

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 606**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (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: **02.07.2010 E 10727004 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2448677**

54 Título: **Sistema de análisis de diagnóstico inmediato (POC) y procedimiento para aplicar una muestra**

30 Prioridad:

02.07.2009 DE 102009033008

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

15.07.2016

73 Titular/es:

**DST DIAGNOSTISCHE SYSTEME &
TECHNOLOGIEN GMBH (100.0%)
Güterbahnhofstr. 16
19059 Schwerin, DE**

72 Inventor/es:

**VON OLLESCHIK-ELBHEIM, LARS;
HÜNKEN, MARK y
DANGERS, MARC**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 577 606 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 DE DIAGNÓSTICO INMEDIATO (POC) Y PROCEDIMIENTO PARA APLICAR UNA MUESTRA

La presente invención se refiere a un sistema de análisis o sistema analítico (sistema de detección) y a un procedimiento o método de análisis, que utiliza preferiblemente un diagnóstico inmediato (PoC).

En la investigación, el diagnóstico o en otros múltiples campos de aplicación los ensayos de laboratorio analíticos que sirven para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de moléculas, analitos o bien para determinar su actividad o composición, representan la base de enunciados trascendentales hasta para el desarrollo de nuevos procedimientos o dispositivos. La base son los métodos en general conocidos de la analítica del DNA/RNA o bien de la analítica proteínica. Otro ejemplo son la multitud de procedimientos y métodos analíticos que se emplean para las reacciones de anticuerpos, las conocidas reacciones inmunológicas, que se emplean para la determinación de biomarcadores y muchas otras sustancias /analitos.

Se conocen los procedimientos de ensayos rápidos, como el Lateral-Flow-test(LFT), Flow-Through-Test (FTT), Agglutinations-Test (AT) p Soldi-Phase-Test(SPT). Todos estos procedimientos sirven para la detección rápida de analitos sin la utilización de aparatos y son adecuados para la evaluación visual.

Se conoce un principio analítico serio descrito en la tecnología actual como el análisis inmunológico (IA) para el diagnóstico in vitro, conocido también como EIA o "binding assay"("sándwich") (ver por ejemplo, EP0171150B1, EP 0063810B1). Además se conoce, por ejemplo, la detección fluorimétrica de la IgE en el campo de los análisis de fijación de la EP0119613 B1. Además se hace referencia al escrito de Roger P. Ekins (por ejemplo, WO 8401031 u.v.a.).

También desde finales de los años 80 se conoce un análisis de fijación o unión, soportado por una membrana, en particular de la IgE de la sangre en alérgenos. Por ejemplo en el CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 101, nr. 25, del 17 de diciembre de 1984, página 578, abstract nr. 228190b, Columbus, Ohio, US; B.J. WALSH y cols.: "Allergen discs prepared from nitrocellulose: detection of IgE binding to soluble and insoluble allergens", & J. IMMUNOL. METHODS 1984, 72(1) 139-45.

Para un análisis de diagnóstico inmediato se ha descrito, por ejemplo, el Fast-Check-PoC (ver EP1718970) que se basa en un análisis de fijación soportado por una membrana y sirve para detectar alergias en la sangre entera.

Sin embargo, existe una gran necesidad de mejorar el sistema de análisis de diagnóstico inmediato (PoC).

Un problema en particular es la humectación simultánea de las muestras de cada uno de los lugares de detección. Esto es preciso para reproducir y obtener un resultado de elevado valor cualitativo.

Un problema significativo similar es la humectación de las zonas de detección con la misma cantidad de líquido de muestra.

En la tecnología actual se conocen sistemas de tubos para los inmunoanálisis, por ejemplo de la WO2002072264, que permiten una adición de muestras controlada y definida sobre una membrana.

En general es un inconveniente que los sistemas de tubos o de conductos conocidos no garanticen una aportación uniforme o bien homogénea de cada una de las muestras procedente de una muestra global.

Por lo tanto el cometido de la presente invención es disponer de una adición de muestras mejorada para un sistema de análisis PoC, que dé lugar a un mejor resultado.

Sorprendentemente este cometido se resuelve mediante la reivindicación 1. De acuerdo con la invención se ha previsto un método de análisis en el que

- a) Al menos un reactivo de prueba o análisis se fija a una primera superficie, y en el dorso de la misma se configura una segunda superficie,
- b) Al menos un líquido de muestra se hace pasar por un conducto de muestra, donde el conducto de muestra conduce a una zona de descarga que se encuentra frente a la segunda superficie, en el que la segunda superficie puede humedecerse al menos en una región que está frente al área de descarga,
- c) Y el fluido de muestra sale por el conducto de muestra a través de su abertura de descarga como resultado de la presión aplicada, y dicho fluido forma una gota que se adhiere a la abertura de la zona de descarga,
- d) Donde el contacto se produce entre la gota y un punto húmedo en la segunda superficie, de manera que como resultado de la presión aplicada al conducto de muestra, la gota se hace más grande y entra en contacto con el punto humedecido,

e) El líquido de muestra, como un resultado directo del contacto establecido con el punto humedecido o bien como resultado de la acción capilar de la primera superficie y/o de la presión aplicada al conducto de muestra, penetra desde la segunda superficie hacia la primera superficie o bien viaja hasta la primera superficie y reacciona con el reactivo de análisis,

5 f) El conducto de muestra tiene una forma tal que se ensancha hacia el extremo que mira la zona de descarga y una gota humedece parcialmente la zona ensanchada.

Los tipos de realización preferidos y las configuraciones se deducen de las subreivindicaciones.

10 Un reactivo de análisis puede contener, por ejemplo, sustancias como péptidos, proteínas, enzimas o bien sus sustratos, ligandos o receptores, anticuerpos o antígenos, ADN, ARN, así como moléculas de origen no bioquímico, como el yodo. Los reactivos de análisis pueden contener combinaciones de estos tipos de moléculas o bien de sus fragmentos, conjugados, formas modificadas, algo glucosiladas o bien fosforiladas. Los lípidos y azúcares están
15 asimismo comprendidos conforme a la invención. Además las sustancias naturales y los extractos naturales pueden presentarse en los reactivos de análisis como ocurre con frecuencia en las pruebas de alergia o de intolerancia a alimentos.

