

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 734**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2007 PCT/EP2007/008419**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2008 WO08037469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2007 E 07818502 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2069787**

54 Título: **Elemento de prueba rotativo**

30 Prioridad:

**27.09.2006 EP 06020219**

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

**13.09.2019**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstraße 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BOEHM, CHRISTOPH;  
ORANTH, NORBERT y  
SPINKE, JUERGEN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 724 734 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

Elemento de prueba rotativo

5 La invención se refiere a un elemento de prueba, que está esencialmente en forma de disco y es plano y porosa absorbentes rotativo alrededor de un eje central que se sitúa perpendicularmente al plano del elemento de prueba en forma de disco, que contiene una abertura de alimentación de muestra para la alimentación de una muestra líquida, una zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente y un canal de muestra que se extiende desde la abertura de alimentación de muestra hasta la zona activa capilar. Además, la invención se refiere a un procedimiento para la  
10 determinación de un analito con la ayuda del elemento de prueba.

En principio, los sistemas, que se utilizan para el análisis de materiales de muestra líquidos o materiales de muestra, que se pueden transferir a forma líquida, se pueden subdividir en dos clases: por un lado, hay sistemas de análisis que funcionan exclusivamente con los así llamados reactivos húmedos, por otro lado hay sistemas que funcionan con  
15 los así llamados reactivos secos. Particularmente en el diagnóstico médico, pero también en la analítica ambiental y de procesos, los primeros sistemas han prevalecido ante todo en el campo de los laboratorios instalados permanentemente, mientras que los últimos sistemas se usan ante todo en el campo de la analítica "*in situ*".

En el campo del diagnóstico médico, los sistemas de análisis con reactivos secos se ofrecen, en particular, en forma de los así llamados soportes de pruebas, por ejemplo, tiras reactivas. Los ejemplos prominentes de ellos son las tiras reactivas para la determinación del valor de glucosa en sangre o las tiras reactivas para análisis de orina. Dichos soportes de pruebas generalmente integran varias funciones (por ejemplo, el almacenamiento de reactivos en forma seca o, aunque con menos frecuencia, en solución; la separación de los componentes de muestra indeseados, en particular, de glóbulos rojos de la sangre total; en inmunoensayos, la así llamada separación de fracción libre y ligada;  
20 la dosificación de volúmenes de muestra, el transporte de líquido de muestra desde fuera de un equipo a un equipo; el control de la secuencia temporal de las etapas de reacción individuales, etc.). La función del transporte de muestras se realiza a menudo por medio de materiales absorbentes (por ejemplo, papeles o no tejidos), por medio de canales capilares o por la aplicación de fuerzas impulsoras externas (como presión; aspiración) o por medio de la fuerza centrífuga. Los soportes de pruebas en forma de disco, los así llamados discos de laboratorio o biodiscos ópticos, continúan la idea del transporte controlado de muestras por medio de la fuerza centrífuga. Dichos soportes de pruebas en forma de disco, similares a un disco compacto permiten la miniaturización mediante el uso de estructuras microfluidas y al mismo tiempo la paralelización de procesos mediante la aplicación repetida de estructuras idénticas para el procesamiento paralelo de análisis similares de una muestra o análisis idénticos de diferentes muestras. Precisamente en el campo de los biodiscos ópticos es posible la integración de datos digitales almacenados  
25 ópticamente para la identificación de los soportes de pruebas o el control de los sistemas de análisis en los biodiscos ópticos.

Además de la miniaturización y la paralelización de los análisis y la integración de datos digitales en discos ópticos, los biodiscos generalmente tienen la ventaja de que se pueden fabricar mediante procedimientos de fabricación establecidos y medirse mediante tecnología de evaluación establecida. En los componentes químicos y bioquímicos de tales biodiscos ópticos, la mayoría de las veces es posible recurrir a componentes químicos y bioquímicos conocidos. Una desventaja de los discos de laboratorio o biodiscos ópticos basados únicamente en fuerzas centrífugas y capilares es que la inmovilización de los reactivos es difícil y lo padece la precisión de la detección. Especialmente en sistemas de detección basados en reacciones de unión específicas, como por ejemplo inmunoensayos, se echa  
30 en falta, en comparación con los sistemas de tiras reactivas convencionales, el componente de volumen, especialmente en la así denominada separación de fracción libre y ligada.

Por esta razón, hay enfoques recientes, ante todo en el campo de los inmunoensayos, para establecer híbridos de tiras reactivas convencionales y biodiscos. El resultado es biodiscos con canales y estructuras similares a canales para el transporte de líquidos por un lado y materiales absorbentes voluminosos en estas estructuras (al menos  
35 parcialmente) por otro lado.

El documento WO 2005/001429 (Phan *et al.*) describe biodiscos ópticos que presentan piezas de membrana como portadores de reactivos en partes del sistema de canales. Los reactivos se disuelven por un líquido suministrado al disco, dando como resultado soluciones de reactivo tamponadas, que luego se ponen en contacto con la muestra.  
40

Por el documento WO 2005/009581 (Randall *et al.*) se conocen biodiscos ópticos que contienen membranas o papeles absorbentes para el movimiento de un líquido de muestra, para la separación de los componentes de muestra en partículas, para el soporte de reactivos y para el análisis de la muestra. La muestra se aplica en primer lugar sobre una membrana de separación de sangre cerca del borde exterior del biodisco y migra radialmente a través de un papel reactivo que está alojado más cerca del centro del biodisco. Posteriormente, la muestra se mueve de nuevo radialmente hacia afuera, es decir, se aleja del centro del biodisco, y atraviesa una así llamada membrana de análisis. A este respecto, el movimiento hacia afuera se realiza mediante cromatografía, que se apoya en la rotación del biodisco y la fuerza centrífuga que actúa sobre la muestra de este modo.  
45

El documento US 2002/0076354 A1 (Cohen) da a conocer biodiscos ópticos que, junto a un sistema de canales para  
50

el transporte de una muestra líquida, presentan la así llamada "capa de captura" (inglés "capture layer"). Esta última puede estar hecha, por ejemplo, de nitrocelulosa. La "capa de captura" se atraviesa por medio de fuerzas centrífugas durante la rotación del disco.

5 El documento US 2005/0014249 (Staimer *et al.*) y US 2005/0037484 (Staimer *et al.*) describen biodiscos ópticos con materiales porosos integrados en el canal que actúan como medios de separación cromatográficos. El líquido de la muestra se fuerza hacia el exterior por medio de una fuerza centrífuga desde un punto de alimentación de muestra cerca del centro a través del medio de separación y a continuación. después de pasar a través de un filtro, fluye nuevamente en un canal radialmente hacia dentro.

10 El documento US 2004/0265171 (Pugia *et al.*) describe un elemento de prueba con canales de líquido, en el que el líquido de muestra se transporta mediante una interacción de la fuerza de capilaridad y la fuerza centrífuga. Dentro de un canal de líquido puede estar prevista una tira de nitrocelulosa, que porta un reactivo de aglutinación que reacciona con el analito y, por lo tanto, puede conducir a la formación de las así llamadas bandas, que finalmente pueden medirse ópticamente y, por lo tanto, servir para la determinación de una concentración de analito en la muestra. Con la ayuda de la tira de nitrocelulosa es posible transportar el líquido de la muestra tanto en paralelo a la fuerza centrífuga como en sentido opuesto a la fuerza centrífuga, en particular, si se usa otro material absorbente, por ejemplo un papel absorbente de nitrocelulosa, para apoyar el efecto de aspiración.

20 El documento WO 99/58245 (Larsson *et al.*) describe elementos de prueba microfluidos en los que se controla el movimiento de los líquidos a través de diferentes superficies con diferentes propiedades de superficie, tales como, por ejemplo, la diferente hidrofilia.

25 El documento US 5.242.606 (Braynin *et al.*) da a conocer rotores circulares de tipo disco para centrifugadoras que disponen de canales y cámaras para el transporte de líquidos de muestra.

Es desventajoso en los conceptos del estado de la técnica que precisamente para ensayos de unión específicos, como, por ejemplo, los inmunoensayos, no es posible el control dirigido del tiempo de reacción y de permanencia del líquido de la muestra después de la absorción de los reactivos y después de la entrada a la matriz porosa absorbente.

30 El objetivo de la invención es solucionar las desventajas del estado de la técnica.

Este objetivo se consigue mediante el objeto de la invención.

35 Un objeto de la invención es un elemento de prueba según la reivindicación 1, un sistema según la reivindicación 11 y un procedimiento según la reivindicación 7. Las configuraciones ventajosas y formas de realización preferentes de la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes.

40 El elemento de prueba según la invención está esencialmente en forma de disco y es plano. Es rotativo alrededor de un eje central que se sitúa perpendicularmente al plano del elemento de prueba en forma de disco dentro del elemento de prueba. Típicamente el elemento de prueba es un disco circular, comparable a un disco compacto. Sin embargo, la invención no se limita a esta forma del disco, sino que se puede usar sin más también en discos no simétricos o no circulares.

45 Como componentes, el elemento de prueba contiene en primer lugar una abertura de alimentación de muestra en la que se puede pipetear una muestra líquida o introducirse de otra manera. La abertura de alimentación de muestra está cerca del eje (es decir, cerca del centro del disco).

