



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 163**

51 Int. Cl.:

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

G01N 21/03 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02722509 .3**

96 Fecha de presentación : **09.05.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1390760**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Sistema de ensayo.**

30 Prioridad: **09.05.2001 GB 0111360**
19.12.2001 GB 0130359

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **AXIS-SHIELD ASA**
Ulvenveien 87
0510 Oslo, NO

72 Inventor/es: **Holtlund, Jostein;**
Borch, Stig Morten;
Seim, Thorstein;
Janson, Tore;
Ton, Hege;
Karlson, Jan Roger y
Lauvstad, Inger Lise

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 309 163 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

Sistema de ensayo.

5 Esta invención se refiere a mejoras en y relativas a sistemas de ensayo, especialmente sistemas de ensayo para diagnóstico, en particular sistemas utilizables en el punto de atención, por ejemplo en la clínica o en el lecho del paciente.

10 Muchos ensayos de diagnóstico están actualmente disponibles, por ejemplo ensayos de embarazo, azúcar en sangre, homocisteína, transferrina carbohidrato deficiente, coagulación sanguínea, colesterol en sangre, etc. Algunos de tales ensayos pueden ser realizados por el paciente, y algunos por el médico del paciente, pero muchos, especialmente los que proporcionan un resultado cuantitativo, deben ser realizados actualmente en un laboratorio alejado del paciente y del médico y así dan lugar a retardos significativos entre la toma de muestras y el análisis y generalmente requieren que el paciente realice otra visita al médico para conocer los resultados del análisis. Esto no solamente es inconveniente para el paciente, lo que también incrementa los costos para el paciente o la organización que paga la atención sanitaria del paciente.

US-A-5138868 (Long Ernest W), 18 de agosto de 1992, describe

20 un aparato de ensayo incluyendo un cartucho de ensayo extraíble incluyendo una pluralidad de cavidades. El aparato incluye además una pipeta que se puede colocar en al menos dos de dichas cavidades, teniendo dicha pipeta un extremo próximo y un extremo distal;

un soporte está dispuesto para recibir dicho cartucho;

25 medios de accionamiento pueden operar para colocar dicha pipeta en cavidades seleccionadas de dicho cartucho;

se puede acoplar un aplicador de gas a presión a dicha pipeta para hacer por ello que fluya líquido; y

30 un detector de radiación puede operar para detectar radiación de una cavidad de dicho cartucho.

Se necesitan así actualmente sistemas de ensayo, especialmente los que proporcionan resultados cuantitativos, operables por el médico o el personal médico en el punto de atención del paciente.

35 Los sistemas de ensayo cuantitativos a menudo requieren dispositivos de medición de volumen altamente exactos, varios reactivos, y detectores de lectura del resultado específicos del ensayo, y es inviable proporcionar aparatos de ensayo dedicados para un amplio rango de diferentes sistemas de ensayo en el punto de cuidado, tanto por razones de espacio como de gasto.

40 Por lo tanto, hemos desarrollado un aparato de ensayo que, en realizaciones preferidas, es capaz de usarse en el punto de cuidado, es capaz de realizar un rango de diferentes ensayos, es capaz de producir resultados cuantitativos del ensayo, y es relativamente barato.

45 Considerada desde un aspecto, la invención proporciona un aparato de ensayo según la reivindicación 1. Opcionalmente, pero preferiblemente, este aparato incluye además una fuente de radiación electromagnética. Preferiblemente, el aparato es un aparato de ensayo de diagnóstico.

50 Considerada desde otro aspecto, la invención proporciona un cartucho de ensayo incluyendo al menos dos cavidades y una pipeta que se puede colocar en al menos dos de dichas cavidades, teniendo dicha pipeta un extremo próximo y un extremo distal, cerrándose dicho extremo distal por una membrana permeable a los líquidos.

Una pipeta es un tubo con un agujero en un extremo (el extremo distal) al que puede fluir un líquido a la aplicación de una presión reducida al otro extremo (el extremo próximo). En el aparato al que se hace referencia en los párrafos anteriores, el extremo distal de la pipeta tiene en la punta (está cerrado por) una membrana permeable a los líquidos. El extremo próximo de esta pipeta puede estar abierto o cerrado, pero si está cerrado, entonces debe estarlo claramente por algunos medios que permitan la aplicación de presión necesaria para que la pipeta funcione como una pipeta. En una realización descrita más adelante, el extremo próximo de la pipeta con punta de membrana está sellado con una membrana autosellable perforable (por ejemplo una junta estanca de caucho) y se puede aplicar presión a través de una aguja hueca insertada a través de la membrana. Alternativamente, el extremo próximo puede estar cerrado por una cubierta o tope extraíble que se quita para permitir la aplicación de presión, o por una junta estanca rompible que se rompe para permitir la aplicación de presión.

Considerada desde otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo de ensayo según la reivindicación 29.

65 El cartucho de ensayo preferiblemente se le ofrece al usuario prellenado con los reactivos necesarios para el ensayo o ensayos concretos a realizar con dicho cartucho. Donde se precisen dos o más reactivos y estos no se deban mezclar antes de realizar el ensayo, se pueden introducir en diferentes cavidades en el cartucho. Generalmente tales reactivos se introducirán en las cavidades en cantidades medidas. Tales reactivos pueden ser, por ejemplo, líquidos, polvos, perlas,

ES 2 309 163 T3

recubrimientos en las paredes de la cavidad, recubrimientos en perlas, o materiales impregnados o inmovilizados en la membrana de la pipeta. Donde los reactivos son líquidos o donde son susceptibles de degradación a la exposición al aire o a la humedad, el cartucho se puede sellar para evitar pérdida de líquido o el acceso de aire o humedad al reactivo susceptible. Tal sellado se logra convenientemente formando el cartucho con una base conteniendo cavidades y una cubierta para cubrir las cavidades, y, si es necesario, colocando una junta estanca impermeable a los fluidos, por ejemplo una junta tórica, entre las aberturas de las cavidades en la base y la cubierta para cubrir las cavidades, y, si se desea, colocando una junta estanca extraíble, por ejemplo, una tira adhesiva de sellado, alrededor de la unión externa entre la cubierta y la base. En otra realización más preferida, una o más cavidades se pueden sellar con lámina antes del uso: en esta realización, el tapón de cubierta de cavidad está equipado preferiblemente con cortadores de lámina sellante para cortar la junta estanca de la lámina que cubre la cavidad para poder introducir la pipeta en estas cavidades. Alternativamente, la cubierta puede estar provista de material elástico en posiciones correspondientes a las partes superiores de las cavidades (o justo las cavidades conteniendo líquido) de tal manera que cuando la cubierta y la base se junten, se forma una junta estanca a los líquidos en las partes superiores de las cavidades. Tal material puede ser, por ejemplo, una capa recubierta sobre la cubierta o discos o juntas estancas unidas (por ejemplo, soldadas o adheridas) a la cubierta. En una realización, la superficie inferior de la cubierta está provista de salientes elásticos capaces de funcionar como tapones de las cavidades. De esta forma, los tapones sirven para mantener la cubierta y la base conjuntamente antes de usar el cartucho en un ensayo y, después de la realización del ensayo, la base y la cubierta se pueden sellar para desecho simplemente juntándolos, haciendo que los tapones sellen de nuevo las cavidades. Esto es especialmente ventajoso cuando las cavidades, después de la realización del ensayo, contienen materiales tóxicos o potencialmente infecciosos. Tales cubiertas se pueden quitar, si se desea, antes del uso; sin embargo, en una realización preferida, la cubierta servirá para mantener la pipeta y posiblemente también para proporcionar medios de unión para el aplicador de presión. En tal realización los medios de accionamiento pueden servir para mover la base con relación a la cubierta con el fin de colocar la pipeta en las cavidades deseadas en las diferentes etapas del ensayo.

En general, y en particular donde la cubierta del cartucho está provista de tapones elásticos para las cavidades en la base del cartucho, el aparato y dispositivo de la invención incluyen preferiblemente medios para separar la cubierta de la base de modo que el cartucho se pueda introducir en el dispositivo todavía sellado. En una realización, tales medios de separación incluyen una cuña que se pasa por el cartucho cargado y engancha con salientes, por ejemplo pestañas, en la cubierta y la base separándolos. Deseablemente estos medios de separación se ponen automáticamente en funcionamiento después de la carga del cartucho, por ejemplo en respuesta al cierre de la tapa en la cámara conteniendo el cartucho cargado o al transportar el cartucho a la cámara, por ejemplo, usando un transportador que puede quitar igualmente el cartucho de la cámara después de la realización del ensayo.

Para ensayos diferentes, por ejemplo de analitos diferentes, se puede prever diferentes cartuchos de ensayo; sin embargo, los cartuchos pueden estar diseñados para la realización de dos o más ensayos diferentes. En este último caso, frecuentemente será deseable que el cartucho contenga dos o más pipetas cerradas con membrana, es decir de modo que una pipeta diferente pueda ser usada para cada uno de los ensayos.

Las cavidades en el cartucho se pueden disponer en cualquier configuración deseada, por ejemplo como una serie bidimensional (por ejemplo como en las placas multicavidad convencionales), como una serie lineal, o como una serie circular. Se prefiere en particular el uso de series circulares y especialmente lineales puesto que se simplifica el mecanismo requerido para mover el cartucho entre posiciones preestablecidas, es decir los medios de accionamiento pueden operar entonces para mover el cartucho a lo largo de un recorrido lineal o para girar el cartucho.

El uso de una serie lineal de cavidades se prefiere especialmente, en particular una serie incluyendo, en secuencia: una cavidad de manejo de material (opcionalmente, antes del uso, conteniendo una pipeta con punta capilar montada extraíblemente en la cubierta del cartucho o adaptada para recibir durante el uso una pipeta con punta capilar montable en la cubierta del cartucho); una cavidad que, antes del uso, guarda la pipeta con punta de membrana u otra pipeta de punta capilar montada en la cubierta del cartucho; y una o una serie de dos o más (por ejemplo, hasta seis) cavidades para realización del ensayo y lectura del resultado del ensayo; estas cavidades pueden contener reactivos y, antes del uso, tales cavidades conteniendo reactivo pueden estar selladas con lámina y una de estas cavidades puede terminar abierta o tener lados abiertos para facilitar la lectura del resultado. En tal disposición, la cubierta y la base se pueden separar deseablemente antes de iniciar la realización del ensayo y volver a unir solamente cuando haya terminado la realización del ensayo. Así, la lectura del resultado en esta disposición tiene lugar mientras la cubierta y la base están desenganchadas uno de otro. En esta disposición, la cubierta y la base se retienen preferiblemente conjuntamente, por ejemplo por un retén de bloqueo por salto. La cavidad de manejo de material puede contener, por ejemplo, reactivo seco para mezcla durante la realización del ensayo, un filtro para separación de la muestra (por ejemplo, para quitar eritrocitos de una muestra de sangre), u otra pipeta capaz de engancharse por acoplamiento con una pipeta montada con cubierta (por ejemplo, una pipeta con punta capilar).

Aunque el cartucho debe contener al menos dos cavidades, una o más posiciones en la serie de cavidades de un cartucho multicavidades pueden ser de extremos abiertos o lados abiertos de tal manera que se facilite la detección de radiación de la pipeta cuando esté situada en tales posiciones. Si se ha de detectar la radiación de una pipeta en una cavidad, entonces al menos una porción de la pared de cavidad debe ser transparente al tipo de radiación a detectar.

Las cavidades en el cartucho pueden permanecer estacionarias durante el ensayo; sin embargo, dado que puede ser deseable utilizar el detector para supervisar el progreso del ensayo, generalmente es preferible que los medios de accionamiento puedan operar para mover el cartucho entre dos o más posiciones preestablecidas de modo que el de-

ES 2 309 163 T3

lector pueda detectar la radiación de diferentes cavidades del cartucho. Alternativamente, pero menos preferiblemente, el detector propiamente dicho se puede mover entre posiciones preestablecidas o se puede disponer espejos móviles con el fin de poder variar el recorrido de luz del cartucho al detector con el fin de lograr el mismo efecto.

5 Así, en una realización preferida, los medios de accionamiento operarán durante el ensayo para elevar la cubierta del cartucho y la pipeta alejándolo de la base conteniendo cavidades (o más preferiblemente dejar caer la base lejos de la cubierta), mover la base con relación al tapón (moviendo preferiblemente la base, por ejemplo linealmente o por rotación) para poner la pipeta en correspondencia con la cavidad deseada, y mover la cubierta y la base conjuntamente para colocar la pipeta en la cavidad deseada, y así sucesivamente hasta que el ensayo haya terminado.

10 En algunos ensayos puede ser deseable bascular las cavidades durante la transferencia de líquido o agitar el líquido en una cavidad y consiguientemente es deseable que los medios de accionamiento también puedan operar para bascular o agitar (por ejemplo bascular o sacudir) al menos la porción del cartucho que contiene cavidades.

15 Los medios de accionamiento pueden ser operables manualmente, por ejemplo un dispositivo de accionamiento mecánico o un dispositivo de accionamiento movido por motor activado en cada etapa por el operador; sin embargo, preferiblemente serán un dispositivo de accionamiento por motor activado para realizar las acciones necesarias por un ordenador externo o más preferiblemente interno que opera el aparato de ensayo.

20 Las cavidades en el cartucho pueden ser de cualquier forma o volumen deseados; sin embargo, preferiblemente serán de lados cilíndricos rectos o menos preferiblemente cilíndricos ahusados. La sección transversal de tales cavidades cilíndricas puede ser de cualquier forma deseada, por ejemplo circular, oval, poligonal (por ejemplo rectangular), semicircular, etc. Las bases de las cavidades pueden ser planas o curvadas; sin embargo, para cavidades que han de ser supervisadas por debajo durante o a la terminación del ensayo, la base de cavidades será preferiblemente plana.

25 En una realización especialmente preferida, la base de cavidades es plana e inclinada, es decir, no horizontal. Las cavidades pueden estar dentro de una base sólida o alternativamente, y menos preferiblemente, las cavidades pueden estar conectadas en un formato de tira, chapa, disco, margarita, etc. Las paredes de la cavidad, por ejemplo la base sólida conteniendo cavidades, serán preferiblemente de plástico, especialmente plástico transparente, por ejemplo plástico acrílico, vinílico, estirénico u olefínico. La elección del plástico particular dependerá, sin embargo, como es convencional, de la naturaleza de los reactivos usados. Se ha hallado especialmente preferible usar plástico con buenas propiedades ópticas y baja permeabilidad a los gases y/o líquidos. Para ello, los copolímeros de alfa-olefinas (por ejemplo, etileno y propileno, especialmente etileno) y olefinas cíclicas (por ejemplo, norborneno) son especialmente preferidos, por ejemplo el producto vendido bajo la denominación comercial Topas® 8007 por Ticona GmbH de Frankfurt, Alemania (Topas® 8007 es un copolímero de etileno/norborneno). Deseablemente tales copolímeros tienen una transmisión de luz (medida según ASTM D1003 para una pared de 2 mm grosor) de al menos 80%, muy preferiblemente al menos 90%; y una permeabilidad al vapor de agua (en 23°C y 85% HR, medida según DIN 53122 en una muestra de 80 x 80 x 1 mm) de menos que 0,2 g.mm.m⁻²d⁻¹, más preferiblemente menos de 0,05 g.mm.m⁻²d⁻¹.