La zona de descarga y/o la primera y/o segunda superficie de un soporte de detección pueden ser de vidrio, plástico, en particular plástico transparente. Se prefieren los policarbonatos como por ejemplo Makrolon, las olefinas policíclicas, como Topaz, polipropileno, PMMA o poliimidias. La superficie puede revestirse, por ejemplo con proteínas, en particular anticuerpos, azúcares como por ejemplo los dextranos, o bien con metales, vidrio o plásticos o derivados de carbono como por ejemplo, nanotubos de carbono.

20 Uno o varios reactivos de análisis se fijan a la primera superficie. De acuerdo con la invención los reactivos de análisis se pueden fijar en una capa por debajo de la primera superficie. Los reactivos de análisis se pueden secar por ejemplo en la superficie, solos o bien en una matriz estabilizante o bien aplicarse como liofilizado y disolverse humedeciendo la superficie. La fijación puede realizarse utilizando interacciones no covalentes, como por ejemplo las que existen entre anticuerpos y proteína A, entre la biotina y la estreptavidina, entre la hexa-histidina y níquel-NTA o bien en pares de bases de ADN. Además un elemento de los reactivos de análisis puede formar un enlace covalente
25 en la primera superficie. En una configuración preferida el reactivo de análisis se mantiene fijado por humectación básicamente a la primera superficie, en particular en una proporción mayor al 50%.

Un líquido de muestra puede ser una sustancia cualquiera o una mezcla de sustancias, si es preciso junto con un disolvente de cualquier origen, proceder en particular de una planta o de un animal, en especial de un animal mamífero, especialmente de un ser humano. El líquido de muestra puede contener por ejemplo sangre completa, plasma, suero, saliva, líquido lagrimal, orina, líquido cerebral, secreciones o bien formas procesadas de dichos líquidos, como la sangre estabilizada con EDTA.

35 El conducto de muestra puede disponer de un medio de presurización. En una configuración preferida puede tratarse de una abertura de llenado o de un tapón de llenado en el que se ha insertado una jeringa con la que el usuario puede ejercer una presión manual. Otras configuraciones disponen de cámaras de bombeo o blísteres o bien conexiones a bombas externas. Además se puede prever también un dispositivo de calentamiento con el que se dilata el líquido o se aplica para la evaporación, creándose una presión.

45 La superficie de descarga puede hacerse humectable en la zona de descarga del conducto de muestra, de manera que la gota formada durante la presurización se adhiera y no se pierda de forma incontrolada. Esta propiedad la cumplen no solo los policarbonatos como el Makrolon y las poliolefinas como el Topaz en forma no tratada, o bien posteriormente tratada, siempre que el tratamiento ulterior como el tratamiento del plasma no reduzca o anule esa humectabilidad. Esta zona humedecida puede estar rodeada por una zona hidrófoba con la que se delimita el tamaño de las gotas.
50

La segunda superficie se crea humectable en una zona del punto de humectación, que se encuentra frente a la zona de descarga, de manera que la gota entra en contacto con la segunda superficie. En particular esta zona se compone de nitrocelulosa.

55 Se prefiere especialmente el procedimiento en el que la segunda superficie presenta en la zona de descarga del conducto de prueba una distancia a la superficie de descarga de 0,001 mm hasta 15 mm, en particular de 0,01 mm hasta 2 mm, especialmente de 0,04 hasta 0,4 mm.

60 El punto de humectación se sitúa en la segunda superficie y es el primer punto de esta superficie que contacta con la gota en su crecimiento por la segunda superficie. Se prefieren especialmente las configuraciones en las cuales el punto de humectación es totalmente reproducible, como puede producirse por un ensanchamiento alrededor del orificio extremo del conducto de prueba y/o por la mencionada hidrofobización en la superficie de descarga y/o por la hidrofobización alrededor del punto de reticulación en la segunda superficie.
65

En una configuración especialmente preferida del procedimiento el conducto de prueba se ha configurado de tal forma que se ensancha en los extremos hacia la segunda superficie, de manera que la gota humedece parcial o totalmente la superficie del ensanchamiento. El ensanchamiento abarca de acuerdo con la invención desde la zona de descarga del conducto de prueba hasta el borde de descarga del ensanchamiento.

5 De acuerdo con la invención el ensanchamiento se humedece en la zona del borde de la descarga. Preferiblemente puede ocurrir que la zona del borde de la descarga del ensanchamiento sea algo hidrófoba.

10 El ensanchamiento actúa preferiblemente de manera que el ángulo de contacto y la superficie de la gota son óptimos desde el punto de vista energético cuando la gota se perfila en el ensanchamiento. Al dilatarse más allá de los límites del ensanchamiento se debe aplicar todavía más energía. El ensanchamiento actúa de tal manera que la gota adquiere una posición y forma reproducible y estable. El punto de reticulación en la segunda superficie y el punto de paso del líquido de muestra por la primera superficie se fijan preferiblemente de ese modo en la primera superficie.

15 Se prefiere especialmente el procedimiento en el que la superficie de la zona de descarga en la posición en el borde de la descarga del ensanchamiento presenta una distancia a la segunda superficie de 0,001 mm hasta 15 mm, en particular de 0,01 mm hasta 2 mm, especialmente de 0,04 hasta 0,4 mm.

20 En otra configuración la segunda superficie puede cerrar un ensanchamiento en al menos un borde de la zona de descarga o apoyarse al menos parcialmente o bien crear un espacio intermedio desde la segunda superficie hasta el borde de descarga del ensanchamiento. El espacio creado equivale a una cavidad que se puede delimitar espacialmente (por ejemplo, por medio de una carcasa, paredes laterales, etc...)

