

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 200**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2015** **PCT/US2015/052333**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016** **WO16049515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2015** **E 15778152 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021** **EP 3197602**

54 Título: **Dispositivo microfabricado con sensores de microambiente para evaluar la coagulación en muestras de fluidos**

30 Prioridad:

26.09.2014 US 201462055776 P

26.09.2014 US 201462055777 P

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

04.03.2022

73 Titular/es:

ABBOTT POINT OF CARE, INC. (100.0%)

400 College Road East

Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

DI TULLIO, KATRINA PETRONILLA;

TAYLOR, JAY KENDALL;

ZHAO, TIAN-XIAN;

WONG, ANJULIA CHIU-YUK;

MARTIN, GLENN BRIAN;

THIBODEAU, ISABELLE LOUISETTE;

BREEZE, STEVEN ROY;

SUTRALA, SMITHA RK;

HONG, ERIC y

BALL, SHEILA DIANE

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 898 200 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo microfabricado con sensores de microambiente para evaluar la coagulación en muestras de fluidos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a cartuchos de análisis de muestras que comprenden sensores de microambiente.

Antecedentes de la invención

10 La coagulación de la sangre o la hemostasia es un mecanismo protector importante del cuerpo para sellar las heridas causadas por lesiones corporales. La hemostasia tiene lugar en dos fases. La hemostasia primaria (celular) sirve para detener rápidamente el sangrado y minimizar la pérdida de sangre. La hemostasia primaria implica células lesionadas del endotelio y la capa subyacente de células que emiten señales que permiten que las plaquetas sanguíneas (trombocitos) se acumulen en una región de un vaso sanguíneo lesionado, lo que forma un tapón que sella provisionalmente la herida. La hemostasia secundaria (plasmática) o coagulación se inicia al mismo tiempo que la hemostasia primaria e implica un proceso por el cual la sangre se coagula. Más específicamente, la coagulación se controla por una cascada de coagulación de señalización que consiste en trece factores de coagulación que interactúan y se activan entre sí. Al final de la cascada de coagulación, el fibrinógeno se convierte en fibrina. Una red de fibras de fibrina refuerza el cierre de la herida, y las plaquetas y otras células sanguíneas quedan atrapadas en esta red y forman un coágulo sanguíneo (trombo). Por último, las plaquetas y el endotelio liberan factores de crecimiento que controlan el proceso de cicatrización de las heridas. Al final de estos procesos, las enzimas en el plasma sanguíneo disuelven la red de fibrina.

25 La hemostasia requiere un equilibrio sutil de procoagulantes y anticoagulantes de modo que la sangre circulante siga siendo un fluido de viscosidad relativamente baja y la coagulación solo comience para sellar las heridas. Los procoagulantes previenen el sangrado excesivo al bloquear el flujo sanguíneo de una herida o un vaso dañado, mientras que los anticoagulantes previenen que se formen coágulos en el sistema circulatorio, que de cualquier otra manera podrían bloquear los vasos sanguíneos y conducir a un infarto de miocardio o un accidente cerebrovascular.

30 La cascada de coagulación de la hemostasia secundaria se basa en la conversión catalítica de fibrinógeno, una proteína plasmática soluble, en fibrina insoluble. La enzima que cataliza esta reacción es la trombina, que no circula permanentemente en la sangre en forma activa, sino que existe como protrombina, el precursor inactivo de la trombina. La cascada de coagulación que conduce a la trombina activa consiste en dos vías, la vía extrínseca y la intrínseca, que convergen en una vía común que incluye la trombina activa que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina. La vía extrínseca se inicia en el sitio de la lesión en respuesta a la liberación del factor tisular (factor III) y, por lo tanto, también se conoce como la vía del factor tisular. El factor tisular es un cofactor en la activación catalizada por el factor VIIa del factor X (inactivo) al factor Xa (activo). La segunda vía intrínseca, más compleja, se activa mediante los factores de coagulación VIII, IX, X, XI y XII asociados con las plaquetas. También se requieren las proteínas precalcireína (PK) y cininógeno de alto peso molecular (HK o HMWK), así como también iones de calcio y fosfolípidos secretados por las plaquetas. Cada uno de estos componentes conduce a la conversión del factor X a factor Xa. El punto común en ambas vías es la activación del factor X al factor Xa. El factor Xa es una enzima (por ejemplo, una endopeptidasa de serina) que escinde la protrombina en dos lugares (un enlace arg-thr y luego un arg-ile), que produce trombina activa y, en última instancia, da como resultado la conversión de fibrinógeno en fibrina.

La ruptura de un coágulo de sangre o de la red de fibrina, denominada fibrinólisis, requiere la conversión de fibrina en un producto soluble. Esta lisis se cataliza por la enzima proteolítica plasmina, que circula en forma inactiva, plasminógeno. El activador tisular del plasminógeno (tPA), las enzimas hemolíticas bacterianas (por ejemplo, estreptoquinasa) y las enzimas proteolíticas humanas que se encuentran en la orina (por ejemplo, uroquinasa) activan el plasminógeno. Estos materiales se usan típicamente en terapia trombolítica.

Por consiguiente, la cascada de coagulación es un objetivo adecuado para diagnosticar y tratar enfermedades que implican una coagulación sanguínea desregulada o la ausencia de coagulación. Por ejemplo, el diagnóstico de afecciones hemorrágicas tales como la hemofilia, donde uno o más de los trece factores de coagulación sanguíneo implicados en la cascada de coagulación pueden ser defectuosos, puede lograrse mediante una amplia variedad de pruebas de coagulación. Además, se han desarrollado varias pruebas para controlar el progreso de la terapia trombolítica. Se han desarrollado otras pruebas para señalar un estado pretrombolítico o hipercoagulable, o controlar el efecto de administrar protamina a los pacientes durante la cirugía de derivación cardiopulmonar. Sin embargo, el principal valor de las pruebas de coagulación está en controlar la terapia de anticoagulación oral e intravenosa. Tres de las pruebas de diagnóstico claves son el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) y el tiempo de coagulación activado (ACT).

El PT es el tiempo que tarda el plasma en coagularse después de la adición de factor tisular (obtenido de animales tales como conejos, o factor tisular recombinante, o de cerebros de pacientes de autopsias). Esto mide la calidad de la vía extrínseca (así como también la vía común) de la coagulación. El PT se usa más comúnmente para controlar

la terapia de anticoagulación oral. Los anticoagulantes orales tales como Coumadin® suprimen la formación de protrombina. La prueba tradicional de PT incluye la extracción de sangre en un tubo que contiene citrato de sodio líquido, que actúa como un anticoagulante al unir el calcio en una muestra. Por consiguiente, la prueba de PT se basa en la adición de calcio y tromboplastina tisular a la muestra de sangre citratada, y se mide el tiempo que tarda la muestra en coagularse.

El aPTT es el tiempo que tarda en formarse un coágulo de fibrina. Esto mide la calidad de la vía intrínseca (así como también la vía común) de la coagulación. El aPTT se usa más comúnmente para controlar la terapia de anticoagulación con heparina intravenosa. La administración de heparina tiene el efecto de suprimir la formación de coágulos. La prueba tradicional de aPTT incluye la extracción de sangre en un tubo que contiene citrato de sodio líquido, que actúa como anticoagulante al unir el calcio en una muestra. Por consiguiente, la prueba de aPTT se basa en la adición de un agente de activación, calcio y un fosfolípido a la muestra de sangre citratada (por ejemplo, un plasma pobre en plaquetas) y se mide el tiempo que tarda la muestra en formar un coágulo de fibrina.

El ACT es el tiempo que tarda la sangre total en coagularse tras la exposición a un activador. La prueba de la vía intrínseca evalúa las vías intrínsecas y comunes de la coagulación. El ACT se usa más comúnmente para controlar el efecto de dosis altas de heparina antes, durante y poco después de procedimientos que requieren la administración intensa de anticoagulantes, tales como la derivación cardíaca, angioplastia cardíaca, trombólisis, oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO) y diálisis continua. La prueba tradicional de ACT incluye adicionar la sangre total a un tubo que contiene un activador de superficie (por ejemplo, celita, caolín o bolas de vidrio), lo que da como resultado la activación de la cascada de coagulación a través de la vía intrínseca (Factor XII). Por consiguiente, la prueba de ACT se basa en la adición de un activador a la vía intrínseca para refrescar la sangre total a la que no se le ha adicionado anticoagulante exógeno, y se mide el tiempo que tarda la muestra en formar un coágulo de fibrina.

Los monitores de coagulación se conocen por el análisis de la sangre total. Por ejemplo, se ha descrito un dispositivo de flujo capilar en la Patente de Estados Unidos núm. 4,756,884 en la que los reactivos secos se colocan en un analizador, que luego se calienta a 37 °C antes de introducir una gota de sangre. La muestra se mezcla con el reactivo mediante extracción capilar. El mecanismo de detección se basa en la luz láser que atraviesa la muestra. Las células sanguíneas que se mueven a lo largo de la vía de flujo producen un patrón moteado específico para la sangre no coagulada. Cuando la sangre se coagula, el movimiento deja de producir un patrón específico de la sangre coagulada. Se ha concebido una matriz absorbente con reactivos de coagulación secos para una única prueba de coagulación en un dispositivo (Ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos núm. 5,344,754) con medios integrados para determinar un cambio en la resistencia eléctrica al adicionar una muestra a la matriz. La detección de la reacción se basa en un conjunto óptico separado que se alinea e interroga a la región absorbente del dispositivo.

Los puntos de coagulación en el ensayo de atención también se conocen para el análisis de muestras de fluidos o muestras biológicas. Por ejemplo, se conocen cartuchos en el punto de atención para realizar una variedad de ensayos que responden a un cambio en la viscosidad de una muestra de fluido, que incluye los ensayos que implican pruebas de coagulación, aglutinación, fibrinólisis de toda la sangre total y, en general, ensayos para obtener información sobre el proceso de coagulación o lítico (lisis) (Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núm. 5,447,440 y 5,628,961). Además, se conocen cartuchos en el punto de atención que proporcionan un medio por el cual una muestra de sangre puede medirse y mezclarse cuantitativamente con reactivos que activan la vía primaria o secundaria de la cascada de coagulación para la posterior detección de la formación de coágulos mediante el uso de un sensor micro fabricado (Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núms. 6,750,053; 7,923,256; 7,977,106 y 6,438,498).

El documento WO 2007/025559 describe un elemento de prueba para la determinación de una coagulación en una muestra de plasma o sangre total, la prueba tiene una primera superficie y una segunda superficie a una distancia predeterminada opuesta entre sí, dichas ambas superficies se proporcionan de dos patrones sustancialmente equivalentes que forman áreas de alta y baja energía de superficie que se alinean en su mayoría de manera congruente, de manera que las áreas de alta energía de superficie crean un sistema de distribución de muestras con al menos un área de detección en el que las áreas de detección de la primera y segunda superficie se proporcionan con al menos un reactivo de estimulación de coagulación.

El documento US 2014/0014509 describe un sistema que comprende: un receptor de muestras para recibir una muestra de sangre; uno o más procesadores; uno o más medios legibles por ordenador que mantienen instrucciones ejecutables, que cuando se ejecutan por uno o más procesadores, causan que uno o más procesadores realicen operaciones que comprenden: aplicar una diferencia de potencial eléctrico a través de la muestra de sangre; medir, a lo largo del tiempo, una señal eléctrica que atraviesa la muestra de sangre para obtener una pluralidad de medidas; y determinar las características de coagulación de la sangre en base, al menos en parte, a la pluralidad de medidas tomadas a lo largo del tiempo entre un primer pico de la señal eléctrica y un segundo pico de la señal eléctrica.

El documento US 2008/0318260 describe aparatos y métodos para realizar ensayos para determinar el tiempo requerido para que se coagule una muestra de sangre. El aparato comprende cámaras de reacción revestidas con uno o más agentes de coagulación. Se coloca una gota de sangre o equivalente en el puerto de aplicación de la muestra, se diluye y contacta con el agente de coagulación.

El documento US 2013/0000378 describe un método para corregir una señal en un dispositivo sensor del punto de atención, que comprende las etapas de: proporcionar un dispositivo sensor que comprende un sensor, una primera almohadilla eléctrica, una segunda almohadilla eléctrica y una capa continua de polímero que contacta al menos una parte de la primera y segunda almohadillas eléctricas; medir una propiedad eléctrica asociada con la capa continua de polímero; determinar un factor de corrección asociado con la propiedad eléctrica medida; y aplicar el factor de corrección a una señal generada por el sensor para producir una señal corregida.

El documento US 2013/0002278 describe un método para determinar la usabilidad del dispositivo en el punto de atención, que comprende las etapas de: proporcionar un dispositivo que comprende una primera almohadilla eléctrica; una segunda almohadilla eléctrica; y una capa de polímero sensible a la humedad que contacta al menos una parte de dichas primera y segunda almohadillas eléctricas; aplicar un potencial a través de dichas primera y segunda almohadillas eléctricas; medir una propiedad eléctrica asociada con dicho polímero sensible a la humedad; y determinar si dicha propiedad eléctrica medida asociada con dicha capa de polímero sensible a la humedad ha excedido un nivel de umbral de humedad asociado con la usabilidad de dicho dispositivo.

Sin embargo, los sistemas de ensayo de coagulación en el punto de atención configurados para realizar los ensayos de coagulación de muestras de fluidos antes mencionados comprenden generalmente el reactivo y el sustrato impresos en una forma soluble en una cubierta o base del cartucho en el punto de atención o dispositivo de prueba. Durante el análisis, la muestra se empuja y tira mediante un proceso mecánico para disolver y mezclar el reactivo y el sustrato en la muestra. Esta disposición de tener el reactivo y el sustrato impresos en esta forma en combinación con el requisito de mezclar el reactivo y el sustrato en la muestra ha obstaculizado la integración de las pruebas de coagulación en un solo cartucho del punto de atención o dispositivo de prueba debido al potencial de activación cruzada de las dos vías distintas de la cascada de coagulación. Por consiguiente, existe la necesidad de un diseño mejorado del cartucho del punto de atención o dispositivo de prueba que permita realizar una combinación de pruebas de coagulación en un solo cartucho del punto de atención o dispositivo de prueba.

Resumen de la invención

En una realización, la presente invención se dirige a un cartucho de análisis de muestras como se define en la reivindicación 1.

Opcionalmente, el cartucho de análisis de muestras puede incluir además una bomba configurada para mover una muestra biológica en el conducto y colocar la muestra biológica sobre el sensor de PT de microambiente, y mover la muestra biológica en el conducto y colocar la muestra biológica sobre el sensor de aPTT de microambiente.

En otra realización adicional, la presente invención se dirige a un cartucho de análisis de muestras que incluye un conducto que incluye al menos un sensor de coagulación, un sensor de pH, un sensor de presión parcial de CO₂, un sensor de presión parcial de O₂ y un sensor de lactato, y una bomba configurada para mover una muestra biológica dentro del conducto para contactar cada uno de los al menos un sensor de coagulación, el sensor de pH, el sensor de presión parcial de CO₂, el sensor de presión parcial de O₂ y el sensor de lactato.

En algunas realizaciones, la presente invención se dirige a un chip como se define en la reivindicación 13.

En algunas realizaciones, el chip tiene una superficie sustancialmente plana. Opcionalmente, el contra electrodo de referencia es un electrodo de plata/cloruro de plata.

En realizaciones alternativas, la presente invención se dirige a un chip que incluye un sensor de PT de microambiente, un sensor de ACT de microambiente y un contra electrodo de referencia. Opcionalmente, los sensores de PT y ACT son sensores electroquímicos.

En algunas realizaciones, el chip tiene una superficie sustancialmente plana. Opcionalmente, el contra electrodo de referencia es un electrodo de plata/cloruro de plata.

Breve descripción de los dibujos:

La presente invención se entenderá mejor a la vista de las siguientes figuras no limitantes, en las que:

La Figura 1 muestra un esquema de cartucho de acuerdo con algunos aspectos de la invención;
Las Figuras 2 y 3 muestran un conducto que comprende un reactivo/sustrato soluble y un transductor de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 4 muestra un reactivo difusible, una capa de sustrato-polímero inmovilizado y un transductor de acuerdo con algunos aspectos de la presente invención;

Las Figuras 5 y 6 muestran gráficos que proporcionan evidencia empírica para aspectos de la presente invención;

Las Figuras 7A, 7B y 7C ilustran el principio de funcionamiento del sensor de microambiente que comprende un reactivo y/o sustrato, inmovilizado o no en una capa de polímero, y un transductor de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 8 muestra un esquema de cartucho de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 9 muestra una vista lateral de la fabricación de una capa de reactivo/sustrato-polímero inmovilizado de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 10-12 muestran gráficos que proporcionan evidencia empírica para aspectos de la presente invención;

Las Figuras 13A, 13B y 13C muestran múltiples disposiciones para un reactivo difusible, una capa de sustrato-polímero inmovilizado y un transductor de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 14 muestra una vista lateral de la fabricación de un sensor de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 15 y 16 muestran múltiples configuraciones de sensores de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 17 muestra una vista superior de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 18 a 20 muestran múltiples configuraciones de sensores de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 21, 22A y 22B ilustran el principio de funcionamiento de los sensores conductimétricos de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 23 muestra una vista isométrica de un dispositivo sensor desechable y un dispositivo lector de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 24 muestra una vista superior de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 25 y 26 muestran una vista superior de una parte de los dispositivos sensores desechables de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 27 a 29 muestran sistemas de microfluidos avanzados de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 30 muestra un gráfico de control de mezcla independiente de acuerdo con aspectos de la invención;

La Figura 31 muestra una vista superior de una parte de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 32 y 33 muestran sistemas de microfluidos avanzados de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 34 muestra una vista superior de una parte de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 35 muestra un sistema de microfluidos avanzado de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 36 muestra una vista superior de una parte de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 37 y 38 muestran sistemas de microfluidos avanzados de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

La Figura 39 muestra una vista superior de una parte de un dispositivo sensor desechable de acuerdo con algunos aspectos de la invención;

Las Figuras 40, 41A y 41B muestran gráficos que proporcionan evidencia empírica para aspectos de la presente invención; y

Las Figuras 42 y 43 ilustran el principio de funcionamiento para eliminar el chip de tierra de acuerdo con algunos aspectos de la invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a los cartuchos de análisis de muestras.

En algunos ejemplos, la divulgación se refiere a un chip de circuito integrado que tiene uno o más sensores de prueba que comprenden al menos un transductor revestido con una capa de polímero que incluye un péptido escindible con trombina con una fracción detectable de manera que el uno o más sensores operan de manera localizada y son capaces de determinar uno o más tiempos de coagulación de diagnóstico (por ejemplo, PT, aPTT y/o ACT). Más específicamente, la invención se refiere a un cartucho de análisis de muestras que comprende una cámara de entrada configurada para recibir una muestra biológica (por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina y formas modificadas y diluidas de las mismas) y un conducto conectado de manera fluida a la cámara de entrada y configurado para recibir la muestra biológica de la cámara de entrada. El conducto comprende un primer sensor de microambiente y un segundo sensor de microambiente que se configuran para operar de manera localizada y son capaces de determinar, respectivamente, un primer tiempo de coagulación de diagnóstico (PT) y un segundo tiempo de coagulación de diagnóstico (aPTT) diferente del primer tiempo de coagulación de diagnóstico; en el que el sensor

de PT de microambiente y el sensor de aPTT de microambiente comprenden cada uno una capa de sustrato-polímero inmovilizado y reactivos integrados o distribuidos en la parte superior del mismo o adyacentes al mismo; en el que el sensor de PT de microambiente comprende reactivos de diagnóstico de PT, que comprenden al menos un reactivo para inducir la vía de coagulación extrínseca en la muestra biológica, y en el que el sensor de aPTT activado por microambiente comprende reactivos de diagnóstico de aPTT, que comprenden al menos un reactivo para inducir la vía de coagulación intrínseca en la muestra biológica.

En algunas realizaciones, el primer sensor de microambiente puede incluir al menos un transductor revestido con una capa de polímero sustancialmente neutralizante de heparina y un péptido escindible con trombina con una fracción de señal. En algunas realizaciones, el segundo sensor de microambiente puede incluir al menos un transductor revestido con una capa de polímero sustancialmente no neutralizante de heparina y un péptido escindible con trombina con una fracción de señal. El primer y el segundo sensor de microambiente pueden incluir además, respectivamente, reactivos del primer y el segundo tiempo de coagulación de diagnóstico dentro de las capas de polímero (por ejemplo, los reactivos se integran dentro de las capas de polímero), revestidos sobre las capas de polímero (por ejemplo, los reactivos son una capa separada distribuida encima de las capas de polímero), o colocados sustancialmente adyacente a las capas de polímero y/o al menos un transductor (por ejemplo, los reactivos se colocan dentro del conducto de manera que los reactivos se apoyan en o dentro de una distancia interactiva de las capas de polímero y/o el al menos un transductor para que sigan funcionando en conjunto).

Además, la divulgación se refiere a sistemas de microfluidos avanzados para el control de la muestra biológica dentro del cartucho de análisis de muestras. En una realización preferida, el diseño del cartucho de análisis de muestras permite realizar dos pruebas separadas físicamente (por ejemplo, PT y aPTT) simultáneamente en una sola muestra biológica (por ejemplo, sangre total) dentro del mismo cartucho de análisis de muestras. En algunas realizaciones, los sistemas de microfluidos avanzados pueden comprender características de fluidos pasivas (por ejemplo, válvulas, resistencias y elementos de bloqueo de fluidos) además de características de fluidos activas del analizador (por ejemplo, una bomba) para dividir la muestra biológica en conductos/regiones separados de un cartucho de análisis de muestras de manera que cada segmento de muestra pueda moverse posteriormente a un sensor específico (por ejemplo, biosensor o sensor de microambiente como se describe en detalle en la presente descripción). En realizaciones adicionales o alternativas, un chip de circuito integrado puede comprender electrodos conductimétricos de múltiples conductos (por ejemplo, barras de hematocrito) configurados para proporcionar múltiples puntos de contacto con la muestra biológica para un control de microfluidos avanzado sobre los sensores o sensores de microambiente.

Como se usa en la presente descripción, el término "sensor de microambiente" se refiere a un sensor configurado de manera que cualquier reacción que ocurra en la vecindad inmediata del sensor de una manera suficiente para lograr la señal deseada en el sensor no interferirá de manera detectable (o impactará) con otra reacción que ocurre en un sensor adyacente durante el uso normal.

Como se usa en la presente descripción, el término "neutralizante de heparina" se refiere a un aspecto del sensor que hace que la heparina no fraccionada y la heparina de bajo peso molecular (LMWH) sean biológicamente inactivas en una muestra biológica en un área suficiente para abarcar el área del sensor de microambiente. Por el contrario, "no neutralizante de heparina" se refiere a un aspecto del sensor que no impacta/afecta la actividad biológica de la heparina no fraccionada o LMWH en el área del sensor de microambiente.

Como se usa en la presente descripción, el término "inmovilizado" se refiere a un aspecto del sensor de microambiente que sustancialmente se limita en movimiento y, por tanto, localiza este aspecto del microambiente en un área general.

Como se usa en la presente descripción, el término "sustrato" se refiere a una molécula que es el objetivo de una reacción enzimática o una entidad física que forma la base de una estructura.

Descripción General de la Coagulación Sanguínea

El proceso de coagulación de la sangre y la posterior disolución del coágulo que sigue la reparación del tejido lesionado se denomina hemostasia. Para que ocurra la hemostasia, las plaquetas deben adherirse al colágeno expuesto, liberar el contenido de sus gránulos y agregarse. La adhesión de las plaquetas al colágeno expuesto en las superficies de las células endoteliales se media por el factor von Willebrand (vWF). La activación de las plaquetas a través de la trombina se requiere para su consiguiente agregación a un tapón plaquetario. Sin embargo, igualmente significativo es el papel de los fosfolípidos de la superficie plaquetaria activados en la activación de la cascada de coagulación.

La vía intrínseca de la cascada de coagulación requiere los factores de coagulación VIII, IX, X, XI y XII. También se requieren las proteínas precalicreína (PK) y cininógeno de alto peso molecular (HK o HMWK), así como también iones de calcio y fosfolípidos secretados por las plaquetas. Cada uno de estos componentes de la vía intrínseca conduce a la conversión del factor X a factor Xa. El inicio de la vía intrínseca ocurre cuando la precalicreína, el cininógeno de alto peso molecular, el factor XI y el factor XII se exponen a una superficie cargada negativamente.

Esto se denomina fase de contacto y puede ocurrir como resultado de la interacción con los fosfolípidos (principalmente fosfatidiletanolamina, PE) de partículas de lipoproteínas circulantes tales como quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LDL). Ésta es la base del papel de la hiperlipidemia en la promoción de un estado protrombótico.

La activación del factor Xa en la vía intrínseca requiere el ensamblaje del complejo tenasa (Ca^{2+} y factores VIIIa, IXa y X) en la superficie de las plaquetas activadas. Una de las respuestas de las plaquetas a la activación es la presentación de fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) en sus superficies. La exposición de estos fosfolípidos permite la formación del complejo tenasa y la posterior activación del factor Xa.

La vía extrínseca de la cascada de coagulación se inicia en el sitio de la lesión en respuesta a la liberación del factor tisular (factor III) y, por tanto, también se conoce como vía del factor tisular. El factor tisular es un cofactor en la activación catalizada por el factor VIIa del factor X. El factor VIIa, un residuo gla que contiene serina proteasa, escinde el factor X a factor Xa de una manera idéntica a la del factor IXa de la vía intrínseca. La activación del factor VII ocurre mediante la acción de la trombina o el factor Xa. La capacidad del factor Xa para activar el factor VII crea un vínculo entre las vías intrínseca y extrínseca.

El punto común en ambas vías es la activación del factor X al factor Xa. El factor Xa activa la protrombina (factor II) a trombina (factor IIa). La trombina, a su vez, convierte el fibrinógeno en fibrina. La activación de la trombina ocurre en la superficie de las plaquetas activadas y requiere la formación de un complejo de protrombinasa. Este complejo se compone de los fosfolípidos plaquetarios, fosfatidilinositol y fosfatidilserina, Ca^{2+} , factores Va y Xa y protrombina. El factor V es un cofactor en la formación del complejo de protrombinasa, similar al papel del factor VIII en la formación del complejo tenasa. Al igual que la activación del factor VIII, el factor V se activa a factor Va por medio de cantidades mínimas y se inactiva al aumentar los niveles de trombina. El factor Va se une a receptores específicos en las superficies de las plaquetas activadas y forma un complejo con la protrombina y el factor Xa.

La protrombina es una proteína de cadena sencilla de 72 kDa que contiene diez residuos gla en su región N-terminal. Dentro del complejo de protrombinasa, el factor Xa escinde la protrombina en 2 sitios. Esta escisión genera una molécula de trombina activa de 2 cadenas que contiene una cadena A y una B que se mantienen juntas mediante un solo enlace disulfuro. La trombina se une a una clase de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) llamados receptores activados por proteasa (PAR), específicamente PAR-1, -3 y -4. Los PAR utilizan un mecanismo único para convertir el resultado de la escisión proteolítica extracelular en un evento de señalización intracelular. Los PAR llevan su propio ligando, que permanece inactivo hasta que la escisión de la proteasa, tal como la trombina, "desenmascara" el ligando. Después de la escisión de la trombina, el ligando desenmascarado sigue siendo parte del PAR intacto, pero ahora es capaz de interactuar con el dominio de unión al ligando del PAR, lo que da como resultado la activación de numerosas cascadas de señalización.

Descripción General de las Pruebas de Coagulación

Los ensayos de tiempo de sangrado se usan para evaluar las respuestas vasculares y plaquetarias que se asocian con la hemostasia. El tiempo de sangrado es un ensayo frecuente que se realiza en pacientes preoperatorios para garantizar que haya una respuesta adecuada a la lesión de los vasos antes de la cirugía. Como se describe en la presente descripción, las respuestas rápidas a la lesión vascular (que ocurre en segundos) son la constricción de los vasos y la adhesión de las plaquetas a la pared del vaso. El método Ivy para determinar el tiempo de sangrado implica el uso de un manguito de presión arterial (esfigmomanómetro) que se coloca en el antebrazo y se infla a 40 mm Hg. Luego se hace una incisión superficial en el antebrazo y se registra el tiempo que tarda en detenerse el sangrado. Con el método Ivy, el sangrado debe detenerse en 1 a 9 minutos. Cualquier tiempo de sangrado superior a 15 minutos sería indicativo de un defecto en las respuestas iniciales de los vasos y las plaquetas a la lesión vascular. Un ensayo de tiempo de sangrado menos invasivo implica el uso de una lanceta o una aguja especial, con la que se hace un pinchazo de 3-4 mm de profundidad en la yema del dedo o en el lóbulo de la oreja. Este ensayo de tiempo de sangrado se denomina como método de Duke, y en este ensayo el sangrado debe cesar en 1-3 minutos. El tiempo de sangrado se afecta (prolonga) por cualquier defecto en la función plaquetaria, por trastornos vasculares y en la enfermedad de von Willebrand, pero no se afecta por otros factores de coagulación. Los trastornos que se asocian comúnmente con un aumento del tiempo de sangrado incluyen trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada (CID), síndrome de Bernard-Soulier y trombastenia de Glanzmann. Los tiempos de sangrado anormales también se encuentran en pacientes con síndrome de Cushing, enfermedad hepática grave, leucemia e insuficiencia de la médula ósea.

Los defectos asociados con factores de las vías de coagulación sanguínea también pueden evaluarse con ensayos específicos. El tiempo de protrombina (TP) es un ensayo diseñado para ver defectos en fibrinógeno, protrombina y factores II, V, VII y X y, por lo tanto, mide las actividades de la vía extrínseca de la coagulación. Cuando alguno de estos factores es deficiente, entonces el TP se prolonga. Un TP normal es de 11,0 a 12,5 segundos. Un TP mayor de 20 segundos es indicativo de déficit de coagulación. El TP se mide comúnmente mediante el uso de plasma después de que se extraen las células sanguíneas. Una muestra de sangre se recolecta típicamente en un tubo que contiene citrato para unir cualquier calcio y por tanto inhibir la coagulación, y luego las células se separan por centrifugación. El exceso de calcio se adiciona a una alícuota del plasma para iniciar la coagulación. La medida más

común de PT es dividir el tiempo de coagulación de la sangre de un paciente por el valor medio de PT normal, y con esta relación se eleva posteriormente a una potencia correspondiente al ISI (índice de sensibilidad internacional) del reactivo que se usa. El valor resultante se denomina índice internacional normalizado (INR). Los valores normales oscilan de 0,8 a 1,2 INR. El PT se usa para determinar la dosis correcta de la clase cumarina de fármacos anticoagulantes (por ejemplo, Coumadin®), para la presencia de enfermedades o daño hepático y para evaluar el estado de la vitamina K.

El tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) se usa para evaluar defectos en la vía intrínseca de la coagulación. El ensayo aPTT incluye la adición de activadores que acortan el tiempo normal de coagulación y normalmente se prescribe en pacientes con sangrado o coagulación inexplicables. El ensayo evaluará la función del fibrinógeno, la protrombina y los factores V, VIII, IX, X, XI y XII. Un defecto en cualquiera de estos factores resultará en un aPTT prolongado. Un aPTT normal es de 30 a 40 segundos. El aPTT es un ensayo estándar que se usa para evaluar la eficacia de la terapia anticoagulante con heparina. El aPTT se mide comúnmente mediante el uso de plasma después de que se extraen las células sanguíneas. Una muestra de sangre se recolecta típicamente en un tubo que contiene citrato para unir cualquier calcio y por tanto inhibir la coagulación, y luego las células se separan por centrifugación. El exceso de calcio se adiciona a una alícuota del plasma para revertir la anticoagulación con citrato. Los aPTT prolongados se asocian con trastornos de sangrado adquiridos o congénitos asociados con deficiencia de factor de coagulación, deficiencia de vitamina K, enfermedad hepática, DIC, enfermedad de von Willebrand, leucemia, hemofilia y durante la administración de heparina.

El tiempo de coagulación activado (ACT) es una prueba común de coagulación de sangre total en el punto de atención que se usa para controlar la terapia con heparina en dosis altas o el tratamiento con bivalirudina. La dosis de heparina o bivalirudina requerida en estos entornos está más allá del rango que puede medirse con el aPTT. Normalmente, la sangre total se recolecta en un tubo o cartucho que contiene un activador de coagulación (por ejemplo, celita, caolín o partículas de vidrio) y una barra de agitación magnética, y luego se mide el tiempo que tarda la sangre en coagularse. El valor de referencia para el ACT típicamente oscila entre 70 y 180 segundos. El rango deseable de anticoagulación depende de la indicación y el método de prueba usado. Por ejemplo, durante la cirugía de derivación cardiopulmonar, el rango de ACT deseado con heparina puede exceder de 400 a 500 segundos. Por el contrario, en pacientes que se someten a intervenciones coronarias percutáneas, se recomienda un ACT objetivo de 200 segundos cuando se administra heparina junto con un antagonista de la glucoproteína IIb/IIIa, mientras que un ACT entre 250 y 350 segundos se dirige en ausencia de tal terapia complementaria.

Sistema Electroquímico para la Determinación de Tiempos de Coagulación de Diagnósticos

Se han usado ensayos cromogénicos para medir la actividad enzimática de factores de coagulación específicos mediante el desarrollo de sustratos de péptidos artificiales, escindibles, específicos para factores particulares. Cabe señalar que los ensayos en base al tiempo de coagulación, tales como aPTT, PT y ACT, son esencialmente medidas funcionales de la formación e inhibición de trombina en la presencia de anticoagulantes, tales como warfarina y heparina o factores de coagulación defectuosos. Por tanto, puede establecerse una analogía entre los ensayos en base a la medición de la formación de fibrina y los ensayos en base directamente a la medición de la actividad de la trombina mediante el uso de sustratos peptídicos apropiados, como en los ensayos cromogénicos.

