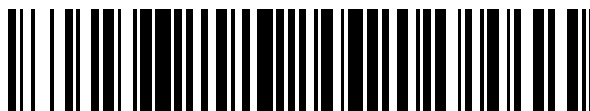


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 192**

51 Int. Cl.:

B01L 99/00 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2001 E 06011968 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 1760466**

54 Título: **Método e instrumento de medida que usan un cartucho**

30 Prioridad:

28.04.2000 JP 2000130767

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

05.09.2014

73 Titular/es:

**MITSUBISHI CHEMICAL MEDIENCE
CORPORATION (100.0%)
2-8, Shibaura 4-chome Minato-ku
Tokyo 108-8559, JP**

72 Inventor/es:

**YOKOI, HIROYUKI y
KURIHARA, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 491 192 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método e instrumento de medida que usan un cartucho

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de medida y a un instrumento de medida. Tal se puede usar para la medida automática poniendo cartuchos en un dispositivo de medida automático para determinar automáticamente un componente contenido en una muestra a modo de un método de medida automático.

10

Antecedentes técnicos

Hasta ahora, se han desarrollado varios analizadores para el análisis automático de sangre humana. Tales analizadores se diferencian mucho en los intervalos de concentración analizables para los diferentes elementos que se van a analizar (por ejemplo, desde mg/ml a pg/ml). Dependiendo de los elementos respectivos que se van a analizar, se han seleccionado diferentes métodos de análisis (principios de medida) de, por ejemplo, un método de inmunoensayo enzimático (EIA), un método de inmunoensayo en látex (LIA), un método de inmunoensayo turbidimétrico (TIA), y un método de inmunoensayo de fluorescencia (FIA), un método de inmunoensayo enzimático quimioluminiscente (CLEIA) en consideración a la concentración de las sustancia objetivo. Además, hay elementos que se van a analizar, para los que una muestra en la forma de una solución sin diluir se mide como está, y también hay elementos que se van a analizar, para los que la dilución de una muestra es necesaria antes de la medida de la muestra. Recientemente, se han llegado a desarrollar instrumentos que cubren una pluralidad de elementos que se van a analizar y un amplio intervalo de concentración por ellos mismos solos.

15

20

25

Sin embargo, en los instrumentos anteriormente mencionados que realizan procesamiento multielemento por ellos mismos solos, aunque se comparten un dispositivo de dosificar la muestra, un dispositivo de dosificar reactivos, un pocillo de reacción, etc., varios tipos de módulos que corresponden a los principios de medida están integrados en un único instrumento, haciendo de esta manera que el instrumento tenga un mecanismo muy complicado y que sea uno a gran escala. El mecanismo complicado lleva particularmente a un aumento en el número de partes operativas, lo que naturalmente produce un aumento en problemas tales como rotura. Por tanto, el mantenimiento y la inspección diarios así como el manejo de la precisión del instrumento se convierten en una gran carga. Además, diferentes principios de medida naturalmente requerirán diferentes procesos de análisis para controlar la cantidad de una muestra, el tipo de reactivo, la cantidad de un reactivo, la condición de agitación, la condición de separar un producto de reacción y un reactivo en exceso entre sí (separación B/F), el tiempo de reacción, el método de medida, etc., dependiendo de los elementos respectivos que se van a analizar. Es esencialmente imposible para un único instrumento realizar una pluralidad de diferentes procesos de análisis al mismo tiempo; en las presentes circunstancias, el progreso de procesos de análisis individual está estrictamente controlado de modo que diferentes procesos de análisis no deben interferir entre sí. Por tanto, en el caso donde muestras cuyos elementos que se van a analizar se diferencian entre si se van medir al mismo tiempo, se requiere tiempo de espera (estado de espera), lo que lleva a una disminución en la capacidad de rendimiento total, que es una causa de un aumento considerable en el tiempo requerido para la medida.

30

35

40

Además, se van a usar de dos a seis tipos de reactivos para cada elemento para el análisis, en general. Esto impone una gran carga al operador en la preparación antes de la medida.

45

En resumen, en los instrumentos convencionales, la complejidad de su mecanismo aumenta la carga de su mantenimiento y el coste de producción de los mismos, así como el tiempo requerido para la medida y el tiempo y la mano de obra para preparar los reactivos necesarios. Estos se vuelven grandes problemas particularmente, por ejemplo, en pruebas de urgencia y pruebas en el sitio de atención (POCT) que realizan médicos/enfermeras.

50

Para hacer frente a tales problemas, se ha propuesto un cartucho tipo "una prueba-un cartucho" para la medida automática que se ha cargado con todos los reactivos necesarios para la medida en la forma de soluciones, respectivamente (documento JP 11-316226 A). Sin embargo, aún no se ha propuesto ningún método para hacer frente a las diferentes diluciones, que se requerirán dependiendo de los elementos que se van a analizar.

55

Compendio de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de medida para la medida de una pluralidad de tipos de diferentes componentes que se van a medir contenidos en una muestra mediante una operación uniforme, que comprende los pasos de: proporcionar un cartucho que tiene dos o más líneas de grupos de pocillos organizadas en paralelo, o dos o más cartuchos que tiene cada uno dos o más líneas de grupos de pocillos, para medir dos o más tipos de componentes diferentes que se van a medir contenidos en una muestra, cada grupo de pocillos lineal comprende al menos un pocillo de dilución y un pocillo de reacción, en donde: cada grupo de pocillos lineal está configurado para recibir una cantidad predeterminada uniforme de la muestra en su respectivo primer de al menos un pocillo de dilución, los pocillos de dilución de cada grupo de pocillos lineal contienen una cantidad de una solución de dilución para diluir dicha cantidad predeterminada de la muestra a una

60

65

dilución deseada respectiva para ese grupo de pocillos, en donde la dilución deseada puede ser 1; cada grupo de pocillos lineal se organiza para someterse a una operación uniforme predeterminada en la que una cantidad predeterminada de la muestra diluida se aspira desde el primer pocillo de dilución, y en la que una cantidad predeterminada de la muestra diluida aspirada de un pocillo del grupo de pocillos se dosifica en el pocillo de reacción, dichos pocillos de reacción de los dos o más grupos de pocillos lineales contiene cada uno una sustancia específicamente reactiva con uno respectivo de los dos o más tipos de componentes diferentes que se van a medir contenidos en una muestra diluida que se ha sometido a dicha operación uniforme predeterminada en dicho grupo de pocillos lineal respectivo; y cada cartucho se sella con dicha cantidad de solución diluyente y sustancia específicamente reactiva cargadas en el mismo; al mismo tiempo dosificar una cantidad predeterminada de la muestra que contiene los componentes que se van a medir en cada pocillo de dilución por una operación uniforme, para diluir la muestra en cada grupo de pocillos lineal a una dilución deseada en el cartucho; al mismo tiempo aspirar una cantidad predeterminada de la muestra diluida de el al menos un pocillo de dilución de cada grupo de pocillos lineal mediante una operación uniforme; al mismo tiempo dosificar una cantidad predeterminada de muestra diluida aspirada de un pocillo de cada grupo de pocillos lineal en el pocillo de reacción de cada grupo de pocillos lineal mediante una operación uniforme, para hacer reaccionar el componente respectivo que se va a medir con cada muestra diluida con una sustancia respectiva específicamente reactiva con el mismo contenida en el pocillo de reacción; y medir la cantidad del producto de reacción respectivo en cada pocillo de reacción.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de medida según la reivindicación 3, en donde la reacción inmunológica es una reacción en la que se permite que el componente que se va a medir en la muestra y la sustancia inmunológicamente específicamente reactiva con el mismo reaccionen para formar un primer complejo inmunitario y se deja que el primer complejo inmunitario y un marcador inmunológicamente específicamente reactivo con el mismo reaccionen para formar un segundo complejo inmunitario, y en donde se mide la cantidad del marcador en el segundo complejo inmunitario formado por la reacción.

Una ventaja alcanzable con las formas de realización de la presente invención es proporcionar un cartucho para la medida automática usado para un instrumento de medida automático capaz de ser usado para medir una pluralidad de tipos de elementos que se van a analizar que requieren diferentes diluciones en una muestra sin aumentar sustancialmente un tiempo de medida incluso cuando estos elementos se miden al mismo tiempo en un instrumento que tiene solo mecanismos simplificados tanto como sea posible, y un método de medida que usa este cartucho.

Los inventores de la presente invención han encontrado que proporcionando un cartucho con un pocillo de dilución para diluir una muestra, y diluir una cantidad predeterminada de la muestra a una dilución deseada en el pocillo de dilución, los mecanismos del instrumento de medida automático se pueden simplificar, y se previene sustancialmente que el tiempo requerido para la medida aumente incluso cuando se miden al mismo tiempo una pluralidad de tipos de elementos que van a analizar.