25 Además cada uno de los bordes de la zona de descarga del ensanchamiento se ha configurado en una única zona de descarga que se sitúa frente a la primera y segunda superficie y/o descansa total o parcialmente sobre la segunda superficie.

30 Un espacio intermedio puede ocupar columnas de distinto volumen desde la segunda superficie o de la primera superficie a cualquier borde de descarga de un ensanchamiento. Por ejemplo, la segunda superficie puede presentar un plano inclinado respecto a la superficie de descarga de la totalidad de conductos de prueba/ensanchamientos. En particular la segunda superficie puede descansar parcialmente sobre los planos de los bordes de la zona de descarga de los ensanchamientos, tanto en los bordes de descarga de los ensanchamientos como junto a los ensanchamientos.

35 Se prefiere especialmente el procedimiento en el que el ensanchamiento lateral de la zona de descarga tiene forma cónica o cóncava en al menos uno de los conductos de muestra, especialmente semiesférica, en forma de una placa o segmento esférico. El ensanchamiento puede adquirir cualquier forma aproximadamente oval o básicamente cóncava. El ensanchamiento puede también presentar una forma cilíndrica, con cantos y curvas. Es preferible que el ensanchamiento tenga forma de trompeta.

40 En una configuración especialmente preferida el ensanchamiento en el borde de descarga tiene un diámetro entre 0,015 y 15 mm, en particular entre 0,1 y 6 mm, especialmente entre 1 y 4 mm.

45 En una configuración preferida, el ensanchamiento tiene una profundidad, es decir una distancia desde la zona de descarga del conducto de prueba hasta el borde de descarga del ensanchamiento de 0,001 mm hasta 2 mm, en particular entre 0,01 y 1 mm.

50 Además el conducto de prueba puede presentar adicionalmente un codo en la boca de descarga siempre que éste no limite la humectación del ensanchamiento.

El ensanchamiento puede oscilar entre una forma simétrica radial, por ejemplo elíptica, o bien un perfil irregular.

55 Es preferible también que exista una distancia prácticamente similar de la segunda superficie a los bordes de la zona de descarga sobre una gran parte de la primera superficie y sobre varios puntos de humectación. Además es preferible que la primera y/o la segunda superficie discurren en paralelo y/o planas a los niveles de los bordes de la zona de descarga o de la superficie de descarga en la totalidad de los conductos de descarga/ensanchamientos.

60 Desde un punto de vista técnico de fabricación puede ocurrir que esta distancia entre la superficie de la zona de descarga y la segunda superficie no se pueda mantener con exactitud o no sea estable, por ejemplo, si se emplea una membrana como primera superficie y segunda superficie. El método conforme a la invención tiene la especial ventaja de que incluso en estas condiciones la humectación de los puntos de humectación se realiza casi del mismo modo y al mismo tiempo.

65 Se prefiere en particular una configuración en la que se acceda al análisis a través de al menos otro conducto, al menos un reactivo (de análisis, de prueba), en particular una solución de lavado y/o una solución de parada.

- Uno o varios conductos pueden llegar desde distintas direcciones al lugar en el que se fija un reactivo de análisis, y/o al punto de humectación. Es preferible que otro conducto se disponga en perpendicular a la línea del conducto de pruebas-punto de humectación (segunda superficie) – si es preciso un punto de paso (primera superficie). En particular este otro conducto puede abastecer varios lugares de medición, en serie o en paralelo con un reactivo. El reactivo puede ser un reactivo de paro, que detenga una reacción enzimática, por ejemplo en un ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción). El reactivo puede contener un sustrato que conduzca la emisión de la luz en un método de luminiscencia (Firefly). Se prefiere una configuración en la que se añada un anticuerpo secundario marcado. Además es preferible añadir una solución de lavado, por ejemplo para arrastrar los anticuerpos no unidos al lugar de medición. Puede ser preferible añadir varios reactivos de análisis al mismo conducto uno tras otro.
- Se prefiere una configuración en la que la superficie de la zona de descarga y la segunda superficie están unidas rígidamente una con otra, en la que en particular el volumen entre la zona de descarga del conducto de prueba más el ensanchamiento y la segunda superficie si se diera el caso más el espacio intermedio esté totalmente cerrado frente al entorno exterior y se forme una primera cavidad, y en la cual el aire que se encuentre en este volumen pueda escaparse por otro conducto o por al menos otro orificio. La primera cavidad puede adquirir distintas formas, siempre que se garantice que la gota puede entrar en contacto con el punto de humectación de la primera superficie. Se prefiere especialmente una configuración en la que la cavidad en al menos una zona de descarga de un conducto de prueba presenta una distancia desde la zona de descarga hasta la segunda superficie de 0,001 mm hasta 15 mm, especialmente de 0,01 mm hasta 2 mm, en particular de 0,04 hasta 0,4 mm.
- Este cavidad puede comprender además un espacio intermedio situado en la parte superior.
- Se prefiere especialmente una configuración en la que la primera y la segunda superficie se compongan de una membrana tipo gel, porosa, tipo filtro, permeable o semipermeable, o bien una membrana de diálisis, en particular una membrana de nitrocelulosa revestida o no revestida.
- De acuerdo con la invención la primera y/o la segunda superficie pueden estar unidas total o parcialmente al material sustrato de la cavidad. Puede también aplicarse como revestimiento y se puede fabricar in situ mediante un procedimiento microtécnico conocido, por ejemplo, el método Sol-Gel o mediante presión o vaporización, y puede ser disuelta por el sustrato disolviendo una primera capa previamente aplicada. La primera y/o segunda superficie puede estar estructurada mediante un método conocido, por ejemplo aplicando una máscara protectora a las zonas específicas y un ataque o posterior tratamiento del plasma. La primera y/o segunda superficie puede estar compuesta por varias capas que se manipularán in situ. Por ejemplo, se podrían haber perforado agujeros con un láser en la primera y/o segunda capa, o al menos una de sus capas podría activarse a través de un tratamiento con plasma o con biomoléculas.
- Puede ser preferible que la distancia entre la primera y la segunda superficie se encuentre en la zona de 0,001 hasta 1 mm. En una configuración preferida será monomolecular.
- En una configuración preferida se fabrica una membrana, al menos parcialmente por fuera y se aplica después de estas etapas de fabricación a una superficie o se coloca en ella. La membrana puede adherirse a al menos una parte de su superficie, fijarse por carga estática o bien engancharse de forma mecánica, en particular entre la primera y la segunda superficie, o bien fijarse mediante combinaciones de métodos distintos.
- De acuerdo con la invención antes de colocar la membrana ésta se reviste por fuera de al menos un reactivo de análisis. Los reactivos de análisis se pueden aplicar a la membrana mediante una unidad de dispensado, usando un procedimiento de fijación fotoquímica o mediante un pulverizador. También se puede anclar moléculas de ligante a la membrana, que se unirán al reactivo de análisis sin que la unión de los analitos del líquido de muestra influya básicamente en el proceso.
- En otra configuración se aplica in situ al menos una parte de los reactivos de análisis. Aquí se pueden emplear los métodos mencionados.
- En una configuración especialmente preferida la membrana puede empaparse de agua, de manera que el líquido de muestra tras la humectación del punto de humectación con la gota pueda dispersarse por la membrana. Esta propagación se puede llevar a cabo por la fuerza capilar o bien por presurización continuada del líquido de muestra. En particular la membrana puede estar compuesta de un material no tejido y especialmente de nitrocelulosa.
- Puede ser preferible que la membrana disponga de algún otro material como algodón o guata que incrementa la capacidad de capilaridad, es decir la potencia de absorción.
- Se prefiere especialmente que la membrana esté dispuesta en forma de al menos una tira en la cavidad, en una disposición en paralelo.
- En una configuración especialmente preferida, a las membranas o las tiras se les aplican los reactivos de análisis.

