Típicamente, los electrodos están formados por metales o aleaciones. El primer y el segundo electrodos pueden comprender, por ejemplo, un metal seleccionado del grupo que consiste en plata, oro, platino, cobre, carbono, hierro, grafito, cromo, níquel, cobalto, titanio, mercurio o una aleación de los mismos.

También se prevé que un electrodo puede comprender un líquido conductor e incluso consistir esencialmente en un líquido conductor. El líquido conductor puede ser, por ejemplo, mercurio.

La dimensión y/o estructura de los electrodos depende típicamente de la dimensión y/o estructura de la cámara de muestra. La longitud y anchura de los electrodos son del mismo orden de magnitud que la longitud y anchura de la cámara de muestra.

Los electrodos pueden estar formados por tan sólo un recubrimiento de unas pocas capas de átomos de material conductor.

En una realización de la invención, un electrodo, por ejemplo, el primer y/o el segundo electrodo, tiene un espesor en el intervalo de  $0,001\ \mu\text{m}$ - $2000\ \mu\text{m}$ , tal como  $0,001\ \mu\text{m}$ - $1\ \mu\text{m}$ ,  $1\ \mu\text{m}$ - $20\ \mu\text{m}$ ,  $20\ \mu\text{m}$ - $200\ \mu\text{m}$  y  $200\ \mu\text{m}$ - $2000\ \mu\text{m}$ .

En una realización, la cámara de muestra de la microplaca comprende además un conjunto de electrodos de detección, por ejemplo, dos o tres electrodos de detección, para la detección de la presencia o ausencia de un componente redox activo que, por ejemplo, puede liberarse a partir de una sonda. Dos electrodos de detección pueden servir como electrodo de trabajo y contraelectrodo, respectivamente. El conjunto de electrodos de detección puede comprender además un electrodo de referencia. Típicamente, los electrodos de detección están formados en metales o aleaciones. Los electrodos pueden comprender, por ejemplo, un material seleccionado del grupo que consiste en carbono, plata, oro o platino. Después de la detección, los electrodos pueden experimentar formación de películas en la superficie del electrodo. Para permitir una detección adicional de sonda digerida, pueden disponerse conjuntos de electrodos de detección adicionales en el interior de la cámara de muestra de la microplaca.

En una realización, el primer y el segundo electrodos pueden ser el conjunto de electrodos de detección.

En una realización preferida, la microplaca comprende además un elemento de detección de temperatura que podría ser, por ejemplo, un resistor basado en un metal termosensible (un termistor) con un coeficiente de temperatura positivo (PTC), es decir, el termistor presenta una resistencia eléctrica creciente con aumentos en la temperatura ambiental y una resistencia eléctrica decreciente con disminución de la temperatura.

El termistor puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo de materiales que comprende cobre, níquel, hierro, aluminio, platino o aleaciones de los mismos.

El termistor puede tener formas o dimensiones diferentes. Por ejemplo, el termistor puede tener una forma sustancial seleccionada del grupo de una lámina, una placa, un disco, un alambre o una varilla.

El termistor puede ser, por ejemplo, un electrodo en forma de alambre.

El electrodo de calentamiento puede tener formas o dimensiones diferentes. Por ejemplo, el electrodo de calentamiento puede tener una forma sustancial seleccionada del grupo de una lámina, una placa, un disco, un alambre o una varilla.

En una realización preferida, el electrodo de calentamiento puede ser, por ejemplo, un electrodo de tipo lámina. En una realización preferida, el electrodo de calentamiento puede situarse de manera que permite el calentamiento desde al menos un lado de la cámara de reacción.

En otra realización más, uno o más electrodos de calentamiento complementarios pueden situarse en los lados opuestos de la cámara de reacción.

El electrodo de calentamiento está hecho de un material eléctricamente conductor, preferiblemente seleccionado del grupo de níquel-cromo (NiCr), hierro-cromo-aluminio (FeCrAl), hierro-níquel-cromo (FeNiCr) u otras aleaciones de elementos de calentamiento.

En una realización preferida, la microplaca comprende una o más almohadillas de contacto conductoras en contacto eléctrico con los electrodos de la microplaca. La microplaca puede comprender una almohadilla de contacto conductora en contacto eléctrico con el primer electrodo. La microplaca puede comprender una almohadilla de contacto conductora en contacto eléctrico con el segundo electrodo. La microplaca puede comprender dos almohadillas de contacto conductoras en contacto eléctrico con cada uno de los extremos del electrodo de calentamiento. La microplaca puede comprender dos o tres almohadillas de contacto conductoras en contacto eléctrico con cada uno de los electrodos del conjunto de electrodos de detección.

## ES 2 330 347 T3

En la Figura 1 se ilustran dos realizaciones ejemplares de microplaca. En la Figura 1 A) la microplaca (1) comprende la cámara de muestra (2) y un primer electrodo (3) y un segundo electrodo (4). El primer electrodo (3) está unido a la parte superior (5) de la microplaca y el segundo electrodo (4) está unido a la parte inferior (6) de la microplaca. Tanto el primer como el segundo electrodos están cubiertos por una capa eléctricamente aislante (7) para evitar una electrolisis no deseada del contenido líquido de la cámara de muestra (2). Un electrodo de calentamiento está embebido en la capa aislante en la parte superior del segundo electrodo. La cámara de muestra está formada por una parte separadora (9), que está intercalada entre la primera parte (5) y la segunda parte (6) de la microplaca (1). El conjunto de electrodos de detección y el elemento de detección de la temperatura no se muestra en la Figura 1.

La microplaca puede comprender una amplia serie de materiales diferentes. Puede comprender, por ejemplo, polímeros orgánicos tales como plásticos, metales y semiconductores tales como silicio, vidrios y materiales cerámicos, y similares.

Con respecto a la Figura 1, la primera y segunda partes podrían comprender, por ejemplo, materiales tales como plásticos, semiconductores tales como silicio, vidrios o materiales cerámicos. El primer y segundo electrodos podrían comprender, por ejemplo, un metal tal como oro o cobre. La capa aislante podría ser, por ejemplo, una película de SiO<sub>2</sub> o poliimida. El electrodo de calentamiento podría ser, por ejemplo, un electrodo de NiCr y la capa separadora podría ser, por ejemplo, un elastómero de polidimetilsiloxano (PDMS) moldeado.

En la Figura 1 B), el primer y segundo electrodos no están comprendidos en la microplaca pero pueden estar comprendidos, por ejemplo, en un dispositivo para hacer funcionar la microplaca.

Típicamente, una microplaca tiene un espesor en el intervalo de 0,5 mm-50 mm y, preferiblemente, en el intervalo de 2 mm-8 mm.

Típicamente, una microplaca tiene una longitud o diámetro en el intervalo de 10 mm-500 mm, preferiblemente en el intervalo de 40 mm-200 mm.

Típicamente, una microplaca tiene una anchura en el intervalo de 5 mm-200 mm, preferiblemente en el intervalo de 20 mm-100 mm.

La microplaca puede comprender sólo una única cámara de muestra o puede comprender múltiples cámaras de muestra.

Se describe un dispositivo para detectar una partícula biológica en una muestra gaseosa, comprendiendo el dispositivo:

- un sitio de microplaca en el que se va a localizar una microplaca para asociarse funcionalmente con el dispositivo,
- una interfaz eléctrica entre el dispositivo y la microplaca para aplicar un campo eléctrico alterno entre los electrodos de la cámara de muestra y
- una unidad programable que comprende un programa informático que hace que el dispositivo realice una o más acciones seleccionadas del grupo que consiste en:
  - proporcionar una muestra gaseosa en la cámara de muestra,
  - aplicar un primer potencial al primer electrodo y un segundo potencial al segundo electrodo, produciéndose por lo tanto una diferencia de potencial y un campo eléctrico entre el primer y segundo electrodos para contribuir a la recogida electrostática en la cámara de muestra de una partícula biológica presente en la muestra gaseosa,
  - poner en contacto la partícula biológica recogida con un primer reactivo líquido,
  - exponer una mezcla de reacción a un campo eléctrico alterno en dicha cámara de muestra, teniendo dicho campo eléctrico alterno una amplitud suficiente para extraer el material biológico de la partícula biológica,
  - realizar la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana,

medir la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o medir los productos resultantes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

La expresión “asociado funcionalmente” se refiere a que la microplaca está asociada con el dispositivo de modo que el dispositivo puede realizar una o más acciones que afectan a la microplaca.

## ES 2 330 347 T3

En una realización, la microplaca está funcionalmente asociada con el dispositivo cuando el dispositivo puede afectar al campo eléctrico del contenido de la cámara de muestra.