35 Típicamente, las cavidades tendrán diámetros internos de 3 a 20 mm, especialmente de 5 a 15 mm, y volúmenes de 0,1 a 5 ml, especialmente de 0,5 a 1,5 ml.

40 La pipeta con punta de membrana en el cartucho de la invención es preferiblemente cilíndrica y la membrana está preferiblemente en un extremo o más preferiblemente cubriéndolo. El otro extremo abierto tiene preferiblemente una forma para la unión sustancialmente estanca a los gases a un aplicador de presión. La pipeta puede ser de cualquier material apropiado; sin embargo, se prefiere plástico transparente o vidrio. La membrana se puede unir a la pipeta de cualquier forma apropiada, por ejemplo por soldadura (por ejemplo, soldadura ultrasónica o térmica), adhesiva, fusión de un precursor de membrana granular, etc.

45 La membrana propiamente dicha puede ser de cualquier material apropiado, por ejemplo plástico (por ejemplo nylon, polisulfonas, etc), vidrio (por ejemplo, fibra de vidrio), metal, etc. Sin embargo, las membranas celulósicas (por ejemplo, nitrocelulosa reforzada) son especialmente preferidas puesto que es relativamente sencillo inmovilizar anticuerpos u otros reactivos de ensayo en tales materiales.

50 En varias realizaciones de la invención, la membrana es preferiblemente plana y perpendicular al eje de la pipeta; tales membranas son especialmente efectivas para extracción de líquido de una cavidad horizontal con fondo cóncavo o plano.

55 Sin embargo, la membrana puede ser alternativamente y más preferiblemente plana, pero inclinada con relación al eje de la pipeta, por ejemplo hasta 85° de la perpendicular al eje, preferiblemente de 10 a 80° de la perpendicular, más preferiblemente de 50 a 70° de la perpendicular, especialmente de aproximadamente 60° de la perpendicular. Donde la pipeta y una o más cavidades son de sección transversal rectangular (por ejemplo cuadrada), se prefiere que la membrana esté inclinada y que la base de una o más cavidades esté igualmente inclinada de manera que sea sustancialmente paralela a la membrana cuando la pipeta esté en dicha cavidad.

60 El uso de una membrana inclinada es especialmente ventajoso puesto que, para una sección transversal de pipeta dada, el área superficial de la membrana se incrementa a medida que se inclina progresivamente más de la horizontal, dando así una mayor área superficial a leer o supervisar durante el ensayo. Muy inesperadamente, las membranas inclinadas no solamente permiten esencialmente que todo el contenido de una cavidad de forma correspondiente sea

ES 2 309 163 T3

captado a través de la membrana, sino también que la captación sea uniforme a través de la membrana (es decir, si se atrapa en la membrana un analito de color, la membrana se colorea uniformemente). Otra ventaja es que la membrana se puede ver desde el lado, evitando todo riesgo de caída de la muestra, reactivo, etc, que caen sobre la óptica del aparato. Otra ventaja es que la membrana puede ser iluminada fácilmente sin hacer que la alta incidencia de la luz iluminante sea reflejada al detector de luz. Otra ventaja es que, incluso con una muestra de color (por ejemplo, sangre), es posible supervisar la superficie de la membrana a través de la pared de la cavidad lateral y así terminar cualquier paso de reacción cuando se haya producido el cambio deseado en la superficie de la membrana puesto que la separación de la membrana a la pared de la cavidad puede ser menos que para una membrana horizontal en una cavidad conteniendo líquido. Otra ventaja es que se reduce la formación de burbujas entre la membrana y la pared que mira a la cavidad con relación al caso de membranas horizontales, reduciendo así la necesidad de bascular o agitar la base del cartucho.

El uso de una sección rectangular transversal para una cavidad se prefiere especialmente puesto que reduce la incidencia de que se atrapen reactivos líquidos en el extremo superior de cavidades por efectos capilares después de la inversión de los cartuchos de ensayo durante el transporte o almacenamiento. Por lo tanto, las esquinas donde se unen las paredes laterales de las cavidades deberán ser deseablemente lo más afiladas posible en los extremos superiores de las cavidades, por ejemplo, con un radio de curvatura de 0,5 mm o menos, por ejemplo 0,1 mm o menos. Sin embargo, para evitar que los líquidos presentes en la base de las cavidades “suban” por las esquinas de la cavidad, es deseable que en el extremo inferior de las cavidades las esquinas estén achaflanadas o más redondeadas, por ejemplo, con un radio de curvatura de al menos 0,5 mm, preferiblemente al menos 0,8 mm.

Donde se ha de usar una cavidad para lectura del ensayo, por ejemplo, donde se ha de medir la absorción de luz que pasa a través de un líquido en la cavidad, también se prefiere en particular usar una cavidad de sección rectangular transversal con una base inclinada. De esta forma, mediante el enmascaramiento apropiado de la sección de la cavidad visible al detector, se puede elegir medir la luz transmitida a través de toda la anchura de la cavidad o a través de una anchura más pequeña en la base de la cavidad (es decir, entre una pared lateral y la base inclinada). Así, la longitud del recorrido de luz a través de la cavidad se puede incrementar o disminuir subiendo o bajando la sección visible. De esta forma, por ejemplo, donde la densidad óptica del contenido de la cavidad es alta, se puede elegir una longitud de recorrido más corta.

Además, midiendo la intensidad de transmisión de luz en dos o más longitudes de recorrido (por ejemplo dentro y encima de la porción de base ahusada de la cavidad), la contribución de las paredes de la cavidad a la señal detectada puede ser determinada y corregida.

Donde se ha de detectar luz dispersada (por ejemplo, donde la muestra leída contiene partículas o aglomerados o es fluorescente o fosforescente), de nuevo será deseable usar cavidades de sección transversal rectangular, dirigiéndose la luz incidente perpendicular a un par de paredes de cavidad y detectándose la luz dispersada por un detector (por ejemplo, una cámara digital) dirigida a una de las otras paredes. Donde el cartucho contiene una serie lineal de cavidades, la cavidad de lectura para mediciones de dispersión de luz está preferiblemente en un extremo de la serie.

Este uso de cavidades de pared inclinada también es nuevo y constituye otros aspectos de la invención.

Además de una pipeta con punta de membrana, los cartuchos de la invención pueden contener una o más pipetas, de nuevo soportadas preferiblemente por la cubierta del cartucho, por ejemplo para medir el volumen exacto de reactivo o muestra o para mezclar reactivos y muestras. En una realización preferida el cartucho contiene una pipeta con punta capilar que aspira una cantidad deseada de fluido de una muestra en virtud de su acción capilar. Muy deseablemente incluye un agujero capilar a una cámara de mayor diámetro interno de tal manera que la acción capilar haga solamente que la punta capilar se llene. Con la punta retirada del líquido circundante, el contenido de la punta puede ser expulsado entonces a una cavidad de cartucho a presión o aspirado a la pipeta más allá de la punta capilar y la cámara.

El diámetro externo de la pipeta con punta de membrana es preferiblemente al menos 0,8 mm, por ejemplo de 1 a 5 mm, especialmente de 1,5 a 2,5 mm, menos que el diámetro interno de las cavidades con el fin de facilitar el flujo de gas entre la pared de cavidad y la pipeta durante la transferencia de líquido a través de la membrana de la pipeta y de asegurar la captación sustancialmente completa de líquido de las cavidades. El intervalo también permite que la cavidad contenga líquido (por ejemplo 200 μ l) y la pipeta con punta de membrana antes de la introducción de líquido a la pipeta.

Aunque la pipeta y las cavidades pueden tener la misma forma en sección transversal (es decir circular, cuadrado, etc), ocasionalmente puede ser preferible que las formas difieran ligeramente, por ejemplo, que una sea circular y la otra elíptica, puesto que esto reduce el riesgo de que la pipeta con punta de membrana sea mantenida por aspiración en la parte inferior de una cavidad. Este problema se puede resolver igualmente haciendo la punta de la pipeta o la base de cavidades ligeramente irregulares, por ejemplo con indentaciones o salientes.

En una realización especialmente preferida, el cartucho incluye: una base conteniendo múltiples cavidades, por ejemplo de 2 a 8 o 10, de las que al menos dos y preferiblemente al menos 3 están libres de reactivos líquidos y de las que al menos una contiene un reactivo líquido; y una cubierta que soporta la pipeta con punta de membrana de tal manera que se disponga con el extremo de la membrana en una de las cavidades vacías y con el extremo abierto accesible en la superficie exterior de la cubierta, y que tiene un agujero de aplicación de muestra a través de la

ES 2 309 163 T3

cubierta para comunicar con otra cavidad sin líquido. Es deseable disponer juntas estancas extraíbles para cubrir los extremos abiertos de la pipeta y el agujero de aplicación de muestra. A no ser que la cubierta lleve tapones de sellado de cavidad o las cavidades estén selladas como se ha descrito anteriormente, se dispondrá preferiblemente otra junta estanca extraíble rodeando la unión externa de la cubierta y la base y se dispondrá una junta tórica u otra junta estanca alrededor de al menos las cavidades conteniendo líquido entre la cubierta y la base. En cualquiera de estas formas el interior del cartucho está aislado de aire y humedad antes del uso. La base y la cubierta tienen preferiblemente indentaciones o salientes para enganche con el soporte de cartucho y medios de accionamiento, para asegurar la correcta correspondencia entre la cubierta y la base durante la realización del ensayo, y si la cubierta lleva tapones de sellado de cavidad, para enganche con un separador, tal como el descrito anteriormente, que separa la cubierta y la base para que pueda proseguir el ensayo.

La base y la cubierta son preferiblemente tales que la pipeta con punta de membrana se pueda colocar dentro de una "cavidad de lectura" o en una posición sin cavidad en la que la radiación de la pipeta sea accesible al detector. Dicha "cavidad de lectura" puede tener, por ejemplo, una sección de cavidad de lados planos o base plana transparentes a través de los que puede pasar luz al detector. En el caso donde la lectura se realiza en una posición sin cavidad, puede ser, por ejemplo, un agujero de extremos abiertos a través de la base o una porción de la base donde su pared lateral se ha quitado o rebajado de modo que la luz de la pipeta pueda llegar al detector sin pasar a través del material del que se hace la base.

Se prefiere el uso de una "cavidad de lectura" dado que se reduce la posibilidad de que goteen reactivos o muestra al cuerpo del aparato de ensayo. Donde se haya de leer una membrana inclinada, se puede evitar el uso de una cavidad de lectura separada puesto que la simple elevación de la membrana del líquido en una cavidad o la aspiración del líquido a través de la membrana a la pipeta deja la superficie de la membrana expuesta para lectura.

En una realización, la base se puede formar con el fin de obtener una superficie especular (por ejemplo una superficie prismática plástica) debajo de la parte inferior de la cavidad de lectura que refleja luz de la parte inferior de la cavidad de lectura, por ejemplo de la vertical a la horizontal. De esta forma, el detector no tiene que colocarse debajo del cartucho y se pueden evitar los problemas de la caída de polvo o líquido sobre el detector. Como en una lente Fresnel, se puede producir igualmente un prisma como una combinación integral de elementos de prisma individuales paralelos. Esta estructura de prisma se denomina aquí un "prisma Fresnel".

La distorsión de la imagen, debida a distorsión de la superficie que a menudo se produce en piezas moldeadas de plástico con un grosor de más de unos pocos milímetros, se reduce o evita utilizando un prisma Fresnel de plástico más bien que un prisma de plástico convencional que tiene la misma área superficial de incidencia de luz. Así, el uso de un prisma Fresnel formado en la base del cartucho para lograr reflexión de luz se prefiere especialmente en los dispositivos de la invención. Un "prisma Fresnel" típico es una estructura de material transparente escalonada en un lado y plana en el otro; la luz normalmente incidente en la parte horizontal de un paso es reflejada internamente por la superficie plana y sale normalmente a través de la parte vertical de un paso. Por lo tanto, funciona en efecto como un espejo. Sin embargo, dicho prisma Fresnel no será generalmente necesario con una membrana inclinada.

En los cartuchos de la invención, el extremo próximo o "abierto" de al menos una pipeta está sellado preferiblemente con una membrana elástica de autosellado, por ejemplo una membrana de caucho, que puede ser perforada por una aguja hueca para poder aplicar presión de gas. En esta realización, se dispone preferiblemente un depósito de residuos en la pipeta entre la punta de la pipeta y la membrana elástica. Con esta realización, el líquido presente en el cartucho puede ser aspirado al depósito de residuos durante o al final de la realización del ensayo de modo que el cartucho usado se pueda quitar y desechar sin que tenga lugar escape de residuos.

El aplicador de gas a presión en el aparato de la invención puede incluir, por ejemplo, una bomba, y un conducto desde la bomba a una unión de cartucho, y opcionalmente al menos un depósito y una válvula de dos o más posiciones. La inclusión de un depósito, por ejemplo de uno o más litros de capacidad, y preferiblemente al menos dos depósitos, permite aplicar presiones superiores y/o inferiores a la ambiente a la pipeta durante cortos períodos de tiempo con una variación despreciable del tiempo de la presión aplicado debido a la capacidad de aislar la pipeta de la bomba y debido al cambio de presión relativamente pequeño dentro del depósito durante el período de aplicación de presión (como resultado del tamaño relativamente grande del depósito). Entre aplicaciones de presión, la bomba puede ser usada para hacer que la presión del depósito vuelva al nivel deseado. Dado que puede ser deseable ventilar la pipeta a presión atmosférica y/o proporcionar en la pipeta presiones superiores e inferiores a la ambiente, es deseable poner una válvula multiposición en el conducto hacia arriba de la pipeta para permitir dichas aplicaciones de presión diferentes. La válvula, que también deberá incluir deseablemente una posición cerrada que no permita el flujo de gas a o de la pipeta, es operada preferiblemente por ordenador. Sin embargo, el uso de depósitos de presión como se ha descrito anteriormente requiere un espacio relativamente grande para el aparato y dispositivo de la invención. Dado que el dispositivo es preferiblemente portátil, es preferible, en cambio, usar una bomba de pistón (por ejemplo una jeringa) acoplado mediante un conducto (preferiblemente de volumen mínimo) a una unión de cartucho. De hecho, se prefiere especialmente tener una serie de bombas de pistón acopladas, conectada cada una a una unión de cartucho separada de modo que, cuando el cartucho esté en posición, la operación de un motor de bomba haga que todas las bombas operen. En esta realización, el cartucho está provisto preferiblemente de medios en blanco o activos para enganchar cada uno de estos accesorios, permitiendo simplemente los medios de enganche en blanco la ventilación de la bomba de pistón respectiva. En algunas realizaciones, por ejemplo, al medir la coagulación o donde haya que unir un analito a un ligando inmovilizado en la membrana de pipeta, puede ser deseable acelerar o ralentizar el paso de líquido bajo la

ES 2 309 163 T3

influencia del aplicador de presión; en estas circunstancias esto se puede lograr, por ejemplo, acelerando o ralentizando la velocidad de los pistones en las bombas de pistón.