La detección electroquímica implica el uso de un electrodo de trabajo (por ejemplo, un electrodo amperométrico) y un electrodo de referencia (por ejemplo, un contra electrodo de referencia), mediante el cual se aplica un potencial constante al electrodo de trabajo que conduce a una reacción de oxidación-reducción (redox) que puede cuantificarse como una corriente eléctrica registrable. Los sensores electroquímicos han encontrado un uso generalizado en el desarrollo de dispositivos de autocomprobación y en el punto de atención (POC), como se ejemplifica por el desarrollo de las tiras reactivas de glucosa, ya que son fáciles de conectar con instrumentos electrónicos y reducen los costos de los dispositivos. Dispositivos, tales como el sistema i-STAT® (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Núm. 7,977,106), han empleado sustratos electrogénicos que dan como resultado la formación de un producto de escisión detectable electroquímicamente que es proporcional a la actividad de la trombina. Luego, estos dispositivos se configuran para devolver un tiempo de coagulación en base a una medida de la actividad de la trombina para permitir comparaciones con la coagulación estándar. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el sistema de detección electroquímica se denomina "electrogénico" porque las especies detectables electroquímicamente se generan para permitir la determinación de una medición de velocidad o un punto final de prueba, por ejemplo, un tiempo de coagulación de diagnóstico. Esto es similar a las pruebas de punto final cromogénicas o fluorogénicas en las que un cambio en las propiedades de absorción o emisión de luz de una muestra indica la medición de la velocidad o el punto final, por ejemplo, un tiempo de coagulación de diagnóstico.

La Figura 1 ilustra el principio de un sistema de detección electroquímica (por ejemplo, un sistema de detección electroquímica amperométrica) de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención para la determinación de los tiempos de coagulación de diagnóstico. Sin embargo, debe entenderse que, aunque se describen en la presente descripción realizaciones específicas para ensayos de tiempo de coagulación de diagnóstico (por ejemplo, ensayos de PT, aPTT y ACT), las estructuras de sensor de microambiente descritas en la presente descripción también pueden ser útiles para detectar varios analitos de interés potencial. Más específicamente, el sistema de detección electroquímica de la presente invención no se limita al ensayo de enzimas de coagulación. Por ejemplo,

cualquier ensayo donde una enzima escinde una molécula de sustrato para producir una fracción electroactiva puede usar la presente metodología. Como debe entenderse, pueden concebirse ensayos para una variedad de otras enzimas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, glucosa oxidasa, lactato oxidasa y otras oxidoreductasas, enzimas basadas en deshidrogenasa y fosfatasa alcalina y otras fosfatasa, y serina proteasas sin apartarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, algunos aspectos de la presente invención pueden incluir un ensayo de fosfatasa donde está presente el ferroceno con una fracción de fosfato en una capa de sensor de microambiente. La enzima fosfatasa presente en una muestra puede penetrar el sensor de microambiente y escindir los grupos fosfato lo que permite que las moléculas de ferroceno liberadas se oxiden en el electrodo. Por consiguiente, la corriente medida puede ser una función de la velocidad de la reacción de escisión y, por tanto, proporcional a la actividad fosfatasa en la muestra.

En un análisis ilustrativo, puede introducirse una muestra de fluidos 15, por ejemplo, sangre total, en una cámara de retención de muestras 20 de un cartucho 25 de la presente invención. Posteriormente, la muestra de fluidos 15 puede introducirse en una región de análisis 30 del cartucho, por ejemplo, una región de sensor o una o más ubicaciones dentro de uno o más conductos del cartucho que incluye uno o más sensores para la detección de coagulación y opcionalmente para la detección de un analito objetivo (por ejemplo, actividad de trombina durante un tiempo de protrombina y troponina I). La región de análisis 30 incluye uno o más sensores de microambiente 35 que comprenden uno o más electrodos o transductores 37, uno o más reactivos 40 y uno o más sustratos 45 en cualquier número de diferentes disposiciones posibles. La forma y orientación de los electrodos, reactivos y sustrato pueden variar ampliamente en dependencia de las realizaciones de la invención, que se describen en detalle a continuación.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el uno o más reactivos 40 pueden incluir un material para inducir la coagulación a través de la vía intrínseca o extrínseca. Los materiales adecuados para inducir la vía extrínseca (por ejemplo, análisis de PT) pueden incluir uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en factor tisular no recombinante, factor tisular recombinante, un lípido sintético o natural, un fosfolípido sintético o natural, una combinación de lípidos sintéticos o naturales y una combinación de fosfolípidos sintéticos o naturales. En algunas realizaciones puede incluirse una variedad de otros componentes dentro del uno o más reactivos 40 para contribuir a las características de estabilización y deposición/disolución del uno o más reactivos 40. Por ejemplo, el uno o más reactivos 40 pueden comprender además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en proteínas portadoras tales como albúmina de suero bovino (BSA), agentes estabilizantes, agentes antimicrobianos, una sal de calcio, una sal de potasio, un polímero soluble en agua, un azúcar, gelatina, agarosa, un polisacárido, un sacárido, sacarosa, polietilenglicol, fosfato de sodio, glicina, un aminoácido, antioxidantes, un detergente, una sal tampón y un tampón tal como tampón de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES).

De acuerdo con diferentes aspectos de la presente invención, el uno o más reactivos 40 pueden incluir material adecuado para inducir la vía intrínseca. Los materiales adecuados para inducir la vía intrínseca (por ejemplo, el análisis aPTT o ACT) pueden incluir uno o más componentes seleccionados de ácido eláico, celita, caolín, tierra de diatomeas, arcilla, dióxido de silicio, lípidos sintéticos o naturales y fosfolípidos sintéticos o naturales. En algunas realizaciones puede incluirse una variedad de otros componentes dentro de uno o más reactivos 40 para contribuir a las características de estabilización y/o deposición/disolución de uno o más reactivos 40. Por ejemplo, el uno o más reactivos 40 pueden comprender además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en dextrano, dextrina, tergitol, tampones, una proteína portadora, un aminoácido, estabilizadores, antimicrobianos, antioxidantes, un detergente, un sacárido, un polisacárido, sacarosa, polietilenglicol, derivados de polietilenglicol, glicina, gelatina, tampón tal como tampón de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), ramnosa, trehalosa y azúcares.

De acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, el uno o más sustratos 45 usados en el ensayo electrogénico pueden tener un enlace amida que imita el enlace amida escindido por trombina en el fibrinógeno. Específicamente, el uno o más sustratos 45 pueden comprender uno o más péptidos escindibles con trombina tales como los seleccionados del grupo que consiste en H-D-Phe-Pip-Arg, H-D-Chg-Abu-Arg, CBZ-Gly-Pro-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, H-D-Phe-Pro-Arg, Ciclohexilglicina-Ala-Arg, Tos-Gly-Pro-Arg, Bz-Phe-Val-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Hyp-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Val-Pro-Arg, Ac-Gly-Pro-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Gly-Pro-Arg, Ac-Gly-Hyp-Arg y H-D-Chg-Abu-Arg. La trombina escinde típicamente el enlace amida en el extremo carboxi del residuo del residuo de arginina porque el enlace se parece estructuralmente al enlace amida escindido con trombina en el fibrinógeno. El producto de la reacción trombina-sustrato incluye compuestos electroquímicamente inertes tales como Tos-Gly-Pro-Arg, H-D-Phe-Pip-Arg y/o Bz-Phe-Val-Arg- y compuestos electroactivos o fracciones detectables, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en p-aminofenol, una quinona, un ferroceno, derivado de ferrocianuro, otras especies organometálicas, p-nitroanilina, o-dianisidina, 4,4'-bensidina, 4-metoxi-2-naftilamina, N-fenil-p-fenilendiamina, N-[p-metoxifenil]-p-fenilendiamina y derivados de fenazina. Se eligió la secuencia de tripéptidos porque hace que el sustrato sea virtualmente no reactivo con proteasas sanguíneas distintas de la trombina y la reactividad de la trombina con el enlace amida de arginina en la molécula es muy similar a su reactividad con el enlace amida objetivo en el fibrinógeno. Cuando el uno o más sustratos 45 están presentes en una muestra de sangre o fluido derivado de la sangre o muestra biológica, la trombina activa generada a partir de la activación de la(s) vía(s) de coagulación a través de uno o más reactivos 40

convierte simultáneamente el uno o más sustratos 45 y fibrinógeno a sus productos de escisión. El producto de reacción de la especie electroquímica se detecta por uno o más transductores 37, por ejemplo, un transductor electroquímico.

5 Estructuras de Sensores de Microambiente

Como se describe en la presente descripción, las estructuras de los sensores de microambiente comprenden uno o más reactivos y uno o más sustratos en cualquiera de una serie de disposiciones diferentes, de manera que la introducción de la muestra de fluido, por ejemplo, sangre total, al uno o más reactivos y al uno o más sustratos se ubican en uno o más sensores. En particular, las estructuras del sensor de microambiente se configuran para separar físicamente el uno o más reactivos y/o productos de reacción entre sí para evitar la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia de sensor cruzado una vez que el uno o más reactivos se han expuestos a la muestra de fluido.

Como se muestra en la Figura 2, los ensayos de coagulación POC tradicionales han empleado el reactivo/sustrato 60 impreso como una sustancia seca en una pared 65 (por ejemplo, una cubierta) de un conducto que se opone a una superficie de un sensor 70. La muestra de fluido 75 necesitaría mezclarse con la sustancia seca, por ejemplo, mediante oscilación de la bomba, para disolver el reactivo/sustrato 60 en la muestra de fluido 75 y generar una mezcla 80, que puede tener la forma de un gradiente desde la parte superior del conducto hasta el sensor 70. Sin embargo, tal configuración tiene al menos tres problemas o desventajas. En primer lugar, solo una pequeña parte del producto electroactivo generado a través de la mezcla 80 alcanzará la superficie del sensor 70 y se oxidará y, por tanto, no se utilizará una mayoría del producto electroactivo. Como un resultado, el uso del reactivo/sustrato 60 no es eficiente. Además, la muestra de fluido 75 se adultera con el reactivo/sustrato 60, lo que puede ser indeseable debido a su posible impacto con otros sensores que pueden entrar en contacto con la muestra de fluido 75 (por ejemplo, interferencia de sensor cruzado). En segundo lugar, para lograr una precisión analítica adecuada, el reactivo/sustrato 60 debe dispersarse uniformemente en la muestra de fluido 75 lo más rápidamente posible. Esto puede ser un desafío para los dispositivos en el punto de atención donde el espacio y la eficiencia de la mezcla pueden limitarse. Es especialmente cierto cuando el reactivo/sustrato 60 está en forma sólida y en un espacio muy pequeño con relación al volumen de la muestra de fluido 75. En tercer lugar, existe la posibilidad de que el sustrato interfiera con el reactivo y/o los factores de coagulación. Por ejemplo, mezclar el sustrato junto con el reactivo en la muestra 75 antes de que se haya iniciado la cascada de coagulación puede manifestar tal interferencia.

En contraste con los ensayos de coagulación POC tradicionales, algunas realizaciones de la presente invención, como se muestra en la Figura 3, presenta el reactivo 85 asociado con una capa de sustrato 90 formada de manera localizada cerca de la superficie del sensor 95. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 3, el reactivo 85 y el sustrato 90 pueden imprimirse como una sustancia seca directamente sobre una superficie del sensor 95. La muestra de fluido 100 puede reaccionar con el reactivo 85 y el sustrato 90 sin mezclar (por ejemplo, mediante difusión pasiva) (aunque puede desearse cierto grado de mezcla, por ejemplo, oscilación del fluido), de manera localizada lo que crea un gradiente desde el sensor 95 hasta la parte superior del conducto. Ventajosamente, esta disposición del reactivo y el sustrato presentados directamente sobre una superficie del sensor permite que la mayoría del producto electroactivo se oxide y, por tanto, se utilice en la superficie del sensor. Esta disposición del sensor también es beneficiosa debido al menor volumen de muestra requerido en el entorno inmediato del sensor y, por lo tanto, produce una zona de ensayo de reactivo a muestra más concentrada.

No obstante, algunos de los problemas (por ejemplo, la mitigación de la interferencia de sensor cruzado y la interferencia de sustrato) evidentes dentro de los ensayos de coagulación POC tradicionales pueden no solucionarse por la disposición mostrada en la Figura 3. Por ejemplo, cualquier reacción que ocurra en la vecindad inmediata del sensor podría interferir potencialmente con el reactivo y/o los factores de coagulación y/o posiblemente con otra reacción que ocurra en un sensor adyacente (es decir, un sensor dentro del mismo conducto y dentro de aproximadamente 3 mm del sensor mostrado en la Figura 3). Como tal, este tipo de disposición de sensor no se caracterizaría como un sensor de microambiente. Sin embargo, estos problemas restantes pueden superarse mediante sistemas de microfluidos avanzados de la presente invención (por ejemplo, al dividir una sola muestra en dos o más partes y controlar el movimiento de esas partes en dos o más conductos), como se describe a continuación en detalle, y/o separación apropiada de los sensores entre sí. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando los sensores adyacentes se cubren por un mismo fluido de muestra inactivo, para prevenir la interferencia de sensores cruzados por debajo de un umbral dado, por ejemplo, por debajo del 1 %, puede ser adecuado usar modelos en base a un coeficiente de difusión conocido para el interferente y el tiempo total de ensayo para determinar una distancia de separación adecuada entre sensores. En algunas realizaciones, donde la muestra no está inactiva, otros modelos para mezcla dinámica pueden ser adecuados para usar para seleccionar una distancia de separación del sensor adecuada.

En realizaciones adicionales o alternativas, se ha demostrado inesperadamente que inmovilizar el sustrato 90 en el sensor 95 soluciona muchos o todos los problemas mencionados anteriormente. De acuerdo con estos aspectos de la presente invención, la inmovilización puede realizarse mediante reticulación (por ejemplo, luz ultravioleta, glutaraldehído, etc.), atrapamiento, unión covalente, etc. Un ejemplo de tal disposición de microambiente se muestra en la Figura 4 donde el sustrato 90 se inmoviliza sobre la superficie del sensor 95 mediante el uso de una capa de

polímero 105. En algunas realizaciones, la inmovilización puede realizarse al revestir el sensor 95 con una capa de polímero 105 que incluye el sustrato 90 de manera que el sustrato 90 se inmoviliza a través de la capa de polímero 105 en la superficie del sensor 95. En otras palabras, el sustrato 90 se forma como una capa de sustrato-polímero poroso inmovilizado sobre la superficie del sensor 95 para crear un recipiente para mantener la reacción de la muestra de fluido 100, el reactivo 85 y el sustrato 90 de manera localizada sobre una superficie del sensor 95. La muestra de fluido 100 puede reaccionar con el reactivo 85 y el sustrato 90 sin mezclar (aunque puede desearse cierto grado de mezcla, por ejemplo, oscilación del fluido) de una manera localizada dentro de los límites de (o por encima, y luego difundida en) la capa de polímero 105 formada en el sensor.

Ventajosamente, esta disposición del sustrato inmovilizado presentado directamente sobre una superficie del sensor permite que la mayoría del producto electroactivo se oxide y, por tanto, se utilice en la superficie del sensor. Aún más ventajosamente, esta disposición del sustrato inmovilizado proporciona un microambiente capaz de mantener el sustrato y el producto electroactivo en la vecindad inmediata del sensor, y por tanto mitigar la interferencia de sensor cruzado con un sensor adyacente durante el uso normal. Otros beneficios potenciales de inmovilizar el sustrato en el sensor incluyen la mitigación de la interferencia del sustrato mediante la separación del sustrato del reactivo, la reducción del uso de material, la simplificación del hardware y el diseño del sensor y la mejora de la robustez del producto.

Las Figuras 5 y 6 proporcionan evidencia empírica de que inmovilizar el sustrato puede aumentar la corriente de respuesta y mejorar la precisión de la detección del analito de manera significativa. Específicamente, la Figura 5 muestra curvas de respuesta aPTT donde el eje x es tiempo/segundos y el eje y es corriente/pA. En este ejemplo, el sustrato se imprimió en un sensor, uno inmovilizado con PVA (curvas de respuesta de aPTT 106) y el otro no inmovilizado (curvas de respuesta de aPTT 107). Se añadió un reactivo aPTT a la sangre total. Después de mezclar durante aproximadamente 30 segundos, la muestra se extrajo del tubo de muestra y se llenó en cartuchos para la prueba. La corriente eléctrica del sensor de sustrato inmovilizado (curvas de respuesta de aPTT 106) era superior a 30 nA, mientras que la del sensor de sustrato no inmovilizado (curvas de respuesta de aPTT 107) era solo de aproximadamente 3 nA. Su coeficiente de variación de tMid (tiempo en el que la corriente alcanza su punto medio) fue de aproximadamente 1 % y 2 %, respectivamente. Estos datos indican que la presencia del sustrato inmovilizado directamente sobre el sensor permitió la reacción redox inmediata y concentrada del grupo saliente del sustrato de coagulación. Esto, a su vez, produjo tiempos de coagulación más rápidos y una respuesta del sensor más predecible.

Otro ejemplo se muestra en la Figura 6 donde el eje x es tiempo/segundos y el eje y es corriente/pA. Las curvas de respuesta de PT 108 representan la respuesta de un sensor de sustrato no inmovilizado a un nivel de fluido de control de i-STAT® PT 2, mientras que las curvas de respuesta de PT 109 representan la respuesta de un sensor de sustrato inmovilizado al mismo nivel de fluido de control de i-STAT® PT 2. Con respecto al sensor de sustrato no inmovilizado, tanto el sustrato como el reactivo se imprimieron juntos en el electrodo y se mezclaron junto con la muestra durante la prueba. Con respecto al sensor de sustrato inmovilizado, el sustrato se inmovilizó con PVA en el electrodo y el reactivo se imprimió en la parte superior del sustrato inmovilizado, y no hubo mezcla durante la prueba. El uso del sensor inmovilizado con un control de plasma produjo una mejora significativa en el rendimiento de manera que la corriente eléctrica aumentó de aproximadamente 4 nA a aproximadamente 9 nA y el coeficiente de variación disminuyó de aproximadamente 10 % a aproximadamente 3 %. Estos datos muestran una mejora significativa en el campo de las pruebas de coagulación, de manera que el rendimiento de un dispositivo de punto de atención ahora podría acercarse al rendimiento de un instrumento de laboratorio central (2-3 % CV).

Como se muestra en las Figuras 7A, 7B y 7C, los sensores de microambiente de la presente invención pueden tener el reactivo 110 y la capa de sustrato-polímero inmovilizado 115 colocados en varias disposiciones diferentes con los componentes que interactúan entre sí sin mezclarse, aunque puede desearse cierto grado de oscilación. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 7A, el reactivo 110 puede colocarse dentro o encapsularse por la capa de sustrato-polímero inmovilizado 115 (por ejemplo, el reactivo se integra dentro de la capa de sustrato-polímero inmovilizado). Como se muestra en la Figura 7B, el reactivo 110 puede revestirse sobre la capa de sustrato-polímero inmovilizado 115 (por ejemplo, el reactivo es una capa separada distribuida encima de la capa de sustrato-polímero inmovilizado). Como se muestra en la Figura 7C, el reactivo 110 puede colocarse sustancialmente adyacente a la capa de sustrato-polímero inmovilizado 115 y al menos un transductor del sensor 120 (por ejemplo, el reactivo se coloca dentro del conducto de manera que el reactivo se apoya en o dentro de una distancia interactiva de la capa de sustrato-polímero y/o el al menos un transductor para que sigan funcionando en conjunto). Como se usa en la presente descripción, una distancia interactiva significa menos que la dimensión más larga del sensor con la restricción de que el reactivo se posicione dentro de un mismo plano o en una misma pared/superficie de un conducto que el sensor. Otras variantes también resultarán evidentes para los expertos en la técnica, por ejemplo, el reactivo 110 puede formarse como una combinación del mostrado en las Figuras 7B y 7C, o como se muestra en la Figura 7C con solo parte del reactivo 110 mostrado en la Figura 7B.

Como se muestra en la Figura 8, en algunas realizaciones, la presente invención puede dirigirse a un cartucho de análisis 125 que comprende una cámara de entrada 130 configurada para recibir una muestra de fluido 135 y un conducto 140 conectado de manera fluida a la cámara de entrada 130 y configurado para recibir la muestra de fluido 135 desde la cámara de entrada 130. El conducto 140 puede comprender una serie de sensores de microambiente,

por ejemplo, un primer sensor de microambiente 145 y un segundo sensor de microambiente 150. El primer sensor de microambiente 145 puede comprender un primer reactivo 155 y un primer sustrato 160 (por ejemplo, un sustrato inmovilizado dentro de una capa de polímero) configurado para detectar un primer tiempo de coagulación de diagnóstico. Por ejemplo, el primer sensor de microambiente 145 puede ser un sensor de PT que comprende un primer reactivo 155 que incluye uno o más componentes, como se describe en la presente descripción, específicos para desencadenar la vía de coagulación extrínseca y una primera capa de sustrato 160 que comprende un péptido escindible con trombina con una fracción detectable como se describe en la presente descripción. El segundo sensor de microambiente 150 puede comprender un segundo reactivo 165 y un segundo sustrato 170 (por ejemplo, un sustrato inmovilizado dentro de una capa de polímero) configurado para detectar un segundo tiempo de coagulación de diagnóstico. Por ejemplo, el segundo sensor de microambiente 150 puede ser un sensor de aPTT que comprende un segundo reactivo 165 que incluye uno o más componentes, como se describe en la presente descripción, específicos para desencadenar la vía de coagulación intrínseca y una segunda capa de sustrato 170 que comprende un péptido escindible con trombina con una fracción detectable (por ejemplo, un reactivo y un sustrato inmovilizados dentro de una capa de polímero). Como debe entenderse, aunque el cartucho de análisis 125 descrito anteriormente se describe con respecto a un sensor de PT y un sensor de aPTT, se contemplan varias combinaciones y números de sensores, por ejemplo, un sensor de PT, un sensor de aPTT y un sensor de ACT por la presente invención sin apartarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el primer sensor de microambiente 145 puede ser un sensor de PT, y el segundo sensor de microambiente 150 puede ser un sensor de aPTT o un sensor de ACT. En otro aspecto, el primer sensor de microambiente 145 es un sensor de aPTT, y el segundo sensor de microambiente 150 es un sensor de PT o un sensor de ACT. En otro aspecto, el primer sensor de microambiente 145 es un sensor de ACT, y el segundo sensor de microambiente 150 puede ser un sensor de aPTT o un sensor de PT. En otras realizaciones adicionales, uno de los sensores de microambiente es un sensor de PT, un sensor de aPTT o un sensor de ACT, y otro de los sensores es un sensor para detectar un analito, relacionado o no relacionado con la coagulación.

Ventajosamente, las estructuras de sensor de microambiente de la presente invención se configuran para separar físicamente el uno o más reactivos y sustratos para evitar la activación cruzada y/o interferencia de las vías en cascada una vez que uno o más reactivos y sustratos se han expuesto a la muestra de fluido. Incluso más ventajosamente, la incorporación del sustrato inmovilizado y/o la capa de polímero reactivo en los ensayos de coagulación proporciona la capacidad de realizar los ensayos de coagulación sin requerir o mientras se minimiza la mezcla, por ejemplo, oscilación del fluido de muestra en un conducto, porque ocurre la activación de la coagulación en un área localizada y concentrada sobre el sensor con la posterior propagación de la reacción de prueba en la capa inmovilizada, lo que finalmente da como resultado la oxidación en el transductor.

Capa de Sustrato-Polímero Inmovilizado

En realizaciones preferidas, para separar físicamente el uno o más ensayos entre sí para evitar la activación cruzada y promover la localización de señales electroquímicas u ópticas sobre los transductores, un sustrato inmovilizado y/o una capa de reactivo-polímero puede estamparse selectivamente en los sensores (por ejemplo, revestido sobre el transductor o electrodo de trabajo/detector óptico). Como se muestra en la Figura 9, la capa de polímero inmovilizado 175 puede formarse mediante revestimiento giratorio o mediante microdistribución. Más específicamente, puede utilizarse una matriz de polímeros acuosa que comprende uno o más reactivos y sustratos y un polímero, tal como un polímero foto formable (por ejemplo, alcohol polivinílico (PVA)), para inmovilizar el uno o más sustratos sobre o cerca del transductor 180. También pueden incluirse en la matriz acuosa aditivos que incluyen, pero no se limitan a, una proteína tal como BSA, un azúcar o alcohol de azúcar, tal como sacarosa, sorbitol o manitol. Para los expertos en la técnica de la química de polímeros, la adición de algunas sustancias a la(s) capa(s) de polímero da como resultado una serie de alteraciones que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hinchamiento, coeficientes de difusión, estabilidad de la molécula, porosidad, transporte, cinética de reacción y similares. Estas alteraciones pueden usarse para modular la respuesta del sensor de microambiente según se requiera.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el uno o más sustratos pueden comprender uno o más péptidos escindibles con trombina seleccionados del grupo que consiste en H-D-Phe-Pip-Arg, H-D-Chg-Abu-Arg, CBZ-Gly-Pro-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, H-D-Phe-Pro-Arg, Ciclohexilglicina-Ala-Arg, Tos-Gly-Pro-Arg, Bz-Phe-Val-Arg, Boc-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Pro-Arg, Ac-Val-Hyp-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Val-Pro-Arg, Ac-Gly-Pro-Arg, Ac-(8-amino-3,6, dioxaoctanoil-Gly-Pro-Arg, Ac-Gly-Hyp-Arg y H-D-Chg-Abu-Arg. Opcionalmente, los dos o más de estos sustratos pueden mezclarse para obtener las actividades de trombina y las propiedades de difusión deseadas en el sustrato inmovilizado y/o la capa de polímero reactivo.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el polímero que contiene el sustrato puede comprender uno o más materiales, opcionalmente en forma de matriz. El material para el polímero, por ejemplo, puede seleccionarse del grupo que consiste en PVA, polivinilalcohol de estirilpiridinio (SBQ-PVA), agarosa, poliácridamida, polimetilmetacrilato, N-metilpirrolidona, polivinilpirrolidona, poliimida, un látex formador de película, sefarosa poliuretanos, acrilatos, metacrilatos, polietilenglicoles, ácido poliláctico, poli (ácido láctico co-glicólico), hidroxipropilcelulosa, celulosas, derivados de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, inulina, fructanos, derivados de fructanos, ácido carboxílico, ácido poliglicólico, Elvace, carboximetilcelulosa, ácido poliláctico

y poli (ácido láctico co-glicólico). En algunas realizaciones en las que el material para el polímero comprende celulosas (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa), aditivos tales como un plastificante (por ejemplo, citrato de trietilo, citrato de acetiltriethyl, propilenglicol, glicerina, trimetilolpropano, polietilenglicoles, ácidos grasos y derivados de los mismos) y/o reticulantes (por ejemplo, ácidos carboxílicos, glioxal y cualquier resina que sea reactiva con los grupos hidroxilo disponibles de la celulosa) también pueden incluirse en la matriz acuosa. La reticulación de los materiales también puede afectar el hinchamiento, la permeabilidad, la difusión, la cinética de reacción, etc. de la capa de polímero para modular la respuesta del sensor según se requiera.

Además de la selección del material para el polímero, otro beneficio de inmovilizar el sustrato y/o reactivo incluye el uso de la matriz inmovilizadora como un neutralizador de interferencia localizada. Por ejemplo, la selección del material para el polímero puede depender del tipo de prueba de coagulación de diagnóstico que se va a realizar mediante el uso de la capa de polímero inmovilizado. Por ejemplo, se ha encontrado ventajosa e inesperadamente que la inclusión de SBQ-PVA reticulado o no reticulado en la capa de polímero inmovilizado imparte una propiedad de neutralizante de heparina o insensibilidad a la heparina en la capa de polímero inmovilizado. Por consiguiente, en las realizaciones en las que la prueba de coagulación de diagnóstico que se va a realizar mediante el uso de la capa de polímero inmovilizado es una prueba sensible a la heparina (por ejemplo, se conoce que la prueba de PT es moderadamente sensible a los inhibidores de la coagulación tales como la heparina), el polímero puede seleccionarse para ser un polímero neutralizante de heparina tal como SBQ-PVA reticulado o no reticulado. En algunas realizaciones, el PVA puede ser una sal de estilbizonio foto-activada.

Las Figuras 10 y 11 ejemplifican este concepto de la siguiente manera. Se imprimió directamente un sensor de coagulación con un sustrato de coagulación inmovilizado SBQ-PVA grande (Figura 10) o pequeño (Figura 11). Posteriormente, se imprimió un activador de coagulación PT en la parte superior de la matriz de sustrato inmovilizado. Luego, estos sensores se probaron con los fluidos apropiados para evaluar el tiempo de coagulación. Como con los resultados de las Figuras 5 y 6, un beneficio de imprimir más de la matriz de sustrato inmovilizado es que la cantidad aumentada de matriz de sustrato inmovilizado condujo a un aumento de pA. Además, cuando se añade heparina a la muestra de sangre total, los tiempos de coagulación no son tan prolongados como se espera (Figuras 10 y 11 (curvas de respuesta 181) (pico de heparina) deberían ser más similares a los tiempos de coagulación de las curvas de respuesta 182 (fluidos de control anormalmente largos), pero en realidad se comportan más como sangre total sin heparina (curvas de respuesta 183). Estos resultados reflejan el efecto neutralizante de heparina de un polímero tal como SBQ-PVA. Además, aplicar una mayor cantidad de la matriz inmovilizadora da como resultado un mayor efecto neutralizante (por ejemplo, compare el sesgo entre sangre total y sangre total con heparina en las Figuras 10 y 11). Los datos de la Figura 10 representa una impresión de matriz grande y muestra que hay una extensión del 14 % cuando se adiciona heparina a 1 IU/mL, mientras que en la Figura 11 hay una extensión del 55 % cuando se deposita una cantidad de impresión más pequeña de la matriz neutralizante. En ambas Figuras 10 y 11, la sangre añadida con heparina se comporta más como sangre total inalterada que como un fluido de control anormalmente largo, lo que refleja que hay un efecto neutralizante de heparina/interferente. Estos datos muestran que aumentar el área de la impresión de PVA reduce el efecto interferente de la heparina en el ensayo de PT.

La Figura 12 proporciona evidencia empírica adicional de que puede usarse un SBQ-PVA reticulado para impartir una propiedad neutralizante de heparina o insensibilidad a la heparina a un ensayo de PT de sustrato inmovilizado. Específicamente, la Figura 12 muestra los resultados de un ensayo de TP realizado en una muestra de sangre total (curva de respuesta 184) y una muestra de sangre total (curva de respuesta 185) añadida con 0,4 (curva de respuesta 184) o 1,2 IU/mL (curva de respuesta 185) de heparina sin uso de heparinasa (un reactivo incluido convencionalmente en una prueba de PT para neutralizar la heparina), pero con la adición de cantidades crecientes de SBQ-PVA al mismo tamaño de impresión. Los datos muestran que aumentar la concentración de la capa de SBQ-PVA da como resultado la disminución de las extensiones del tiempo de coagulación de la sangre total en la presencia de heparina. Esto muestra que la respuesta del sensor de microambiente de PT puede modularse para reducir la interferencia de la heparina sin el uso de la costosa heparinasa.

Sin restringirse con consideraciones teóricas, parece que una carga positiva impartida por el SBQ-PVA reticulado o no reticulado puede impartir la propiedad neutralizante de heparina o la insensibilidad a la heparina al ensayo de PT del sustrato inmovilizado. Más particularmente, el grupo colgante SBQ es un catión, el PVA es un anión y la heparina es un anión, y por tanto se plantea la hipótesis de que la repulsión en el área localizada del electrodo a través del SBQ cargado positivamente excluye la heparina del microambiente del sensor inmovilizado o el SBQ cargado positivamente interactúa con la heparina cargada negativamente e incapacita la capacidad de la heparina para actuar sobre los factores de coagulación. Esta teoría se evidencia además por el hecho de que un polímero aniónico tal como hidroxipropilcelulosa puede usarse para pruebas de tiempo de coagulación de diagnóstico que controlan la terapia con heparina (por ejemplo, aPTT y ACT) sin impartir una propiedad neutralizante de heparina o insensibilidad a la heparina al ensayo.

En realizaciones adicionales o alternativas, el polímero puede ser un polímero neutralizante sin heparina que luego podría tratarse o modificarse posteriormente para convertirse en neutralizante de heparina. Por ejemplo, en las realizaciones en las que la prueba de coagulación de diagnóstico que se va a realizar mediante el uso de la capa de polímero inmovilizado es sensible a la heparina, el polímero puede seleccionarse para incluir al menos un

componente neutralizante sin heparina, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en hidroxipropilcelulosa y Elvace, carboximetilcelulosa, ácido poliláctico, ácido poliláctico, poli (ácido láctico co-glicólico), celulosas, derivados de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, inulina, fructosa, fructanos, derivados de fructanos y ácido poliglicólico. Luego, el uno o más componentes del polímero neutralizante sin heparina pueden tratarse o modificarse para generar una capa neutralizante de heparina. En algunas realizaciones, el tratamiento o modificación puede incluir cambiar la carga del uno o más componentes del polímero neutralizante sin heparina, adicionar heparinasa a la matriz del polímero y/o configurar la capa de polímero para unir preferentemente los grupos sulfato en la heparina.

En realizaciones adicionales o alternativas, el polímero puede formarse de un polímero neutralizante sin heparina. Por ejemplo, en las realizaciones en las que la prueba de coagulación de diagnóstico que se va a realizar mediante el uso de la capa de polímero inmovilizado es para controlar la terapia con heparina (por ejemplo, la prueba de aPTT y ACT), la capa de polímero puede incluir al menos un componente neutralizante sin heparina seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en hidroxipropilcelulosa, Elvace, carboximetilcelulosa, ácido poliláctico, ácido poliláctico, poli (ácido láctico co-glicólico), celulosas, derivados de celulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, inulina, fructanos, derivados de fructanos y ácido poliglicólico.

En realizaciones que comprenden el revestimiento giratorio, el sustrato inmovilizado y/o la capa de polímero reactivo puede estamparse fotolitográficamente mediante el uso de luz ultravioleta para reticular el material mediante el uso de una máscara, seguido por la eliminación del material no reticulado de manera que el sustrato inmovilizado y/o la capa de polímero reactivo se reviste selectivamente. En realizaciones que comprenden microdistribución (Ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos núm. 5,554,339), puede aplicarse una cantidad apropiada de cada revestimiento a un área circunscrita opcionalmente por un componente estructural adicional configurado como un límite de contención. Alternativamente, pueden usarse tratamientos de superficies, por ejemplo, exposición a plasmas de gas, para controlar la energía de la superficie y, por lo tanto, la propagación del material micro distribuido.

