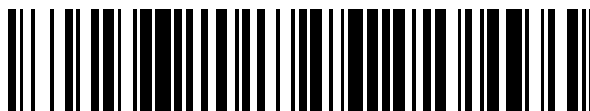


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 215**

51 Int. Cl.:

G01N 35/04 (2006.01)

G01N 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2010 E 10784466 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2502082**

54 Título: **Sistema de análisis y procedimiento de análisis**

30 Prioridad:

16.11.2009 EP 09176148

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

16.07.2015

73 Titular/es:

**BIT ANALYTICAL INSTRUMENTS GMBH (100.0%)
Am Kronberger Hang 3
65824 Schwalbach, DE**

72 Inventor/es:

**BALGER, MARIUS y
LANG, ALFRED**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 541 215 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 análisis y procedimiento de análisis

5 La invención se refiere a un procedimiento para el análisis automatizado de una muestra, en particular mediante la utilización de un sistema de análisis de rotor simple, en particular en el sector médico, en el que la muestra a determinar, dispuesta en un recipiente de muestra, se alimenta mediante un dispositivo de pipeteo, movido por un dispositivo de elevación/pivotado, a un depósito de reacción y/o una cubeta de medición que está disponible en un rotor de proceso junto con al menos un depósito de reactivo que contiene un reactivo, y se alimenta a
10 continuación en una cubeta de medición a un dispositivo de medición después de ejecutarse una secuencia de etapas de análisis, específica del ensayo, mediante la utilización de al menos un reactivo para determinar una propiedad física de la muestra.

Estado de la técnica

15 El diagnóstico clínico comprende análisis bioquímicos que se basan en reacciones enzimáticas y otras reacciones químicas para el análisis de azúcares, grasas, proteínas y similares, así como análisis inmunoquímicos, que implican interacciones específicas entre antígenos y anticuerpos, para la detección de hormonas, marcadores tumorales y similares.

20 Tanto para los análisis en el sector del diagnóstico clínico-químico como para los métodos de diagnóstico inmunológico se dispone de dispositivos de análisis automáticos. Estos se diferencian de manera clara entre sí por los métodos de análisis básicamente diferentes en cada caso.

25 Así, por ejemplo, en el sector de la química clínica están muy difundidos los sistemas de análisis químico por vía húmeda, en los que los reactivos líquidos se disponen en depósitos de reactivo que están situados en alojamientos de un rotor de proceso giratorio. Las muestras a analizar se encuentran en tubos de muestra pequeños de un rotor de muestra. Al rotor de proceso está asignada una pipeta de reactivo y al rotor de muestra está asignada una pipeta de muestra. Otro rotor, un rotor de proceso, está equipado con cubetas de reacción o
30 medición.

En el caso de los dispositivos de análisis químico por vía húmeda, una cantidad predefinida del reactivo específico del análisis se extrae de uno de los depósitos de reactivo mediante la pipeta de reactivo y se introduce en una cubeta de reacción o medición. A continuación, la pipeta de muestra extrae una cantidad de muestra predefinida y la alimenta a la cubeta de medición o reacción llena del reactivo. La cubeta de medición o reacción, cargada de esta manera con un reactivo y la muestra, se traslada mediante el rotor de reacción hacia una estación de medición, en la que se ejecuta, por ejemplo, una medición fotométrica de la solución de reacción. Las secuencias de las operaciones de pipeteo individuales pueden variar aquí según la especificidades del ensayo y además, pueden tener lugar también secuencias de varias etapas.

40 Los dispositivos de análisis químico por vía húmeda están diseñados generalmente para un gran volumen de análisis, en particular también debido a la pluralidad de ensayos diferentes, así como debido a la frecuencia de los requerimientos desde el punto de visto médico-diagnóstico.

45 En el caso de los métodos de diagnóstico inmunológicos heterogéneos son usuales los sistemas de análisis que trabajan con formatos estándar, en los que se utilizan depósitos de reacción (los llamados "wells") recubiertos en su interior de anticuerpos o antígenos (fase sólida). Dado que la reacción bioquímica tiene lugar sólo en la superficie recubierta y el material no ligado se elimina por lavado, el control de proceso básico se diferencia de los ensayos clínico-químicos. Asimismo, los tiempos de reacción requeridos en tales ensayos difieren generalmente de los ensayos clínico-químicos.

50 El documento US5,358,691A1 da a conocer un sistema de análisis para determinar distintos parámetros del sector del inmunodiagnóstico. El sistema de análisis comprende varios rotores equipados con recipientes de muestra, cartuchos de reactivo, depósitos de reacción y cubetas de medición. Para los análisis respectivos se utilizan diferentes unidades de medición. Este sistema de análisis resulta relativamente costoso desde el punto de vista constructivo y requiere mucho espacio.

60 El documento EP1637886A1 da a conocer en cambio un sistema de análisis compacto con una pluralidad de realizaciones, en las que están previstos respectivamente dos rotores de proceso para el alojamiento de cartuchos de reactivo con dos reactivos diferentes, estando dispuesto uno de los rotores de proceso de manera concéntrica dentro de un rotor de reacción y estando dispuesto el otro rotor de proceso por fuera del mismo. Alrededor del rotor de reacción están situadas distintas zonas para la entrada de reactivo, la mezcla, la medición y el lavado.

65 La particularidad del sistema de análisis del documento US2009/0004057A1 radica en que está prevista una

cámara de almacenamiento refrigerable para depósitos de reactivo. A tal efecto, la cámara de almacenamiento se puede cerrar con una tapa y enfriar por abajo mediante una unidad de refrigeración. La cámara de almacenamiento está dispuesta concéntricamente dentro de un carrusel de reacción equipado con depósitos de reacción. Además, está prevista una segunda unidad para reactivos en forma de un carrusel de reactivo
5 dispuesto por fuera del carrusel de reacción. El sistema de análisis dispone de una unidad de medición óptica y de un dispositivo de manejo y control.

Del documento EP1310303A1 es conocido un cartucho de reactivo con compartimentos separados que contienen reactivos, acondicionados previamente, para una determinación específica y están cerrados de
10 manera segura para su transporte.