Breve descripción de las figuras

Para permitir un mejor entendimiento de la presente invención, y para mostrar cómo la misma se puede llevar a efecto, ahora se hará referencia, a modo de ejemplo solo, a los dibujos acompañantes, en los que:

La figura 1 es un diagrama de un cartucho según el ejemplo 1. Los símbolos en la figura son como sigue. 1 indica un pocillo de dosificación de la muestra; 2, un pocillo de dilución 1; 3, un pocillo de dilución 2; 4, un pocillo que contiene partículas magnéticas (pocillo de reacción 1); 5, un pocillo de lavado 1; 6, un pocillo que contiene un anticuerpo marcado (pocillo de reacción 2); 7, un pocillo de lavado 2; y 8, un pocillo fotométrico.

La figura 2 es un diagrama de un cartucho según el ejemplo 2 e ilustración de las condiciones de operación para el mismo. La operación de carga de reactivos se describe encima del cartucho, y la operación de dilución de una muestra y reacción se describe debajo del cartucho. Los símbolos en la figura son como sigue. DS1 indica un pocillo que contiene solución de dilución 1; DS2, un pocillo que contiene solución de dilución 2; WS, un pocillo que contiene solución de lavado; MP, un pocillo que contienen partículas magnéticas; LA, un pocillo que contienen anticuerpo marcado; AMPPD, un pocillo que contiene AMPPD; SD, un pocillo dosificador de muestra; D1, un pocillo de dilución 1; D2, un pocillo de dilución 2; D3, un pocillo de dilución 3; W1, un pocillo de lavado 1; W2, un pocillo de lavado 2; LM, un pocillo fotométrico; y M. P., partículas magnéticas.

Descripción detallada

Los términos usados en el presente documento tienen los siguientes significados a menos que se indique de otra manera específicamente.

El cartucho descrito en el presente documento se usa cuando un componente que se va a medir contenido en una muestra se mide, y habitualmente se usa de modo que esté colocado en un instrumento de medida automático.

La medida anteriormente mencionada se puede realizar mediante el método de medida de las reivindicaciones 1 a 4.

El componente que se va a medir no está particularmente limitado y cualquier componente se puede usar siempre que exista una sustancia que reaccione específicamente con el componente. Los ejemplos de combinación de un componente que se va a medir y una sustancia que reacciona específicamente con el mismo incluyen un antígeno y un anticuerpo, un anticuerpo y un antígeno, una enzima y un sustrato, una cadena de azúcar y una lectina, etc.

Por tanto, en la presente invención, la expresión “reacciona específicamente o que reacciona específicamente” significa unión bioquímica específica. El componente que se va a medir o la sustancia que reacciona específicamente con el mismo puede ser una sustancia cuya naturaleza química cambiará entre antes y después de la unión, tal como sustratos.

La muestra puede ser cualquier muestra siempre que contenga un componente que se va a medir o tenga una posibilidad de contenerlo. Los ejemplos de las mismas incluyen sangre, suero, plasma y orina.

Se pueden seleccionar apropiadamente las condiciones de, por ejemplo, el paso de hacer reaccionar el componente que se va a medir y la sustancia que reacciona específicamente con el mismo, y el paso de medir la cantidad del producto de reacción, etc., dependiendo de la combinación del componente que se va a medir y la sustancia que reacciona específicamente con el mismo. Por ejemplo, la reacción entre una enzima y un sustrato y la medida de la cantidad de un producto de reacción se puede realizar mezclando la enzima con el sustrato para dejar que la enzima actúe sobre el sustrato y midiendo la cantidad del producto de reacción (producto de descomposición del sustrato). La reacción entre un anticuerpo y un antígeno y la medida de la cantidad de un producto de reacción se puede realizar mezclando el anticuerpo o antígeno con un soporte de fase sólida que tiene unido al mismo un antígeno o anticuerpo correspondiente y un marcador para formar un producto de reacción (complejo inmunitario), lavando el producto de reacción para eliminar el anticuerpo o antígeno no usado y el marcador no usado del complejo inmunitario (separación B/F), y midiendo la cantidad del marcador unido a la fase sólida mediante la formación del complejo inmunitario. Por tanto, en la presente invención, la expresión “medir la cantidad de un producto de reacción” abarca no solo medir directamente la cantidad de un producto de reacción mismo sino también medir la cantidad de una sustancia cuantitativamente relacionada con la cantidad del producto de reacción. A partir de la cantidad del producto de reacción así medida, se puede calcular la cantidad del componente que se va a medir en la muestra.

El cartucho descrito en el presente documento se caracteriza en que comprende al menos un pocillo de dilución para diluir una cantidad predeterminada de una muestra a una dilución deseada y un pocillo de reacción para hacer reaccionar un componente que se va a medir en la muestra con una sustancia que específicamente reacciona con el componente.

Como se ha mencionado anteriormente, la dilución de una muestra puede ser diferente dependiendo del componente que se va a medir (elemento que se va a analizar). Sin embargo, cuando se usa el cartucho descrito en el presente documento, solo se necesita dosificar una cantidad predeterminada de una muestra en una operación de medida independientemente de cual pueda ser el elemento que se va a analizar, puesto que el cartucho está provisto con un pocillo de dilución para diluir una cantidad predeterminada de la muestra a una dilución deseada. Esto reduce los esfuerzos por el operador requeridos para confirmar la cantidad dosificada. Además, esto reduce considerablemente la posibilidad de fallo de la medida debido a un error en la cantidad dosificada. En un instrumento de medida automático que usa el cartucho descrito en el presente documento incorporándolo en el mismo, el mecanismo de cambiar la cantidad dosificada de una muestra dependiendo del elemento que se va a analizar ya no es necesario, de modo que los mecanismos se pueden simplificar. En lo siguiente, es aparente que donde no se carga solución de dilución en el pocillo de dilución, la solución madre se deja como está (es decir, la dilución es 1). Por tanto, la expresión “dilución” en el presente documento se usa en un sentido para que abarque dejar la solución como está. En el caso donde se realiza la dilución de una muestra a alta dilución, se prefiere que se proporcionen dos o más pocillos de dilución en el cartucho y se realicen diluciones en dos fases o más.

Como se ha indicado anteriormente, el cartucho descrito en el presente documento incluye uno que puede manejar diferentes condiciones para analizar mediante una operación uniforme y además uno que está provisto con dos o más líneas de grupos de pocillos requeridos para la medida de componentes que se van a medir organizados en paralelo. Alternativamente, la medida de una pluralidad de tipos de componentes diferentes que se van a medir se puede realizar al mismo tiempo usando una pluralidad de cartuchos. Por tanto, cuando se usa el cartucho descrito en el presente documento, ni el tiempo requerido para la medida aumentará considerablemente incluso en el caso de medida de una pluralidad de tipos de diferentes componentes que se van a medir, ni los mecanismos del instrumento de medida automático que se va a usar cambiarán.

La dilución de una muestra y una solución de dilución que se va a cargar en el pocillo de dilución se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo de, por ejemplo, los tipos de muestra, componentes que se van a medir, y sustancias que específicamente reaccionan con los componentes que se van a medir. La solución de dilución puede contener un reactivo necesario para el pretratamiento de la muestra. Si lo tiene, la dilución y el pretratamiento se realizan al mismo tiempo en el pocillo de dilución.

El cartucho puede tener un pocillo que contienen reactivo para contener un reactivo necesario para la medida del componente que se va a medir contenido en la muestra. El pocillo que contiene reactivo también puede servir como un pocillo de reacción. En otras palabras, una parte del reactivo que participa en la reacción puede estar contenido en el pocillo de reacción. El reactivo que se va a contener en el pocillo que contiene reactivo o el pocillo de reacción puede incluir una especie o una pluralidad de especies siempre que los reactivos contenidos no reaccionen entre sí. El reactivo que se va a contener puede ser líquido (por ejemplo, solución o suspensión), o sólido siempre que se pueda disolver o resuspender en la solución que se va a inyectar en el pocillo.

Se prefiere que el cartucho tenga además un pocillo dosificador de muestra para dosificar una muestra. Con esta construcción, se puede añadir una cantidad predeterminada de la muestra mediante un proceso uniforme al pocillo de dilución desde el pocillo dosificador de la muestra al que se ha dosificado la muestra. Además, cuando se dosifica una muestra al cartucho desde un envase en el que se ha recogido la muestra, el control estricto de la cantidad de la muestra se vuelve innecesario y la operación por el operador se hace fácil. Además, en el instrumento de medida automático en el que se coloca el cartucho, es innecesario proporcionar un mecanismo adicional tal como un mecanismo de cuantificar y dosificar directamente la muestra desde un envase de muestra maestra fuera del cartucho para dosificar una cantidad predeterminada de la muestra, de modo que los mecanismos se pueden simplificar.

