

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 583**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/18** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2018 PCT/SE2018/050266**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2018 WO18174784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2018 E 18771946 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023 EP 3601588**

54 Título: **Caracterización fenotípica de células**

30 Prioridad:

**22.03.2017 SE 1750341**

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

**14.11.2023**

73 Titular/es:

**ASTREGO DIAGNOSTICS AB (100.0%)**

**Vallvägen 4 B**

**756 51 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**ELF, JOHAN;**

**READ, MICHAEL;**

**BALTEKIN, ÖZDEN;**

**LOVMAR, MARTIN;**

**HAMMAR, PETTER;**

**AMSELEM, ELIAS;**

**OLSSON, MIKAEL y**

**ÖHMAN, OVE**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

ES 2 953 583 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

Caracterización fenotípica de células

## 5 Campo técnico

Las presentes realizaciones se refieren en general a la caracterización fenotípica de células y, en particular, a dicha caracterización fenotípica de células en un dispositivo de microfluídica.

## 10 Antecedentes

Con la aparición y propagación cada vez mayor de bacterias resistentes a los antibióticos, un factor clave en el tratamiento correcto de las infecciones es la capacidad de identificar de forma rápida y consistente el perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las especies infectantes para garantizar el uso de un antibiótico eficaz y reducir la necesidad de fármacos de amplio espectro. Actualmente, la resistencia de un patógeno bacteriano a un antibiótico se detecta mediante el fenotipado en ausencia y presencia del antibiótico, o mediante el genotipado de los marcadores genéticos correlacionados con la resistencia fenotípica observada previamente.

Los ensayos fenotípicos de susceptibilidad a los antibióticos (AST) se basan típicamente en la detección del crecimiento bacteriano diferencial con y sin antibióticos en cultivos líquidos o en placas de agar sólido. En los ensayos líquidos, la detección se basa en el cambio de densidad óptica, mientras que el método de difusión en disco se utiliza en placas de agar sólido para identificar las zonas de inhibición. Estos métodos son generalmente fiables para detectar resistencia y determinar la concentración de antibiótico que detiene el crecimiento bacteriano, lo que los hace predictivos de la utilidad terapéutica de diferentes antibióticos. Sin embargo, dado que se tarda 1-2 días en obtener una lectura fiable, estos métodos no proporcionan información sobre cómo tratar a un paciente en las etapas tempranas de infección, a menudo críticas. Como consecuencia, el médico se enfrenta a la difícil elección de prescribir un antibiótico de amplio espectro o arriesgarse a que el primer antibiótico prescrito sea ineficaz.

Los AST genotípicos se basan en la detección de marcadores genéticos específicos, tales como plásmidos, genes o mutaciones, asociados con fenotipos de resistencia mediante el uso de herramientas genéticas comunes, p. ej., amplificación específica de secuencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por amplificación de círculo rodante (RCA) mediada por sonda de candado o secuenciación del genoma completo. Estos ensayos son muy sensibles y pueden limitar el tiempo de detección a lo que se necesita para amplificar secuencias de ADN seleccionadas a niveles detectables. Sin embargo, requieren un conocimiento previo de qué marcadores de resistencia ensayar. Si surgen nuevos mecanismos de resistencia, estos pasarían sin ser detectados y darían falsos negativos. Además, la presencia de ciertos genes/mutaciones de resistencia no se traduce necesariamente en resistencia fenotípica.

A diferencia de los AST genotípicos, los AST fenotípicos evalúan directamente si el antibiótico detiene el crecimiento bacteriano, que es la medida más relevante para el médico tratante. Por lo tanto, en los últimos años se han desarrollado nuevos AST fenotípicos para disminuir el tiempo de detección.

Al detectar la abundancia relativa de ARNr 16S en cultivos líquidos en lugar de medir la densidad óptica, el tiempo de detección del AST puede reducirse a unas pocas horas. De manera similar, al reducir el volumen de crecimiento y aplicar imágenes de apilamiento en z para calcular la ocupación de células, el tiempo de detección del AST se redujo a -100 min.

Durante los últimos años, la microfluídica ha revolucionado la manipulación y observación de células microbianas individuales, y una dirección provechosa para el AST es usar microfluídica para miniaturizar las cámaras de incubación bacterianas para aumentar la relación de señal a fondo. Un ejemplo reciente de un método de AST basado en microfluídica simple crea un gradiente de concentración y lo aplica a cultivos de células pequeñas en cámaras de 30 nl. El análisis de imágenes tomadas cada 60 min permite la detección de la concentración inhibitoria mínima (MIC) en 180 min [1].

Una restricción en la realización de los AST eficaces basados en microfluídica ha sido la dificultad de capturar o cargar células en los dispositivos de microfluídica. Una solución es cargar el cultivo líquido de bacterias mezclado con agarosa líquida, que solidifica al enfriarse y captura las bacterias. En este enfoque, el suministro del antibiótico al canal de agarosa microfluídica (MAC) se basa en la difusión y el AST rápido, típicamente de 1-4 horas, se logra mediante el seguimiento de la velocidad de crecimiento de células individuales a partir de imágenes de contraste de fase. Otra solución se basa en el éxito de MAC moviéndolo a un chip de 96 pocillos y combinándolo con el análisis morfológico de una sola célula (SCMA). Este método permite la identificación simultánea de varias respuestas de múltiples especies a varios antibióticos y era capaz de detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en 60-120 min.

Se ha desarrollado un dispositivo de microfluídica que se puede utilizar para la caracterización fenotípica de

las células [2]. El dispositivo de microfluidica comprende una pluralidad de canales de células paralelos que tienen un primer extremo respectivo en conexión fluida con un canal de entrada de flujo y un segundo extremo respectivo en conexión fluida con un primer extremo de un canal de lavado respectivo. El segundo extremo respectivo de los canales de lavado está en conexión fluida con un canal de salida de flujo. Los canales de células tienen dimensiones para acomodar células en monocapa, mientras que los canales de lavado tienen dimensiones demasiado pequeñas para acomodar las células.

El dispositivo de microfluidica como se describe en [2] se usó para hacer un AST en menos de 30 minutos comenzando con solo mil células bacterianas en menos de 1 ml de líquido [3]. El AST rápido se basa en una técnica de captura de microfluidos y mediciones de la velocidad de crecimiento de células individuales.

El documento WO 2013/130875 describe métodos, composiciones, kits y sistemas para la determinación rápida de la susceptibilidad a antibióticos de un microbio en el espacio de horas después de recoger una muestra. Los métodos, composiciones, kits y sistemas descritos pueden permitir la determinación de la susceptibilidad a antibióticos de un microbio basándose en un pequeño número de microbios, p. ej., tan pocos como 5-10 microbios unidos a un sustrato dirigido a microbios.

Todavía existe la necesidad de mejoras en el campo del fenotipado celular usando dispositivos de microfluidica, y en particular cuando se hace el fenotipado de células presentes en muestras biológicas complejas y heterogéneas que comprenden una variedad de material biológico y no biológico

#### Compendio

Es un objetivo general proporcionar un fenotipado de células utilizando dispositivos de microfluidica.

Es un objetivo particular proporcionar un fenotipado de células presentes en muestras biológicas heterogéneas.

Estos y otros objetivos se cumplen mediante las realizaciones que se describen en el presente documento.

La presente invención se define en la reivindicación independiente. Realizaciones adicionales de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

Un aspecto de las realizaciones se refiere a un método para el fenotipado de células. El método comprende cargar una muestra biológica que comprende material biológico que incluye células diana de un tipo de células y células no diana de otro tipo de células en un dispositivo de microfluidica que comprende compartimentos de células espacialmente definidos y separados para capturar material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. El método también comprende el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados antes de exponer el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados a un agente de ensayo. El método comprende además identificar un subconjunto de compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden células diana que presentan al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en el seguimiento del material biológico en los compartimentos espacialmente definidos y separados. El método también comprende la identificación de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados restantes que comprenden células no diana y/o material no celular que no presenta al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células separados espacialmente definidos. El método comprende adicionalmente exponer material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados al agente de ensayo y hacer el seguimiento de las células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. El seguimiento comprende tomar al menos una imagen de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados y procesar la al menos una imagen para la detección del subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados y las células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados, sin tener en cuenta los restantes compartimentos de células espacialmente definidos y separados y las células no diana y/o el material no celular en los restantes compartimentos de células espacialmente definidos y separados. El método también comprende determinar una respuesta fenotípica de las células diana al agente de ensayo basándose en el seguimiento de las células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

Las presentes realizaciones permiten el fenotipado eficiente y preciso de las células diana presentes en una muestra biológica heterogénea que comprende varios tipos de células y material no celular. Se utiliza una selección inicial para identificar los compartimentos de células en el dispositivo de microfluidica que se considera que albergan las células diana. El fenotipado se realiza luego basado en la respuesta del material biológico, es decir, células diana, en los compartimentos de células identificados sin tener en cuenta ninguna respuesta del material, es decir, otras células y material no celular, en los compartimentos de células restantes. Por lo tanto, la respuesta fenotípica de las células diana no queda eclipsada por la respuesta de otras células y material no celular en la muestra biológica heterogénea.

Breve descripción de los dibujos

5 Las realizaciones, junto con otros objetos y ventajas de las mismas, pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 es un diagrama de flujo que ilustra un método para el fenotipado según una realización;

10 La Fig. 2 es un diagrama de flujo que ilustra una etapa opcional adicional del método mostrado en la Fig. 1;

La Fig. 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la etapa de identificación S3 en la Fig. 1;

La Fig. 4 es un diagrama de flujo que ilustra otra realización de la etapa de identificación S3 en la Fig. 1;

15 La Fig. 5 es un diagrama de flujo que ilustra la etapa de identificación S3 y la etapa de seguimiento S5 en la Fig. 1;

La Fig. 6 es un diagrama de flujo que ilustra una etapa opcional adicional del método mostrado en la Fig. 1;

20 La Fig. 7 es una ilustración de un dispositivo de microfluídica que se puede utilizar en el método de fenotipado según una realización;

La Fig. 8 es una imagen de microscopía electrónica de barrido que muestra parte del molde para un dispositivo de microfluídica según una realización (aumento:  $11 \times 10^3 \times$ );

25

La Fig. 9 es una imagen de contraste de fase de una parte de un dispositivo de microfluídica cargado con una muestra biológica;

30 La Fig. 10 son imágenes de contraste de fase de una parte de un dispositivo de microfluídica en tres instantes de tiempo diferentes después de cargar el dispositivo de microfluídica con una muestra biológica;

Las Figs. 11A y 11B muestran la longitud (Fig. 11A) y la velocidad de crecimiento (Fig. 11B) en función del tiempo representado para canales de células individuales de un dispositivo de microfluídica;

35 La Fig. 12 es una ilustración de un dispositivo de microfluídica que se puede utilizar en el método de fenotipado según otra realización; y

La Fig. 13 es una ilustración de la región de trampa celular en el dispositivo de microfluídica de la Fig. 12.

40 Descripción detallada

Las presentes realizaciones se refieren en general a la caracterización fenotípica de células y, en particular, a dicha caracterización fenotípica de células en un dispositivo de microfluídica.