50 A este respecto, la abertura de alimentación de muestra puede desembocar directamente en un canal de muestra. Sin embargo, también es posible que la abertura de alimentación de muestra desemboque en primer lugar en un depósito ubicado detrás, al que entra la muestra antes de que continúe fluyendo hacia el canal de muestra. Gracias al dimensionamiento adecuado, se puede asegurar que la muestra fluya desde la abertura de alimentación de muestra a las estructuras fluidas subsiguientes sin ninguna acción adicional. Para ello puede ser necesaria una hidrofiliación de las superficies de las estructuras fluidas y/o el uso de estructuras que promuevan la generación de fuerzas de capilaridad. Sin embargo, también es posible permitir el llenado de las estructuras fluidas del elemento de prueba según la invención desde la abertura de alimentación de muestra solo después de la acción de una fuerza externa, preferentemente una fuerza centrífuga.

60 Además, el elemento de prueba contiene una zona activa capilar en forma de una matriz porosa absorbente que absorbe al menos una parte de la muestra líquida. La zona activa capilar presenta un primer extremo alejado del eje y un segundo extremo cerca del eje.

65 El elemento de prueba posee además un canal de muestra que se extiende desde la abertura de alimentación de muestra hasta el primer extremo alejado del eje de la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente. A este respecto, el canal de muestra atraviesa al menos una vez un área cerca del eje, que se sitúa más cerca del eje central que el primer extremo alejado del eje de la zona activa capilar.

Es esencial en el elemento de prueba de la presente invención que la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente, presente un segundo extremo cerca del eje. A este respecto, el primer extremo alejado del eje de la zona activa capilar está en contacto con el canal de muestra, en el cual la muestra puede moverse por fuerzas de capilaridad y/o fuerzas centrífugas y/u otras fuerzas externas, como sobrepresión o subpresión. Tan pronto como la muestra líquida alcanza el primer extremo alejado del eje de la zona activa capilar -eventualmente después de la absorción de los reactivos y/o medios de dilución y/o del desarrollo de reacciones previas- se absorbe en ella y se transporta por las fuerzas de capilaridad (que en el caso de una matriz porosa absorbente también se pueden designar como fuerzas de aspiración) a través de ella.

La zona activa capilar es una matriz porosa absorbente, en particular, un papel, una membrana o un no tejido.

La zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente, contiene una o más zonas con reactivos inmovilizados.

En la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente, están inmovilizados reactivos de unión específicos, por ejemplo, compañeros de unión específicos, como antígenos, anticuerpos, (poli)haptenos, estreptavidina, poliestreptavidina, ligandos, receptores, cadenas de ácido nucleico ("capture probes") y similares. Sirven para capturar de forma dirigida, de la muestra que fluye a través de la zona activa capilar, el analito o las especies derivadas del analito y especies relacionadas con este. Estos compañeros de unión se presentan de forma inmovilizada en forma de líneas, puntos, patrones en o sobre el material de la zona activa capilar. Por ejemplo, en el caso de los inmunoensayos, puede estar presente de forma inmovilizada un anticuerpo contra el analito sobre la superficie de la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente, que luego captura el analito (en este caso, un antígeno o hapteno) de la muestra y lo inmoviliza igualmente en la zona capilar activa. A este respecto, el analito se puede volver detectable mediante otras reacciones, por ejemplo, mediante contacto adicional con un compañero de unión marcado, por ejemplo, mediante un marcador que puede detectarse de forma visual, óptica o fluorescente.

En una configuración preferente del elemento de prueba según la invención, la zona activa capilar, que es una matriz absorbente porosa, colinda con el segundo extremo cerca del eje con otro material absorbente o una estructura absorbente, de modo que pueda absorber líquido de la zona. Típicamente, la matriz porosa absorbente y el otro material se superponen ligeramente con esta finalidad. A este respecto, el otro material o la otra estructura absorbente sirven, por una parte, para favorecer el efecto de aspiración de la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente, por otra parte, como zona de absorción de líquido, que ya ha atravesado la zona activa capilar. A este respecto, el otro material puede estar hecho del mismo material o materiales diferentes que la matriz. Por ejemplo, la matriz puede ser una membrana y el otro material absorbente puede ser un no tejido o un papel. Por supuesto, también son posibles otras combinaciones.

El elemento de prueba según la invención se caracteriza en una forma de realización preferente por que el canal de muestra contiene zonas de diferentes dimensiones y/o para diferentes funciones. Por ejemplo, el canal de muestra puede contener una zona que contenga reactivos que sean solubles en la muestra o suspendibles en la muestra. Estos pueden disolverse o suspenderse al entrar o atravesar la muestra líquida y pueden reaccionar con el analito en la muestra o con otros componentes de muestra.

Las diferentes zonas en el canal de muestra también se pueden diferenciar porque hay zonas con actividad capilar y aquellas sin actividad. Además, se pueden incluir zonas de alta hidrofilia y baja hidrofilia. Las zonas individuales pueden convertirse virtualmente sin costura unas en otras o estar separadas entre sí por ciertas barreras, por ejemplo, válvulas, en particular, válvulas sin cierre, como válvulas geométricas o barreras hidrófobas.

Los reactivos en el canal de muestra están presentes preferentemente en forma seca o liofilizada. Sin embargo, también es posible que los reactivos estén presentes en forma líquida en el elemento de prueba según la invención.

Los reactivos se pueden introducir en el elemento de prueba de una manera conocida en sí. El elemento de prueba contiene preferentemente al menos dos capas, una capa de fondo en la que se introducen las estructuras fluidas, y una capa cobertora, que por lo general no contiene otras estructuras aparte de las aberturas de entrada para líquidos y las aberturas de ventilación. La introducción de reactivos durante la preparación del dispositivo de prueba generalmente se lleva a cabo antes de que la parte superior del elemento de prueba (capa cobertora) se aplique sobre la parte inferior (capa de fondo). En este momento, las estructuras fluidas están abiertas en la parte inferior, de modo que es posible una dosificación de los reactivos en forma líquida o seca. A este respecto, la introducción de los reactivos se puede realizar, por ejemplo, mediante presión o dispensado. También es posible incorporar los reactivos en el elemento de prueba dado que se insertan en el elemento de prueba de forma impregnada en materiales absorbentes tales como papeles, no tejidos o membranas. Después de la colocación de los reactivos e inserción de los materiales absorbentes, por ejemplo, la matriz (membrana) porosa absorbente y, eventualmente, otros materiales absorbentes (no tejido de desecho, etc.), la parte superior e inferior del elemento de prueba se conectan entre sí, por ejemplo, se unen por clip, sueldan, pegan y similares.

Alternativamente, es posible que la capa de fondo presente, junto a las estructuras fluidas, también las aberturas de entrada para líquidos y las aberturas de ventilación. En este caso, la capa cobertora puede formarse completamente

sin aberturas, eventualmente con la excepción de una escotadura central para la recepción de una unidad de accionamiento. Especialmente en este caso, la parte superior está hecha simplemente en una película de plástico que está pegada o soldada sobre la parte inferior.

5 El canal de muestra contiene una zona para la separación de componentes en partículas de la muestra líquida. En particular, si se utiliza sangre u otros fluidos corporales con componentes celulares como material de muestra, esta zona sirve para la separación los componentes de muestra celulares. A partir de la sangre se puede obtener, mediante separación, en particular, de los glóbulos rojos (eritrocitos), el plasma o el suero casi incoloro, que es más adecuado para los procedimientos de detección visual u óptica posteriores que la sangre muy coloreada.

10 Preferentemente, la separación de los componentes de muestra celulares se realiza mediante centrifugación, es decir, por la rotación rápida del elemento de prueba después del llenado con la muestra líquida. El elemento de prueba según la invención contiene canales y/o cámaras adecuadamente dimensionados y diseñados geométricamente con esta finalidad. En particular, el elemento de prueba para la separación de componentes sanguíneos celulares contiene una zona de recogida de eritrocitos (cámara de eritrocitos o trampa de eritrocitos) y una zona de recogida de suero o plasma (cámara de suero o plasma).

15 Para el control del flujo del líquido de muestra en el elemento de prueba, este puede contener válvulas, en particular, las así llamadas válvulas geométricas o sin cierre (non-closing) o barreras hidrófobas, ante todo en el canal de muestra. Estas válvulas sirven como topes capilares. Mediante éstas se puede garantizar que sea posible un control dirigido, temporal y espacial dirigido del flujo de muestra a través del canal de muestra y la zona individual del elemento de prueba.

20 En particular, el canal de muestra puede presentar una zona de dosificación de muestra, que permite una medición exacta de la muestra - alimentada en primer lugar en exceso. En una forma de realización preferente, la zona de dosificación de muestra se extiende desde la abertura de alimentación de muestra a través de un tramo correspondiente de un canal de muestra hasta una válvula en la estructura fluida, en particular, una válvula geométrica o una barrera hidrófoba. La abertura de alimentación de muestra puede absorber en primer lugar un exceso de material de muestra. La muestra fluye impulsada por fuerzas de capilaridad o por centrifugación desde la zona de alimentación de muestra a la estructura del canal y la llena hasta la válvula. A este respecto el exceso de muestra permanece en primer lugar en la zona de alimentación de muestra. Solo cuando la estructura del canal está llena hasta la válvula, se llena una cámara de exceso de muestra adyacente a la zona de alimentación de muestra y se ramifica desde el canal de muestra, por ejemplo, mediante fuerzas de capilaridad o por centrifugado del elemento de prueba. A este respecto se debe garantizar que el volumen de muestra que se va a medir inicialmente no se transporte a través de la válvula mediante la selección adecuada de la válvula. En tanto que el exceso de muestra queda atrapado en la cámara de desbordamiento correspondiente, un volumen de muestra definido con precisión se sitúa entre la válvula del canal de muestra en el un lado y la entrada a la cámara de desbordamiento de muestra en el otro lado. Al aplicar fuerzas externas, en particular, al iniciar otra centrifugación, este volumen de muestra definido ahora se mueve más allá de la válvula. Todas las áreas fluidas, que se sitúan después de la válvula y entran en contacto con la muestra, ahora se llenan en primer lugar con un volumen de muestra definido con precisión.