5 En una realización, la microplaca está funcionalmente asociada con el dispositivo cuando el dispositivo puede controlar el potencial de al menos un electrodo de la microplaca. Por ejemplo, el dispositivo puede estar asociado funcionalmente con la microplaca cuando el dispositivo puede controlar el potencial del primer electrodo y/o el segundo electrodo de la microplaca.

10 Estar funcionalmente asociado puede incluir además que la cámara de muestra de la microplaca esté en comunicación fluida con un medio de control de flujo.

En una realización, el dispositivo comprende el primer y segundo electrodos y cuando la microplaca está asociada funcionalmente el campo eléctrico entre el primer y segundo electrodos contribuye a recoger las partículas biológicas de la muestra gaseosa en la cámara de muestra. En esta realización, la microplaca no necesita comprender el primer y el segundo electrodos.

20 El dispositivo también puede comprender una primera cámara de reactivo para recibir y/o contener un primer reactivo líquido. Típicamente, la primera cámara de reactivo tiene al menos una abertura, que está en conexión fluida con la cámara de muestra cuando la microplaca está asociada funcionalmente con el dispositivo. Como alternativa, la al menos una abertura de la primera cámara de reactivo se pone en conexión fluida con la cámara de muestra, por ejemplo, usando el medio para controlar un flujo. La primera cámara de reactivo también puede cerrarse mediante una barrera desmontable durante el almacenamiento, retirándose dicha barrera de forma reversible o irreversible cuando se usa el dispositivo.

25 El dispositivo puede comprender además una fuente de energía eléctrica para suministrar energía, por ejemplo, al medio generador de flujo y/o a la unidad programable, el primer y segundo electrodos.

30 En una realización, la microplaca está asociada funcionalmente con el dispositivo mediante el sitio de microplaca. El sitio de microplaca puede comprender, por ejemplo, una interfaz de plástico que sirve como material de conexión y como juntas que aseguren uniones estrechas entre los puertos de microplaca y los puertos de dispositivo, eliminando fugas de aire y líquido. El sitio de microplaca puede comprender, por ejemplo, una superficie y/o un soporte para recibir la microplaca. Típicamente, el sitio de microplaca comprende al menos una almohadilla de contacto conductora. Preferiblemente, el sitio de microplaca comprende al menos una almohadilla de contacto conductora para proporcionar contacto eléctrico con el primer electrodo de la microplaca y una almohadilla de contacto conductora para proporcionar contacto eléctrico con el segundo electrodo de la microplaca. La unidad programable contiene instrucciones, preferiblemente legibles por ordenador, por ejemplo un programa informático, adaptadas para facilitar el control, la supervisión y/o la manipulación del dispositivo antes del funcionamiento, durante el funcionamiento y/o después del funcionamiento.

40 La unidad programable comprende preferiblemente al menos un ordenador que tiene uno o más programas de ordenador almacenados en el interior del medio de almacenamiento de datos asociado con el mismo, estando el sistema de ordenador adaptado para controlar el dispositivo. La unidad programable puede seleccionarse en el contexto de la presente invención a partir del grupo no exhaustivo de: un ordenador universal, un ordenador personal (PC), una unidad de control lógico programable (PLC), una unidad de control lógico programable implementada por software (soft-PLC), una unidad de control lógico programable implementada por hardware (hard-PLC), un ordenador personal industrial o un microprocesador especializado.

50 También se describe un producto de programa informático que se adapta para permitir un sistema informático que comprende al menos un ordenador que tiene un medio de almacenamiento de datos asociado con el mismo para controlar, supervisar y/o manipular el dispositivo antes del funcionamiento, durante el funcionamiento y/o después del funcionamiento. También se describe un medio legible por ordenador que tiene almacenado en el mismo un conjunto de rutinas para permitir a un sistema informático que comprende al menos un ordenador que tiene un medio de almacenamiento de datos asociado con el mismo controlar, supervisar y/o manipular el dispositivo antes del funcionamiento, durante el funcionamiento y/o después del funcionamiento.

55 La unidad programable para controlar, supervisar y/o manipular el dispositivo antes del funcionamiento, durante el funcionamiento y/o después del funcionamiento preferiblemente está adaptada para el funcionamiento en condiciones rigurosas tales como clima ártico, clima tropical y entorno de combate, en particular en zonas de combate que se hayan sometido a guerra atómica, biológica y/o química (guerra ABC). Preferiblemente, la unidad programable cumple con las especificaciones militares pertinentes para dichas unidades.

En una realización, la unidad programable que comprende el programa informático hace además que el dispositivo compruebe si la microplaca está asociada funcionalmente con el dispositivo.

65 La unidad programable que comprende el programa informático puede hacer además que el dispositivo realice una o más acciones, tales como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6 acciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- proporcionar una muestra gaseosa en la cámara de muestra,

## ES 2 330 347 T3

- aplicar un primer potencial al primer electrodo y un segundo potencial al segundo electrodo, produciéndose por lo tanto una diferencia de potencial y un campo eléctrico entre el primer y el segundo electrodos, para contribuir a la recogida electrostática en la cámara de muestra de una partícula biológica presente en la muestra gaseosa,

5

- poner en contacto la partícula biológica recogida con un primer reactivo líquido,

- exponer una mezcla de reacción a un campo eléctrico alterno en dicha cámara de muestra, teniendo dicho campo eléctrico alterno una amplitud suficiente para permitir la extracción de material biológico,

10

- realizar la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana

- medir la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o medir productos resultantes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

15

La unidad programable que comprende el programa informático puede hacer, por ejemplo, que el dispositivo proporcione una muestra gaseosa en la cámara de muestra por funcionamiento de un medio generador de flujo para proporcionar una muestra gaseosa.

20

La unidad programable que comprende el programa informático puede hacer, por ejemplo, que el dispositivo aplique un primer potencial al primer electrodo y un segundo potencial al segundo electrodo.

25

La unidad programable que comprende el programa informático puede hacer, por ejemplo, que el dispositivo ponga en contacto la partícula biológica recogida con un primer reactivo líquido por funcionamiento de un medio generador de flujo para proporcionar un reactivo líquido y/o funcionamiento del medio para controlar un flujo.

30

La unidad programable que comprende el programa informático puede hacer, por ejemplo, que el dispositivo exponga la mezcla de reacción a un campo eléctrico alterno en dicha cámara de muestra por medio de la modulación de los potenciales de al menos dos electrodos, por ejemplo, el primer y el segundo electrodos como se describe en este documento u otro conjunto de electrodos dedicados al campo eléctrico alterno.

35

La unidad programable que comprende el programa informático puede hacer, por ejemplo, que el dispositivo realice una amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana por funcionamiento de un electrodo de calentamiento como se describe en este documento.

40

La unidad programable que comprende el programa informático puede hacer, por ejemplo, que el dispositivo mida la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o mida los productos resultantes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana por funcionamiento de los electrodos de detección relacionados con una voltametría de pulso diferencial.

Preferiblemente, el dispositivo comprende además una interfaz eléctrica entre el dispositivo y la microplaca para aplicar un campo electrostático entre el primer y el segundo electrodos de la cámara de muestra.

45

El dispositivo puede medir además una señal de referencia, es decir, una señal de una muestra que comprende una muestra sin una partícula biológica o comprende una cantidad bien definida de una partícula biológica dada. La señal de referencia puede recuperarse, por ejemplo, de otra cámara lejana a la cámara de muestreo, por ejemplo, una cámara localizada en otra posición de la microplaca o una cámara localizada en otra microplaca.

50

El dispositivo puede comprender además una fuente de energía interna.

55

La fuente de energía interna puede comprender, por ejemplo, una pila. La cantidad de energía a utilizar durante una reacción de PCR puede estimarse como la cantidad de calor necesario para calentar un volumen de agua equivalente al de la muestra líquida entre las temperaturas mínima y máxima del ciclo de PCR. Esta diferencia de temperatura es de aproximadamente 50 K y, por lo tanto, el calor a transferir por ciclo es de aproximadamente 6 Julios para un volumen de muestra de 30  $\mu$ l. El procesamiento, por ejemplo, de 60 ciclos, el consumo de energía total para una reacción de PCR asciende a  $60 \times 6 = 360$  Julios. Usando un tiempo de aumento progresivo de la temperatura comparable a los termocicladores comerciales (es decir 2°C por segundo) la energía necesaria es de  $360 \times 2/50 = 14,4$  W.