En algunas realizaciones, el uno o más reactivos y sustratos 187 pueden inmovilizarse dentro de la capa de polímero 175 como se muestra en la Figura 13A. De acuerdo con estos aspectos de la presente invención, la matriz acuosa de sustrato-polímero-reactivo que comprende uno o más sustratos, un polímero tal como un polímero fotoformable (por ejemplo, PVA) y uno o más reactivos pueden utilizarse para inmovilizar el uno o más sustratos y el uno o más reactivos en o cerca el transductor 180. La capa de polímero inmovilizado 175 puede formarse mediante revestimiento giratorio o por microdistribución de la matriz acuosa de sustrato-polímero-reactivo. En realizaciones preferidas, el uno o más reactivos o sustratos 187 para una prueba de aPTT o ACT pueden inmovilizarse dentro de la capa de polímero 175 y el volumen seco de la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado 175 que comprende el uno o más reactivos o sustratos 187 puede estar en el rango de aproximadamente 0,55 - 2,0 nL, preferentemente en el rango de aproximadamente 1,0 -1,5 nL. En algunas realizaciones, la capa de polímero inmovilizado 175 es sustancialmente plana y tiene un grosor en el rango de aproximadamente 0,1 a 100 µm. En realizaciones adicionales o alternativas, la capa de polímero inmovilizado 175 es sustancialmente abovedada y tiene un grosor máximo de la bóveda en el rango de aproximadamente 0,1 a 100 µm. Aunque los reactivos se muestran en la Figura 13A localizados heterogéneamente en la región central de la capa de polímero 175, en realizaciones preferidas el(los) reactivo(s) se dispersa(n) homogéneamente por toda la capa de sustrato-polímero.

En algunas realizaciones, el uno o más reactivos o sustratos 187 pueden formarse como una capa separada sobre y/o adyacente a la capa de polímero inmovilizado 175 como se muestra en las Figuras 13B y 13C. Además, el uno o más reactivos o sustratos pueden localizarse/inmovilizarse juntos o en ubicaciones separadas. De acuerdo con estos aspectos de la presente invención, el uno o más reactivos o sustratos 187 pueden revestirse por giro o imprimirse sobre y/o adyacentes a la capa de polímero inmovilizado 175 (por ejemplo, la capa de PVA) para localizar señales electroquímicas u ópticas sobre o cerca del transductor 180. En realizaciones preferidas, el uno o más reactivos o sustratos 187 para una prueba de PT pueden formarse separados de la capa de polímero inmovilizado 175 y el volumen seco de la capa de polímero inmovilizado 175 puede estar en el rango de 1,5 - 2,2 nL, preferentemente en el rango de 1,60 - 2,00 nL. En algunas realizaciones, la capa de polímero inmovilizado 175 es sustancialmente plana y tiene un grosor en el rango de aproximadamente 0,1 a 100 µm. En realizaciones adicionales o alternativas, la capa de polímero inmovilizado 175 es sustancialmente abovedada y tiene un grosor máximo de la bóveda en el rango de aproximadamente 0,1 a 100 µm.

Diseño de Sensores y Chips

En una realización preferida de una matriz de sensores micro fabricados comprende al menos un transductor (por ejemplo, un electrodo de trabajo o un detector óptico). Por ejemplo, la matriz de sensores micro fabricados puede comprender un par de sensores o transductores de microambiente que comprenden un primer sensor o transductor de microambiente (por ejemplo, un sensor de PT) y, opcionalmente, un segundo sensor o transductor de microambiente (por ejemplo, un sensor de aPTT). En algunas realizaciones, los sensores o transductores de microambiente pueden fabricarse como estructuras adyacentes, respectivamente, en un chip de silicio.

En realizaciones adicionales o alternativas, la matriz de sensores micro fabricados puede además comprender, además del primer sensor o transductor de microambiente y, opcionalmente, el segundo sensor o transductor de microambiente, uno o más sensores de química sanguínea. Por ejemplo, la matriz de sensores puede comprender además uno o más de los sensores configurados para medir uno o más de sodio, potasio, calcio, cloruro, dióxido de carbono, glucosa, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina, pH, presión parcial de CO₂, presión parcial de O₂, lactato, magnesio u otro analito.

En algunas realizaciones, los transductores pueden formarse como electrodos con superficies doradas revestidas con una capa de poliimida foto definida. Por ejemplo, la micro fabricación a nivel de oblea de una realización preferida de la matriz de sensores puede lograrse como se muestra en la Figura 14. Puede usarse un sustrato plano no conductor 190 como una base para la matriz de sensores. Puede depositarse una capa conductora 195 sobre el sustrato 190 por medios convencionales, por ejemplo, impresión conductora o técnica de micro fabricación conocida por los expertos en la técnica para formar al menos un transistor. La capa conductora 195 puede comprender un metal noble tal como oro, platino, plata, paladio, iridio o aleaciones de los mismos, aunque también pueden usarse otros metales no reactivos tales como titanio y tungsteno o aleaciones de los mismos, como también pueden usarse muchos electrodos de grafito no metálicos, polímero conductor u otros materiales.

Por ejemplo, un electrodo base puede comprender una matriz cuadrada de discos de oro de 5-10 µm, por ejemplo, discos de oro de 7 µm, en centros de 15 µm. La matriz puede cubrir una región, por ejemplo, una región circular, de aproximadamente 300 a 900 µm de diámetro, opcionalmente 400-800 µm o aproximadamente 600 µm de diámetro, y puede formarse mediante el foto-estampado de una capa delgada de poliimida o foto-resistente de grosor hasta 1,5 µm sobre un sustrato hecho de una serie de capas que comprenden Si, SiO₂, TiW y/o Au, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el electrodo base tiene un área de trabajo de aproximadamente 130 000 a 300 000 µm cuadrados, el volumen de muestra directamente sobre el sensor puede ser de aproximadamente 0,1-0,3 µL y el volumen de la muestra sobre el chip puede ser de 1-3 µL. De acuerdo con estos aspectos de la presente invención, el conducto en una región del electrodo base tiene una relación de volumen a área del sensor de menos de aproximadamente 6 µL a aproximadamente 1 mm cuadrado, preferentemente menos de aproximadamente 50 mm a aproximadamente 2 mm cuadrados, con mayor preferencia menos de aproximadamente 100 µm a aproximadamente 500 µm cuadrados. Por consiguiente, la matriz de microelectrodos permite una alta eficiencia de recolección de una fracción detectable que es una especie electroactiva con una contribución reducida de cualquier corriente de fondo electroquímica asociada con la capacitancia del metal expuesto. En particular, las aberturas en la capa aislante de poliimida o fotorresistente definen una región de electrodos de oro en la que las especies electroactivas, por ejemplo, p-aminofenol, pueden oxidarse tal como en una reacción de dos electrones por molécula.

Pueden utilizarse técnicas de micro fabricación (por ejemplo, fotolitografía y deposición de plasma) para la construcción de estructuras de sensores de múltiples capas en espacios confinados. Por ejemplo, los métodos para la micro fabricación de inmunosensores electroquímicos sobre sustratos de silicio se describen en la Patente de Estados Unidos núm. 5,200,051 e incluyen, por ejemplo, métodos de distribución, métodos para unir sustratos y reactivos a superficies que incluyen capas foto-formadas y métodos para realizar ensayos electroquímicos.

La matriz de sensores micro fabricados también puede comprender una conexión eléctrica 195 y una capa de polímero inmovilizado 205 (como se describió anteriormente con respecto a las Figuras 4, 7A, 7B y 7C), que se deposita sobre al menos una parte de la capa conductora 195 y/o el sustrato no conductor 190. En la presente invención, la capa de polímero inmovilizado 205 puede ser una capa de polímero poroso que comprende un péptido escindible con trombina con una fracción detectable que se configura para responder a la presencia de trombina activa al producir un cambio que puede medirse.

Como se muestra en las Figuras 15 y 16, en algunas realizaciones, la matriz de sensores micro fabricados puede comprender un chip de silicio 210 que incluye sensores o transductores amperométricos de microambiente 215 y 220 ubicados en diferentes planos verticales (a) y (b) del chip de silicio 210. El sensor 215 puede conectarse mediante el cableado 225 a una primera clavija amperométrica 230 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal) y el sensor 220 puede conectarse mediante el cableado 235 a una segunda clavija amperométrica 240 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). En algunas realizaciones, el sensor 215 puede configurarse como un sensor de aPTT y el sensor 220 puede configurarse como un sensor de PT, ambos se forman en un solo chip de silicio 210 y se colocan dentro de uno o más conducto del cartucho de prueba del punto de atención. Como se ilustra en la Figura 15, el sensor 215 puede construirse con un diseño de retícula objetivo que comprende preferentemente una pluralidad de anillos concéntricos (por ejemplo, 2, 3, 4 o más anillos concéntricos) en un área superior del chip de silicio 210 y el sensor 220 puede construirse con un diseño de retícula objetivo que comprende preferentemente una pluralidad de anillos concéntricos (por ejemplo, 2, 3, 4 o más anillos concéntricos) en un área inferior del chip de silicio 210. Específicamente, el diseño y la disposición de los sensores 215 y 220 en el chip 210 se seleccionan en base a las características de impresión y rendimiento para cada uno de los sensores 215 y 220. Además, aunque los sensores 215 y 220 en el ejemplo de la Figura 15 son sensores amperométricos, pueden usarse otros procesos electroquímicos o procesos ópticos que usan otros sensores electroquímicos u ópticos, por ejemplo, guías de ondas ópticas y chips de cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD). Por ejemplo, puede usarse un sensor potenciométrico para detectar especies de iones tales como Na⁺ o K⁺.

Como se describe en la presente descripción, los sensores o transductores amperométricos 215 y 220 pueden formarse como electrodos con superficies doradas que se exponen (por ejemplo, sin cubierta de poliimida o fotorresistente) al ambiente interior del conducto y configurarse para contactar directamente con una muestra biológica dispuesta dentro del conducto. Los cableados 225 y 235 pueden formarse con superficies doradas que se revisten con una capa fotorresistente o de poliimida foto definida de manera que los cableados 225 y 235 se aíslan de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto. Los cableados 225 y 235 pueden formarse para comprender estructuras de anillo de contención 245 y 250 configuradas para contener la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado. Por ejemplo, la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado (como se describió anteriormente con respecto a las Figuras 4, 7A, 7B y 7C) puede depositarse sobre al menos una parte de los sensores 215 y/o 220 dentro de las estructuras de anillo de contención 245 y/o 250. Los cableados 225 y 235 terminan en la primera clavija amperométrica 230 y la segunda clavija amperométrica 240 respectivamente, que se usan para hacer contacto con un conector en un analizador o lector de cartucho (por ejemplo, un lector de cartucho i-STAT® como se describe en la Patente de Estados Unidos núm. 4,954,087).

En las realizaciones preferidas de la presente invención, el analizador aplica un potencial a través de la primera clavija amperométrica 230 y la segunda clavija amperométrica 240 entre cada uno de los sensores amperométricos 215 y 220 y un electrodo de referencia (descrito en detalle a continuación con respecto a la Figura 17), y mide los cambios de corriente generados por sustrato escindido como una señal electroquímica. La señal electroquímica es proporcional a la concentración del producto en la muestra biológica. Los sensores amperométricos 215 y 220 tienen un potencial aplicado de aproximadamente +0,4 V frente al electrodo de referencia y, en otra realización preferida, los sensores amperométricos 215 y 220 tienen un potencial aplicado de aproximadamente +0,1 V frente al electrodo de referencia. La señal generada por el producto de reacción enzimática a aproximadamente +0,1 V se distingue de la señal generada por el sustrato sin reaccionar a aproximadamente +0,4 V.

En las realizaciones de la invención que usan el péptido escindible con trombina Tos-Gly-Pro-Arg-, H-D-Phe-Pip-Arg o Bz-Phe-Val-Arg unido a una N-fenil-p-fenilendiamina o fracción detectable de N-[p-metoxifenil]-p-fenilendiamina, los sustratos intactos se detectan a una tensión de aproximadamente +0,4 V. Los productos de reacción electrogénica N-fenil-p-fenilendiamina o N-[p-metoxifenil]-p-fenilendiamina se detectan a una tensión de aproximadamente +0,1 V. Por lo tanto, en estas realizaciones, el analizador aplica un potencial a los sensores amperométricos 215 y 220 con la generación de una señal electroquímica que es proporcional a la concentración del sustrato en la muestra biológica. Además, el analizador aplica un potencial a los sensores amperométricos 215 y 220 con la generación de una señal electroquímica que es proporcional a la concentración del producto en la muestra biológica. Después de la hidrólisis del sustrato por trombina, se forma un producto que reacciona en los sensores amperométricos 215 y 220 con la generación de una señal distinguible de la señal generada por el sustrato.

Cabe señalar que las tensiones exactas usadas para detectar amperométricamente el sustrato y el producto variarán en dependencia de la estructura química del sustrato y del producto. Es importante que la diferencia en las tensiones usadas para detectar el sustrato y el producto sea lo suficientemente grande como para prevenir interferencias entre las lecturas. Con algunos sustratos, la tensión requerida para detectar electroquímicamente el sustrato es tan alta que está más allá de la medición práctica en una solución acuosa tamponada. En estos casos, solo es necesario que el producto sea detectable amperométricamente.

En algunas realizaciones, el chip de silicio 210 mostrado en la Figura 15 puede incluir además sensores conductométricos de múltiples conductos 255 y 260 (por ejemplo, sensores de hematocrito). Los sensores conductométricos 255 y 260 se configuran para determinar la llegada y/o salida de la muestra biológica en los sensores amperométricos 215 y 220. Más específicamente, los sensores conductométricos 255 y 260 se encuentran perpendiculares a una longitud del conducto o conducto de sensor, y puede usarse una resistencia eléctrica entre pares de electrodos para cada sensor para controlar una posición relativa de un frente de fluido de la muestra biológica. En los extremos, una lectura de circuito abierto indica que la muestra biológica se ha expulsado de los sensores amperométricos 215 y 220 y una lectura de circuito cerrado indica que los sensores amperométricos 215 y 220 se cubren con la muestra biológica.

Como se muestra en la Figura 15, el sensor conductométrico 255 puede comprender al menos dos electrodos 265 y 270 (es decir, primer par de electrodos) colocadas aguas arriba de un punto medio del sensor amperométrico 215. Los electrodos 265 y 270 pueden conectarse a través de los cableados 275 y 280 a una clavija de baja conductimétrica 285 y una fuente de AC o clavija de alta conductimétrica 290, respectivamente (por ejemplo, conectores eléctricos temporales). Los cableados 275 y 280 pueden formarse con una superficie dorada que se reviste con una capa fotorresistente o de poliimida foto definida de manera que los cableados 275 y 280 se aíslan de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro de los conductos. El sensor conductométrico 260 puede comprender al menos dos electrodos 295 y 300 (es decir, un segundo par de electrodos) colocadas aguas abajo de un punto medio del sensor amperométrico 220. Los electrodos 295 y 300 pueden conectarse a través de los cableados 275 y 280 a una clavija de baja conductimétrica 285 y una fuente de AC o clavija de alta conductimétrica 290, respectivamente (por ejemplo, conectores eléctricos temporales). Como tal, en algunas realizaciones, el fluido alcanza el primer par de electrodos en un primer conducto de fluidos (por ejemplo, antes de llegar al sensor

amperométrico 215), luego llega posteriormente al segundo par de electrodos en un segundo conducto de fluidos (por ejemplo, después de llegar al sensor amperométrico 220).

Como se muestra en la Figura 16, en otra realización, el chip de silicio 210 puede incluir además un tercer sensor conductimétrico 301 que comprende al menos dos electrodos 302 y 303. Los electrodos 302 y 303 pueden conectarse mediante el cableado 304 a una segunda fuente de AC o a la clavija de alta conductimétrica 305 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). De acuerdo con estos aspectos de la presente invención, el uso de un tercer sensor permite dos eventos de detección de fluidos binarios, por ejemplo, ambos son APAGADO/ENCENDIDO, lo cual es fácilmente detectable con los circuitos actuales y las limitaciones del software. En el caso de dos sensores de conductividad (mostrados en la Figura 15), el circuito de corriente y el software se basan en la capacidad de detectar dos "caídas" en la resistencia de la muestra en rápida sucesión. Típicamente, la primera caída es grande, ya que pasa de un estado seco a un estado húmedo y el circuito se completa. La segunda caída en resistencia, cuando la muestra llega en el segundo conducto de fluidos, es mucho más pequeña y por lo tanto más difícil de diferenciar del ruido de la señal y de los pequeños cambios en la señal. Además, la amplitud de cada cambio de resistencia varía en dependencia de las propiedades de la muestra. Por consiguiente y ventajosamente, en algunas realizaciones, la disposición de tener tres sensores conductimétricos permite dos trayectorias de conductividad conmutables mediante el uso del sensor conductimétrico 255 (mostrado en la Figura 15) y el sensor conductimétrico 301 (mostrado en la Figura 16).

Como se muestra en la Figura 17, en algunas realizaciones, la matriz de sensores micro fabricados puede comprender además un chip de tierra 306 que incluye un sensor o electrodo 307 de referencia. De acuerdo con aspectos de la presente invención, en los que los sensores 215 y 220 son sensores amperométricos, el electrodo de referencia 307 puede configurarse como un contra electrodo para completar el circuito. En una realización preferida, el electrodo de referencia 307 puede comprender metal de plata (Ag) y su sal de plata (AgCl) depositada sobre un sustrato sólido (es decir, un electrodo de referencia Ag/AgCl). El electrodo de referencia 307 puede conectarse mediante el cableado 308 a una clavija de referencia 309 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). La matriz de sensores micro fabricados puede diseñarse de manera que el chip de tierra 306 se coloque aguas arriba del chip semiconductor 210 como se describe con más detalle con respecto a las Figuras 15 y 16. Por ejemplo, la matriz de sensores puede comprender además uno o más chips sensores adicionales (no mostrados) configurados para detectar varios analitos de interés potencial, tales como troponina I, troponina T, CKMB, procalcitonina, bHCG, HCG, NTproBNP, proBNP, BNP, mioglobina, hormona paratiroidea, d-dímero, NGAL, galectina-3 y/o PSA, entre otros analitos.

Como se muestra en la Figura 18, en realizaciones preferidas, la matriz de sensores micro fabricados puede comprender un chip de silicio 310 que incluye sensores o transductores amperométricos de microambiente 315 y 320 ubicados en un mismo plano vertical (a) del chip de silicio 310. El sensor 315 puede conectarse mediante el cableado 325 a una primera clavija amperométrica 330 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal) y el sensor 320 puede conectarse mediante el cableado 335 a una segunda clavija amperométrica 340 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). En algunas realizaciones, el sensor 315 puede configurarse como un sensor de aPTT y el sensor 320 puede configurarse como un sensor de PT, ambos se forman en un solo chip 310 y se colocan dentro del conducto del cartucho de prueba del punto de atención. Como se ilustra en la Figura 18, el sensor 315 puede construirse con un diseño en forma de rosquilla en una posición aguas arriba de la del sensor 320 construido con un diseño de retícula objetivo que comprende una pluralidad de anillos concéntricos (por ejemplo, 2, 3, 4 o más anillos concéntricos). Específicamente, el diseño y la disposición de los sensores 315 y 320 en el chip 310 se seleccionan en base a las características de impresión y rendimiento para cada uno de los sensores 315 y 320. Además, aunque los sensores 315 y 320 en el ejemplo de la Figura 18 son sensores amperométricos, pueden usarse otros procesos electroquímicos o procesos ópticos que usan otros sensores electroquímicos u ópticos. Por ejemplo, puede usarse un sensor potenciométrico para detectar especies de iones tales como Na^+ o K^+ .

Como se describe en la presente descripción, los sensores o transductores 315 y 320 pueden formarse como electrodos con superficies doradas que se exponen (por ejemplo, sin revestimiento de poliimida o fotorresistente) al ambiente interior del conducto y configurarse para contactar directamente con una muestra biológica dispuesta dentro del conducto. Los cableados 325 y 335 pueden formarse con superficies doradas que se revisten con una capa de poliimida foto definida de manera que los cableados 325 y 335 se aíslan de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto. Los cableados 325 y 335 pueden formarse para comprender estructuras de anillo de contención 345 y 350 configuradas para contener la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado. Por ejemplo, la capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado (como se describió anteriormente con respecto a las Figuras 4, 7A, 7B y 7C) puede depositarse sobre al menos una parte de los sensores 315 y/o 320 dentro de las estructuras de anillo de contención 345 y/o 350. Los cableados 325 y 335 terminan en la primera clavija amperométrica 330 y la segunda clavija amperométrica 340 respectivamente, que se usan para hacer contacto con un conector en un analizador o lector de cartucho (por ejemplo, un lector de cartucho i-STAT® como se describe en la Patente de Estados Unidos núm. 4,954,087).

En algunas realizaciones, el chip de silicio 310 incluye además un electrodo de referencia 355 integrado. De acuerdo con aspectos de la presente invención, en la que los sensores 315 y 320 son sensores amperométricos, el electrodo de referencia 355 se configura como un contra electrodo para completar el circuito. El electrodo de referencia 355

puede comprender metal de plata (Ag) y su sal de plata (AgCl) depositada sobre un sustrato sólido (es decir, un electrodo de referencia Ag/AgCl). El electrodo de referencia puede conectarse mediante el cableado 360 a una tierra de AC y a la clavija de referencia 365 (por ejemplo, un conector eléctrico temporal). El cableado 360 puede formarse con una superficie dorada que se reviste con una capa fotorresistente o de poliimida foto definida de manera que el cableado 360 se aísla de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto. En realizaciones preferidas el electrodo de referencia 355 se diseña en un patrón de tablero de ajedrez como se ilustra en la Figura 18 para mejorar la humectabilidad de una superficie del electrodo de referencia 355. Específicamente, se ha encontrado inesperadamente que la humectabilidad del electrodo de referencia 355 puede mejorarse mediante el uso del patrón de tablero de ajedrez debido a que el AgCl es relativamente hidrófobo y puede promover la formación de una burbuja de aire sobre la superficie del electrodo de referencia 355 cuando un parche sólido de AgCl se usa, lo que da como resultado un circuito defectuoso.

Como se describió en detalle anteriormente con respecto al chip de silicio 310 y como se muestra en la Figura 19, en las realizaciones preferidas de la presente invención el analizador aplica un potencial a través de la primera clavija amperométrica 330 y la segunda clavija amperométrica 340 entre cada uno de los sensores amperométricos 315 y 320 y el electrodo de referencia 355, y mide los cambios de corriente generados por el sustrato escindido como una señal electroquímica. La señal electroquímica es proporcional a la concentración del producto en la muestra biológica. Los sensores amperométricos 315 y 320 tienen un potencial aplicado de aproximadamente +0,4 V frente al electrodo de referencia 355 y, en otra realización preferida, los sensores amperométricos 315 y 320 tienen un potencial aplicado de aproximadamente +0,1 V frente al electrodo de referencia 355. La señal generada por el producto de reacción enzimática a aproximadamente +0,1 V se distingue de la señal generada por el sustrato sin reaccionar a aproximadamente +0,4 V.

Con referencia de nuevo a la Figura 18, en algunas realizaciones, el chip de silicio 310 puede incluir además sensores conductimétricos 370 y 375 (que también pueden funcionar como sensores de hematocrito). Los sensores conductimétricos 370 y 375 pueden dividirse para formar dos pares de sensores con uno en cada extremo del chip 310. Los sensores conductimétricos 370 y 375 se configuran para determinar la llegada y/o salida de la muestra biológica en los sensores amperométricos 315 y 320, respectivamente. Más específicamente, los sensores conductimétricos 370 y 375 se encuentran en un arco que es perpendicular a una longitud del conducto o conducto de sensor, y puede usarse una resistencia eléctrica entre pares de electrodos para cada sensor para controlar una posición relativa de un frente de fluido de la muestra biológica. En los extremos, una lectura de circuito abierto indica que la muestra biológica se ha expulsado de los sensores amperométricos 315 y 320 y una lectura de circuito cerrado indica que los sensores amperométricos 315 y 320 se cubren con la muestra biológica.

Como se muestra en la Figura 20, el sensor conductimétrico 370 puede comprender al menos dos electrodos 380 y 385 (es decir, primer par de electrodos) colocados a una distancia predeterminada (d_1) entre sí. En algunas realizaciones, el sensor conductimétrico 370 puede colocarse en el chip de silicio 310 con relación a un punto medio (v) del sensor amperométrico 315 (por ejemplo, aguas arriba, aguas abajo o en línea con el punto medio (v)). El electrodo 380 puede conectarse mediante el cableado 390 a una clavija de fuente de AC 395 (por ejemplo, conector eléctrico temporal). El electrodo 385 puede conectarse mediante el cableado 400, el electrodo de referencia 355 y el cableado 360 a la tierra de AC y la clavija de referencia 365. Los cableados 390 y 400 pueden formarse con una superficie dorada que se reviste con una capa fotorresistente o de poliimida foto definida de manera que los cableados 390 y 400 se aíslan de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto.

El sensor conductimétrico 375 puede comprender al menos dos electrodos 405 y 410 (es decir, un segundo par de electrodos) colocados a una distancia predeterminada (d_2) entre sí. En algunas realizaciones, el sensor conductimétrico 375 puede colocarse en el chip de silicio 310 con relación a un punto medio (x) del sensor amperométrico 320 (por ejemplo, aguas arriba, aguas abajo o en línea con el punto medio (x)). El electrodo 405 puede conectarse mediante el cableado 415, el electrodo de referencia 355 y el cableado 360 a la tierra de AC y la clavija de referencia 365. El electrodo 410 puede conectarse mediante el cableado 420 y el cableado 390 a la clavija de la fuente de AC 395. Los cableados 415 y 420 pueden formarse con una superficie dorada que se reviste con una capa fotorresistente o de poliimida foto definida de manera que los cableados 415 y 420 se aíslan de la exposición a la muestra biológica dispuesta dentro del conducto.

En realizaciones preferidas, los sensores conductimétricos 370 y 375 se configuran para detectar la llegada de la muestra biológica dentro del conducto a los sensores amperométricos 315 y 320, respectivamente. Como se muestra en la Figura 21, la llegada de la muestra biológica a los sensores amperométricos 315 y 320 puede detectarse en base a la determinación de una primera caída de resistencia 425 cuando la muestra biológica alcanza el sensor de conductividad 370 y una segunda caída de resistencia 430 cuando la muestra biológica alcanza el sensor de conductividad 375. En realizaciones adicionales o alternativas, la determinación de un aumento o pico (no mostrado) en la resistencia en uno o ambos de los sensores conductimétricos 370 y 375 puede usarse para detectar la presencia de una burbuja de aire dentro del conducto que se coloca sobre uno o ambos sensores amperométricos 315 y 320.

Un perfil de resistencia para los sensores conductimétricos 370 y 375 debería proporcionar preferentemente dos caídas de resistencia bien definidas de aproximadamente la misma amplitud. En algunos diseños de chips, como se

muestra en la Figura 22A, los sensores conductimétricos 435 y 440 pueden configurarse como barras separadas en los extremos opuestos del chip cerca de los respectivos sensores amperométricos 445 y 450. Sin embargo, se encuentra que el perfil de resistencia 455 para tal diseño incluye a menudo una etapa adicional 460, que es atribuible a que la muestra se detiene temporalmente en el electrodo de referencia 465 debido a la naturaleza hidrófoba del electrodo de referencia 465. Como debe entenderse, esto podría dificultar descifrar la segunda caída de resistencia como el humedecimiento del electrodo de referencia 465 o como la muestra que llega al segundo sensor conductimétrico 440. Además, el tiempo entre las dos etapas es bastante corto, lo que dificulta la sincronización, y la caída de resistencia de la segunda llegada es mucho menor en comparación con la primera caída, lo que dificulta la detección.

Por consiguiente, como se muestra en la Figura 22B, el diseño del chip implementado en las realizaciones preferidas de la presente invención utiliza los sensores conductimétricos 370 y 375, cada uno de los cuales se divide para comprender al menos dos electrodos 380, 385 y 405, 410 separados a distancias predeterminadas (d1) y (d2), respectivamente. Como se ilustra en el perfil de resistencia 470, las caídas de resistencia dominante 425 y 430 ocurren en los dos pares de sensores conductimétricos 370 y 375. Por lo tanto, se reduce el impacto de la caída de resistencia adicional 460 (mostrada en la Figura 22A) observada a partir del humedecimiento del electrodo de referencia 355. Además, los sensores conductimétricos 370 y 375 se colocan en la parte delantera y trasera del chip para aumentar el tiempo entre las caídas de resistencia 425 y 430 para diferenciar mejor las caídas de resistencia 425 y 430. Además, en algunas realizaciones, la separación o distancia predeterminada (d1) proporcionada entre los electrodos 380 y 385 es un valor "n" mayor que el de la separación o distancia predeterminada (d2) proporcionada entre los electrodos 405 y 410 de manera que una amplitud de la segunda caída de resistencia 430 aumenta sobre una caída de resistencia 475 (mostrada en la Figura 22A) del diseño de chip alternativo. Por ejemplo, (d1) puede construirse dos veces más grande que la de (d2) para lograr un aumento de aproximadamente 1000 ohmios en la amplitud de la segunda caída de resistencia. El aumento en (d1) sobre el de (d2) aumenta efectivamente la relación de caídas de resistencia para el diseño de chip mostrado en la Figura 22B por encima de la relación de caídas de resistencia para el diseño de chip mostrado en la Figura 22A. Ventajosamente, este aumento en las caídas de resistencia permite una mejor detección de la llegada de la muestra biológica en los sensores conductimétricos 370 y 375 durante una posición encendido/en marcha de motor o bomba 480.

En algunas realizaciones, los procesos pueden incluir mover continuamente la muestra biológica hacia adelante y hacia atrás sobre el chip a una velocidad controlada. Controlar el tiempo durante el cual los sensores conductimétricos 370 y 375 permanecen como circuitos abiertos y cerrados controla la posición en la que la muestra biológica cambia de dirección. Por ejemplo, una bomba neumática dentro del analizador puede configurarse para hacer oscilar la muestra biológica en el conducto con el borde posterior de la muestra biológica colocado en la región del sensor conductimétrico 370 para disolver el sustrato en esa parte de la muestra cerca del borde posterior. La oscilación puede ser a una frecuencia en el rango de 0,2 a 10 hercios durante un período en el rango de 1 a 100 segundos. En un método preferido, la oscilación puede ser a una frecuencia en el rango de aproximadamente 1,5 hercios durante un período de aproximadamente 20 segundos. En otro método preferido, la oscilación puede ser a una frecuencia de aproximadamente 0,3 hercios y los sensores amperométricos 315 y 320 (como se muestra en la Figura 20) pueden configurarse para generar una señal en cada oscilación. Si están presentes los eritrocitos en la muestra biológica, la oscilación puede ser a una frecuencia adecuada para prevenir la sedimentación de eritrocitos en los sensores amperométricos 315 y 320.

En algunas realizaciones, los sensores amperométricos 315 y 320 determinan la concentración de producto cada vez que la muestra biológica se hace oscilar más allá de los sensores amperométricos 315 y 320. Por ejemplo, el analizador puede almacenar una primera señal de sensor amperométrico para cada uno de los sensores amperométricos 315 y 320 y las señales posteriores de los sensores amperométricos 315 y 320 pueden almacenarse y compararse con la primera y otras señales almacenadas para determinar una tasa máxima de cambio en las señales del sensor amperométrico. Estos puntos de datos pueden analizarse luego para determinar una fracción fija de una tasa máxima de cambio de las señales del sensor amperométrico. Por tanto, estos puntos de datos pueden usarse para determinar un parámetro de coagulación de interés para cada uno de los sensores amperométricos 315 y 320.

En realizaciones alternativas, los sensores o transductores pueden formarse como un detector óptico, por ejemplo, un chip de cámara CCD y una guía de ondas ópticas. El detector óptico puede ser un detector de emisión de fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia de la fracción detectable o un detector de absorbancia por la fracción detectable. En tales realizaciones, la fracción detectable puede ser un tinte óptico, un emisor de fluorescencia, un emisor de quimioluminiscencia o un emisor de bioluminiscencia.

En otras realizaciones, el sensor o los transductores pueden formarse como una tira reactiva, por ejemplo, una tira reactiva de glucosa, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos núm. 13/724,348. Por ejemplo, puede incluirse una tira reactiva dentro de los cartuchos descritos en la presente descripción. En algunas realizaciones, la muestra puede colocarse manualmente en la tira reactiva y, como tal, los sistemas de microfluidos descritos en la presente descripción no necesitarían incluirse con tales realizaciones. Como se conoce bien en la técnica, los dispositivos de tiras reactivas de glucosa pueden incluir elementos de fluidos capilares pasivos para suministrar la muestra a un sensor o matriz de sensores.

Sistemas y Procesos para el Análisis de Muestras

Como se muestra en la Figura 23, el sistema 500 de la presente invención puede comprender un dispositivo sensor o cartucho desechable autónomo 505 y un dispositivo o instrumento lector 510 (por ejemplo, un analizador). En algunas realizaciones, el cartucho 505 es un dispositivo de un solo uso configurado para ser desechable después de un solo uso. Una muestra de fluido (por ejemplo, sangre total) que se va a medir se extrae en un orificio de entrada de muestra o puerto 515 en el cartucho 505, y el cartucho 505 puede insertarse en el lector 510 a través de una abertura ranurada 520. El lector 510 puede comprender un procesador configurado para realizar mediciones de concentraciones de analitos, mediciones de resistencias, identificar analitos o conjuntos de analitos que un chip se configura para medir y/o determinaciones del tiempo de coagulación de diagnóstico dentro de la muestra de fluido, como se describe en la presente descripción con más detalle. Las mediciones y determinaciones realizadas por el lector 510 pueden enviarse a una pantalla 525 u otro dispositivo de salida, tal como una impresora o un sistema de gestión de datos 530 a través de un puerto 535 en el lector 510 a un puerto de ordenador 540. La transmisión puede ser a través de Wifi, enlace Bluetooth, infrarrojos y similares. En realizaciones donde los sensores 545 en el cartucho 505, por ejemplo, sensores de microambiente, se basan en principios electroquímicos de funcionamiento, (por ejemplo, un primer sensor y opcionalmente un segundo sensor) pueden configurarse para hacer contacto eléctrico con el lector 510 a través de un conector eléctrico 550. Por ejemplo, el conector puede ser del diseño descrito en la Patente de Estados Unidos núm. 4,954,087 de propiedad conjunta. En algunas realizaciones, los sensores de PT y aPTT pueden configurarse para conectarse con un conector eléctrico de un medidor de prueba dentro del lector 510 a través del conector eléctrico 550 (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núms. 5,096,669 y 4,954,087). El lector 510 también puede incluir un método para la compensación automática del flujo de fluido en el cartucho 505, como se describe en la Patente de Estados Unidos núm. 5,821,399 de propiedad conjunta.