25 El canal de muestra también puede presentar una entrada de otros líquidos, excepto el líquido de la muestra. Por ejemplo, en el canal de muestra puede desembocar un segundo canal, que se puede llenar, por ejemplo, con un líquido reactivo o de lavado.

30 El sistema según la invención del equipo de medición y el elemento de prueba se utilizan para la determinación de un analito en una muestra líquida. A este respecto, entre otras cosas, el equipo de medición contiene al menos un accionamiento para la rotación del elemento de prueba y una óptica de evaluación para la evaluación de la señal visual u óptica del elemento de prueba.

35 Preferentemente, la óptica del equipo de medición se puede usar para la medición de fluorescencia con detección de resolución local. En el caso de una óptica de evaluación bidimensional, es decir, plana, típicamente se utiliza un LED o un láser para la iluminación del área de detección del elemento de prueba y, eventualmente, la excitación de marcas ópticamente detectables. La detección de la señal óptica se realiza mediante CMOS o CCD (típicamente 640 x 480 píxeles). La trayectoria del haz es directa o plegada (por ejemplo, a través de espejos o prismas).

40 En el caso de la óptica anamórfica, la iluminación o la excitación se realiza típicamente por medio de una raya de iluminación que ilumina el área de detección del elemento de prueba, preferentemente perpendicular a las rayas de detección y control. La detección se puede realizar aquí a través de una línea de diodos. En este caso, el movimiento de giro del elemento de prueba se puede utilizar para la iluminación y evaluación de la segunda dimensión, a fin de escanear con la línea de diodos sobre el área plana a evaluar del elemento de prueba.

45 Como accionamiento para la rotación y el posicionamiento del elemento de prueba se puede usar un motor de CC con encoder o un motor paso a paso.

50 Preferentemente el atemperado del elemento de prueba en el equipo se realiza indirectamente, por ejemplo calentando

o enfriando la placa sobre la que descansa el elemento de prueba en forma de disco en el equipo. La medición de la temperatura se realiza preferentemente sin contacto.

El procedimiento según la invención sirve para la detección de un analito en una muestra líquida. La muestra se coloca primero en la abertura de alimentación de muestra del elemento de prueba. A continuación el elemento de prueba se rota alrededor de su eje central. A este respecto, la muestra se transporta desde la abertura de alimentación de muestra hasta el extremo alejado del eje de la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente. La rotación del elemento de prueba se ralentiza o detiene luego hasta que la muestra o un material recuperado de la muestra al atravesar el elemento de prueba (por ejemplo, una mezcla de la muestra con reactivos, una muestra modificada por reacciones previas con reactivos del elemento de prueba, una muestra libre de ciertos componentes como suero o plasma de la sangre completa después de la separación de los eritrocitos, etc.) se transporta desde el extremo alejado del eje hasta el extremo cerca del eje de la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente. Finalmente, el analito se detecta visual u ópticamente en la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente, o una zona corriente abajo a ella.

El inicio de la migración de la muestra (o de un material recuperado de la muestra) a través de la zona activa capilar se puede constatar y controlar de manera precisa temporalmente mediante la ralentización o detención dirigida de la rotación del elemento de prueba. Solo cuando el valor de la fuerza de capilaridad (fuerza de aspiración) en la zona activa capilar excede el valor de su fuerza centrífuga dirigida en sentido opuesto es posible un movimiento de la muestra en y a través de la zona activa capilar. El transporte de líquido en la zona activa capilar se puede comenzar así de forma dirigida. Por ejemplo, así se puede esperar una posible reacción previa o incubación previa de la muestra o un atemperado de la muestra antes de que la rotación del elemento de prueba se ralentice o detenga, de modo que sea posible una entrada de la muestra en la zona activa capilar.

El transporte de la muestra (o un material recuperado de la muestra) a través de la zona activa capilar se puede ralentizar o detener de forma dirigida mediante la nueva rotación del elemento de prueba alrededor de su eje central. Las fuerzas centrífugas que se producen durante la rotación contrarrestan la fuerza de capilaridad que mueve el fluido de muestra desde el extremo alejado del eje de la zona activa capilar hasta el extremo cerca del eje. Por lo tanto, es posible un control dirigido, en particular, ralentización, de la velocidad de flujo de la muestra en la zona activa capilar, hasta la inversión de la dirección del flujo. De esta manera, por ejemplo, se puede controlar el tiempo de permanencia de la muestra en la zona activa capilar.

En particular, así es posible invertir la dirección de migración de la muestra líquida y/o de otro líquido a través de la zona activa capilar mediante la rotación del elemento de prueba con el elemento de prueba y el procedimiento según la invención, en donde esto también es posible repetidas veces, a fin de conseguir un movimiento de vaivén del líquido. Mediante una interacción dirigida de las fuerzas de capilaridad, que transportan el líquido a la zona activa capilar desde fuera (es decir, desde el extremo alejado del eje) hacia dentro (es decir, hasta el extremo cerca del eje), y las fuerzas centrífugas dirigidas en sentido opuesto, es posible, entre otras cosas, aumentar la eficacia de unión de las reacciones de unión en la zona activa capilar, disolver mejor los reactivos solubles y mezclarlos con la muestra u otros líquidos, o aumentar la eficiencia de lavado ("separación de fracción libre y ligada") en los ensayos de afinidad.

En particular, en relación con los inmunoensayos, la detección puede llevarse a cabo según el principio del ensayo en sándwich o en forma de una prueba competitiva.

También es posible que después de la rotación del elemento de prueba, se alimente otro líquido al elemento de prueba, que se transporta después de la muestra desde el extremo alejado del eje hasta el extremo cerca del eje de la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente.

El otro líquido puede ser, en particular, un tampón, preferentemente un tampón de lavado, o un líquido reactivo. Al agregar el otro líquido, en particular, en relación con los inmunoensayos, se puede lograr una relación señal-fondo mejorada en comparación con las tiras reactivas convencionales, ya que la adición del líquido se puede usar casi como una etapa de lavado después de la separación de fracción libre y ligada.

La invención presenta las ventajas siguientes:

La combinación del transporte de líquido por medio de fuerzas centrífugas y por fuerzas de aspiración en zonas activas capilares, en particular, en materiales de matriz porosa absorbente permite un control preciso de los flujos de líquido. Según la invención, la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente, transporta el líquido desde un extremo alejado del eje a un extremo cerca del eje, es decir, desde la periferia del elemento de prueba en forma de disco en la dirección del eje de rotación. La fuerza centrífuga, que también se puede utilizar para mover los líquidos, contrarresta exactamente esta dirección de transporte. Gracias al control dirigido de la rotación del elemento de prueba (como, por ejemplo, rotación más rápida/más lenta, conexión y desconexión del movimiento de rotación), por tanto es posible ralentizar o detener el flujo del líquido de muestra en la zona activa capilar, que es una matriz porosa absorbente, de modo que se puedan cumplir condiciones de reacción específicas y definidas. Al mismo tiempo, el uso de la matriz porosa absorbente, que sirve esencialmente como una matriz de captura para la separación de fracción libre y ligada en inmunoensayos, permite la captura eficiente de los componentes de muestra en el curso del inmunoensayo. En

particular, mediante la interacción de las fuerzas centrífugas y de capilaridad (fuerzas de aspiración) es posible permitir, sin un esfuerzo técnico aumentado, un movimiento de vaivén de la muestra a través de una zona de reactivo, en particular, una zona con reactivos inmovilizados (ante todo zona de captura para inmunoensayos heterogéneos) y así garantizar una disolución más eficaz de los reactivos, mezcla de la muestra con reactivos o una captura de componentes de muestra en compañeros de unión inmovilizados. Al mismo tiempo, es posible eliminar los efectos de agotamiento en la unión de los componentes de muestra (ante todo analito) en los compañeros de unión inmovilizados y, por lo tanto, aumentar la eficacia de la unión (es decir, las partes de la muestra empobrecidas en analito se pueden sustituir durante el movimiento de vaivén de la muestra sobre la zona de captura y/o mediante mezcla eficiente por medio de partes de la muestra ricas en analito). Además, gracias al movimiento de vaivén de los líquidos en la zona activa capilar se puede conseguir un uso lo más eficiente posible de los pequeños volúmenes de líquido, no solo para fines de reacción (aquí, en particular, se usa el volumen de muestra) sino también para fines de lavado, por ejemplo, para una mejor discriminación del marcador unido y libre en la zona de captura. De este modo se puede minimizar de forma eficaz la cantidad de muestra y reactivo líquido, así como los volúmenes de tampón de lavado.

Debido a la posición central del eje de rotación dentro del elemento de prueba, es posible diseñar tanto el elemento de prueba como el equipo de medición asociado lo más compacto posible. En los elementos de prueba en forma de chip, como se muestra, por ejemplo, en las figuras 1 y 2 del documento US 2004/0265171, el eje de rotación se sitúa fuera del elemento de prueba. Por lo tanto, una mesa giratoria o rotor asociado es necesariamente más grande que en un elemento de prueba con dimensiones idénticas, pero en el que el eje de giro está dispuesto centralmente dentro del elemento de prueba, como es el caso de los elementos de prueba según la invención.

