



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 239**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/03** (2006.01)

**B01F 13/00** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99902025 .8**

86 Fecha de presentación : **14.01.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1055112**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2000**

54

Título: **Método de mezcla.**

30

Prioridad: **14.01.1998 SE 9800070**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2008**

73

Titular/es: **Hemocue AB.**  
**P.O. Box 1204**  
**262 23 Ängelholm, SE**

72

Inventor/es: **Svensson, Johnny;**  
**Nilsson, Bertil;**  
**Olsson, Per y**  
**Jansson, Lars**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 299 239 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de mezcla.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para llevar a cabo mezcla en capas finas de líquidos. Más específicamente, la invención concierne a un método para llevar a cabo mezcla en dispositivos desechables para permitir análisis cuantitativos y cualitativos. La invención también concierne a un método para efectuar tales análisis así como  
10 los dispositivos que son adecuados para el uso cuando se llevan a cabo los análisis.

**Antecedentes de la técnica**

Los dispositivos desechables, llamados microcubetas, se describen en, por ejemplo las Publicaciones de Patentes  
15 EP 469 097 y WO 96/33399. Estas microcubetas están destinadas al muestreo del líquido, tal como sangre, la mezcla de la muestra líquida con un reactivo y el análisis óptico directo de la muestra mezclada con el reactivo. La microcubeta comprende un cuerpo con una cavidad que contiene un área de medida. La cavidad se comunica con el entorno exterior del cuerpo a través de una entrada. Además, la cavidad tiene un volumen predeterminado y está diseñada de tal manera que la muestra puede entrar mediante la fuerza de capilaridad. Se aplica un reactivo seco a la superficie de la cavidad  
20 de medida. Las microcubetas de este tipo han tenido éxito comercial en una extensión considerable y actualmente se utilizan para la determinación cuantitativa de, por ejemplo, hemoglobina y glucosa en sangre entera. Un importante factor que ha contribuido a este éxito es que el tiempo desde el muestreo a la respuesta es muy corto. Una razón para que este periodo de tiempo sea muy corto es que las composiciones reactivas que se utilizan para la determinación de la hemoglobina y la glucosa son fácilmente solubles en la pequeña cantidad de sangre que es aspirada en la cavidad  
25 capilar de la microcubeta, que da como resultado una mezcla con distribución uniforme de los componentes reactivos de manera prácticamente inmediata. Sin embargo, se ha encontrado que estas microcubetas de la técnica anterior son menos adecuadas para determinar componentes que requieren reactivos, que no son fácilmente solubles y/o en los existen problemas de difusión y que por lo tanto requieren un periodo de tiempo comparativamente largo para la disolución y reacción.

En la patente de EE.UU. 4.936.687 se ha sugerido un método, que se ha desarrollado específicamente para mezclar un líquido y un reactivo en las capas finas capilares que existe en las microcubetas. En este método, se hace uso de pequeñas partículas magnéticas como medio para conseguir la mezcla, y la verdadera operación de mezcla se lleva a cabo utilizando imanes externos, que especialmente se diseñan y se disponen de una manera especial y se hacen  
30 funcionan de un modo predeterminado. Después del procedimiento de mezcla, las partículas magnéticas se separan de la parte de la muestra que se va a analizar. Aunque este método funciona bien para ciertos tipos de líquidos/reactivos, no es particularmente atractivo desde un punto de vista industrial y comercial ya que son necesarios diseños y disposiciones especiales de los imanes. El uso de finas partículas magnéticas y la separación de estas partículas después de la etapa de mezcla requiere también tiempo y trabajo, que hace el método complicado y comparativamente caro.  
35 Además, existe un riesgo de obstrucción química, causada por las partículas magnéticas, tanto de las muestras como de los reactivos.