- 5 En una configuración especialmente preferida los reactivos de análisis se aplican en forma de tiras, cuadrados o rectángulos, círculos, números o letras o símbolos. Se prefieren especialmente otros símbolos de colores, grises o en blanco y negro sin aplicar el reactivo de análisis, de manera que por ejemplo se identifiquen mediante un signo “-“ ó “+”.
- 10 En una configuración especialmente preferida el reactivo de análisis se aplica como una tira sobre la membrana que va de un canto de la membrana hasta el otro. Se prefiere en particular la membrana en forma de tiras y las tiras de reactivo de análisis van de un canto longitudinal de la tira de la membrana hasta el canto longitudinal opuesto.
- 15 En una configuración preferida se dispone en la primera superficie una segunda cavidad que es independiente de la cavidad formada en la segunda superficie, a la cual al menos puede ir a parar un conducto microfluidico, que se une a esta segunda cavidad con un recipiente o con un espacio exterior.
- 20 La segunda cavidad se puede configurar de forma diferente sin que el método conforme a la invención se vea perjudicado. En particular puede ser preferible que los conductos microfluidicos puedan desembocar en la segunda cavidad, que está unida a un recipiente o al entorno exterior.
- 25 En una configuración especialmente preferida no existe ningún reactivo de análisis en un punto de paso de la primera superficie. De acuerdo con la invención dicho punto de paso se encuentra sobre la primera superficie frente al punto de humectación de la segunda superficie. Tan pronto como la gota entra en contacto con el punto de humectación de la segunda superficie, se propaga el líquido de prueba por la fuerza capilar y/o la presión por la membrana, y alcanza al menos un lugar de detección con reactivo de análisis, que puede encontrarse sobre una zona cubierta de la membrana. En esta configuración la membrana soporta en la primera superficie no solo el reactivo de análisis, sino que también impide que componentes de partículas más grandes del líquido de prueba entren en contacto con el reactivo de análisis.
- 30 Esta configuración permite preferiblemente que los componentes más grandes en un líquido de prueba, como por ejemplo los eritrocitos de una muestra de sangre completa, no puedan interaccionar con los campos de análisis.
- 35 Por ello la invención hace referencia también a aquellas configuraciones en las cuales en la primera superficie el punto de paso está libre de reactivos de análisis.
- 40 En otra configuración se han colocado al menos dos, en particular al menos diez lugares de detección en puntos separados en la primera superficie. Una parte de dichos lugares se ha previsto para determinaciones de control. Es preferible que se realicen las detecciones de distintos alérgenos o sustancias de intolerancia alimenticia en diferentes lugares.
- 45 En una configuración preferida al menos dos conductos de muestra con un ensanchamiento cada uno de ellos en la superficie de la zona de descarga y al menos dos de estos conductos de muestra están conectados por medio de al menos una ramificación a al menos un recipiente o un orificio de llenado común.
- 50 En una configuración especialmente preferida un conducto de muestra presenta al menos en sus extremos antes del ensanchamiento un estrechamiento o estrangulamiento, que eleva la resistencia al flujo que se puede conseguir según Hagen-Poiseuille por estrechamiento y/o modificación de la forma del área de la sección transversal del conducto de muestra. Es preferible un estrechamiento del área de la sección transversal superior al 1%, en particular mayor del 10%, especialmente mayor del 30%. Se prefiere especialmente una modificación de una sección transversal angular de 0,5-1 mm frente a un diámetro circular de 0,5 mm. La sección transversal del estrangulamiento puede presentar secciones irregulares, redondas, cuadradas, distintas de la del conducto de muestra. Preferiblemente la sección transversal puede variar a lo largo del estrangulamiento tanto en forma como en dimensiones. En otra configuración el estrangulamiento no discurre en forma recta sino que en su recorrido forma curvas y meandros.
- 55 En otra configuración preferida el estrechamiento del conducto de prueba correspondiente tiene una longitud de 1 cm hasta 0,5 mm.
- 60 En una configuración preferida el estrechamiento tiene lugar en forma de un escalón.
- 65 Puede ser preferible que el conducto de muestras se desvíe del primer conducto formando un ángulo de 40 hasta 120 grados respecto al eje longitudinal del primer conducto de muestras.
- En una configuración preferida uno o varios conductos de muestras proceden de un primer conducto de muestra, de manera que el paso del primer conducto a como mínimo un conducto de muestras siguiente presenta una reducción de la sección transversal que equivale pues a una función de estrangulamiento.
- En una configuración especialmente preferida uno o varios, en particular cuatro conductos de muestra proceden en forma cruzada de un primer conducto de muestras.