El documento EP1255115A2 describe un dispositivo diseñado como artículo desechable para el inmunodiagnóstico, en el que un sustrato esencialmente plano está provisto de un alojamiento de una placa microtituladora y de varias hendiduras que sirven para alojar la muestra y reactivos de ensayo.
15

Del documento US2002/0085959A1 es conocido un armario para el inmunodiagnóstico automatizado que comprende un espacio de reserva y un sistema de transporte para cubetas, un espacio de almacenamiento y un sistema de selección para depósitos de muestras de medición y reacción, así como una unidad de medición, detección y control.
20

Hasta el momento se han utilizado dispositivos de análisis separados para el diagnóstico clínico-químico, por una parte, y para los métodos de diagnóstico inmunológico, por la otra parte, porque en la química clínica tienen lugar reacciones en todo el volumen de líquido, mientras que en los ensayos inmunológicos se producen reacciones sobre la superficie de la fase sólida inmovilizada (anticuerpos, antígenos) y, por tanto, se necesita un depósito de
25 reacción recubierto especialmente (well), y porque también los procedimientos de medición ópticos presentan en general características diferentes. Un sistema de análisis combinado se propuso por primera vez en el documento EP1662261A1. Éste describe un sistema de análisis con una construcción modular, que está compuesto de una unidad central responsable de varios módulos de análisis diseñados, por ejemplo, para análisis inmunológicos, moleculares o clínico-químicos. Las muestras a analizar se pasan en recipientes de muestra a la unidad central, en la que se extrae respectivamente una cantidad de muestra predefinida mediante una unidad de pipeteo y se introduce en un recipiente secundario. Los recipientes secundarios se transfieren a un dispositivo de transporte unidireccional. En este caso se puede tratar, por ejemplo, de una cinta transportadora, una vía vibratoria o carriles guía con correas de arrastre. En dependencia del requerimiento diagnóstico, el recipiente secundario se introduce mediante el dispositivo de transporte en el módulo de análisis adecuado, en el que se analiza el contenido del recipiente secundario. Después de ejecutarse el ensayo en un
30 recipiente de reacción, en cada módulo de análisis están previstas una o varias unidades de medición, mediante las que se miden propiedades del reactivo, tales como la absorción en una o varias longitudes de onda luminosa, la turbiedad, la dispersión o la emisión luminiscente/fluorescente.

Este sistema de análisis ha dado la posibilidad de unificar métodos de diagnóstico clínico-químico e inmunológico en un espacio de trabajo de laboratorio común. El sistema de análisis presenta una entrada y salida de muestra central y garantiza de cierto modo una simplificación. Sin embargo, se trata aquí de un acoplamiento secuencial de módulos clínico-químicos e inmunológicos que están agrupados mediante un mecanismo de transporte en un aparato de análisis aparentemente único. Esto apenas reduce los costes por equipamiento para el suministro de
40 medios, unidades de medición, calefacción o lavado, así como para software de control y evaluación. Además, las dimensiones de los equipos corresponden a las dimensiones típicas existentes, por lo demás, en sistemas de análisis clínico de laboratorio.

No obstante, en los últimos tiempos se ha registrado un fuerte aumento de la demanda de sistemas de análisis compactos que posibilitan un diagnóstico rápido en unidades de laboratorio de menor tamaño, directamente en la cama del paciente o en consultas médicas. De este modo se pueden evitar operaciones costosas y propensas a errores en el proceso de almacenamiento y envío de muestras a un laboratorio de ensayo central y los resultados del ensayo quedan disponibles localmente para decidir a corto plazo la terapia correspondiente. Se pueden automatizar también los procesos de ensayo y ejecución manuales, muy utilizados aún en particular en países emergentes, con resultados reproducibles claramente y de calidad asegurada. Este tipo de sistemas de análisis, identificados y utilizados también como sistemas POC (Point Of Care), han de cumplir requisitos cada vez mayores en relación con la compactibilidad, el manejo y el mantenimiento fáciles, así como la rapidez y la exactitud de los resultados de medición.
50

Del documento DE4128698A1 es conocido un procedimiento de análisis genérico para la ejecución automática de análisis inmunológicos heterogéneos mediante la utilización de un sistema de análisis de rotor simple. El sistema de análisis presenta una estación de medición óptica para la determinación fotométrica, fluorométrica o luminométrica de la reacción de análisis. Para la ejecución del análisis, la muestra a determinar se dispone en un recipiente de muestra y se alimenta a un depósito de reacción y/o una cubeta de medición mediante un dispositivo de pipeteo que se mueve mediante un dispositivo de elevación/pivotado. Se utiliza un rotor de
60

proceso que presenta una pluralidad de alojamientos para recipientes de muestra, reactivo y reacción con el fin de determinar parámetros inmunológicos heterogéneos. A cada cartucho de reactivo está asignada una cubeta de medición individual en forma de una punta de pipeta de medición, a la que está asignado un alojamiento en el rotor de proceso. Para determinar el parámetro inmunodiagnóstico se describe la formación de una sándwich de anticuerpo y antígeno. La reacción del antígeno con el anticuerpo fijado en el soporte se detiene por succión y lavado. Al rotar el rotor de proceso alrededor de su eje de giro, las cubetas de medición se alimentan al dispositivo de medición óptico, situado en la zona del rotor de proceso, para ser analizadas mediante un sistema de medición óptico. El dispositivo de medición comprende una unidad de medición óptica para determinar una propiedad física de la muestra.

Objetivo técnico

El documento mencionado en último lugar se refiere exclusivamente a la ejecución automática de análisis inmunodiagnósticos.

La invención tiene el objetivo de proporcionar un procedimiento de análisis que posibilite un análisis rápido y exacto tanto de muestras clínico-químicas como inmunológicas homogéneas y heterogéneas en un único aparato simple de fabricación económica.

Este objetivo se consigue según la invención a partir del procedimiento genérico mencionado al inicio

(a) al utilizarse un sistema de análisis de rotor simple, en el que el rotor está configurado como rotor de proceso que presenta una pluralidad de alojamientos, en los que se pueden insertar respectivamente cartuchos de reactivo de un primer tipo y cartuchos de reactivo de un segundo tipo, estando agrupados en los cartuchos de reactivo del primer tipo varios depósitos de reactivo con reactivos para la determinación de parámetros clínico-químicos y estando agrupados en los cartuchos de reactivo del segundo tipo varios depósitos de reactivo con reactivos para la determinación de parámetros inmunológicos heterogéneos, estando asignada a cada cartucho de reactivo una cubeta de medición individual, a la que está asignado un alojamiento en el rotor de proceso,

(b) al determinarse un parámetro clínico-químico mediante la cubeta de medición que está asignada al cartucho de reactivo del primer tipo, utilizándose la cubeta de medición como depósito de reacción, en el que se desarrollan reacciones para la determinación del parámetro clínico-químico, y

(c) al determinarse un parámetro inmunodiagnóstico mediante la cubeta de medición asignada al cartucho de reactivo del segundo tipo, comprendiendo la determinación de parámetros inmunodiagnósticos las siguientes etapas:

(c1) pasar un sustrato al depósito de reacción recubierto con la fase sólida,

(c2) incubar el sustrato sobre la fase sólida por conversión, y

(c3) pipetear del depósito de reacción a la cubeta de medición para medir el sustrato convertido, deteniéndose directamente mediante el pipeteo una reacción que se desarrolla en el depósito de reacción,

alimentándose mediante la rotación del rotor de proceso alrededor de su eje de giro cada una de las cubetas al dispositivo de medición, que comprende una unidad de medición óptica dispuesta en la zona del rotor de proceso y utilizada para la respectiva determinación analítica de parámetro, para ser analizada mediante el mismo sistema de medición óptico.

En el caso del procedimiento de análisis según la invención se utiliza un sistema de rotor simple que está configurado para determinar tanto parámetros clínico-químicos como para determinar parámetros inmunodiagnósticos.