El cartucho también tiene un pocillo de medida para medir la cantidad de un producto de reacción. Por ejemplo, se puede proporcionar un pocillo fotométrico para la medida óptica. Aquí, en el caso donde se desea una condición de medida especial, por ejemplo, el caso donde la medida se debe realizar en condiciones de oscuridad, el pocillo de medida se puede proporcionar en una forma separable.

La forma y el tamaño del cartucho no están particularmente limitados. Sin embargo, para el fácil manejo por el operador, el cartucho está preferiblemente en, por ejemplo, una forma de barco en el que un pocillo que contiene el reactivo, un pocillo dosificador de la muestra, un pocillo de dilución, un pocillo de reacción y/o un pocillo de medida se organiza(n) linealmente. Se puede usar una pluralidad de pocillos para cada tipo de pocillo. Además, para la medida de una pluralidad de tipos de elementos que se van a analizar, se puede usar el cartucho que tiene dos o más líneas de grupos de pocillos necesarios organizados en paralelo como se ha descrito anteriormente. El material del cartucho no está particularmente limitado pero se prefiere un material transparente puesto que la medida óptica es posible a través de la pared del cartucho.

En el cartucho descrito en el presente documento, la reacción entre el componente que se va a medir y la sustancia que específicamente reacciona con el mismo es preferiblemente una reacción inmunológica. Es decir, se prefiere que el componente que se va a medir y la sustancia que específicamente reacciona con el mismo sean un anticuerpo y un antígeno.

La reacción inmunológica es preferiblemente una en que un componente que se va a medir en una muestra se hace reaccionar con una sustancia que específicamente reacciona con el mismo para formar un primer complejo inmunitario y después el primer complejo inmunitario se hace reaccionar con un marcador que reacciona específicamente inmunológicamente con el mismo para formar un segundo complejo inmunitario. En este caso, el cartucho preferiblemente tiene un pocillo de reacción para formar el primer complejo inmunitario y un pocillo de reacción para formar el segundo complejo inmunitario. Más preferiblemente, el cartucho tiene pocillos de lavado para la separación B/F correspondiente a los pocillos de reacción respectivos. Los pocillos de lavado se pueden llenar con una solución de lavado de antemano o llenar dosificando de, por ejemplo, otro cartucho o botella.

El reactivo y/o la solución necesarios para la medida del componente que se va a medir contenido en una muestra se puede cargar en otro cartucho de antemano y el cartucho se puede usar en combinación con el cartucho descrito en el presente documento en realizar la medida. La medida se puede realizar, por ejemplo, cargando una solución de dilución de una muestra, una sustancia y un marcador que específicamente reaccionan con el componente que se va a medir en la muestra, y una solución de lavado, etc., para lavar el complejo inmunitario resultante en otro cartucho de antemano, y dosificando el reactivo y/o la solución al cartucho mediante una operación uniforme. Mediante tal método, el mecanismo del instrumento se puede simplificar y la estructura del cartucho descrito en el presente documento se puede simplificar y reducir de tamaño. Además, se vuelve fácil resolver el problema de la estabilidad de almacenamiento del reactivo y/o la solución que se va a usar. Por supuesto, es posible cargar los reactivos y/o las soluciones necesarios para la medida tanto en el cartucho aquí descrito como en el otro cartucho y usarlos en combinación.

Todos los reactivos y/o soluciones necesarios para la medida del componente que se va a medir contenido en la muestra se pueden cargar en el cartucho. Se prefiere cargar de antemano en el cartucho todos los reactivos necesarios, por ejemplo, una solución de dilución de una muestra, una sustancia y un marcador que reaccionan específicamente con el componente que se va a medir en la muestra, y una solución de lavado, etc., para lavar el complejo inmunitario resultante. Al hacer esto, el uso de un cartucho para un componente que se va a medir permite manejar todos los casos, de modo que pueden cortar los desperdicios de reactivos. El suministro de agua o la descarga de agua se hacen innecesarios, lo que produce simplificación adicional del instrumento de medida y la reducción del tiempo requerido para la medida.

5 El cartucho, cuando se carga con, por ejemplo, reactivos y/o soluciones, y similares tal como una solución de dilución, un marcador, una solución de lavado, y similares, de antemano, preferiblemente se sella con una hoja laminada de aluminio, una película plástica o similar en su parte superior para prevenir contaminación de materia exógena y evaporación/deterioro de los reactivos. Los sellos de hoja laminada de aluminio son particularmente preferidos ya que se pueden abrir fácilmente automáticamente por un mecanismo de perforación en el instrumento de medida automático. En el caso donde el/los reactivo(s) y/o la(s) solución(es) y similares se cargan en otro cartucho y la medida se realiza usando el cartucho en combinación, se prefiere que el cartucho también se selle.

10 En el cartucho descrito en el presente documento, se puede adjuntar un código de barras que codifica información sobre la muestra, información sobre los elementos que se van a analizar, información sobre el manejo del reactivo, etc., imprimiendo, aplicando o similar. Adjuntar tal código de barras en el cartucho hace posible lo siguiente: cuando se usa un instrumento de medida automático que reconoce el código de barras en el cartucho y automáticamente selecciona un elemento para analizar, el operador puede medir cualquier elemento o elementos que se va(n) a analizar fácil y eficazmente usando un único instrumento de medida automático simplemente seleccionando un cartucho o cartuchos apropiado(s). Esto también elimina la necesidad de realizar operación de hoja de cálculo que ha sido una causa principal para el ajuste erróneo de elementos que se van a analizar y se ha realizado en los instrumentos de medida automáticos comunes convencionales y permite realizar la medida de una pluralidad de tipos de elementos que se van a analizar sin falta y con facilidad. Además, el almacenamiento y manejo de los reactivos se hace fácil.

25 En el método de medida expuesto en el presente documento, en el caso donde la muestra contiene una pluralidad de tipos de componentes que se van a medir, se prefiere medir al mismo tiempo la pluralidad de tipos diferentes de componentes que se van a medir usando una pluralidad de cartuchos o un cartucho en el que dos o más líneas de grupos de pocillos están organizadas en paralelo. En tal caso, se prefiere que se haga uso de un instrumento de medida automático que sea capaz de medir al mismo tiempo una pluralidad de elementos que se van a analizar en paralelo y en el que se pueden colocar una pluralidad de los cartuchos descritos en el presente documento, o un instrumento de medida automático en el que se puede colocar el cartucho que tiene pocillos correspondientes a una pluralidad de elementos que se van a analizar (dos o más líneas de grupos de pocillos que se organizan en paralelo).

35 En el instrumento automático en el que se coloca(n) el cartucho o cartuchos cuando está en uso, se pueden usar medios conocidos, respectivamente, para medios para aspirar una cantidad predeterminada de líquido de un pocillo y dosificarlo a otro pocillo, medios para mezclar el contenido en el pocillo, medios para realizar separación B/F, medios para medir la cantidad de un producto de reacción o de un marcador, medios para calcular la cantidad del componente que se va a medir del resultado de la medida de la cantidad del producto de reacción o del marcador, medios para controlar la temperatura de un cartucho, medios para reconocer un código de barras, medios para realizar al mismo tiempo la medida de una pluralidad de cartuchos, etcétera.

40 De aquí en adelante la presente invención se ilustrará con referencia a un ejemplo de inmunoensayo, más particularmente inmunoensayo enzimático quimioluminiscente (CLEIA), según un ejemplo de un aspecto preferido.

45 Una forma de realización de un cartucho es un cartucho para la medida automática que se va a usar de modo que se coloque en un instrumento de medida automático que cuantifica automáticamente un componente que se va a medir en una muestra. Este cartucho tiene un pocillo de reacción para hacer reaccionar el componente que se va a medir con la sustancia que inmunológicamente reacciona específicamente con el mismo, una pluralidad de pocillos que contienen reactivos para cargar reactivos, respectivamente, que se van a usar en la reacción, un pocillo dosificador de muestra para dosificar una muestra, un pocillo de dilución para diluir la muestra, un pocillo de lavado para realizar separación B/F, y/o un pocillo fotométrico. Como se ha descrito anteriormente, el pocillo que contiene reactivos también puede servir como un pocillo de reacción. Preferiblemente estos pocillos se usan como sigue. El pocillo de dilución se carga con una solución de dilución en una cantidad suficiente para diluir una cantidad predeterminada de la muestra a una dilución deseada. Una pluralidad de pocillos que contienen reactivos se cargan individualmente con un soporte de fase sólida para llevar a cabo reacción inmunológicamente específica, un antígeno o anticuerpo marcado, un reactivo para realizar la medida de la cantidad de marcador, etc. El pocillo de lavado se carga con una solución de lavado para lavar los complejos inmunitarios.