En una configuración preferida al menos dos, en particular todas las bocas de descarga de los conductos de muestra proceden de un tubo de llenado común.

5 En una configuración preferida las secciones transversales de los conductos de muestras se disponen de forma distinta y de manera que se compensan las distintas resistencias de los conductos de muestras. Por lo tanto se consigue que las distintas muestras fluyan por el ensanchamiento en cantidades similares y al mismo tiempo, incluso cuando las longitudes de los conductos o el número de codos o flexiones por conducto varían. Como consecuencia de ello el tamaño de las gotas que se forman en los distintos ensanchamientos prácticamente no varía.

10 En otra configuración el estrechamiento conforme a la invención puede efectuarse en forma de una estructura tipo tamiz, que básicamente está colocada perpendicularmente al eje longitudinal del conducto de muestras. Los diámetros de cada uno de los orificios pueden variar y presentar una disposición irregular. Se prefiere especialmente una disposición cuadrada o hexagonal de los orificios. En otra configuración preferida los orificios son más grandes hacia el borde para que el perfil de circulación laminar por el conducto de muestras se vaya aplanando.

15 Además se prefiere que dos o más conductos de muestras varíen de tal modo los estrechamientos que distintos conductos de muestras independientemente de su longitud presenten una misma resistencia a la circulación.

20 Este estrechamiento o reducción del diámetro a lo largo del conducto de muestras correspondiente permite una distribución homogénea óptima de cada una de las muestras de una muestra común, puesto que se consigue un estrangulamiento a lo largo del gradiente de flujo y de ese modo una formación de gotas simultánea a la salida del conducto de muestras conduce a una humectación óptima en la membrana. Si los conductos de muestra se llenan del líquido de muestra a través de un orificio de llenado común éstos se van llenando del líquido de muestra hasta que se llega a un estrechamiento donde el líquido de muestra se detiene y se llenan los otros conductos de muestra hasta que se alcanza el estrechamiento en todos ellos. Solamente entonces el líquido de muestra penetra en los lugares estrechos en los ensanchamientos y forma una gota.

30 La humectación es especialmente adecuada si se realiza por medio de un plato radialmente abierto por arriba, puesto que dicho plato apoya la formación de una gota. La gota sirve para salvar la distancia entre el conducto de muestras y la membrana y depende del diámetro de la boca de descarga de salida del conducto. Es decir, la forma del plato conduce a un incremento reforzado de la forma del plato y con ello a que la muestra entre en contacto con el material de la membrana en el lugar de humectación. Seguidamente la membrana asume un papel absorbente, es decir tras la toma de contacto con la muestra la membrana absorbe la muestra de forma pasiva hasta la saturación.

35 En otra configuración un conducto de muestra cualquiera puede estar estrangulado independientemente de otro. Dicha estrangulación se puede efectuar mediante una válvula o sencillamente por medio de un elemento que interrumpa el flujo de manera que un primer conducto de muestra tenga un ángulo de 40-120°.

40 En otra configuración preferida se han dispuesto al menos dos reactivos de análisis de manera que forman una estrella con distancias o ángulos iguales o distintos alrededor de un punto de humectación sobre la primera superficie o membrana, de manera que en una línea de unión recta no se encuentra ningún reactivo de análisis fijado entre un reactivo de análisis fijado y el punto de humectación. Esta disposición evita que el líquido de muestra discurra por distintos lugares de detección y los datos de estos lugares de detección se vean influidos por anticuerpos de cruce reactivos de las muestras.

45 En una configuración preferida se disponen varias membranas, en particular membranas en forma de tiras dispuestas en paralelo, y la segunda cavidad consta de una o varias cavidades parciales. Una segunda cavidad puede tener unas dimensiones tales que lleguen preferiblemente a todos los lugares de detección de una tira de membrana. Además es preferible que la segunda cavidad se extienda del mismo modo por una tira de membrana. Además se prefiere que la tira de membrana separe totalmente la primera y la segunda cavidad y ningún líquido de muestra pase de la primera a la segunda cavidad sin pasar por la membrana.

50 En una configuración especialmente preferida la segunda cavidad está unida a un tubo de llenado, a través del cual pueden pasar los reactivos de análisis o las soluciones de lavado que se inyectan por medio de una jeringa, columna de agua, bomba o bien otros dispositivos para crear presión en la segunda cavidad. En una configuración especialmente preferida esta cavidad está unida a un orificio de salida o a un recipiente de descarga, de manera que el aire y el líquido sobrenadante pueden salir de esta segunda cavidad. Preferiblemente a esta segunda cavidad se unen otras cavidades o cavidades parciales con tubos de llenado comunes o recipientes de descarga.

60 En otra configuración preferida además de al menos un reactivo de análisis fijo se dispone al menos una lente, de manera que el ojo humano puede reconocer bien los lugares de detección más pequeños.

65 En una configuración preferida el reactivo de análisis es liofilizado y/o se une a la primera superficie o membrana por medio de un enlace covalente o no covalente.

En una configuración preferida el tamaño del poro de la primera superficie o membrana tiene unas dimensiones tales que las proteínas pueden pasar por los poros pero los eritrocitos o los glóbulos blancos no pueden. En particular, se prefiere un tamaño de poro inferior a 0,8 μm , muy especialmente menor de 0,2 μm .