La invención se explica con más detalle mediante los ejemplos y figuras siguientes. En este caso se hace referencia respectivamente a ensayos inmunológicos en sándwich. Sin embargo, la invención no se limita a esto. También se puede aplicar igualmente a otros tipos de inmunoensayos, en particular, también a inmunoensayos competitivos, u otros tipos de ensayos de unión específicos (por ejemplo, aquellos que como compañeros de unión usan azúcares y lectinas, hormonas y sus receptores, o también pares complementarios de ácidos nucleicos). Representantes típicos de estos ensayos de unión específica son conocidos en sí por el experto en la materia (en relación con los inmunoensayos, aquí se hace referencia expresa a las figuras 1 y 2 y los pasajes de descripción asociados del documento US 4,861,711) y pueden transferirse sin más a la presente invención.

La figura 1 muestra en una representación esquemática una vista en planta de una forma de realización preferente del elemento de prueba según la invención. En aras de la claridad, solo se muestra la capa del elemento de prueba que contiene las estructuras fluidas. A este respecto, la forma de realización mostrada solo contiene una abertura para la introducción de la muestra y/o el líquido de lavado. En esta forma de realización, la separación de los componentes de muestra molestos se lleva a cabo después de que la muestra se ha puesto en contacto con los reactivos.

La figura 2 muestra esquemáticamente otra forma de realización preferente del elemento de prueba según la invención. De nuevo, aquí solo se ha mostrado la estructura, que presenta los elementos fluidos del elemento de prueba. En esta forma de realización del elemento de prueba, hay dos aberturas separadas de alimentación de muestra y de tampón de lavado. Aquí ya se realiza una separación de los componentes de muestra celulares antes de que la muestra se ponga en contacto con los reactivos.

La figura 3 muestra una variante de la forma de realización según la figura 1 en representación esquemática. Aquí la separación de los componentes de muestra celulares también se realiza después de que la muestra se puso en contacto con los reactivos. Sin embargo, la estructura según la figura 3 tiene un suministro separado para el líquido de lavado.

La figura 4 muestra otra forma de realización preferente del elemento de prueba según la invención en una vista esquemática análoga a la figura 2.

La figura 5 representa un ligero perfeccionamiento del elemento de prueba según la figura 3. A diferencia de la forma de realización según la figura 3, la figura 5 contiene otra disposición geométrica del no tejido de residuos y otro tipo de válvula al final de la sección de dosificación de muestra.

La figura 6 muestra esquemáticamente una vista en planta de un perfeccionamiento del elemento de prueba según la figura 5. A diferencia de la forma de realización según la figura 5, la forma de realización según la figura 6 contiene una estructura fluida para la absorción de un exceso de muestra.

La figura 7 es una representación esquemática de otra variante del elemento de prueba según la figura 3. Funcionalmente, las estructuras fluidas son esencialmente análogas a las de la figura 3. Sin embargo, están alineadas y diseñadas geoméricamente de manera diferente.

La figura 8 muestra esquemáticamente otra forma de realización preferente del elemento de prueba según la invención. A este respecto, las estructuras en la figura 8 se corresponden esencialmente con las funciones que ya son conocidas por el elemento de prueba según la figura 4.

La figura 9 muestra esquemáticamente una vista en planta de una alternativa no según la invención al elemento de prueba según la figura 6. A diferencia de la forma de realización según la invención según la figura 6, la forma de realización según la figura 9 contiene una abertura de alimentación de muestra alejada del eje, que inicialmente lleva la muestra más cerca del centro del elemento de prueba a través de un capilar, es decir, a un área cerca del eje.

La figura 10 muestra el desarrollo de curva típico para las mediciones de troponina T en muestras de sangre total (concentración de troponina T en ng/ml representada en función de la intensidad de señal (recuentos)). Las muestras se suplementaron con troponina T recombinante hasta la concentración respectiva. Los datos pertenecen al ejemplo 2 y se obtuvieron con la ayuda de elementos de prueba según la figura 6/ejemplo 1.

Los números y abreviaturas en las figuras tienen el siguiente significado:

- 1 Elemento de prueba en forma de disco (disco)
- 2 Sustrato (por ejemplo, en una o más piezas, moldeado por inyección, fresado, construido a partir de capas, etc.)
- 3 Escotadura central (agujero de accionamiento)
- 4 Abertura de alimentación de muestra
- 5 Zona de dosificación de muestra (sección de dosificación del canal)
- 6 Tope capilar (por ejemplo, barrera hidrófoba, válvula geométrica/sin cierre)
- 7 Contenedor para exceso de muestra.
- 8 Tope capilar (por ejemplo, barrera hidrófoba, válvula geométrica/sin cierre)
- 9 Canal
- 10 Zona de recogida de suero/plasma (cámara de suero/plasma)
- 11 Zona de recogida de eritrocitos (cámara de eritrocitos)
- 12 Matriz porosa absorbente (membrana)
- 13 Residuo (no tejido)
- 14 Tope capilar (por ejemplo, barrera hidrófoba, válvula geométrica/sin cierre)
- 15 Canal
- 16 Abertura de adición para otros líquidos, por ejemplo, tampón de lavado
- 17 Abertura de ventilación
- 18 Canal de decantación
- 19 Tope capilar (por ejemplo, barrera hidrófoba, válvula geométrica/sin cierre)
- 20 Depósito colector
- 21 Canal capilar

Las figuras 1 a 8 muestran diferentes formas de realización preferentes del elemento de prueba (1) según la invención. Esencialmente se muestra respectivamente el sustrato (2) que contiene las estructuras fluidas y la escotadura central (orificio de accionamiento 3). Además del sustrato, que puede estar hecho por ejemplo en una o más partes y puede construirse por medio de moldeado por inyección, fresado o mediante laminado de las capas correspondientes, el elemento de prueba (1) en forma de disco, según la invención también contiene generalmente una capa cubradora, que en las figuras no está representada por claridad. En principio, la capa cubradora puede portar igualmente estructuras, pero en general no presentará otras estructuras aparte de las aberturas para las muestras y/u otros líquidos a alimentar en el elemento de prueba. La capa cubradora también puede diseñarse completamente sin aberturas, por ejemplo en forma de una película, que se conecta con el sustrato y cierra las estructuras situadas en ella.

Las formas de realización, que están representadas en las figuras 1 a 9, muestran estructuras fluidas que realizan



funciones muy similares, aunque difieren en el detalle de una forma de realización a otra forma de realización. La estructura básica y la función básica se deben explicar por lo tanto aquí con más detalle mediante la forma de realización según la figura 1. Las formas de realización según las figuras 2 a 9 se explican a continuación con más detalle solo mediante las diferencias específicas a fin de evitar repeticiones innecesarias.

5 La figura 1 muestra una primera forma de realización preferente del elemento de prueba (1) en forma de disco según la invención. El elemento de prueba (1) contiene un sustrato (2) que contiene las estructuras fluidas y microfluidas así como cromatográficas. El sustrato (2) está cubierto por una contrapieza correspondiente (capa cobertora) (no mostrada) que contiene la alimentación de muestra y orificios de ventilación correspondientes a las estructuras en el  
10 sustrato (2). Tanto la capa cobertora como el sustrato (2) presentan una escotadura central (3) que, en cooperación con una unidad de accionamiento correspondiente en un equipo de medición, hacen posible una rotación del elemento de prueba (1) en forma de disco. Alternativamente, es posible que el elemento de prueba (según una de las figuras 1 a 9) no presente tal escotadura central (3) y el accionamiento se rote a través de una unidad de accionamiento del equipo de medición diseñada conforme a los contornos exteriores del elemento de prueba, por ejemplo, una plato rotativo en el cual se inserta el elemento de prueba a una profundidad conforme a su forma.

El líquido de muestra, en particular, la sangre total, se le suministra al elemento de prueba (1) a través de la abertura de alimentación de muestra (4). Accionado por fuerzas de capilaridad y/o fuerzas centrífugas, el líquido de muestra llena la zona de dosificación de muestra (5). La zona de dosificación de muestra (5) también puede contener los reactivos secos. Está limitada por los topes capilares (6 y 8), que pueden estar configurados, por ejemplo, como barrera hidrófoba o como válvulas geométricas/sin cierre. A este respecto, la limitación de la zona de dosificación de muestra (5) por los topes capilares (6, 8) garantiza que un volumen de muestra definido se absorba y transfiera a las zonas fluidas que se sitúan corriente abajo de la zona de dosificación de la muestra (5). Tras la rotación del elemento de prueba (1), un eventual exceso de muestra se transfiere desde la abertura de alimentación muestra (4) y la zona de dosificación de muestra (5) al contenedor de exceso de muestra (7), mientras que la cantidad medida de muestra se transfiere de la zona de dosificación de la muestra (5) al canal (9).

A las velocidades de rotación correspondientes, el canal (9) se utiliza para iniciar la separación de glóbulos rojos y otros componentes de muestra celulares. Los reactivos contenidos en la zona de dosificación de muestra (5) ya están presentes disueltos en la muestra al entrar la muestra en el canal (9). A este respecto, la entrada de la muestra en el canal (9) a través del tope capilar (8) conduce a una mezcla de los reactivos en la muestra.

La posibilidad del control temporal de los procesos de rotación, que son posibles con el elemento de prueba según la invención, permite a este respecto un control dirigido de los tiempos de permanencia y, por lo tanto, el tiempo de incubación de la muestra con reactivos y los tiempos de reacción.