5 El aplicador de presión está acoplado preferiblemente directamente al extremo abierto de la pipeta; sin embargo, alternativamente y mucho menos preferiblemente se puede acoplar directamente a una cavidad en el cartucho, abriéndose el extremo abierto de la pipeta a la presión ambiente.

10 En una realización particular se ha previsto una unión de aplicador de presión (preferiblemente móvil) para cada cavidad o posición de lectura sin cavidades del cartucho, y el cartucho está provisto de medios en blanco o activos para enganchar cada uno de estos accesorios. De esta forma es posible evitar la necesidad de una orientación esmerada del cartucho durante la colocación en el soporte: el cartucho se podría colocar en cualquier orientación de las orientaciones permitidas preestablecidas y la tapa del aparato se podría cerrar para poner los accesorios automáticamente en enganche con los medios de enganche en blanco y activos en el cartucho. La identificación del cartucho (como se explica mejor más adelante) por el aparato permitiría entonces mover automáticamente el cartucho a la orientación correcta para iniciar el ensayo. Sin embargo, esto sólo es especialmente deseable si es importante reducir el tiempo requerido para la colocación del cartucho o si el cartucho está diseñado para uso en múltiples ensayos (es decir, tiene múltiples pipetas).

20 El detector en el aparato de la invención puede ser cualquier detector de radiación apropiado, por ejemplo un detector de emisión radioactiva o un detector de radiación electromagnética. Alternativamente el aparato puede contener dos o más detectores capaces de detectar diferentes tipos de radiación. Sin embargo, para uso en el punto de cuidado, se prefiere que el detector sea un detector de radiación electromagnética y más específicamente un detector capaz de detectar luz en al menos una parte del rango UV a IR, en particular el rango del UV cercano a IR cercano y más especialmente el rango visible. (el término luz se usa aquí en el sentido de radiación electromagnética en el rango UV a IR). Para esta finalidad se prefiere especialmente usar una cámara digital como el detector.

30 El uso de una cámara digital como el detector se prefiere especialmente dado que puede funcionar no solamente como un detector de luz, sino como un analizador de estructura de imagen. Así, por ejemplo, se pueden detectar y corregir las irregularidades en la imagen de una membrana en una pipeta.

Entre el detector y el cartucho puede ser deseable colocar, de forma móvil o fija, artículos que sirven para seleccionar la energía de radiación que puede pasar al detector (por ejemplo filtros, prismas, etc) o para reducir el impacto de radiación parásita en el detector (por ejemplo agujeros y trampas de luz).

35 Los artículos que reducen la radiación parásita son especialmente importantes donde la radiación a detectar es débil (por ejemplo, la resultante de quimioluminiscencia o fluorescencia) o estimulada o resulta de la transmisión o reflexión de radiación mensurable por el detector. En tales circunstancias, también se puede disponer barreras de luz o colimadores en otro lugar en el aparato o dentro del cartucho.

40 En general, el aparato de la invención estará provisto de fuentes de radiación electromagnética (por ejemplo, fuentes de luz visible o IR cercano a UV cercano), dispuestas para hacer que la radiación emitida, reflejada o transmitida por las cavidades deseadas del cartucho o la pipeta pase al detector. Como resultado, también se prefiere que el cartucho, el soporte de cartucho y el detector estén dispuestos en una cámara a prueba de luz en el aparato y que el aparato esté provisto de un orificio de acceso cerrable para colocación del cartucho, por ejemplo una tapa.

45 Se prefiere especialmente prever una fuente de luz que, cuando el cartucho está en posición, tenga una cavidad entre ella y el detector, por ejemplo, de modo que la transmitancia de luz en la cavidad pueda ser determinada. Para ello, el cartucho puede estar provisto de un agujero en el que dicha fuente de luz se puede insertar al cargar el cartucho, preferiblemente un agujero colocado axialmente donde las cavidades en el cartucho están dispuestas alrededor de un eje central.

Se observará que el detector puede estar colocado con relación a la cavidad y la fuente de luz con el fin de detectar la luz transmitida, reflejada, dispersada o emitida.

55 Donde el detector es una cámara digital (o un láser de exploración), también se puede usar para identificación del ensayo. Así, se puede colocar un código de barras o código similar legible por máquina en el cartucho de ensayo y, leyéndolo, el ordenador que hace funcionar el aparato puede identificar la naturaleza del ensayo y por lo tanto los pasos del ensayo necesarios para llevarlo a cabo. El usuario del ensayo puede igualmente aplicar un código de barras o código legible por máquina al cartucho de ensayo para identificar al paciente de modo que el aparato pueda generar un informe que identifique al paciente y al ensayo o puede generar una entrada en o para los registros computerizados del paciente. Se describen sistemas de lectura de códigos y resultados de esta naturaleza, por ejemplo, en WO 98/32004.

65 Es deseable que el dispositivo, por ejemplo en el soporte de cartucho, esté provisto de control de temperatura, por ejemplo una placa caliente con termostato, una fuente de aire caliente, etc.

En una realización alternativa, el tiempo de coagulación en sangre o plasma puede ser determinado depositando la muestra en una cavidad conteniendo un agente efervescente y supervisando la tasa de subida de las burbujas generadas usando una cámara digital.

ES 2 309 163 T3

Donde se usa una pipeta de punta capilar, puede ser deseable disponerla por separado del cartucho, formarla de manera que se pueda colocar en una cavidad y acoplable al aplicador de presión.

Tales pipetas de punta capilar y su uso en unión con cartuchos de ensayo forman otros aspectos de la invención.

Usando las pipetas en los cartuchos de ensayo de la invención, es así posible introducir muestras de prueba en cavidades del cartucho, mezclar reactivos o reactivos y muestra en las cavidades, transferir líquidos de una cavidad a otra, etc. Bombeando líquidos a y de una pipeta en una cavidad es posible mejorar la homogeneidad de la mezcla, y bombeando líquidos de un lado a otro a través de una membrana de soporte de reactivo de la pipeta es posible aumentar la extensión de la reacción con el reactivo. Variando la tasa a la que un líquido es bombeado a través de una membrana de soporte de reactivo de la pipeta también es posible variar la extensión a que reacciona el reactivo. Consiguientemente el formato de la pipeta y del cartucho da gran versatilidad para la realización del ensayo.

Donde el cartucho de ensayo incluye una pipeta de punta capilar, por ejemplo para transportar muestras de sangre, frecuentemente es deseable quitar el fluido excedente de la superficie exterior del capilar. En tales casos, se prefiere que una de las cavidades esté provista de una escobilla de pipeta absorbente contra la que se puede poner la punta capilar con el fin de hacer que la escobilla absorba fluido en la superficie exterior del capilar. Esta escobilla puede tomar, por ejemplo, la forma de una compresa absorbente dispuesta en o cerca del extremo superior de la cavidad, por ejemplo una compresa en forma de U, preferiblemente ranurada en la base de la U. En tal realización, como se retira el capilar de la cavidad, puede ser desplazado a un lado para enganchar la punta capilar con la ranura. Dado que tal desplazamiento puede tener lugar antes de que la pipeta con punta de membrana se haya retirado completamente de la cavidad en que está dispuesta, puede ser necesario diseñar las cavidades para evitar que la pipeta con punta de membrana sea movida a una pared de cavidad lateral. Así, la cavidad para la pipeta con punta de membrana se puede hacer más ancha o alternativamente su pared lateral se puede quitar parcialmente en el extremo superior de la cavidad.

En vez de limpiar una punta capilar para quitar la muestra excedente del exterior de la punta, una alternativa es insertar la punta capilar en una matriz absorbente dispuesta paralela con el eje de la punta capilar, por ejemplo fibras absorbentes paralelas a la punta o hojas de material absorbente (por ejemplo papel) con superficies paralelas al eje de la punta capilar. Dado que la punta abierta del capilar no contactará el material absorbente, el contenido del capilar no se quita mientras que el exterior del capilar se limpia del fluido excedente. Esto es especialmente importante con muestras de sangre. Así por ejemplo un capilar de $1 \mu\text{l}$ representa pobre precisión a no ser que se quite la sangre adherida al exterior del capilar. Como media, un capilar de $1 \mu\text{l}$ lleva $0,25 \mu\text{l}$ en el exterior. Sin extracción de sangre adherida al exterior se ha hallado un CV (coeficiente de variación) de aproximadamente 7-8% (volumen de sangre distribuido). Con la extracción eficiente de sangre soportada en el exterior el CV se reduce a 1,0-1,5%.

Donde la limpieza del capilar tiene lugar como parte de la realización del ensayo, el retardo de tiempo antes de que tenga lugar la limpieza, puede dar lugar al secado de la sangre en el exterior del capilar. Cuando esto sucede, no toda la sangre será absorbida y puede ser solubilizada durante un paso de dilución posterior. Si el usuario espera un minuto desde la toma de la sangre al capilar para poner en funcionamiento el instrumento, la limpieza es algo ineficiente. Esperar tres minutos significa ausencia total de absorción de sangre.

Por lo tanto, es muy preferible que la limpieza del capilar tenga lugar inmediatamente después de que el capilar tome la muestra de sangre. Esto se puede lograr disponiendo en una cavidad de recepción de capilar del cartucho una matriz absorbente como se ha descrito anteriormente, por ejemplo una tira de papel plegado en forma de V, recibiendo el extremo abierto de la V la punta capilar. El papel se puede colocar y mantener estable en la cavidad usando las fuerzas del papel que empujan hacia fuera contra las paredes de la cavidad o, si es necesario, montando el papel en un bastidor de soporte. Cuando el usuario introduzca el soporte de capilar en el cartucho, el capilar separará los dos brazos superiores y el capilar bajará a contacto con el papel en dos lados opuestos uno a otro. Esta construcción con el papel paralelo al capilar asegura que no se pueda absorber sangre del interior del capilar y además el capilar nunca chocará con la parte inferior del papel plegado. Usando un capilar de $1 \mu\text{l}$ y sangre entera, con esta construcción se logró un CV (volumen de sangre) de 0,75%.

En otra realización preferida, el cartucho de ensayo se le suministra al usuario con una pipeta con punta capilar a usar para tomar muestras suelta o montada soltamente en el cartucho, por ejemplo, en una cavidad de extremo de una serie lineal de cavidades. En esta realización, en la punta capilar, es decir el extremo distal de la pipeta, se ha montado soltamente un manguito que engancha estrechamente y está preferiblemente a nivel con el extremo abierto de la punta capilar. A la toma de muestras por el capilar, todo líquido externo excedente se adhiere consiguientemente al exterior del manguito más bien que al exterior del capilar apropiado. El manguito está provisto preferiblemente, por ejemplo en su superficie externa, de medios para enganchar con la superficie interior o superior de una cavidad en el cartucho (por ejemplo una pestaña deformable, etc) de que, cuando la pipeta con punta capilar cargada sea empujada a dicha cavidad, la pipeta con punta capilar se pueda sacar entonces de la cavidad (por ejemplo, al comienzo de la realización automatizada del ensayo) dejando el manguito y el líquido externo excedente en la cavidad. Experimentos han demostrado que, al transferir una muestra de sangre de $1 \mu\text{l}$ usando tal capilar protegido por manguito, se puede lograr un CV (volumen de sangre) tan bajo como los que se pueden lograr con la escobilla de papel plegado descrita en el párrafo anterior.

ES 2 309 163 T3

Para ciertos ensayos, puede ser deseable llevar a la práctica una separación de la muestra, por ejemplo generar una muestra de plasma a partir de una muestra de sangre original. En tales casos puede ser deseable poner un filtro en una de las cavidades. Éste puede ser extraíble o alternativamente puede formar parte de una extensión de pipeta integral asentada en la cavidad. Tal extensión de la pipeta puede incluir, por ejemplo, un cilindro abierto en su extremo superior donde se conforma para enganche con una pipeta montada en la cubierta del cartucho, y empaquetado en su extremo inferior con fibra de vidrio. En tal realización, la muestra puede ser llevada a una pipeta de punta capilar montada en la cubierta del cartucho cuando la cubierta y base están separadas o a una pipeta de punta capilar montable en la cubierta del cartucho. Entonces, con la cubierta y la base enganchadas, la muestra puede ser expulsada bajo presión de aire al cilindro de la extensión de la pipeta; el filtrado pasará a la base de la cavidad. Una segunda pipeta montada con cubierta de punta capilar puede ser usada entonces para aspirar el filtrado después de que la pipeta y extensión de la pipeta se han retirado de la cavidad. De esta forma, comenzando con una muestra de sangre, se puede producir una muestra de plasma no diluido.

Además de extensiones de pipeta, limpiadores de capilares, etc. se puede disponer otros artículos dentro de las cavidades del cartucho. Así, por ejemplo, la cavidad para recibir un capilar de muestreo puede contener otra cavidad fija o extraíble conteniendo un reactivo seco de modo que la muestra y este reactivo se puedan mezclar al inicio de la realización del ensayo.

El aparato, el dispositivo y los cartuchos de la invención son para uso en métodos de ensayo. Tales métodos, usando el aparato, el dispositivo o los cartuchos de la invención forman otros aspectos de la invención. Aunque la invención es especialmente adecuada para ensayos de diagnóstico médico, también se puede usar para otros ensayos, por ejemplo ensayos medioambientales, nutricionales, etc. incluyendo ensayos de muestras de procesos de fabricación. Es especialmente adecuado para tales usos que los cartuchos y dispositivos se puedan hacer suficientemente pequeños de modo que sea completamente portátiles, por ejemplo, no siendo la dimensión máxima del dispositivo (excluyendo los conectores al equipo externo o fuentes de potencia) superior a 30 cm, más preferiblemente no superior a 20 cm.

Considerada desde otro aspecto, la invención también proporciona el uso del aparato de la invención para analizar un analito en una muestra biológica o una propiedad de una muestra biológica, por ejemplo para analizar el tiempo de coagulación en una muestra de sangre o derivada de sangre o para analizar un analito proteínico en una muestra de fluido corporal o derivada de fluido corporal.

Ejemplos del aparato y los métodos según la invención se ilustrarán ahora mejor con referencia a los ejemplos no limitadores siguientes y los dibujos acompañantes, donde:

La figura 1 es una vista en sección transversal esquemática de un cartucho según la invención.

La figura 2 es una vista esquemática en sección transversal parcial de un cartucho según la invención.

La figura 3 es una vista esquemática en sección transversal parcial de un cartucho según la invención.

La figura 4 es un dibujo esquemático del aparato según la invención.

La figura 5 es una vista esquemática en sección transversal de un cartucho según la invención.

Las figuras 6 y 7 muestran curvas de dosis-respuesta para los ensayos de los ejemplos 1 y 2.

La figura 8 representa los resultados del ensayo del ejemplo 3.

Las figuras 9 a 19 son vistas esquemáticas de otras realizaciones de cartuchos según la invención donde las cavidades están dispuestas en una serie lineal.

La figura 20 es una vista esquemática que representa cómo se puede utilizar un imán móvil para separar perlas poliméricas magnéticas de una muestra en una cavidad de un cartucho según la invención.