- 5 En una configuración preferida el método de análisis contiene un análisis de fijación. Por lo que se puede emplear para la fijación entre péptidos y/o proteínas o bien la hibridación de ADN, ARN o ANF, la fijación de anticuerpo-antígeno, la interacción de anticuerpo primario-secundario, la fijación aptámero-target, interacción ligando-receptor o combinación de los mismos. Se prefiere especialmente un análisis de fijación, en el cual un antígeno se fija a la primera superficie, que contiene IgE específica del antígeno en el líquido de prueba, y se añade un anticuerpo anti-IgE, que tiene una marca enzimática, fluorescente, luminiscente o de color.
- 10 La invención hace referencia además a un sistema de análisis que consta de una primera superficie y de una segunda superficie donde
- a) al menos un reactivo de prueba o análisis se fija a una primera superficie, y en el dorso de la misma se configura una segunda superficie,
- 15 b) al menos un líquido de muestra se hace pasar por un conducto de muestra, donde el conducto de muestra conduce a una zona de descarga que se encuentra frente a la segunda superficie, en el que la segunda superficie puede humedecerse al menos en una región que está frente al área de descarga,
- c) el conducto de muestra se ensancha por su extremo hacia una segunda superficie y una gota humedece parcialmente al menos el ensanchamiento, de forma que el borde de la zona de descarga del ensanchamiento está a una distancia de la segunda superficie de 0,001 mm hasta 15 mm, en particular de 0,04 hasta 0,4 mm y la primera y la segunda superficie forman independientemente una de otra una cavidad.
- 20

El sistema de análisis se puede configurar de acuerdo con las características mencionadas, incluso cuando dichas características se refieren al método conforme a la invención. En las reivindicaciones y en las figuras se representan otras configuraciones.

25

Estos ejemplos sirven exclusivamente para aclarar la invención

- A) Extracción de 100ml de sangre periférica, o de suero o de sangre completa heparinizada
- B) Mezcla de la muestra con la solución de detección
- 30 C) Introducción de la solución en la carcasa de análisis, y se humedecen de forma homogénea los campos de detección de la primera superficie
- D) incubación durante 5 minutos
- E) Se hace pasar 3 veces una solución de lavado de 1 ml por el reverso de la primera superficie en la que se realiza la detección, dejando 1 minuto de tiempo de incubación entre las etapas de lavado.
- 35 F) Introducción del sustrato por el reverso de la membrana, tiempo de incubación 5 minutos
- G) Parada de la reacción mediante la adición de la solución de parada por el reverso de la membrana
- H) Lectura visual de los campos de detección

40 Descripción de las figuras:

La figura 1(a) muestra una posible disposición que consta de una segunda cavidad(1), membrana(2), ensanchamiento(3), superficie del ensanchamiento(4), estrechamiento o estrangulación (5), sustrato(6), lugar de detección con reactivo de análisis(7) y conducto de muestras(8) y superficie de la zona de descarga(9)

45 La figura 1(b) muestra que en la membrana no adyacente a la superficie de la zona de descarga (9) o inclinada se garantiza una humectación casi homogénea (posición inclinada de la membrana en el dibujo algo exagerada para una mayor aclaración).

50 La figura 2 muestra el proceso de humectación conforme a la invención. Las flechas en el borde inferior de la figura indican la dirección del ensanchamiento de la presión en el líquido. (izquierda) El líquido de muestra sale de la estrangulación y forma una gota en el ensanchamiento (centro). La gota crece y toca la membrana en un punto de humectación (1)(derecha). El líquido de muestra se propaga por la membrana en la dirección (2) de los lugares de detección.

55 La figura 3 muestra en un perfil longitudinal distintas formas del estrechamiento o estrangulación. Los ensanchamientos se han representado respectivamente como trapecios. Totalmente a la derecha un ensanchamiento en forma de trompeta.

60 La figura 4(a) muestra la distribución del líquido de muestra en los conductos de muestra, que es conducida desde un tubo de llenado (2) común en forma de cruz hacia el estrangulamiento (1) y el ensanchamiento adyacente.

65 La figura 4(b) muestra esquemáticamente el plano de adición de la solución de lavado a través del tubo de llenado común (1); con las segundas cavidades (2), en las que se encuentran las membranas; los ensanchamientos significativos (3) en el lado inferior de la membrana (segunda superficie) junto con los lugares de detección (4) de un recipiente de descarga (5).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de análisis en un sistema de análisis conforme a la reivindicación 17, en el que:
 - a) Al menos un reactivo de prueba o análisis se fija a una primera superficie, y en el dorso de la misma se configura una segunda superficie,
 - b) Al menos un líquido de muestra se hace pasar por un conducto de muestra (8, figura 1a), donde el conducto de muestra (8, figura 1a) conduce a una zona de descarga (9, figura 1a) que se encuentra frente a la segunda superficie, en el que la segunda superficie puede humedecerse al menos en una región que está frente al área de descarga,
 - c) Y el fluido de muestra sale por el conducto de muestra (8, figura 1a) a través de su abertura de descarga como resultado de la presión aplicada, y dicho fluido forma una gota que se adhiere a la abertura de la zona de descarga (9, figura 1a),
 - d) Donde el contacto se produce entre la gota y un punto húmedo en la segunda superficie, de manera que como resultado de la presión aplicada al conducto de muestra, la gota se hace más grande y entra en contacto con el punto humedecido,
 - e) El líquido de muestra, como un resultado directo del contacto establecido con el punto humedecido o bien como resultado de la acción capilar de la primera superficie y/o de la presión aplicada al conducto de muestra, penetra desde la segunda superficie hacia la primera superficie o bien viaja hasta la primera superficie y reacciona con el reactivo de análisis,
Se caracteriza por que
 - f) El conducto de muestra (8, figura 1a) se ha configurado de manera que se hace más grande hacia el extremo que mira la zona de descarga (9, figura 1a) y una gota humedece al menos parcialmente la zona ensanchada (3, figura 1a).
2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, que se caracteriza por que la zona de descarga (9, figura 1a) al menos en la posición del borde de abertura de la descarga de la zona ensanchada (3, figura 1a) se distancia de la segunda superficie entre 0,001 mm y 15mm, especialmente entre 0,01 mm y 2 mm, más especialmente entre 0,04 y 0,4 mm.
3. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la segunda superficie termina en al menos un borde de abertura de descarga de la zona ensanchada (3, figura 1a) o bien puede encontrarse al menos parcialmente en la zona ensanchada (3, figura 1a) o al lado de la zona ensanchada (3, figura 1a), y/o se forma un espacio intermedio desde la segunda superficie hasta el canto de abertura de la zona ensanchada (3, figura 1a).
4. Procedimiento conforme a la reivindicación 3, que se caracteriza por que se forma una cavidad (1, figura 1a).
5. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la zona ensanchada (3, figura 1a) por el lado de la abertura de descarga de al menos uno de los conductos de muestra (8, figura 1a) es cónica o cóncava, especialmente semiesférica, en forma de una placa o segmento esférico.
6. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que al menos un reactivo adicional, en particular una solución de lavado o una solución de parada se añade si fuera preciso a al menos otro conducto.
7. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la primera y/o la segunda superficie se compone de una membrana tipo gel, porosa, tipo malla o filtro, permeable o semipermeable, o membrana de diálisis, en particular una membrana de nitrocelulosa revestida o no revestida.
8. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que el punto de paso a la primera superficie está libre de reactivo de análisis.
9. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la primera y segunda superficies respectivamente se han configurado a base de una cavidad independiente una de otra (1, figura 1a).
10. Procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que al menos un conducto de muestra presenta un estrechamiento o paso calibrado en los extremos antes del ensanchamiento (3, figura 1a).
11. Procedimiento conforme a la reivindicación 10, donde al menos un estrechamiento presenta una reducción de la superficie perfilada mayor al 1%, en particular mayor al 10%, especialmente mayor al 30%.