60

El voltaje de la pila se considera el voltaje nominal de la pila, por ejemplo, 1,2V por celda para pilas de níquel-cadmio (NiCd) y níquel-hidruro metálico (NiMH) y 3,6V por celda para la mayoría de pilas de ion-litio (Li-ion). La capacidad de carga de la pila se proporciona típicamente en términos de miliAmp-horas (mAh) y se denomina la clasificación tipo C de la pila. Por ejemplo, una corriente de carga de 1C para una pila con una clasificación tipo C de 1200 mA-horas es de 1200 mA. Una pila puede considerarse ideal (es decir, con una capacidad de energía constante) cuando se agota con una corriente de carga por debajo de 0,1 C (Linden, D. 1984. Handbook of Batteries and Fuel Cells. Nueva York: McGraw-Hill). Por lo tanto, cuando se suministra una salida de energía de 14,4 W usando, por ejemplo, una pila que suministra 10,8V, la clasificación tipo C de esta pila debe estar en el intervalo de  $14,4/(10,8 \times 0,1) = 13300$  mAh para evitar un consumo de energía máximo que reducirá espectacularmente la capacidad de energía.

65

## ES 2 330 347 T3

Para permitir este consumo de energía y este suministro de energía, y para asegurar adicionalmente una portabilidad verdadera, se prefieren pilas recargables. En una realización preferida de la presente invención se seleccionan pilas recargables del grupo que consiste en pilas basadas en Níquel-Hidruro Metálico (NiMH) y pilas basadas en ion-Litio (Li-ion).

Además, la fuente de energía interna puede comprender un generador, por ejemplo, un generador portátil. Puede utilizarse un generador de energía portátil como fuente de energía externa. El generador de energía portátil puede recargarse a partir de, o simplemente consistir en un módulo solar, un cargador de pilas (por ejemplo, cargador de pila de CA o de batería de coche), un generador de combustión de combustible o similar.

Como alternativa, al dispositivo se le puede proporcionar energía a partir de una fuente de energía externa, por ejemplo, complementado con un dispositivo de reserva de pila.

En una realización, el dispositivo comprende además un medio generador de flujo, por ejemplo, para proporcionar una muestra gaseosa en la cámara de muestra de la microplaca y estar en conexión fluida con la segunda abertura de la cámara de muestra cuando la microplaca se inserta en el dispositivo.

El generador de flujo puede comprender una bomba, tal como una bomba de pistón, una bomba de membrana o una bomba de desplazamiento positivo.

En una realización, se selecciona una bomba capaz de suministrar un flujo de aire apropiado a través de la microplaca durante el muestreo (en el intervalo de 10 ml/min a 500 ml/min). Preferiblemente, la bomba debe seleccionarse de manera que cumpla uno o más de los siguientes criterios: pequeño tamaño, peso ligero, flujo sin pulsaciones, flujo reversible del medio por cambio de la polaridad del motor o volumen de flujo ajustable por control del voltaje. En una realización de la invención, el medio generador de flujo puede comprender un dispensador de chorro para generar pequeñas gotas de reactivo o un dispositivo de microdispensación similar.

En una realización, la muestra gaseosa puede proporcionarse mediante un flujo pasivo a través de la microplaca. Esto exigirá una diferencia de velocidad entre la microplaca y el aire circundante a muestrear. Las condiciones para que esto suceda se cumplen si la microplaca se desplaza a través del aire, por ejemplo, montada en un avión de tal modo que la primera abertura esté en conexión fluida con el aire circundante, de forma óptima opuesta a la dirección de vuelo. Como alternativa, las condiciones se dan si el aire se está moviendo alrededor de la microplaca que no tiene velocidad en comparación con el aire, por ejemplo, montada en un conducto de ventilación de aire.

En una realización, el dispositivo comprende además un medio para controlar, por ejemplo, un flujo a través de la cámara de muestra.

El flujo puede ser, por ejemplo, un flujo líquido y/o un flujo de gas.

Los medios para controlar un flujo comprenden típicamente una o más válvulas. Las válvulas pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en una válvula de retención, una válvula de dos vías, una válvula multiposición y una válvula de constricción.

La válvula puede ser, por ejemplo, una válvula microfabricada y, en una realización, la válvula está integrada en la microplaca.

En una realización, el primer reactivo líquido puede suministrarse usando la tecnología de microdispensación de chorro. Un cartucho de chorro que contiene uno o más compartimentos que comprenden el primer reactivo líquido o componentes separados del primer reactivo líquido se monta de tal modo que permite la microdispensación de líquidos en la cámara de reacción.

En otra realización más, el primer reactivo líquido o componentes separados del mismo se encapsulan en el interior de una envuelta sellada que está compuesta por un polímero de plástico. La envuelta de polímero de plástico está equipada con un electrodo de calentamiento incorporado, permitiendo la fusión del polímero de plástico mediante la aplicación de una corriente eléctrica apropiada y la posterior liberación del líquido encapsulado en la microplaca. En otra realización más, la liberación de líquido a partir de la envuelta polimérica de plástico sellada puede conseguirse por ruptura mecánica o física de la envuelta, por ejemplo, por perforación de la envuelta con un objeto afilado.

En una realización, el dispositivo puede equiparse con un dispositivo de visualización que permita una lectura visual de los resultados. El dispositivo puede estar en formato de una fuente emisora de luz (un LED, una bombilla o similar), una pantalla, una lectura digital o cualquier combinación de las mencionadas anteriormente. En otra realización más, la lectura puede comunicarse en forma de señales de audio.

En una realización preferida, el dispositivo comprende un componente que permite una comunicación sin cable. Son ejemplos de comunicación sin cable 802.11 Mobile Wireless LAN, celular, Bluetooth®, GPS, y Banda Ultra Ancha. La comunicación puede ser de sentido único, por ejemplo, transporte de datos desde el dispositivo o transporte de datos hasta el dispositivo, o la comunicación puede ser la combinación, es decir, de doble sentido. La comunicación establecida puede ampliarse adicionalmente a comunicación interdispositivo, es decir, el establecimiento de una red

## ES 2 330 347 T3

ad-hoc que permita a un dispositivo desencadenar el inicio del muestreo de otro dispositivo facilitando de este modo la supervisión, por ejemplo, de la progresión de una nube de aerosol.

En una realización preferida, el dispositivo es un dispositivo de bajo peso y/o portátil.

En una realización, el dispositivo pesa 10 kg como máximo, tal como 8 kg, 6 kg, 4 kg, 3 kg o 2 kg como máximo, tal como 1 kg como máximo. Puede incluso preferirse que el dispositivo pese 800 g como máximo, tal como 600 g, 500 g, 400 g, 300 g, 200 g, 150 g, 100 g, 80 g, 60 g, 50 g, 40 g, 30 g, 20 g, 10 g o 5 g como máximo, tal como 1 g como máximo.

Típicamente, el dispositivo tiene un peso total en el intervalo de 20 g-1 kg, tal como de 20 g-50 g, 50 g-100 g, 100 g-250 g, 250 g-500 g o 500 g-1000 g.

Se describe un sistema para detectar una partícula biológica en una muestra gaseosa, comprendiendo el sistema una microplaca como se define en este documento asociada funcionalmente con un dispositivo como se define en este documento.

En una realización, la microplaca y el dispositivo del sistema están integrados y se supone que no deben separarse físicamente entre sí. En una realización de la invención, la microplaca y el dispositivo del sistema están integrados de modo que no pueden separarse físicamente el uno del otro sin dañar la microplaca o el dispositivo.

En una realización importante, el sistema es un sistema desechable, por ejemplo, destinado a usarse sólo una vez.

En otra realización importante, la microplaca del sistema es desechable pero se supone que el dispositivo debe reutilizarse.

Un aspecto especial se refiere a un dispositivo que tiene como objetivo supervisar enfermedades infecciosas de transmisión aérea y está optimizado para supervisar bajas concentraciones de aerosol, con implicaciones directas para vigilancia de epidemias. El dispositivo consiste en tres tecnologías integradas alojadas en el mismo recipiente (volumen que varía de 10 nl a 10 ml) que permiten el muestreo de bioaerosoles y la preparación de muestras para extracción de material genético con amplificación posterior de ADN o ADNc. El recipiente se suministra mediante una entrada y salida común para aire y líquido. Inicialmente, el aire pasa a través del recipiente en una corriente que se origina por sobrepresión en la entrada o vacío en la salida. El recipiente está equipado con electrodos que facilitan la precipitación electrostática. Los electrodos típicamente están formados como dos láminas opuestas entre las que pasa el aire. Sin embargo pueden usarse otras configuraciones, por ejemplo, un solo electrodo de lámina combinado con un solo o un conjunto de electrodos puntuales para dirigir las partículas muestreadas a un punto dado en el recipiente. El campo eléctrico entre los electrodos medido en la distancia más corta está por debajo de 1000 V/mm para prevenir la formación de chispas eléctricas. Las biopartículas que llevan una carga natural se capturan en el campo electrostático, su desplazamiento a través del recipiente se interrumpe y se dirigen hacia los electrodos donde precipitan. El mecanismo de captura es eficaz y se consigue fácilmente una eficacia de captura del 80% o mayor. El tiempo para la precipitación electrostática se ajusta fácilmente mediante un equipo externo que controla el voltaje sobre los electrodos de superficie. La precipitación se detiene cuando se apaga el voltaje. Una vez que se ha procesado un volumen deseado de aire a través del recipiente, el bombeo de aire puede interrumpirse y el recipiente puede cargarse con un líquido que contenga los reactivos para amplificación de ADN/ADNc.