45 Los dispositivos de microfluídica, también denominados chips de microfluídica en la técnica, se pueden usar para el fenotipado, es decir, la caracterización fenotípica, de células de una manera eficiente en el tiempo. Sin embargo, en las aplicaciones de la vida real, la entrada de muestras biológicas a los dispositivos de microfluídica puede ser una muestra compleja y heterogénea que comprende varios materiales biológicos, que incluyen las células diana para el fenotipado, otras células y desechos celulares, y material no biológico, tal como suciedad, contaminantes, etc. Por lo tanto, la muestra biológica suele ser heterogénea y las células diana pueden constituir de hecho una minoría, incluso una minúscula minoría, del material presente en la muestra biológica.

55 La heterogeneidad de la muestra biológica puede deberse a varias razones. Por ejemplo, la muestra biológica en sí misma puede consistir en varios tipos de células y material no celular tomado de un sujeto animal o humano. Alternativamente, o además, la muestra biológica puede contaminarse durante la toma de muestra y/o hasta el punto de cargar la muestra biológica en el dispositivo de microfluídica. Un ejemplo típico de esto último es una muestra de orina de chorro medio. No es raro que una muestra de chorro medio de orina de este tipo incluya contaminación celular y microbiana, tal como células y bacterias de la piel del paciente.

60

Por lo tanto, puede haber problemas y dificultades en el fenotipado de células diana en una muestra biológica en un dispositivo de microfluídica debido a la heterogeneidad de la muestra biológica y la presencia de otras células y material no celular que puede afectar negativamente a la caracterización fenotípica.

65 Por ejemplo, el fenotipado de células diana se puede realizar por seguimiento de la respuesta de las células diana a un estímulo, tal como la exposición a un agente de ensayo, una condición ambiental particular, etc. Si

las células diana constituyen una minoría del material que se captura y se siguen en el dispositivo de microfluidica, el fenotipado puede tener errores por la presencia de otras células y material no celular. En el peor de los casos, la caracterización fenotípica de las células diana puede ser incorrecta, asignando así un fenotipo incorrecto a las células diana.

5

Un ejemplo típico es ensayar la susceptibilidad a antibióticos de las bacterias presentes en la orina de un paciente que padece una infección del tracto urinario (UTI). Si la muestra de orina está contaminada por células y bacterias de, por ejemplo, la piel, dichas células contaminantes pueden constituir la gran mayoría de las células en la muestra de orina cargada en el dispositivo de microfluidica. Sin embargo, es posible que las bacterias contaminantes no crezcan ni sobrevivan en la muestra de orina debido a los constituyentes y al pH de la muestra de orina. Si las células cargadas en el dispositivo de microfluidica se exponen a un antibiótico para ensayar la susceptibilidad de las bacterias que causan las UTI en la orina, entonces la mayoría de las células capturadas no crecerán, no principalmente por la presencia del antibiótico sino debido a que las células contaminantes no crecerán en la orina. Por lo tanto, el seguimiento del crecimiento de células en el dispositivo de microfluidica en presencia de antibiótico puede concluir que las bacterias que causan UTI son susceptibles al antibiótico ya que la mayoría de las células capturadas en el dispositivo de microfluidica no crecen en presencia de antibiótico. Esto significa que el crecimiento de bacterias resistentes en la orina puede verse eclipsado por la falta de crecimiento de las células que no son viables en la orina. Como resultado, las bacterias que causan las UTI en la orina pueden clasificarse incorrectamente como susceptibles al antibiótico, incluso si realmente son resistentes al antibiótico. Esto, a su vez, puede tener graves consecuencias cuando se trata a un paciente del que se tomó la muestra de orina, por la administración de un antibiótico que no inhibirá significativamente el crecimiento de bacterias resistentes presentes en la orina del paciente.

10

15

20

25

Las presentes realizaciones proporcionan un método para el fenotipado de células que resuelve el problema mencionado anteriormente de cargar una muestra biológica compleja o heterogénea en un dispositivo de microfluidica con el fin de hacer el fenotipado de las denominadas células diana presentes en la muestra biológica.

30

A continuación, "células diana" indica células, tales como bacterias, p. ej., células de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, células de arqueas, células eucariotas, células de levadura, células animales, células humanas, células cancerosas, etc., presentes en una muestra biológica. Estas células diana deben ser fenotipadas, es decir, se determina al menos una característica de fenotipo de las células diana en el método de las realizaciones.

35

El dispositivo de microfluidica utilizado en el método para el fenotipado de células comprende compartimentos de células espacialmente definidos y separados, o compartimentos de células para abreviar. Dichos compartimentos de células están diseñados para capturar y albergar material biológico presente en la muestra biológica. En consecuencia, cuando se carga la muestra biológica en el dispositivo de microfluidica, el material biológico, tal como células, presente en la muestra biológica es capturado por los compartimentos de células. Los compartimentos de células están espacialmente definidos y separados. Esto significa que cada compartimento de células tiene una posición espacialmente definida en el dispositivo de microfluidica y cada compartimento de células está separado, típicamente separado físicamente, de otros compartimentos de células en el dispositivo de microfluidica. En consecuencia, es posible separar físicamente y seguir individualmente el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados del dispositivo de microfluidica.

40

45

Un compartimento de células puede ser cualquier estructura física o parte del dispositivo de microfluidica que está dimensionado y diseñado para capturar y albergar células. Los ejemplos no limitativos pero ilustrativos de dichos compartimentos de células incluyen canales de células, trampas de células, etc.

50

La Fig. 1 es un diagrama de flujo que ilustra un método para el fenotipado de células según una realización. El método comprende cargar, en la etapa S1, una muestra biológica que comprende material biológico que incluye células diana de un tipo de células y células no diana de otro tipo de células en un dispositivo de microfluidica. El dispositivo de microfluidica comprende compartimentos de células espacialmente definidos y separados para capturar material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. Una etapa S2 a continuación comprende el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados antes de exponer el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados a un agente de ensayo. Se identifica un subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S3 como que comprende células diana que presentan al menos una característica de fenotipo determinada basándose en el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S2.

55

60

El material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados se expone al agente de ensayo en la etapa S4. Una etapa S5 siguiente comprende el seguimiento de células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. A continuación, se determina una respuesta fenotípica de las células diana al agente de ensayo en la etapa S6

65

basándose en el seguimiento de las células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S5.

5 El método de las realizaciones por lo tanto implica una etapa de selección para identificar aquellos compartimentos de células espacialmente definidos y separados del dispositivo de microfluídica que comprenden células diana antes de determinar la respuesta fenotípica de las células diana. Por lo tanto, el material biológico capturado o cargado en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados se sigue para identificar los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden material biológico que presenta al menos una característica de fenotipo objetivo. A continuación, la respuesta  
10 fenotípica se determina en la etapa S6 basándose únicamente en la respuesta del material biológico, es decir, las células diana, que está presente en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados identificados en la etapa S3. En consecuencia, el material biológico en los restantes compartimentos de células espacialmente definidos y separados induce células y material no celular distinto de las células diana según se determina basándose en no presentar el al menos un fenotipo objetivo. Las respuestas de dicho material en  
15 los restantes compartimentos de células espacialmente definidos y separados por lo tanto se descartan y no se utilizan para determinar la respuesta fenotípica en la etapa S6.

Esto significa que la respuesta fenotípica determinada en la etapa S6 es, de hecho, la verdadera respuesta de las células diana al agente de ensayo en el material biológico y esta respuesta fenotípica no será eclipsada o  
20 afectada por las respuestas de otras células y material no celular en la muestra biológica.

Por ejemplo, supóngase que la muestra biológica es una muestra de orina tomada de un paciente que padece UTI y que la susceptibilidad de las bacterias que causan UTI como células diana a un antibiótico se va a ensayar en el método que se muestra en la Fig. 1. La muestra de orina se carga entonces en la etapa S1 en el dispositivo de microfluídica para capturar las bacterias que causan la UTI y cualquier bacteria y célula contaminante en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. Las bacterias y células contaminantes pueden no ser viables en la orina y, por lo tanto, no crecerán o al menos crecerán lentamente. En consecuencia, la etapa S2 puede, por ejemplo, implicar el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados con el fin de determinar su viabilidad o crecimiento celular, tal como estudiando la extensión de la longitud de las células durante un período de tiempo. Por lo tanto, la etapa S3 puede implicar la identificación del subconjunto o parte de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprende células que son viables y/o tienen una velocidad de crecimiento superior a una velocidad de crecimiento objetivo determinada basándose en el seguimiento en la etapa S2. El material biológico en este subconjunto identificado es, por lo tanto, viable y crece bien en la orina y, por lo tanto, constituye principalmente las bacterias causantes de la UTI. El material en los restantes  
25 compartimentos de células espacialmente definidos y separados no es viable y tiene una velocidad de crecimiento por debajo de la velocidad de crecimiento objetivo. Por lo tanto, este material consiste principalmente en células y bacterias contaminantes y material no celular de la muestra de orina.

40 El material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados luego se expone al antibiótico y el material biológico, es decir, las bacterias que causan las UTI, presentes en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados identificados en la etapa S3 se siguen en la etapa S5 y la respuesta fenotípica de este material biológico, es decir, bacterias que causan UTI, al antibiótico se determina luego en la etapa S6 basándose en el seguimiento de la etapa S5. La susceptibilidad o resistencia de las bacterias que causan UTI al antibiótico se puede determinar de manera eficiente en la etapa S6 sin el riesgo de eclipsamiento o de que influyan en la respuesta las células o bacterias contaminantes de la muestra de orina.

Por lo tanto, de acuerdo con las presentes realizaciones, primero se realiza un seguimiento inicial del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S2 antes de exponer el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados al agente de ensayo en la etapa S4. El seguimiento inicial en la etapa S2 se realiza antes de la adición del agente de ensayo con el fin de identificar al menos un subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados para el seguimiento una vez que se haya añadido el agente de ensayo. Si el agente de ensayo ya estuviera presente en la etapa S2, sería difícil o incluso imposible diferenciar entre las células muertas o no viables y material no celular de las células que son susceptibles al agente de ensayo y, por lo tanto, no pueden crecer en presencia del agente de ensayo. Por lo tanto, el seguimiento en la etapa S2 y la posterior identificación en la etapa S3 se realizan con el fin de identificar aquellos compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden células viables, capaces de crecer en los  
50 compartimentos de células espacialmente definidos y separados, y diferenciar dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados de los que contienen células no viables y material no celular.

En una realización, el seguimiento inicial en la etapa S2 se realiza durante al menos un período de tiempo mínimo con el fin de permitir una identificación correcta de los compartimentos de células espacialmente  
55 definidos y separados que comprenden células diana en la etapa S3. Por ejemplo, el seguimiento en la etapa S2 se realiza al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, al menos 3 minutos, al menos 4 minutos, al menos 5

minutos, al menos 6 minutos, al menos 7 minutos, al menos 8 minutos, al menos 9 minutos o al menos 10 minutos. El período de tiempo mínimo real depende típicamente de las células diana y de la característica de fenotipo particular. Por ejemplo, si la característica de fenotipo es el crecimiento de las células diana, el período de tiempo mínimo se establece preferiblemente para permitir que las células diana se dividan al menos una vez. Por lo tanto, el período de tiempo mínimo podría establecerse en función del ciclo celular o el tiempo de división celular promedio de las células diana.