Los reactivos, específicos del ensayo, se disponen en depósitos de reactivo agrupados de manera modular en un cartucho de reactivo. Los depósitos de reactivo están cerrados y se abren sólo inmediatamente antes de extraerse el reactivo, por ejemplo, al perforarse una tapa de cierre o una lámina con la aguja de pipeta del dispositivo de pipeteo. La cantidad de reactivo está definida sólo para un ensayo, por lo que la apertura del depósito es generalmente irreversible. Después de finalizar el proceso de determinación, el cartucho de reactivo o los cartuchos de reactivo se eliminan. De este modo desaparecen los problemas de extracción, manipulación y conservación de los reactivos que están asociados a depósitos de reserva de reactivo de mayor tamaño.

Es esencial que el sistema de análisis contenga tanto cartuchos de reactivo previstos para la determinación de parámetros clínico-químicos como cartuchos de reactivo para la determinación de parámetros

inmunodiagnósticos, de modo que es posible determinar parámetros de distintos sectores de la medicina de laboratorio.

5 A cada cartucho de reactivo está asignada de manera mecánica o lógica una cubeta de medición propia. La cubeta de medición forma parte del cartucho de reactivo o representa un componente separado. En el caso mencionado en primer lugar se trata de una cubeta de medición desechable que se utiliza y se elimina junto con el cartucho de reactivo. En el caso mencionado en último lugar se puede tratar también de una cubeta de medición de múltiples usos.

10 El parámetro clínico-químico se determina mediante aquella cubeta de medición que está asignada al cartucho de reactivo previsto para ejecutar el análisis del parámetro clínico-químico, y el parámetro inmunodiagnóstico se determina en cambio mediante aquella cubeta de medición que está asignada al cartucho de reactivo previsto para ejecutar el análisis del parámetro inmunodiagnóstico. Dado que cada determinación tiene lugar entonces en una cubeta de medición propia, varias determinaciones se pueden preparar en paralelo y transportar sucesivamente al dispositivo de medición.

15 Todas las cubetas de medición, alojadas en el rotor de proceso, se alimentan a la unidad de medición simplemente mediante la rotación del rotor de proceso alrededor de un eje de giro. No es necesario ni está previsto un transporte separado de las cubetas de medición. Las cubetas de medición están asignadas fijamente al respectivo cartucho de reactivo y se mueven sólo junto con éste.

20 Para garantizar esto, la unidad de medición está dispuesta en la zona del rotor de proceso, por ejemplo, por debajo del rotor. En este sentido resulta esencial también que todas las cubetas de medición se alimenten a la misma unidad de medición y puedan ser analizadas por ésta, independientemente de si se trata de la determinación de un parámetro clínico-químico o de la determinación de un parámetro inmunodiagnóstico.

Los cartuchos de reactivo contienen los depósitos de reactivo y opcionalmente líquidos funcionales, tales como líquidos de barrera, calibración, control de calidad, lavado, desinfección o limpieza.

25 La cubeta de medición se utiliza, por una parte, como depósito de reacción, en el que se desarrollan reacciones para la determinación de parámetros clínico-químicos. Por otra parte, la cubeta de medición se utiliza en la determinación de parámetros inmunodiagnósticos de tal modo que se lleva a cabo un pipeteo de un depósito de reacción a la cubeta de medición, mediante lo que se detiene directamente una reacción de comprobación que tiene lugar en el depósito de reacción.

30 Como resultado del pipeteo a la cubeta de medición se detiene en un momento definido la reacción que se desarrolla en el depósito de reacción, sin necesidad de utilizar reactivos de detención. Esto posibilita su ahorro y proporciona una exactitud de medición mayor. El pipeteo del sustrato convertido desde el depósito de reacción hasta la cubeta de medición garantiza en particular la combinación de la etapa de análisis de la determinación inmunológica y la etapa de análisis de la determinación clínico-química de muestras en la cubeta de medición y posibilita así la ejecución de ambos métodos de determinación en un único aparato simple de fabricación económica.

35 Tanto la determinación del parámetro clínico-químico como la determinación del parámetro inmunodiagnóstico se llevan a cabo mediante medición fotométrica de la muestra en la cubeta de medición asignada al respectivo cartucho de reactivo.

40 El procedimiento de análisis sirve, por ejemplo, para la determinación descentralizada de parámetros POC en muestras de suero, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo de distintos sectores de la medicina de laboratorio. De esta manera se pueden ejecutar con rapidez y exactitud análisis individuales necesarios para cada paciente, lo que posibilita una aplicación precoz de medidas terapéuticas o intervenciones profilácticas. Para aumentar el volumen se pueden interconectar varios de los sistemas de rotor simple.

45 La determinación del parámetro clínico-químico comprende en el caso más simple las siguientes etapas de procedimiento:

50 aa) recoger la muestra y un primer reactivo mediante el dispositivo de pipeteo, separados, dado el caso, por una burbuja de aire,

60 bb) pasar el primer reactivo y la muestra del dispositivo de pipeteo a la cubeta de reacción o la cubeta de medición, y

65 cc) incubar el primer reactivo con la muestra, reaccionando el primer reactivo con el parámetro clínico-químico, que está presente en la muestra y que se va a comprobar, para formar un producto que se puede comprobar de manera fotométrica mediante el dispositivo de medición.

Para la determinación de parámetros inmunodiagnósticos se utiliza preferentemente un cartucho de reactivo que presenta un depósito de reacción lleno previamente de un reactivo de sistema, específico del ensayo y preformulado, como fase sólida.

5

Partiendo de esto, la determinación comprende, por ejemplo, las siguientes etapas de procedimiento:

aa) recoger la muestra y un conjugado mediante el dispositivo de pipeteo, separados, dado el caso, por una burbuja de aire,

10

bb) pasar el conjugado y la muestra del dispositivo de pipeteo a un recipiente, recubierto con una fase sólida, dentro del cartucho de reactivo,

cc) incubar la fase sólida con conjugado y muestra,

15

dd) eliminar el conjugado y la muestra sobrantes mediante lavado de la fase sólida,

ee) recoger sustrato de un segundo depósito de reactivo mediante el dispositivo de pipeteo,

20

ff) pasar el sustrato del dispositivo de pipeteo a la fase sólida,

gg) incubar el sustrato sobre la fase sólida,

hh) recoger el sustrato convertido mediante el dispositivo de pipeteo,

25

ii) pasar el sustrato convertido del dispositivo de pipeteo a la cubeta de medición, y

jj) medir la concentración del sustrato convertido con ayuda del dispositivo de medición.

30

Otras configuraciones ventajosas del procedimiento según la invención se derivan de las reivindicaciones secundarias. Siempre que configuraciones del procedimiento de análisis, indicadas en las reivindicaciones secundarias, estén representadas en las formas de realización mencionadas en las reivindicaciones secundarias sobre el dispositivo de análisis según la invención, se remite a las explicaciones anteriores sobre las reivindicaciones correspondientes del dispositivo para una explicación suplementaria.