La figura 21 es una vista esquemática que representa cómo se puede utilizar una tira de papel para limpiar el líquido excedente del exterior una pipeta con punta capilar en un cartucho según la invención.

La figura 22 es una vista esquemática que representa cómo un depósito de residuos sellado con membrana puede formar parte de una pipeta en un cartucho según la invención.

Y la figura 23 es una vista esquemática en sección transversal lateral de una pipeta con punta capilar para uso en un cartucho de ensayo según la invención.

Con referencia a la figura 1, se representa una base de cartucho cilíndrica transparente de plástico 1 conteniendo cavidades cilíndricas 2 (de las que solamente se representan dos) dispuestas en una serie circular alrededor del eje del cartucho 3. Encima de la base de cartucho 1 se ha dispuesto una cubierta de cartucho 5. Las bocas de cada cavidad están selladas con tapones 4 unidos a la cubierta 5. La cubierta 5 también sujeta la pipeta 6, presentan una extensión de unión de aplicador de presión 7 al exterior de la cubierta y con el extremo de pipeta con punta de membrana 8 dispuesto en

ES 2 309 163 T3

una cavidad 2 de la base 1. Un orificio de introducción de muestra 9 también está presente en la cubierta 5. El orificio 9 y la pipeta 6 se mantienen en correspondencia con las cavidades 2 por salientes y rebajes de acoplamiento 10, 11, 12, 13. Salientes y/o rebajes de acoplamiento similares 14 (aquí representados como rebajes) están dispuestos en la base 1 y la cubierta 5 para permitir que la base y la cubierta enganchen con el soporte de cartucho y medios de accionamiento (no representados) del aparato de ensayo. La base y la cubierta están provistas de pestañas 15 para enganchar con el separador (no representado) que separa la base y las juntas estancas de cubierta 16 antes de que comience la realización del ensayo. La naturaleza del ensayo para el que se ha previsto el cartucho, es identificada por una etiqueta de código de barras 17 en el lado de la base. La pipeta y el orificio de aplicación de muestra se representan sellados por tiras estancas extraíbles 16. Éstas se quitan antes de usar el cartucho.

En la figura 2, el cartucho de la figura 1 se representa en una orientación diferente para lectura del resultado del ensayo al final de la realización del ensayo. En esta orientación, las cavidades 18 y 19 representadas son diferentes de las cavidades 2 en la figura 1. La cavidad 18 es una "cavidad de lectura" que tiene un prisma de plástico 20 colocado en su base y parte del recorrido de la luz de la membrana al detector se representa como una línea de puntos 21. La pipeta 7 se representa conteniendo reactivo usado 22. La fuente de luz 44 se representa en posición dentro del canal axial 45 en la base del cartucho.

En la figura 3 se representa una realización diferente del cartucho de la figura 2 en la que la parte inferior de la cavidad de lectura 18 está escalonada y la base debajo de la cavidad de lectura 18 está inclinada formando por ello conjuntamente un prisma Fresnel 29. La fuente de luz 46 está dispuesta para iluminar la membrana. En esta realización, la pipeta 7 también se representa con una cámara de volumen relativamente grande 47. Esto facilita la retención de los líquidos usados en el ensayo en la pipeta.

En la figura 4 los componentes del aparato de la invención se representan esquemáticamente. El cartucho 23 (con la base 1, la cubierta 5 y la pipeta 6) es mantenido por el soporte 24 y movido por los medios de accionamiento 25. La pipeta 6 está conectada mediante conductos 26 a bombas de pistón 27 movidas por el motor 28. Un detector, una cámara digital 32, está dispuesto para detectar luz de la cavidad de lectura de cartucho 23 cuando el ensayo ha terminado y las fuentes de luz 44 y 46 con suministro de potencia 34 están dispuestas para iluminar la cavidad de lectura.

Los medios de accionamiento 25, el motor 28, la cámara 32 y la fuente de potencia 34 son operados por un ordenador 35 que proporciona una salida en monitor/impresión 36 o a un ordenador remoto 37 (por ejemplo mediante una conexión inalámbrica de infrarrojos). La cámara 32, las fuentes de luz 44 y 46, el soporte 24 y el cartucho 23 están dentro de una cámara estanca a la luz 38 provista de un orificio de carga y descarga de cartucho 39.

La figura 5 representa una sección transversal de una pipeta alternativa con punta capilar utilizable en los cartuchos de la invención.

El extremo abierto 39 de la pipeta está adaptado para unirse al aplicador de presión. El otro extremo de la pipeta está provisto de una punta capilar 40 que comunica con la cámara 41 y por lo tanto mediante otro capilar sinuoso 42 con el extremo abierto 39. La parte 43 de la base de la cavidad 2 está recubierta con un agente de promoción de coagulación, por ejemplo factor de tejido. La inmersión de la punta capilar 40 en sangre o plasma hace que una muestra de volumen fijo sea aspirada por acción capilar. La extracción de la pipeta de la muestra y posteriormente la expulsión del contenido a la cavidad recubierta con agente promotor de coagulación y la posterior aspiración de la muestra de nuevo al capilar o la aspiración de la muestra por el factor de tejido en el capilar, acelera el inicio de coagulación y la cámara digital puede ser usada para determinar el tiempo en que cesa efectivamente el flujo de muestra a lo largo del capilar 42, es decir el tiempo de coagulación.

Las figuras 9 a 19 muestran disposiciones alternativas de un cartucho de ensayo en que las cavidades están dispuestas de forma lineal.

La figura 9 representa una pipeta de punta capilar separada 50 que puede ser sumergida en un líquido para aspirar una muestra. La pipeta cargada se puede introducir entonces en el agujero 51 en la cubierta del cartucho 52 disponiendo así la punta capilar en una cavidad de extremo en la base del cartucho 53. El extremo superior abierto de la pipeta 50 está provisto de ranuras 54 de modo que si el operador engancha la pipeta con la cubierta del cartucho y la base ejerciendo presión en la parte superior de la pipeta, esto no eleva la presión en la pipeta y expulsa así prematuramente parte o toda la muestra. La figura 10 representa el cartucho de la figura 9 montado después de la introducción de la pipeta de muestreo, es decir, en la etapa en que el cartucho está preparado para colocación en el aparato de la invención.

Durante la realización del ensayo, la cubierta y la base del cartucho se separarán por el desenganche del mecanismo de retención 84. El cartucho separado se representa en la figura 11. La cubierta de cartucho 52 se representa soportando la pipeta de punta capilar 50 y la pipeta con punta de membrana 55. La pipeta con punta de membrana 55 es rectangular en sección transversal y tiene una punta inclinada 56. Para claridad, la membrana que cubre el extremo abierto inferior de pipeta 55 no se representa. La base del cartucho 53 se representa con seis cavidades 57-62, todas generalmente rectangulares en sección transversal. Para poder limpiar la punta capilar, se ha quitado una porción de la sección superior de la pared entre cavidades 57 y 58. Como se representa en la figura 12, las bases 63 de las cavidades 59 a 62 están inclinadas de manera que sean paralelas a la punta 56 de la pipeta con punta de membrana. Las cavidades 59 a 62 están selladas con lámina en sus extremos superiores. Las juntas estancas de lámina se perforan durante la

ES 2 309 163 T3

realización del ensayo por punzones 64 inicialmente montados en la cubierta del cartucho (véase la figura 13). Los punzones individuales están conectados conjuntamente en una tira 65 representada en la figura 14. Cada punzón, que puede ser de metal, pero que es preferiblemente de plástico, es un cilindro de sección transversal rectangular hueca con un borde de cuchilla 66 en el borde inferior y pestañas 67 en el borde superior que hacen que el punzón sea retenido por la base del cartucho una vez que ha sido empujado a enganche con la base (como se representa en la figura 15). La sección transversal interna de los punzones se ha conformado para actuar como una guía para las pipetas.

La figura 16 representa la cubierta del cartucho y la base separadas con un desplazamiento a un lado para poner la punta capilar de pipeta 50 en contacto con una escobilla absorbente 68 dispuesta en la parte superior de la cavidad 57. Como se representa, la pipeta con punta de membrana 55 está parcialmente desplazada de la cavidad 58 a la cavidad 57.

Las figuras 17 y 18 son vistas despiezadas de los conjuntos de cubierta y base del cartucho con extensiones de pipeta 69 y 70 que en la práctica se dispondrían en la cavidad (57) en la que la pipeta de muestreo 50 se introduce inicialmente. En el caso de la figura 18, la extensión de la pipeta 70 sirve para transformar la pipeta de muestreo a una pipeta con punta de membrana, por ejemplo para poder filtrar una muestra.

La figura 19 representa los extremos inferiores de tres cavidades dispuestas para la realización de ensayos de coagulación de sangre que tienen en las figuras 19a y 19b una bola de acero 72 móvil a lo largo de la base de la cavidad y en la figura 19c una bola de polímero 73 que flotará en la superficie de muestra mientras todavía sea fluida.

Después de la realización del ensayo usando los cartuchos de las figuras 9 a 19, se introduce preferiblemente una tira absorbente en el agujero 71 en la cubierta del cartucho con el fin de evitar la infiltración de cualquier fluido que permanezca en las cavidades 58 a 62. Alternativamente, el agujero se puede sellar con un "pistón" alargado que se usa para empujar los punzones a través de las juntas estancas de lámina de las cavidades 58 a 62.

En la figura 20 se representa una cavidad 75 en un cartucho según la invención. Esta cavidad contiene un líquido 76 conteniendo perlas poliméricas magnéticas. Para separar las perlas del líquido durante la realización del ensayo (por ejemplo como en el ejemplo 12 siguiente), se mueve un imán 77 desde una posición (A) en la que está alejado de la cavidad a una posición (B) en la que contacta la pared de cavidad. Entonces se puede introducir una pipeta con punta de membrana en la cavidad y usar para sacar el líquido que queda detrás de las perlas magnéticas.

En la figura 21 se representa esquemáticamente un cartucho 78 según la invención con una serie lineal de cavidades 79-84, del que un extremo 79 está dispuesto para recibir un capilar de muestreo cuya punta 85 se representa. Dentro de la cavidad 79 se ha dispuesto un pliegue en V de papel absorbente 86 de modo que la introducción de la punta capilar 85 en la cavidad 79 haga que se limpien los lados del capilar.

En la figura 22 se representa parcialmente y esquemáticamente un cartucho 87 según la invención que tiene pipetas de punta capilar y de punta de membrana 88 y 89 en la cubierta de cartucho 90. La pipeta con punta de membrana 89 tiene hacia su extremo próximo un depósito de residuos líquidos 91 y cuando está en posición dentro de la cubierta de cartucho 90 el depósito se cierra con una junta estanca de caucho 92. Donde se ha de aplicar presión al extremo próximo de la pipeta con punta de membrana 89, esto se hace perforando la junta estanca 92 con una aguja hueca 93 unida a un aplicador de presión (no representado).

En la figura 23 se representa una pipeta con punta capilar 94 que se ha previsto como parte de un cartucho de ensayo según la invención. Tal como se entrega al usuario, la pipeta 94 está colocada floja en una cavidad, por ejemplo como la pipeta 50 en la cavidad 57 en la realización de la figura 11. El extremo distal 95 de la pipeta 94 está provisto de un manguito 96 que agarra el extremo de la pipeta y rodea estrechamente y está a nivel con la punta del capilar. El borde superior del manguito 96 está provisto de una pestaña deformable 97 que se puede pasar por una pestaña de adaptación en la cavidad con el fin de bloquear el manguito en la cavidad. En la práctica, la pipeta con punta capilar se quita del cartucho con el manguito 96 unido, se sumerge en una muestra de líquido para aspirar líquido a la punta capilar, y se sustituye en la cavidad y empuja para bloquear el manguito a la cavidad. El cartucho se puede cargar entonces en el dispositivo de ensayo y en la realización del ensayo la separación de la cubierta y la base del cartucho sirve para desenganchar el manguito del capilar.

Ejemplo 1

Ensayo de proteína C-reactiva en suero

Muestras de 1 μ l de sangre humana, con adición de proteína C-reactiva purificada (CRP) a concentraciones del orden de 0 a 160 mg/l se colocan en una cavidad con fondo redondo, de 9 mm de diámetro interno (en un cartucho de ensayo equivalente al cartucho de la figura 1) conteniendo 200 μ l de un líquido de dilución acuoso (30 mM tampón borato, pH 8,0 conteniendo 0,01% p/v sodio citrato, 0,02% p/v NaN_3 y deoxicolato).

La pipeta con punta de membrana, con un diámetro externo de 7,2 mm, se baja a la cavidad conteniendo la muestra, y se aplica a presión inferior a la ambiente al extremo abierto de la pipeta haciendo que el contenido de la cavidad fluya a través de la membrana a la pipeta. En este ejemplo, la membrana de pipeta es una hoja de nitrocelulosa encima de la que se ha inmovilizado un anticuerpo anti-CRP monoclonal (preparado por técnicas convencionales).

ES 2 309 163 T3

Posteriormente se saca la pipeta de la cavidad y baja a una segunda cavidad de la misma configuración conteniendo 200 μl de una dispersión acuosa de microperlas de oro (diámetro medio 4,5 nm, concentración (densidad óptica a 540 nm) de aproximadamente 3, correspondiente a una concentración de anticuerpos de aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 50 mM tampón borato pH 8,05, conteniendo 20 mM NaCl, 0,05% p/v NaN_3 y 0,1% p/v BSA) conjugada de forma convencional a un anticuerpo anti-CRP monoclonal. De nuevo se aplica presión inferior a la ambiente al extremo abierto de la pipeta haciendo que el líquido de la cavidad pase a la pipeta saturando así la membrana con el conjugado de oro.

Posteriormente se saca la pipeta de la segunda cavidad y baja a una tercera cavidad, de nuevo de la misma configuración, conteniendo 200 μl del líquido de dilución acuoso (*supra*). Se aplica a presión inferior a la ambiente al extremo abierto de la pipeta para aspirar el reactivo de lavado a la pipeta; de esta forma, se quita conjugado de oro no unido de la membrana.

Posteriormente se saca la pipeta de la tercera cavidad y coloca en una cuarta cavidad, de 9 mm de diámetro interno, de fondo plano, vacía. Para este ensayo, esta cuarta cavidad es la cavidad de lectura. La membrana de pipeta se ilumina (por ejemplo, con luz verde de un LED) a través de la base transparente conteniendo cavidades del cartucho de ensayo y la luz de 540 nm reflejada por la membrana es detectada usando un detector (por ejemplo una cámara digital o un fotodiodo).

La figura 6 de los dibujos acompañantes representa la dosis-respuesta lineal para este ensayo usando un LED verde. La realización del ensayo requiere aproximadamente 40 segundos desde la adición de suero a la determinación de reflectancia.

Ejemplo 2

Ensayo de albúmina de suero humano en orina

Se quita albúmina de suero humano (HSA) de orina humana por ultrafiltración y posterior adición de HSA purificado a concentraciones entre 0 y 200 mg/l.