En una realización, como se muestra en la Figura 24, el dispositivo o cartucho de detección desechable autónomo 555 puede comprender una cubierta 560, una base 565 y una junta adhesiva de película delgada (no mostrada) que se dispone entre la base 565 y la cubierta 560. El cartucho 555 puede configurarse para su inserción en el lector 510 y, por lo tanto, el cartucho 555 puede comprender una pluralidad de conexiones mecánicas y eléctricas (no mostradas) para este propósito. Ventajosamente, una característica del cartucho 555 es que una vez que se carga una muestra biológica o de fluido dentro del cartucho 555, el análisis de la muestra biológica o de fluido puede completarse y el cartucho 555 puede desecharse sin que un operador u otros contacten con la muestra biológica o de fluido.

Con referencia a la Figura 24, la cubierta 560 puede hacerse de un material rígido, preferentemente plástico, y capaz de deformaciones repetitivas en las regiones de bisagra flexibles 570, 575 y 580 sin agrietarse. La cubierta 560 puede comprender una tapa 585, unida a un cuerpo principal de la cubierta 560 por la bisagra flexible 570. En funcionamiento, después de la introducción de la muestra biológica o de fluido en una cámara de retención de muestras 590 a través de un puerto de entrada de muestra 595, la tapa 585 puede asegurarse sobre una entrada al puerto de entrada de muestra 595, lo que previene fugas de la muestra. La tapa 585 puede mantenerse en su lugar mediante un gancho 600. La cubierta 560 puede comprender además dos miembros deformables 605 y 610 que pueden moverse con relación al cuerpo de la cubierta 560, y que pueden unirse a la cubierta 560 por las regiones de bisagra flexible 575 y 580.

El miembro deformable 610 puede configurarse para operarse por un primer medio de bombeo de manera que se ejerza una fuerza sobre una bolsa de aire compuesta de la cavidad 615 y la junta. El funcionamiento del miembro deformable 610 desplaza el fluido dentro de los conductos del cartucho 555. El miembro deformable 605 puede configurarse para operarse por un segundo medio de bombeo de manera que se ejerza una fuerza sobre la junta, que puede deformarse debido a las hendiduras cortadas en la misma. En algunas realizaciones, la deformación de la junta puede transmitir presión sobre un paquete de aluminio que contiene fluido lleno con un fluido, por ejemplo, aproximadamente 130 μ L de solución de análisis/lavado, un fluido de control o fluido calibrante, ubicado en la cavidad 620, lo que rompe el paquete de aluminio y expulsa el fluido en el conducto 625 para su uso posterior en otros conductos durante el análisis de la muestra. Como debe entenderse, si bien los formatos de ensayo de coagulación generalmente no requieren el uso de estos fluidos, los fluidos generalmente pueden requerirse en un solo dispositivo que combina las pruebas de coagulación con otras pruebas, por ejemplo, un fluido de lavado en inmunoensayos para analitos tal como BNP y troponina y un fluido calibrante en pruebas químicas tal como potasio, creatinina y glucosa. En realizaciones alternativas, la deformación de la junta puede transmitir presión sobre una bolsa de aire compuesta de la cavidad 620 para desplazar el fluido dentro de los conductos del cartucho 555. En otras realizaciones adicionales, los segundos medios de bombeo pueden no operar sobre la cavidad 620 y, en cambio, la cavidad 620 puede configurarse como una cámara de residuos.

La acción adicional en el cartucho 555 generada por mecanismos dentro del lector 510 (descrito con respecto a la Figura 23) aplicados al cartucho 555 puede usarse para inyectar uno o más segmentos de aire en la muestra biológica o de fluido en posiciones controladas dentro de la cámara de retención de muestras 590 y el conducto 630. Los segmentos de aire pueden usarse para lavar una superficie de sensor de la matriz de sensores y el conducto circundante 630 con una cantidad mínima de fluido (por ejemplo, un ciclo de lavado limitado en el que el volumen de lavado puede ser menos de cincuenta veces el volumen de la muestra biológica o de fluido y/o menos de tres ciclos independientes de tampón de lavado limpio (por ejemplo, tres etapas de lavado independientes con tampón de

lavado nuevo)), como debe entenderse por los expertos en la técnica de los procedimientos de inmunoensayo. Por ejemplo, la cubierta 560 puede comprender además un orificio cubierto por una película fina y flexible. En funcionamiento, la presión ejercida sobre la película puede expulsar uno o más segmentos de aire al conducto 630 a través de un pequeño orificio en la junta. En algunas realizaciones, el área de la sección transversal del conducto 630 puede estar en el rango de aproximadamente 0,1 mm² a aproximadamente 10 mm².

En algunas realizaciones, una superficie inferior de la cubierta 560 comprende además la cámara de retención de muestras 590, el conducto 630 y otro conducto 635 (por ejemplo, un conducto de residuos). La cámara de retención de muestras 590 y el conducto 630 pueden incluir una o más constricciones o topes capilares 640 y 642 que controlan el flujo de fluido al proporcionar resistencia al flujo de la muestra biológica o de fluido. Los revestimientos opcionales (no mostrados), por ejemplo, revestimientos de reactivo seco, pueden proporcionar superficies hidrófobas en el conducto 630, que junto con los orificios de la junta controlan el flujo de fluido entre la cámara de retención de muestras 590 y el conducto 635. La cámara de retención de muestras 590 puede configurarse para conectar el puerto de entrada de muestras 595 al conducto 630 en el cartucho ensamblado 555.

De acuerdo con aspectos de la presente invención en que hay múltiples chips (por ejemplo, un chip de tierra y un chip sensor), el corte 645 puede alojar uno o más chips sensores 650 que comprenden al menos un sensor 655 (por ejemplo, un sensor de microambiente de PT, aPTT o ACT), o una superficie sensible, junto con un sensor o sensores conductimétricos opcionales 660. El corte 665 puede alojar un chip de tierra 670 que comprende un electrodo de tierra 675 si es necesario como una trayectoria de corriente de retorno para un sensor electroquímico, y también puede alojar un sensor conductimétrico opcional. De acuerdo con aspectos de la presente invención en la que hay un solo chip (por ejemplo, un chip combinado de tierra y sensor), el corte 665 y el chip de tierra 670 pueden no incluirse con el cartucho 555.

En algunas realizaciones, puede proporcionarse un medio medición que comprende la cámara de retención de muestras 590 limitada por la constricción o tope capilar 640 y que tiene a lo largo de la longitud de la cámara de retención de muestras 590 un punto de entrada de aire 680 desde la bolsa que comprende la cavidad 615. La presión de aire ejercida en el punto de entrada 680 impulsa un volumen medido de la muestra más allá de la constricción o tope capilar 640. Por lo tanto, un volumen medido de muestra puede determinarse por un volumen de la cámara de retención de muestras 590 entre el punto de entrada de aire 680 y la constricción o tope capilar 640. Una cantidad de la muestra correspondiente a este volumen puede desplazarse al conducto 630 cuando se desplaza el miembro deformable 605. Por lo tanto, esta disposición puede proporcionar un medio de medición para suministrar una cantidad medida de una muestra no medida en los diversos conductos aguas abajo del cartucho 555. La medición puede ser ventajosa en algunas realizaciones si se requiere la cuantificación de un analito. Por lo tanto, un operador puede verse aliviado de medir con precisión el volumen de la muestra antes de la medición, lo que ahorra tiempo, esfuerzo y aumenta la precisión y reproducibilidad.

En realizaciones preferidas, se describe un proceso para usar un cartucho para determinar los tiempos de coagulación de diagnóstico en una muestra de sangre total. El proceso puede incluir la introducción de una muestra de fluido no medido en la cámara de retención de muestras 590 del cartucho 555 a través del puerto de entrada de muestras 595 (como se muestra en la Figura 24). El tope capilar 640 previene el paso de la muestra de fluido al conducto 630 en esta etapa, y la cámara de retención de muestras 590 se llena con la muestra. La tapa 585 se cierra para prevenir la fuga de la muestra de fluido del cartucho 555. Luego, el cartucho 555 puede insertarse en el dispositivo o aparato de lectura 510, como se muestra en la Figura 23 y se describe además en la Patente de Estados Unidos núm. 5,821,399. En algunas realizaciones, la inserción del cartucho en el aparato de lectura 510 activa un mecanismo que perfora el paquete que contiene fluido ubicado en la cavidad 620 cuando el paquete se presiona contra un pico (no mostrado). De esta manera, el fluido puede expulsarse a uno o más conductos (por ejemplo, el conducto 630) que llegan en secuencia en la región de sensor. Posteriormente, el funcionamiento de un medio de bomba (por ejemplo, una bomba neumática) aplica presión a la bolsa de aire compuesta de la cavidad 615, lo que fuerza aire a través de un conducto hacia la cámara de retención de muestras 590 en el punto de entrada de aire 680. El tope capilar 640 delimita una parte medida de la muestra de fluido original. La parte medida de la muestra se expulsa luego a través del tope capilar 640 mediante la presión de aire producida dentro de la bolsa de aire compuesta de la cavidad 615. La muestra pasa al conducto 630 y entra en contacto con uno o más reactivos, el uno o más sustratos (por ejemplo, una capa de reactivo-sustrato-polímero inmovilizado) y/o el uno o más sensores que comprenden uno o más transductores y opcionalmente el electrodo de referencia ubicado dentro del corte 665.

Como también se muestra en la Figura 24, para promover (i) la difusión de uno o más reactivos en la muestra de fluido, o la difusión de la muestra en la capa de polímero que contiene los reactivos (en dependencia de la realización específica), (ii) la activación de la cascada de coagulación por una de dos vías para generar trombina, (iii) la difusión de la trombina activa a través del sustrato inmovilizado y/o capa de polímero reactivo, (iv) la escisión del péptido escindible con trombina, (v) la activación de la fracción detectable, y/o (vi) la detección de la fracción detectable por el al menos un transductor, la muestra de fluido puede colocarse dentro del conducto 630 para contactar con uno o más reactivos y/o sustratos, la una o más capas de polímero inmovilizados y/o el uno o más sensores, por ejemplo, sensores de microambiente, durante un período de tiempo predeterminado.

El uso de un cartucho se ilustra en la presente descripción mediante una realización específica en la que se determina el tiempo de coagulación de diagnóstico para una muestra de fluido, que se introduce en la cámara de retención de muestras del cartucho seguido de la inserción en el dispositivo de lectura del cartucho. El dispositivo de lectura del cartucho hace contacto eléctrico con los electrodos/sensores a través de almohadillas y realiza ciertas pruebas de diagnóstico. Las pruebas de diagnóstico determinan si hay fluido o muestra en los conductos mediante el uso de los electrodos de conductividad; determinan si hay cortocircuitos eléctricos en los electrodos; y aseguran que el sensor y los electrodos de tierra se equilibren térmicamente a, preferentemente, 37 °C antes del ciclo de ensayo.

En realizaciones preferidas, una parte medida de la muestra de fluido, preferentemente entre 4 y 200 μL , con mayor preferencia entre 4 y 20 μL , y con la máxima preferencia 7 μL , puede usarse para realizar el ensayo, mientras que un subvolumen (entre 0,1 y 3,5 μL) del mismo puede usarse para contactar los electrodos/sensores. La muestra de fluido se coloca con respecto a la región de sensor de manera que una parte de la muestra de fluido se coloca sobre el uno o más reactivos, el uno o más sustratos (por ejemplo, capas de polímero inmovilizado) y el uno o más sensores que comprenden uno o más transductores y el electrodo de tierra. Después del período de tiempo predeterminado, por ejemplo, 0-10 segundos de oscilación en la sección superior o inferior de 630 (o en cualquiera de los conductos de ensayo en las Figuras 24, 25, 26, 31, 34, 36 por ejemplo) la muestra puede moverse a un segundo conducto o área para mezclas o interacciones posteriores, o volverse estático o bloquearse dentro del conducto(s) o cartucho antes de la generación de la señal. Pueden usarse uno o más sensores de conductividad en el chip sensor para controlar estos procesos como se describe con respecto a las Figuras 20, 21, 22A y 22B. Durante la posterior división o desvío de los fluidos, puede haber un paso a través de elementos controlados por presión o tamaño. Estos aspectos se describen con más detalle más adelante.

Durante el tiempo de contacto entre la muestra y los sensores, (i) los reactivos modificadores tienen tiempo para difundirse en la muestra de fluido o la muestra de fluido tiene tiempo para difundirse en los reactivos modificadores (que podrían inmovilizarse en algunas realizaciones) para promover la activación de la cascada de coagulación por una de dos vías para generar trombina, (ii) la trombina activa tiene tiempo para difundirse a través de una capa de sustrato, por ejemplo, un sustrato inmovilizado y/o una capa de polímero reactivo, y escindir el péptido escindible con trombina, y (iii) la fracción detectable activada tiene tiempo para detectarse por el al menos un transductor.

Función de Fluidos y Configuraciones de Cartuchos

En realizaciones preferidas, se proporciona una configuración de cartucho desechable que permite se realice simultánea o posteriormente dos pruebas separadas físicamente en una única muestra de sangre total dentro del mismo cartucho desechable. Los elementos de la configuración del cartucho desechable incluyen el uso de características de fluidos pasivas (por ejemplo, válvulas, resistencias y elementos de bloqueo de fluidos) además de los mecanismos activos del analizador (por ejemplo, una bomba) para dividir la muestra en conductos/regiones separadas de manera que cada segmento de muestra pueda moverse posteriormente a un sensor específico. En la presente descripción se describen varias configuraciones separadas que permiten mantener la muestra en un solo canal, dividir la muestra en conductos de fluidos separados, controlar el movimiento del fluido en cada conducto para, por ejemplo, mezclar reactivo seco y/o sustrato en el segmento de muestra y/o posteriormente aparcarse (y bloquear) la muestra sobre los sensores para su análisis.

En cada realización a continuación, un usuario puede insertar la muestra en la cámara de entrada del cartucho. Luego, el cartucho se cierra y se inserta en el analizador. La bomba de diafragma formada como una bolsa de aire en el cartucho y un émbolo mecánico en el analizador (como se describe con respecto a la Figura 24) se usan para mover la muestra por todo el cartucho.

Las realizaciones de la presente invención descritas con respecto a las Figuras 25-29 se configuran para dividir una sola muestra biológica (por ejemplo, sangre total) y permitir el control de la mezcla independiente de al menos dos segmentos de la muestra en dos conductos donde se ubican los reactivos secos y/o sustratos específicos para cada prueba. De acuerdo con aspectos de la presente invención, los sustratos pueden localizarse o no (por ejemplo, de acuerdo con algunas realizaciones, pueden inmovilizarse o no) sobre el sensor. Los reactivos y/o sustratos disueltos en la muestra permanecen dentro del conducto donde se formaron, lo que por tanto elimina cualquier interferencia cruzada potencial entre las pruebas. Este es un elemento importante de multiplexación para dos pruebas cualesquiera donde podría haber interferencia química o física (por ejemplo, pruebas de coagulación).

Como se muestra en la Figura 25, algunas realizaciones de la presente invención pertenecen a una primera configuración de sensor de tierra para un cartucho 700 en el que un conducto 705 se divide en una unión 707 en un primer conducto 710 y un segundo conducto 715 antes o aguas arriba de un chip de tierra 720. El segundo conducto 715 puede comprender una constricción o tope capilar 725 y se configura para pasar sobre una región inferior del chip sensor 730 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (como se describe con respecto a las Figuras 15 y 16). El primer conducto 710 se configura para pasar sobre el chip de tierra 720 (por ejemplo, el chip de tierra con sensor de referencia como se describe con respecto a la Figura 17) y la región superior del chip sensor 730 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (como se describe con respecto a las Figuras 15 y 16). El cartucho 700 puede comprender además al menos un mecanismo de bloqueo de fluidos 735 (por ejemplo, una válvula de esponja de membrana, un capilar de micro canal o una válvula de micro matriz) colocado dentro del

primer conducto 710, y uno o más conductos 740 (por ejemplo, respiraderos), que conducen desde el primer conducto 710 y el segundo conducto 715 a la cavidad 747. En esta realización, la cavidad 747 se configura como una cámara de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24). Sin embargo, los expertos en la técnica deben entender que uno o más conductos 740 pueden configurarse para conducir a un conducto de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24).

La Figura 26 muestra una primera configuración de sensor de tierra alternativa para un cartucho 750 en el que el conducto 755 se divide en una unión 760 en un primer conducto 765 y un segundo conducto 770 antes o aguas arriba de un chip de tierra 775. El segundo conducto 770 puede comprender una constricción o tope capilar 780 y se configura para pasar sobre una región inferior del chip sensor 785 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (como se describe con respecto a las Figuras 15 y 16). El primer conducto 765 se configura para pasar sobre el chip de tierra 775 (por ejemplo, el chip de tierra con sensor de referencia como se describe con respecto a la Figura 17) y la región superior del chip sensor 785 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (como se describe con respecto a las Figuras 15 y 16). El cartucho 750 puede comprender además al menos un mecanismo de bloqueo de fluidos 790 colocado dentro del primer conducto 765. Y uno o más conductos 793 y 795 (por ejemplo, respiraderos), que conducen desde el primer conducto 765 y el segundo conducto 770 respectivamente a un conducto de residuos 797 (como se describe con respecto a la Figura 24).

Como se muestra en la Figura 27, durante el funcionamiento de los cartuchos 700 y 750, la muestra biológica o de fluido se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describe con respecto a la Figura 24) desde la entrada o cámara de retención de muestras a los conductos 705/755. La muestra biológica se divide en una primera parte y una segunda parte en la unión 707/760 (por ejemplo, una unión en T). En realizaciones preferidas, la constricción o tope capilar 725/780 (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) colocada dentro del segundo conducto 715/770 hace que la muestra llene preferentemente el primer conducto 710/765 y se mueva sobre el chip de tierra 720/775 y el al menos un electrodo (por ejemplo, un electrodo de aPTT) dentro de la región superior del chip sensor 730/785. Por lo tanto, la bomba de diafragma puede mover una primera parte de la muestra hacia adelante y hacia atrás en el primer conducto 710/765 para disolver y mezclar el reactivo y/o sustrato en la muestra, mientras que una segunda parte de la muestra en el segundo conducto 715/770 tampoco deja libre el segundo conducto 715/770 ni se mueve hacia el chip sensor 730/785. Una vez que se ha logrado una mezcla adecuada en el primer conducto 710/765, la primera parte de la muestra se empuja sobre el chip sensor 730/785 hasta el mecanismo de bloqueo de fluidos 735/790 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un micro canal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), lo que proporciona resistencia a la presión y bloquea efectivamente la primera parte de la muestra en el primer conducto 710/765. Posteriormente, puede comenzar el análisis en el primer conducto 710/765. A medida que la resistencia a la presión en el primer conducto 710/765 aumenta significativamente, la segunda parte restante de la muestra se fuerza a través de la constricción o tope capilar 725/780 en el segundo conducto 715/770. Luego, puede aplicarse un proceso similar de mezcla hacia adelante y hacia atrás al segundo conducto 715/770. Una vez que el reactivo y/o el sustrato se mezclan en la segunda parte de la muestra, la segunda parte de la muestra puede colocarse sobre el chip sensor 730/785 y puede comenzar el análisis en el segundo conducto 715/770. Por ejemplo, la segunda parte puede moverse a través del segundo conducto 715/770 sobre al menos un electrodo (por ejemplo, un electrodo de PT) dentro de la región inferior del chip sensor 730/785. De acuerdo con aspectos de la presente invención, los electrodos dentro de la región superior e inferior del chip sensor 730/785 pueden formarse con o sin inmovilización del reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9.

Como se muestra en la Figura 28, durante el funcionamiento adicional de los cartuchos 700 y 750, la muestra biológica o de fluido puede moverse mediante el uso del diafragma bidireccional desde la entrada o cámara de retención de muestras hasta el chip sensor 730/785 (como se describe con respecto a la Figura 24). Además, una vez que el reactivo y/o el sustrato se mezclan en la segunda parte de la muestra, la segunda parte de la muestra se empuja sobre el chip sensor 730/785 hacia un mecanismo de bloqueo de fluido adicional 745/798 (mostrado en las Figuras 25 y 26) (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un micro canal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que proporciona resistencia a la presión y bloquea efectivamente la segunda parte de la muestra en el segundo conducto 715/770. Una vez que la segunda parte de la muestra se bloquea en su posición sobre el chip sensor 730/785, puede comenzar el análisis en el segundo conducto 715/770.

Como se muestra en la Figura 29, durante el funcionamiento adicional de los cartuchos 700 y 750, la muestra de fluido o muestra biológica puede moverse mediante el uso del diafragma bidireccional desde la entrada o la cámara de retención de muestras a los conductos 705/755. Sin embargo, antes de que la muestra se mueva a la unión 707/760, la muestra puede moverse a través de una unión adicional (por ejemplo, una unión en T) (no mostrada en las Figuras 25 y 26). La unión adicional se configura para separar el primer conducto 710/765 y el segundo conducto 715/770 de un conducto de alivio (por ejemplo, un respiradero), que tiene una constricción o un tope capilar (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) para desviar el flujo de la muestra a través de la unión 707/760. Cualquier presión residual o movimiento de la muestra pasará luego al conducto de alivio. En realizaciones preferidas, la constricción adicional o tope capilar en el conducto de alivio se diseña de

manera que tiene una menor resistencia a la presión que los elementos de bloqueo de fluidos en el primer conducto 710/765 y/o el segundo conducto 715/770.

Como se muestra en la Figura 30, la mezcla dentro de los conductos puede realizarse al hacer oscilar la primera y la segunda parte de la muestra sobre los electrodos mediante el uso de los sensores conductimétricos de múltiples conductos para determinar y mantener el posicionamiento de la muestra cómo se describe en la presente descripción. En algunas realizaciones, la primera parte de la muestra biológica se mezcla primero para iniciar una reacción entre la primera parte de la muestra biológica y el reactivo y/o sustrato dentro del primer conducto antes del inicio de una reacción entre la segunda parte de la muestra biológica y el reactivo y/o sustrato dentro del segundo conducto. Por ejemplo, una prueba de aPTT requiere convencionalmente un tiempo de prueba más largo que el de la prueba de PT y, por lo tanto, una prueba de aPTT realizada dentro del primer conducto podría iniciarse antes que la prueba de PT realizada dentro del segundo conducto, de manera que las pruebas se completen aproximadamente al mismo tiempo.

Como debe entenderse, el primer diseño del sensor de tierra para los cartuchos 700 y 750 proporciona ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (por ejemplo, PT y aPTT) dentro de dos conductos separados. En realizaciones en las que la mezcla se requiere o es ventajosa, las características de los cartuchos 700 y 750 permiten un control de mezcla independiente dentro del primer y el segundo conducto sin preocuparse por la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia de electrodos cruzados una vez que uno o más reactivos se han expuestos a la muestra biológica debido a que los sensores se separan físicamente entre sí mediante el uso de al menos el primer y el segundo conducto.

Las realizaciones de la presente invención descritas con respecto a las Figuras 31-35 se configuran para dividir una sola muestra biológica (por ejemplo, sangre total) en dos segmentos en dos conductos donde se ubican los reactivos secos y/o sustratos específicos para cada prueba. La principal diferencia entre las configuraciones descritas con respecto a las Figuras 31-35 a las de las Figuras 25-29 es que en las configuraciones de las Figuras 31-35, la muestra se empuja sobre los sensores y se bloquea en su lugar y los reactivos y/o sustratos ubicados en los sensores se diseñan específicamente para disolverse en la muestra por difusión pasiva o permanecer dentro de una capa de inmovilización. En el ejemplo de realizar un análisis de coagulación, la activación de las vías en cascada y su detección ocurre en una región de alta concentración en la proximidad cercana a los sensores. Los reactivos y/o sustratos disueltos en la muestra o contenidos en la capa inmovilizada permanecen dentro del conducto donde fueron impresos, por lo tanto, se elimina cualquier interferencia cruzada potencial entre las pruebas (datos no mostrados). Este es un elemento importante de multiplexación para dos pruebas cualesquiera donde podría haber interferencia química o física (por ejemplo, pruebas de coagulación).

Como se muestra en la Figura 31, algunas realizaciones de la presente invención pertenecen a un sensor de tierra integrado y un diseño de conducto de sensor dividido para un cartucho 800 en el que un conducto 805 se divide en una unión 810 en un primer conducto 815 y un segundo conducto 820 antes o aguas arriba de un chip sensor/de tierra 825. El primer conducto 815 se configura para pasar sobre una primera región del chip sensor/de tierra 825 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende una parte del electrodo de referencia y al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de aPTT). El segundo conducto 820 comprende una constricción o tope capilar 822 y se configura para pasar sobre una segunda región del chip sensor 825 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende otra parte del electrodo de referencia y al menos otro electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de detección de analito diferente, tal como un electrodo de PT). De acuerdo con aspectos de la presente invención, los electrodos de detección de analito dentro del primer conducto 815 y el segundo conducto 820 pueden formarse con o sin inmovilización del reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9.

El cartucho 800 puede comprender además al menos dos mecanismos de barrera de fluidos 830 y 835 (por ejemplo, un mecanismo de bloqueo de fluidos, un tope capilar o una constricción de fluidos) colocados dentro del primer conducto 815 y el segundo conducto 820 respectivamente, y uno o más conductos 840 y 845 (por ejemplo, respiraderos), que conducen desde el primer conducto 815 y el segundo conducto 820 respectivamente a una cavidad 850. En esta realización, la cavidad 850 se configura como una cámara de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24). Sin embargo, en realizaciones alternativas el uno o más conductos 840 y 845 pueden configurarse para conducir a un conducto de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24).

Como se muestra en la Figura 32, durante el funcionamiento del cartucho 800, la muestra biológica o de fluido se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describe con respecto a la Figura 24) desde la entrada o la cámara de retención de muestras al conducto 805. La muestra biológica se divide en una primera parte y una segunda parte en la unión 810 (por ejemplo, una unión en T). En realizaciones preferidas, la constricción o tope capilar 822 (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) colocada dentro del segundo conducto 820 hace que la muestra llene preferentemente el primer conducto 815 y se mueva sobre la primera región del chip sensor/de tierra 825. La primera parte de la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 825 hacia el mecanismo de barrera de fluidos 830 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un micro canal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que proporciona una resistencia a la presión mayor que la del segundo conducto 820, y bloquea

efectivamente la primera parte de la muestra en el primer conducto 815. A continuación, puede comenzar el análisis en el primer conducto 815. A medida que la resistencia a la presión en el primer conducto 815 aumenta significativamente, la segunda parte restante de la muestra se fuerza a través de la constricción o tope capilar 822 en el segundo conducto 820. De manera similar, la segunda parte de la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 825 hacia el mecanismo de barrera de fluidos 835 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un micro canal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado) y bloquea efectivamente la segunda parte de la muestra en el segundo conducto 820. A continuación, puede comenzar el análisis en el segundo conducto 820.

Como se muestra en la Figura 33, durante el funcionamiento adicional del cartucho 800, la muestra biológica o de fluido puede moverse mediante el uso del diafragma bidireccional desde la entrada o la cámara de retención de muestras al conducto 805. Sin embargo, antes de que la muestra se mueva a la unión 810, la muestra puede moverse a través de una unión adicional 855 (por ejemplo, una unión en T) (mostrada en la Figura 31). La unión adicional 855 (por ejemplo, una unión en T) se configura para separar el primer conducto 810 y el segundo conducto 820 de un conducto de alivio 860 (por ejemplo, un respiradero), que tiene una constricción o un tope capilar (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) para desviar el flujo de la muestra a través de la unión 810. Cualquier presión residual o movimiento de la muestra pasará al conducto de alivio 860. En realizaciones preferidas, la constricción adicional o tope capilar en el conducto de alivio se diseña de manera que tiene una menor resistencia a la presión que los mecanismos de barrera de fluidos en el primer y el segundo conducto 815 y 820.

Como deben entender los expertos en la técnica, el sensor de tierra integrado y el diseño del conducto de sensor dividido para el cartucho 800 proporciona ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (como debe entenderse, los ensayos pueden ser diferentes o iguales, por ejemplo, PT y aPTT, PT y PT, aPTT y aPTT, etc.) dentro de dos conductos separados sin el requisito de mezclar la muestra biológica con el reactivo y/o sustrato. De acuerdo con aspectos de esta realización, las características del cartucho 800 permiten realizar dos pruebas analíticas separadas dentro del primer y el segundo conducto 815 y 820 sin preocuparse por la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia de electrodos cruzados una vez que uno o más reactivos se han expuesto a la muestra biológica debido a que los electrodos se separan físicamente entre sí mediante el uso de al menos el primer y el segundo conducto 815 y 820. Además, el diseño de sensor de tierra integrado para el cartucho 800 proporciona un diseño de cartucho más simple y compacto que el de los primeros diseños de sensor de tierra descritos anteriormente debido a que el diseño elimina el requisito de espacio para un sensor de tierra completamente separado y una longitud adicional de conducto necesaria para mover la muestra biológica al sensor de tierra separado.

Como se muestra en la Figura 34, realizaciones alternativas de la presente invención pertenecen a un sensor de tierra integrado y un diseño de conducto dividido para un cartucho 870 que comprende un conducto 875 con una unión 880 (por ejemplo, una unión en T). La unión 880 se configura para separar un primer conducto de sensor 885 y un segundo conducto 890 de un conducto de alivio 895 (por ejemplo, un respiradero). El primer conducto de sensor 885 se configura para pasar sobre una primera región de un chip sensor/de tierra 900 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende una parte de un electrodo de referencia y al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo aPTT). El segundo conducto de sensor 890 se configura para pasar sobre una segunda región del chip sensor 900 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende otra parte del electrodo de referencia y al menos un electrodo de detección de analito diferente (por ejemplo, un electrodo de PT). De acuerdo con aspectos de la presente invención, los electrodos de detección de analito dentro del primer conducto de sensor 885 y el segundo conducto de sensor 890 pueden formarse con o sin inmovilización del sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9.

El cartucho 870 puede comprender además al menos dos mecanismos de barrera de fluidos 905 y 910 colocados dentro del primer conducto de sensor 885 y el segundo conducto de sensor 890 respectivamente, y uno o más conductos 915 y 920 (por ejemplo, respiraderos), que conducen del primer conducto de sensor 885 y el segundo conducto 890 respectivamente a una cavidad 925. En esta realización, la cavidad 925 se configura como una cámara de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24). Sin embargo, en realizaciones alternativas, el uno o más conductos 915 y 920 pueden configurarse para conducir a un conducto de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24).

Como se muestra en la Figura 35, durante el funcionamiento de los cartuchos 870, la muestra biológica o de fluido se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describe con respecto a la Figura 24) desde la entrada o cámara de retención de muestras al conducto 875 y a través de la unión 880. El conducto de alivio 895 (por ejemplo, un respiradero) tiene una constricción o tope capilar (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) para desviar el flujo de la muestra al primer conducto de sensor 885 y al segundo conducto de sensor 890. Una primera parte de la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 900 hacia el mecanismo de barrera de fluidos 905 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un micro canal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que bloquea efectivamente la primera parte de la muestra en el primer conducto de sensor 885. A continuación, puede comenzar

el análisis en el primer conducto 885. Una segunda parte de la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 900 hacia el mecanismo de barrera de fluidos 910 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un micro canal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que bloquea efectivamente la segunda parte de la muestra en el segundo conducto de sensor 890. A continuación, puede comenzar el análisis en el segundo conducto 890. Cualquier presión residual o movimiento de la muestra pasará entonces al conducto de alivio 895. En realizaciones preferidas, la constricción o tope capilar en el conducto de alivio se diseña de manera que tiene una menor resistencia a la presión que los mecanismos de barrera de fluidos en el primer y el segundo conducto de sensor 885 y 890.

Como debe entenderse, el sensor de tierra integrado alternativo y el diseño de conducto dividido para el cartucho 870 proporciona ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (como debe entenderse, los ensayos pueden ser diferentes o iguales, por ejemplo, PT y aPTT, PT y PT, aPTT y aPTT, etc.) dentro de dos conductos de sensor separados sin el requisito de mezclar la muestra biológica con el reactivo y/o sustrato. De acuerdo con aspectos de esta realización, las características del cartucho 870 permiten realizar dos pruebas analíticas separadas dentro del primer y el segundo conducto de sensor 885 y 890 sin preocuparse por la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia de electrodos cruzados una vez que uno o más reactivos se han expuesto a la muestra biológica debido a que los electrodos se separan físicamente entre sí mediante el uso de al menos el primer y el segundo conducto de sensor 885 y 890. Además, el diseño de sensor de tierra integrado para el cartucho 870 proporciona un diseño de cartucho más simple y compacto que el de los primeros diseños de sensor de tierra descritos anteriormente debido a que el diseño elimina el requisito de espacio para un sensor de tierra completamente separado y una longitud adicional de conducto necesaria para mover la muestra biológica al sensor de tierra separado. Además, el volumen de muestra requerido para cubrir todo el circuito del sensor se reduce significativamente.

Las realizaciones de la presente invención descritas con respecto a las Figuras 36-38 se configuran para mantener una sola muestra biológica (por ejemplo, sangre total) en un único conducto donde se ubican los reactivos secos y/o sustratos específicos para cada prueba. La principal diferencia entre las configuraciones descritas con respecto a las Figuras 36-38 a las de las Figuras 27-29 es que en las configuraciones de las Figuras 36-38 la muestra se mantiene en un único conducto y se empuja sobre los sensores en serie y se bloquea o se mantiene en su lugar y los reactivos y/o sustratos ubicados en los sensores se diseñan específicamente para disolverse en la muestra por difusión pasiva o permanecer dentro de una capa de inmovilización. En el ejemplo de realizar un análisis de coagulación, la activación de las vías en cascada y su detección ocurre en una región de alta concentración en la proximidad cercana a los sensores. Los reactivos y/o sustratos disueltos en la muestra permanecen cerca de los sensores donde fueron impresos, por lo tanto, se elimina cualquier interferencia cruzada potencial entre las pruebas. Este es un elemento importante de multiplexación para dos pruebas cualesquiera donde podría haber interferencia química o física (por ejemplo, pruebas de coagulación).