35

El procedimiento de análisis según la invención se puede implementar en particular mediante un aparato de análisis de rotor simple portátil que se explica en detalle a continuación.

Este sistema de análisis de rotor simple está equipado con un dispositivo de alojamiento para al menos un recipiente de muestra para alojar la muestra, un rotor de proceso para alojar al menos un depósito de reactivo que contiene un reactivo específico del ensayo, un dispositivo de pipeteo, un dispositivo de pipeteo, una estación de lavado para el dispositivo de pipeteo, un dispositivo de medición para determinar una propiedad física de la muestra en una cubeta de medición y una unidad de control para controlar el accionamiento del rotor de proceso, así como para controlar el funcionamiento del dispositivo de pipeteo y del dispositivo de medición,

45

(a) presentando el rotor de proceso una pluralidad de alojamientos, en los que se pueden insertar respectivamente cartuchos de reactivo de un primer tipo y cartuchos de reactivo de un segundo tipo, estando agrupados en los cartuchos de reactivo del primer tipo varios depósitos de reactivo con reactivos para la determinación de parámetros clínico-químicos y estando agrupados en los cartuchos de reactivo del segundo tipo varios depósitos de reactivo con reactivos para la determinación de parámetros inmunodiagnósticos,

50

(b) estando asignada a cada cartucho de reactivo una cubeta de medición individual, a la que está asignado un alojamiento en el rotor de proceso, y

(c) comprendiendo el dispositivo de medición una unidad de medición óptica que está dispuesta en la zona del rotor de proceso y se puede utilizar para una determinación analítica de cada una de las cubetas de medición y a la que se alimenta la cubeta de medición para la medición mediante la rotación del rotor de proceso alrededor de su eje de giro.

55

El sistema de análisis comprende un aparato de análisis y cartuchos de reactivo. El aparato de análisis funciona correctamente con un único rotor, el rotor de proceso, que contiene reactivos, depósitos wells, así como cubetas de medición y resulta, por tanto, particularmente compacto y económico. La forma del rotor comprende realizaciones en forma de anillo y disco.

60

En cada cartucho de reactivo están agrupados de manera modular varios depósitos de reactivo, en los que se

65

- 5 disponen los reactivos específicos del ensayo. Los depósitos de reactivo están cerrados y se abren sólo inmediatamente antes de extraerse el reactivo, por ejemplo, al perforarse una tapa de cierre o una lámina con la aguja de pipeta del dispositivo de pipeteo. La cantidad de reactivo está definida sólo para un ensayo, por lo que la apertura del depósito es generalmente irreversible. Después de finalizar el proceso de determinación, el cartucho de reactivo o los cartuchos de reactivo se eliminan. De este modo desaparecen los problemas de extracción, manipulación y conservación de los reactivos que están asociados a depósitos de reserva de reactivo de mayor tamaño y se necesita un espacio comparativamente menor. Esto contribuye a la compactibilidad y a un manejo más fácil del sistema de análisis.
- 10 A este respecto es esencial que el sistema de análisis contenga tanto cartuchos de reactivo previstos para la determinación de parámetros clínico-químicos (estos se identifican a continuación también como “cartuchos de reactivo de primer tipo”) como cartuchos de reactivo para la determinación de parámetros inmunodiagnósticos (estos se identifican a continuación también como “cartuchos de reactivo de segundo tipo). De este modo es posible determinar parámetros de distintos sectores del diagnóstico de laboratorio en un aparato de análisis simple con sólo un rotor.
- 15 A esto contribuye el hecho de que a cada cartucho de reactivo está asignada de manera mecánica o lógica una cubeta de medición individual propia. La cubeta de medición forma parte del cartucho de reactivo o representa un componente separado dentro del rotor de proceso.
- 20 En el caso mencionado en primer lugar se trata de una cubeta de medición desechable que se utiliza y se elimina junto con el cartucho de reactivo. En el caso mencionado en último lugar se puede tratar también de una cubeta de medición de múltiples usos mediante procesos de lavado previstos. Preferentemente, la cubeta de medición está fija respecto al cartucho de reactivo correspondiente, en el sentido de que no se mueve por separado, sino junto con el cartucho de reactivo desde el comienzo hasta el final de la determinación.
- 25 Por tanto, el transporte de las cubetas de medición hacia la unidad de medición óptica se realiza en particular también sólo mediante la rotación del rotor de proceso alrededor de un eje de giro. A tal efecto, la unidad de medición está dispuesta en la zona del rotor de proceso, por ejemplo, por debajo del rotor.
- 30 En el caso de análisis clínico-químicos, en la cubeta de medición tiene lugar al mismo tiempo la reacción específica del ensayo, mientras que en el caso inmunológico, la reacción tiene lugar en un recipiente separado (en un llamado “well”) y se pipetea a continuación a esta cubeta de medición.
- 35 Cada determinación se lleva a cabo en una cubeta de medición propia y todas las cubetas de medición están asignadas (fijamente) sólo a un rotor de proceso y pueden ser transportadas por éste a la unidad de medición. Se pueden preparar en paralelo determinaciones clínicas e inmunológicas y ejecutar sucesivamente en un aparato de análisis compacto pequeño.
- 40 En este sentido es importante que el dispositivo de medición comprenda una unidad de medición óptica que se puede utilizar para una determinación analítica de cada una de las cubetas de medición, o sea, tanto de las cubetas de reacción y medición asignadas a los cartuchos de reactivo del primer tipo como a las cubetas de medición asignadas a los cartuchos de reactivo del segundo tipo. Todas las cubetas de medición se pueden alimentar a la unidad de medición óptica y, por tanto, todas las pruebas se pueden analizar con el mismo sistema de medición óptico. De este modo es innecesario proporcionar varios sistemas de medición para los diferentes métodos de medición, lo que influye ventajosamente sobre la compactibilidad, la movilidad, la facilidad de manejo y mantenimiento, así como sobre el precio del sistema de análisis.
- 45 Los cartuchos de reactivo contienen los depósitos de reactivo y opcionalmente líquidos funcionales, tales como líquidos de barrera, calibración, control de calidad, lavado, desinfección o limpieza.
- 50 El aparato de análisis es autárquico y se puede utilizar, por ejemplo, para la determinación descentralizada de parámetros POC en suero, plasma, líquido cefalorraquídeo u orina de distintos sectores del diagnóstico in vitro, por ejemplo, para la determinación de una pluralidad de metabolitos, así como para la comprobación general de proteínas. Las aplicaciones pueden ser, por ejemplo, la detección de la función hepática, diabetes, enfermedades cardíacas, inflamaciones, embarazos, infecciones, enfermedades virales, alergias, enfermedades autoinmunes, cáncer, monitoreo acompañado de terapia, enfermedades de la glándula tiroidea o también el abuso de estupefacientes.
- 55 El sistema de análisis de uso universal permite ejecutar con rapidez y exactitud el volumen de análisis individuales necesarios para cada paciente y posibilita así una aplicación precoz de medidas terapéuticas o intervenciones profilácticas.
- 60 Dado que todos los materiales de ensayo específicos necesarios están presentes en el cartucho de reactivo y sus cantidades están ajustadas a un único ensayo, el aparato de análisis puede ejecutar al mismo tiempo y
- 65

sucesivamente una gran cantidad de ensayos diferentes, sin necesidad de disponer otros depósitos al respecto. Para aumentar el volumen de determinaciones se pueden interconectar también varios de los sistemas de rotor simple.