Durante la rotación, la mezcla de reactivo-muestra se conduce a las estructuras fluidas (10) (zona de recogida de suero/plasma) y (11) (zona de recogida de eritrocitos). Debido a las fuerzas centrífugas que actúan sobre la mezcla de reactivo-muestra, el plasma o suero se separa de los glóbulos rojos. A este respecto, los glóbulos rojos se acumulan en la zona de recogida de eritrocitos (11), mientras que el plasma permanece esencialmente en la zona de recogida (10).

A diferencia de los elementos de prueba que utilizan membranas o no tejidos para la separación de componentes de muestra en partículas (por ejemplo, no tejidos de fibras de vidrio o membranas plásticas porosas asimétricamente para la separación los glóbulos rojos de la sangre total, generalmente referidos como membranas o materiales no tejidos que separan la sangre), el volumen de la muestra se puede utilizar de forma mucho más eficaz con los elementos de prueba según la invención, dado que prácticamente no hay volúmenes muertos (por ejemplo, volumen de espacios intermedios de fibras o poros) de los cuales no se puede extraer la muestra de nuevo. Además, estas membranas y no tejidos que separan la sangre del estado de la técnica tienden parcialmente a la absorción indeseada de componentes de muestra (por ejemplo, proteínas) o a la destrucción (lisis) de las células, lo que tampoco se observa igualmente con los elementos de prueba de la presente invención.

Si la rotación del elemento de prueba (1) se detiene o se ralentiza, la mezcla de reactivo-plasma (que se formó en presencia del analito en el caso de un inmunoensayo, por ejemplo, complejos de sándwich de conjugados de analito y anticuerpo) se absorbe por aspiración de la matriz absorbente porosa (12) en esta y se conduce a través de ésta. En el caso de los inmunoensayos, mediante los compañeros de unión inmovilizados contenidos en la membrana (12) se capturan los complejos que contienen analitos en la zona de detección y se unen al conjugado marcado no unido en la zona de control. A este respecto, el no tejido (13) adyacente a la matriz porosa absorbente favorece el movimiento de la muestra a través de la membrana (12). El no tejido (13) también sirve además para la absorción de la muestra después de atravesar la membrana (12).

Una vez que la muestra líquida ha atravesado la estructura fluida del elemento de prueba (1) desde la abertura de alimentación de la muestra (4) hasta el no tejido (13), en un paso posterior, el tampón de lavado se pipetea en la abertura de alimentación de la muestra (4). Gracias a la misma combinación de fuerzas de capilaridad, centrífugas y cromatográficas, el tampón de lavado atraviesa las estructuras fluidas correspondientes del elemento de prueba (1) y, en particular, lava la membrana (12), donde ahora se sitúan los complejos de analito unidos, eliminando así los

residuos de reactivo en exceso. La etapa de lavado se puede repetir una o más veces para mejorar la relación señal-fondo. Esto permite una optimización del límite de detección para el analito y un aumento del rango de medición dinámico.

5 El canal de muestra, en el que la muestra líquida en el elemento de prueba (1) se transporta desde la abertura de alimentación de muestra (4) hasta el primer extremo alejado del eje de la membrana (12), comprende en este caso la zona de dosificación de muestra (5), el tope capilar (8), el canal (9), la zona de recogida de suero/plasma (10) y la cámara de eritrocitos (11). En otras formas de realización, el canal de muestra puede consistir en más o menos zonas/áreas/cámaras individuales.

10 Las figuras 3, 5, 6, 7 y 9 muestran formas de realización esencialmente análogas a la figura 1. La figura 3 difiere de la figura 1 en que, por un lado, un contenedor para el exceso de muestra (7) no se conecta con la abertura de alimentación de muestra (4) y no está presente un tope capilar en el extremo de la sección de dosificación de muestra (5) (es decir, se requiere una aplicación de la muestra dosificada) y, por otro lado, porque están presentes una abertura de adición separada (16) para otros líquidos, como por ejemplo tampón de lavado, y un canal asociado (15), que puede transportar el tampón a la membrana (12). A este respecto, el transporte del tampón a la membrana (12) se puede basar en fuerzas de capilaridad o fuerzas centrífugas.

15 La forma de realización según la figura 5 es en gran parte idéntica a la forma de realización según la figura 3. Las dos formas de realización difieren solo en la forma del no tejido de desecho (13) y en que el elemento de prueba según la figura 5 presenta un tope capilar (8) en el extremo de la sección de dosificación de muestra (5).

20 La forma de realización según la figura 6 es de nuevo esencialmente idéntica a la forma de realización según la figura 5 y se diferencia de esta por la presencia adicional de un recipiente para el exceso de muestra (7) en el área entre la abertura de dosificación de muestra (4) y la zona de dosificación de muestra (5). Aquí, no se requiere una aplicación dosificada de la muestra (análogamente a la figura 1).

25 La forma de realización del elemento de prueba (1) según la invención según la figura 7 se corresponde esencialmente con el elemento de prueba (1) de la figura 6. Ambas formas de realización presentan las mismas estructuras fluidas y funciones. Solo son diferentes la disposición y la configuración geométrica. La forma de realización según la figura 7 tiene aberturas de ventilación adicionales (17), que son necesarias debido al diferente dimensionamiento de las estructuras fluidas en comparación con la figura 6, a fin de permitir el llenado de las estructuras con muestras o líquido de lavado. El canal (9) está diseñado aquí como un capilar delgado, que se llena solo durante la rotación del elemento de prueba (es decir, solo es posible superar el tope capilar (8) por medio de la fuerza centrífuga). Ya durante la rotación, con el elemento de prueba (1) según la figura 7 es posible evacuar el plasma recuperado de la zona de recogida de eritrocitos 11; para ello sirve la unidad de decantación 18, que finalmente desemboca en la zona de recogida de suero/plasma 10.

30 La forma de realización del elemento de prueba (1) no según la invención según la figura 9 se corresponde esencialmente con el elemento de prueba (1) de la figura 6. Ambas formas de realización presentan las mismas estructuras fluidas y funciones. Solo son diferentes la disposición y la configuración geométrica. La forma de realización no según la invención según la figura 9 presenta básicamente una abertura de alimentación de muestra (4) más exterior, es decir, alejada del eje. Esto puede ser ventajoso si el elemento de prueba (1) ya está introducido en un equipo de medición para el llenado con la muestra. En este caso, al usuario se le puede hacer accesible la abertura de alimentación de muestra (4) más fácilmente que lo que es posible con los elementos de prueba según la invención según las figuras 1 a 8, donde la abertura de alimentación de muestra (4) está dispuesta cerca del eje (es decir, alejada del borde exterior del elemento de prueba).

35 A diferencia de la forma de realización según las figuras 1, 3, 5, 6, 7 y 9, en las formas de realización según las figuras 2, 4 y 8, la separación de los componentes de muestra celulares del líquido de la muestra tiene lugar antes de que la muestra entre en contacto con los reactivos. Esto tiene la ventaja de que el uso de sangre total o plasma o suero como material de muestra no conduce a diferentes resultados de medición, ya que el plasma o suero siempre entra en contacto en primer lugar con los reactivos y el comportamiento de disolución/incubación/reacción debería ser prácticamente el mismo. También en las formas de realización según las figuras 2, 4 y 8, la muestra líquida se alimenta en primer lugar al elemento de prueba (1) a través de la abertura de alimentación de muestra (4). Gracias a las fuerzas de capilaridad y/o fuerzas centrífugas, la muestra se transporta a continuación desde la abertura de alimentación de muestra (4) a las estructuras del canal. En las formas de realización según las figuras 2 y 4, la muestra se transfiere a una sección de dosificación de muestra (5) después de la alimentación en la abertura de alimentación de muestra (4), y a continuación se efectúa una separación suero/plasma de la sangre total por rotación. Los componentes de muestra celulares no deseados, esencialmente eritrocitos, se acumulan en la trampa de eritrocitos (11), mientras que el suero o plasma se acumulan en la zona (10). A través de un capilar, el suero se extrae de la zona (10) y se transporta a la estructura de canal (9), donde se alojan los reactivos secos y se disuelven al entrar la muestra. Debido a la reiterada rotación del elemento de prueba (1), la mezcla muestra-reactivo puede superar el tope capilar (14) desde la estructura de canal (9) y así llegar a través del canal (15) a la membrana (12). Al ralentizar o detener la rotación, la mezcla de muestra-reactivo se transporta a través de la membrana (12) al no tejido de desecho (13).

Las formas de realización según la figura 2 y la figura 4 difieren a este respecto en que en la figura 2 está previsto un recipiente para el exceso de muestra (7), mientras que la forma de realización según la figura 4 no prevé una función semejante. Como en la forma de realización según la figura 3, aquí es conveniente una aplicación dosificada de la muestra.

La figura 8 muestra una variante de las formas de realización según las figuras 2 y 4. Aquí, inmediatamente después de la abertura de alimentación de muestra (4), después de pasar a través de una primera válvula geométrica (19), la muestra se transfiere por centrifugación a una estructura de separación de eritrocitos (10, 11). A este respecto, el área designada con (10) sirve como zona de recogida de suero/plasma (10) desde donde el suero o plasma liberado de las células se reconduce a través de un canal capilar (21) después de la centrifugación. La cámara (20) sirve como depósito colector para el exceso de suero o plasma, que después del llenado completo de la sección de dosificación de muestra (5) fluye eventualmente desde la zona de recogida de suero/plasma (10). Todas las demás funciones y estructuras son análogas a las figuras 1 a 7.