Se transfiere una muestra de 10 μl de la orina en un capilar a una cavidad con fondo redondo, de 9 mm de diámetro interno (en un cartucho de ensayo equivalente al cartucho de la figura 1) conteniendo 200 μl de sodio tampón fosfato acuoso, pH 5,6 conteniendo 4,0% v/v propan-1-ol, 0,05% p/v NaN_3 , 0,003% p/v tropeolin-O y 0,5% p/v BSA. Se mezcla la orina con la dilución tampón bombeándose a y del capilar tres veces. Se quita el capilar y se baja la pipeta con punta de membrana a la cavidad. En este ensayo la membrana es una hoja de nitrocelulosa encima de la que se ha inmovilizado un anticuerpo anti-HSA monoclonal. La muestra diluida es aspirada a la pipeta como en el ejemplo 1.

Posteriormente se saca la pipeta de la cavidad y baja a una segunda cavidad que tiene la misma configuración, pero conteniendo 200 μl de una dispersión de conjugado de anticuerpo-microperlas de oro (como en el ejemplo 1, pero con un anti-HSA más bien que un anticuerpo anti-CRP, 50 mM tampón borato pH 7,8, 0,05% p/v NaN_3 , y 0,2% p/v BSA). El contenido de la cavidad se aspira a la pipeta como en el ejemplo 1, y como en el ejemplo 1 la pipeta es transferida posteriormente a una tercera cavidad (de lavado) y una cuarta cavidad (de lectura). En este ensayo el reactivo de lavado es PBS, pH 7,4.

La figura 7 de los dibujos acompañantes representa la curva de dosis-respuesta de este ensayo.

Ejemplo 3

Ensayo de hemoglobina glicada en sangre

Se toma 1 μl de sangre entera de una muestra de sangre usando un capilar montado en la punta de un depósito cónico invertido, volumen aproximadamente 500 μl , es decir un dispositivo en forma de embudo, a cuyo extremo superior se une un aplicador de presión.

El capilar se baja a una cavidad con fondo redondo, de 9 mm de diámetro interno en un cartucho de ensayo (como se ha descrito en los ejemplos anteriores) conteniendo 200 de una solución acuosa de conjugado de ácido bórico.

La solución de conjugado incluye 0,25 mM conjugado de ácido bórico de xileno-cianol (ejemplo 18 de US-A5631364), 0,07% p/v Triton X-100, 9 mM cloruro de zinc, y 100 mM tampón HEPES, pH 8,15.

La muestra de sangre es bombeada a la cavidad y se mezcla con la solución de conjugado de ácido bórico bombeando la solución a y del depósito cónico tres veces. Se quita el capilar y se deja incubar el contenido de la cavidad durante dos minutos. Esto permite que el detergente lise las células sanguíneas, que el zinc precipite la hemoglobina y que el conjugado de ácido bórico se una a hemoglobina glicada.

La pipeta con punta de membrana se baja entonces a la cavidad y se aplica a presión inferior a la ambiente haciendo que el líquido en la cavidad pase a la pipeta y que la hemoglobina sea atrapada en la membrana. En este ensayo la membrana es un filtro poroso que tiene un tamaño de poro de 1 μm .

ES 2 309 163 T3

Se saca la pipeta de la cavidad y se coloca en una segunda cavidad de la misma configuración conteniendo 200 μ l de un reactivo de lavado acuoso (50 mM morfolina tampón, pH 9,5, conteniendo 200 mM NaCl, 0,5% p/v Triton X-100, 0,1% p/v glicerol y 0,05% p/v NaN₃). Se aplica presión inferior a la ambiente a la pipeta aspirando a la pipeta el reactivo de lavado y conjugado de ácido bórico no unido.

5

Posteriormente se saca la pipeta y baja a una cavidad de lectura vacía, de fondo plano, de 9 mm de diámetro interno en el cartucho para medición reflectométrica de la hemoglobina atrapada en la membrana de pipeta. La hemoglobina total se mide usando luz azul a 460 nm y la hemoglobina glicada usando luz roja a 620 nm (por ejemplo usando LEDs rojo y azul). La proporción de hemoglobina glicada con relación a la hemoglobina total (a veces denominada %HblAc) se determina por la relación de las reflectancias medidas, calibrada contra muestras con %HblAc conocido.

10

La figura 8 de los dibujos acompañantes muestra los resultados del ensayo de este ejemplo para 6 muestras de sangre en las que se analizó %HblAc 24 horas antes de usar HPLC (variante, BioRad).

15 Ejemplo 4

Eficiencia de recogida de líquido de pipetas con punta de membrana

La eficiencia de la recogida de líquido de cavidades de diferentes configuraciones se comprobó con una pipeta de nitrocelulosa plana con punta de membrana como la descrita en el ejemplo 1 en comparación con una pipeta estándar cónica de punta abierta. En cada caso hubo que retirar 200 μ l de líquido de una cavidad de fondo plano o redondo de 9 mm de diámetro en una base de plástico blando o duro (LDPE y poliestireno respectivamente). Los resultados se exponen en la tabla 1 siguiente.

25

TABLA 1

Cavidad	Líquido recogido %	
	Pipeta de punta abierta	Pipeta de punta de membrana
Blanda, redonda	98,9	99,8
Dura, redonda	99,5	99,7
Dura, plana	84,0	99,5

30

35

40 Ejemplo 5

Ensayo de tiempo de coagulación de sangre

La pipeta de la figura 5 se usa para recoger un aproximadamente 2 μ l de muestra de sangre. El cartucho se vuelve a montar posteriormente y se aplica presión a la pipeta para expulsar la muestra de sangre a una cavidad de cartucho, cuya base está recubierta con un agente de promoción de coagulación (por ejemplo factor de tejido). Posteriormente se aplica presión inferior a la ambiente para aspirar de nuevo la muestra a la pipeta, por la cámara al capilar sinuoso. La muestra se lanza entonces de un lado al otro en el capilar sinuoso bajo la aplicación de presiones superior e inferior a la ambiente y, usando la cámara digital, se determina el tiempo entre cuando la muestra de sangre contacta el agente de promoción de coagulación y el cese efectivo de movimiento de la muestra de sangre. Esto puede durar típicamente aproximadamente 40 segundos.

50

Ejemplo 6

55 *Ensayo del tiempo de coagulación de sangre entera o plasma*

Se usa un cartucho de ensayo del tipo representado en la figura 11. Una de las cavidades 59 a 62 contiene factor de tejido seco y cloruro cálcico o gluconato así como una bola de acero, por ejemplo de 2 mm de diámetro (véase la figura 19a).

60

El aparato en el que se ha de colocar el cartucho está provisto de un elemento de calentamiento para mantener el contenido del cartucho a aproximadamente 37°C y con un imán para lanzar la bola de acero a lo largo de la base de la cavidad en que está dispuesta.

En la cavidad 57 se coloca una pipeta de punta capilar extraíble capaz de tomar un volumen preestablecido de muestra, por ejemplo 1 a 15 μ l, preferiblemente 10 μ l, de sangre entera, sangre venosa citrada, plasma o plasma citrado.

65

ES 2 309 163 T3

La muestra es aspirada por la pipeta con punta capilar que después se coloca en el cartucho que después se coloca en el aparato de ensayo. La muestra es transferida posteriormente a la cavidad conteniendo una bola de acero y se mezcla.

5 El cartucho es lanzado entonces con relación al imán en una dirección horizontal paralela con la punta de la cavidad conteniendo la bola. (Se puede mover el cartucho en conjunto o el imán; sin embargo, se mueve preferiblemente el cartucho, sirviendo el imán inicialmente para mantener estática la bola de acero).

10 Se usa una cámara digital para supervisar la posición de la bola de acero. Cuando la mezcla comienza a coagular, la bola deja de ser estática con relación al imán y esto es detectado por la cámara, permitiendo determinar así que el tiempo de coagulación (del contacto de la muestra con solución salina de calcio).

15 En una realización alternativa, menos preferida, se omite el imán debajo del cartucho y la bola se coloca en una cavidad con una base inclinada (por ejemplo como se representa en la figura 19b). El movimiento brusco del cartucho en la dirección del extremo inferior de la base, por ejemplo a través de choque mecánico o por activación de un electroimán al lado de la cavidad, hace que la bola suba por la base inclinada y, antes de que tenga lugar la coagulación, la bola vuelve al extremo inferior de la base bajo la acción de gravedad.

Ejemplo 7

20 *Ensayo de tiempo de coagulación de sangre entera o plasma*

Se usa un cartucho de ensayo como en el ejemplo 6 con una bola de polímero de densidad baja (por ejemplo una bola de poliestireno de 3-5 mm de diámetro) en lugar de la bola de acero. Esta bola está preferiblemente en una cavidad de fondo plano o cóncavo, de sección transversal circular (véase la figura 19c).

30 Se toma una muestra y se mezcla como en el ejemplo 6 y posteriormente se coloca en la cavidad conteniendo una bola donde la bola flotará en la superficie de la muestra. La bola es empujada posteriormente repetidas veces bajo la superficie de la muestra y se deja flotar de nuevo a la superficie. Cuando la muestra coagule, la bola volverá a la superficie más lentamente y posteriormente no lo hará.

35 La bola puede ser empujada debajo de la superficie por presión de la punta de la pipeta o alternativamente se puede usar una bola magnéticamente móvil y se puede activar y desactivar un campo magnético para aspirar la bola hacia abajo y soltarla, respectivamente. Tales bolas magnéticamente sensibles se pueden preparar, por ejemplo, depositando cristales superparamagnéticos en la bola de polímero (por ejemplo como en las perlas magnéticas vendidas por Dynal Biotech, Oslo, Noruega).

Ejemplo 8

40 *Ensayo de tiempo de coagulación de plasma*

Se usa un cartucho de ensayo similar al representado en la figura 11. Como en el ejemplo 6, una de las cavidades 59 a 62 contiene un tampón citrato, otro contiene fibrinógeno y factor de coagulación V y una tercera una solución salina de calcio. La cavidad 57 contiene una pipeta con punta capilar y la cavidad 58 contiene una extensión de filtro como se representa en la figura 18.

50 Se aspira una muestra a la pipeta de punta capilar que después se coloca en la cavidad 57 y el cartucho se coloca en el aparato de ensayo y en él se calienta a 37°C. La muestra es transferida posteriormente a la cavidad conteniendo tampón y se mezcla. Toda o una proporción preestablecida de la mezcla es transferida posteriormente a la extensión de filtro de la pipeta y se bombea plasma diluido sin células a la base de la cavidad. Un volumen predeterminado de plasma sin células es transferido posteriormente a la cavidad conteniendo fibrinógeno usando otra pipeta de punta capilar y esta pipeta adicional también se usa para transferir un volumen predeterminado de la solución salina de calcio a la cavidad conteniendo fibrinógeno/plasma para iniciar la reacción de coagulación. Se ilumina la cavidad y se usa una cámara digital para registrar la turbidez de la mezcla en la cavidad. El tiempo de adición de calcio para aumentar la turbidez a un valor predefinido se toma como el tiempo de coagulación.

Ejemplo 9

60 *Ensayo de coagulación en sangre entera o plasma*

65 Se usa un cartucho de ensayo similar al representado en la figura 11 y descrito en el ejemplo 8. Como en el ejemplo 8, una de las cavidades 59 a 62 contiene tampón citrato y otra una solución salina de calcio; sin embargo, se omite la cavidad conteniendo una bola y en lugar de factor de coagulación V y fibrinógeno la cavidad de "reactivo" contiene una sustancia cromogénica seca específica de trombina (por ejemplo Nycotest Chrom (descrita en Janson y colaboradores, *Thrombostasis and Haemostasis* 62: 530 (Poster 1677) (1989) y Jonker y colaboradores, *Research in Clinic and Laboratory* 20: 45-57 (1990)) o una de las sustancias cromogénicas explicadas en DE-A-3113350, DE-A-3413311, DE-A-3311287, US-A-4458015 o US-A-4784944).

ES 2 309 163 T3

Se toma la muestra y se mezcla de forma análoga al procedimiento del ejemplo 7. El proceso de coagulación da lugar a la formación de trombina y así a la liberación de un tinte de la sustancia cromogénica (por ejemplo, paranitroanilina amarilla de Nycotest Chrom).

- 5 El cambio de color de la muestra se sigue usando la cámara digital y el tiempo de coagulación se toma como el tiempo de adición de calcio a un cambio de color predeterminado.

Ejemplo 10

10 *Ensayo de proteína C-reactiva (CRP) en sangre entera usando conjugado de enzimas (ELISA)*

Usando la pipeta con punta capilar del cartucho, se añade 1 μl de sangre entera a una cavidad (por ejemplo, la cavidad 59) de un cartucho similar al representado en la figura 11 y conteniendo 200 μl de una dilución y lisando líquido (30 mM tampón borato pH 8,0 conteniendo 0,01% p/v sodio citrato, 0,02% p/v NaN_3 y deoxicolato). Las 15 cavidades del cartucho tienen una sección transversal rectangular con dimensiones interiores de 6,0 por 6,5 mm. La parte inferior plana de la cavidad se inclina 30 grados al eje longitudinal de la cavidad.

La pipeta rectangular con punta de membrana (que tiene dimensiones exteriores 3,7 por 4,2 mm y está equipada con una membrana de nitrocelulosa recubierta con anticuerpo anti-CRP montada a 30 grados al eje longitudinal del tubo 20 de membrana) se baja a la cavidad y la solución de células sanguíneas lisadas es absorbida a través de la membrana aplicando presión inferior a la ambiente al interior de la pipeta con punta de membrana. Cuando todo el líquido ha sido absorbido, se aplica presión superior a la ambiente para empujar el líquido por segunda vez a través de la membrana y que vuelva a la cavidad. Pasar la solución CRP dos veces a través de la membrana incrementa además la eficiencia de 25 captura de CRP.

Posteriormente la pipeta con punta de membrana es movida a una cavidad similar (por ejemplo, la cavidad 60) en el cartucho que contiene una solución de conjugado de fosfatasa alcalina (ALP) a un anticuerpo anti CRP (aproximadamente 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ALP y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anticuerpo en 50 mM tampón borato pH 8,0 conteniendo 0,02% p/v NaN_3 y 0,5% p/v BSA. La solución de conjugado es absorbida a través de la membrana y bombeada de nuevo a la cavidad 30 aplicando una secuencia de presión inferior y superior a la ambiente dentro de la pipeta con punta de membrana como se ha descrito anteriormente para la captura de antígeno.

En el paso siguiente, la pipeta con punta de membrana es movida a otra cavidad (por ejemplo, la cavidad 61) en el cartucho que contiene 200 μl de solución de lavado (50 mM tampón borato pH 8,0 conteniendo 0,01 % p/v NaN_3 , 35 0,5% p/v BSA y deoxicolato) que es absorbida y posteriormente bombeada de nuevo a la cavidad. Este paso de lavado se repite dos veces moviendo la pipeta con punta de membrana a dos cavidades adicionales (no representadas en la figura 11, pero equivalentes a la cavidad 61) que también contiene la solución de lavado. El total de tres ciclos de lavado asegura una extracción eficiente de conjugado no unido.