5 Dado que los reactivos se consumen convenientemente poco después de insertarse el cartucho de reactivo en el aparato de análisis y, por tanto, permanecen en el aparato sólo durante un corto período de tiempo, no es necesario enfriar los cartuchos. Esto contribuye a la compactibilidad del aparato de análisis, a un manejo fácil, así como a costes de equipamiento favorables en general.

10 Con respecto en particular a un uso compacto y universal del sistema de análisis ha resultado ventajoso que la cubeta de análisis se pueda utilizar simultáneamente como depósito de reacción, en el que se desarrollan reacciones para la determinación de parámetros clínico-químicos. Por tanto, se utiliza una cubeta de medición, en la que se realiza exclusivamente una medición (determinaciones inmunológicas) o en la que se pueden desarrollar adicionalmente también reacciones químicas.

15 Los alojamientos para los cartuchos de reactivo del primer tipo y del segundo tipo presentan preferentemente una construcción igual, extendiéndose los mismos en dirección radial.

20 La extensión radial de los cartuchos de reactivo dentro del rotor de proceso permite una instalación en un espacio lo más reducido posible, lo que contribuye a una construcción compacta del sistema de análisis. El hecho de que los alojamientos para los cartuchos de reactivo presenten una construcción igual, posibilita una carga óptima, porque todos los alojamientos se pueden ocupar tanto con cartuchos de reactivo del primer tipo como del segundo tipo.

25 Ha resultado favorable que los depósitos de reactivo y la cubeta de medición estén agrupados en una disposición lineal en cada uno de los alojamientos del rotor de proceso, estando dispuesta la cubeta de medición en la zona de un lado exterior del rotor de proceso.

30 En caso de un rotor de proceso en forma de disco, la cubeta de medición o las cubetas de medición están situadas en la zona de la superficie exterior de envoltura cilíndrica y en caso de un rotor anular, en la zona de la superficie interior o exterior de envoltura cilíndrica. El sistema de medición óptico está dispuesto en correspondencia con esto, irradiando el rayo de medición la cubeta de medición generalmente por el lateral.

35 Ha resultado eficaz que al menos tres depósitos de reactivos estén agrupados respectivamente en un cartucho de reactivo.

40 Una cantidad mínima de tres depósitos de reactivo es ventajosa, porque muchas determinaciones requieren una cantidad correspondiente de reactivos o de otros líquidos funcionales. Estas determinaciones no se podrían ejecutar con menos de tres reactivos o estos se tendrían que colocar en dos o más cartuchos de reactivo, lo que requiere un mayor coste de programación y cuidado.

Se prefiere una forma de realización del sistema de análisis, en el que el cartucho de reactivo comprende un depósito de reacción provisto de un recubrimiento específico del ensayo.

45 El cartucho de reactivo presenta, además de los depósitos de reactivo llenos de reactivos, al menos un depósito de reacción que puede estar provisto de una fase sólida específica del ensayo, en particular también como recubrimiento interior de este depósito de reacción. Las etapas de reacción y pipeteo, necesarias para el ensayo específico, no se ejecutan aquí en la cubeta de medición, sino en el depósito de reacción. Para realizar la medición se pipetea a continuación del depósito de reacción a la cubeta de medición. Este tipo de cartuchos de reactivo es adecuado en particular para determinaciones inmunológicas heterogéneas. Aquí tiene lugar una detención simultánea de la reacción inmunológica.

55 La cubeta de medición es preferentemente independiente del cartucho de reactivo. En caso de una cubeta de medición unida mecánicamente con el cartucho de reactivo se consigue un equipamiento más fácil del aparato de análisis. En caso de una cubeta de medición no unida mecánicamente con el cartucho de reactivo se consiguen, sin embargo, mayores libertades en la producción del cartucho de reactivo, porque la cubeta de medición no interfiere en el proceso de llenado. Si la cubeta de medición está diseñada para un uso múltiple, resulta ventajosa una cubeta de medición separada. No obstante, ésta se deberá lavar con mucho cuidado por razones de contaminación.

60 Los depósitos de reactivo pueden estar fabricados de un material flexible, así como diseñados, por ejemplo, en forma de bolsas colocadas en envolturas de un material rígido. Sin embargo, los depósitos de reactivo están fabricados preferentemente de un plástico rígido y están sellados al vacío con una lámina que se perfora con la aguja de pipeta para extraer los reactivos.

65

Tales cartuchos se pueden identificar claramente, por ejemplo, mediante una codificación de barras situada sobre la superficie de la lámina.

5 Los cartuchos de reactivo se pueden fabricar de manera económica, por ejemplo, como piezas moldeadas por extrusión e inyección o piezas moldeadas por extrusión y soplado.

La cubeta de medición presenta preferentemente lados frontales planoparalelos que sirven como superficies de irradiación para un rayo de medición de la unidad de medición óptica.

10 La cubeta de medición es irradiada en el lateral, lo que evita problemas relativos al ajuste, el nivel de llenado y el menisco que se pueden originar en caso de una radiación en dirección del eje longitudinal de la cubeta y pueden producir resultados de medición inexactos. Esta medida contribuye, por tanto, a la fiabilidad del resultado de medición y a un menor coste de mantenimiento.

15 **Ejemplo de realización**

La invención se explica detalladamente a continuación por medio de ejemplos de realización y un dibujo. En el dibujo muestran:

20 **Figura 1** una forma de realización de un sistema de análisis con un aparato de análisis en forma de un sistema de rotor simple y cartuchos de reactivo en una vista tridimensional (sin carcasa);

Figura 2 una vista en planta del aparato de análisis en representación esquemática;

25 **Figura 3** un cartucho de reactivo para el uso en el sistema de análisis según la invención en una vista lateral; y

Figura 4 una cubeta de medición para el uso en el sistema de análisis en vista tridimensional.

30 El sistema de análisis, mostrado en la **figura 1**, para la analítica médica comprende un aparato de análisis 1 diseñado como sistema de rotor simple, una pluralidad de cartuchos de reactivo 2 y la misma cantidad de cubetas de medición 3.

35 Los componentes esenciales del aparato de análisis 1 son un rotor de proceso 15 calentable opcionalmente, una pieza de alojamiento 4 para recipientes de muestra 5, un dispositivo de pipeteo 6 unido a un dispositivo de elevación/pivotado 7 que presenta un brazo de pipeteo 13 y un tubo de acero conformado como aguja de pipeta 18, una estación de lavado 8 para la aguja de pipeta 18, una unidad de medición fotométrica 20 con detector, que está dispuesta por debajo del rotor de proceso 15, así como un escáner dispuesto por encima del rotor de proceso 15 para la identificación de los cartuchos de reactivo 2. Con el fin de controlar los movimientos accionados por motor del rotor de proceso 15, del dispositivo de pipeteo 6, del dispositivo de elevación/pivotado 7, así como con el fin de identificar las muestras, ejecutar y evaluar la medición fotométrica está prevista una unidad de control central dispuesta dentro de la carcasa del aparato de análisis.