Las biopartículas recogidas y concentradas pueden exponerse ahora para la preparación de muestra. Se ha demostrado que endosporas de bacterias Gram-positivas, que se sabe que son extremadamente resistentes a la degradación mecánica, química y térmica, liberan ADN cromosómico y plasmídico cuando se exponen a un campo eléctrico oscilante a través del recipiente. La liberación de ADN se produce en unos pocos segundos si la frecuencia es superior a 10 kHz y se consigue una liberación máxima alrededor de 100 kHz. El efecto del campo oscilante es la destrucción de la integridad de las esporas por rotura directa de la membrana, formación de poros en la pared de la endospora o hinchamiento osmótico súbito debido a degradación bioquímica de la espora con activación concomitante de cationes divalentes tamponados de otro modo como  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ . La pared de la endospora de las bacterias Gram-positivas es la estructura de inclusión más estable encontrada en bacterias, virus y hongos, protegiendo al organismo y permitiendo que resida latente en condiciones rigurosas extremas durante décadas. Por lo tanto, la tecnología de preparación de muestras que utiliza un campo eléctrico oscilante es eficaz en la liberación de material genético a partir de células bacterianas y esporas. El campo oscilante puede inducirse mediante los mismos electrodos usados para precipitación electrostática.

Después de la preparación de la muestra eléctrica inicial, la muestra se expone a ciclos de calentamiento y refrigeración calentando rápidamente la muestra a una temperatura de desnaturalización y refrigerándola posteriormente. La temperatura de ciclado media la degradación adicional de células, esporas y especialmente virus que no se ven afectados por el campo eléctrico oscilante y libera material genético. Los virus son generalmente material genético embebido en estructuras proteicas que se desnaturalizan rápidamente a mayores temperaturas. Las oscilaciones rápidas de temperatura (velocidades de calentamiento  $> 40^{\circ}C/segundo$  y velocidades de refrigeración  $> 15^{\circ}C/segundo$ ) se facilitan al diseñar el recipiente para un intercambio óptimo de calor. El diseño térmico se basa en la relación entre las constantes de tiempo térmico total de los materiales en comparación con la constante de tiempo térmico del agua en el recipiente. La capacidad térmica total de los materiales circundantes del recipiente y el acoplamiento de estos

## ES 2 330 347 T3

materiales entre sí y con un recipiente térmico montado externamente son factores importantes para permitir las oscilaciones rápidas de temperatura. El calor se suministra a través de una película fina conductora de, por ejemplo, Au o Pt tanto en la parte superior como en la parte inferior del recipiente y es importante que el líquido forme una lámina plana entre los calentadores para conseguir un rápido calentamiento y refrigeración.

5 La película fina se calienta por paso de corriente a través del material conductor. La temperatura se controla por supervisión de un dispositivo termodetector de puente de Wheatstone de cuatro cables que permite que se ajuste la temperatura en el interior del recipiente con una exactitud de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Las oscilaciones de la temperatura facilitan adicionalmente la amplificación de ADN o ADNc si están presentes las condiciones bioquímicas apropiadas dentro del recipiente.

El dispositivo representa una combinación única y novedosa de metodologías que permiten un muestreo, una preparación de muestra y una amplificación de molécula sencilla de ADN o ADNc rápidos e integrados en un dispositivo.

15 El término “fluido”, como se usa en este documento, se refiere a cualquier fluido, incluyendo aire, un gas o un líquido incluyendo agua y una solución acuosa.

Un aspecto especial se refiere a un dispositivo a escala microscópica para recoger partículas biológicas, extraer material genético y realizar reacciones bioquímicas dependientes de la temperatura que comprende;

20 una cámara de reacción que tiene una abertura de entrada que proporciona una capacidad de flujo de gas entre el aire a muestrear y la cámara de reacción, y una abertura de salida que proporciona una capacidad de flujo de gas entre la cámara de reacción y el exterior de la cámara de reacción, estando la entrada o salida conectadas a un medio productor de flujo de aire para extraer la muestra gaseosa a través de la cámara de reacción desde la abertura de entrada hasta la abertura de salida; teniendo dicha cámara de reacción una capacidad para introducir disolventes definidos bioquímicamente en la cámara, una capacidad para retirar los productos de la reacción bioquímica dependiente de la temperatura de la cámara y una capacidad para un control muy rápido y exacto de la temperatura de la cámara de reacción, y un componente de recogida y electrolización dispuesto en el interior de la cámara de reacción entre la abertura de entrada y la abertura de salida, consistiendo dicho componente de recogida y electrolización en dos o más electrodos situados en paralelo y que tienen las superficies o al menos una parte de las superficies recubiertas con o constituidas por un material capaz de conducir una corriente eléctrica.

35 En una realización especial, los electrodos paralelos permiten la generación de un campo eléctrico en un ángulo o perpendicular al flujo de aire que pasa a través del dispositivo, facilitando que las partículas presentes en el aire muestreado se carguen electrostáticamente y por lo tanto se capturen adhiriéndose al electrodo cargado positivamente o negativamente.

40 En una realización especial, los electrodos aplican un campo electrolizante alterno de alta frecuencia a dichas partículas biológicas capturadas después de la introducción de dichos disolventes definidos bioquímicamente.

En una realización especial, los disolventes comprenden reactivos que permiten realizar una reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

45 En una realización especial, los disolventes comprenden reactivos que permiten realizar una reacción en cadena de la ligasa o LCR.

En una realización especial, los disolventes comprenden reactivos que permiten realizar una amplificación basada en la transcripción.

50 En una realización especial, los disolventes comprenden reactivos que permiten realizar una amplificación basada en restricción.

55 En una realización especial, la cámara de reacción está adaptada para contener en el intervalo de aproximadamente  $0,1 \mu\text{l}$  a  $500 \mu\text{l}$  de fluido.

En una realización especial, la cámara de reacción está adaptada para contener en el intervalo de aproximadamente  $1,0 \mu\text{l}$  a  $5 \mu\text{l}$  de fluido.

60 En una realización especial, la cámara de reacción tiene aproximadamente las dimensiones de  $4,5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 300 \mu\text{m}$  o es proporcionalmente menor.

En una realización especial, el dispositivo es reutilizable y se fabrica a partir del grupo de materiales que consisten en polímeros, sílice, vidrio, metales y materiales cerámicos.

65 En una realización especial, el dispositivo es desechable y se fabrica a partir del grupo de materiales que consisten en polímeros, sílice, vidrio, metales y materiales cerámicos.

## ES 2 330 347 T3

En una realización especial, los electrodos comprenden al menos un electrodo de placa para conducir una corriente eléctrica generando de este modo un campo electrostático.

5 En una realización especial, el electrodo comprende al menos un electrodo lineal para conducir una corriente eléctrica generando de este modo un campo electrostático.

10 En una realización especial, la distancia entre los electrodos en un ángulo o perpendicular al flujo de aire a través del dispositivo es de entre 0,01 mm y 4 mm. En una realización especial de la invención, el campo electrostático aplicado entre los electrodos está comprendido entre 100 V/mm y 1600 V/mm.

15 En una realización especial, el procedimiento comprende además realizar una lisis celular inducida por la aplicación de campos eléctricos alternos de alta frecuencia.

En una realización especial, la corriente alterna se aplica a frecuencias comprendidas entre 8000 y 200.000 Hz.

20 En una realización especial, las secuencias de pulsos aplicados están comprendidas entre 1 segundo y 60 segundos.

En una realización especial, el dispositivo comprende además un medio de transmisión para notificar los resultados de dicha reacción bioquímica.

25 En una realización especial, el medio de transmisión es mediante conexión por cable, mediante enlace de radio, mediante transmisión por infrarrojo, mediante transmisión por microondas, mediante teléfono móvil, mediante módulo GSM o mediante red informática.

Otro aspecto especial se refiere a un sistema de supervisión microbiana que comprende dispositivos como se describe en este documento, en los que dicho sistema de supervisión microbiana comprende una red de dispositivos separados.

30 En una realización especial, la red de supervisión es una red integrada.

En una realización especial, la localización de un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo en la red, se determina por medio de un sistema de posicionamiento global.