12. Procedimiento conforme a la reivindicación 10 o 11, que se caracteriza por que uno o varios conductos de muestra proceden de un primer conducto de muestra (8, figura 1a), donde el primer conducto de muestra presenta un estrangulamiento (5, figura 1a).
- 5 13. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 10 hasta 12, que se caracteriza por que dos o varios conductos de muestra tienen un diámetro del estrechamiento distinto, de manera que distintos conductos de muestra presentan la misma resistencia a la corriente independientemente de su distinta longitud.
- 10 14. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que uno o varios conductos de muestra en forma cruzada (1, figura 4a) proceden de un primer conducto de muestra (2, figura 4a).
- 15 15. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que al menos dos reactivos de análisis se disponen de manera que están colocados en forma de estrella con distancias o ángulos iguales o diferentes alrededor de una zona de descarga de al menos un conducto de prueba (8, figura 1a) sobre la primera superficie o membrana, de manera que no existe ningún otro reactivo de análisis adicional en una línea de unión recta entre un reactivo de análisis fijado y la abertura de descarga.
- 20 16. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que el procedimiento de análisis comprende un análisis de fijación.
- 25 17. Sistema de análisis compuesto por una primera superficie y una segunda superficie, que se caracteriza por que
a. Al menos un reactivo de análisis se fija a una primera superficie, y se configura en el reverso una segunda superficie,
b. El conducto de muestra (8, figura 1a) desemboca en una zona de descarga (9, figura 1a), que se encuentra frente a la segunda superficie, donde la segunda superficie está humedecida al menos en una zona opuesta a la zona de descarga, que se caracteriza por que
c. El conducto de muestra (8, figura 1a) se ensanche por su extremo y al menos una gota humedece al menos
30 de manera que el borde de descarga del ensanchamiento (3, figura 1a) se encuentra a una distancia de la segunda superficie de 0,001 mm hasta 15mm y la primera y la segunda superficie forman respectivamente una cavidad independiente una de otra (1, figura a).
- 35 18. Sistema de análisis conforme a la reivindicación 17, que se caracteriza por que al menos un conducto de muestra (8, figura 1a) presenta un estrechamiento o paso calibrado (5, figura 1a) cerca de su extremo antes del ensanchamiento (3, figura 1a).
- 40 19. Sistema de análisis conforme a la reivindicación 17 ó 18, que se caracteriza por que la zona ensanchada (3, figura 1a) por el lado de la abertura de descarga de al menos uno de los conductos de muestra (8, figura 1a) es cónica o cóncava, especialmente semiesférica, en forma de una placa o segmento esférico.
- 45 20. Sistema de análisis conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la zona ensanchada (3, figura 1a) por el lado de la abertura de descarga presenta un diámetro entre 0,015 mm y 15 mm, en particular entre 0,1 mm y 6 mm, especialmente entre 1 y 4 mm.
- 50 21. Sistema de análisis conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que la zona ensanchada (3, figura 1a) tiene una profundidad de 0,001 mm hasta 2 mm, en particular entre 0,01 mm y 1 mm.
- 55 22. Sistema de análisis conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que el punto de paso en la primera superficie está libre de reactivo de análisis.
23. Sistema de análisis conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza por que el sistema de análisis es un análisis de fijación especialmente adecuado para muestras sanguíneas.