En una realización, la muestra biológica es una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina, una muestra de sangre, una muestra de saliva, una muestra de heces, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de líquido amniótico, una muestra de leche o una muestra de linfa. Alternativamente, la muestra biológica podría obtenerse de un tejido corporal, tal como una biopsia. Otros ejemplos incluyen muestra de alimento analizada para determinar contaminaciones bacterianas, leche de vaca, cabra u otros animales productores de leche para pruebas de mastitis, etc. En realidad, cualquier muestra biológica que comprenda células y que pueda cargarse en un dispositivo de microfluídica puede usarse según las realizaciones.

En la siguiente descripción, la etapa S4 se describe y se ejemplifica exponiendo el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados a un agente de ensayo. Este agente de ensayo podría ser cualquier molécula, compuesto, composición o una mezcla de moléculas, compuestos o composiciones. En realizaciones relacionadas, el material biológico se expone más generalmente a un estímulo en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. Tal estímulo no tiene que ser necesariamente un agente de ensayo, sino que podría ser un cambio en las condiciones ambientales, tal como un cambio de temperatura. Por lo tanto, la respuesta fenotípica de las células diana a los estímulos se determina luego en la etapa S6.

La Fig. 2 es un diagrama de flujo que ilustra una etapa opcional adicional del método que se muestra en la Fig. 1. El método continúa desde la etapa S1 en la Fig. 1. La siguiente etapa S10 comprende exponer material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados a un medio de cultivo. El método luego continúa a la etapa S2 en la Fig. 1, que comprende, en esta realización, el seguimiento del material biológico expuesto al medio de cultivo en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

En una realización, la propia muestra biológica se considera como el medio de cultivo. Por lo tanto, cualquier material biológico en la muestra biológica y capturado en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados se expone al material biológico como medio de cultivo. En esta realización, no hay necesidad de ningún intercambio de medios.

En una realización alternativa, hay un cambio de medio después de cargar la muestra biológica en la etapa S1. Por lo tanto, el material biológico de la muestra biológica capturado en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados se expone luego a un nuevo medio de cultivo en la etapa S10. Este medio de cultivo se selecciona entonces preferiblemente de modo que las células diana presentarán la al menos una característica de fenotipo objetivo cuando se exponen al medio de cultivo, mientras que otras células y material no celular preferiblemente no presentarán la al menos una característica de fenotipo objetivo cuando se exponen al medio de cultivo en la etapa S10.

Este cambio de medio de cultivo podría realizarse más de una vez con el fin de exponer el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados a diferentes medios de cultivo. El medio o medios de cultivo podrían ser un medio de cultivo general que contenga todos los elementos que la mayoría de las células necesitan para crecer y no son selectivos. Alternativamente, el medio o medios de cultivo podrían ser un medio de cultivo mínimo que contenga los mínimos nutrientes posibles para el crecimiento celular, generalmente sin la presencia de aminoácidos. Dichos medios de cultivo mínimos pueden usarse para hacer crecer células de "tipo natural" y seleccionar a favor o en contra de recombinantes o exconjugantes. Otra alternativa es usar un medio o medios de cultivo que sean selectivos, es decir, que soporten el crecimiento de solamente células seleccionadas. Una variante relacionada es usar un medio o medios de cultivo diferenciales para distinguir un tipo de células de otro que crece en el mismo medio de cultivo. Este tipo de medio de cultivo utiliza las características bioquímicas de una célula que crece en presencia de nutrientes o indicadores específicos añadidos al medio de cultivo para indicar visiblemente las características definitorias de la célula.

En el caso de cambiar entre diferentes medios de cultivo, todos los medios de cultivo pueden ser del mismo tipo (medio de cultivo general, medio de cultivo mínimo, medio de cultivo selectivo o medio de cultivo diferencial) o el cambio puede ser entre diferentes tipos de medios de cultivo.

Por ejemplo, se podrían usar diferentes medios de cultivo selectivos que tienen diferentes fuentes de carbono en relación con bacterias que causan UTI para identificar diferentes poblaciones de células diana, que se describe más adelante en el presente documento. Por ejemplo, *Escherichia coli* causante de UTI puede crecer en un medio de cultivo que comprende arabinosa, lactosa, manitol o xilosa como fuente de carbono pero no en citrato. *Klebsiella pneumoniae* puede cultivarse utilizando cualquiera de las fuentes de carbono

mencionadas anteriormente, mientras que *Proteus mirabilis* solo crecerá utilizando citrato o xilosa como fuente de carbono y no arabinosa, lactosa o manitol. En consecuencia, *Staphylococcus epidermidis* solo usa lactosa como fuente de carbono y no arabinosa, citrato, manitol o xilosa.

5 En una realización, la etapa S4 de la Fig. 1 comprende exponer el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados al medio de cultivo que comprende el agente de ensayo o a otro medio de cultivo que comprende el agente de ensayo.

10 En la primera realización, el agente de ensayo se añade al mismo medio de cultivo que se usó en la etapa S10 de la Fig. 2, tal como se añade a la muestra biológica si la muestra biológica se usa como medio de cultivo. En esta realización, no hay necesidad de ningún intercambio de cultivo entre la etapa S10 y la etapa S4. Por lo tanto, la única diferencia es la adición del agente de ensayo al medio de cultivo en la etapa S4.

15 En la última realización, hay un intercambio de medio de cultivo en la etapa S4. Por lo tanto, en la etapa S4 se usa un medio de cultivo diferente que comprende el agente de ensayo en comparación con el medio de cultivo usado en la etapa S10. Este medio de cultivo diferente podría luego seleccionarse y adaptarse para la inclusión del agente de ensayo y el seguimiento de la respuesta de las células diana al agente de ensayo en el medio de cultivo diferente.

20 La etapa S3 en la Fig. 1 comprende identificar el subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden células diana que presentan al menos una característica de fenotipo objetivo según se determina basándose en el seguimiento de la etapa S2. En una realización, el material biológico que presenta una característica de fenotipo objetivo se determina en la etapa S3 que son células diana y los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden dicho material biológico se incluyen en el subconjunto identificado en la etapa S3. El material que no presenta esta característica de fenotipo objetivo no se considera por tanto como células diana y los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden dicho material no deben incluirse en el subconjunto identificado en la etapa S3.

30 En otra realización, el material biológico que presenta múltiples, es decir, al menos dos, características de fenotipo objetivo se determina en la etapa S3 que son células diana y los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden dicho material biológico se incluyen en el subconjunto identificado en la etapa S3. El material que no presenta ninguna de las múltiples características de fenotipo objetivo o simplemente presenta algunas, pero no todas las múltiples características de fenotipo objetivo, no se considera como células diana y los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden dicho material no deben incluirse en el subconjunto identificado en la etapa S3.

40 Los ejemplos ilustrativos, pero no limitativos, de las características de fenotipo objetivo podrían ser la velocidad de crecimiento, la figura, tamaño, forma de la curva de la velocidad de crecimiento que define la velocidad de crecimiento a lo largo del tiempo, la forma de la curva de longitud que define la longitud de la célula a lo largo del tiempo, la forma de superficie de la curva que define la superficie celular a lo largo del tiempo, el color, densidad óptica, conductividad eléctrica, producción de calor, composición del antígenos de superficie observada por los reactivos de afinidad, espectros de absorción y una mezcla de al menos dos de tales características de fenotipo.

45 Una característica de fenotipo objetivo puede ser el complemento de una característica del material celular no objetivo. Por lo tanto, la característica del fenotipo objetivo podría ser la falta de una característica de fenotipo determinada. En tal caso, el material celular no objetivo presenta la característica de fenotipo, mientras que las células diana tienen la característica de fenotipo objetivo al no presentar la característica de fenotipo dada.

50 La velocidad de crecimiento en una condición de cultivo dada, tal como medio de cultivo, es una característica o rasgo fenotípico que se puede usar ventajosamente para discriminar células diana de otro material. La velocidad de crecimiento se puede determinar, por ejemplo, mediante el seguimiento del número de células o partículas en cada compartimento de células espacialmente definido y separado, ya que el número aumentará a lo largo del tiempo para las células en crecimiento. Alternativamente, o además, la velocidad de crecimiento puede determinarse mediante el seguimiento de la longitud de la parte de un compartimento de células espacialmente definido y separado ocupado por células o partículas. Esta longitud aumentará a lo largo del tiempo para las células en crecimiento, pero seguirá siendo la misma para las células no viables y que no crecen y el material no celular. La Fig. 11A ilustra dicha duración a lo largo del tiempo en compartimentos de células espacialmente definidos y separados de un dispositivo de microfluídica. Alternativamente, o además, la velocidad de crecimiento se puede determinar mediante el seguimiento de la superficie o la longitud de las células segmentadas en imágenes de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

65 La velocidad de crecimiento a lo largo del tiempo normalmente varía entre diferentes tipos de células. Por ejemplo, algunos tipos de células crecen exponencialmente, mientras que otros crecen de forma más periódica. En consecuencia, la figura o forma de la curva de velocidad de crecimiento puede usarse para discriminar

células diana de otras células y material no celular. La Fig. 11B ilustra las curvas de velocidad de crecimiento del material capturado en compartimentos de células espacialmente definidos y separados de un dispositivo de microfluidica.

5 Otras características fenotípicas que varían entre diferentes tipos de células y entre células y material no celular incluyen la forma, tamaño, color y densidad óptica. Por lo tanto, varios tipos de células pueden tener diferentes formas, tal como forma de varilla, esférica, retorcida, forma de disco, etc. También el tamaño, tal como la longitud y/o el diámetro, es una característica de fenotipo que se puede usar para diferenciar células entre sí y del material no celular, tal como variando desde sub- $\mu\text{m}$  hasta varias decenas de  $\mu\text{m}$ .

10 La densidad óptica, el color u otras propiedades espectrales difieren entre los diferentes tipos de células, tal como dependiendo del contenido de las células, la forma de las células, etc., y entre células y material no celular. Por lo tanto, las propiedades ópticas del material en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados pueden usarse para diferenciar células, células no diana y material no celular.

15 La conductividad y la producción de calor dependerán de la composición química y el estado metabólico de las células y, por lo tanto, pueden constituir la base para diferenciar las células diana de las células no diana.

20 La Fig. 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la etapa S3 en la Fig. 1. En esta realización, la etapa S3 comprende identificar, en la etapa S20, células diana que presentan al menos un fenotipo objetivo determinado basándose en el seguimiento de material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S2. Una etapa S21 a continuación comprende entonces seleccionar el subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados como un subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden las células diana identificadas.

30 Por lo tanto, en esta realización, el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados se sigue en la etapa S2. La siguiente etapa S20 identifica el material biológico, es decir, las células diana, que presentan al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en el seguimiento en la etapa S2. Los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden el material biológico identificados en la etapa S20 se seleccionan luego en la etapa S21 como el subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden células diana.

35 En una realización, la etapa S2 comprende el seguimiento, en múltiples puntos de tiempo, del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

40 Esta realización es particularmente adecuada para su uso en relación con las características de fenotipo objetivo en forma de velocidad de crecimiento y/o forma de curva de velocidad de crecimiento. Por lo tanto, con el fin de determinar o al menos estimar la velocidad de crecimiento o determinar la forma de la curva de velocidad de crecimiento, el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados debe seguirse en múltiples puntos de tiempo en la etapa S2.