Finalmente la pipeta con punta de membrana es movida a otra cavidad (por ejemplo, la cavidad 62) en el cartucho 40 que contiene 300 μl de una solución del sustrato de fosfatasa alcalina para nitrofenil fosfato (1,0 mg/ml pNPP en 1,0 M dietanolamina tampón pH 9,6 conteniendo 0,5 mM MgCl_2 y 0,025% p/v NaN_3). El producto enzimático amarillo paranitrofenol se desarrolla bombeando la solución sustrato a y de la pipeta con punta de membrana en un período de 45 de dos minutos. La incubación se termina bombeando todo el líquido de nuevo a la cavidad y elevando la pipeta con punta de membrana de la solución sustrato. Usando 300 μl de solución sustrato la altura de llenado es aproximadamente 3 mm por encima de la parte superior de la parte inclinada de la cavidad, pudiendo medir así el color a través de paredes paralelas de la cavidad.

Con la pipeta con punta de membrana subida, la absorbancia se mide usando un LED azul como una fuente de luz 50 y una cámara digital para medición de la luz transmitida.

Ejemplo 11

55 *Ensayo de proteína C-reactiva (CRP) en sangre entera usando medición de dispersión de luz de perlas de látex agregadas*

Usando la pipeta con punta capilar del cartucho, se añade 2 μl de sangre entera a una cavidad (por ejemplo la cavidad 62) de un cartucho similar al representado en la figura 11 y conteniendo perlas de látex de 120 nm (0,2% p/v) suspendidas en 300 μl de 50 mM tampón borato pH 8,0 conteniendo 0,01% p/v sodio citrato, 0,02% p/v NaN_3 60 y deoxicolato. Las perlas se recubren por simple adsorción con anticuerpos anti CRP. La cavidad tiene una sección transversal rectangular y está en el extremo del cartucho para facilitar la medición de dispersión de luz. La luz es dirigida sobre una pared lateral de la cavidad. Después de una fase inicial de lisis celular que dura aproximadamente 10 segundos, se mide el aumento de dispersión de luz en un ángulo de 90 grados a la luz incidente. El aumento de dispersión de luz debido a la agregación mediada CRP de las perlas de látex se mide con la cámara digital a una 65 longitud de onda de 425 nm.

ES 2 309 163 T3

Ejemplo 12

Ensayo de albúmina en orina usando perlas magnéticas, perlas de látex de color y reflectometría

5 Usando la pipeta con punta capilar del cartucho, se añaden 2 μl de orina a una cavidad (por ejemplo, la cavidad 62) de un cartucho similar al representado en la figura 11 y conteniendo 1000 nm de perlas poliméricas magnéticas (0,2% p/v) y 1000 nm de perlas de látex azules (0,2% p/v) en 200 μl 30 mM sodio tampón fosfato pH 5,7 conteniendo 0,5% p/v BSA y 0,05% p/v NaN_3 . Las perlas magnéticas (por ejemplo, del tipo que se puede obtener de Dynal Biotech, Oslo, Noruega) se recubren con un anticuerpo que reacciona con un epitopo en la molécula de albúmina diferente del
10 epitopo reconocido por el anticuerpo recubierto sobre las perlas de látex.

Después de incubación durante 60 segundos, se mueve un imán de neodimio (10x7x2 mm) de su posición de reposo (20 mm de la pared más próxima de la cavidad) hacia la cavidad para poner el imán en contacto directo con la pared lateral de la cavidad. El imán hace contacto con la pared opuesta a la inclinada y cubre la parte llena de líquido de la cavidad (200 μl). La cavidad y la colocación del imán se representan esquemáticamente en la figura 20. En la posición
15 de reposo el campo magnético que trabaja en las perlas magnéticas es demasiado débil para mover las perlas. Cuando está en contacto con la cavidad, la distancia del imán a la pared interior más próxima y más alejada de la cavidad es 0,8 mm y 6,3 mm respectivamente. A esta distancia, las perlas son recogidas cuantitativamente en la pared después de 30 segundos. En la presencia de analito, se une látex azul a las partículas magnéticas y la fracción reaccionada de las
20 perlas de látex se recogerá en la pared mientras que las partículas de látex sin reaccionar permanecerán suspendidas.

Con el imán en posición de contacto, la pipeta con punta capilar se usa para aspirar el líquido conteniendo las partículas de látex sin reaccionar. El imán se aleja entonces de la cavidad a su posición de reposo.

25 El tubo de pipeta con punta capilar es movido posteriormente a una cavidad vacía (por ejemplo, la cavidad 61) y el líquido se distribuye a esta cavidad aplicando presión superior a la ambiente al interior de la pipeta.

La pipeta con punta capilar es movida entonces a otra cavidad (por ejemplo, la cavidad 60) que contiene 500 RL de solución de lavado (PBS, pH 7,4) y se toman 200 μl . La pipeta con punta capilar es movida entonces de nueva a la cavidad conteniendo las perlas magnéticas y las perlas quedan suspendidas bombeando la solución de lavado a y de la cavidad cinco veces. Se mueve El imán a la posición de contacto y las perlas magnéticas se pueden recoger en la pared de la cavidad. Después de 30 segundos, la solución de lavado es devuelta a la pipeta con punta capilar. El imán se mueve posteriormente de nuevo a su posición de reposo.
30

35 En el paso siguiente, la pipeta con punta capilar es movida a la cavidad conteniendo el primer supernatante (cavidad 61) y bombeada a esta cavidad.

La pipeta con punta capilar es movida posteriormente a la cavidad conteniendo la solución de lavado (cavidad 60) y se toman 200 μl .
40

La pipeta con punta capilar es movida a la cavidad conteniendo las perlas magnéticas (la cavidad 62) y las perlas se suspenden bombeando la solución de lavado dentro y fuera 5 veces.

45 Una pipeta con punta de membrana equipada con una membrana microporosa de 0,45 μl es movida a la cavidad conteniendo las perlas magnéticas suspendidas (la cavidad 62) y las perlas se recogen sobre la membrana por aspiración.

La pipeta con punta de membrana se saca de la cavidad 62 y las partículas de látex azul y las perlas magnéticas amarillo-marrones son cuantificadas por reflectometría usando un LED rojo para las perlas de látex azules y un LED azul para las perlas magnéticas. La cantidad de luz roja absorbida/la cantidad de luz azul absorbida es una medida de la fracción de látex azul en la mezcla y por lo tanto una medida de la cantidad de albúmina presente en la muestra.
50

También se puede usar el mismo cartucho para determinación del contenido de creatinina de la orina y por lo tanto la relación de albúmina:creatinina en la muestra de orina. La albúmina en orina proporciona un indicador de la función del riñón y la relación de albúmina:creatinina puede ser usado para corregir la diuresis. La medición de albúmina a se describe por ejemplo en US-A-5385847.
55

En esta realización se mezcla una fracción de la muestra de orina con un reactivo de dilución y una enzima o mezcla de enzimas que reacciona con creatinina generando un analito de color que es detectado usando una cámara digital por medición de la transmisión de luz a través de una cavidad conteniendo orina, enzimas y reactivo de dilución.
60

ES 2 309 163 T3

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de ensayo incluyendo:

5 i) un cartucho de ensayo extraíble (52, 53) incluyendo al menos dos cavidades (57-62) y una pipeta (55) que se puede colocar en al menos dos de dichas cavidades, teniendo dicha pipeta un extremo próximo y un extremo distal, cerrándose dicho extremo distal por una membrana permeable a los líquidos;

10 ii) un soporte (24) dispuesto para recibir dicho cartucho;

iii) medios de accionamiento (25) operables para colocar dicha pipeta en cavidades seleccionadas de dicho cartucho;

15 iv) un aplicador de gas a presión (27) acoplable a dicha pipeta para hacer por ello que fluya líquido a través de dicha membrana; y

v) un detector de radiación (32) operable para detectar la radiación procedente de una cavidad de dicho cartucho o de dicha pipeta,

20 donde dicho cartucho incluye elementos soltables de base (53) y cubierta (52), estando dispuestas dichas cavidades en dicho elemento base y estando dispuesto dicho elemento de cubierta para sujetar dicha pipeta.

25 2. Aparato según la reivindicación 1 donde dicho cartucho incluye una pipeta con punta capilar (50) y una pipeta con punta de membrana (55).

3. Aparato como el reivindicado en alguna de las reivindicaciones 1 y 2 donde dicho cartucho incluye una pipeta (55) cuyo extremo distal está cerrado por una membrana permeable a los líquidos inclinada.

30 4. Aparato según la reivindicación 3 donde dicha membrana inclinada está en un plano en un ángulo de 20 a 40° al eje de la pipeta a que está unida.

5. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde dicho cartucho incluye una pipeta con punta de membrana cuyo extremo de punta de membrana es de sección transversal rectangular.

35 6. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde dicho elemento de cubierta incluye medios para recibir una pipeta con punta capilar.

40 7. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde al menos una de dichas cavidades está sellada en su extremo superior por una junta estanca rompible y donde dicho elemento de cubierta está provisto de un cortador dispuesto para perforar dicha junta estanca.

8. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde dicho elemento base incluye una escobilla absorbente dispuesta para limpiar el exterior de una pipeta con punta capilar insertada en él.

45 9. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde dicho cartucho incluye una pipeta con punta de membrana cuyo extremo próximo está cerrado por una membrana autosellable perforable.

50 10. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde las cavidades en dicho cartucho están dispuestas en una serie lineal.

11. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde dicho detector de radiación incluye una cámara digital.

55 12. Aparato según la reivindicación 11 donde la pared de base de al menos una de las cavidades en dicho cartucho es plana y no perpendicular a las paredes laterales contiguas de la cavidad.

13. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 incluyendo además una fuente de luz dispuesta para iluminar dicho cartucho.

60 14. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 incluyendo además un imán.

15. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 incluyendo además un calentador dispuesto para calentar dicho cartucho.

65 16. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 incluyendo además un controlador dispuesto para controlar la realización del ensayo por dicho aparato.

ES 2 309 163 T3

17. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 donde dicho aplicador de gas a presión incluye un pistón dispuesto dentro de un alojamiento cilíndrico y un motor de accionamiento dispuesto para accionar dicho pistón.
- 5 18. Un cartucho de ensayo (52, 53) incluyendo al menos dos cavidades (57-62) y una pipeta (55) que se puede colocar en al menos dos de dichas cavidades, teniendo dicha pipeta un extremo próximo y un extremo distal, cerrándose dicho extremo distal por una membrana permeable a los líquidos, donde dicho cartucho incluye elementos soltables de base (53) y cubierta (52), estando dispuestas dichas cavidades en dicho elemento base y estando dispuesto dicho elemento de cubierta para sujetar dicha pipeta.
- 10 19. Un cartucho de ensayo según la reivindicación 18 donde dicho cartucho incluye una pipeta con punta capilar (50) y una pipeta con punta de membrana (55).
- 15 20. Un cartucho de ensayo como el reivindicado en alguna de las reivindicaciones 18 y 19 donde dicho cartucho incluye una pipeta (55) cuyo extremo cerrado está cerrado por una membrana permeable a los líquidos inclinada.
21. Un cartucho de ensayo según la reivindicación 20 donde dicha membrana está en un plano en un ángulo de 20 a 40° al eje de la pipeta a que está unida.
- 20 22. Un cartucho de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 donde dicho cartucho incluye una pipeta con punta de membrana cuyo extremo de punta de membrana es de sección transversal rectangular.
- 25 23. Un cartucho de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 donde dicho elemento de cubierta incluye medios para recibir una pipeta con punta capilar.
24. Un cartucho de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23 donde al menos una de dichas cavidades está sellada en su extremo superior por una junta estanca rompible y donde dicho elemento de cubierta está provisto de un cortador dispuesto para perforar dicha junta estanca.
- 30 25. Un cartucho de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24 donde dicho elemento base incluye una escobilla absorbente dispuesta para limpiar el exterior de una pipeta con punta capilar insertada en él.
- 35 26. Un cartucho de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25 donde dicho cartucho incluye una pipeta con punta de membrana cuyo extremo próximo está cerrado por una membrana autosellable perforable.
27. Un cartucho de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26 donde las cavidades en dicho cartucho están dispuestas en una serie lineal.
- 40 28. Un cartucho de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 27 donde al menos una de dichas cavidades contiene un reactivo de ensayo.
29. Un dispositivo de ensayo especialmente adaptado para usar un cartucho de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 28 e incluyendo a) un soporte de cartucho (24) capaz de recibir dicho cartucho de ensayo (23); b) medios de accionamiento (25) operables para colocar la pipeta (6) de dicho cartucho en cavidades seleccionadas de dicho cartucho; c) un aplicador de gas a presión (27) acoplable a la pipeta de dicho cartucho para hacer por ello que fluya líquido a su través; y d) un detector de radiación (32) operable para detectar radiación procedente de una cavidad de dicho cartucho o de su pipeta.
- 50 30. Un dispositivo según la reivindicación 29 donde dicho detector de radiación incluye una cámara digital.
31. Un dispositivo como el reivindicado en alguna de las reivindicaciones 29 y 30 incluyendo además una fuente de luz dispuesta para iluminar dicho cartucho.
- 55 32. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31 incluyendo además un imán.
33. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 incluyendo además un calentador dispuesto para calentar dicho cartucho.
- 60 34. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 33 incluyendo además un controlador dispuesto para controlar la realización del ensayo por dicho aparato.
35. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 34 donde dicho aplicador de gas a presión incluye un pistón dispuesto dentro de un alojamiento cilíndrico y un motor de accionamiento dispuesto para accionar dicho pistón.
- 65 36. El uso de aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para analizar un analito en una muestra biológica o una propiedad de una muestra biológica.

ES 2 309 163 T3

37. Uso según la reivindicación 36 para analizar el tiempo de coagulación en una muestra de sangre o derivada de sangre.

5 38. Uso según la reivindicación 36 para analizar un analito proteínico en una muestra de fluido corporal o derivada de fluido corporal.