45 El rotor de proceso 15 comprende un anillo de alojamiento 9 que puede rotar alrededor de un eje de rotación orientado en vertical y que presenta cuarenta orificios iguales en forma de ranura para el alojamiento de cartuchos de reactivo 2. En la representación de la figura 4, los orificios en forma de ranura están ocupados y no se pueden observar debido a los cartuchos de reactivo 2 insertados en los mismos.

50 El anillo de alojamiento 9 se acciona mediante un motor paso a paso controlado 11. Los orificios del rotor de proceso 15 se extienden a partir de la circunferencia radialmente hacia adentro. Los orificios presentan respectivamente, además del alojamiento para el cartucho de reactivo 2, una posición de alojamiento para una cubeta de medición 3.

55 Los cartuchos de reactivo 2 comprenden cuatro depósitos 24, 25 (véase figura 3), fabricados de un plástico rígido, que se encuentran dispuestos en una hilera y unidos entre sí. Una cubeta de medición 3 está dispuesta respectivamente en una hilera con un cartucho de reactivo 2 en la superficie exterior de envoltura cilíndrica del rotor de proceso 15. La longitud de la cubeta de medición 3 está dimensionada de modo que sobresale de los depósitos de reactivo 24, 25, por lo que en la sección longitudinal sobresaliente se puede realizar la medición fotométrica.

60 En la pieza de alojamiento 4 están dispuestos los recipientes de muestra 5 en una trayectoria semicircular, cuyo punto central se forma mediante el eje de rotación del brazo de pipeteo 13.

65 La estación de lavado de pipeta 8 comprende un recipiente de lavado con desagüe para un líquido de lavado. Mediante la estación de lavado de pipeta 8 se limpia la aguja de pipeta 18 antes de cada análisis.

- 5 El dispositivo de elevación/pivotado 7 comprende asimismo un motor paso a paso 19, así como otro motor paso a paso 21 que posibilita un movimiento vertical del dispositivo de pipeteo 6. Este dispositivo permite mover de manera reversible la aguja de pipeta 18 entre una primera posición de trabajo en el lado de la pieza de alojamiento de muestra 4 y varias posiciones de trabajo en el lado del rotor de proceso 15 y otra posición de trabajo en la zona de la estación de lavado 8. En este caso, cada depósito 24; 25 de los cartuchos de reactivo y las cubetas de medición 3 se pueden trasladar a la zona de trabajo de la aguja de pipeteo mediante la rotación del rotor de proceso 15.
- 10 Con un escáner se pueden identificar los cartuchos de reactivo 2 provistos de un código de barras individual. La calidad de las cubetas de medición 3 se puede evaluar con ayuda de la unidad óptica 20.
- 15 Está prevista además una unidad de aclarado 22 que sirve para lavar un depósito de reacción recubierto (25) con el fin de eliminar el conjugado y el material de muestra después de la reacción inmunológica, como se explica en detalle más adelante.
- 20 La forma de realización del cartucho de reactivo 2, mostrada en la **figura 3**, comprende en total cuatro depósitos 24; 25 para el alojamiento de reactivos. Los depósitos de reactivo 24; 25 están fabricados de un plástico rígido y abiertos por arriba. En el estado no usado, el orificio se encuentra cerrado con una lámina. Los depósitos de reactivo 24, 25 están unidos entre sí de manera no separable mediante nervios 23. El extremo delantero del cartucho de reactivo 2, dirigido hacia la envoltura exterior cilíndrica del rotor de proceso 15, está provisto de una brida 26 que permite fijar el cartucho de reactivo 2 en uno de los orificios del rotor de proceso 3.
- 25 En principio se pueden utilizar todos los depósitos 24; 25 para el alojamiento de reactivos líquidos para determinaciones en el campo de la química clínica y de la inmunología. No obstante, el depósito delantero 25 puede presentar también un recubrimiento interior con una fase sólida y servir simultáneamente como depósito de reacción. El cartucho de reactivo 2 con esta configuración está diseñado en particular para determinaciones inmunológicas.
- 30 La cubeta de medición 15, mostrada en la **figura 4**, presenta un fondo redondo 25 y dos paredes planoparalelas 17 que se irradian con el rayo de medición del sistema de medición óptico durante la medición. Se trata de una cubeta de medición de uso universal, en la que se realiza exclusivamente una medición o en la que se pueden desarrollar adicionalmente también reacciones químicas.
- 35 En el caso de la unidad de medición fotométrica 20 se trata de una unidad de medición que en el procedimiento de irradiación puede medir absorciones hasta doce longitudes de onda diferentes en el intervalo de 340 nm a 800 nm. Además, son posibles mediciones turbidimétricas en el mismo intervalo de longitud de onda. Por tanto, la unidad de medición se puede utilizar para mediciones fotométricas de muestras típicas en el campo de la química clínica y la inmunología.
- 40 A continuación se explican detalladamente el funcionamiento del sistema de análisis y un ejemplo de realización del procedimiento, según la invención, por medio de las figuras 1 a 4.
- En una muestra de suero o plasma se deben analizar varios parámetros inmunológicos y clínico-químicos.
- 45 La muestra se dispone en el recipiente de muestra 5 y éste se inserta en el dispositivo de alojamiento 4. Los parámetros a determinar se introducen mediante un teclado y a continuación, el aparato de análisis 1 solicita los cartuchos de reactivo 2, necesarios al respecto, que están provistos de un código de barras para la identificación. Estos se insertan junto con una cubeta de medición 3 respectivamente en el rotor de proceso 15.
- 50 Mediante la rotación alrededor del eje de rotación del rotor de proceso 15, todos los cartuchos de reactivo 2 insertados se guían por debajo del escáner 13 y las informaciones del código de barra se leen y se transmiten a la unidad de control central.
- 55 Para la ejecución de un análisis inmunológico, el rotor de proceso 15 se provee, por ejemplo, de un cartucho de reactivo 2, en el que uno de los depósitos de reactivo 25 está recubierto en su pared interior de una fase sólida. Este depósito de reactivo 25 sirve simultáneamente como depósito de reacción. Otro de los depósitos de reactivo 24 del cartucho de reactivo 2 contiene un reactivo con un conjugado y otro de los depósitos de reactivo 24 contiene un sustrato.
- 60 El dispositivo de elevación/pivotado 7 mueve el dispositivo de pipeteo 6 de su posición de reposo a la primera posición de trabajo, hacia la que se transporta al mismo tiempo el recipiente de muestra 5. La aguja de pipeta 18 se introduce mínimamente en la muestra de manera controlada mediante una identificación de nivel de líquido, y un dispositivo de succión (no representado en las figuras) succiona una cantidad de muestra predeterminada, controlándose este proceso de succión mediante la unidad de control central.
- 65

ES 2 541 215 T3

La aguja de pipeta 18 se eleva a continuación y se desplaza a su segunda posición de trabajo en la zona del rotor de proceso 15, moviéndose al mismo tiempo el depósito de reactivo 25 hacia esta posición de trabajo mediante la rotación del rotor de proceso 15. Al descender la aguja de pipeta 18, ésta atraviesa una lámina de protección del depósito de reactivo 25 y absorbe reactivo, separado, dado el caso, por una burbuja de aire.