45 Sin embargo, para otras características de fenotipo objetivo, tales como la forma, tamaño, color y densidad óptica, puede ser suficiente hacer el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados solo una vez en la etapa S2.

50 En consecuencia, la etapa S5 comprende, en una realización, el seguimiento, en múltiples puntos de tiempo, de células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. Por lo tanto, dependiendo de la respuesta fenotípica particular de las células diana al agente de ensayo, podría ser suficiente hacer el seguimiento de las células diana una vez en la etapa S5 o en múltiples puntos de tiempo.

55 En una realización, la etapa S2 comprende tomar al menos una imagen de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. De manera correspondiente, en una realización, la etapa S5 comprende tomar al menos una imagen de las células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. En estas realizaciones de las etapas S2 y S5 podría tomarse una única imagen en un único punto de tiempo. Alternativamente, se toman múltiples imágenes en múltiples puntos de tiempo en la etapa S2 y/o S5.

60 En una realización particular, la al menos una imagen tomada en la etapa S2 y/o S5 se toma utilizando una microscopía, tal como un microscopio de contraste de fase, conectado a una cámara, tal como un dispositivo de carga acoplada (CCD) y una cámara de semiconductor de óxido de metal complementaria (CMOS), o un sistema de barrido confocal para fluorescencia, imágenes Raman, dispersión Raman anti-Stokes coherente (CARS), dispersión Raman estimulada (SRS) y técnicas químicamente sensibles similares que proporcionan cambios espectrales para células muertas y vivas. Esto incluye mediciones en una o varias longitudes de onda

con o sin adiciones que potencien el contraste frente al medio de crecimiento, tales como sondas y colorantes químicamente específicos.

5 La conductividad y/o la producción de calor podrían medirse mediante electrodos o sensores dispuestos en o en conexión con los compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

10 La Fig. 4 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la etapa S3 en la Fig. 1 cuando la etapa S2 comprende tomar al menos una imagen de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. En esta realización, la etapa S3 comprende el procesamiento, en la etapa S30, de al menos una imagen para la detección de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados y material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. Al menos una característica de fenotipo respectiva del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados se determina en la etapa S31 basándose en el procesamiento. Una etapa S32 a continuación comprende la identificación de células diana como material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados y que tienen al menos una característica de fenotipo determinada respectiva correspondiente a la al menos una característica de fenotipo objetivo. La etapa S33 comprende seleccionar el subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados como un subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden las células diana identificadas.

20 En esta realización, la al menos una imagen tomada como se ha descrito previamente en el presente documento se procesa para identificar los compartimentos de células espacialmente definidos y separados y el material biológico presente en ellos en la etapa S30. Se determina al menos una característica de fenotipo respectiva para el material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S31 basándose en el procesamiento de la etapa S30. Por ejemplo, supóngase que la característica de fenotipo objetivo es una velocidad de crecimiento que supera una tasa umbral  $T_R$ . Supóngase además que el dispositivo de microfluídica comprende  $N$  compartimentos de células espacialmente definidos y separados. En tal caso, se determina una velocidad de crecimiento respectiva  $R_i$ ,  $i=1\dots N$  para el material respectivo en cada uno de los  $N$  compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S31. A continuación, las células diana se identifican como material biológico que tiene una velocidad de crecimiento  $R_i$  respectiva que supera la tasa umbral, es decir,  $R_i > T_R$ . Esto significa que el material biológico en los  $N$  compartimentos de células espacialmente definidos y separados puede clasificarse o identificarse como células diana si  $R_i > T_R$  y otras células o material no celular si  $R_i \leq T_R$ . Los compartimentos de células espacialmente definidos y separados entre los  $N$  compartimentos espacialmente definidos y separados que comprenden material biológico identificado en la etapa S32 como células diana, es decir, que tienen  $R_i > T_R$ , se seleccionan entonces en la etapa S33. Los otros compartimentos de células espacialmente definidos y separados son compartimentos de células espacialmente definidos y separados restantes que comprenden otro material distinto de las células diana. En tal caso, la respuesta fenotípica se determina posteriormente en la etapa S6 basándose únicamente en la respuesta fenotípica del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados seleccionados en la etapa S33 y por lo tanto identificados como que comprenden las células diana.

45 La Fig. 5 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas S3 y S5 en la Fig. 1. La etapa S1 de la Fig. 1 comprende cargar una muestra biológica que comprende material biológico que incluye las células diana de un tipo de células y las células no diana de otro tipo de células en el dispositivo de microfluídica para capturar material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. El método después continúa a la etapa S2 en la Fig. 1 y después además a la etapa S40 en la Fig. 5. La etapa S40 comprende identificar un subconjunto de compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden células diana que presentan al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en el seguimiento del material biológico en los compartimentos espacialmente definidos y separados en la etapa S2. La etapa S41 comprende de forma correspondiente la identificación de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados restantes que comprenden células no diana y/o material no celular que no presenta la al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células separados espacialmente definidos en la etapa S2.

55 El método luego continúa a la etapa S4 en la Fig. 1 y luego además a la etapa S42 en la Fig. 5. La etapa S42 comprende tomar al menos una imagen de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. La al menos una imagen se procesa en la etapa S43 para la detección del subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados y las células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados, sin tener en cuenta los restantes compartimentos de células espacialmente definidos y separados y las células no diana y/o el material no celular en los restantes compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

60 En la invención, el método luego continúa a la etapa S6, donde la respuesta fenotípica de las células diana al agente de ensayo se determina basándose en el procesamiento en la etapa S43, es decir, basándose en la respuesta fenotípica de las células diana, es decir, material biológico en el subconjunto de compartimentos de

células espacialmente definidos y separados identificados en la etapa S40, pero no basándose en ninguna respuesta de las células no diana y/o material no celular, es decir, material en la parte restante de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados identificados en la etapa S41.

5 Por lo tanto, la respuesta fenotípica determinada en la etapa S6 se determina por lo tanto basándose únicamente en la respuesta del material biológico identificado o seleccionado como que son células diana y presente en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados identificados en la etapa S40 y por lo tanto no en la respuesta del material biológico y/o material no biológico presente en los restantes compartimentos de células espacialmente definidos y separados identificados en la etapa S41. Por lo tanto, este enfoque evita eficazmente que cualquier respuesta de células no diana y material no celular eclipse la respuesta fenotípica de las células diana al agente de ensayo.

15 En otro aspecto, el seguimiento realizado en la etapa S5 podría implicar por tanto el seguimiento de todos los compartimentos de células espacialmente definidos y separados, es decir, el subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden las células diana y los restantes compartimentos de células espacialmente definidos y separados. Sin embargo, la respuesta fenotípica determinada en la etapa S6 preferiblemente solo se determina basándose en el material biológico, es decir, las células diana, presentes en el subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados identificados en la etapa S3.

20 En lo anterior, las realizaciones se han descrito principalmente en relación con la identificación y separación de las denominadas células diana de otro material biológico y no biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. Sin embargo, también es posible, dentro de un mismo dispositivo de microfluidica, identificar diferentes poblaciones de células diana que presentan diferentes características de fenotipo objetivo o diferentes combinaciones de características de fenotipo objetivo.

30 Por ejemplo, la etapa S3 podría comprender identificar un primer subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden una primera población de células diana que presentan la(s) primera(s) característica(s) de fenotipo objetivo e identificar un segundo subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden una segunda población de células diana que presentan la(s) segunda(s) característica(s) de fenotipo objetivo según se determina basándose en el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S2.

35 En esta realización, la etapa S5 comprende el seguimiento de la primera población de células diana en el primer subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados y el seguimiento de la segunda población de células diana en el segundo subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

40 La etapa S6 comprende preferiblemente, en esta realización, determinar una respuesta fenotípica respectiva de la primera población de células diana y la segunda población de células diana al agente de ensayo basándose en el seguimiento de la primera población de células diana en el primer subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados y de la segunda población de células diana en el segundo subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S5.

Por supuesto, la realización descrita anteriormente también puede aplicarse a casos con tres o más poblaciones de células diana.

50 En una realización, las sondas fluorescentes que se unen específicamente a un marcador se añaden antes o en relación con el seguimiento en la etapa S2. En tal caso, la etapa S2 comprende el seguimiento del material biológico en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados midiendo la fluorescencia en los compartimentos espacialmente definidos y separados de las células. En esta realización, la característica de fenotipo objetivo podría ser entonces la presencia del marcador, dando así como resultado la presencia de sondas fluorescentes y una fluorescencia medida alta, o la ausencia del marcador, dando así como resultado la ausencia de sondas fluorescentes y una fluorescencia medida comparativamente baja.

60 Por lo tanto, la etapa S3 comprende preferiblemente identificar el subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden células diana que presentan al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en la fluorescencia medida en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

65 La sonda fluorescente se une específicamente a un marcador. Este marcador puede ser una molécula, cuya presencia se va a usar en la selección o identificación en la etapa S3. Por ejemplo, el marcador podría ser una proteína en las células o en la membrana celular, tal como un receptor. Alternativamente, el marcador podría ser una molécula de ácido nucleico, tal como una secuencia de ADN o gen particular o una secuencia de ARNm

particular.

La sonda fluorescente puede ser, por ejemplo, un colorante de unión al ADN intercalante que distingue claramente las células con cromosomas de los restos celulares. La sonda fluorescente puede ser un colorante de detección de células vivas/muertas, que solo entra en las células vivas.

La sonda fluorescente puede ser un anticuerpo fluorescente que se une específicamente a células seleccionadas, lo que permite la diferenciación de, por ejemplo, diferentes especies bacterianas con diferentes antígenos de superficie, células cancerosas de otras células basado en los antígenos de superficie, células fetales circulantes de las propias células de la mujer embarazada.

La sonda fluorescente puede ser un oligonucleótido fluorescente que se dirige a un ARN específico de especie, tal como el ARN ribosómico 16S.

La unión específica de una sonda fluorescente se puede determinar basándose en la afinidad y/o la avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación del marcador diana con la sonda fluorescente ( $K_d$ ), es una medida de la fuerza de unión entre el marcador diana y la sonda fluorescente. Cuanto menor sea el valor de  $K_d$ , mayor será la fuerza de unión. Alternativamente, la afinidad también se puede expresar como la constante de afinidad ( $K_a$ ), que es  $1/K_d$ . Como quedará claro para el experto en la técnica, la afinidad se puede determinar de una manera conocida de por sí, dependiendo del marcador diana específico de interés.

La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre una sonda fluorescente y el marcador diana. La avidéz está relacionada tanto con la afinidad entre el marcador diana y el sitio de unión en la sonda fluorescente como con el número de sitios de unión presentes en la sonda fluorescente.

En general, se considera que cualquier valor de  $K_d$  superior a  $10^{-4}$  M (o cualquier valor de  $K_a$  inferior a  $10^4$  M<sup>-1</sup>) indica una unión no específica.

La unión específica de una sonda fluorescente a un marcador diana puede determinarse de cualquier manera conocida de por sí, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competición en sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas de por sí en la técnica.