35 En una realización especial de la invención, los procedimientos constituyen un ensayo de detección o diagnóstico.

En una realización especial, de la invención, el ensayo de detección comprende un temporizador variable o programable que determina la frecuencia de ensayos de detección.

40 Debe señalarse que, de acuerdo con la presente invención, las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a los otros aspectos de la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

45 *Realización ejemplar de la preparación de una microplaca*

El diseño incorpora un recipiente o cámara de reacción que tiene dimensiones que son (o que se varían a escala proporcionalmente a) 4,5 mm x 1 mm x 300  $\mu$ m. La estructura de dispositivo propuesta sigue los esquemas esenciales del diseño de concepto descrito.

50 Una base de sustrato de silicio se recubre con una capa resistiva térmicamente para definir las propiedades térmicas del dispositivo. Posteriormente, se deposita y se realiza un patrón en una capa calentadora resistiva con baja resistencia, pistas de salida y almohadillas de contacto. El calentador tiene un patrón uniforme para calentar la base del canal. A continuación se deposita una capa dieléctrica para aislar el calentador de las capas posteriores. Después se deposita una película de platino y se crea un patrón para proporcionar detectores de temperatura y electrodos. Los detectores de temperatura se aíslan después selectivamente de la muestra. La fabricación de oblea de silicio se completa por el procesamiento de cualquiera de las capas que son necesarias para la unión y sellado en la formación de canal/unión de tapa.

60 La tapa está hecha de vidrio para proporcionar un aislamiento térmico intrínseco. se deposita una película de electrodo de platino y se crea un patrón. Si es necesario puede aislarse o puede tener detectores de temperatura estampados en la misma. Las etapas de estampado son esencialmente un subconjunto de las usadas en la fabricación de oblea de silicio. Después se forman en la tapa puertos de acceso de fluido, son posibles una variedad de procesos pero podría realizarse esencialmente por fabricación a máquina convencional. Los componentes de la superficie de contacto de fluido tales como los ajustes Luer se unen a estos puertos en una fase conveniente en el proceso de montaje.

## ES 2 330 347 T3

El canal se define por grabado en la placa antes de la formación del electrodo de platino. Esto se puede conseguir fácilmente sólo si los electrodos en la tapa son de una geometría relativamente basta que permite la fabricación trivial de patrones. Como alternativa, la etapa continúa siendo un componente plano y el canal se forma en una capa “separadora” de 300  $\mu\text{m}$  de espesor que se une tanto a la base de silicio como a la tapa de vidrio.

5

### *Procesamiento de capas paso a paso*

En esta subsección se define la secuencia de capas usadas para construir el dispositivo. Se describe el papel o papeles funcionales de la capa en el dispositivo y se proporcionan varias alternativas de cómo obtener el dispositivo y la lista de ventajas/desventajas de las selecciones.

10

Etapa 1, véase la Figura 2

Sustrato de silicio. Ésta es una oblea de silicio del orden de 500  $\mu\text{m}$  de espesor. Es preferible una oblea pulida de doble cara ya que facilita el contacto térmico con la cara posterior de la cámara de reacción. Si puede conseguirse un aislamiento térmico lateral mediante un proceso de RIE profunda de superficie posterior, entonces el espesor de la oblea debería especificarse de una forma razonablemente precisa o debería variarse la profundidad del grabado para compensar las variaciones de espesor de la oblea. Dichas obleas se pueden adquirir fácilmente en un amplio número de fuentes.

20

Etapa 2, véase la Figura 3

Capa de aislamiento térmico. Esta capa se deposita sobre la superficie superior del silicio para controlar la velocidad de pérdida de calor hacia el disipador térmico y por lo tanto la energía necesaria tanto para mantener la temperatura como para calentar la muestra. Para los tiempos de ciclo de PCR y niveles de energía necesarios será necesaria una capa de poliimida del orden de 20  $\mu\text{m}$  de espesor. Están disponibles para el uso diversas clases de poliimida, siendo el BCB (benzociclobuteno) un material dieléctrico polimérico alternativo.

25

Etapa 3, véase la Figura 4

30

Capa calentadora. Esta capa está formada por un material convenientemente resistivo. En la energía máxima de modelo térmico, se indica una disipación en el calentador del orden de 4 W. La resistencia que requiere depende del voltaje y corriente de excitación deseados. Se consideran razonables corrientes del orden de 100 mA a 1 A, variando los voltajes de forma correspondiente de 40 V a 4 V. La resistencia requerida está entonces en el intervalo de 400  $\Omega$  hasta 4  $\Omega$ . La geometría del resistor térmico puede seguir convenientemente de forma estrecha la de la cámara de reacción, que es una simple placa rectangular que cubre la base completa. Por lo tanto, el resistor es de aproximadamente 4,5 cuadrados de longitud indicando una resistividad de película en el intervalo aproximado de 1-100  $\Omega/\text{m}$ . Esta resistividad puede conseguirse fácilmente con un proceso de película fina. Puede depositarse un resistor de NiCr por metalizado por bombardeo o evaporación y puede crearse un diseño por grabado en húmedo. Se pueden adquirir fácilmente procesos de resistor de NiCr que cumplen los requisitos.

35

40

Etapa 4, véase la Figura 5

Capa de contacto 1. Esta capa se deposita inmediatamente después de la deposición del NiCr y sirve para definir los contactos con el resistor de NiCr. Típicamente, esta capa será una capa fina de oro. Se define mediante grabado en húmedo. De forma manifiesta, el patrón es tal que siempre hay NiCr debajo del oro, pero puede no haber oro sobre el NiCr. La secuencia típica es una máscara fotolitográfica para definir una pseudocapa de “oro o NiCr”, grabar el oro y después el NiCr, volver a cubrir para definir la capa de “oro” y volver a grabar el oro. (Parece que esencialmente no se produce ningún ataque sobre la película de NiCr por agentes de grabado de oro basados en yodo). Se pueden adquirir fácilmente procesos adecuados.

50

Etapa 5, véase la Figura 6

Aislamiento eléctrico 1. Esta capa sirve para aislar eléctricamente la capa calentadora de las capas conductoras posteriores. El material más probable para usar es un óxido de PECVD. Las vías/aberturas de contacto necesarias pueden estamparse creando un patrón en el óxido usando un proceso de grabado por iones reactivos convencional. Se pueden adquirir fácilmente tanto el PECVD como los procesos de RIE.

55

Etapa 6, véase la Figura 7

60

Platino 1. Esta capa sirve para formar las dos estructuras serpenteantes usadas como detectores de temperatura y para formar electrodos usados en los procesos de captura de esporas y de detección de ADN. Se prevé que la película se estampe por fotolitografía por levantamiento de resina (lift-off) y se deposite por deposición de haz de electrones. En su lugar, es posible usar deposición por metalizado por bombardeo y retrograbado por metalizado por bombardeo o grabado por iones reactivos. Sin embargo, probablemente la vía de levantamiento de la resina será la que se pueda adquirir más fácilmente.

65

## ES 2 330 347 T3

Etapa 7, véase la Figura 8

Contacto 2. Puede ser necesario un segundo material de capa de contacto para facilitar la unión de cables a las películas de platino.

Etapa 8, véase la Figura 9

Aislamiento eléctrico 2. Esta capa sirve para aislar los detectores de temperatura de la muestra. Se prevé un óxido de PECVD depositado y estampado esencialmente como en la etapa 5.

Etapa 9, véase la Figura 10

Planarización 1. Si la unión de la tapa requiere una superficie especialmente plana entonces puede ser necesario depositar una capa global que pueda pulirse hasta un alto grado de llanura, antes de retirarla de todas partes excepto de la región de unión de la tapa. Dichos procesos de planarización son cada vez más comunes y son los más eficaces. Por ejemplo, el cristal líquido en la industria de pantallas de silicio usa procesos de este tipo para permitir que se formen superficies de espejo de calidad óptica sobre una topografía de circuito integrado densa.

Etapa 10, véase la Figura 11 y la Figura 12

Para la finalización en esta fase se muestra un separador de “marco de imagen” y la tapa del dispositivo. Se analizan a continuación. Se asume que la etapa tiene una capa de platino global o una capa de titanio-oro. El corte de muesca fuera en la pared lateral del marco es para permitir que se ponga en contacto la película de platino en la tapa con el sustrato de silicio principal. Esto se consigue usando un material conductor inyectado, tal como un epoxi cargado.

El dispositivo final se muestra en la Figura 13.

### *Otra información de proceso*

#### *Fabricación de cubierta de vidrio*

Se prefiere una cubierta de vidrio puesto que ofrece una barrera térmica eficaz en un material demostrado. Se introduce una ligera complejidad por la necesidad de definir una estructura de platino en esta tapa, y por los puertos de fluido, pero esto no está fuera de lo normal.