60 En el pocillo que contiene reactivos del cartucho, por ejemplo, se coloca un soporte sólido (fase sólida sensibilizada) que tiene unido al mismo un antígeno o anticuerpo, de modo que el pocillo también puede servir como pocillo de reacción. El soporte de fase sólida puede incluir bolas de poliestireno, partículas magnéticas y similares, que se han usado convencionalmente en inmunoensayos. Además, también es posible que no se añada soporte de fase sólida al pocillo pero se usa un antígeno o anticuerpo de modo que se inmovilice en la pared interna del pocillo.

65 El inmunoensayo que se va a usar en el presente aspecto es preferiblemente un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente (CLEIA) que es ventajoso respecto a la sensibilidad. El soporte de fase sólida preferiblemente comprende partículas magnéticas cuya separación B/F se puede realizar fácilmente por medio de un imán. La separación B/F se puede realizar mediante la aplicación de un campo magnético al cartucho desde fuera del mismo

mediante el uso de un imán permanente, un electroimán o similares. Además, como se divulga en el documento JP 11-262678 A, la aplicación de un campo magnético se puede realizar utilizando un imán proporcionado en los lados de aspiración y dosificación de la punta de la pipeta, etc., del dosificador.

5 Los otros pocillos que contienen reactivos también pueden servir como un pocillo de reacción añadiendo a los mismos un antígeno o anticuerpo marcado. Por ejemplo, los ejemplos del marcador incluyen enzimas, radioisótopos, sustancias colorantes, sustancias fluorescentes, y sustancias luminiscentes, varias partículas coloreadas. En los
10 inmunoensayos enzimáticos quimioluminiscentes (CLEIA), preferiblemente se usan enzimas. Los ejemplos de tal enzima marcadora incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa, galactosidasa, y glucooxidasa. Como sustratos para las enzimas marcadoras, se usan adecuadamente esos sustratos que corresponden a las respectivas enzimas. Por ejemplo, se puede usar adamantil metoxifenil fosforil dioxetano (AMPPD) para fosfatasa alcalina, se puede usar luminol/peroxidasa para peroxidasa, y se puede usar adamantil metoxifenil-β-D-galactosildioxetano (AMPGD) para galactosidasa.

15 Cuando se usa un pocillo de dilución, se prefiere que el pocillo de dilución se cargue de antemano con una cantidad predeterminada de solución de dilución para cada elemento para analizar. Por ejemplo, en el caso donde dos elementos diferentes se van a analizar, es decir, anticuerpo del virus de la hepatitis C (VHC) y antígeno HBs (HBsAg) se van a medir, colocando idénticamente la cantidad de una muestra, la cantidad de solución de reactivo del soporte de fase sólida, la cantidad de solución de reactivo de antígeno o anticuerpo marcado, la cantidad de
20 solución de lavado, y condiciones de medida para marcadores, etc., para ambos de los dos elementos y usando un cartucho con las cantidades de la solución de dilución cargadas en los pocillos de dilución que son diferentes para los dos elementos en un instrumento de medida automático provisto con dos o más mecanismos para realizar una serie de procesos de reacciones inmunitarias en paralelo permite el procesamiento al mismo tiempo de ambos de los dos elementos mediante el mismo paso de análisis.

25 En el caso donde se va a realizar una alta dilución de una muestra, se prefiere que se proporcionen dos o más pocillos de dilución en el cartucho de modo que se realicen dos o más fases de dilución. La figura 1 ilustra un ejemplo de tal cartucho. Es decir, en el caso del anticuerpo del VHC, puesto que existen cantidades relativamente grandes de los componentes que se van a analizar en una muestra por tanto es necesario medir la muestra después
30 de diluirla preliminarmente, se usa un cartucho para un anticuerpo del VHC con un pocillo de dilución 1 (2) en el que se cargan 500 µl de solución de dilución de antemano y un pocillo de dilución 2 (3) en el que se cargan 335 µl de la solución de dilución de antemano. La muestra en una cantidad de 70 µl se aspira de un pocillo dosificador de muestra (1) y el total de 70 µl de ella se dosifica en un pocillo de dilución 1 (2) por medio de mecanismos de aspiración/dosificación de líquidos del instrumento de medida automático y se mezcla con 500 µl de la solución de dilución, dando una dilución de aproximadamente 8,1 veces ($570/70 = 8,14$) en esta primera fase de dilución. A
35 continuación, 65 µl de la muestra diluida en la primera fase se aspiran del pocillo de dilución 1 (2) y la cantidad entera de ella se dosifica en el pocillo de dilución 2 (3) y se mezcla con 335 µl de la solución de dilución. En esta segunda fase de la dilución, la muestra se diluye finalmente aproximadamente 50 veces ($570/70 \times 400/65 = 50,1$). Por último, 60 µl de la muestra diluida en la segunda fase se aspiran del pocillo de dilución 2 (3), y 60 µl de la muestra finalmente diluida 50 veces se dosifican en un pocillo de reacción (4). Por otra parte, HBsAg es un elemento para analizar que requiere alta sensibilidad, la muestra se usa como está en forma de solución madre sin dilución. Usando un cartucho para HBsAg en el que no se carga nada tanto en el pocillo de dilución 1 (2) como el pocillo de dilución 2 (3), se aspiran 70 µl de cada una de la muestra de la misma manera que el anteriormente mencionado anticuerpo del VHC y simultáneamente con el mismo desde el pocillo dosificador de muestra (1) y el total de los 70
45 µl se dosifica en el pocillo de dilución (2) y después 65 µl se aspiran del pocillo de dilución 1 (2) y la cantidad entera se dosifica en el pocillo de dilución 2 (3). Por último, se aspiran 60 µl del pocillo de dilución 2 (3) y los 60 µl enteros se dosifican en el pocillo de reacción. Puesto que el pocillo de dilución no se carga con una solución de dilución, la dilución de la muestra no se realiza y finalmente se dosifica una porción de 60 µl de la muestra como solución madre al pocillo de reacción (4). Por tanto, es posible medir al mismo tiempo elementos diferentes que se van a analizar
50 incluso usando un instrumento que realiza solo un único estilo de proceso de análisis.

Por supuesto, la dilución de una muestra no está limitada a 50 veces como el ejemplo mencionado anteriormente sino que se puede cambiar a una dilución deseada de 1 o más veces dependiendo de la cantidad de solución de dilución que se va a cargar en el pocillo de dilución. Para que se introduzca una cantidad predeterminada
55 exactamente en pocillo de reacción incluso donde la dilución es 1 considerando la adhesión a la pared de un pocillo, se prefiere que la cantidad de aspiración se ajuste menor que la cantidad de dosificación en el pocillo de dilución.

Como se ha mencionado anteriormente, la medida se puede realizar usando en combinación el cartucho descrito en el presente documento y otro cartucho en el que se carga un reactivo y/o una solución necesaria para la medida. Por
60 ejemplo, el cartucho descrito en el presente documento que tiene un pocillo dosificador de muestra, un pocillo de dilución, un pocillo de reacción, un pocillo de lavado y un pocillo fotométrico se usa sin cargar ningún reactivo y/o solución en el mismo. Por el contrario, una solución de dilución, un soporte de fase sólida, un antígeno o anticuerpo marcado, un reactivo para medir la cantidad de un marcador, etc., se cargan en otro cartucho, desde el que se dosifican realizando una operación de dosificación y medida se puede realizar de la misma manera que
65 anteriormente. La figura 2 muestra un ejemplo de un cartucho de este tipo.

En el paso de dilución de la muestra, se puede realizar un pretratamiento de una muestra añadiendo un ácido, un álcali, un solvente orgánico, un desnaturalizante de proteínas, un detergente, etc., a la solución de dilución. Por ejemplo, en el caso donde se usa sangre (sangre completa) como muestra, se prefiere que el pretratamiento se realice añadiendo cualquier detergente deseado, etc., puesto que la sangre contiene una gran cantidad de interferencia y por algunas otras razones. Al realizar al mismo tiempo la dilución y el pretratamiento de la muestra de esta manera, se puede realizar fácilmente medida de alta precisión incluso cuando la sangre y similares se usan como muestra. Como resultado, el cartucho se puede usar en pruebas de urgencia y pruebas en el sitio de atención (POCT) que van a ser realizadas por médicos y enfermeras.

La solución de lavado para el lavado de la muestra y el marcador sin reaccionar de los complejos inmunitarios (separación B/F) requiere mucho gasto en tiempo y esfuerzo para preparar la solución de lavado, suplementándola durante la medida y la recogida de líquido de desecho cuando la solución de lavado se suministra de una parte de los dispositivos en el instrumento de medida automático como se ve en el instrumento de medida automático convencional. La solución de lavado usada en el instrumento de medida automático convencional estandarizada con respecto a la composición y cantidad de líquido de la solución de lavado independientemente de los elementos que se van a analizar, de modo que es imposible adoptar una composición óptima para analizar. A partir de los puntos anteriormente mencionados, se prefiere que la solución de lavado también esté contenida en un cartucho. Sin embargo, en el caso donde, por ejemplo, la composición o la cantidad de líquido son idénticas, la solución de lavado se puede suministrar uniformemente de una parte de los dispositivos en el instrumento de medida automático como se ha descrito anteriormente.