Como se muestra en la Figura 36, algunas realizaciones de la presente invención pertenecen a un sensor de tierra integrado y un diseño de un único conducto para un cartucho 930 que comprende un conducto 935 con una unión 940 (por ejemplo, una unión en T). La unión 940 se configura para separar un conducto de sensor de un único conducto 945 de un conducto de alivio 950 (por ejemplo, un respiradero). El conducto de sensor único 945 se configura para pasar sobre una primera región de un chip sensor/de tierra 955 (como se describió con respecto a la Figura 18) que comprende al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de aPTT), una segunda región que comprende al menos una parte del electrodo de referencia, y una tercera región que comprende al menos un electrodo de detección de analito igual o diferente (por ejemplo, un electrodo de PT). De acuerdo con aspectos de la presente invención, los electrodos de detección de analito dentro del conducto de sensor de un único conducto 945 se forman con la inmovilización del reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen con respecto a las Figuras 4, 7A, 7B, 7C y 9.

El cartucho 930 puede comprender además un mecanismo de barrera de fluidos 960 colocado dentro del conducto de sensor 945, y un conducto 965 (por ejemplo, respiraderos) que conduce desde el conducto de sensor 945 a una cavidad 970. En esta realización, la cavidad 970 se configura como una cámara de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24). Sin embargo, en realizaciones alternativas, el conducto 965 puede configurarse para conducir a un conducto de residuos (como se describe con respecto a la Figura 24).

Como se muestra en las Figuras 36 y 37, durante el funcionamiento del cartucho 930, la muestra biológica o de fluido se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describe con respecto a la Figura 24) desde la entrada o cámara de retención de muestras al conducto 935 y a través de la unión 940. El conducto de alivio 950 (por ejemplo, un respiradero) tiene una constricción o tope capilar (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) para desviar el flujo de la muestra al conducto de sensor 945. La muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 955 hasta el mecanismo de barrera de fluidos 960 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un micro canal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que bloquea efectivamente la muestra en el conducto de sensor 945. A continuación, puede comenzar el análisis en el conducto de sensor 945. Cualquier presión residual o movimiento de la muestra procederá entonces al conducto de alivio 950. En realizaciones preferidas, la constricción o tope capilar

en el conducto de alivio 950 se diseña de manera que tiene una menor resistencia a la presión que los mecanismos de barrera de fluidos en el conducto de sensor 945.

Como se muestra en las Figuras 36 y 38, durante el funcionamiento alternativo del cartucho 930, la muestra biológica o de fluido puede moverse mediante el uso del diafragma bidireccional desde la entrada o la cámara de retención de muestras al conducto 935. A continuación, la muestra se empuja sobre el chip sensor/de tierra 955 hasta el mecanismo de barrera de fluidos 960 (por ejemplo, una "válvula de esponja" de membrana o un micro canal formado en el adhesivo de doble cara o en uno de los componentes de plástico moldeado), que bloquea efectivamente la muestra en el conducto de sensor 945. A continuación, puede comenzar el análisis en el conducto de sensor 945.

Como debe entenderse, el sensor de tierra integrado y el diseño de un único conducto para el cartucho 930 proporcionan ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (por ejemplo, como debe entenderse, los ensayos pueden ser diferentes o iguales, por ejemplo, PT y aPTT, PT y PT, aPTT y aPTT, etc.) dentro de un único conducto sin el requisito de mezclar la muestra biológica con el reactivo y/o sustrato. De acuerdo con aspectos de esta realización, las características del cartucho 930 permiten realizar dos pruebas analíticas separadas dentro del conducto de sensor 945 sin preocuparse por la activación cruzada de las vías en cascada u otra interferencia de electrodos cruzados una vez que uno o más reactivos se han expuestos a la muestra biológica debido a que los electrodos de detección de analito son sensores de microambiente con un reactivo/sustrato localizado (por ejemplo, inmovilizado) formado mediante el uso de una o más de las disposiciones que se describen en la presente descripción en detalle. Además, el diseño del sensor de tierra integrado para el cartucho 930 proporciona un diseño de cartucho más simple y compacto que el de los primeros diseños de sensor de tierra descritos anteriormente debido a que el diseño elimina el requisito de espacio para un sensor de tierra completamente separado y una longitud adicional de conducto necesaria para mover la muestra biológica al sensor de tierra separado. Además, el volumen de muestra requerido para cubrir todo el circuito del sensor se reduce significativamente.

Las realizaciones de la presente invención descritas con respecto a la Figura 39 se configuran para dividir una única muestra biológica (por ejemplo, sangre total) y permite realizar múltiples pruebas separadas físicamente (por ejemplo, pruebas de coagulación y pruebas de química analítica) simultánea o posteriormente en una única muestra de sangre total dentro del mismo cartucho desechable. En algunas realizaciones, el control de mezcla independiente se proporciona para al menos dos segmentos de la muestra en dos conductos donde pueden ubicarse los reactivos secos y/o sustratos específicos para cada prueba. De acuerdo con aspectos de la presente invención, los sustratos pueden localizarse o no (por ejemplo, inmovilizarse) sobre los sensores. Los reactivos y/o sustratos disueltos en la muestra permanecen dentro del conducto y cerca del sensor donde fueron impresos o depositados, por lo tanto, se elimina cualquier interferencia cruzada potencial entre las pruebas. Este es un elemento importante de multiplexación para dos pruebas donde podría haber interferencia química o física (por ejemplo, pruebas de coagulación y pruebas de química analítica).

Como se muestra en la Figura 39, algunas realizaciones de la presente invención pertenecen a una configuración de sensor múltiple para un cartucho 1000 que comprende un conducto 1005 con una unión 1010 (por ejemplo, una unión en T). La unión 1010 puede comprender una primera constricción o tope capilar 1015 y se configura para separar un primer conducto de sensor 1020 de un conducto auxiliar 1025. El primer conducto de sensor 1020 se configura para pasar sobre al menos una parte de un chip sensor 1030 que comprende al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de PT). De acuerdo con aspectos de la presente invención, el electrodo de detección de analito dentro del primer conducto de sensor 1020 puede formarse con o sin localización (por ejemplo, inmovilización) de un reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones como se describió con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9. Una segunda constricción o tope capilar 1035 puede colocarse dentro del primer conducto de sensor 1020, y un conducto 1040 (por ejemplo, respiraderos) puede configurarse para conducir desde el primer conducto de sensor 1020 a un conducto de residuos 1045 (como se describe con respecto a la Figura 24).

El cartucho 1000 puede comprender además un segundo conducto de sensor 1050 que conecta una cavidad 1055 con el conducto de residuos 1045. El conducto auxiliar 1025 se conecta al segundo conducto de sensor 1050 en una unión 1060. La unión 1060 puede comprender una tercera constricción o tope capilar 1065. En algunas realizaciones, la primera constricción o tope capilar 1015 y la tercera constricción o tope capilar 1065 se configuran más grandes (por ejemplo, de mayor ancho) que la segunda constricción o tope capilar 1035 para permitir el control de la muestra cómo se describe a continuación en detalle. El segundo conducto de sensor 1050 se configura para pasar sobre al menos una parte de cada uno de uno o más chips sensores 1070 que comprenden al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de sodio o cloruro). El uno o más chips sensores 1070 pueden configurarse para realizar cualquier número de ensayos, que incluyen electrolitos, química general, gases en sangre y hematología (Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núms. 7,419,821, 6,379,883, 5,514,253, 5,200,051, y 5,096,669). Por ejemplo, el uno o más chips sensores 1070 pueden configurarse para realizar cualquier número de ensayos capaces de detectar uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en presión parcial de oxígeno, presión parcial de dióxido de carbono, dióxido de carbono total, pH, potasio, sodio, cloruro, glucosa, BUN, creatinina, lactato, magnesio, hematocrito, calcio ionizado, troponina I, troponina T, CKMB, procalcitonina,

bHCG, HCG, NTproBNP, proBNP, BNP, mioglobina, hormona paratiroidea, d-dímero, NGAL, galectina -3, y/o PSA, entre otros analitos. En realizaciones en las que se utiliza un sustrato para realizar el ensayo, el al menos un electrodo de detección de analito dentro del segundo conducto de sensor 1050 puede formarse con o sin localización (por ejemplo, inmovilización) de un reactivo/sustrato mediante el uso de una o más de las disposiciones como se describió con respecto a las Figuras 2, 3, 4, 7A, 7B, 7C y 9. En otra realización que no se utiliza un sustrato, el al menos un electrodo de detección de analito dentro del segundo conducto de sensor 1050 puede formarse sin ningún sustrato.

Como se muestra en la Figura 39, durante el funcionamiento del cartucho 1000, la deformación de una junta por parte del analizador puede transmitir presión a un paquete de aluminio que contiene fluido lleno con un fluido, por ejemplo, aproximadamente 130 μ L de solución de análisis/lavado, fluido de control o fluido calibrante, ubicado en la cavidad 1055, lo que rompe el paquete de aluminio y expulsa el fluido al segundo conducto de sensor 1050 y pasa la tercera constricción o tope capilar 1065 para su uso posterior en análisis de muestras (como se describió con respecto a la Figura 24). En algunas realizaciones, el paquete de aluminio es un paquete calibrante (CALPAK) que contiene una solución calibrante. La secuencia típica de eventos incluye el CALPAK que se rompe y luego la solución de calibración pasa sobre el uno o más chips sensores 1070 para humedecer el uno o más chips sensores 1070. A continuación, la muestra biológica o de fluido se mueve mediante el uso de la bomba de diafragma bidireccional (como se describió con respecto a la Figura 24) desde la entrada o cámara de retención de muestras al conducto 1005. La muestra biológica se divide en una primera parte y una segunda parte en la unión 1010 (por ejemplo, una unión en T). En realizaciones preferidas, la primera constricción o tope capilar 1015 (por ejemplo, una válvula de ruptura capilar o resistencia/constricción de fluidos) colocada dentro del conducto auxiliar 1025 hace que la primera parte de la muestra llene preferentemente el primer conducto de sensor 1020 y se mueva sobre el chip sensor 1030 y el al menos un electrodo (por ejemplo, un electrodo de PT). La primera parte de la muestra dentro del primer conducto de sensor 1020 se detiene en la segunda constricción o tope capilar 1035, lo que hace que la segunda parte de la muestra se empuje a través de la primera constricción o tope capilar 1015 y la tercera constricción o tope capilar 1065. La segunda parte de la muestra llena el segundo conducto de sensor 1050 y se mueve sobre uno o más chips sensores 1070 y el al menos un electrodo de detección de analito (por ejemplo, un electrodo de sodio o cloruro). En algunas realizaciones, la segunda parte de la muestra puede configurarse para mezclarse con la solución de análisis/lavado, el fluido de control o el fluido calibrante presente dentro del segundo conducto de sensor 1050. Para permitir la mezcla de los segmentos de fluido, pueden diseñarse características, que incluyen estructuras de retención, tales como matrices de postes, cortes de conductos, ranuras u hoyuelos, en el segundo conducto de sensor 1050 para retener la solución de análisis/lavado, el fluido de control o el fluido calibrante. Alternativamente, la mezcla de los dos segmentos de fluido puede lograrse al fusionar las dos corrientes de fluido del conducto 1025 y el paquete de aluminio 1055 en la unión 1060. En otras realizaciones, la solución de análisis/lavado, el fluido de control o calibrante puede haberse bombeado a través del segundo conducto de sensor 1050 al conducto de residuos 1045 de manera que la segunda parte de la muestra no se mezcle con la solución de análisis/lavado, el fluido de control, o calibrante. Además, para minimizar el arrastre de la solución de análisis/lavado, el fluido de control o calibrante, el cartucho puede diseñarse de manera que introduzca un segmento de aire entre el primer fluido y la segunda parte de la muestra. El volumen del conducto auxiliar 1025 debería determinar el tamaño del espacio de aire entre los segmentos de fluido.

Como debe entenderse, las configuraciones de sensores múltiples para el cartucho 1000 proporcionan ventajosamente un solo cartucho capaz de realizar simultáneamente o posteriormente dos ensayos independientes (por ejemplo, PT y un ensayo de química analítica, PT y PT, aPTT y PT, aPTT y aPTT, etc.) dentro de dos conductos separados. En realizaciones en las que se requiere o es ventajoso mezclar, las características del cartucho 1000 permiten un control de mezcla independiente dentro del primer y el segundo conducto sin preocuparse por la activación cruzada u otra interferencia de electrodos cruzados una vez que uno o más reactivos se han expuesto a la muestra biológica debido a que los sensores se separan físicamente entre sí mediante el uso de al menos el primer y el segundo conducto de sensor.

Como se muestra en la Figura 40 donde el eje x es tiempo/segundos y el eje y es corriente/pA, las realizaciones pertenecientes al control de mezcla independiente de una muestra en dos conductos separados de un cartucho (como se muestra en las Figuras 25-29 y 39) y la mezcla completa del reactivo/sustrato (es decir, sin microambiente localizado) son capaces de lograr resultados de coagulación (por ejemplo, tiempos PT indicados por la línea vertical marcada en cada una de las curvas de coagulación) mediante el uso de múltiples tipos de muestras (sangre total representada por curvas de respuesta 1071, dos niveles de sangre reducida en factor representados por las curvas de respuesta 1072 y 1073, un nivel de plasma de control representado por las curvas de respuesta 1075). Como se muestra en la Figura 41A, las realizaciones de la presente invención pertenecientes a ninguna mezcla de una muestra sobre los reactivos/sustratos inmovilizados o localizados en uno o más conductos de un cartucho (como se muestra en las Figuras 30-38) que también son capaces de lograr resultados de coagulación mediante el uso de muestras (sangre total representada por las curvas de respuesta 1076, sangre reducida en factor representada por las curvas de respuesta 1077, y dos niveles de plasma de control representados por las curvas de respuesta 1078 y 1079) similares a las usadas en la Figura 40. Como se muestra en la Figura 41B (sangre total representada por las curvas de respuesta 1076, sangre reducida en factor representada por las curvas de respuesta 1077 y dos niveles de plasma de control representados por las curvas de respuesta 1078 y 1079), las respuestas del sensor para las realizaciones pertenecientes a la mezcla de la muestra sobre los reactivos/sustratos inmovilizados o localizados

también son alcanzables, sin embargo, la resolución de las muestras de control de plasma reducido y extendido en factor no es tan clara como en la realización inmovilizada sin mezcla (como se muestra en la Figura 41A). Además, la preferencia es que los tiempos de coagulación de la sangre total (curvas 1071 y 1076) sean muy cercanos a los tiempos de coagulación normales del control de plasma (curvas 1072 y 1078); las realizaciones no mezcladas, inmovilizadas/localizadas reflejan esto de la mejor manera, lo que da crédito adicional a su mejora sobre el sistema de la Figura 40. Aunque son posibles versiones no mezcladas o mezcladas de las realizaciones, la generación de corriente (pA) es mayor y la variabilidad (pA y tiempo de coagulación) es menor en la versión no mezclada (como se muestra en la Figura 41A) de las realizaciones. Estos resultados inesperados y más consistentes son directamente atribuibles al uso de los sensores de microambiente como se describe en la presente descripción con respecto a las realizaciones sin mezcla. La realización sin mezcla en combinación con la impresión de reactivo/sustrato localizado (por ejemplo, inmovilizado) representa una mejora del sistema en la activación/propagación de la señal de coagulación en una relación más alta de reactivo/sustrato a menor volumen de muestra, lo que produce por tanto un tiempo de respuesta de ensayo/sensor más rápido. Además, la localización (por ejemplo, inmovilización) de la impresión del reactivo/sustrato directamente sobre el sensor da como resultado el recambio inmediato (oxidación) del grupo saliente del sustrato difundido una vez generado por la trombina activa. En última instancia, esto conduce a que se genere una señal de corriente mayor (y más reproducible) directamente en el sensor de ensayo amperométrico. Finalmente, la combinación de respuesta rápida a la trombina (evidente por el rápido aumento en las curvas en la Figura 41A en comparación con el aumento más lento en la Figura 41B) con corrientes más altas y una mayor reproducibilidad produce curvas de respuesta que se analizan de manera más fácil y reproducible, lo que produce por tanto un ensayo mejorado (la realización actual, representada en la Figura 41A) sobre cualquiera de los de la Figura 40 o 41B.

Eliminación del Chip de Tierra e Identificación del Cartucho

En realizaciones preferidas, el chip de tierra puede incorporarse o integrarse en el chip sensor como se describe en detalle en la presente descripción. Un chip de tierra típico (como se describe con respecto a la Figura 17) puede incluir un electrodo de tierra que sirve como retorno del chip sensor y cuatro clavijas de contacto para la identificación del cartucho (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos núm. 7,419,821). Por consiguiente, la integración del chip de tierra en el chip sensor incluye mover estas dos funciones al chip sensor. Las ventajas de integrar el chip de tierra con el chip sensor incluyen (i) un proceso de fabricación simplificado, ya que hay un componente menos con el que lidiar durante la fabricación de obleas, metalización, corte en cubos y ensamblaje del cartucho, (ii) costo reducido, y (iii) volumen de muestra reducido ya que el conducto de sensor puede acortarse como se muestra en una comparación entre al menos las Figuras 25 y 31.

Como se muestra en la Figura 42, el chip de tierra separado y la disposición de chip sensor 1080 (por ejemplo, la disposición mostrada en la Figura 17) típicamente funciona mediante el uso de un detector 1082 conectado con la clavija de tierra 1085 en el chip de tierra 1090 y una clavija amperométrica 1095 en el chip sensor 1100 para detectar una diferencia de corriente entre el electrodo de referencia 1105 y el electrodo de detección de analito 1110 (por ejemplo, un electrodo amperométrico). Para impartir la funcionalidad del electrodo de referencia en una disposición de chip sensor único 1115 (por ejemplo, la disposición mostrada en la Figura 18), el electrodo de referencia 1105 puede integrarse con el chip sensor 1100 al conectar el electrodo de referencia 1105 con la clavija de baja conductimétrica 1120. Puede implementarse un interruptor electrónico 1125 en el analizador, que se configura para conectar la clavija de tierra 1085 y la clavija de baja conductimétrica 1120. Por consiguiente, el electrodo de referencia 1105 puede moverse esencialmente desde el chip de tierra 1090 al chip sensor 1100.

Para impartir la funcionalidad de identificación del cartucho en una disposición de chip sensor único (por ejemplo, la disposición mostrada en la Figura 18), puede incluirse un mecanismo o medio adicional en la disposición para la identificación del cartucho. Como se muestra en la Figura 42 para una disposición de electrodo único 1130, por ejemplo, un electrodo de detección de analito solo de aPTT 1110, puede implementarse un resistor 1135 entre una clavija amperométrica no usada 1140 y la clavija de baja conductimétrica 1120. El electrodo de detección de analito 1110 puede conectarse a la clavija amperométrica 1095, el resistor 1135 puede conectarse a la clavija amperométrica no usada 1140 y la clavija de baja conductimétrica 1120, y el electrodo de referencia 1105 puede conectarse a la clavija de baja conductimétrica 1120. La resistencia del resistor 1135 puede medirse por un detector 1145 (por ejemplo, un procesador) al aplicar una pequeña tensión, por ejemplo, 1 mV, entre la clavija amperométrica no usada 1140 y la clavija de baja conductimétrica 1120, posterior (por ejemplo, inmediatamente después) a que el cartucho se inserte en el analizador. El valor de la resistencia medida luego puede usarse para la identificación del cartucho. Por ejemplo, cada tipo de cartucho (por ejemplo, cartuchos i-STAT® EC8+, CG8+, EG7+, CHEM8+, etc.) puede asociarse con una cierta resistencia o rango de resistencia, de manera que puede usarse una resistencia medida del cartucho para identificar el tipo de cartucho mediante el uso de una tabla de consulta.

En algunas realizaciones, el resistor 1135 puede comprenderse de un cable de metal, preferentemente un cable de oro fabricado al mismo tiempo que las almohadillas de contacto y el electrodo sensor. El cable de oro puede ser tan pequeño como de 5 μm de ancho y 0,1 μm de grosor, lo que forma un área de 0,5 μm^2 . Como la resistividad del oro es 2,44 $\mu\Omega\text{-cm}$, o 0,0244 $\Omega\text{-}\mu\text{m}$, un cable de oro de 1000 μm de longitud tendrá una resistencia de 0,0244 $\Omega\text{-}\mu\text{m}$ * 1000 μm / 0,5 μm^2 = 48,8 Ω . Después de insertar el cartucho en el analizador, puede aplicarse un pequeño voltaje, por ejemplo, 0,5 mV y el analizador puede generar y detectar una corriente de alrededor de 10 μA . Para minimizar el

consumo de potencia, opcionalmente el cable de oro podría ser más largo, la tensión aplicada podría ser menor o el tiempo para la aplicación de la tensión podría ser más corto.

5 En una realización alternativa, la disposición de electrodo único 1130 puede incluir un electrodo de detección de analito solo de PT 1110 en lugar de un electrodo de detección de analito solo de aPTT 1110. De acuerdo con este aspecto de la invención, la longitud del cable de oro puede aumentarse alrededor de 10 cm, lo que aumenta la resistencia del cable de oro alrededor de 5000 Q, para distinguir la identificación del cartucho de PT de la del cartucho de aPTT.

10 En otras realizaciones, el resistor puede implementarse entre la clavija amperométrica 1095 y la clavija de baja conductimétrica 1120. Como debe entenderse por los expertos en la técnica, el concepto de usar un resistor para identificar el tipo de cartucho puede implementarse en cualquiera de las disposiciones de sensor/cartucho descritas en la presente descripción. Además, pueden obtenerse diferentes valores para el resistor al variar las geometrías del cable o mediante el uso de materiales variados para el cable (por ejemplo, mediante el uso de TiW en lugar de oro),
15 que luego pueden usarse para identificar diferentes cartuchos.

Para impartir la funcionalidad de identificación del cartucho en una disposición de chip sensor múltiple (por ejemplo, la disposición mostrada en la Figura 18), puede incluirse un mecanismo o medio adicional en la disposición para la identificación del cartucho. Como se muestra en la Figura 43 para una disposición de electrodo múltiple (por
20 ejemplo, dos) 1150, por ejemplo, un electrodo de detección de analito de PT 1155 y un electrodo de detección de analito de aPTT 1160, puede implementarse un resistor 1165 entre una clavija amperométrica no usada 1170 y la clavija de baja conductimétrica 1175. El electrodo de detección de analito de PT 1155 puede conectarse a la clavija amperométrica 1180, el electrodo de detección de analito de aPTT 1160 puede conectarse a la clavija amperométrica 1185, el resistor 1165 puede conectarse a la clavija amperométrica no usada 1170 y a la clavija de
25 baja conductimétrica 1175, y el electrodo de referencia 1190 puede conectarse a la clavija de baja conductimétrica 1175. La resistencia del resistor 1165 puede medirse mediante un detector 1195 al aplicar una pequeña tensión, por ejemplo, 1 mV, entre la clavija amperométrica no usada 1170 y la clavija de baja conductimétrica 1175, posterior (por ejemplo, inmediatamente después) a que el cartucho se inserte en el analizador. El valor de la resistencia medida luego puede usarse para la identificación del cartucho. Por ejemplo, cada tipo de cartucho (por ejemplo, cartuchos i-
30 STAT@ EC8+, CG8+, EG7+, CHEM8+, etc.) puede asociarse con una cierta resistencia o rango de resistencia, de manera que puede usarse una resistencia medida del cartucho para identificar el tipo de cartucho mediante el uso de una tabla de consulta.

Como se describió anteriormente, el resistor 1165 puede comprenderse de un cable de metal, preferentemente un
35 cable de oro fabricado al mismo tiempo que las almohadillas de contacto y el electrodo sensor. El cable de oro puede ser tan pequeño como de 5 µm de ancho y 0,1 µm de grosor, lo que forma un área de 0,5 µm². Como la resistividad del oro es 2,44 µΩ-cm, o 0,0244 Ω-µm, un cable de oro de 1000 µm de longitud tendrá una resistencia de 0,0244 Ω-µm * 1000 µm / 0,5 µm² = 48,8 Q. Después de insertar el cartucho en el analizador, puede aplicarse un pequeño voltaje, por ejemplo, 0,5 mV y el analizador puede generar y detectar una corriente de alrededor de 10 uA.
40 Para minimizar el consumo de potencia, opcionalmente el cable de oro podría ser más largo, la tensión aplicada podría ser menor o el tiempo para la aplicación de la tensión podría ser más corto.

45

REIVINDICACIONES

1. Un cartucho de análisis de muestras (125) que comprende:
 - 5 una cámara de entrada (130) configurada para recibir una muestra biológica; y
un conducto (140) conectado de forma fluida a la cámara de entrada (130) y configurado para recibir la muestra biológica de la cámara de entrada (130), comprendiendo el conducto:
 - 10 un sensor de tiempo de protrombina (PT) de microambiente (145); y
un sensor de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) por microambiente (150);
 - 15 en el que el sensor de PT de microambiente y el sensor de aPTT de microambiente comprenden cada uno una capa de sustrato-polímero inmovilizado y reactivos integrados o distribuidos en la parte superior del mismo o adyacentes al mismo;
 - en el que el sensor de PT de microambiente comprende reactivos de diagnóstico de PT, que comprenden al menos un reactivo para inducir la vía de coagulación extrínseca en la muestra biológica, y
 - en el que el sensor de aPTT activado por microambiente comprende reactivos de diagnóstico de aPTT, que comprenden al menos un reactivo para inducir la vía de coagulación intrínseca en la muestra biológica.
2. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, en el que el sensor de PT (145) es un sensor electroquímico.
3. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 2, en el que el sensor de PT (145) se configura para conectarse con un conector eléctrico de un medidor de prueba.
4. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, en el que el sensor de aPTT (150) es un sensor electroquímico.
5. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 4, en el que el sensor de aPTT (150) se configura para conectarse con un conector eléctrico de un medidor de prueba.
6. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, que comprende además una bomba configurada para:
 - 35 mover la muestra biológica en el conducto y colocar la muestra biológica sobre el sensor de TP (145); y
mover la muestra biológica en el conducto y colocar la muestra biológica sobre el sensor de aPTT (150).
7. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, que comprende además un puerto de entrada de muestra que puede cerrarse (595) para recibir la muestra biológica y un respiradero conectado al conducto.
8. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, que comprende además un reactivo de PT (155) para el sensor de PT (145) y un reactivo de aPTT (165) para el sensor de aPTT (150).
9. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, en el que el conducto en una región del sensor de PT (145) y el sensor de aPTT (150) tiene una relación de volumen a área del sensor de menos de aproximadamente 6 μL a aproximadamente 1 mm cuadrado.
10. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, en el que el cartucho de análisis de muestras (125) es un dispositivo de un solo uso configurado para ser desechable después de un solo uso.
11. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, que comprende además un contra electrodo de referencia, preferentemente un electrodo de plata/cloruro de plata.
12. El cartucho de análisis de muestras de la reivindicación 1, en el que el sustrato comprende un péptido escindible con trombina con una fracción detectable.
13. Un chip (310) que comprende:
 - 60 un sensor de tiempo de protrombina (PT) de microambiente (320); y
un sensor de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) por microambiente (315);
 - en el que el sensor de PT de microambiente y el sensor de aPTT de microambiente comprenden cada uno una capa de sustrato-polímero inmovilizado y reactivos integrados o distribuidos en la parte superior del mismo o adyacentes al mismo;
 - 65 en el que el sensor de PT de microambiente comprende reactivos de diagnóstico de PT, que comprenden al menos un reactivo para inducir la vía de coagulación extrínseca en la muestra biológica, y

en el que el sensor de aPTT activado por microambiente comprende reactivos de diagnóstico de aPTT, que comprenden al menos un reactivo para inducir la vía de coagulación intrínseca en la muestra biológica.

- 5
14. El chip de la reivindicación 13, en el que el chip comprende además un contra electrodo de referencia y en el que el sensor de PT (320) y/o el sensor de aPTT (315) es un sensor electroquímico.
 15. El chip de la reivindicación 13, en el que el sustrato comprende un péptido escindible con trombina con una fracción detectable.