Una decisión de diseño clave es si se incluye algún detector de temperatura y calentamiento en la cubierta. Si se incluyen entonces el flujo de proceso es más complicado.

Podría producirse una cubierta sencilla que tenga sólo un electrodo de platino expuesto usado para captura de esporas mediante metalizado por bombardeo simple o evaporación de haces de electrones de platino sobre el sustrato de vidrio completo. Si se incorporan calentadores y detectores de temperatura entonces se usaría un flujo de proceso seleccionado de las etapas 3-9 del proceso de silicio de base. Puede haber ligeras variaciones en los detalles de las etapas del flujo para adaptarse al vidrio en oposición al sustrato de silicio.

Una vez que se fabrican las películas finas, los puertos de fluido se fabricarían a máquina a través del vidrio. Están disponibles diversos medios para esto, por ejemplo, usando una máquina de micropulido con un eje de alta velocidad. Otras vías incluyen erosión por chispas, pulido ultrasónico y limpieza mediante aspersión de arena.

#### *Formación de canales y ensamblaje de dispositivo*

El canal se forma usando una capa separadora unida tanto al silicio como al vidrio. Son posibles muchas vías para formar y unir esta capa. Las vías preferidas son películas adhesivas y PDMS activado o simplemente fijado. Las alternativas para la formación de canales son las siguientes:

##### *A. Unión adhesiva*

Al nivel más simple posible puede ser posible definir el canal mediante troquel o láser, por corte en una película adhesiva de 300  $\mu\text{m}$  de espesor. Dichos adhesivos se usan ampliamente en el mercado público de dispositivos de ensayo médicos. Sin embargo, puede haber preocupaciones sobre la fiabilidad a largo plazo para la solicitud actual. El uso de cinta adhesiva sería posible si el dispositivo se usara como desechable.

##### *Moldeo de PDMS y unión asistida por plasma*

En este proceso se moldea una junta en goma de silicona. Dichas piezas moldeadas se producen fácilmente en cantidades moderadas, produciéndose de forma económica prototipos. El proceso de moldeo permite la retención de detalles muy finos. El proceso de unión de goma de silicona a vidrio por activación con plasma de oxígeno de la silicona está bien establecido en muchos grupos. Forma fácilmente uniones duraderas que tienen alta resistencia de unión: típicamente el material de goma de silicona falla por rotura, antes de que falle la unión al vidrio. Puesto que la

## ES 2 330 347 T3

fabricación de silicio finaliza con una capa de óxido de PECVD, puede usarse una junta de PDMS para unir los dos componentes y formar el precinto.

5 Si el envase y el dispositivo se diseñan juntos entonces puede resultar atractivo usar un precinto fijado. Lo más probable es que éste sea de PDMS. Esto podría ser un corte por láser o troquel a partir de una lámina moldeada con precisión hasta un espesor marginalmente en exceso de los 300  $\mu\text{m}$  deseados. Se usarían separadores de precisión en el ensamblaje para limitar la compresión del precinto y por lo tanto limitar la excursión lateral en la compresión.

### 10 B. Unión por fusión vidrio-vidrio

Es posible la unión por fusión de componentes de vidrio siempre que ambas superficies sean muy planas y estén limpias. La salvedad principal de esta vía es que las temperaturas necesarias pueden resultar ser demasiado elevadas para permitir el uso de cualquier material polimérico en el dispositivo.

### 15 C. Soldadura en frío

Una posibilidad interesante es formar un marco que defina los canales en vidrio fino o quizás definir el canal por grabado en la tapa. Después se deposita una metalización de película fina y se crea un patrón para definir el área de sellado y se electrodeposita una capa de indio. Esta capa es del orden de 25  $\mu\text{m}$  de espesor, depositándose una capa similar sobre la región de sellado de los otros componentes. Para ensamblar los componentes, el indio se limpia para eliminar el óxido superficial, típicamente con HCl diluido, y después se aclara con disolventes. Después se ponen en contacto las dos superficies de indio limpias e inmediatamente se sueldan en frío entre sí.

### 25 Ejemplo 2

#### *Procedimiento de determinación de la eficacia de captura*

#### *Preparación de partículas biológicas estandarizadas*

30 Se resuspenden cien mg de Biobit *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* que contienen aproximadamente  $10^9$  esporas/g (Valent BioSciences Corp, Libertyville, Estados Unidos) en 1 ml de agua desmineralizada y se centrifugan durante 90 s a 12000 rpm. Se desecha el sobrenadante. Este procedimiento se repite cuatro veces. Antes de la última resuspensión, se retira una muestra para la determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. El tubo se deja para desecación, por ejemplo, al vacío hasta que se seque.

40 Se siembran diluciones seriadas en placas de agar-LB (sustrato de Luria Bertani; 10,0 g de triptona, 5,0 g de extracto de levadura, 10,0 g de NaCl, 15,0 g de agar resuspendido en 1,0 litros de H<sub>2</sub>O - pH = 7,0, esterilizado en autoclave), se incuban a 30°C durante una noche y se inspeccionan para determinar las colonias a simple vista. El número de UFC permite la determinación de esporas en el polvo.

#### *Medición de la eficacia de captura*

45 Las esporas de *Bacillus thuringiensis* lavadas y secadas se formulan en aerosol en una cámara de aerosol apropiada dando como resultado una concentración de esporas aproximada de  $10^4$ - $10^5$  esporas por litro. La microplaca/cámara de muestreo para la que se va a determinar la eficacia de captura está conectada al dispositivo, estando por lo tanto asociada funcionalmente. Entonces, la microplaca/cámara de muestreo se conecta a la cámara de aerosol y se aspira el aerosol a través de la cámara de muestra de la microplaca con un flujo de gas de aproximadamente 50 ml/minuto. Un contador de partículas (por ejemplo, analizador modelo 3321 de TSI Inc., 500 Cardigan Road, Shoreview, MN 55126-3996, Estados Unidos) se conecta a la salida de la microplaca y cuenta el número de esporas en el intervalo de tamaños de 1-10  $\mu\text{m}$  que abandonan la microplaca.

55 Primero se mide el número de esporas en 25 ml de aerosol por aspiración del aerosol mientras se ajustan los potenciales del primer y segundo electrodos a tierra. El número de esporas medido se usa como el valor de control,  $N_c$ .

Después, se aplican los potenciales seleccionados al primer y al segundo electrodo, se aspiran otros 25 ml de aerosol a través de la microplaca y se mide el número de esporas que salen de la microplaca durante la aspiración. Este valor se denomina  $N_s$ .

60 La eficacia de captura de la microplaca/cámara de muestreo a los potenciales seleccionados se calcula como  $(N_c - N_s)/N_c * 100\%$ .

65

## ES 2 330 347 T3

### Ejemplo 3

#### *Determinación del porcentaje de liberación de ADN/ARN*

5 Se resuspenden cien mg de Biobit *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki que contiene aproximadamente  $10^9$  UFC/g (Valent BioSciences Corp, Libertyville, USA) en 1 ml de agua desmineralizada y posteriormente se pasteurizan a  $70^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, y posteriormente la solución se centrifuga ( $5000 \times g$ , 5 minutos). Se desecha el sobrenadante. Este procedimiento (Tindalización) se repite dos veces más. La solución final de 1 ml contiene aproximadamente  $10^8$  esporas.

10 Esta solución se diluye hasta una concentración final de  $10^5$  esporas/ml, constituyendo de esta manera la solución madre.

15 La cámara de muestra se llena con una muestra de solución madre y la muestra se expone a un campo eléctrico alterno que tiene una frecuencia, amplitud y duración seleccionadas.

20 Para determinar el porcentaje de liberación de ADN/ARN de las células biológicas de la muestra, tanto la muestra expuesta como un control que contiene solución madre se tratan con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). DAPI se usa ampliamente como un tinte de ADN que forma un complejo fluorescente cuando se une a secuencias ricas en A-T en el surco menor del ADNbc. La solución de tinción es una solución acuosa que contiene DAPI a  $2,0 \mu\text{g/ml}$ .

25 La cámara de muestra se eluye con un volumen de solución de tinción cuyo volumen es tres veces el volumen de la cámara de muestra. El eluyente de la cámara de muestra se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Un volumen de control comparable al volumen de la muestra expuesta se tiñe por separado durante 5 minutos con un volumen de solución de tinción que es aproximadamente tres veces el volumen de control.