Para acelerar la reacción, se prefiere que un mecanismo para mantener el cartucho a una temperatura necesaria, por ejemplo, en un intervalo de 35 a 45°C que es adecuada para reacciones enzimáticas se una al instrumento de medida automático en el que el cartucho se coloca cuando está en uso.

La medida de los marcadores se puede realizar como sigue. Por ejemplo, en el caso de un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente, la medida se puede realizar directamente mediante un pocillo fotométrico mediante el uso de un fotomultiplicador, etc., después de mezclar un complejo inmunitario y una solución de sustrato de enzima por irradiación luz de medida que tiene una longitud de onda que se va a medir desde el fondo o un lado del pocillo de medida y midiendo la luz transmitida que pasó a través del pocillo fotométrico.

El instrumento de medida automático en el que se coloca el cartucho cuando se usa incluye al menos una sección de alojamiento del cartucho para alojar un cartucho, una sección de dosificación para dosificar un reactivo y/o una muestra al cartucho alojado en la sección de alojamiento del cartucho, y una sección de medida para medir un producto de reacción en el cartucho alojado en la sección de alojamiento del cartucho. La sección de alojamiento del cartucho puede ser la misma que una sección de alojamiento del cartucho convencional excepto que se hace para tener una estructura capaz de alojar el cartucho descrito en el presente documento. La sección dosificadora está constituida por mecanismos convencionales tales como mecanismos de aspiración/dosificación de líquidos, etc., correspondientes a los tipos y propiedades de un reactivo y/o una muestra. El término "dosificar" como se usa en el presente documento abarca ambos de los siguientes: transferir un reactivo y/o una muestra de fuera de un cartucho a un pocillo en el cartucho, y transferir un reactivo y/o una muestra de un pocillo a otro pocillo en un cartucho. La sección de medida está constituida por mecanismos convencionales tal como mecanismos fotométricos dependiendo de los tipos y propiedades de un producto de reacción. En el caso donde la medida se realiza usando el cartucho que tiene provisto en el mismo dos o más líneas de grupos de pocillos en paralelo o una pluralidad de los cartuchos que tiene cada uno una o más líneas de grupos de pocillos, el instrumento de medida automático es preferiblemente un instrumento que tiene provisto en paralelo en el mismo una pluralidad de mecanismos para realizar una serie de reacciones inmunitarias y capaz de al mismo tiempo operar y controlar los procesos de, por ejemplo, dosificar una muestra, diluir una muestra, dosificar un reactivo, separación B/F y fotometría. De esta manera, incluso en el caso de inmunoensayos, se pueden medir al mismo tiempo una pluralidad de elementos que se van a analizar usando un instrumento que realiza solo un único estilo de proceso de análisis sin aumentar sustancialmente el tiempo requerido para la medida incluso para diferentes elementos que se van a analizar.

Se prefiere que la sección dosificadora incluya partes (punta, etc.) que estén en contacto con un reactivo y/o una muestra capaz de ser intercambiado. Al sustituir las partes por nuevas en cada medida, se puede prevenir fácilmente la contaminación del cartucho que se va a usar en una medida posterior.

Como se ha mencionado anteriormente, se prefiere que la medida se realice uniendo un código de barras al cartucho descrito en el presente documento y usando un instrumento provisto con un mecanismo para reconocer el código de barras. Usando un instrumento que pueda reconocer un código de barras y seleccionar automáticamente un elemento para analizar, la medida automática de una pluralidad de elementos que se van a analizar se puede realizar más fácil y eficazmente; por ejemplo, ajustar individualmente la temperatura de reacción y las condiciones fotométricas se vuelva innecesario, y el análisis de los resultados de medida se puede realizar fácilmente.

Ejemplos

De aquí en adelante, se hará la ilustración en detalle de secuencias de reacción posibles particulares, a modo de ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos son meramente para ilustración y el ámbito de la presente invención no se debe interpretar como que está limitado por los siguientes ejemplos. Es obvio para el experto en la materia que se pueden hacer muchas variaciones, mejoras o modificaciones a esta divulgación específica sin separarse del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo de preparación 1 Preparación de reactivo y solución

Se prepararon los respectivos reactivos y soluciones necesarios para la medida de antígeno HBs (HBsAg), anticuerpo del virus de la hepatitis C (VHC), anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), anticuerpo del virus de la leucemia de células T humanas 1 (HTLV-1) y anticuerpo de *Treponema pallidum* (TP).

1. Preparación de partículas magnéticas

El anticuerpo policlonal anti-HBsAg se adsorbió físicamente en partículas magnéticas (0,3 µm) en tampón fosfato 50 mM (pH 4) y las partículas resultantes se trataron en tampón Tris (0,1 M pH 8) que contenía BSA al 2%, a 37°C durante 1 día para preparar anticuerpo anti-HBsAg unido a partículas magnéticas.

Similarmente, el antígeno del VHC, antígeno del VIH, antígeno del HTLV-1, y el antígeno de TP se sometieron al mismo tratamiento que anteriormente para preparar antígeno de VHC unido a partículas magnéticas, antígeno de VIH unido a partículas magnéticas, antígeno de HTLV-1 unido a partículas magnéticas, y antígeno de TP unido a partículas magnéticas, respectivamente.

Las partículas magnéticas preparadas se resuspendieron en tampón Tris 0,1 M (pH 8,0) y después se usaron (las concentraciones se ajustaron individualmente para cada elemento entre 100 a 200 µg/ml).

2. Preparación de anticuerpo marcado

Se unió anticuerpo monoclonal anti-HBsAg a fosfatasa alcalina bovina (ALP) por un método de maleimida para preparar anticuerpo de HBsAg marcado con ALP. Similarmente, se usó anticuerpo monoclonal anti-IgG humana para preparar anticuerpo anti-IgG humana marcado con ALP. Los anticuerpos marcados se disolvieron en tampón Tris 0,1 M (pH 8,0) y se usaron (las concentraciones se ajustaron individualmente para cada elemento entre 0,2 a 0,5 µg/ml).

3. Preparación de la solución de lavado

Se preparó tampón Tris 0,1 M (pH 8,0) que contenía Tween 20 al 0,1% y NaCl al 0,15 M.

4. Preparación de la solución de dilución

Se preparó tampón Tris 0,1 M (pH 8,0) que contenía BSA al 1% y NaCl al 0,15 M.

5. Sustrato luminiscente

Como sustrato luminiscente, se usó solución de AMPPD 25 mM (Tropix Co.).

Ejemplo 1. Medidas (A) de HBsAg, anticuerpo de VHC, anticuerpo de VIH, anticuerpo de HTLV-1 y anticuerpo de TP

Las medidas se realizaron usando un cartucho de poliestireno mostrado en la figura 1. Después de cargar los respectivos reactivos y soluciones preparados en 1 a 5 del ejemplo de preparación 1 descrito anteriormente en un pocillo de dilución 1 (2), un pocillo de dilución 2 (3), un pocillo que contiene partículas magnéticas (4), un pocillo que contiene anticuerpo marcado (6), un pocillo de lavado 1 (5), un pocillo de lavado 2 (7), y un pocillo fotométrico (8), la parte superior de cada pocillo con reactivo se selló con hoja laminada de aluminio. La posición de carga y la cantidad de carga fueron como sigue.

Tabla 1

	Cartucho para HBsAg	Cartucho para anticuerpo de VHC	Cartucho para anticuerpo de VIH	Cartucho para anticuerpo de HTLV-1	Cartucho para anticuerpo de TP
Pocillos dosificadores de muestra	Vacío	Vacío	Vacío	Vacío	Vacío
Pocillo de dilución 1	Vacío	Solución de dilución de muestra 500 µl	Solución de dilución de muestra 500 µl	Solución de dilución de muestra 500 µl	Solución de dilución de muestra 500 µl

ES 2 491 192 T3

Pocillo de dilución 2	Vacío	Solución de dilución de muestra 335 µl	Solución de dilución de muestra 335 µl	Solución de dilución de muestra 335 µl	Solución de dilución de muestra 335 µl
Pocillo con partículas magnéticas (pocillo de reacción 1)	Partículas magnéticas unidas a anticuerpo anti-HBsAg 150 µl	Partículas magnéticas unidas a anticuerpo anti-VHC 150 µl	Partículas magnéticas unidas a anticuerpo anti-VIH 150 µl	Partículas magnéticas unidas a anticuerpo anti-HTLV-1 150 µl	Partículas magnéticas unidas a anticuerpo anti-TP 150 µl
Pocillo de lavado 1	Solución de lavado 500 µl	Solución de lavado 500 µl	Solución de lavado 500 µl	Solución de lavado 500 µl	Solución de lavado 500 µl
Pocillo con anticuerpo marcado (pocillo de reacción 2)	Anticuerpo anti-HBsAg humano marcado con ALP 150 µl	Anticuerpo anti-IgG humana marcado con ALP 150 µl	Anticuerpo anti-IgG humana marcado con ALP 150 µl	Anticuerpo anti-IgG humana marcado con ALP 150 µl	Anticuerpo anti-IgG humana marcado con ALP 150 µl
Pocillo de lavado 2	Solución de lavado 500 µl	Solución de lavado 500 µl	Solución de lavado 500 µl	Solución de lavado 500 µl	Solución de lavado 500 µl
Pocillo fotométrico	Solución de AMPPD 200 µl	Solución de AMPPD 200 µl	Solución de AMPPD 200 µl	Solución de AMPPD 200 µl	Solución de AMPPD 200 µl

Los cinco tipos de cartuchos de reactivos preparados se midieron al mismo tiempo mediante un instrumento de medida automático provisto con mecanismos de aspiración/dosificación quintuples y mecanismos de separación de partículas magnéticas quintuples según los siguientes pasos.