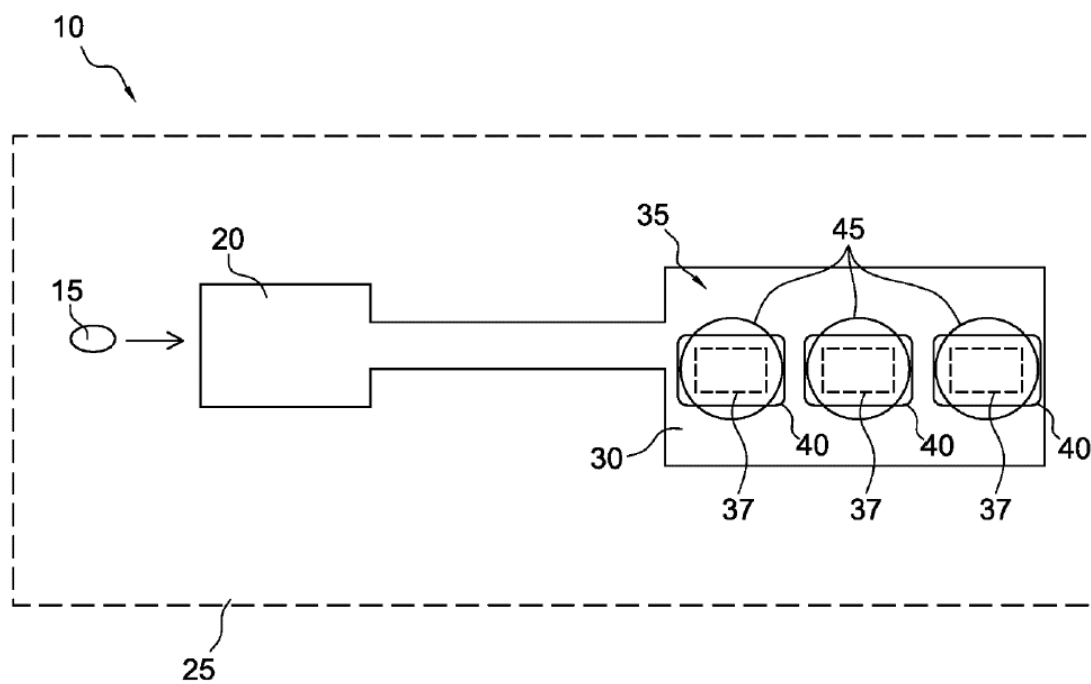


Figura 1

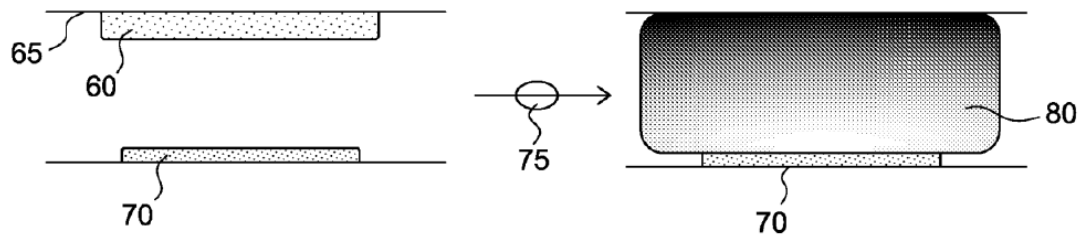


Figura 2

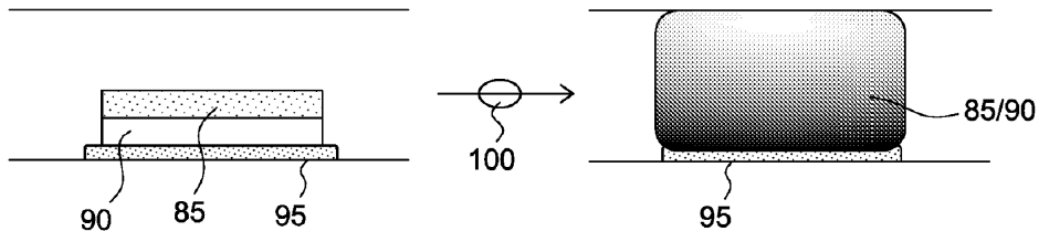


Figura 3

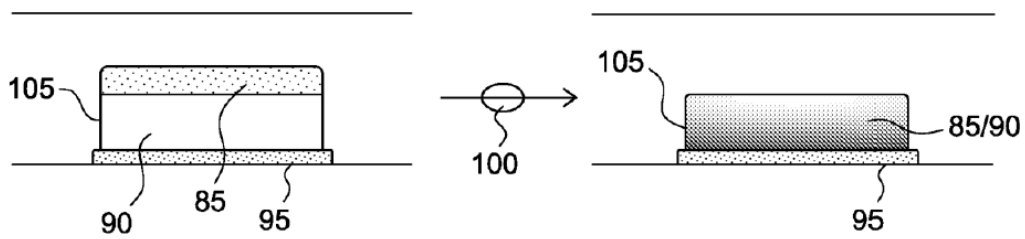


Figura 4

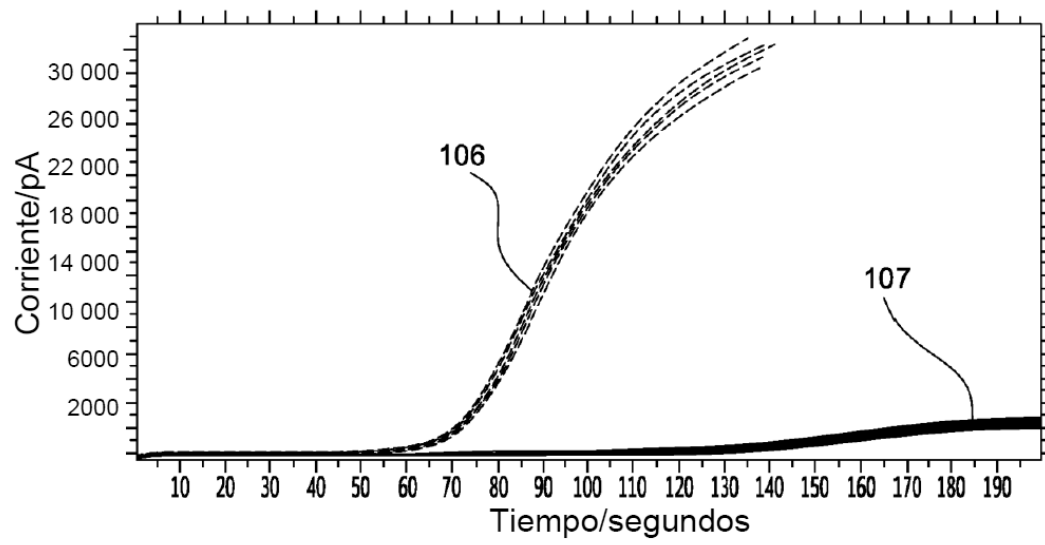


Figura 5

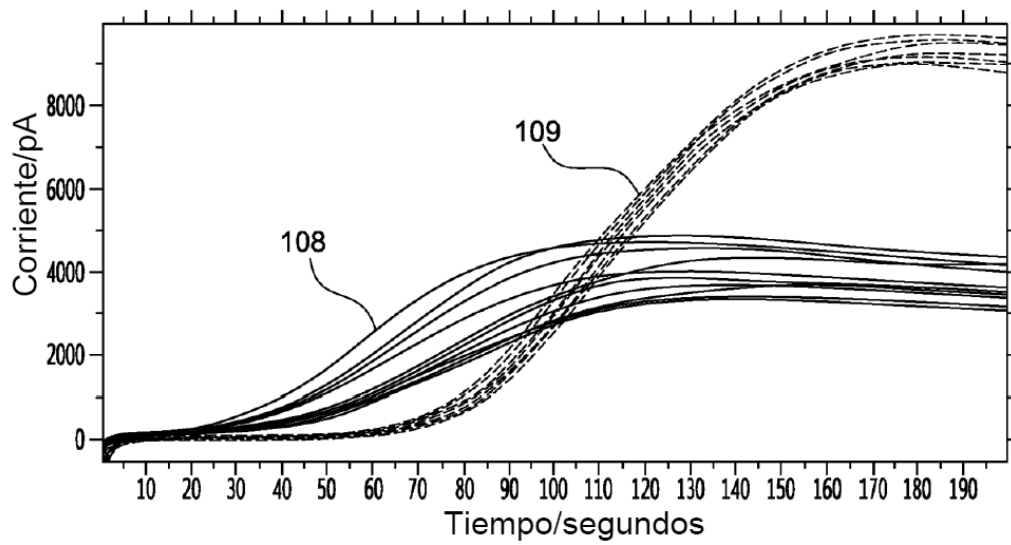


Figura 6

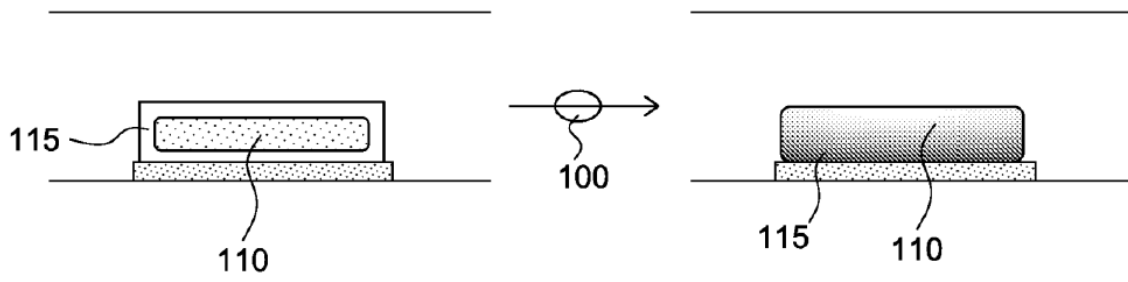


Figura 7A

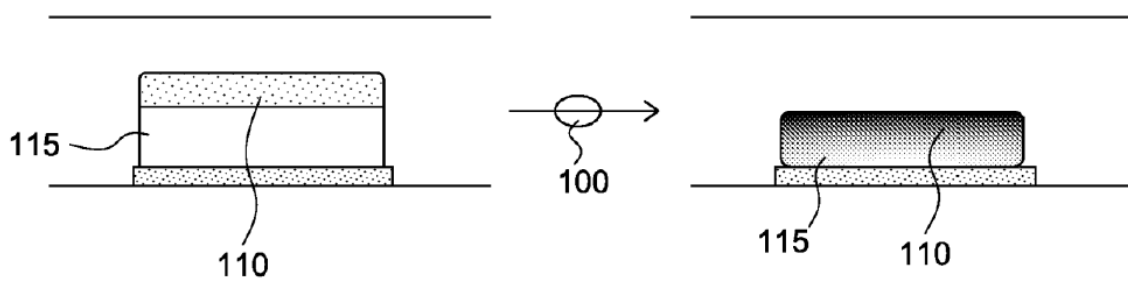


Figura 7B

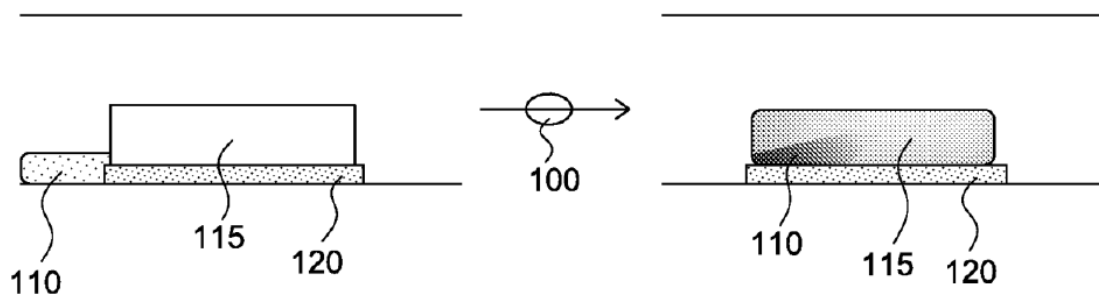


Figura 7C

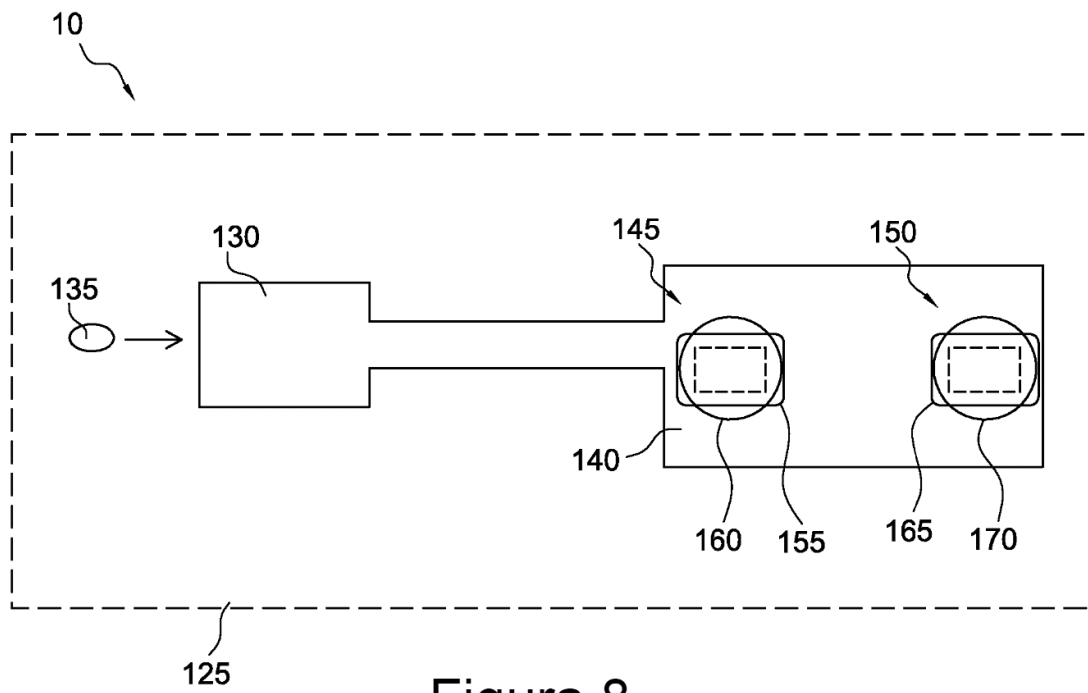


Figura 8

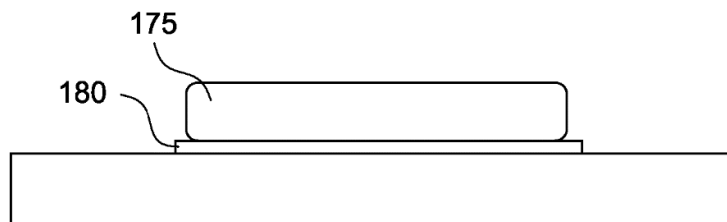


Figura 9

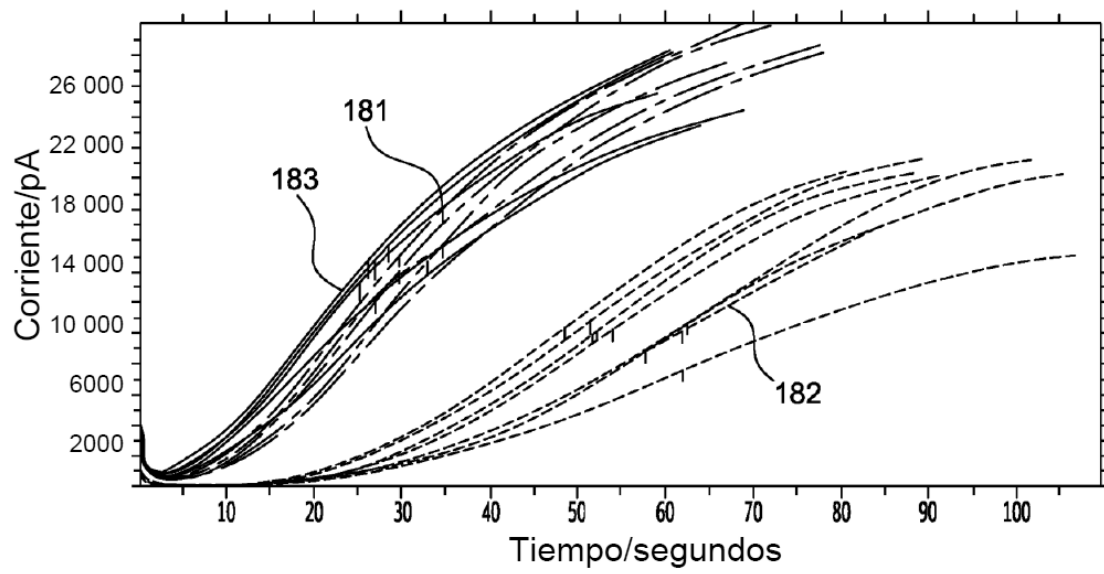


Figura 10

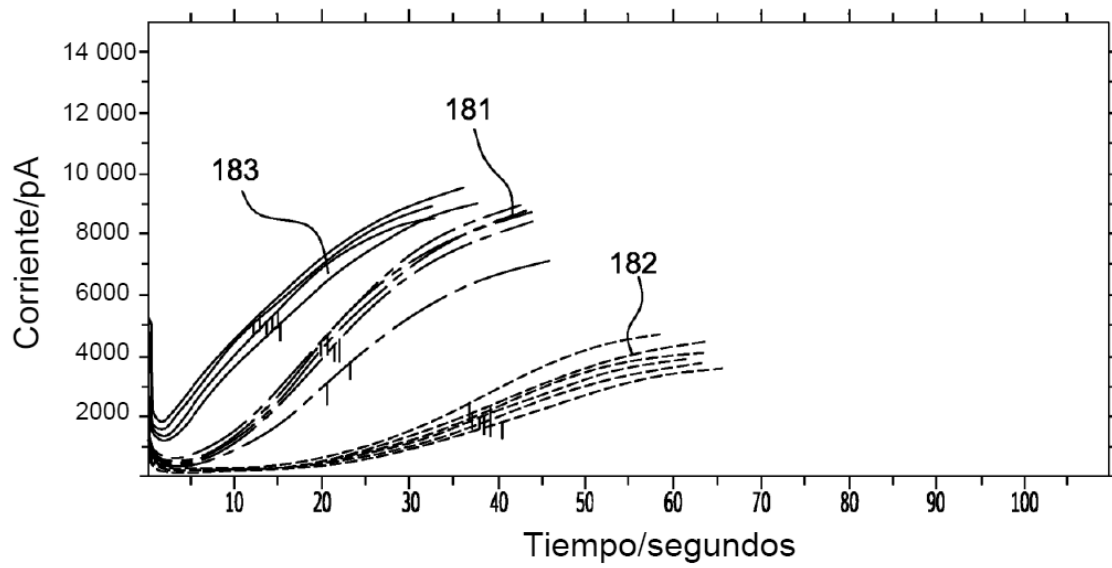


Figura 11

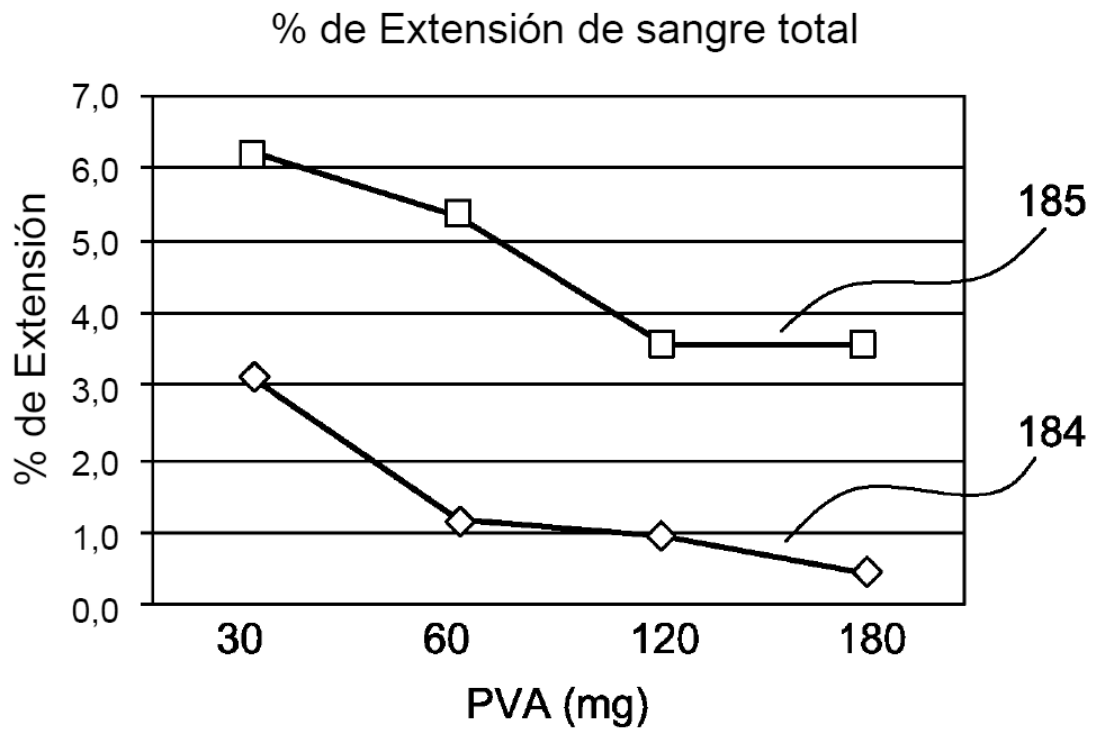


Figura 12

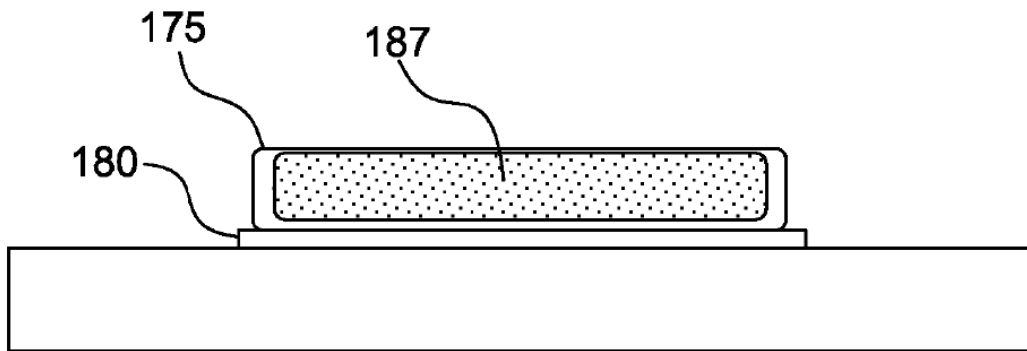


Figura 13A

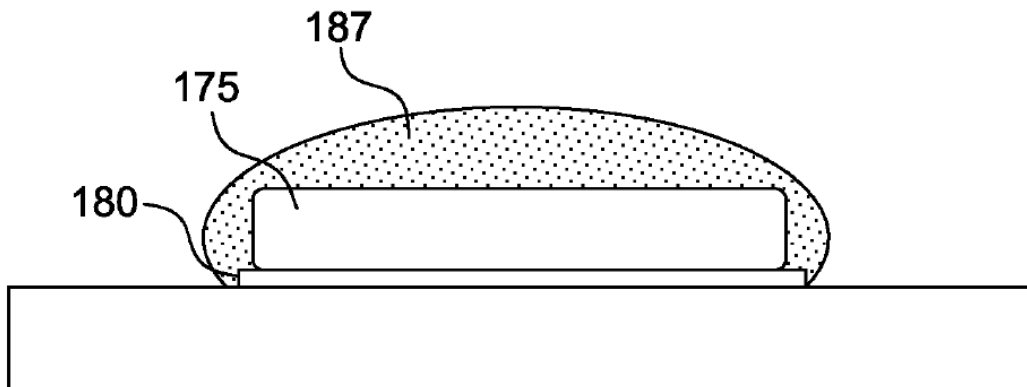


Figura 13B

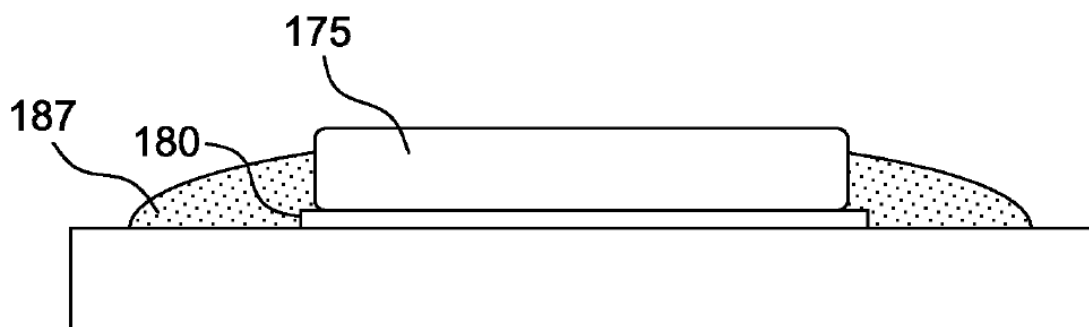