En lo anterior, la sonda se ha ilustrado mediante una sonda fluorescente. Sin embargo, las realizaciones no se limitan a las mismas. En realidad, cualquier sonda que pueda ser detectable y se pueda medir podría usarse según las realizaciones, tales como sondas fluorescentes, sondas teñidas, sondas quimioluminiscentes, sondas radiomarcadas, etc.

Por lo tanto, en una realización, el método comprende una etapa adicional como se ilustra en la Fig. 6. El método continúa desde la etapa S1 en la Fig. 1. Una etapa S50 a continuación comprende añadir una sonda marcada a los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. El método luego continúa a la etapa S2 en la Fig. 1, que comprende, en esta realización, el seguimiento de la sonda marcada en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados. En esta realización, la etapa S3 comprende preferiblemente identificar el subconjunto de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados que comprenden células diana que presentan al menos una característica de fenotipo objetivo determinado basándose en el seguimiento de la sonda marcada en los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S2.

También es posible utilizar sondas con diferentes marcadores o propiedades detectables, tal como con diferentes propiedades espectrales, en paralelo para distinguir varias poblaciones de células diana al mismo tiempo.

En un primer ejemplo de implementación, el agente de ensayo es un antibiótico. En este ejemplo de implementación, el método se usa para determinar una susceptibilidad de las células diana al antibiótico. Por lo tanto, la etapa S6 de la Fig. 1 comprende determinar una susceptibilidad de las células diana al antibiótico basándose en el seguimiento de las células diana en el subconjunto identificado de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S5.

En este ejemplo de implementación, el método se puede utilizar en un AST rápido que normalmente presenta resultados que indican si las células diana, es decir, las bacterias diana, son susceptibles o no al antibiótico en menos de 30 minutos. Esto debe compararse con el ensayo de referencia actual de los AST fenotípicos que requieren 1-2 días para obtener resultados fiables.

Una aplicación típica de tal ejemplo de implementación sería llevar a cabo un AST de bacterias presentes en una muestra de fluido corporal, tal como orina, sangre, saliva, heces, líquido cefalorraquídeo, leche, líquido

amniótico o linfa.

En un segundo ejemplo de implementación, el agente de ensayo es un agente citostático. En dicho ejemplo de implementación, la etapa S6 de la Fig. 1 comprende determinar una susceptibilidad de las células diana al agente citostático basándose en el seguimiento de las células diana en la parte identificada de los compartimentos de células espacialmente definidos y separados en la etapa S5.

Las células diana para el fenotipado en estos ejemplos de implementación son preferiblemente células cancerosas, se debe ensayar la susceptibilidad a un agente citostático.

La Fig. 7 es una ilustración esquemática de un dispositivo de microfluídica 1 que se puede utilizar en el método de las realizaciones. Este dispositivo de microfluídica 1 se describe con más detalle en [2, 3, 5]. Brevemente, el dispositivo de microfluídica 1 comprende un sustrato 10 que tiene canales de células 20 espacialmente definidos y separados, también denominados trampas de células, que tienen una dimensión para acomodar células. Un primer extremo respectivo 22 de los canales de células espacialmente definidos y separados 20 está en conexión fluida con un canal de entrada de flujo 30 que tiene un primer extremo 32 en conexión fluida con un primer puerto de fluido 31 y un segundo extremo 34 en conexión fluida con un segundo puerto de fluido 33. Un segundo extremo respectivo 24 de los canales de células 20 espacialmente definidos y separados está en conexión fluida con un canal de salida de flujo 40 en conexión fluida con un tercer puerto de fluido 41. Los canales de células espacialmente definidos y separados 20 comprenden una obstrucción de canal respectiva 25 diseñada para evitar que las células seleccionadas, como las de un tamaño, dimensión, figura o forma particular, pasen la respectiva obstrucción de canal 25 y entren en el canal de salida de flujo 40.

Si el dispositivo de microfluídica 1 como se define anteriormente y se ilustra en la Fig. 7 se usa en el método, entonces la etapa S1 de la Fig. 1 comprende preferiblemente, en una realización, cargar la muestra biológica en el primer puerto de fluido 31 permitiendo que el exceso de muestra biológica fluya a través del tercer puerto de fluido 41 y, opcionalmente, del segundo puerto de fluido 33 para capturar material biológico en los canales de células 20 espacialmente definidos y separados por las obstrucciones del canal 25.

Por lo tanto, la muestra biológica se introduce en el primer puerto de fluido 31 y se deja que fluya a través del canal de entrada de flujo 30 preferiblemente hacia y opcionalmente fuera del segundo puerto de fluido 33. Además, la muestra biológica, incluidas las células diana, fluirán hacia los canales de células espacialmente definidos y separados 20 y más hacia el canal de salida de flujo 40 y el tercer puerto de fluido 41.

Los canales de células espacialmente definidos y separados 20 están dimensionados, es decir, tienen tamaño, tal como ancho y alto, y forma, para permitir que las células seleccionadas entren en los canales de células espacialmente definidos y separados 20. Las células o el material no celular que tiene un tamaño y/o una forma que es demasiado grande o que no se adapta al tamaño y la forma del corte transversal de los canales de células espacialmente definidos y separados 20 no entrarán en los canales de células espacialmente definidos y separados 20, sino fluyen desde el canal de entrada de flujo 30 a través del segundo puerto de fluido 33.

La obstrucción del canal 25 de los canales de células espacialmente definidos y separados 20 está diseñada para tener una forma y dimensión, tal como ancho y/o altura, que evita que las células seleccionadas pasen la obstrucción del canal 25 y entren el canal de salida de flujo 40. En consecuencia, las células seleccionadas quedarán atrapadas y capturadas en los canales de células espacialmente definidos y separados 20.

En una realización, el sustrato 10 del dispositivo de microfluídica 1 es transparente para la formación de imágenes. Por lo tanto, se puede hacer el seguimiento óptico del material biológico en los canales de células espacialmente definidos y separados 20. Alternativamente, o además, una cubierta del sustrato 10, configurada para poner sobre el sustrato 10 o al menos una parte del mismo para encerrar los canales de células espacialmente definidos y separados 20, podría ser transparente para la obtención de imágenes si se lleva a cabo el seguimiento óptico en la etapa S2 y/o S5.

La Fig. 8 es una imagen de microscopía electrónica de barrido que muestra parte del molde para un dispositivo de microfluídica 1 mostrado con  $11 \times 10^3 \times$  aumentos. La imagen indica los canales de las células 20 y las obstrucciones de los canales 25 cerca de los segundos extremos 24 de los canales de las células 20.

La obstrucción del canal 25 puede tener la forma de una restricción u obstrucción que restringe la dimensión, tal como el ancho y/o la altura, de los canales de células 20 espacialmente definidos y separados. Esta restricción u obstrucción evitará así que las células seleccionadas que tengan un tamaño mayor que el ancho y/o la altura restringidos pasen la obstrucción del canal 25. Sin embargo, las células más pequeñas y el material biológico y no biológico que tenga un tamaño menor que el ancho y/o la altura restringidos pueden pasar la obstrucción del canal 25 y, por lo tanto, serán arrastrados hacia el canal de salida de flujo 40 y el tercer puerto de fluido 41.

Las Figs. 7 y 8 ilustran los canales de referencia 50 que son canales de células que carecen de cualquier

obstrucción del canal. Estos canales de referencia 50 podrían usarse como referencia cuando se toman imágenes del dispositivo de microfluídica 1 para tener un nivel de imagen de referencia solo con medio de cultivo, tal como la muestra biológica, sin células que puedan sustraerse de los datos de imagen de los canales de células 20.

5

La Fig. 8 también ilustra un código de barras de puntos 60 impreso en el sustrato 10. El código de barras de puntos 60 se puede utilizar para identificar los canales de células espacialmente definidos y separados 20 en el dispositivo de microfluídica 1. Se podrían imprimir identificadores de canales individuales alternativos en el sustrato 10 como se muestra en las Figs. 12-15 de [2].

10

En una realización relacionada con el uso de un dispositivo de microfluídica 1 como se describe anteriormente, la etapa S4 de la Fig. 1 comprende cargar el agente de ensayo en el segundo puerto de fluido 33 permitiendo que el agente de ensayo fluya a través del canal de entrada de flujo 30, los canales de células espacialmente definidos y separados 20, el canal de salida de flujo 40 y salga del tercer puerto de fluido 41 y opcionalmente salga del primer puerto de fluido 31.

15

La Fig. 9 es una imagen de contraste de fase de una parte de un dispositivo de microfluídica cargado con una muestra biológica. En esta imagen, las células presentes en los canales de células espacialmente definidos y separados 20 corresponden a la parte oscura de los canales de células espacialmente definidos y separados 20 que miran hacia el canal de salida de flujo 40, mientras que las partes claras restantes de los canales de células espacialmente definidos y separados 20 comprenden únicamente el medio de cultivo de la muestra biológica y ninguna célula.

20

La Fig. 10 son imágenes de contraste de fase de una parte de un dispositivo de microfluídica cargado con una muestra biológica tomada en tres puntos de tiempo diferentes. En estas imágenes, las células y el material no celular se indican como objetos oscuros longitudinales en los canales de células espacialmente definidos y separados. El número de referencia 20A indica un canal de células espacialmente definido y separado 20A que comprende células que están creciendo. Por lo tanto, el número de células presentes en ese canal de células espacialmente definido y separado 20A aumenta cuando se pasa del tiempo 1 al tiempo 2 y luego al tiempo 3. El número de referencia 20B indica un canal de células espacialmente definido y separado 20B que comprende una célula que no es capaz de crecer en el medio de cultivo particular o material no celular. Por lo tanto, el número de células o material no celular en este canal de células espacialmente definido y separado 20B permanece igual en los tres puntos de tiempo.

25

30

35

Como se ilustra esquemáticamente por las tres imágenes en la Fig. 10, solo uno de los canales de células espacialmente definidos y separados 20A que se muestran comprende células que son viables y crecen en el medio de cultivo particular. Todos los restantes canales de células espacialmente definidos y separados 20B comprenden células no viables y que no crecen o material no celular.

40

La Fig. 10 indica que la gran mayoría de los canales de células espacialmente definidos y separados pueden contener material biológico distinto de las células diana o material no biológico cuando se carga una muestra biológica heterogénea en un dispositivo de microfluídica. En consecuencia, existe la necesidad de una selección e identificación de qué canales de células espacialmente definidos y separados hacer el seguimiento para el fenotipado de las células diana. De lo contrario, las células distintas de las células diana y el material no biológico se contaminarían y, por lo tanto, influirían en la determinación del fenotipo de las células diana.

45

Las Figs. 11A y 11B muestran la longitud (Fig. 11A) y la velocidad de crecimiento (Fig. 11B) en función del tiempo representado para canales de células individuales de un dispositivo de microfluídica. Estas cifras indican que existe una gran diferencia en las características fenotípicas de las células en una muestra biológica heterogénea y que un fenotipado correcto y fiable se beneficiaría de una identificación y selección inicial de canales de células espacialmente definidos y separados según las realizaciones.