- 5 (1) Las muestras (suero control negativo y suero control positivo) se dosificaron en una cantidad de 70 µl o más en los respectivos pocillos dosificadores de muestra en el cartucho para HBsAg, el cartucho para anticuerpo de VHC, el cartucho para anticuerpo de VIH, el cartucho para anticuerpo de HTLV-1, y el cartucho para anticuerpo de TP.
- 10 (2) Los cartuchos de reactivos en los que se había dosificado una muestra se colocan en un instrumento de medida automático. La organización de los cartuchos de reactivos puede ser opcional.
- (3) El instrumento de medida automático se inició.
- 15 (4) El instrumento de medida automático leyó un código de barras unido al cartucho de reactivo y reconoció qué elemento de análisis se seleccionó. Después de ello, los cinco cartuchos de reactivos se sometieron al mismo tiempo al mismo proceso.
- 20 (5) El sello de aluminio en la parte superior del cartucho de reactivo se agujereó con una protuberancia de tipo varilla.
- (6) Se aspiraron 70 µl de un pocillo de dosificación de la muestra (1) y la cantidad entera se dosificó en el pocillo de dilución 1 (2). Además, repitiendo las operaciones de aspiración y dosificación en el pocillo de dilución 1 (2), se realizó un proceso de dilución de primera fase.
- 25 (7) Se aspiraron 65 µl de la muestra del pocillo de dilución 1 (2) y la cantidad entera se dosificó en el pocillo de dilución 2 (3). Además, repitiendo las operaciones de aspiración y dosificación en el pocillo de dilución 2 (3), se realizó un proceso de dilución de segunda fase.
- 30 (8) Se aspiraron 60 µl del pocillo de dilución 2 (3), se dosificaron en un pocillo que contenía partículas magnéticas (4), y se mezclaron con las partículas magnéticas, seguido por reacción a 42°C durante 10 minutos.
- (9) En el pocillo que contenía partículas magnéticas (4), las partículas magnéticas se separaron usando un imán y además las partículas magnéticas se lavaron en un pocillo de lavado 1 (5). Después de ello, las partículas magnéticas se separaron de allí usando un imán permanente.
- 35 (10) Las partículas magnéticas se dosificaron en un pocillo que contenía anticuerpo marcado (6), y se dejaron reaccionar adicionalmente a 42°C durante 10 minutos.
- 40 (11) En el pocillo que contenía anticuerpo marcado (6), las partículas magnéticas se separaron usando un imán y además las partículas magnéticas se lavaron en un pocillo de lavado 2 (7). Después de ello, las partículas magnéticas se separaron de allí usando un imán permanente.
- 45 (12) Las partículas magnéticas se dosificaron en un pocillo fotométrico (8), se mezclaron con solución de AMPPD, y se sometieron a reacción enzimática a 42°C durante 5 minutos. Después de ello, la cantidad de luminiscencia se midió desde arriba del pocillo fotométrico usando un tubo fotomultiplicador (PMT).

Las medidas anteriormente mencionadas se repitieron durante 12 días y se examinó la reproducibilidad día tras día para obtener los siguientes buenos resultados.

Tabla 2

5

		HBsAg	Anticuerpo de VHC	Anticuerpo de VIH	Anticuerpo de HTLV-1	Anticuerpo de TP
Suero control negativo	Media	257	3.646	1.521	1.563	2.585
	Desviación estándar	17	425	199	199	291
	CV (%)	6,5%	11,7%	13,1%	12,7%	11,3%
Suero control positivo	Media	45.035	43.601	72.983	215.806	34.571
	Desviación estándar	1.404	1.984	2.902	13.593	1.659
	CV (%)	3,1%	4,6%	4,0%	6,3%	4,8%

(Los valores numéricos indican la intensidad de la luminiscencia).

Ejemplo 2. Medidas (B) de HBsAg, anticuerpo de VHC, anticuerpo de VIH, anticuerpo de HTLV-1 y anticuerpo de TP

10 Las medidas se realizaron usando un cartucho hecho de poliestireno mostrado en la figura 2. Es decir, las soluciones de dilución de la muestra y los reactivos que participan en la reacción (partículas magnéticas, anticuerpo marcado, AMPPD) se cargaron en un cartucho diferente (de aquí en adelante en algunos casos denominado como "cartucho de reactivos") que el cartucho de la presente invención (de aquí en adelante en algunos casos denominado como "cartucho de reacción"). Las medidas se realizaron de modo que los reactivos no estaban físicamente unidos y la dilución de las muestras se hizo en tres fases. Como reactivos y soluciones, se usaron los preparados en el ejemplo de preparación 1 descrito anteriormente.

15 (1) Un cartucho de reactivos para HBsAg, un cartucho para anticuerpo de VHC, un cartucho de reactivos para anticuerpo de VIH, un cartucho de reactivos para anticuerpo de HTLV-1, y un cartucho de reactivos para anticuerpo de TP se colocaron en un instrumento de medida automático. La organización de los cartuchos de reactivos puede ser opcional. Los cartuchos de reactivos se cargaron con reactivos y soluciones, respectivamente, de antemano como se muestra en la tabla 3 y se sellaron con hoja laminada de aluminio.

20 (2) El cartucho de reacción se colocó en el instrumento. Aquí, el cartucho de reacción es un cartucho vacío sin solución de dilución ni reactivo que se carga en el mismo (sin sello de aluminio) de modo que es común independientemente de qué elemento para análisis está concernido.

25 (3) Se dosificaron muestras (suero control negativo y suero control positivo) en el pocillo dosificador de la muestra (SD) de cada cartucho de reacción en correspondencia con un línea en cada cartucho de reactivo en una cantidad de 115 µl o más.

30 (4) El instrumento de medida automático se inició.

35 (5) El instrumento de medida automático leyó un código de barras unido al cartucho de reactivos y reconoció qué proceso de análisis se seleccionó. Después de ello, los cinco cartuchos de reactivos y cartuchos de reacción correspondientes a los cartuchos de reactivos se sometieron al mismo tiempo al mismo proceso.

40 (6) El sello de aluminio en la parte superior del cartucho de reactivos se agujereó con una protuberancia de tipo varilla.

(7) Los reactivos se cargaron en los cartuchos de reacción desde cada cartucho de reacción. El orden de dosificación se determinó en consideración de la contaminación de la puntas de dosificación.

45 (8) Primero, se aspiraron 1.000 µl de solución de lavado desde un pocillo que contiene solución de lavado (WS) y se dosificaron porciones de 500 µl en un pocillo de lavado 1 (W1) y un pocillo de lavado 2 (W2), respectivamente.

(9) Se aspiraron 200 µl de AMPPD de un pocillo que contenía AMPPD (AMPPD) y la cantidad entera se dosificó en un pocillo fotométrico (LM).

50 (10) Se aspiraron 190 µl de una solución de dilución de muestra del pocillo que contiene solución de dilución 1 (DS1) y la cantidad entera se dosificó en un pocillo de dilución (D1). Cuando el pocillo que contenía solución de dilución 1 (DS1) estaba vacío, el pocillo de dilución 1 (D1) permaneció vacío después de esta operación.