Gracias al diseño dirigido de las propiedades hidrófilas o hidrófobas de las superficies del elemento de prueba (1) se puede lograr que un movimiento del líquido de la muestra y/o los líquidos de lavado se realice solo con la ayuda de la rotación y las fuerzas centrífugas resultantes de ello o mediante una combinación de fuerzas centrífugas y fuerzas de capilaridad. Lo último requiere al menos parcialmente superficies hidrofílicas en las estructuras fluidas del elemento de prueba (1).

Como ya se describió más arriba en relación con la figura 1, los elementos de prueba según la invención según las figuras 1, 2, 6, 7, 8 y 9 presentan una funcionalidad automática, que permite una medición relativamente exacta de una muestra alícuota de una muestra que se ha aplicado en exceso al elemento de prueba permitido (el así llamado "sistema de medición"). Comprende esencialmente los elementos 4, 5, 6 y 7 de los elementos de prueba (1) representados. El líquido de muestra, en particular, la sangre total, se le suministra al elemento de prueba (1) a través de la abertura de alimentación de muestra (4). Accionado por fuerzas de capilaridad y/o fuerzas centrífugas, el líquido de muestra llena la zona de dosificación de muestra (5). La zona de dosificación de muestra (5) también puede contener los reactivos secos. Está limitada por los toques capilares (6 y 8), que pueden estar configurados, por ejemplo, como barrera hidrófoba o como válvulas geométricas/sin cierre. A este respecto, la limitación de la zona de dosificación de muestra (5) por los toques capilares (6, 8) garantiza que un volumen de muestra definido se absorba y transfiera a las zonas fluidas que se sitúan corriente abajo de la zona de dosificación de la muestra (5). Tras la rotación del elemento de prueba (1), un eventual exceso de muestra se transfiere desde la abertura de alimentación muestra (4) y la zona de dosificación de muestra (5) al contenedor de exceso de muestra (7), mientras que la cantidad medida de muestra se transfiere de la zona de dosificación de la muestra (5) al canal (9). Alternativamente, también es posible usar para ello otras fuerzas, en lugar de la fuerza generada por la rotación que mueve la muestra, por ejemplo, mediante aplicación de una sobrepresión en el lado de entrada de muestra o una depresión en el lado de salida de muestra. En consecuencia, el sistema de medición representado no está necesariamente vinculado a elementos de prueba rotativos, sino que también se puede utilizar en otros elementos de prueba.

Se conocen sistemas de medición similares, por ejemplo, a partir del documento US 5,061,381. En este documento también se describe un sistema en el que se puede alimentar un líquido de muestra en exceso a un elemento de prueba. La medición de una muestra alícuota relativamente precisa, que a continuación se reprocesa en el elemento de prueba, también se realiza en este caso por la interacción de una zona de dosificación ("metering chamber") y una zona de exceso de muestra ("overflow chamber"), en donde estas dos zonas -a diferencia de en la presente invención - están en contacto estrecho, pero que siempre permite al menos durante el llenado el intercambio de líquidos. El líquido de muestra se separa aquí directamente durante el llenado del elemento de prueba en una parte que pasa a través de un canal ancho en la "metering chamber", y una parte que fluye a través de un canal estrecho en la "overflow chamber". Después del llenado completo de la "metering chamber", el elemento de prueba se pone en rotación y un eventual exceso de muestra se desvía a la "overflow chamber", de modo que solo el volumen de muestra medido deseado permanece en la "metering chamber", que se procesa a continuación.

Una desventaja de la configuración del sistema de medición según el documento US 5,061,381 es que, con volúmenes de muestra que se alimentan al elemento de prueba y que se corresponden exactamente con el volumen mínimo o son solo un poco más grandes que el volumen mínimo, existe el riesgo de que la zona de dosificación se subdosifique, ya que siempre una parte de la muestra desde el principio fluye sin obstáculos hacia la "overflow chamber".

Este problema se resuelve en la configuración actualmente propuesta del sistema de medición porque un tope capilar (barrera hidrófoba o una válvula geométrica o sin cierre) se dispone entre la zona de dosificación y la zona para el exceso de muestra. Durante el llenado del elemento de prueba con una muestra, por lo tanto, la muestra se conduce en primer lugar casi exclusivamente a la zona de dosificación. A este respecto, el tope capilar evita que la muestra pueda entrar en la zona de exceso de muestra antes de que la zona de dosificación de muestra esté completamente llena. También en el caso de volúmenes de muestra que se aplican sobre el elemento de prueba y que se corresponden exactamente con el volumen mínimo o son solo ligeramente más grandes que el volumen mínimo, se garantiza así que la zona de dosificación de muestra esté completamente llena.

#### Ejemplo 1

**Producción de un elemento de prueba según la figura 6**

## 1.1 Producción del sustrato (2)

Por medio de moldeo por inyección, un sustrato (2) según la figura 6 se produce a partir de policarbonato (PC) (alternativamente como material también es posible poliestireno (PS), plástico ABS o poli(metacrilato de metilo) (PMMA)) (dimensiones aprox. 60 × 80 mm<sup>2</sup>). Los canales y zonas individuales (estructuras fluidas) tienen las siguientes dimensiones (profundidad de las estructuras (t) y eventualmente su volumen (V), las figuras se refieren a la figura 6 y las estructuras mostradas en ella):

Capilar entre 4 y 5: t = 500 μm

N.º 7: t = 700 μm

N.º 5: t = 150 μm; V = 26,5 mm<sup>3</sup>

N.º 8: t = 500 μm

N.º 9: t = 110 μm

N.º 10: t = 550 μm

N.º 11: t = 130 μm; V = 15 mm<sup>3</sup>

N.º 15: t = 150 μm; V = 11,4 mm<sup>3</sup>

A este respecto, una transición de estructuras menos profundas a estructuras más profundas solo es posible generalmente para líquidos en las estructuras fluidas si la fuerza (por ejemplo, la fuerza centrífuga) actúa desde fuera. Tales transiciones actúan como válvulas geométricas (no de cierre).

Junto a las estructuras fluidas (ver arriba), el sustrato (2) también tiene las aberturas de adición de muestra y tampón (4, 16), las aberturas de ventilación (17) y la escotadura central (3).

La superficie del sustrato (2), que presenta las estructuras fluidas, puede limpiarse e hidrofiliarse mediante tratamiento con plasma.

## 1.2 Introducción de los reactivos

Una parte de los reactivos requeridos para la detección de analitos (por ejemplo, anticuerpos anti-analito biotinilados y anticuerpos anti-analito marcados con un marcador de fluorescencia) se introducen en la sección de dosificación de la muestra (5) como solución alternativamente como manchas de reactivo puntiformes mediante una dosificación piezoeléctrica y luego se secan. de modo que prácticamente toda su superficie interior está ocupada con reactivos.

A este respecto, las soluciones de reactivos se componen de la siguiente manera:

Anticuerpo biotinilado: Mes 50 mM, pH 5,6; 100 μg/ml de anticuerpos monoclonales biotinilados anti-troponina T

Anticuerpos marcados Hepes 50 mM, pH 7,4, anticuerpos monoclonales anti-troponina T marcados por fluorescencia con colorante fluorescente JG9 derivado de ácido escuárico (embebido en partículas de látex de poliestireno) (solución al 0,35 %)

## 1.3 Inserción de la membrana (12)

En una escotadura correspondiente en el sustrato (2) se inserta la matriz porosa (12) (membrana de nitrocelulosa sobre película portadora de plástico; 21 x 5 mm<sup>2</sup>; membrana de nitrato de celulosa reforzada con película de PE de 100 μm (tipo CN 140 de Sartorius, Alemania)), en la que se introdujo una línea de detección de analitos (poliestreptavidina) y una línea de control (polihaptenos) mediante impregnación de raya (ver abajo), y eventualmente se fija con cinta adhesiva de doble cara.

Sobre la membrana de nitrato de celulosa descrita anteriormente se aplica una solución acuosa de estreptavidina (4,75 mg/ml) mediante la dosificación de raya. Para este propósito, se selecciona la dosis (cantidad de dosis de 0,12 ml/min, velocidad de la banda 3 m/min), e modo que se forma una raya con una anchura de aproximadamente 0,4 mm. Esta raya se usa para la detección del analito a determinar y contiene aproximadamente 0,95 μg de estreptavidina por membrana.

A una distancia de aproximadamente 4 mm corriente abajo de la raya con estreptavidina, se aplica una solución acuosa de polihapteno y troponina T de 0,3 mg/ml en condiciones de dosificación idénticas. Esta raya sirve como un control funcional del elemento de prueba y contiene aproximadamente 0,06 µg de polihapteno por prueba.

5 1.4 Aplicación de la cubierta

A continuación, la cubierta (película o pieza moldeada por inyección sin estructuras fluidas, que eventualmente puede estar hidrofílica) se aplica y eventualmente se conecta al sustrato (2), preferentemente pegada, soldada o unida por clip.

10

1.5 Inserción del no tejido de residuos (13)

15

Finalmente, se gira el sustrato y en la escotadura correspondiente se inserta el no tejido de residuos (13) (13 x 7 x 1,5 mm<sup>3</sup> un gran no tejido de 100 partes de fibras de vidrio (diámetro 0,49 a 0,58 µm, longitud 1000 µm) y 5 partes de fibras de poli(alcohol vinílico) (Kuralon VPB 105-2 de Kuraray) con un peso por unidad de superficie de aproximadamente 180 g/m<sup>2</sup>), que luego se fija mediante una cinta adhesiva en el sustrato (2).