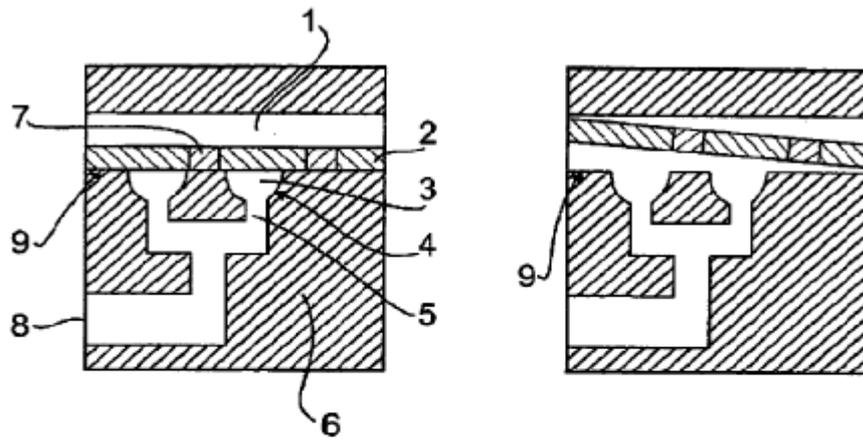


Fig. 1a

Fig. 1b

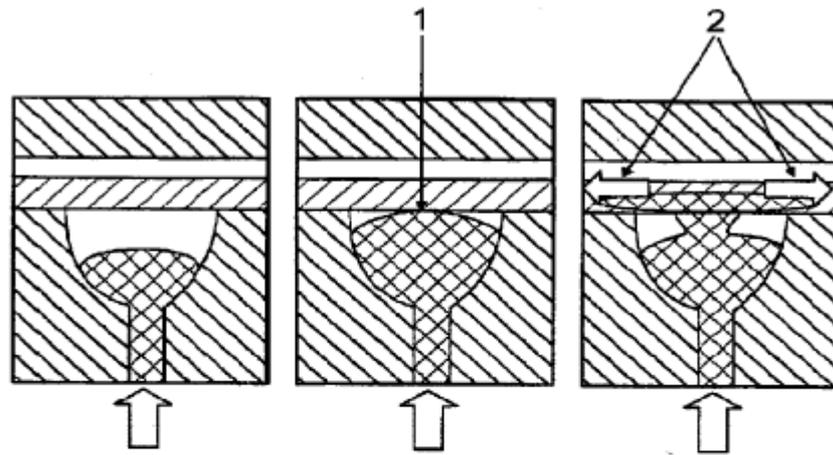


Fig. 2

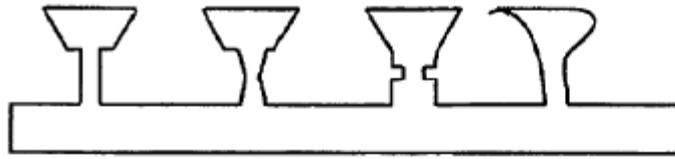


Fig. 3

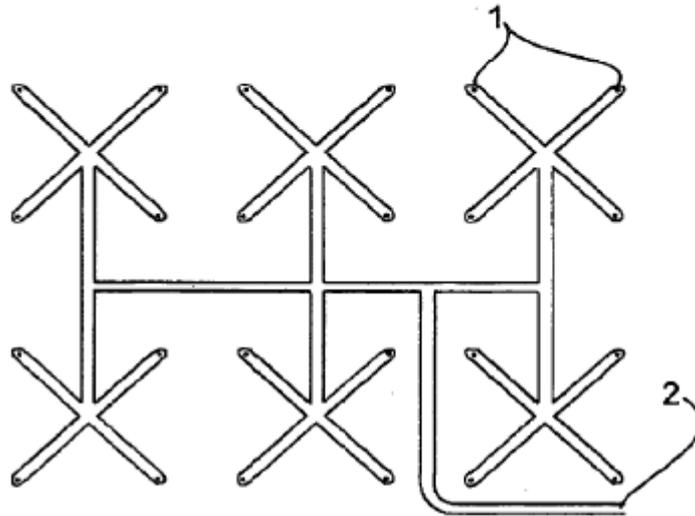


Fig. 4a

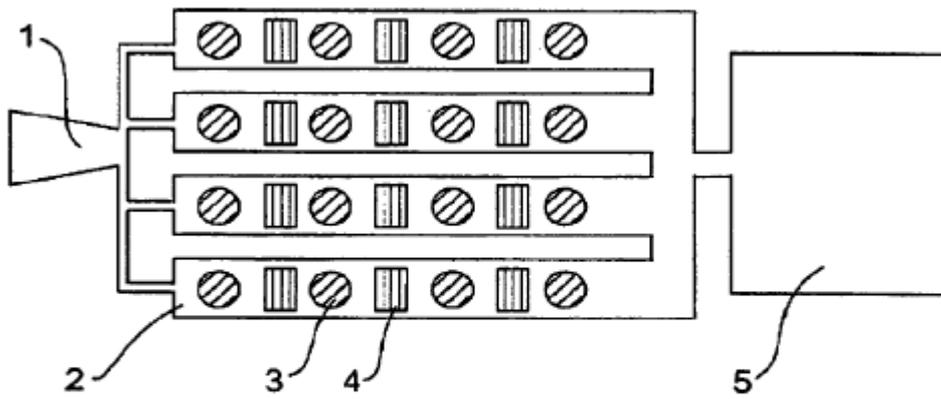
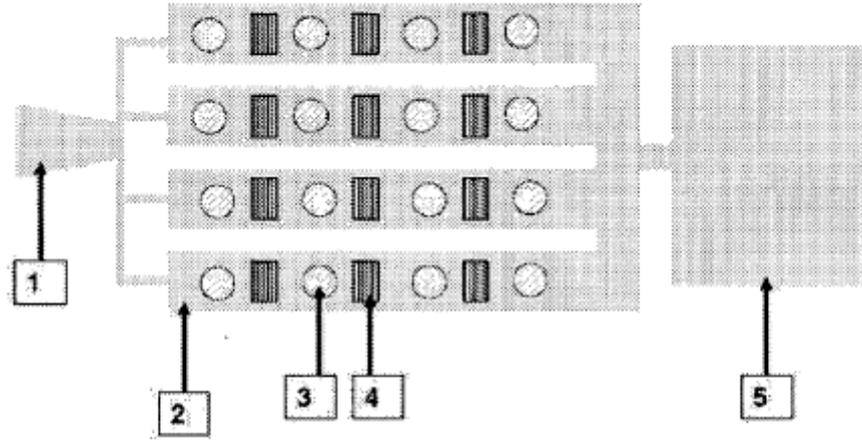


Fig. 4b



(b)