30 Después se visualizan un volumen apropiado del control y un volumen apropiado de la muestra expuesta en microscopia de contraste de fases y microscopia de fluorescencia (suministrada con un filtro DAPI). Tanto para el control como para la muestra expuesta, el número de esporas se cuenta mediante microscopía de contraste de fase y el número de esporas que presentan una liberación de moléculas de ADN cromosómico (visibles como manchas azules) se cuenta mediante microscopia de fluorescencia. Después se determina el porcentaje de liberación de ADN/ARN como

35 
$$\frac{d_s}{s_s} \cdot 100\%$$

donde  $d_s$  es el número contado de manchas de ADN azules y  $s_s$  es el número total de esporas.

40 También puede determinarse el porcentaje de liberación de ADN/ARN de fondo para el control y si muestra una liberación de fondo de más del 5%, se sugiere que la determinación se considere inválida y que se repita en una nueva solución madre de células biológicas.

#### 45 **Bibliografía**

Patente de Estados Unidos 5.723.591

50 Documento WO 03/074,731

Documento EP 1 481 083

55 **O'Brien et al O'Brien D, Baron P, Willeke K. (1986)** Size and concentration measurement of an industrial aerosol. *Am Ind Hyg Assoc J.* 47:386-92

**Linden, D. Linden, David. (1984).** *Handbook of Batteries and Fuel Cells.* New York: McGraw-Hill

#### 60 **Referencias citadas en la descripción**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

65

**Documentos de patente citados en la descripción**

- US 5674742 A
- US 4683195 A
- 5 • US 6586253 B
- US 4800159 A
- US 6673621 B
- US 4965188 A
- WO 0026405 A
- WO 03074731 A
- 10 • US 6511831 B
- EP 1481083 A

**Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción**

- 15 • **O'Brien D; Baron P; Willeke K.** Size and concentration measurement of an industrial aerosol. *Am Ind Hyg Assoc J.*, 1986, vol. 47, 386-92 [0277]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar una partícula biológica en una muestra gaseosa, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 10 a) proporcionar una cámara de muestra y un primer y segundo electrodos, estando el primer y el segundo electrodos y la cámara de muestra situados de modo que al menos una parte de la cámara de muestra esté entre el primer y el segundo electrodos, siendo la distancia entre el primer y el segundo electrodos de 20 mm como máximo,
  - 15 b) proporcionar una muestra gaseosa en la cámara de muestra,
  - c) aplicar un primer potencial al primer electrodo y un segundo potencial al segundo electrodo, produciéndose por lo tanto una diferencia de potencial y un campo eléctrico entre el primer y el segundo electrodos para contribuir a la recogida electrostática en la cámara de muestra de una partícula biológica de la muestra gaseosa,
  - 20 d) poner en contacto la partícula biológica recogida con un primer reactivo líquido, obteniendo de este modo una mezcla de reacción,
  - 25 e) exponer dicha mezcla de reacción a un campo eléctrico alterno en dicha cámara de muestra, teniendo dicho campo eléctrico alterno una amplitud suficiente para permitir la extracción de material biológico de la partícula biológica,
  - 30 f) realizar la amplificación de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico diana, y
  - g) medir la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o de los productos resultantes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y, opcionalmente, inferir que la partícula biológica se ha detectado en la muestra si al menos está presente una copia de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada y/o si está presente al menos un producto resultante de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.
- 35 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer y el segundo electrodos se sitúan en lados opuestos de la cámara de muestra.
3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que primer reactivo líquido comprende uno o más reactivos necesarios para realizar una amplificación de ácido nucleico.
- 40 4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer reactivo líquido comprende uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en un cebador, un nucleótido trifosfato y una polimerasa.
- 45 5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el primer reactivo líquido comprende además una oligosonda de ácido nucleico degradable por exonucleasa 5'-3', dando como resultado la degradación de dicha sonda de ácido nucleico la liberación de un componente redox activo.
- 50 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el componente redox activo es un metaloceno tal como, por ejemplo, ferroceno.
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la amplificación de ácido nucleico de la etapa f) se realiza usando una técnica de amplificación seleccionada del grupo que consiste en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación por círculo rodante mediada por ligación (L-RCA) y sus combinaciones/modificaciones.
- 55 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la amplificación de ácido nucleico de la etapa f) es PCR.
- 60 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la amplificación de ácido nucleico de la etapa f) es PCR anidada, preferiblemente PCR anidada en un solo tubo.
10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la medición de la etapa g) comprende una medición voltamétrica.
- 65 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la medición voltamétrica se realiza usando voltametría pulsátil diferencial u otro medio de resta de señal de referencia para aumentar la relación entre la señal y las interferencias.

## ES 2 330 347 T3

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que la medición voltamétrica se realiza usando electrodos de detección situados en la cámara de muestra.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