50

Las realizaciones no se limitan al dispositivo de microfluídica particular descrito anteriormente e ilustrado en las Figs. 7 y 8. También podría usarse otro dispositivo de microfluídica que comprende compartimentos de células espacialmente definidos y separados de acuerdo con las realizaciones. Un ejemplo de otro dispositivo de microfluídica de este tipo se muestra en las Figs. 12 y 13 y más adelante en [4].

55

El dispositivo de microfluídica 100 comprende un sustrato 110, preferiblemente transparente para la formación de imágenes y que tiene una región de trampa de células 150 con trampas de células 120 espacialmente definidas y separadas que tienen una dimensión, tal como tamaño y forma, para acomodar células. La región de trampa de células 150 está en conexión fluida con un primer canal de flujo 130 que tiene un primer puerto de fluido 131 y con un segundo canal de flujo 140 que tiene un segundo puerto de fluido 141.

60

Se carga una muestra biológica en el segundo puerto de fluido 141 para permitir que la muestra biológica fluya a través del segundo canal de flujo 140, hacia la región de trampas de células 150 y más hacia el primer canal de flujo 130 y fuera del primer puerto de fluido 131. Las células y el material no celular presente en la muestra

65

5 biológica serán capturados en las trampas de captura 121 que forman la "parte posterior" de las denominadas copas de captura 122. Cuando el flujo se invierte, es decir, que pasa del primer puerto de fluido 131 al primer canal de fluido 130, la región de trampas de células 150, y más hacia el segundo canal de flujo 140 y sale del segundo puerto de fluido 141, las células y el material no celular capturado en las trampas de captura 121 se transferirá en la dirección del flujo a las trampas de células más grandes 120 de una copa de captura 122 coalineada y dispuesta aguas abajo, como se ilustra esquemáticamente con la flecha rayada en la Fig. 13.

10 En una realización, las tapas de captura 122 comprenden un canal delgado entre una trampa de células 120 en una tapa de captura 122 y una trampa de captura 121 en la tapa de captura 122. Este canal delgado luego facilita un flujo de medio de cultivo a través de la trampa de células 120 y más adentro en la trampa de captura alineada 122. Sin embargo, este canal delgado opcional de las copas de captura 122 es demasiado pequeño para permitir que cualquier célula pase a través del canal delgado.

15 Los dispositivos de microfluídica descritos e ilustrados anteriormente deben verse simplemente como ejemplos ilustrativos de dispositivos de microfluídica que pueden usarse en el método para el fenotipado de células. Por consiguiente, en las realizaciones se pueden utilizar otros dispositivos de microfluídica que tengan compartimentos de células espacialmente definidos y separados.

20 Las realizaciones descritas anteriormente deben entenderse como algunos ejemplos ilustrativos de la presente invención. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar diversas modificaciones, combinaciones y cambios en las realizaciones sin apartarse del alcance de la presente invención. En particular, diferentes soluciones parciales en las diferentes realizaciones se pueden combinar en otras configuraciones, cuando sea técnicamente posible. Sin embargo, el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

25 Referencias

[1] Kim et al., Miniaturized Antimicrobial Susceptibility Test by Combining Concentration Gradient Generation and Rapid Cell Culturing, *Antibiotics*, 2015, 4(4): 455-466

30 [2] WO 2016/007068

[3] Baltekin et al., Fast Antibiotic Susceptibility Testing (FASTest) based on single cell growth rate measurements, *bioRxiv preprint*, 2016 (doi.org/10.1101/071407)

35 [4] Skelley et al., Microfluidic Control of cell Pairing and Fusion, *Nat Methods*, 2009, 6(2): 147-152

[5] Baltekin et al., Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging, *PNAS*, 2017, 114(34): 9170-9175

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para el fenotipado de células, comprendiendo dicho método:
- 10 a) cargar (S1) una muestra biológica que comprende material biológico que incluye células diana de un tipo de células y células no diana de otro tipo de células en un dispositivo de microfluídica (1, 100) que comprende compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) para capturar material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120);
- 15 b) seguimiento (S2) del material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) antes de exponer el material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) a un agente de ensayo;
- 20 c) identificar (S40) un subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) que comprenden células diana que presentan al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en dicho seguimiento del material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) en b); e
- 25 d) exponer (S4) el material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) a dicho agente de ensayo;
- 30 e) seguimiento (S5) de las células diana en dicho subconjunto identificado (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120):
- 35 tomando (S42) al menos una imagen de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120); y
- 40 procesando (S43) dicha al menos una imagen para la detección de dicho subconjunto identificado (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) y células diana en dicho subconjunto identificado (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) sin tener en cuenta dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados restantes (20B) y células no diana y/o material no celular en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados restantes (20B); y
- 45 f) determinar (S6) una respuesta fenotípica de dichas células diana a dicho agente de ensayo basándose en dicho seguimiento de las células diana en dicho subconjunto identificado (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) en e).
- 50 2. El método según la reivindicación 1, que comprende además:
- 55 exponer (S10) el material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) a un medio de cultivo, en donde
- el seguimiento (S2) del material biológico comprende seguimiento (S2) del material biológico expuesto a dicho medio de cultivo en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120).
3. El método según la reivindicación 2, en donde exponer el material biológico (S4) a dicho agente de ensayo comprende exponer el material biológico (S4) en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) a dicho medio de cultivo que comprende dicho agente de ensayo o a otro medio de cultivo que comprende dicho agente de ensayo.
- 60 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde identificar (S3) dicho subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) comprende:
- 65 identificar (S20) células diana que presentan dicha al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en dicho seguimiento de material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) en b); y
- seleccionar (S21) dicho subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) como un subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos

y separados (20, 120) que comprende dichas células diana identificadas.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el seguimiento (S2) del material biológico comprende el seguimiento (S2), en múltiples puntos de tiempo, del material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120).

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el seguimiento (S5) de las células diana comprende el seguimiento (S5), en múltiples puntos de tiempo, de las células diana en dicho subconjunto identificado (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120).

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el seguimiento (S2) del material biológico comprende tomar (S2) al menos una imagen de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120).

8. El método según la reivindicación 7, en donde la identificación (S3) de dicho subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) comprende:

procesar (S30) dicha al menos una imagen para la detección de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) y el material biológico en dichos compartimentos espacialmente definidos y separados de células (20, 120);

determinar (S31) al menos una característica de fenotipo respectiva del material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) basándose en dicho procesamiento;

identificar (S32) las células diana como material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) y que tienen al menos una característica de fenotipo determinada respectiva correspondiente a dicha al menos una característica de fenotipo objetivo; y

seleccionar (S33) dicho subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) como un subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) que comprende dichas células diana identificadas.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha característica de fenotipo objetivo se selecciona de un grupo que consiste en velocidad de crecimiento, forma, tamaño, forma de la curva de velocidad de crecimiento que define la velocidad de crecimiento a lo largo del tiempo, forma de la curva de longitud que define la longitud de la célula a lo largo del tiempo, forma de la curva de superficie que define la superficie celular a lo largo del tiempo, color, densidad óptica, conductividad eléctrica, producción de calor, composición del antígeno de superficie, espectros de absorción y una mezcla de los mismos.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además:

añadir (S50) una sonda marcada a dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120), en donde

el seguimiento (S2) del material biológico comprende el seguimiento de dicha sonda marcada en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120); e

identificar (S3) dicho subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) comprende identificar (S3) dicho subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) como que comprende células diana que presentan al menos una característica de fenotipo objetivo determinada basándose en dicho seguimiento de dicha sonda marcada en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120).

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde

identificar (S3) dicho subconjunto (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) comprende identificar un primer subconjunto de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) como que comprende una primera población de células diana que presentan al menos una primera característica de fenotipo objetivo y un segundo subconjunto de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) como que comprende una segunda población de células diana que presentan al menos una segunda característica de fenotipo objetivo determinada basándose en dicho seguimiento de material biológico en dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120);

el seguimiento (S5) de las células diana comprende el seguimiento (S5) de dicha primera población de células diana en dicho primer subconjunto identificado de dichos compartimentos de células espacialmente definidos

y separados (20, 120) y de dicha segunda población de células diana en dicho segundo subconjunto identificado de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120); y

5 determinar (S6) dicha respuesta fenotípica comprende determinar (S6) una respuesta fenotípica respectiva de dicha primera población de células diana y dicha segunda población de células diana a dicho agente de ensayo basándose en dicho seguimiento de dicha primera población de células diana en dicho primer subconjunto identificado de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120) y de dicha segunda población de células diana en dicho segundo subconjunto identificado de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120).

10

12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde

dicho agente de ensayo es un antibiótico o un agente citostático; y

15 determinar (S6) dicha respuesta fenotípica comprende determinar (S6) una susceptibilidad de dichas células diana a dicho antibiótico o dicho agente citostático basándose en dicho seguimiento de las células diana en dicho subconjunto identificado (20A) de dichos compartimentos de células espacialmente definidos y separados (20, 120).

20 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde

dicho dispositivo de microfluídica (1) comprende:

25 un sustrato (10) que tiene canales de células espacialmente definidos y separados (20) que tienen una dimensión para acomodar células;

30 un primer extremo respectivo (22) de dichos canales de células espacialmente definidos y separados (20) está en conexión fluida con un canal de entrada de flujo (30) que tiene un primer extremo (32) en conexión fluida con un primer puerto de fluido (31) y un segundo extremo (34) en conexión fluida con un segundo puerto de fluido (33);

35 un segundo extremo respectivo (24) de dichos canales de células (20) espacialmente definidos y separados está en conexión fluida con un canal de salida de flujo (40) en conexión fluida con un tercer puerto de fluido (41); y

dichos canales de células espacialmente definidos y separados (20) comprenden una obstrucción de canal respectiva (25) diseñada para evitar que las células seleccionadas pasen dicha obstrucción de canal respectiva (25) y a dicho canal de salida de flujo (40); y

40 cargar (S1) dicha muestra biológica comprende cargar (S1) dicha muestra biológica en dicho primer puerto de fluido (31) permitiendo que un exceso de muestra biológica fluya a través de dicho tercer puerto de fluido (41) y, opcionalmente, dicho segundo puerto de fluido (33), para capturar material biológico en dichos canales de células espacialmente definidos y separados (20) por dichas obstrucciones de canal (25).

45 14. El método según la reivindicación 13, en donde exponer (S4) el material biológico a dicho agente de ensayo comprende cargar (S4) dicho agente de ensayo en dicho segundo puerto de fluido (33) permitiendo que dicho agente de ensayo fluya a través de dicho canal de entrada de flujo (30), dichos canales de células espacialmente definidos y separados (20), dicho canal de salida de flujo (40) y fuera de dicho tercer puerto de fluido (41) y opcionalmente dicho primer puerto de fluido (31).