5

A continuación, la muestra absorbida se pasa junto con el reactivo al recipiente de reacción recubierto.

La aguja de pipeta 18 se mueve después hacia la estación de lavado 8 y se aclara intensamente desde el interior con líquido de lavado hasta quedar limpia.

10

Después de tiempos de incubación individuales del ensayo, los reactivos, que reaccionan, se eliminan del depósito de reacción recubierto 25 mediante lavado con ayuda de la unidad de aclarado 22. A continuación, los reactivos se extraen sucesivamente de los otros dos depósitos de reactivo 24 mediante el dispositivo de pipeteo 6 y se alimentan al depósito de reacción 25, estando almacenadas las etapas de análisis para el ensayo específico en la unidad de control central y procesándose sucesivamente de manera controlada por software.

15

Al finalizar la reacción, la muestra se pipetea del depósito de reacción 25 a la cubeta de medición 3. De esta manera se detiene inmediatamente la reacción que se desarrolla por último en el depósito de reacción.

20

El rotor de proceso 15 se rota seguidamente, hasta que los lados planos 17 de la cubeta de medición 15 queden situados en el rayo de medición de la unidad de medición óptica 20. Aquí se realiza ahora de manera conocida el análisis fotométrico de la mezcla que está formada por el reactivo y la muestra y está contenida en la cubeta de medición 3.

25

Los datos determinados por la unidad de medición se envían a la unidad de control central para su evaluación. El resultado de medición se almacena en una memoria y se visualiza en una pantalla.

Para realizar una determinación en la misma prueba en el campo de la química clínica (por ejemplo, la determinación de glucosa en sangre), el rotor de proceso 15 se provee, por ejemplo, de un cartucho de reactivo 2, en el que el depósito de reactivo delantero 25 contiene una unidad de glucosa oxidasa (GOD) y el depósito de reactivo siguiente 24 contiene una unidad de peroxidasa (POD). La toma de muestra, las operaciones de lavado, la medición fotométrica y la evaluación y salida de los resultados de medición se llevan a cabo de manera similar, como se describe arriba por medio de la determinación inmunológica, eliminándose la operación de lavado del depósito de reacción recubierto 25 y desarrollándose la reacción directamente en la cubeta de medición 3.

30

La aguja de pipeteo, llena de reactivo y muestra, se desplaza a la segunda posición de trabajo en la zona del rotor de proceso 15, moviéndose simultáneamente la cubeta de medición 3 a esta posición de trabajo mediante la rotación del rotor de proceso 15. La aguja de pipeteo 18 pasa el reactivo con la muestra a la cubeta de medición 3. Después de un tiempo de espera de incubación, el segundo reactivo se extrae del depósito de reactivo 24 mediante el dispositivo de pipeteo 6 y se alimenta asimismo a la cubeta de medición 4.

40

Al finalizar la reacción, el rotor de proceso 15 se rota hasta que los lados planos 17 de la cubeta de medición 15 queden situados en el rayo de medición de la unidad de medición óptica 20, de modo que se puede realizar el análisis fotométrico de la mezcla que está formada por el reactivo y la muestra y contenida en la cubeta de medición 3. En este caso se pueden realizar tanto determinaciones del punto final como determinaciones cinéticas.

45

La cantidad de reactivos en los cartuchos de reactivo 2 está ajustada respectivamente a una única determinación. Los cartuchos de reactivo vacíos 2 y las cubetas de medición 3 se eliminan al finalizar el proceso de análisis.

50

El sistema de análisis posibilita de manera correspondiente la determinación simultánea de una gran cantidad de parámetros clínico-químicos e inmunológicos para varias muestras de medición.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el análisis automatizado de una muestra mediante la utilización de un sistema de análisis de rotor simple, en el que la muestra a determinar, dispuesta en un recipiente de muestra (5), se alimenta mediante un dispositivo de pipeteo (6), movido por un dispositivo de elevación/pivotado (7), a un depósito de reacción (25) y/o una cubeta de medición (3) que está disponible en un rotor de proceso (15) junto con al menos un depósito de reactivo (24; 25) que contiene un reactivo específico del ensayo, y se alimenta a continuación en la cubeta de medición (3) a un dispositivo de medición (20) después de ejecutarse una secuencia de etapas de análisis, específica del ensayo, mediante la utilización de al menos un reactivo para determinar una propiedad física de la muestra, **caracterizado por que**
- (a) se utiliza un rotor de proceso (15) que presenta una pluralidad de alojamientos (14), en los que se pueden insertar respectivamente cartuchos de reactivo (2) de un primer tipo y cartuchos de reactivo (2) de un segundo tipo, estando agrupados en los cartuchos de reactivo del primer tipo varios depósitos de reactivo (24; 25) con reactivos para la determinación de parámetros clínico-químicos, sobre la base de reacciones enzimáticas y otras reacciones químicas para el análisis de azúcares, grasas y proteínas, y estando agrupados en los cartuchos de reactivo del segundo tipo varios depósitos de reactivo (24; 25) con reactivos para la determinación de parámetros inmunológicos heterogéneos, sobre la base de interacciones específicas entre antígenos y anticuerpos mediante la utilización de una fase sólida, estando asignada a cada cartucho de reactivo (2) una cubeta de medición individual (3), a la que está asignado un alojamiento en el rotor de proceso,
- (b) se determina un parámetro clínico-químico mediante la cubeta de medición (3) que está asignada al cartucho de reactivo (2) del primer tipo, utilizándose la cubeta de medición (3) como depósito de reacción, en el que se desarrollan reacciones para la determinación del parámetro clínico-químico, y
- (c) se determina un parámetro inmunodiagnóstico mediante la cubeta de medición (3) asignada al cartucho de reactivo (2) del segundo tipo, comprendiendo la determinación de parámetros inmunodiagnósticos las siguientes etapas:
- (c1) pasar un sustrato al depósito de reacción (25) recubierto con la fase sólida,
- (c2) incubar el sustrato sobre la fase sólida por conversión, y
- (c3) pipetear del depósito de reacción (25) a la cubeta de medición (25) para medir el sustrato convertido, deteniéndose directamente mediante el pipeteo una reacción que se desarrolla en el depósito de reacción (25),
- alimentándose mediante la rotación del rotor de proceso (15) alrededor de su eje de giro cada una de las cubetas (3) al dispositivo de medición (20), que comprende una unidad de medición óptica dispuesta en la zona del rotor de proceso (15) y utilizada para la respectiva determinación analítica de parámetro, para ser analizada mediante el mismo sistema de medición óptico.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los cartuchos de reactivo (2) del primer y del segundo tipo presentan una construcción igual.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** los depósitos de reactivo (24; 25) y la cubeta de medición (3) están agrupados en una disposición lineal y por que la cubeta de medición (3) está dispuesta en la zona de un lado exterior del rotor de proceso (15).
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** se utiliza un cartucho de reactivo (2) que presenta un depósito de reacción (25) lleno de un reactivo de sistema, específico del ensayo y preformulado, como fase sólida.