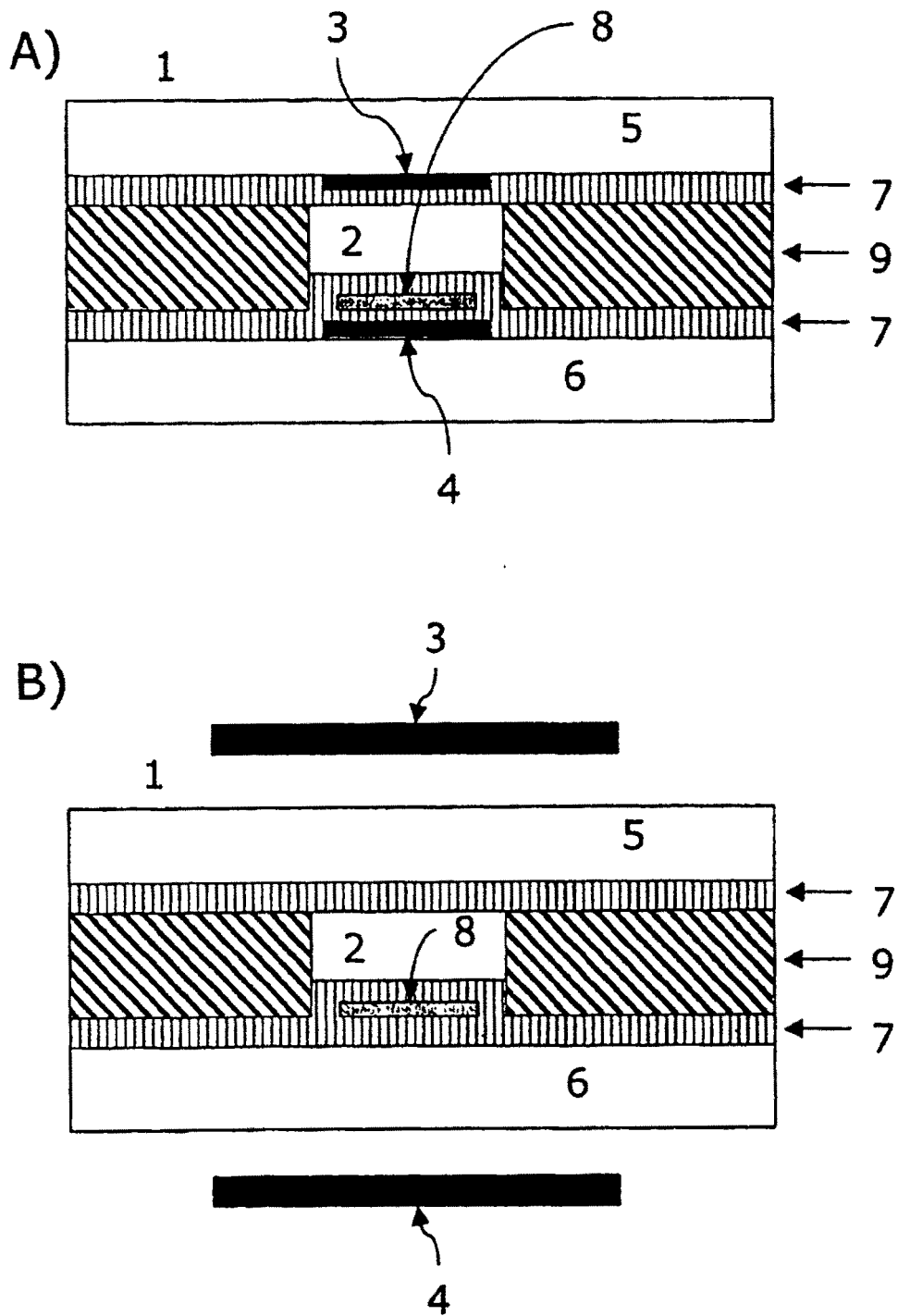


Figura 2

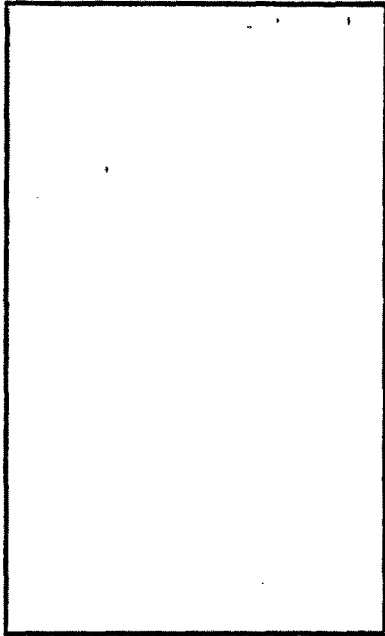


Figura 3

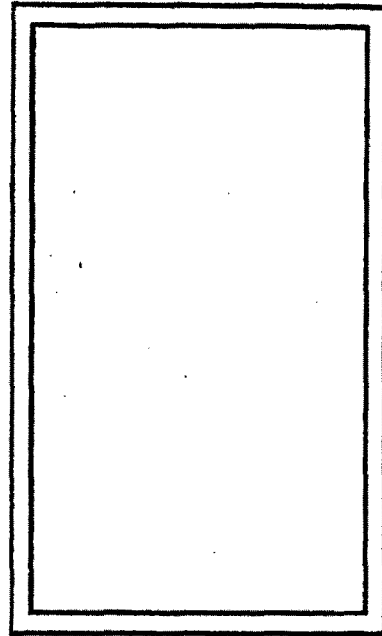


Figura 4

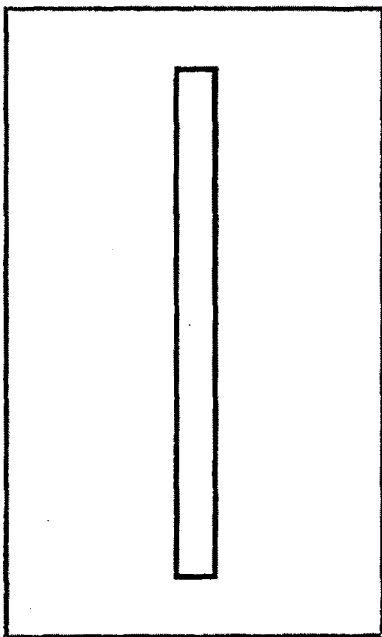


Figura 5

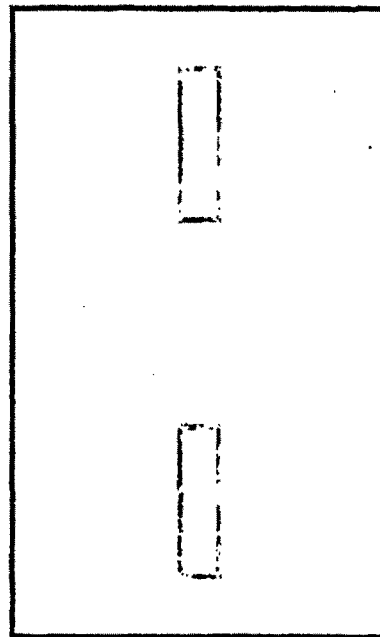


Figura 6

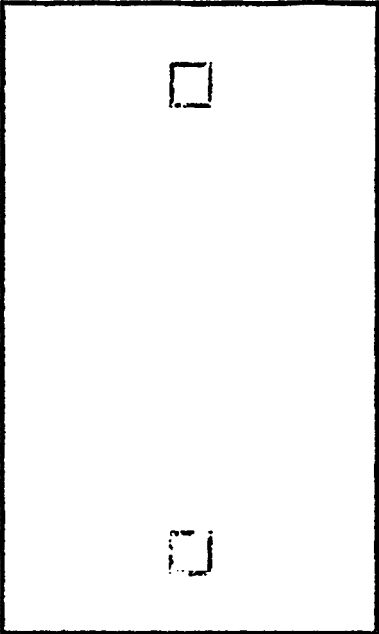


Figura 7

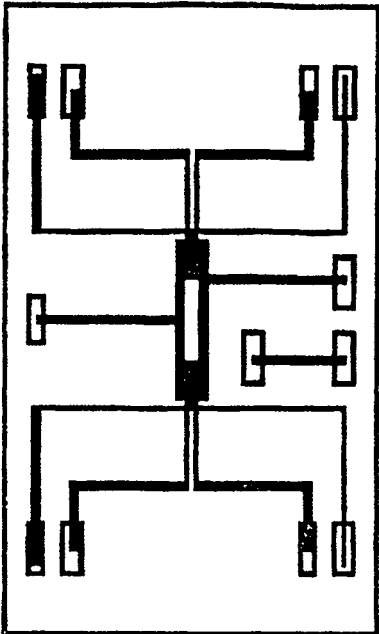


Figura 8

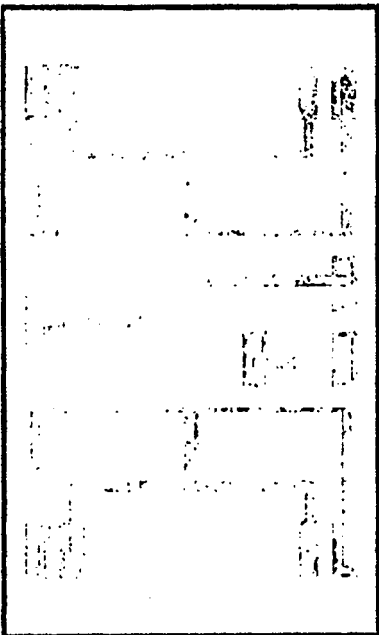


Figura 9

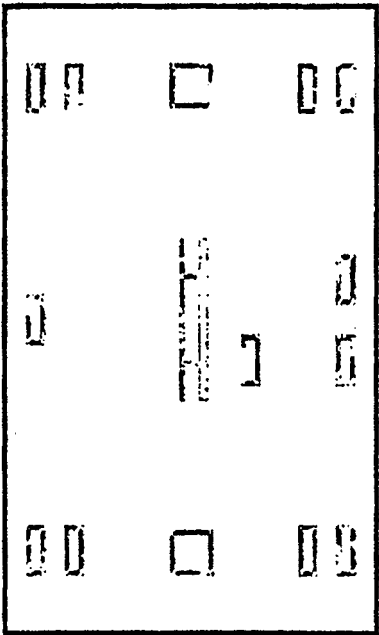


Figura 10

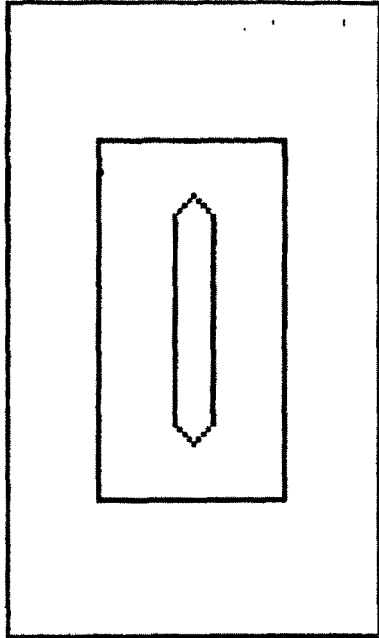


Figura 11

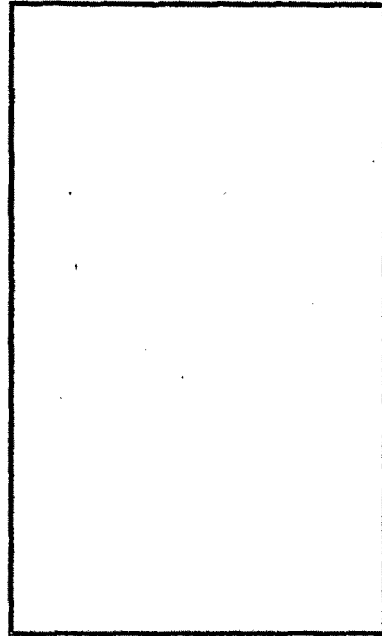


Figura 12

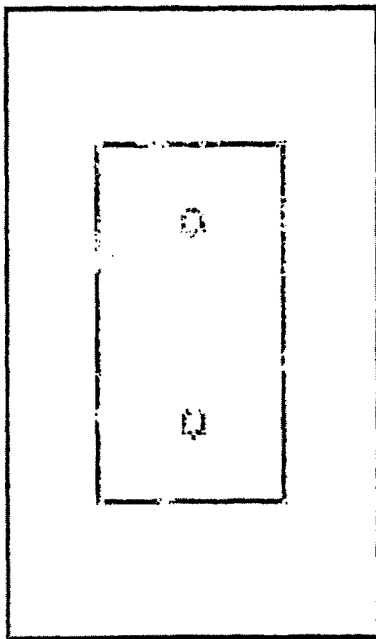


Figura 13