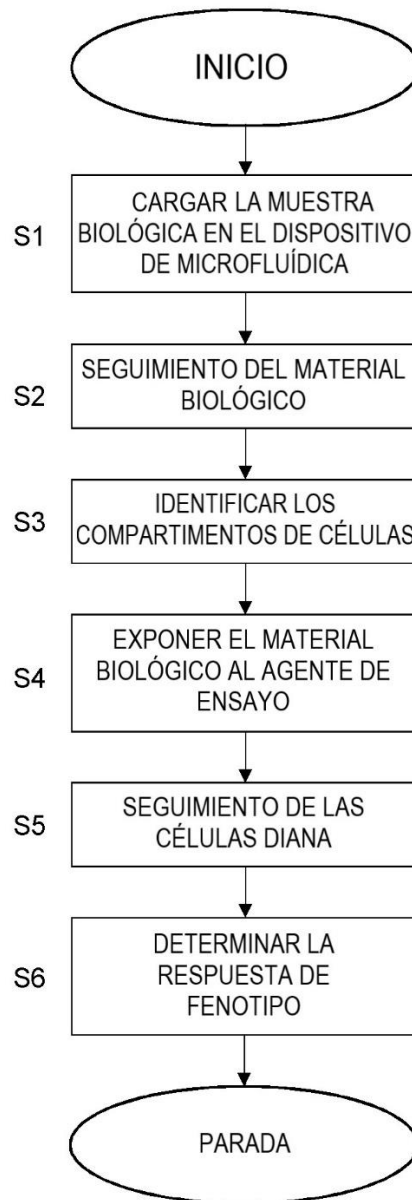


Fig. 1

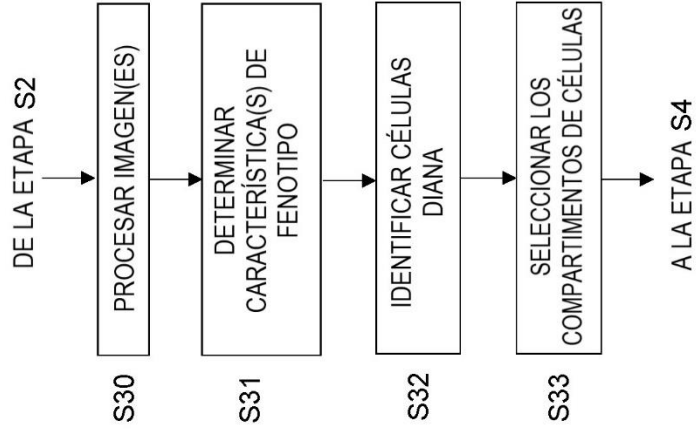


Fig. 4

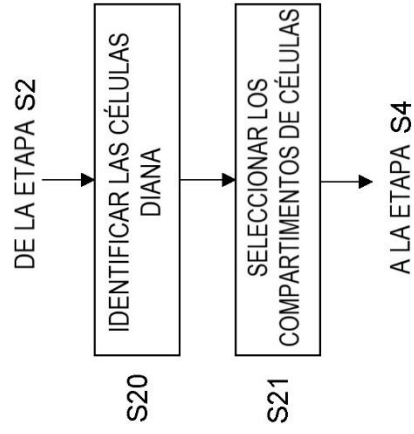


Fig. 3

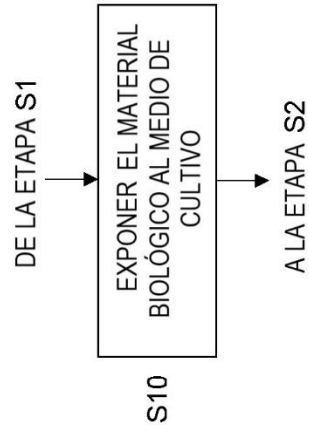


Fig. 2

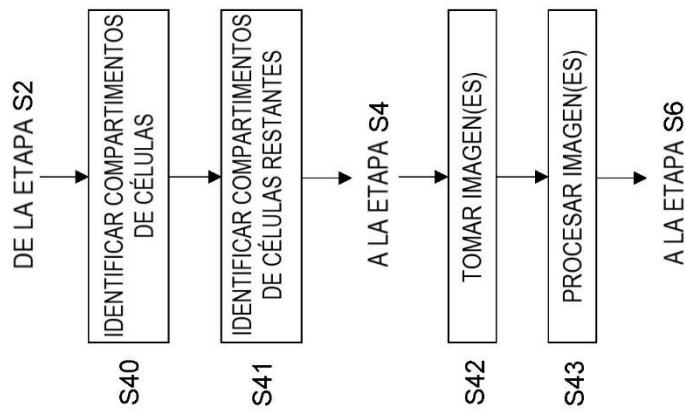


Fig. 5

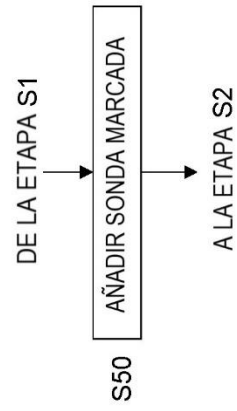


Fig. 6

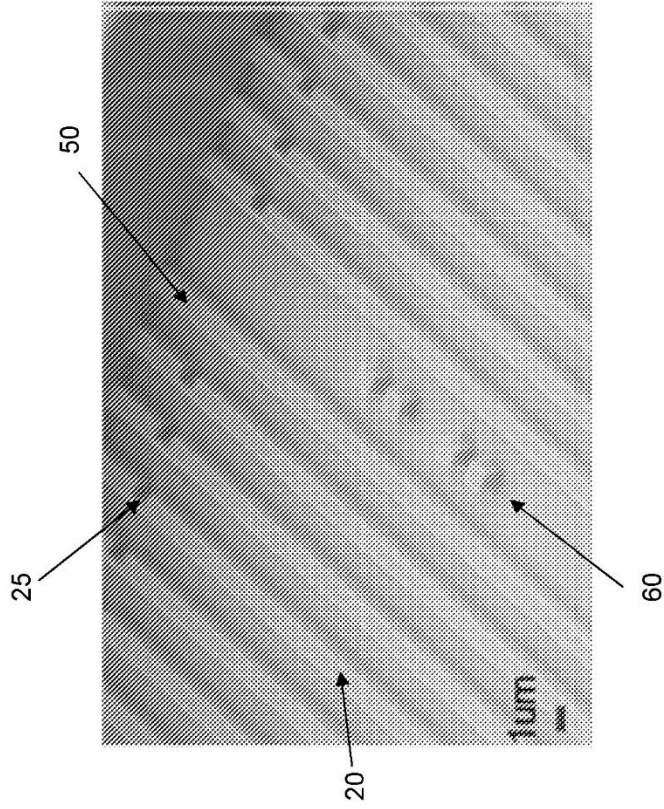


Fig. 8