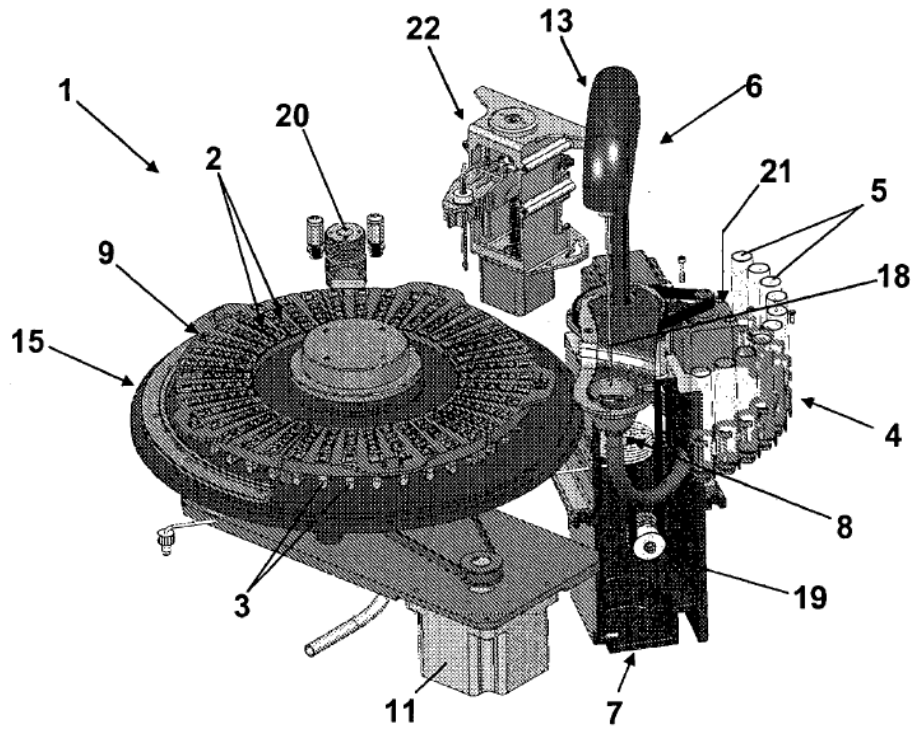


Fig. 1

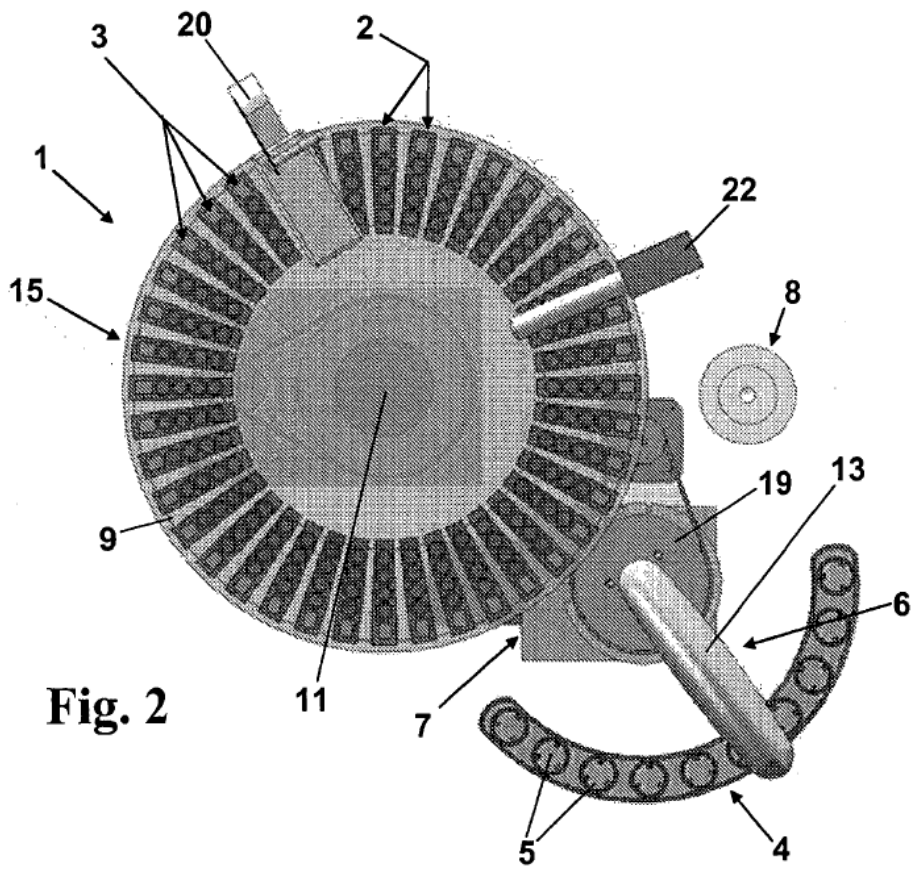


Fig. 2

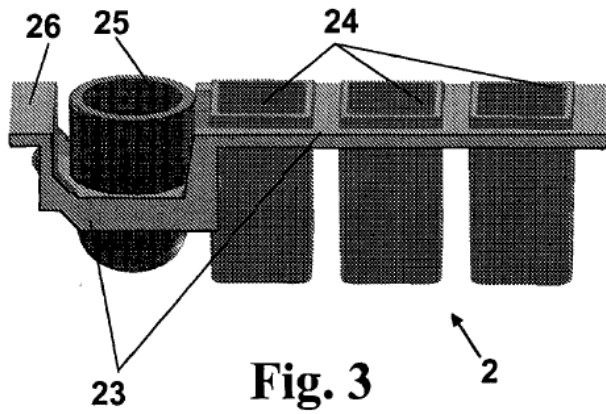


Fig. 3

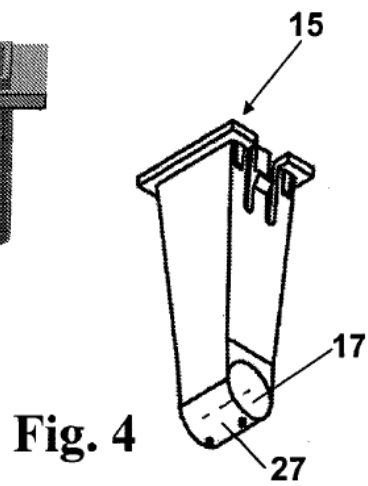


Fig. 4