Figura 13C

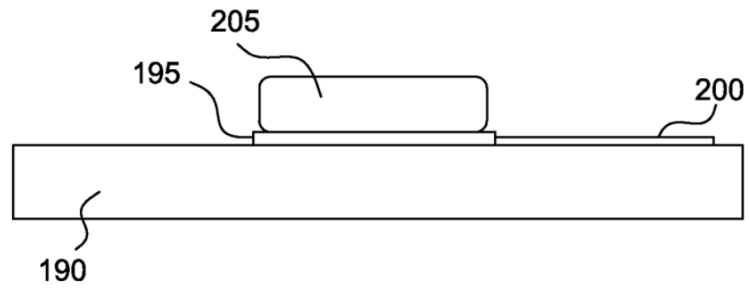


Figura 14

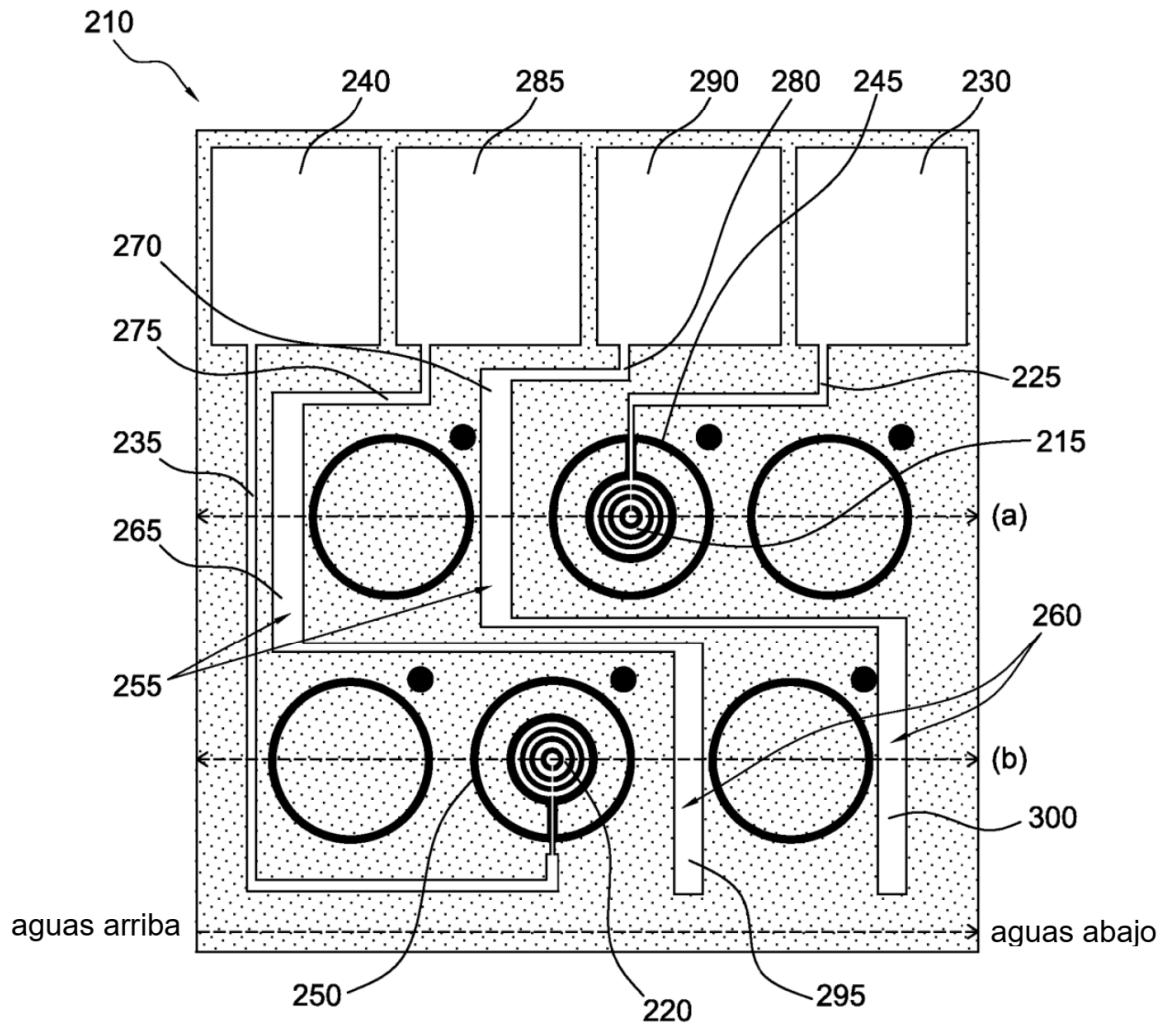


Figura 15

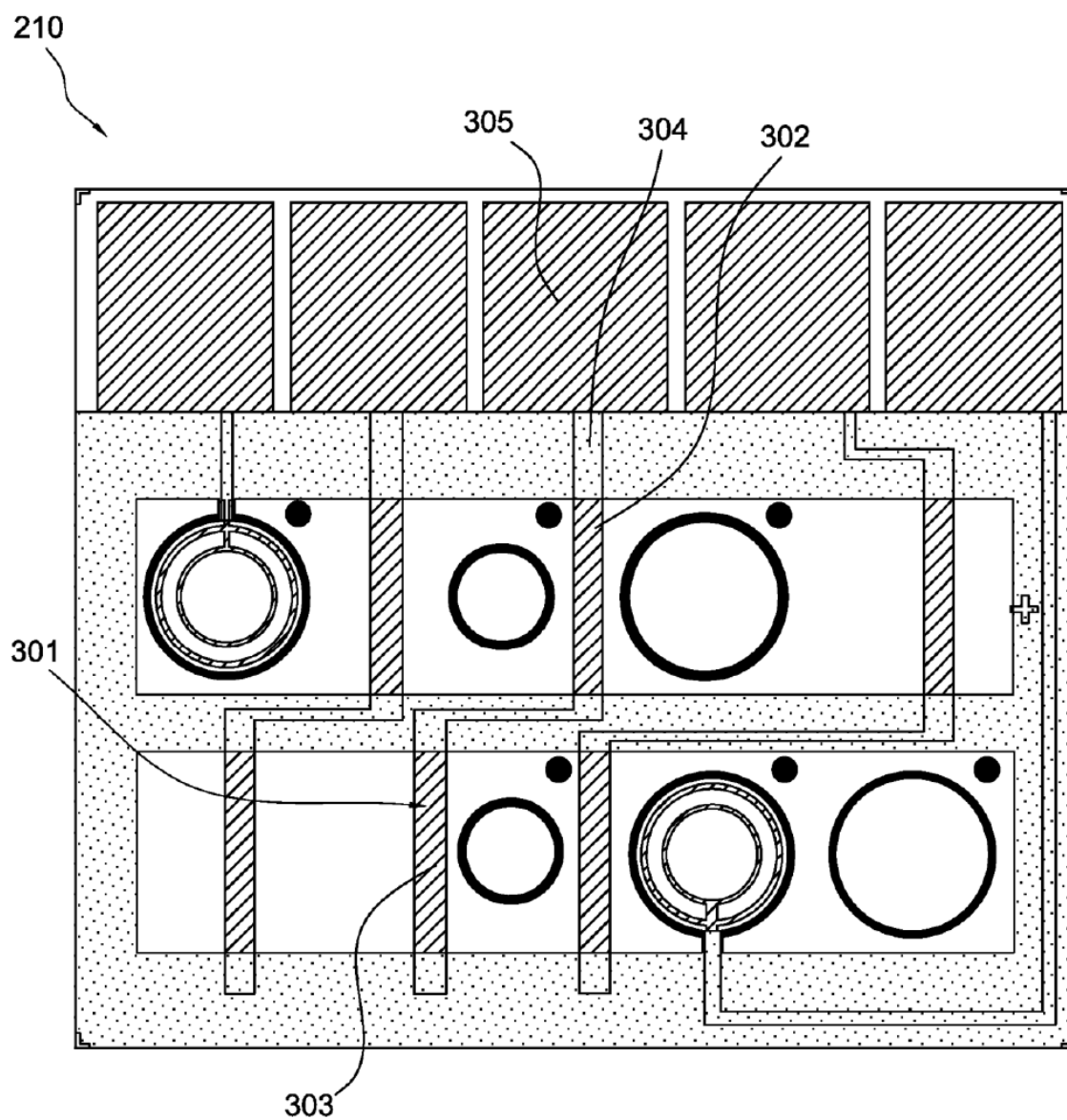


Figura 16

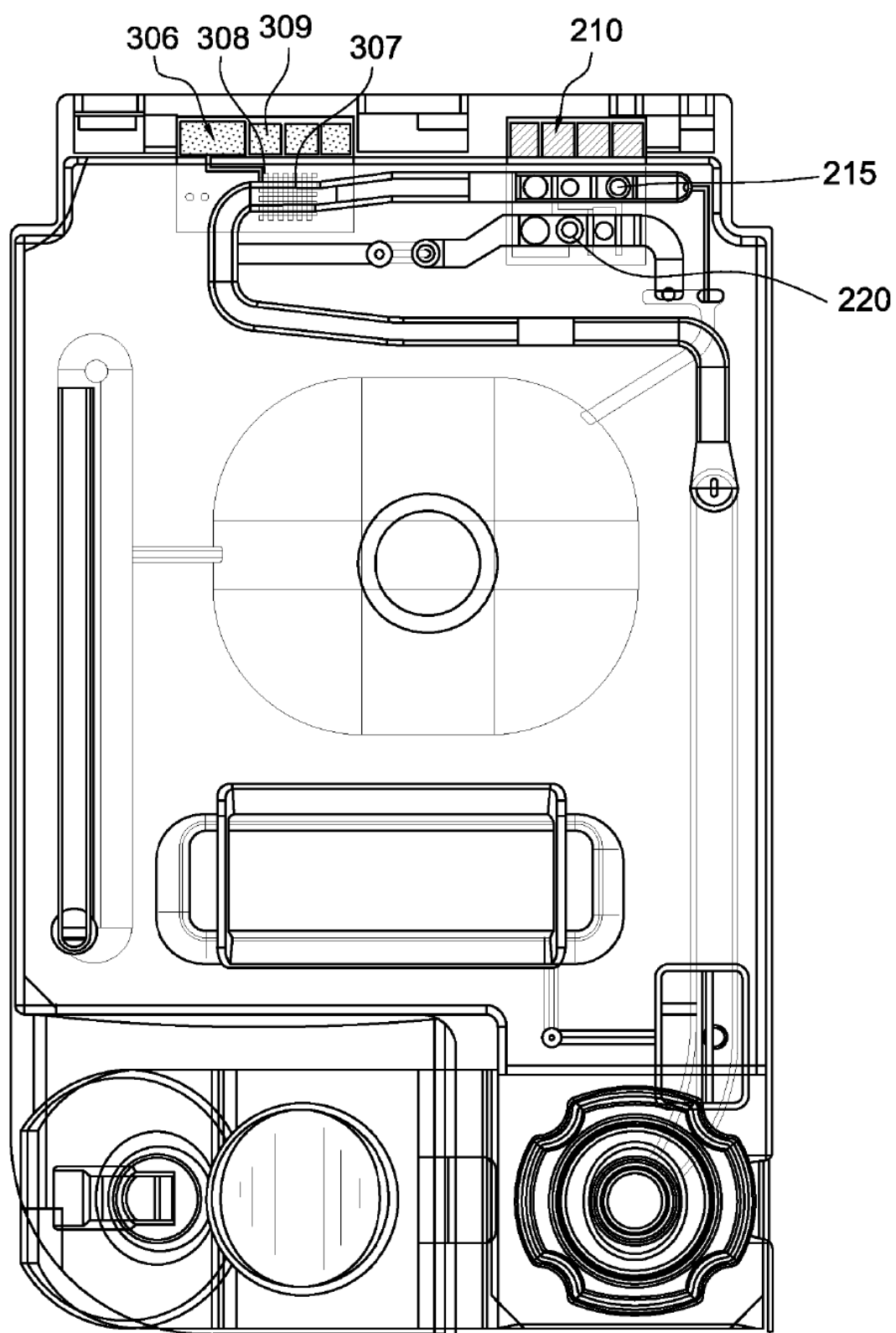


Figura 17

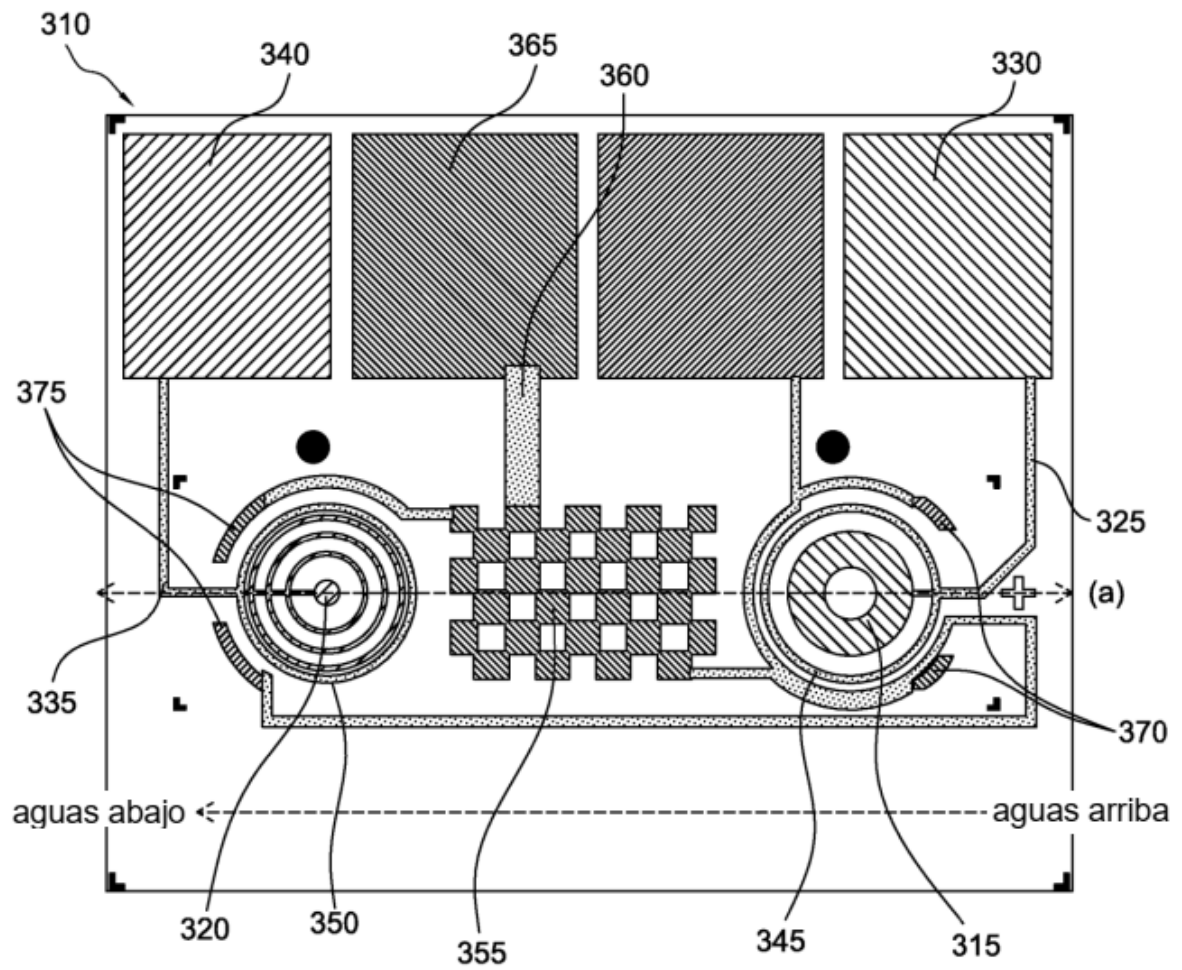


Figura 18

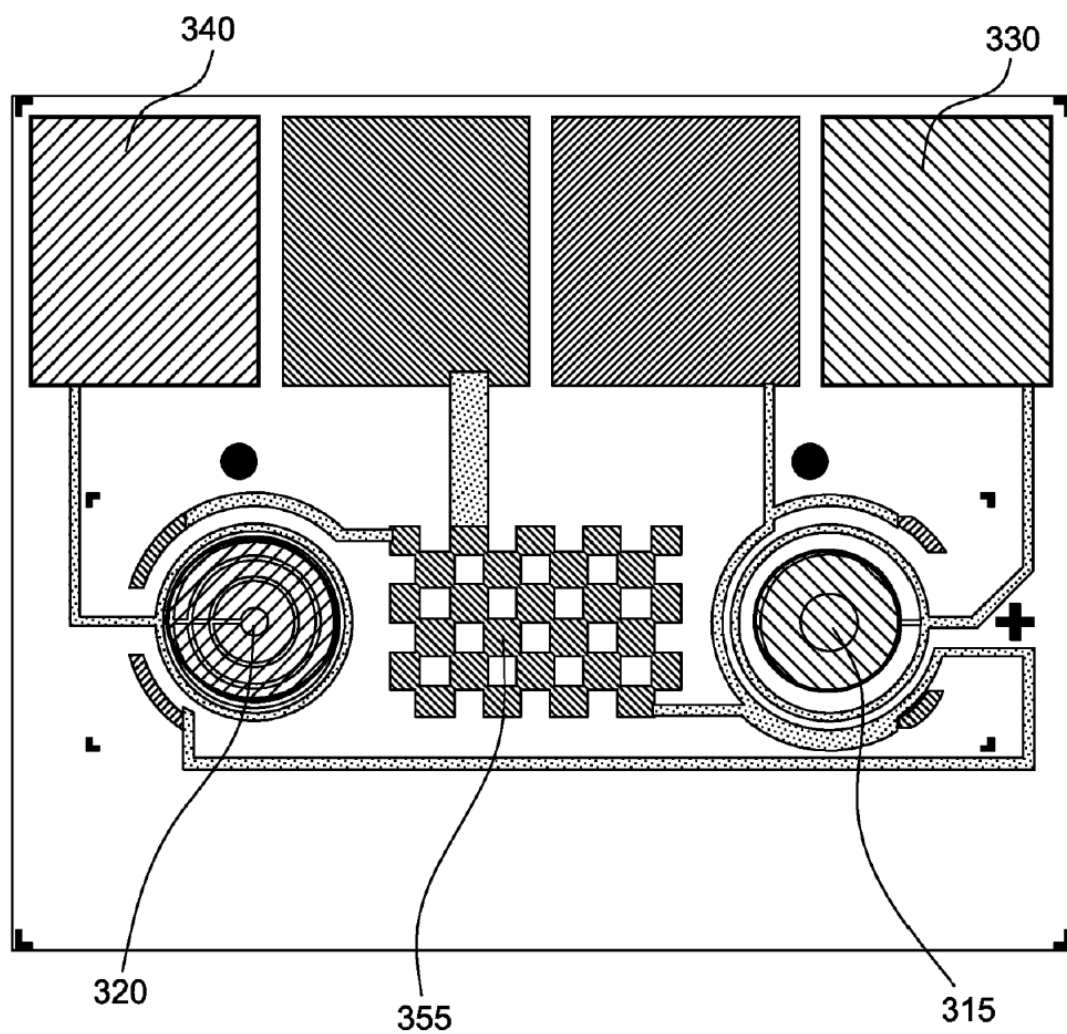


Figura 19

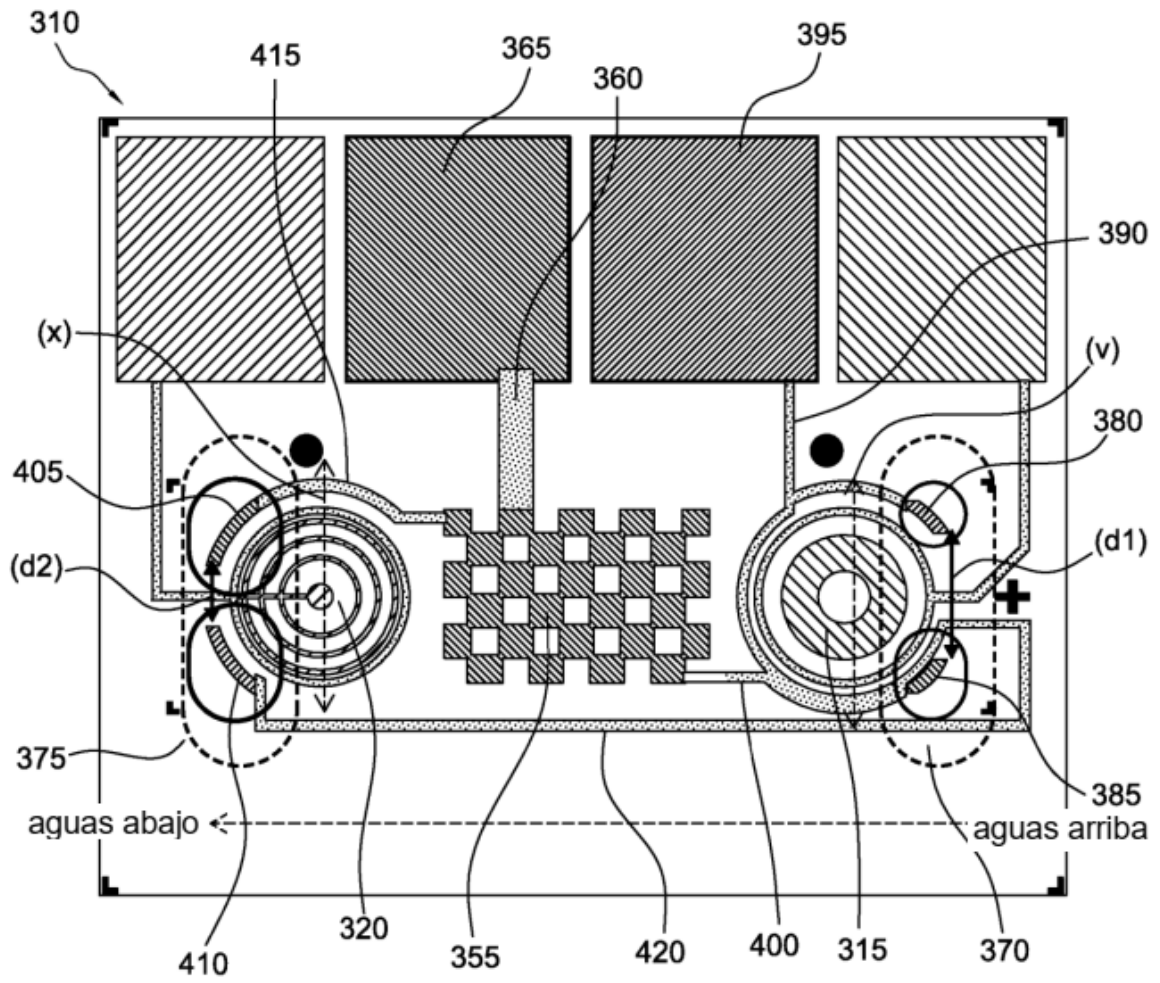


Figura 20

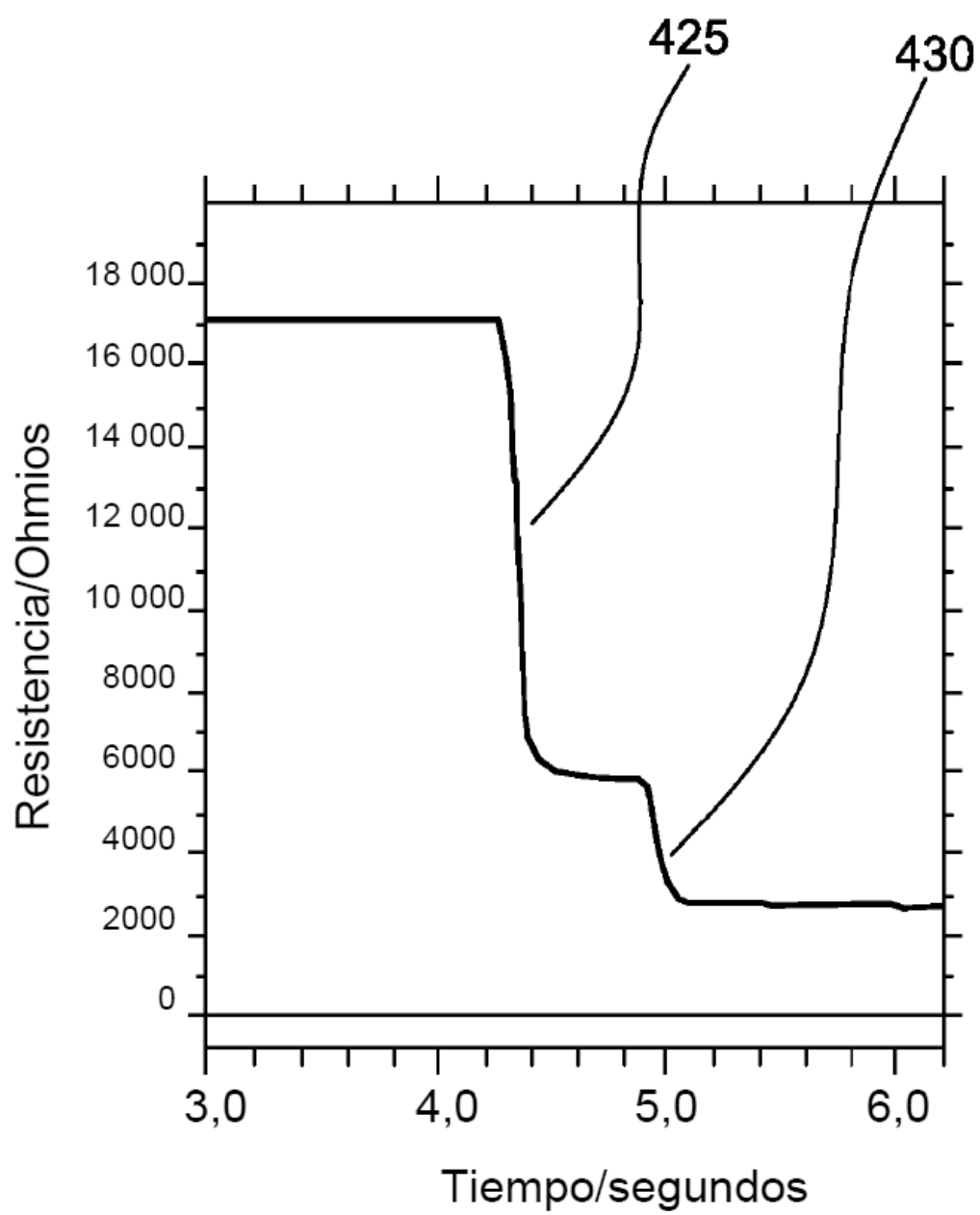


Figura 21

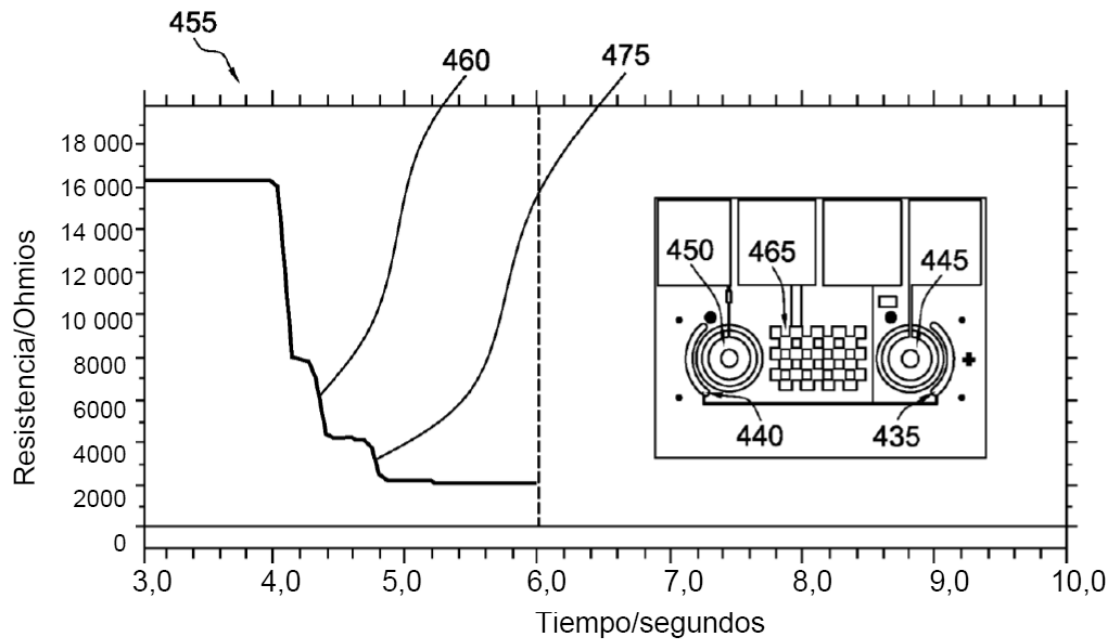


Figura 22A

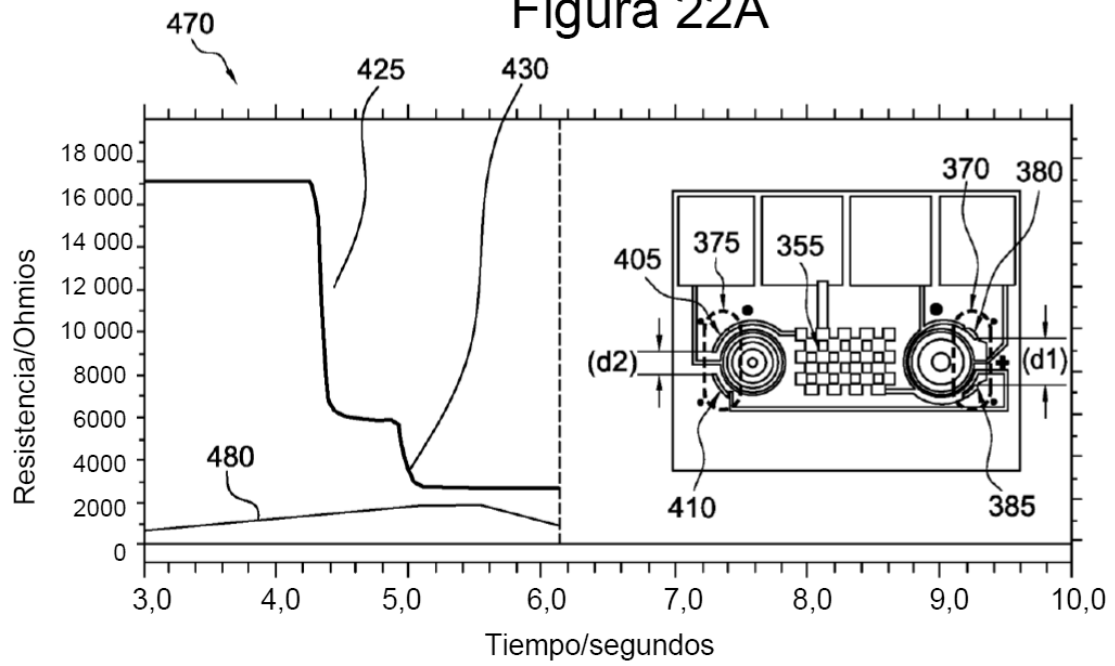


Figura 22B

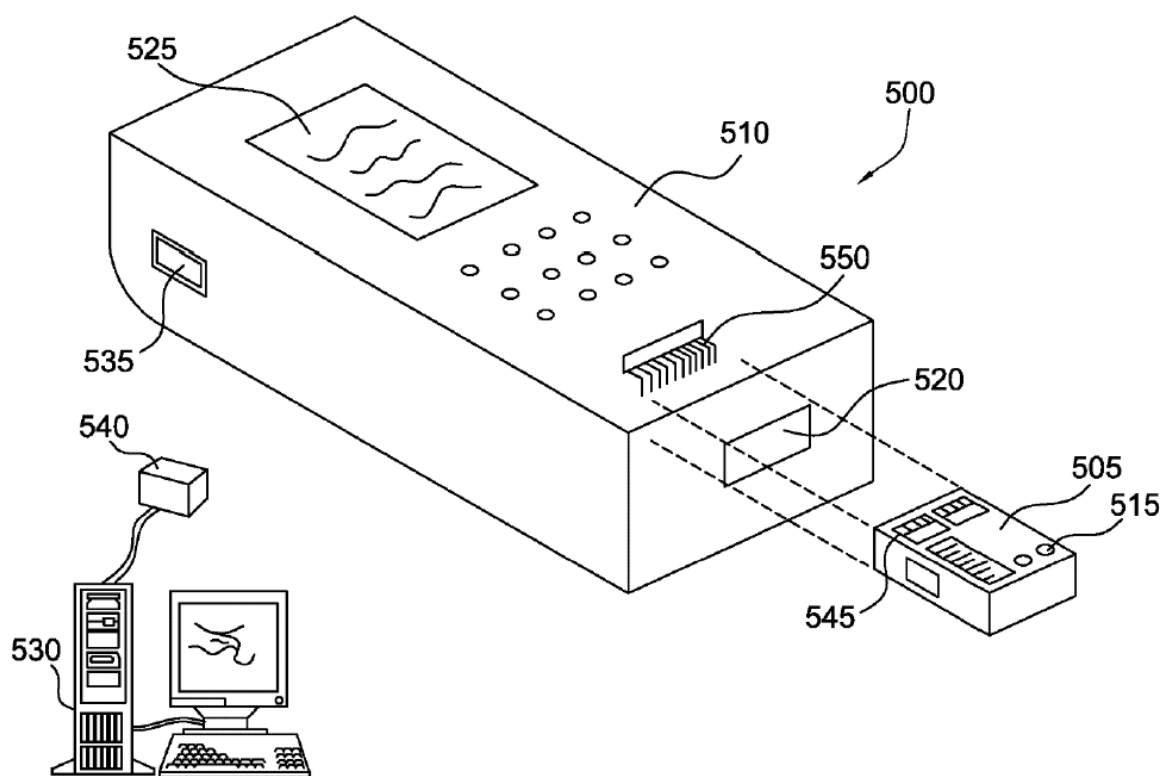


Figura 23

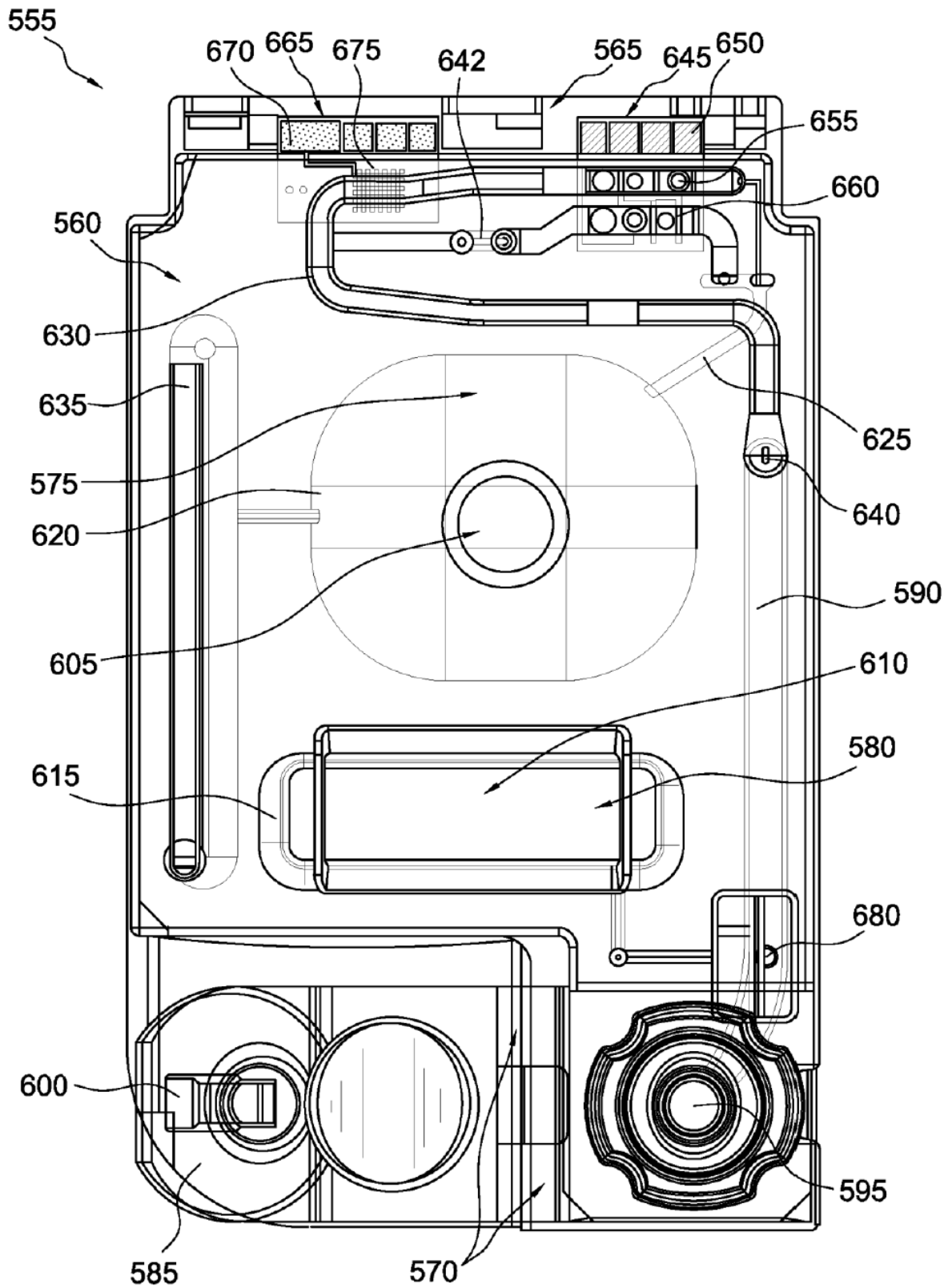


Figura 24

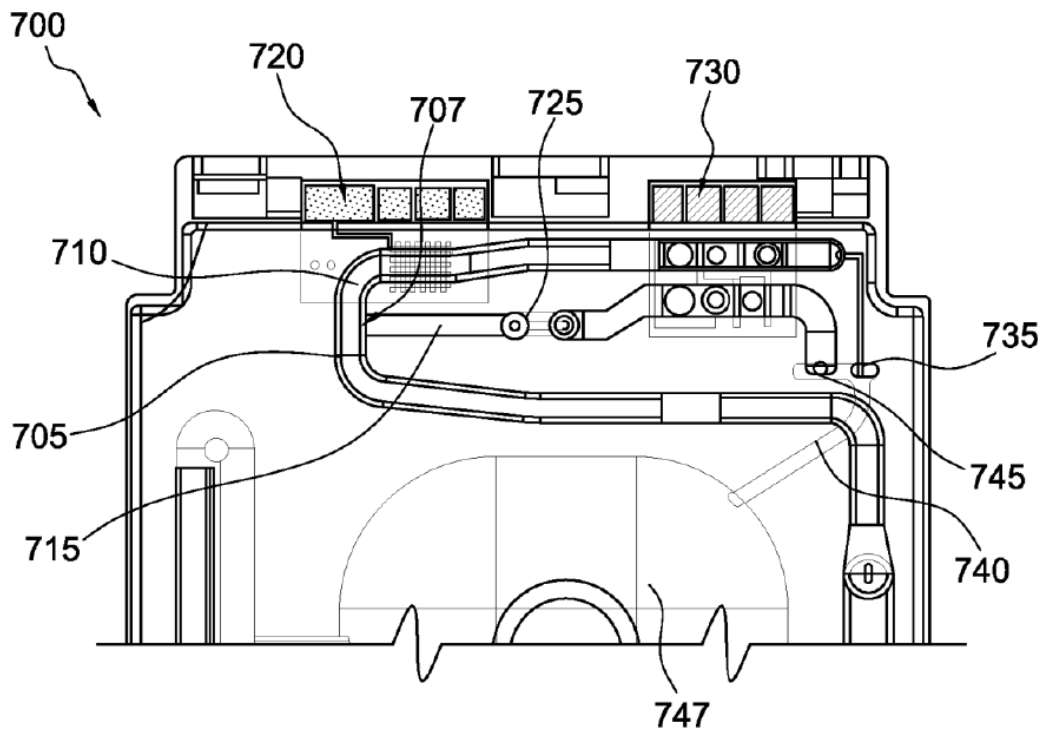


Figura 25

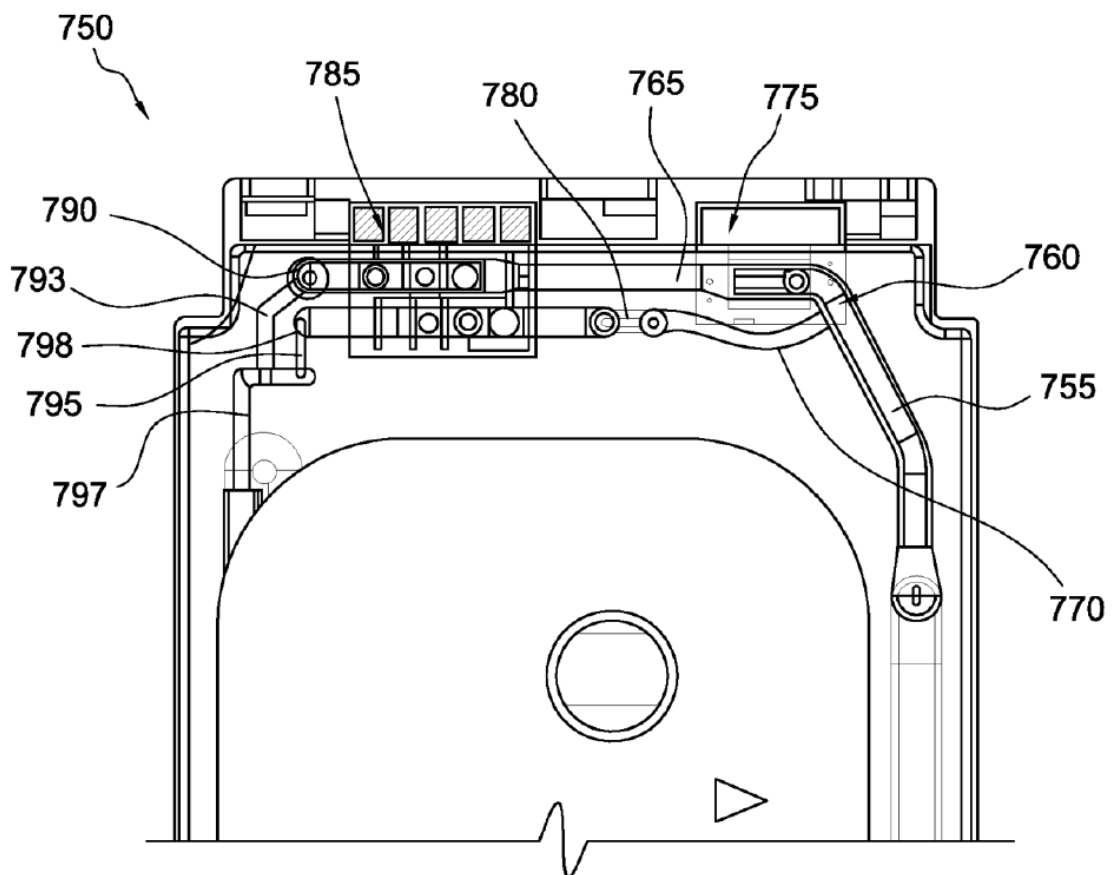


Figura 26

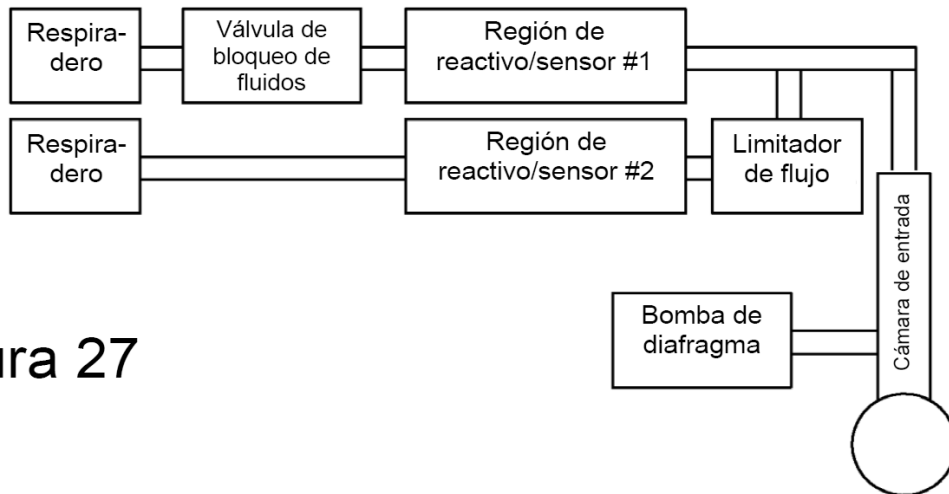


Figura 27

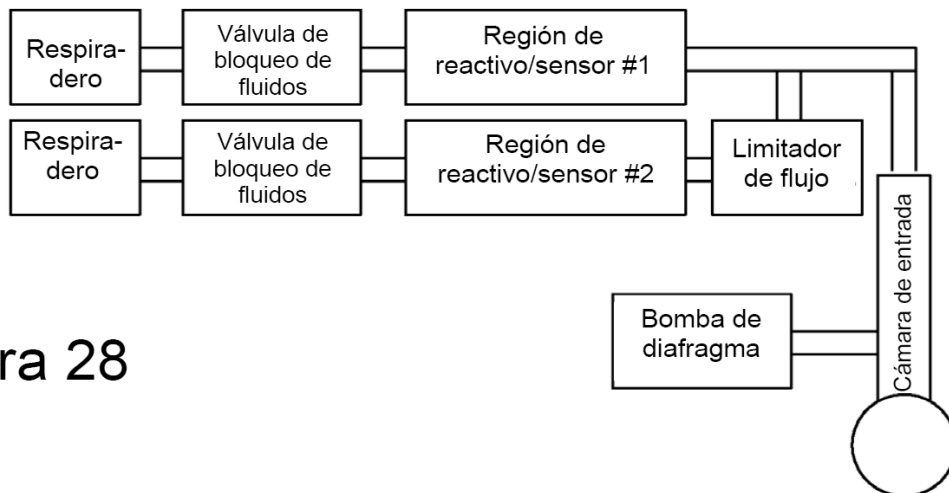