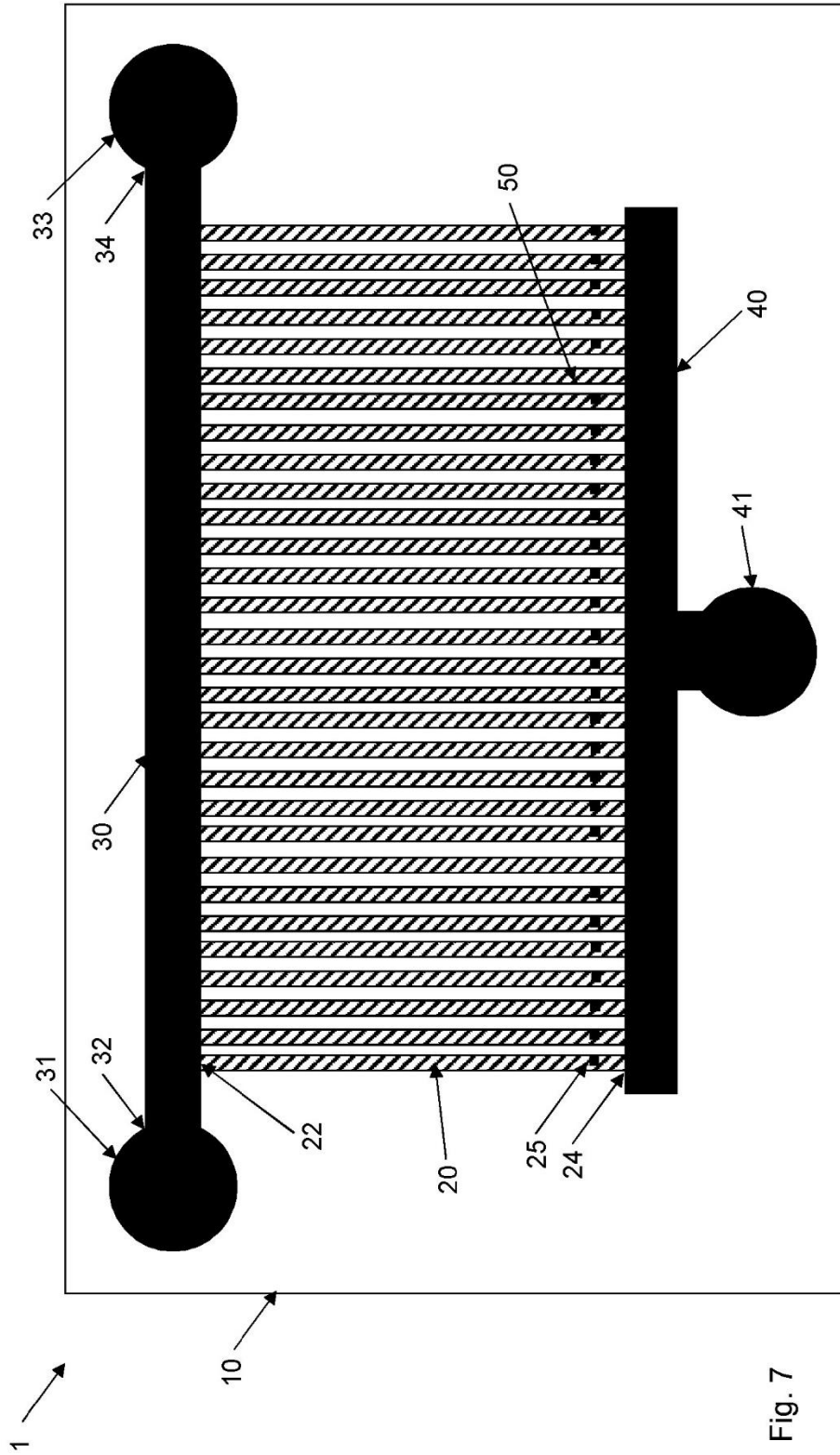


Fig. 7

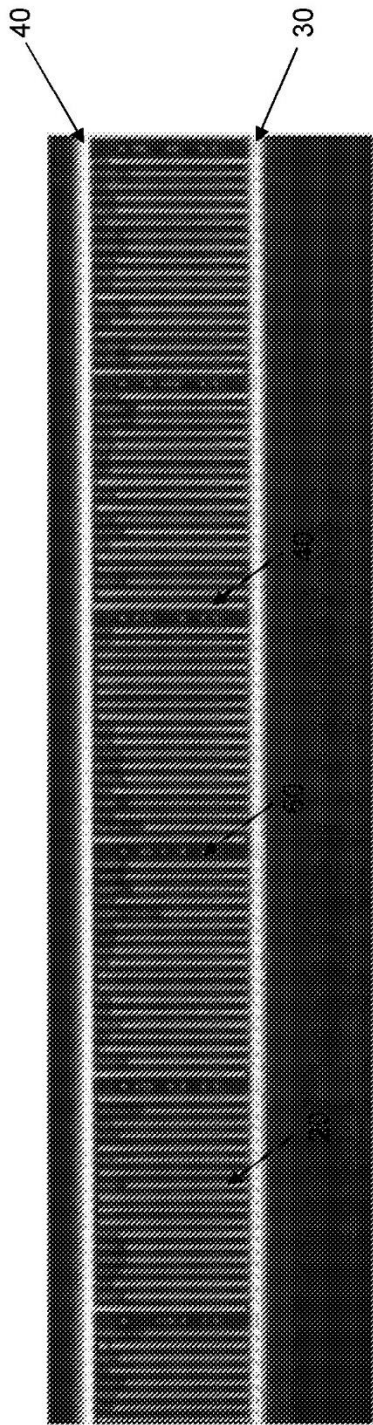


Fig. 9

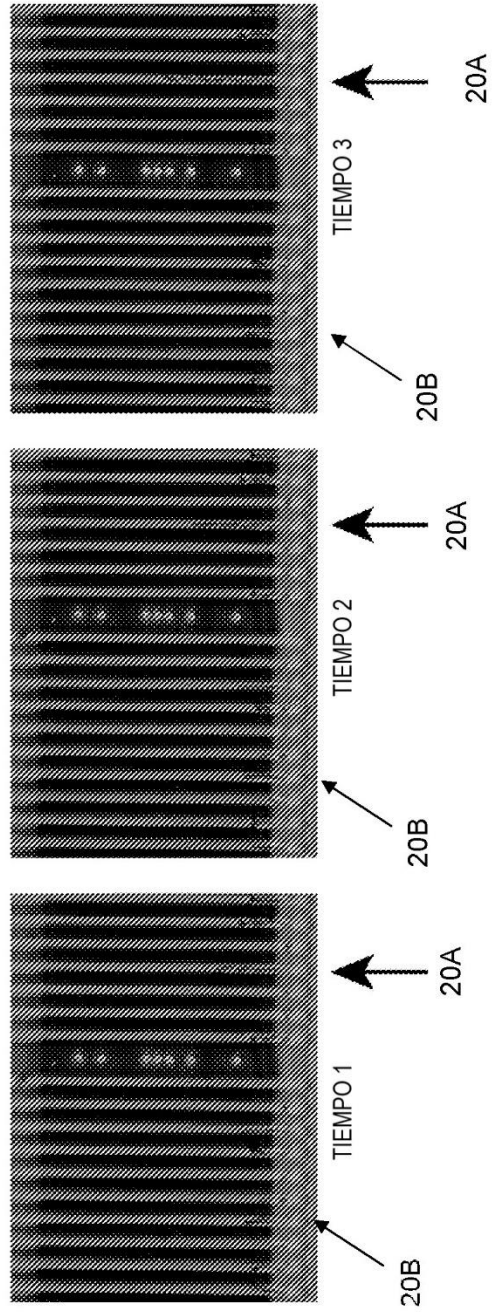


Fig. 10

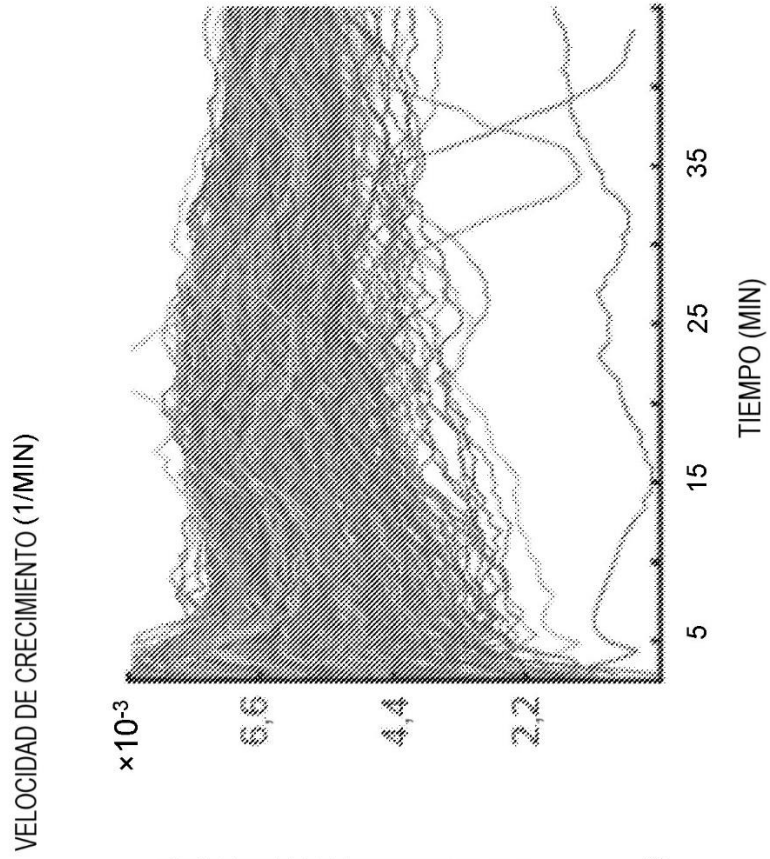


Fig. 11B

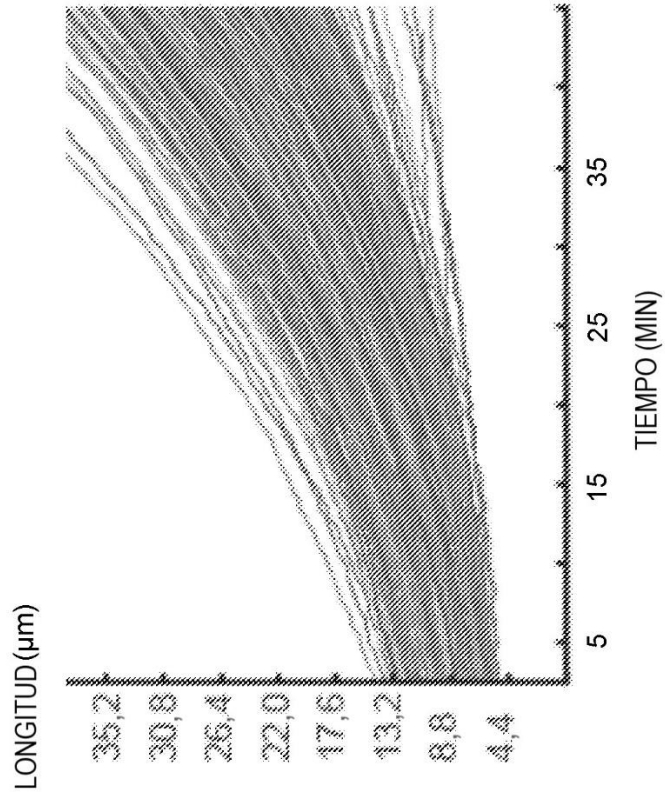


Fig. 11A

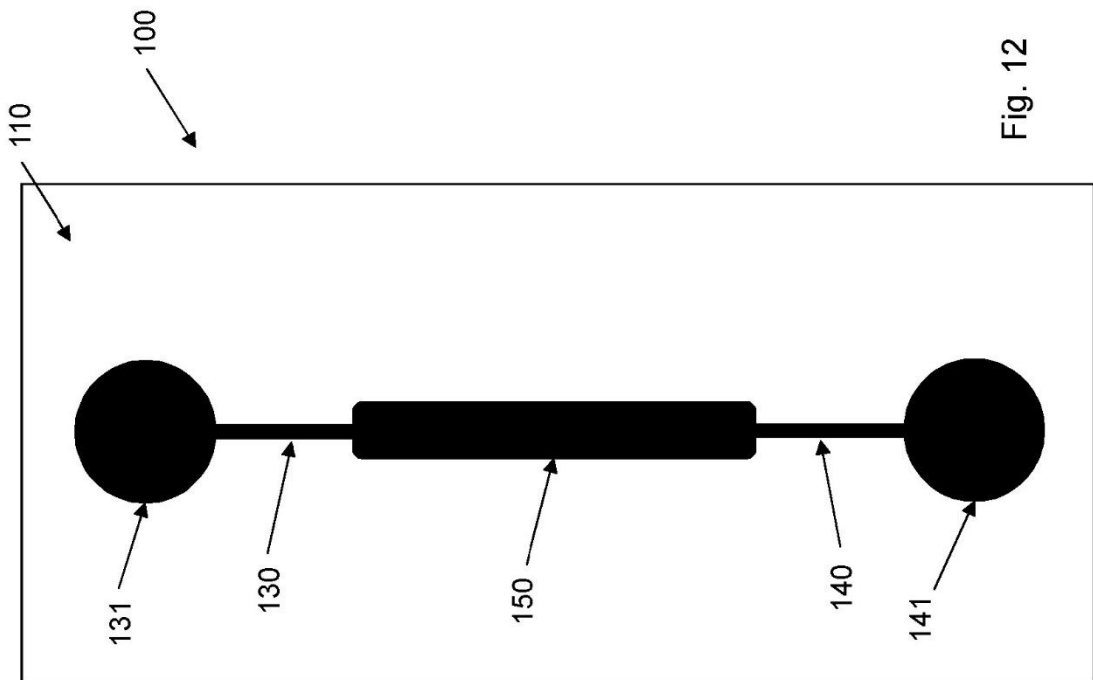


Fig. 12

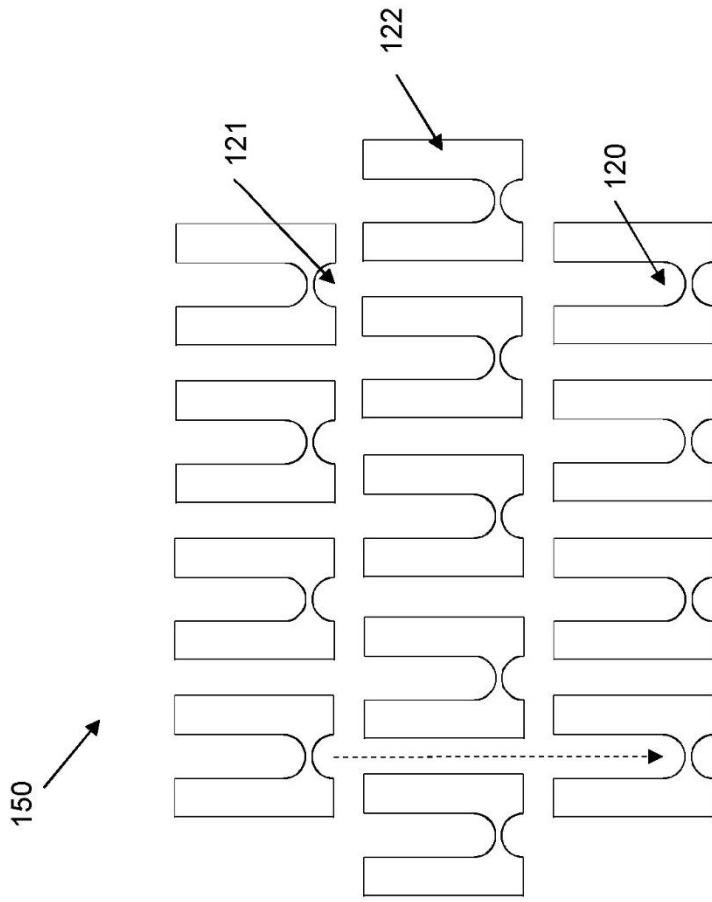


Fig. 13