20

Mediante la unidad de absorción de muestras de cuasi auto dosificación (que comprende la abertura de alimentación de la muestra (4), la sección dosificación de muestra (5) y las estructuras que la limitan (tope capilar (8) y el contenedor para el exceso de muestra (7)) se garantiza que, independientemente de la cantidad de muestra alimentada sobre el elemento de prueba (1) (siempre y cuando exceda un volumen mínimo (en este ejemplo, 27 µl)) se utilicen de forma reproducible las mismas cantidades de muestras al usar diferentes elementos de prueba.

25

Mediante la distribución de los reactivos en toda la sección de dosificación de muestra (5), preferentemente en forma de manchas de reactivo alternas (es decir, áreas de reactivo pequeñas, casi puntiformes), en combinación con un llenado rápido de la sección de dosificación de muestra (5) con la muestra, se logra una disolución homogénea de los reactivos en todo el volumen de la muestra, especialmente si el relleno se realiza claramente más rápido que la disolución. Además, se produce una disolución prácticamente completa de los reactivos, de modo que aquí nuevamente se observa una reproducibilidad incrementada en comparación con los elementos de prueba de materiales convencionales en base a materiales absorbentes (tiras reactivas, discos biológicos con almohadillas de reactivos, etc.).

30

**Ejemplo 2**

35

**Detección de troponina T con la ayuda del elemento de prueba del ejemplo 1**

En el elemento de prueba según el ejemplo 1 se alimentan 27 µl de sangre total a la que se agregaron diferentes cantidades de troponina T recombinante. A continuación el elemento de prueba se trata adicionalmente sobre la base del procedimiento dado en la tabla 1 y finalmente se miden las señales de fluorescencia para diferentes concentraciones.

40

Tabla 1: Desarrollo de medición

Tiempo (min:seg)	Duración (min:seg)	Rotación con revoluciones por minuto	Acción
00:00	01:00	0	Añadir 27 µl de muestra; disolver los reactivos
01:00	02:00	5000	Separación e incubación de eritrocitos
03:00	01:00	800	Cromatografía (generar señal)
04:00	00:10	0	Añadir 12 µl de tampón de lavado <sup>1)</sup>
04:10	02:00	800	Transporte de tampón de lavado y cromatografía
06:10	00:10	0	Añadir 12 µl de tampón de lavado <sup>1)</sup>
06:20	02:00	800	Transporte de tampón de lavado y cromatografía
08:20	00:10	0	Añadir 12 µl de tampón de lavado <sup>1)</sup>
08:30	02:00	800	Transporte de tampón de lavado y cromatografía
10:30		0	Medir

45

<sup>1)</sup> Hepes 100 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; acida sódica al 0,095 %.

Los datos medidos se reproducen en la figura 10. A este respecto, las señales de medición respectivas (en recuentos) se representan frente a la concentración de troponina T recombinante (c (TnT)) en [ng/ml]. La concentración real de troponina T en las muestras de sangre total se determinó utilizando el procedimiento de referencia "Prueba de troponina T de Roche Diagnostics Elecsys".

5 En comparación con las tiras reactivas de troponina T inmunocromatográficas convencionales, como, por ejemplo, Troponina T cardíaca de Roche Diagnostics, el límite de detección para el rango de medición evaluable  
cuantitativamente con el elemento de prueba según la invención se desplaza hacia abajo (Troponina T cardíaca:  
0,1 ng/ml; invención: 0,02 ng/ml) y el rango de medición dinámico se ensancha hacia arriba (Troponina T cardíaca:  
10 2,0 ng/ml; invención: 20 ng/ml). Al mismo tiempo, los elementos de prueba según la invención muestran una precisión  
mejorada.

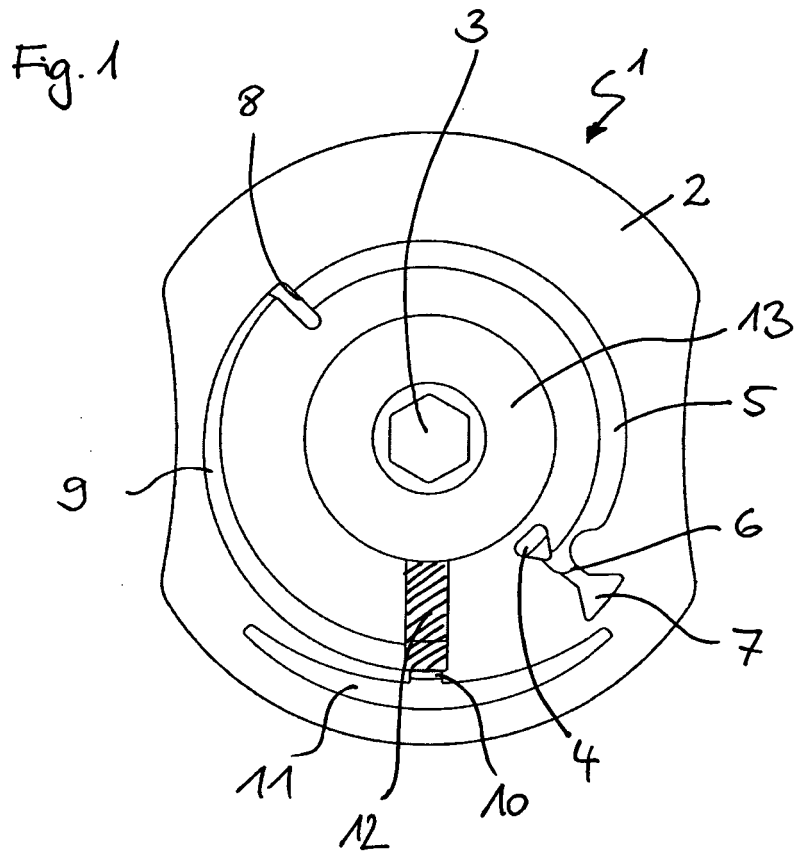
## REIVINDICACIONES

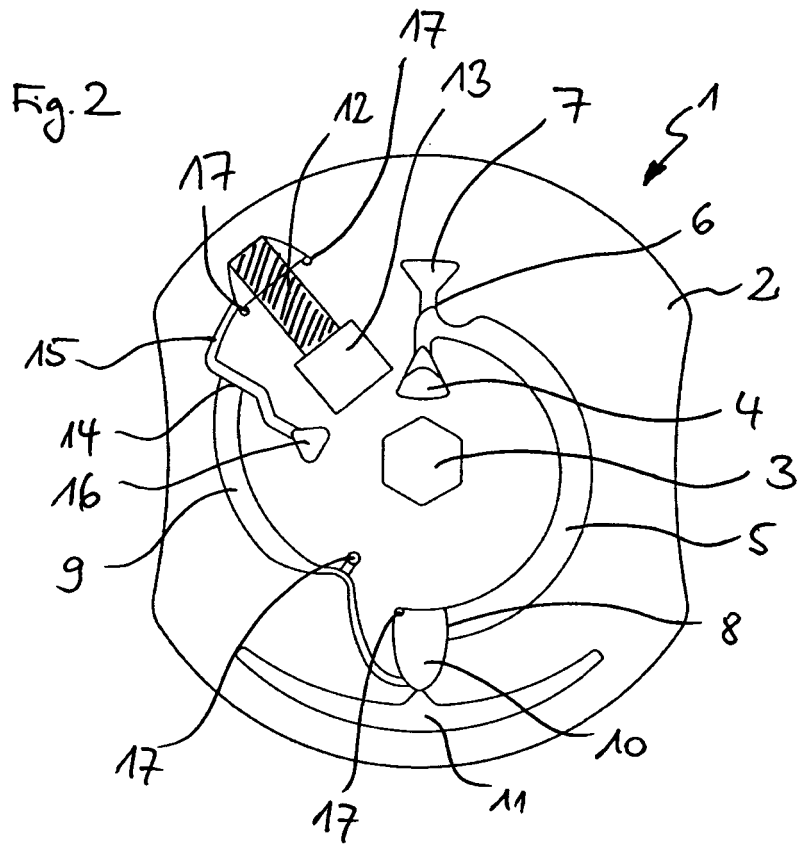
- 5 1. Elemento de prueba (1) para la detección de un analito en una muestra líquida que está esencialmente en forma de disco, que contiene
- un eje central dentro del elemento de prueba que se sitúa perpendicularmente al plano del elemento de prueba y alrededor del que es rotativo el elemento de prueba (1),
  - una abertura de alimentación de muestra (4) para la alimentación de una muestra líquida,
  - una zona activa capilar (12), que es una matriz porosa absorbente (12), en donde la zona activa capilar (12) contiene una o más zonas con reactivos inmovilizados, en donde los reactivos inmovilizados son reactivos de unión específicos que son adecuados para capturar de forma dirigida el analito o las especies derivadas del analito y relacionadas con este a partir de la muestra que fluye a través de la zona activa capilar (12) y que se presentan de forma inmovilizada en forma de líneas, puntos, patrones en o sobre el material de la zona activa capilar (12), con un primer extremo alejado del eje y un segundo extremo cerca del eje, y
  - un canal de muestra (9) que se extiende desde la abertura de alimentación de muestra (4) sobre un área cerca del eje hasta el primer extremo alejado del eje de la zona activa capilar (12) y que contiene una zona para la separación de los componentes en partículas de la muestra líquida (10, 11) **caracterizado por que** el primer extremo alejado del eje de la zona activa capilar (12) está en contacto con el canal de muestra (9) y la abertura de alimentación de muestra (4) está cerca del eje y el canal de muestra (9) se extiende desde la abertura de alimentación de muestra (4) cerca del eje hasta el primer extremo alejado del eje de la zona activa capilar (12).
- 20 2. Elemento de muestra (1) según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la matriz porosa absorbente (12) es un papel, una membrana o un no tejido.
- 25 3. Elemento de prueba (1) según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la zona activa capilar (12) está en contacto con el segundo extremo cerca del eje con otro material absorbente (13) o una estructura absorbente, que puede absorber el líquido de la zona activa capilar (12).
- 30 4. Elemento de prueba (1) según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el canal de muestra (9) contiene zonas de diferentes dimensiones y/o para diferentes funciones, en particular, una zona con reactivos solubles y/o contiene una zona de dosificación de muestra (5) y/o una entrada para otros líquidos (16) excepto el líquido de muestra.
- 35 5. Elemento de prueba (1) según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el canal de muestra (9) contiene válvulas geométricas o barreras hidrófobas (6, 8, 14, 19).
- 40 6. Elemento de prueba (1) según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** la abertura de alimentación de muestra (4) está en contacto con una zona de dosificación de muestra (5) y una zona (7) para el exceso de muestra, en donde entre la zona de dosificación de muestra (5) y la zona (7) para el exceso de muestra está presente un tope capilar (6).
- 45 7. Procedimiento para la detección de un analito en una muestra líquida, en donde
- la muestra se alimenta en la abertura de alimentación de muestra (4) del elemento de prueba (1) según una de las reivindicaciones 1 a 6,
  - el elemento de prueba (1) se rota de modo que la muestra se transporta al extremo alejado del eje de la zona activa capilar (12),
  - la rotación del elemento de prueba (1) se ralentiza o se detiene hasta que la muestra o un material obtenido de la muestra al atravesar el elemento de prueba (1) se aspira desde el extremo alejado del eje cercano hasta el extremo cerca del eje de la zona activa capilar (12), y
  - el analito se detecta visual u ópticamente en la zona activa capilar (12) o en una zona corriente abajo a ella.
- 50 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado por que** después de la rotación del elemento de prueba (1), se alimenta otro líquido al elemento de prueba (1), que se aspira después de la muestra desde el extremo alejado del eje hasta el extremo cerca del eje de la zona activa capilar (12).
- 55 9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado por que** la migración de la muestra líquida y/o el otro líquido a través de la zona activa capilar (12) se ralentiza o detiene de forma dirigida mediante la rotación del
- 60
- 65