Figura 28

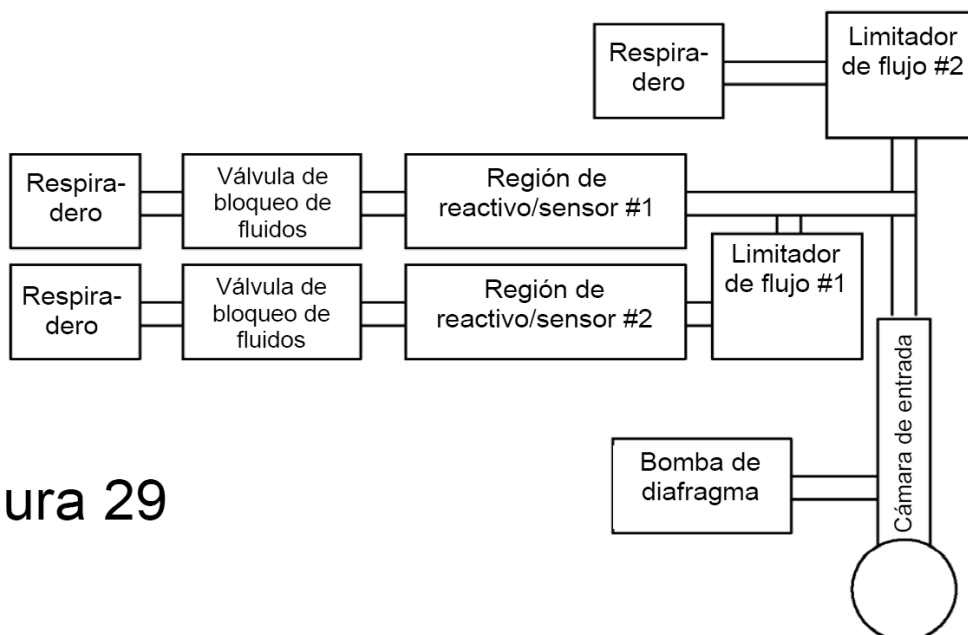


Figura 29

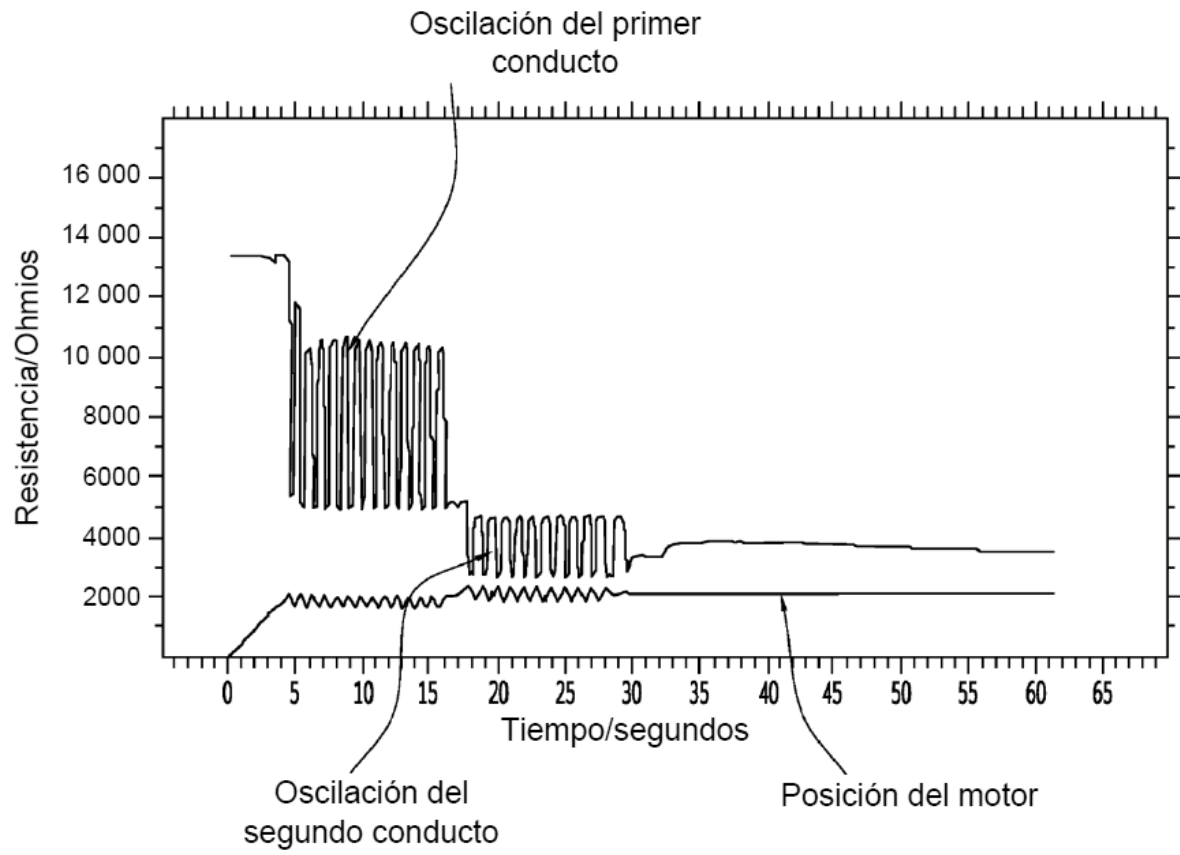


Figura 30

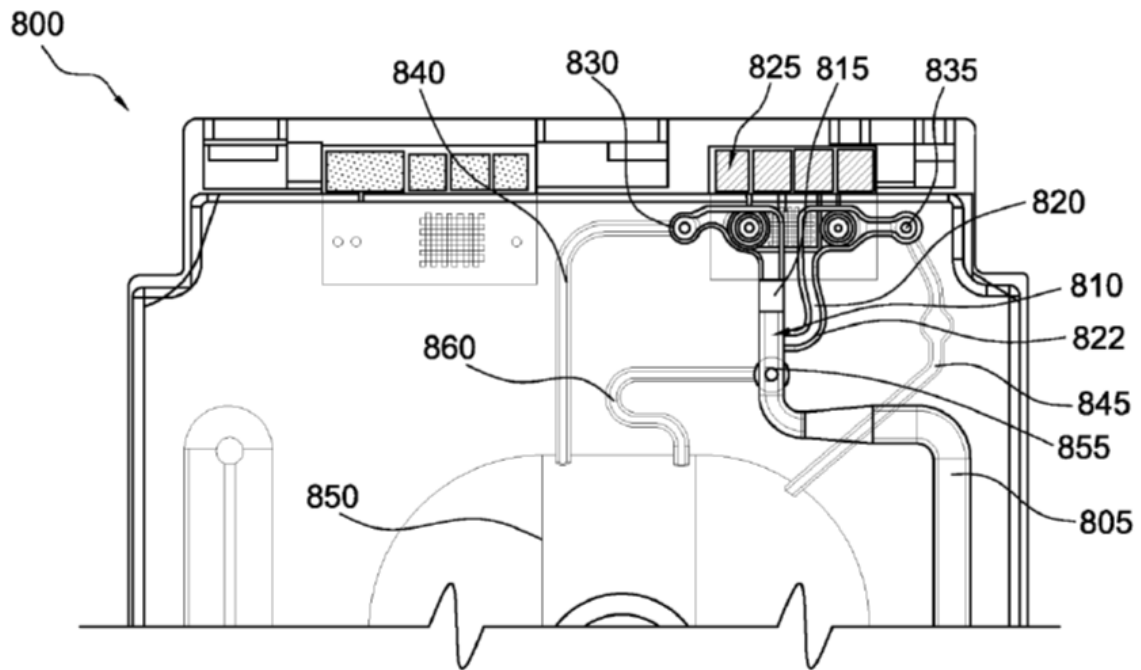


Figura 31

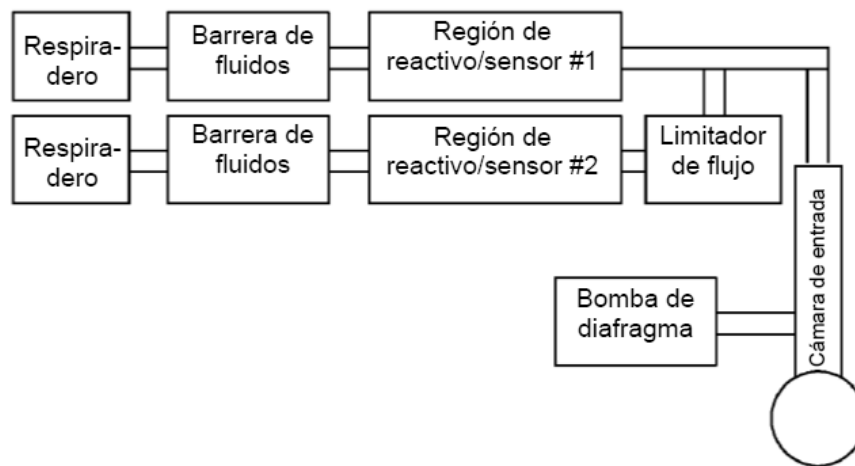


Figura 32

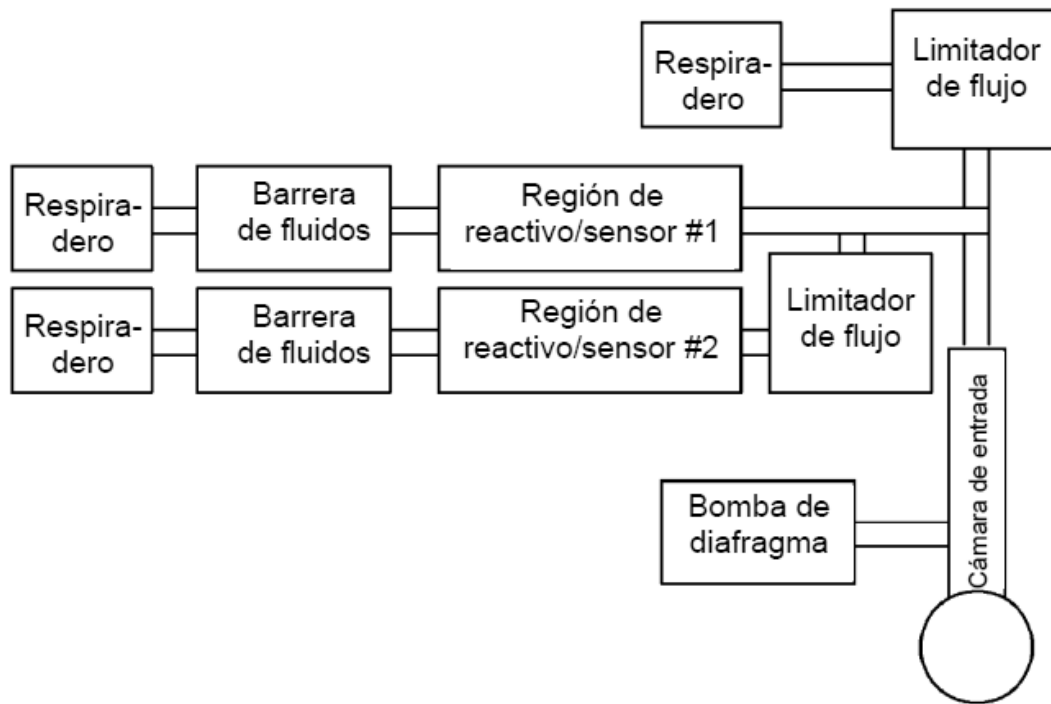


Figura 33

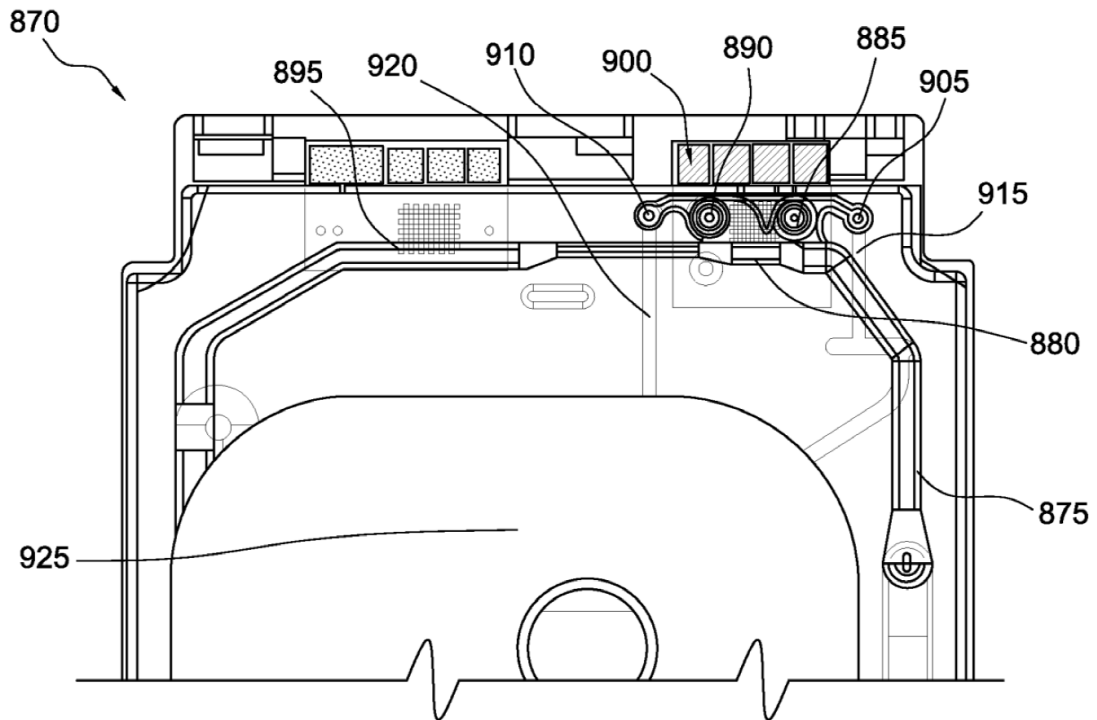


Figura 34

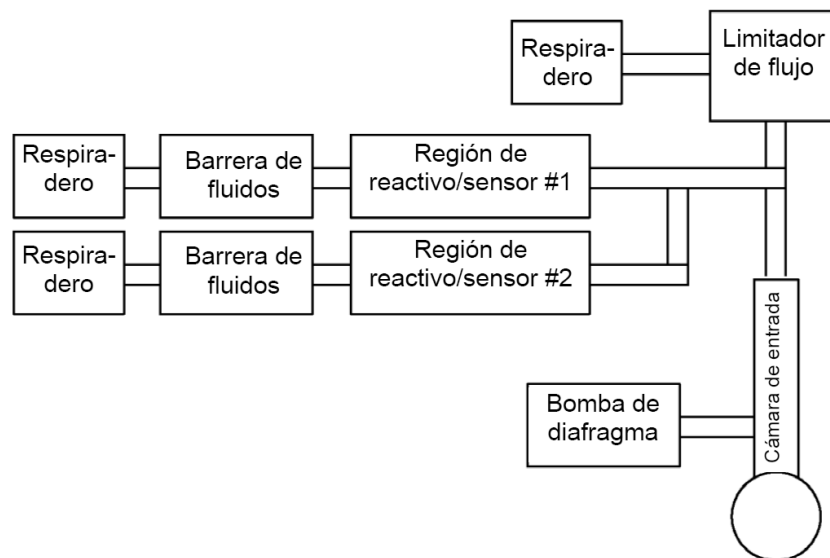


Figura 35

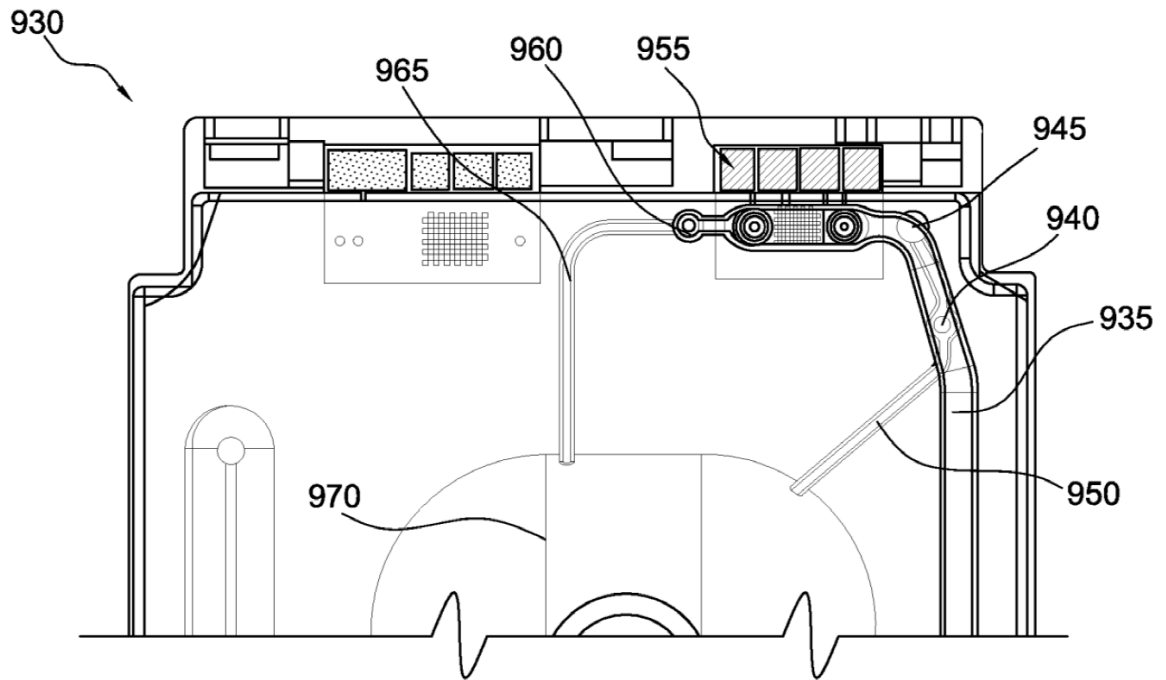


Figura 36

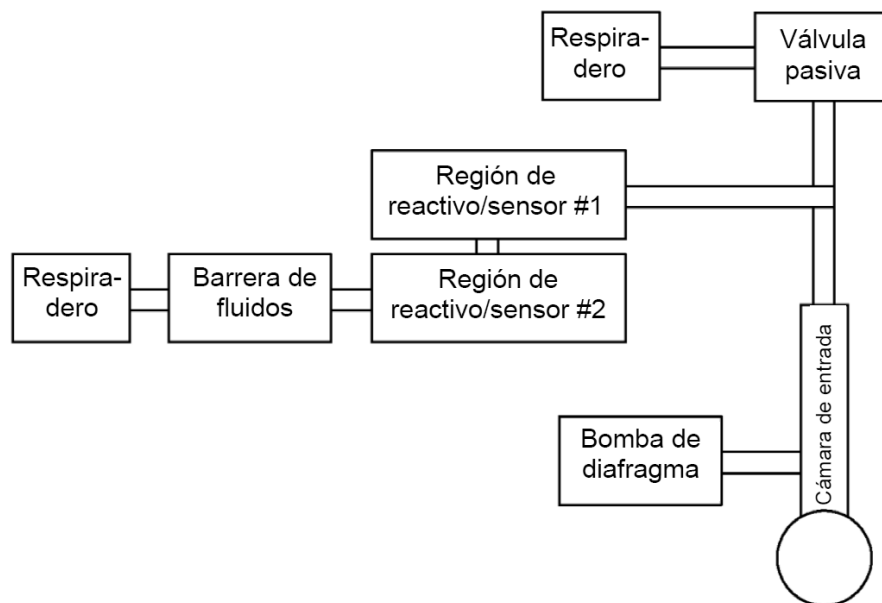


Figura 37

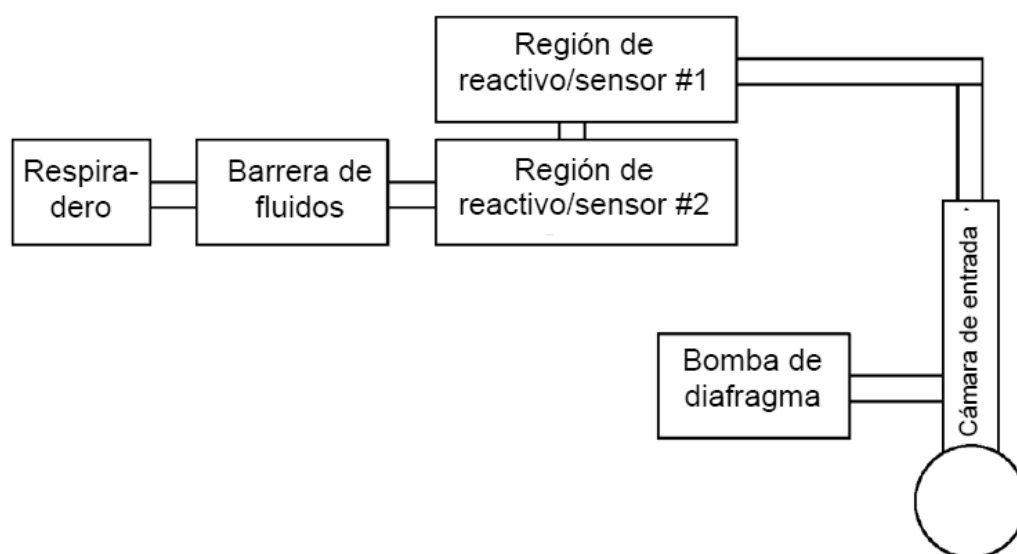


Figura 38

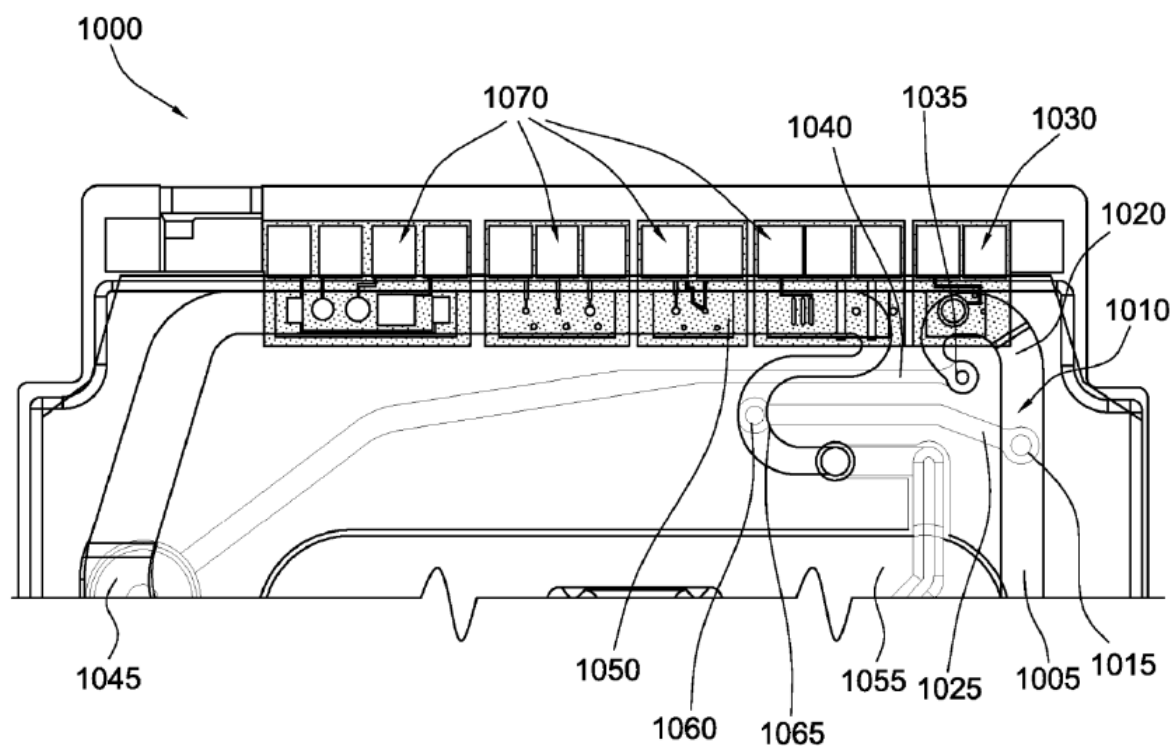


Figura 39

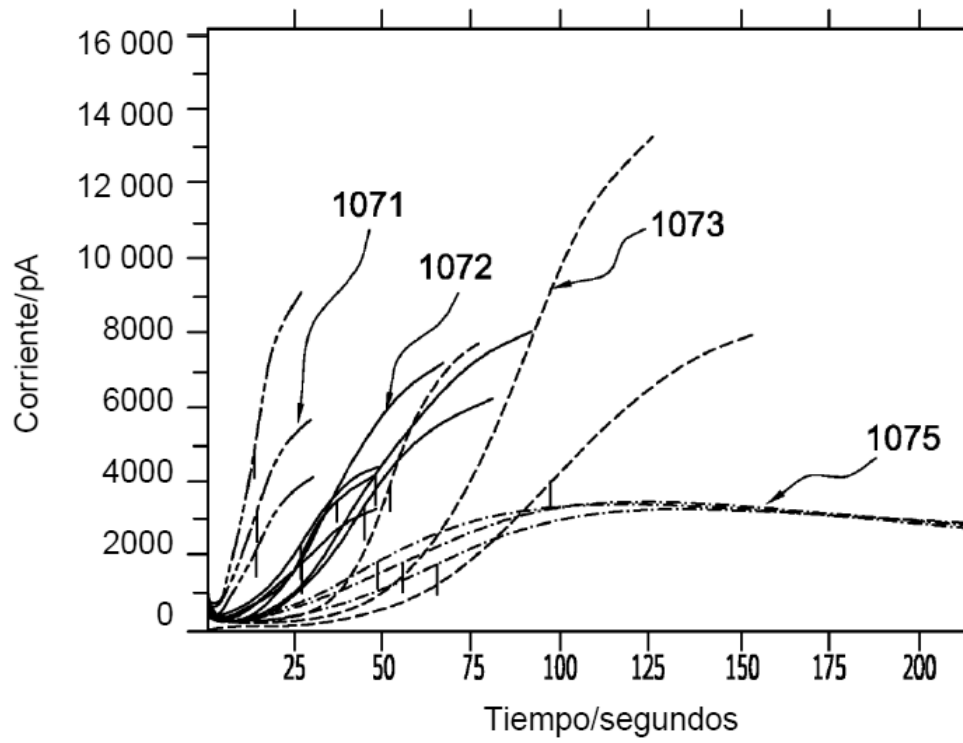


Figura 40

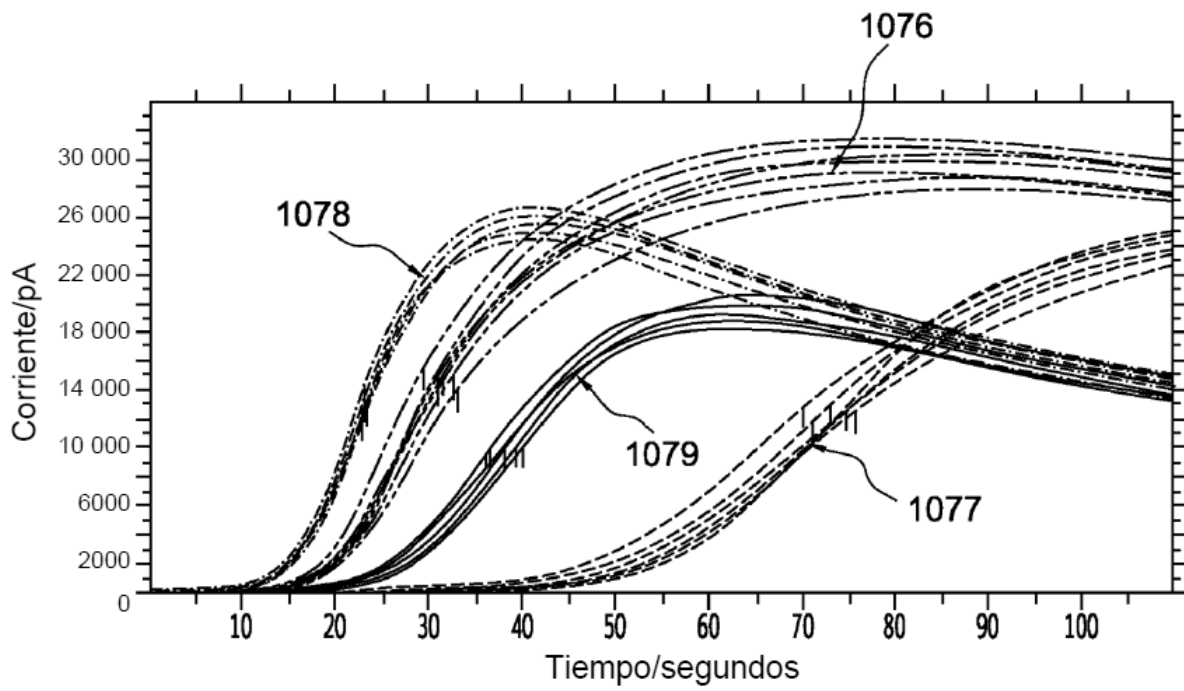


Figura 41A

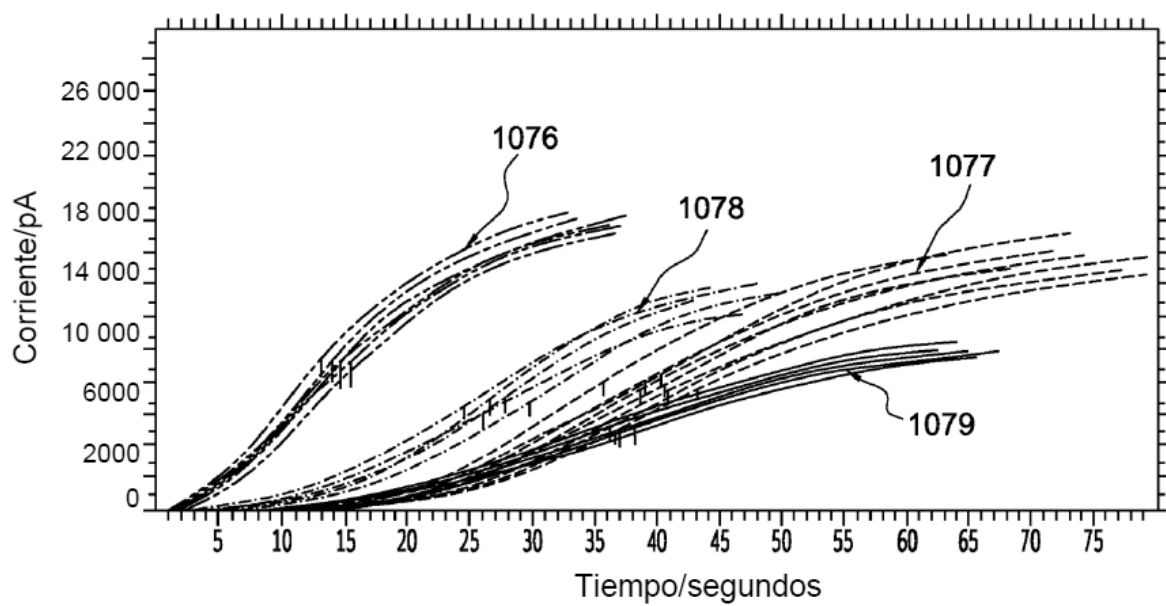


Figura 41B

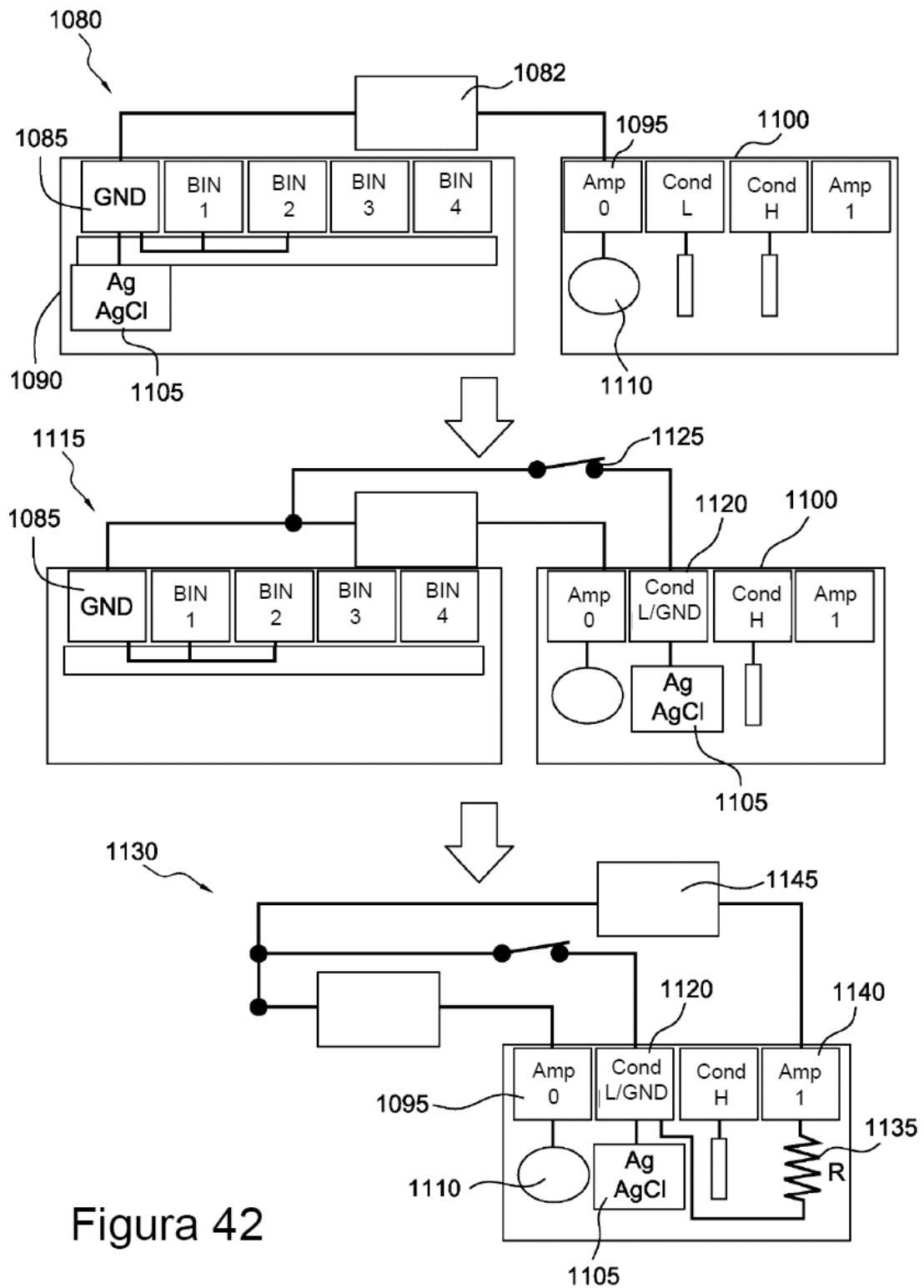


Figura 42

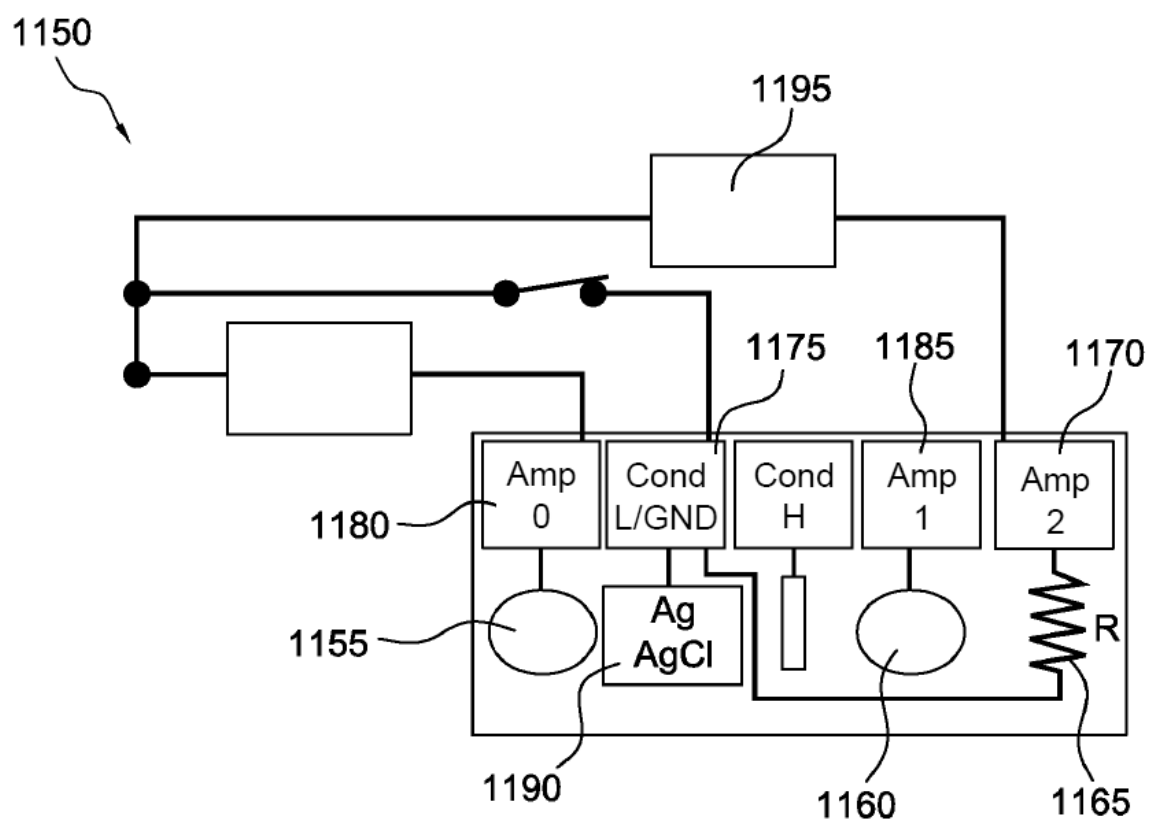


Figura 43