ES 2 491 192 T3

- (11) Se aspiraron 290 µl de solución de dilución de la muestra desde el pocillo que contiene solución de dilución 1 (DS1) y la cantidad entera se dosificó en un pocillo de dilución 2 (D2). Cuando el pocillo que contenía solución de dilución 1 (DS1) estaba vacío, el pocillo de dilución 2 (D2) permaneció vacío después de esta operación.
- 5 (12) Se aspiraron 285 µl de solución de dilución de la muestra desde el pocillo que contiene solución de dilución 1 (DS1) y la cantidad entera se dosificó en un pocillo de dilución 3 (D3). Cuando el pocillo que contenía solución de dilución 1 (DS1) estaba vacío, el pocillo de dilución 3 (D3) permaneció vacío después de esta operación.
- 10 (13) Se aspiraron 115 µl de una solución de dilución de muestra del pocillo que contiene solución de dilución 2 (DS2) y la cantidad entera se dosificó en un pocillo de dilución (D1). Cuando el pocillo que contenía solución de dilución 2 (DS2) estaba vacío, el pocillo de dilución 1 (D1) permaneció sin cambiar después de esta operación.
- (14) Se aspiraron 250 µl de un anticuerpo marcado de un pocillo que contenía anticuerpo marcado (LA) y la cantidad entera se dosificó en un pocillo de reacción 2 (R2).
- 15 (15) Se aspiraron 250 µl de suspensión de partículas magnéticas de un pocillo que contenía partículas magnéticas (MP) y la cantidad entera se dosificó en un pocillo de reacción 1 (R1).
- (16) Mediante las operaciones anteriores, todos los reactivos necesarios se cargaron de los cartuchos de reactivos en los cartuchos de reacción. Después de ello, los procesos de dilución de la muestra, reacción y fotométrico usando los cartuchos de reacción siguieron.
- 20 (17) Se aspiraron 115 µl de muestra de un pocillo dosificador de muestra (SD) y la cantidad entera se dosificó en el pocillo de dilución 1 (D1). Además, repitiendo las operaciones de aspiración y dosificación en el pocillo de dilución 1 (D1), se realizó un proceso de dilución en primera fase.
- 25 (18) Se aspiraron 110 µl de muestra del pocillo de dilución 1 (D1) y la cantidad entera se dosificó en el pocillo de dilución 2 (D2). Además, repitiendo las operaciones de aspiración y dosificación en el pocillo de dilución 2 (D2), se realizó un proceso de dilución en segunda fase.
- 30 (19) Se aspiraron 105 µl de muestra del pocillo de dilución 2 (D2) y la cantidad entera se dosificó en el pocillo de dilución 3 (D3). Además, repitiendo las operaciones de aspiración y dosificación en el pocillo de dilución 3 (D3), se realizó un proceso de dilución en tercera fase. Mediante las operaciones anteriores, por último se obtuvo una dilución deseada como se muestra en la tabla 4.
- 35 (20) Se aspiraron 100 µl de muestra del pocillo de dilución 3 (D3) y la cantidad entera se dosificó en el pocillo de reacción 1 (R1), y se mezcló con las partículas magnéticas, seguido por reacción a 37°C durante 10 minutos.
- 40 (21) En el pocillo de reacción 1 (R1), las partículas magnéticas se separaron usando un imán permanente y además las partículas magnéticas se lavaron en un pocillo de lavado 1 (W1). Después de ello, las partículas magnéticas se separaron del mismo usando un imán permanente.
- 45 (22) Las partículas magnéticas se dosificaron en un pocillo de reacción 2 (R2), se mezclaron con un anticuerpo marcado. Además, después de mezclar, se dejaron reaccionar a 37°C durante 10 minutos.
- 50 (23) En el pocillo de reacción 2 (R2), las partículas magnéticas se separaron usando un imán permanente y además las partículas magnéticas se lavaron en un pocillo de lavado 2 (W2). Después de ello, las partículas magnéticas se separaron del mismo usando un imán permanente.
- (24) Las partículas magnéticas se dosificaron en un pocillo fotométrico (LM), se mezclaron con solución de AMPPD, y se sometieron a una reacción enzimática a 37°C durante 5 minutos. Después de ello, se midió la cantidad de luminiscencia desde encima del pocillo fotométrico (LM) usando un tubo fotomultiplicador (PMT).

Tabla 3

	HBsAg	VHC, VIH, HTLV-1	TP
Pocillo que contiene solución de dilución 1	0 µl	800 µl	0 µl
Pocillo que contiene solución de dilución 2	0 µl	150 µl	150 µl
Pocillo que contiene solución de lavado	1100 µl	1100 µl	1100 µl
Pocillo que contiene partículas magnéticas	300 µl	300 µl	300 µl
Pocillo que contiene anticuerpo marcado	300 µl	300 µl	300 µl
Pocillo que contiene AMPPD	250 µl	250 µl	250 µl

55

Tabla 4

	Cantidad de carga de solución de dilución			Cantidad de muestra (cantidad introducida)
	HBsAg	VHC, VIH, HTLV-1	TP	
Pocillo de dilución 1	0 µl	305 µl	115 µl	115 µl
Pocillo de dilución 2	0 µl	290 µl	0 µl	110 µl
Pocillo de dilución 3	0 µl	285 µl	0 µl	105 µl
Aumento de la última dilución	1 vez	50 veces	2 veces	100 µl

Tabla 5

		HBsAg	Anticuerpo de VHC	Anticuerpo de VIH	Anticuerpo de HTLV-1	Anticuerpo de TP
Suero control negativo	Medida triplicada	704	13.096	10.068	11.740	420
		560	12.328	10.084	11.408	412
		496	12.484	10.296	12.108	404
	Media	587	12.636	10.149	11.752	412
CV (%)	18,2%	3,2%	1,3%	3,0%	1,9%	
Suero control positivo	Medida triplicada	272.316	372.308	870.088	2.668.518	82.272
		260.004	363.888	919.080	2.719.068	83.844
		266.800	364.948	930.576	2.567.712	89.089
	Media	266.373	367.048	906.581	2.651.764	85.071
CV (%)	2,3%	1,2%	3,5%	2,9%	4,2%	

5 **Aplicabilidad industrial**

Las medidas de una pluralidad de tipos de elementos que se van a analizar con diferentes diluciones en una muestra común se pueden realizar al mismo tiempo mediante un proceso de análisis uniforme. Esto produce la simplificación de un instrumento de medida automático, reducción en coste, acortamiento del tiempo requerido para la medida y permite la medida fácil.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método de medida para la medida de una pluralidad de tipos de componentes diferentes que se van a medir contenidos en una muestra mediante una operación uniforme, que comprende los pasos de:

proporcionar un cartucho que tiene dos o más líneas de grupos de pocillos organizadas en paralelo, o dos o más cartuchos que tiene cada uno una o más líneas de grupos de pocillos, para medir dos o más tipos de componentes diferentes que se van a medir contenidos en una muestra, cada grupo de pocillos lineal comprende al menos un pocillo de dilución (2, 3) y un pocillo de reacción (4), en donde:

cada grupo de pocillos lineal está configurado para recibir una cantidad predeterminada uniforme de la muestra en su respectivo primer de al menos un pocillo de dilución (2,3), los pocillos de dilución de cada grupo de pocillos lineal contienen una cantidad de una solución de dilución para diluir dicha cantidad predeterminada de la muestra a una respectiva dilución deseada para ese grupo de pocillos, en donde la dilución deseada puede ser 1;

cada grupo de pocillos lineal está organizado para someterse a una operación uniforme predeterminada en la que una cantidad predeterminada de la muestra diluida se aspira del primer pocillo de dilución, y en la que una cantidad predeterminada de muestra diluida aspirada de un pocillo del grupo de pocillos se dosifica en el pocillo de reacción (4), dichos pocillos de reacción de los dos o más grupos de pocillos lineales contiene cada uno una sustancia específicamente reactiva con un respectivo de los dos o más tipos de componentes diferentes que se van a medir contenidos en una muestra diluida que se ha sometido a dicha operación uniforme predeterminada en dicho respectivo grupo de pocillos lineal; y

cada cartucho se sella con dicha cantidad de solución de dilución y sustancia específicamente reactiva cargadas en el mismo;

dosificar al mismo tiempo una cantidad predeterminada de la muestra que contiene los componentes que se van a medir en cada pocillo de dilución (2, 3) mediante una operación uniforme, para diluir la muestra en cada grupo de pocillos lineal a una dilución deseada en el cartucho;

aspirar al mismo tiempo una cantidad predeterminada de la muestra diluida del al menos un pocillo de dilución de cada grupo de pocillos lineal mediante una operación uniforme;

dosificar al mismo tiempo una cantidad predeterminada de muestra diluida aspirada de un pocillo de cada grupo de pocillos lineal en el pocillo de reacción de cada grupo de pocillos lineal mediante una operación uniforme, para hacer reaccionar el respectivo componente que se va a medir en cada muestra diluida con una respectiva sustancia específicamente reactiva con el mismo contenido en el pocillo de reacción; y

medir una cantidad del respectivo producto de reacción en cada pocillo de reacción.