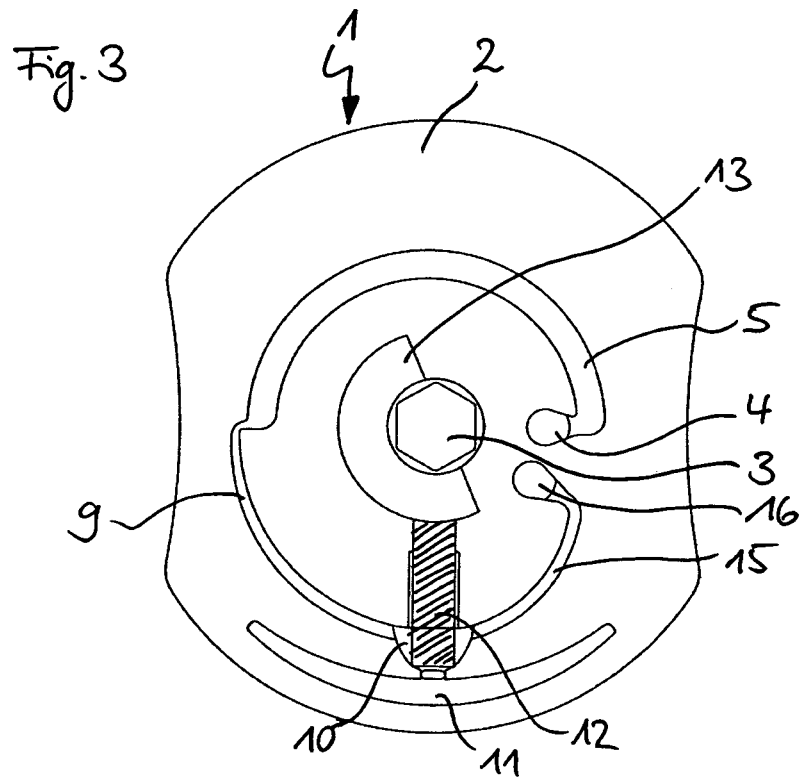
elemento de prueba (1).

- 5 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado por que** la dirección de migración de la muestra líquida y/o el otro líquido a través de la zona activa capilar (12) se invierte por la rotación del elemento de prueba (1).
- 10 11. Sistema para la determinación de un analito en una muestra líquida que contiene un elemento de prueba (1) según una de las reivindicaciones 1 a 6 y un equipo de medición, en donde el equipo de medición
- presenta al menos un accionamiento para la rotación del elemento de prueba (1) y
  - una óptica de evaluación para evaluar la señal visual u óptica del elemento de prueba (1).









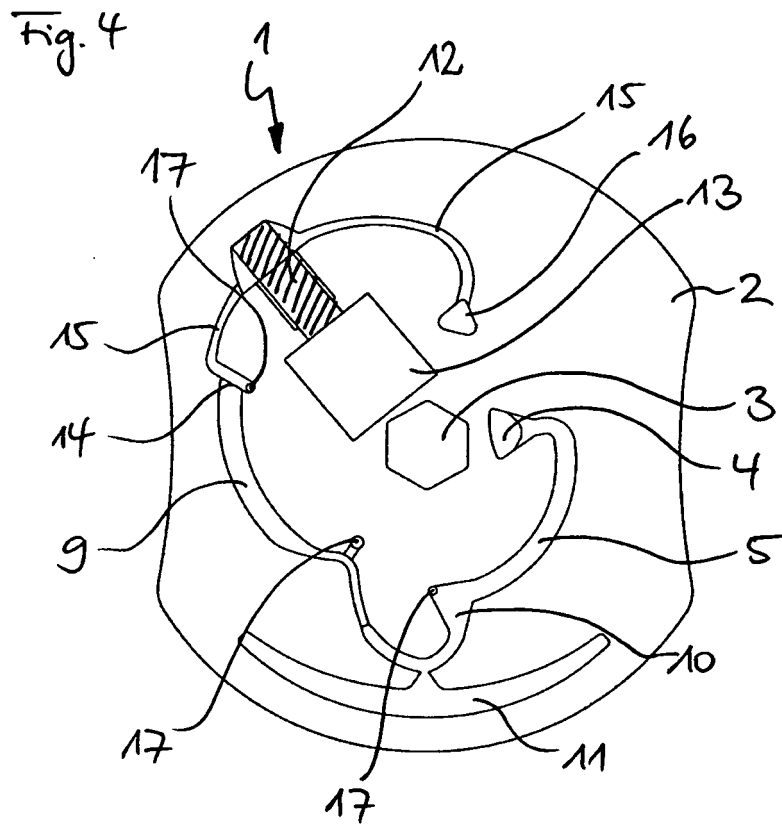


Fig. 5

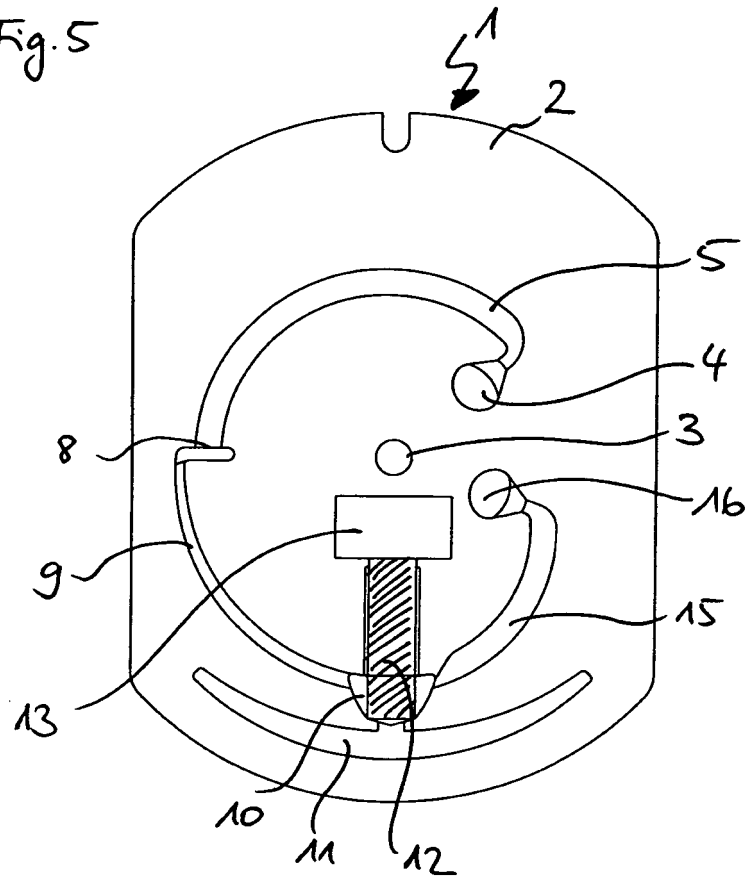


Fig. 6