10

15

20

25

30

35

40

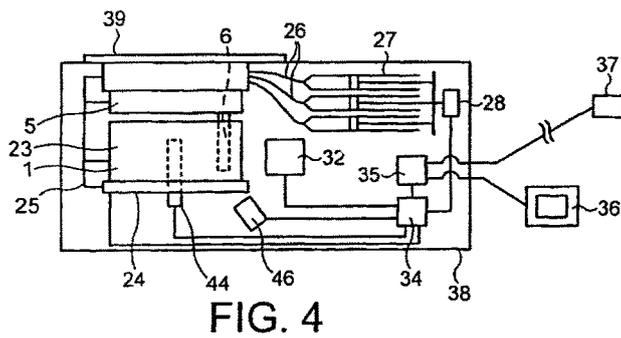
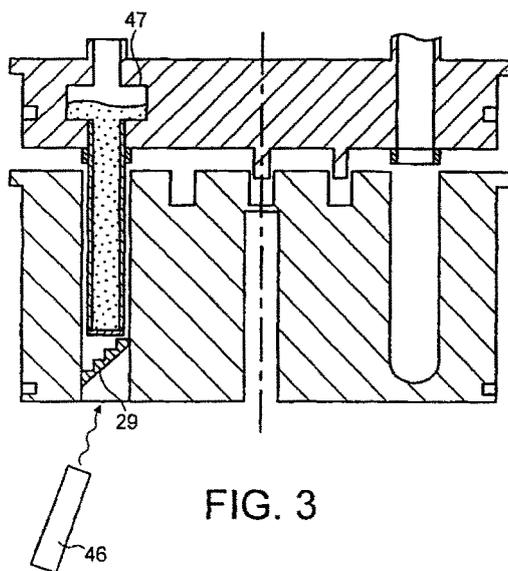
45