2. Un método de medida según la reivindicación 1, en donde la medida se realiza usando el cartucho o dos o más cartuchos de la reivindicación 1 y otro cartucho cargado con un reactivo y/o una solución necesario para la medida del componente que se va a medir contenido en la muestra.

3. Un método de medida según la reivindicación 1 o 2, en donde la reacción entre el componente que se va a medir y la sustancia específicamente reactiva con el mismo es una reacción inmunológica.

4. Un método de medida según la reivindicación 3, en donde la reacción inmunológica es una reacción en la que el componente que se va a medir en la muestra y la sustancia inmunológicamente específicamente reactiva con el mismo se dejan reaccionar para formar un primer complejo inmunitario, y el primer complejo inmunitario y un marcador inmunológicamente específicamente reactivo con el mismo se dejan reaccionar para formar un segundo complejo inmunitario, y en donde se mide la cantidad del marcador en el segundo complejo inmunitario formado por la reacción.

5. Un instrumento de medida que comprende:

al menos una sección de alojamiento de un cartucho organizada para alojar un cartucho que tiene dos o más líneas de grupos de pocillos organizadas en paralelo, o dos o más cartuchos que tiene cada uno una o más líneas de grupos de pocillos, para medir o dos o más tipos de componentes diferentes que se van a medir contenidos en una muestra, cada grupo de pocillos lineal comprende al menos un pocillo de dilución (2,3) y un pocillo de reacción (4), en donde:

cada grupo de pocillos lineal está configurado para recibir una cantidad predeterminada uniforme de la muestra en su respectivo primer de al menos un pocillo de dilución (2,3), los pocillos de dilución de cada grupo de pocillos lineal contienen una cantidad de una solución de dilución para diluir dicha cantidad

predeterminada de la muestra a una respectiva dilución deseada para ese grupo de pocillos, en donde la dilución deseada puede ser 1;

5 cada grupo de pocillos lineal está organizado para someterse a una operación uniforme predeterminada en la que una cantidad predeterminada de la muestra diluida se aspira del primer pocillo de dilución, y en la que una cantidad predeterminada de muestra diluida aspirada de un pocillo del grupo de pocillos se dosifica en el pocillo de reacción (4), dichos pocillos de reacción de los dos o más grupos de pocillos lineales contiene cada uno una sustancia específicamente reactiva con un respectivo de los dos o más tipos de componentes diferentes que se van a medir contenidos en una muestra diluida que se ha sometido a dicha
10 operación uniforme predeterminada en dicho respectivo grupo de pocillos lineal; y

cada cartucho se sella con dicha cantidad de solución de dilución y sustancia específicamente reactiva cargadas en el mismo;

15 una sección de aspiración/dosificación para dosificar al mismo tiempo una cantidad uniforme predeterminada de una muestra a al menos un pocillo de dilución de cada grupo de pocillos lineal del cartucho o dos o más cartuchos alojados en la sección de alojamiento de cartuchos mediante una operación uniforme, para aspirar al mismo tiempo una cantidad uniforme predeterminada de muestra diluida del al menos un pocillo de dilución de cada grupo de pocillos lineal mediante una operación uniforme y para dosificar al mismo tiempo una
20 cantidad predeterminada de muestra diluida aspirada de un pocillo de cada grupo de pocillos en el respectivo pocillo de reacción (4) mediante una operación uniforme; y

una sección de medida para medir un producto de reacción en el pocillo de reacción de cada grupo de pocillos lineal alojado en la sección de alojamiento de cartuchos.
25

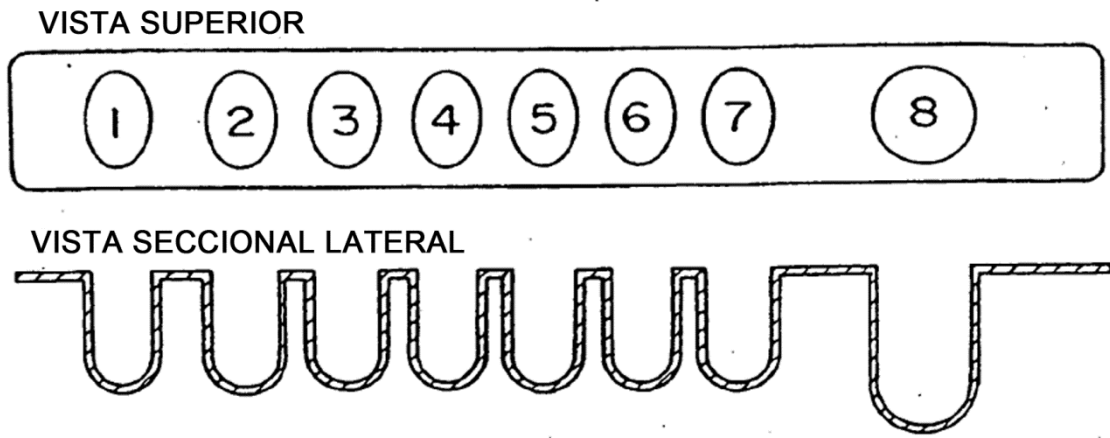


Fig. 1

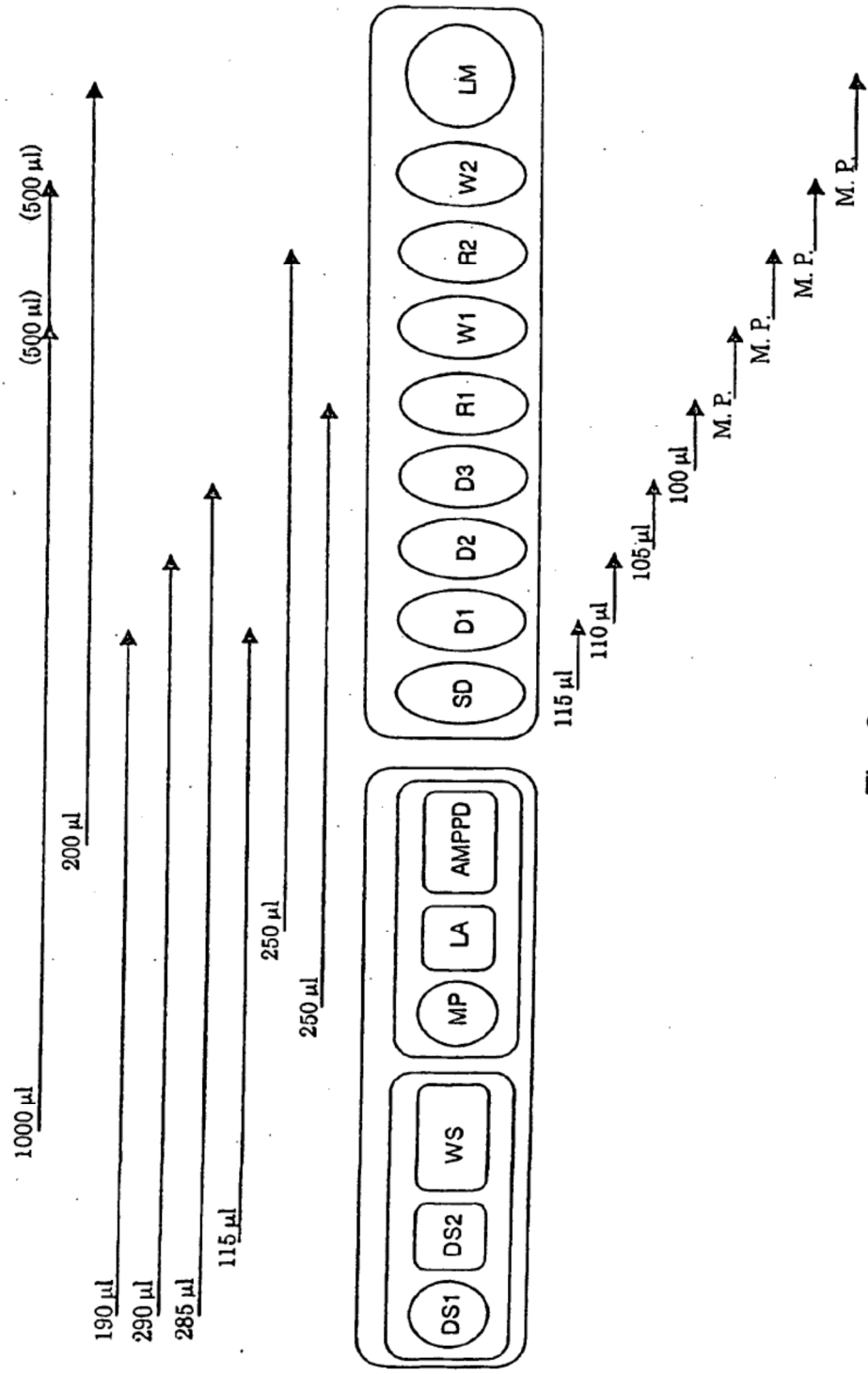


Fig. 2