50

55

60

65



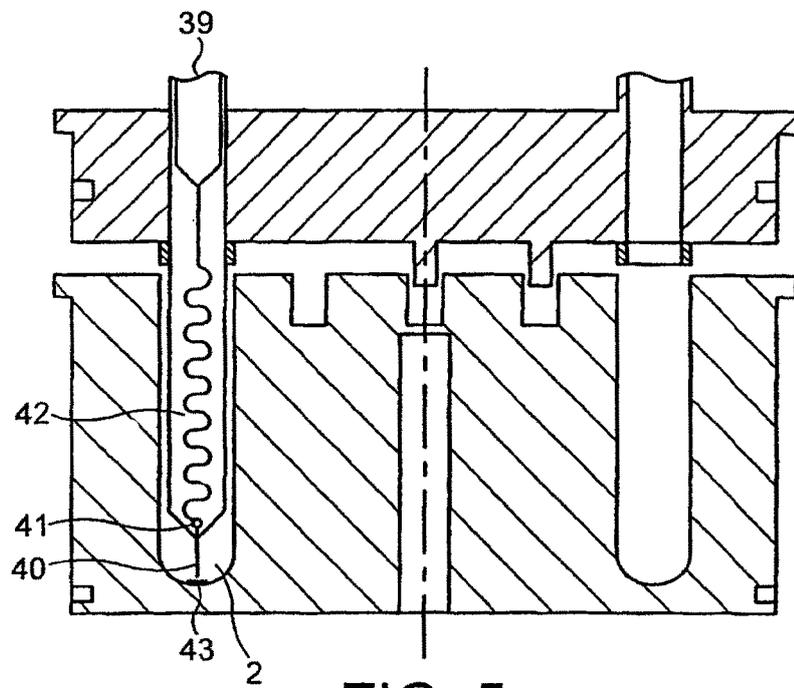


FIG. 5

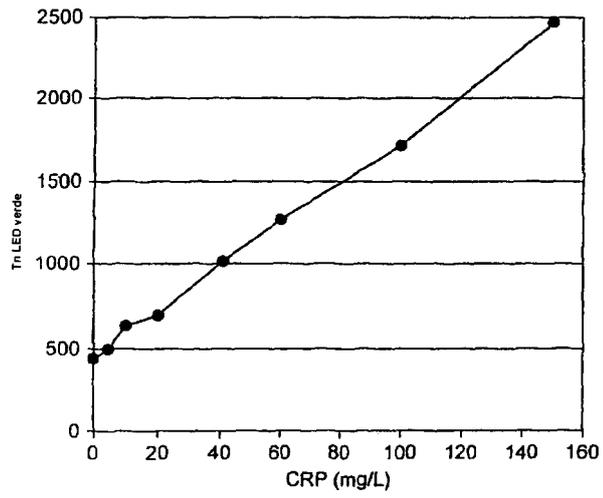


FIG. 6

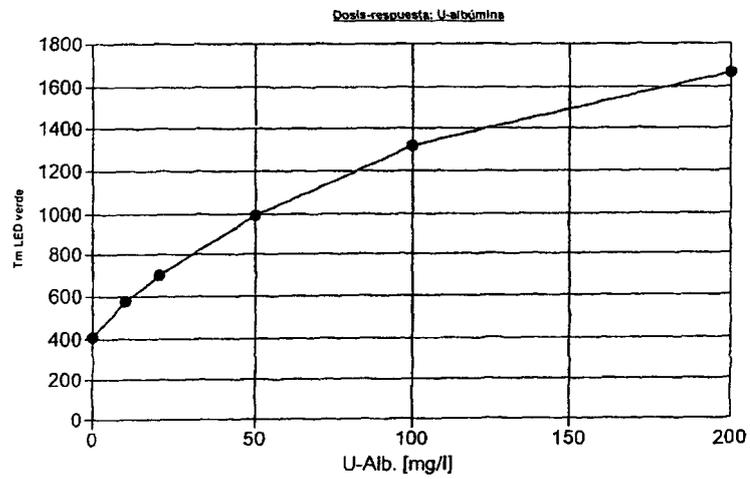


FIG. 7

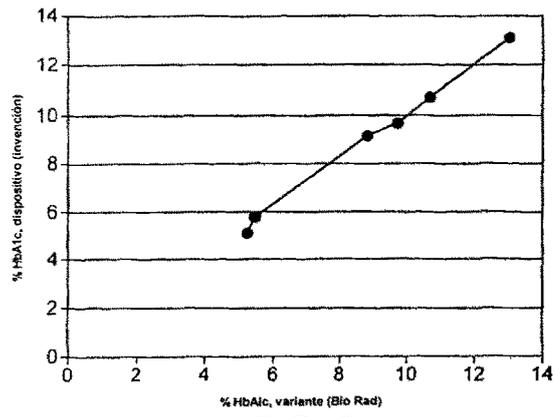


FIG. 8

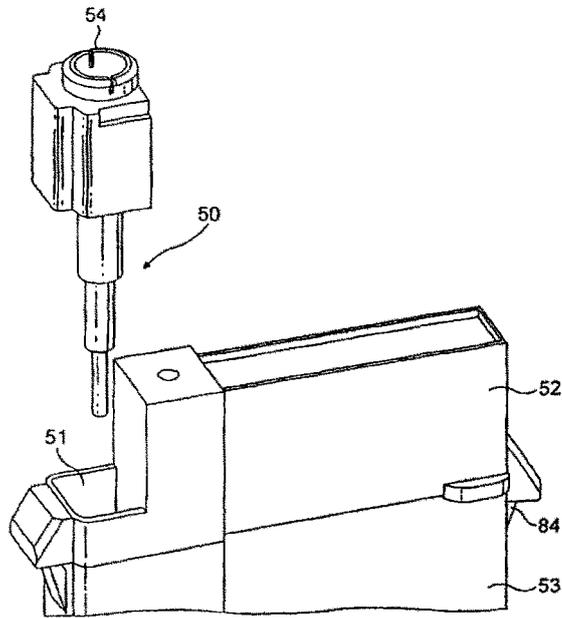


FIG. 9

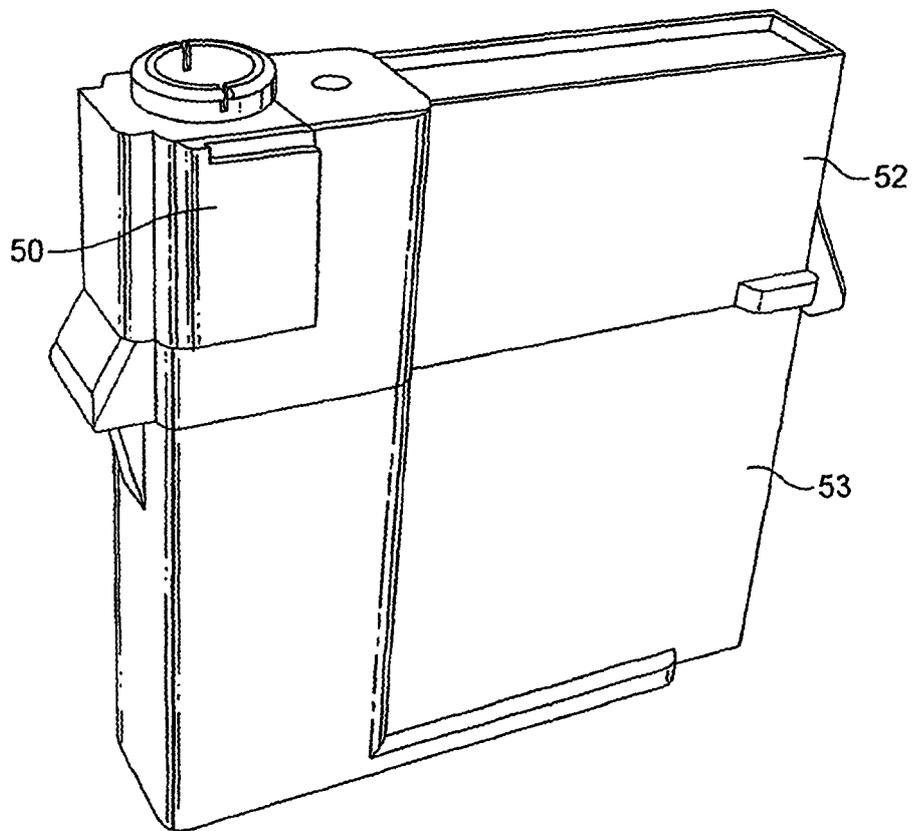


FIG. 10

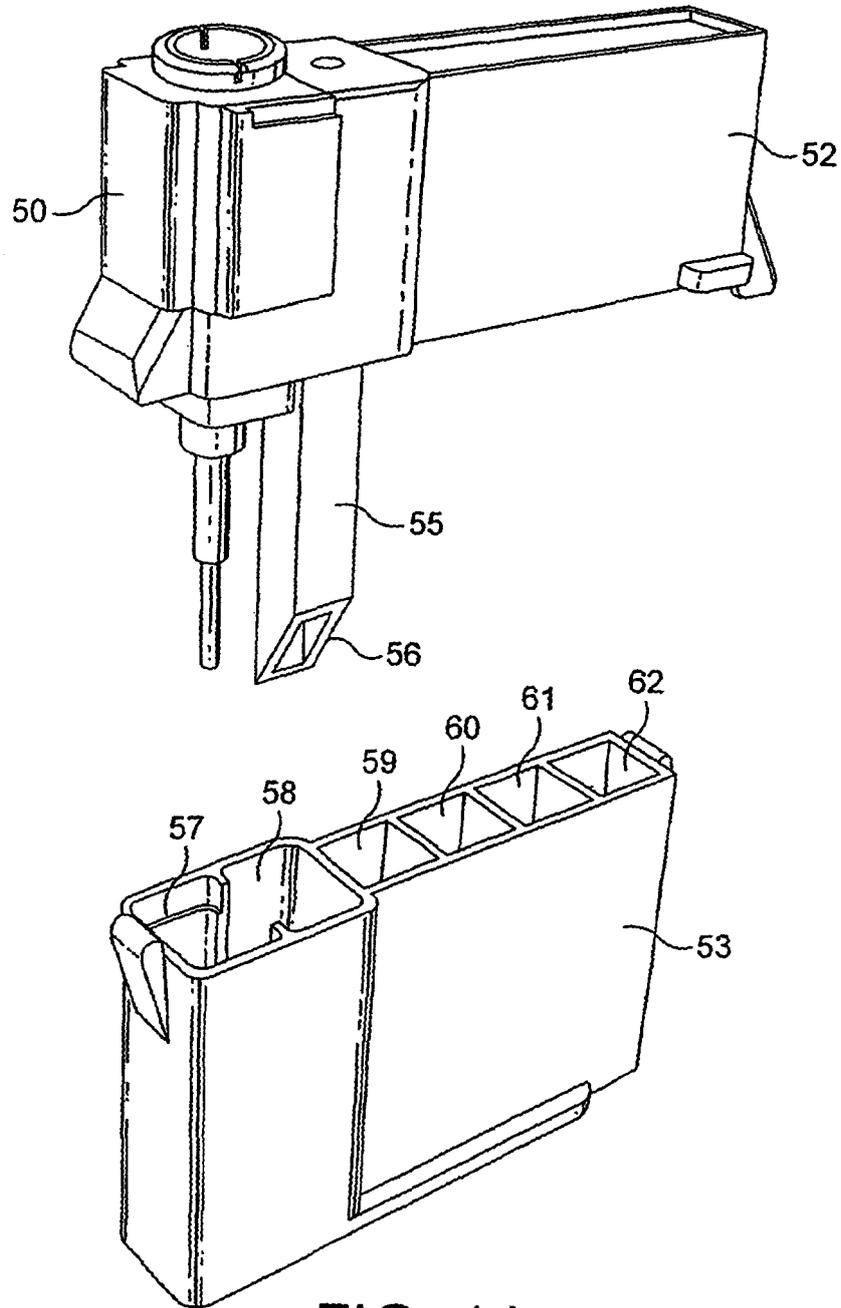


FIG. 11

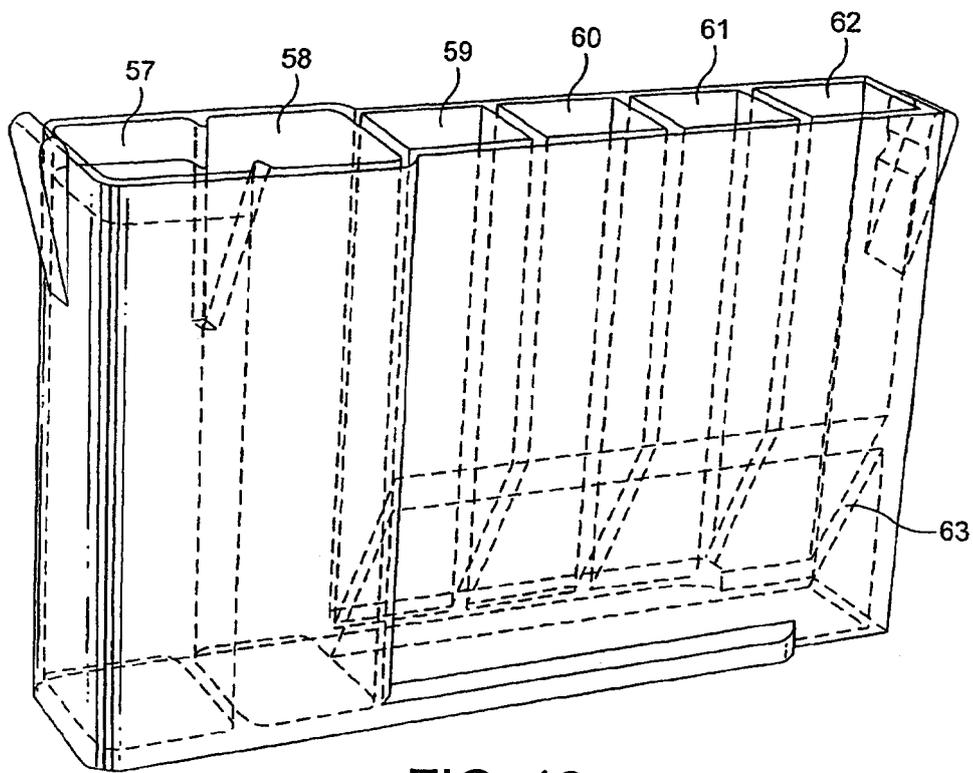


FIG. 12

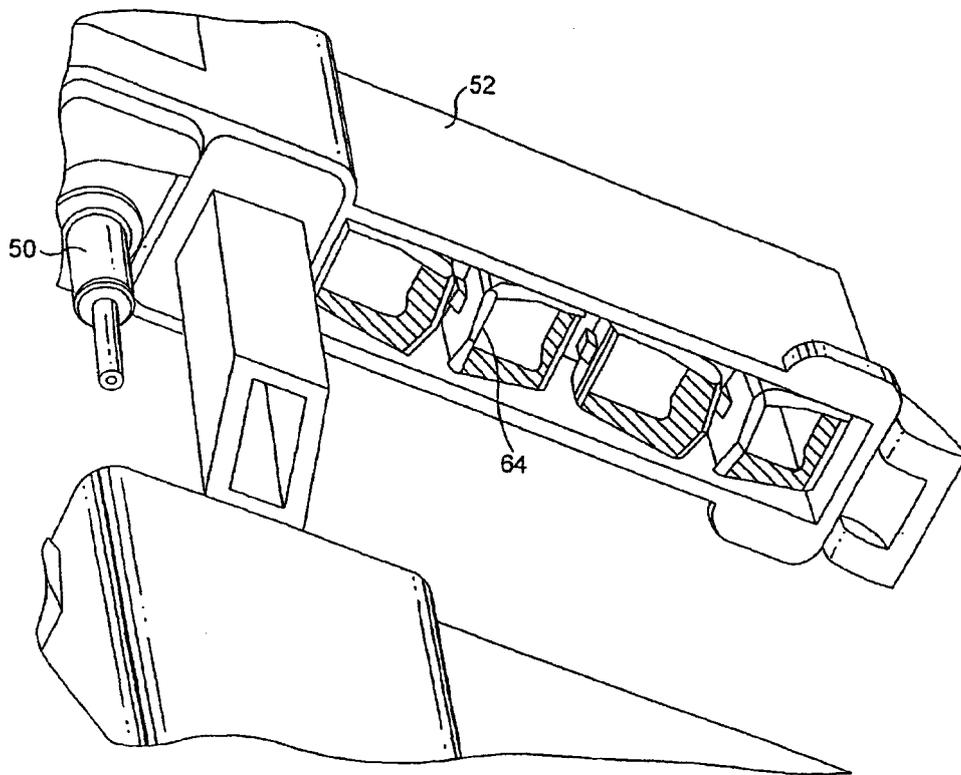


FIG. 13

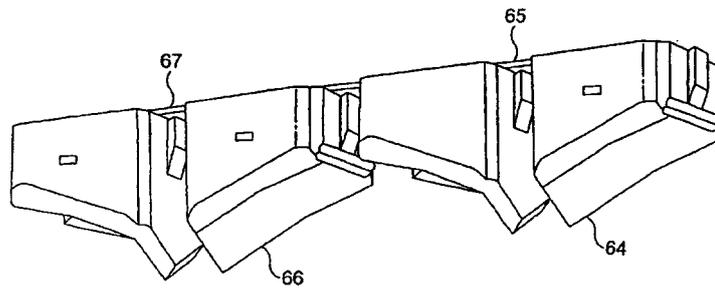


FIG. 14

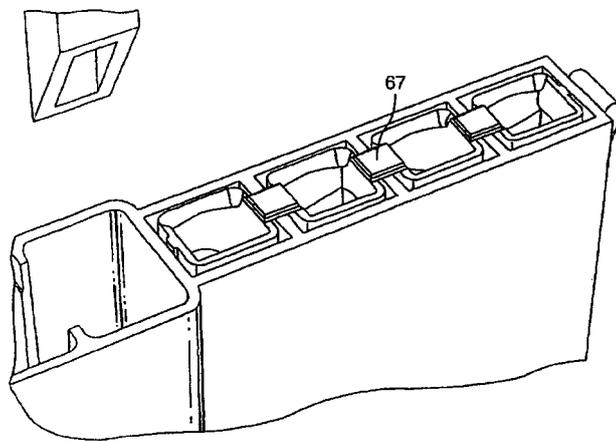


FIG. 15

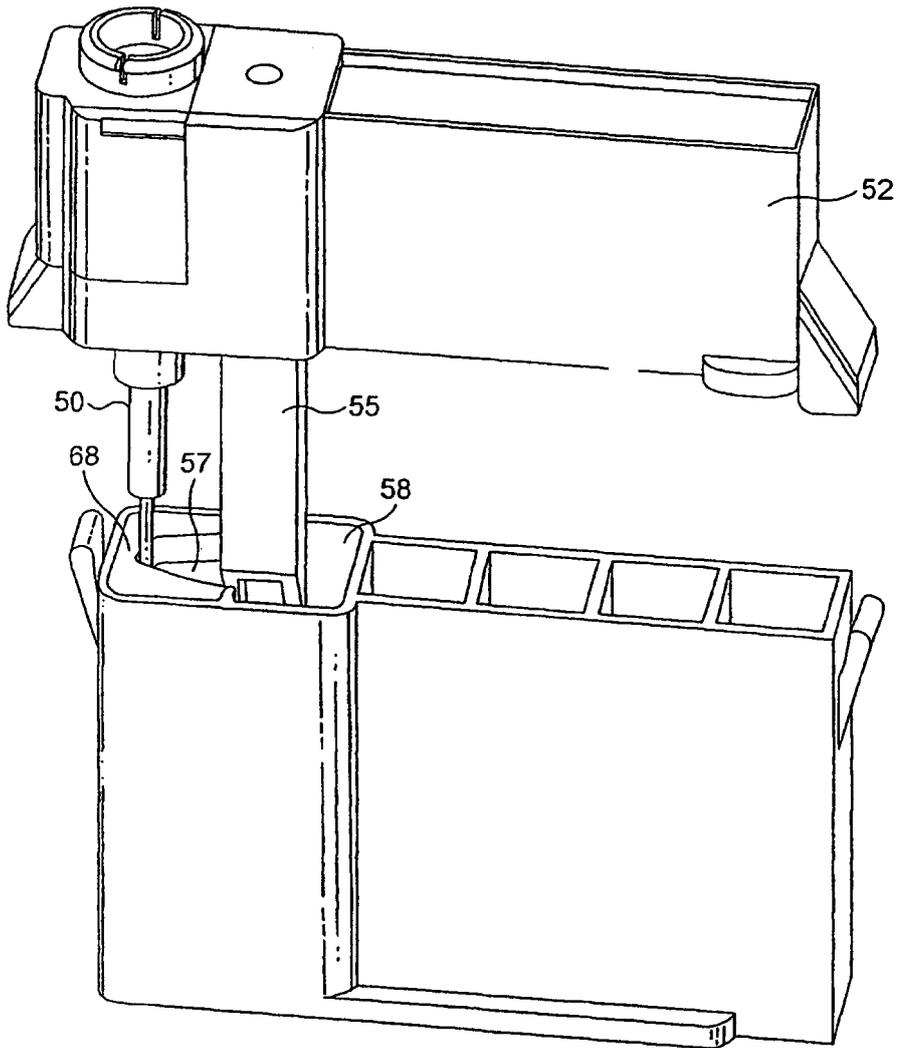


FIG. 16

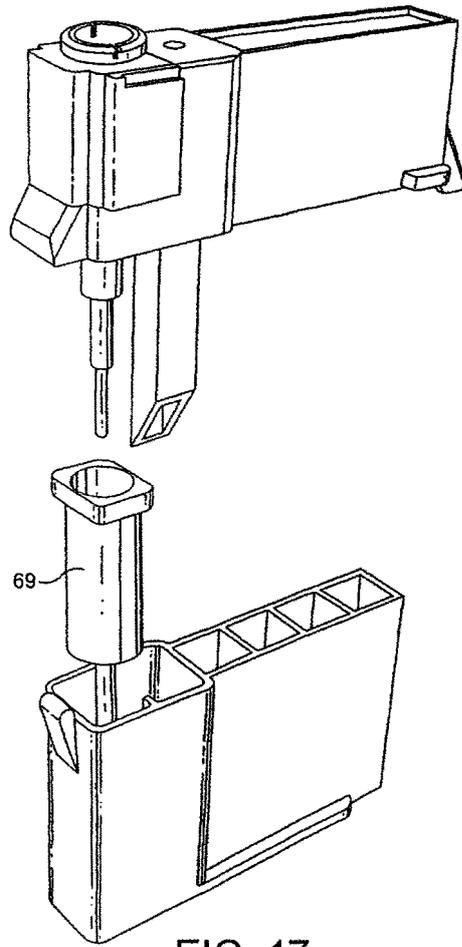


FIG. 17

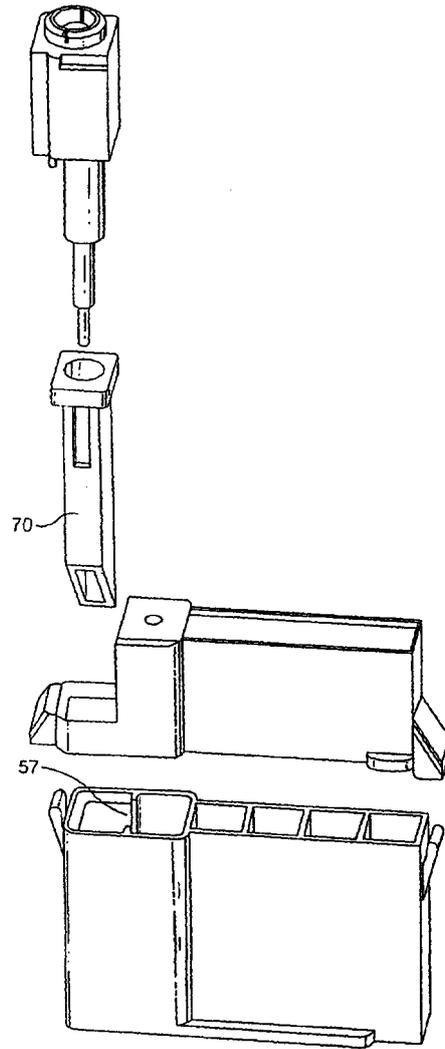


FIG. 18

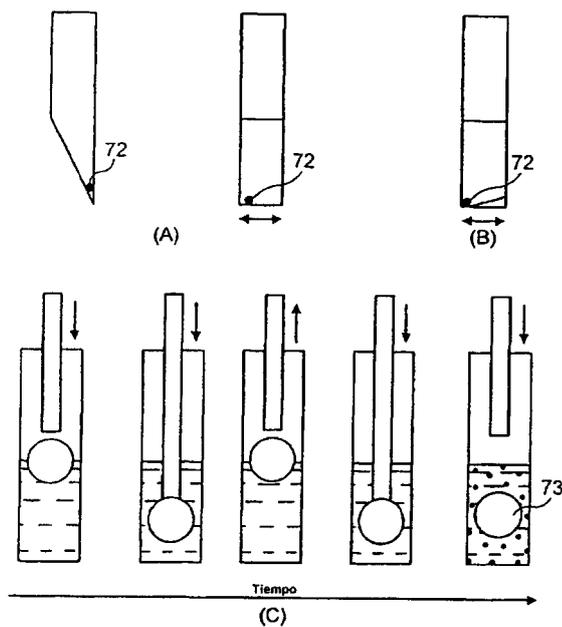


FIG. 19

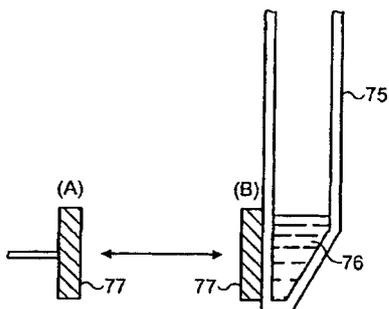


FIG. 20

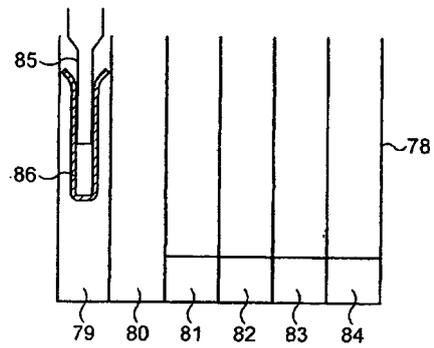


FIG. 21

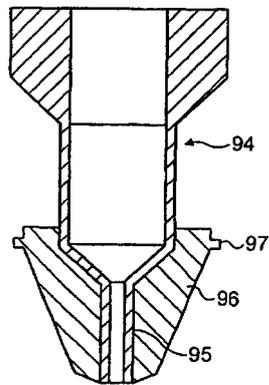


FIG. 23

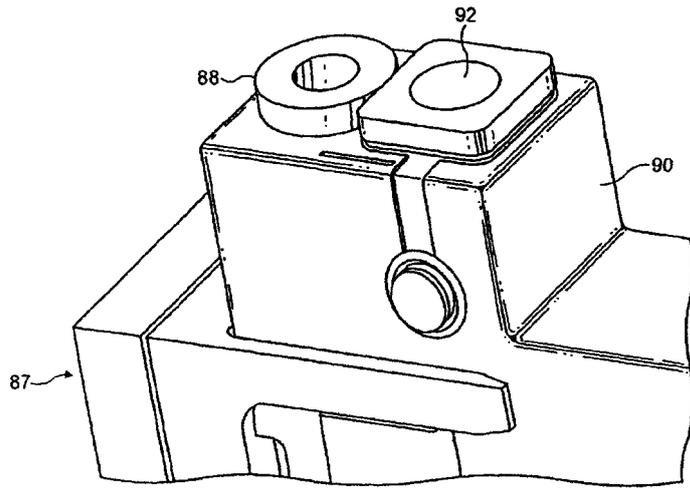


FIG. 22A

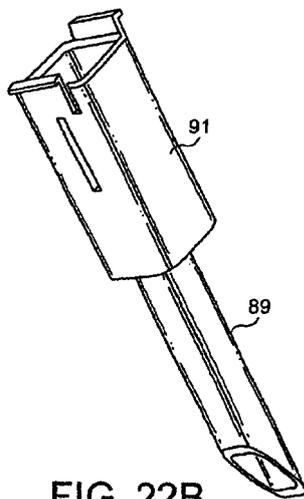


FIG. 22B

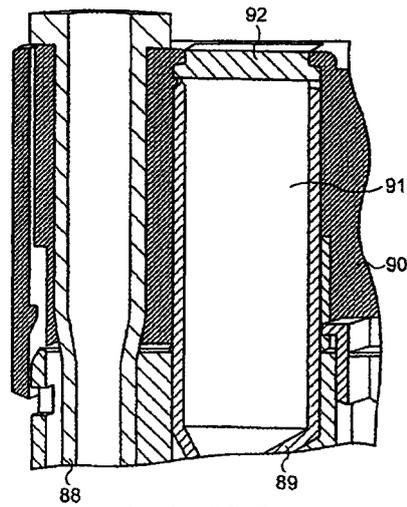


FIG. 22C

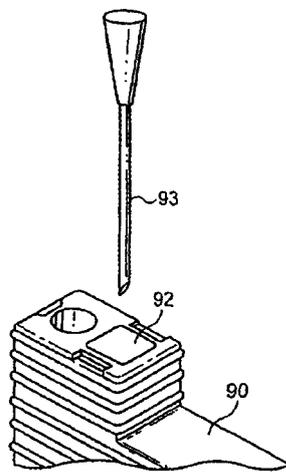


FIG. 22D