Además, el documento EP 75 605 describe un método para mezclar en capas líquidas capilares. Según este método, la mezcla se lleva a cabo en una cuba de reacción, que comprende dos placas paralelas que se mueven una con relación  
45 a la otra y una hacia la otra. Solamente se aplican unos pocos microlitros de reactivo y muestra, cuando se rellena la cuba de reacción, a superficies adhesivas particulares o en diversas posiciones en una superficie adhesiva de las placas, y la mezcla de muestra y reactivo se lleva a cabo moviendo las placas una hacia la otra y en perpendicular a la capa líquida formada por la muestra y el reactivo. Así este método de la técnica anterior requiere que tanto la muestra como el reactivo estén presentes en forma de líquido, lo que hace más fácil llevar a cabo la mezcla comparado con las  
50 microcubetas de más arriba con un reactivo seco que además es difícil de disolver. Se ha probado este tipo de mezcla, es decir en la que se hace mover la capa de líquido perpendicular al plano de la capa, para conseguir la mezcla en microcubetas del tipo de más arriba pero no se ha encontrado que sea suficientemente eficaz.

El documento US 3 898 982 describe tubos capilares abiertos por los dos extremos para recogida y examen de  
55 sangre, en el que los tubos pueden estar recubiertos con un reactivo sobre una parte de sus superficies internas. El tubo, por ejemplo, se agita por sacudida para causar que el reactivo se disuelva en la sangre para permitirles estar suficientemente mezclados.

El documento US 5 286 454 describe una cubeta para recoger un fluido y mezclar el fluido con un reactivo para  
60 analizar la mezcla. El fluido se puede recoger por acción capilar a través de una entrada a una cavidad capilar. A continuación el fluido se puede mover a una segunda cavidad sometiendo a la cubeta a fuerza centrífuga.

El documento EP 0 803 288 describe una pipeta para tomar y analizar una muestra. La pipeta comprende una  
65 sección analítica en la que se puede proporcionar los reactivos para reaccionar con la muestra.

El documento EP 0 287 883 describe un dispositivo de ensayo capilar de tiras que comprende dos placas que, junto con los espaciadores, definen una zona capilar que puede incluir un reactivo en forma seca.

## ES 2 299 239 T3

El documento US 4 088 448 describe una cubeta capilar para tomar muestras. La cubeta incluye una cavidad recubierta con un reactivo que se disuelve en la muestra. Disolución y mezcla se pueden obtener mediante mezcla vibratoria.

5 Un método simple y eficaz para mezclar líquido y reactivo en capas finas capilares, que también sea adecuado para acelerar la disolución de reactivos menos solubles, aumentaría el número de determinaciones que se pueden llevar a cabo tanto en microcubetas como en dispositivos del mismo diseño fundamental que las microcubetas. Como resultado, también podrían ser atractivos los análisis que hasta ahora no se podían realizar o para los que previamente no había habido ningún interés en relación con dispositivos desechables para esencialmente muestreo y análisis simultáneos y  
10 con toma de muestra capilar.

### Compendio de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para llevar a cabo mezcla en una capa fina líquida, en un dispositivo desechable que tiene una entrada con una apertura y una cavidad capilar definida por dos  
15 paredes paralelas planas que están esencialmente inmóviles una con relación a la otra y dispuestas a una distancia capilar la una de la otra, y que incluye un reactivo seco, para permitir el análisis de un componente en una muestra líquida, conectando dicha entrada o apertura la cavidad con un medio circundante fuera del dispositivo desechable, en el que, como una primera alternativa, dicha apertura de dicha entrada tiene una longitud que es por lo menos 5, preferentemente por lo menos 10, veces mayor que la distancia entre las paredes paralelas planas o, en el que, como  
20 una segunda alternativa, dicho dispositivo desechable incluye una cavidad no capilar colocada adyacente a la cavidad capilar, comprendiendo el método las etapas de: tomar la muestra líquida que contiene el componente que se va a determinar en el dispositivo desechable por acción capilar para formar una capa fina líquida en la cavidad capilar de dicho dispositivo; y someter el dispositivo desechable a un movimiento esencialmente en el plano de la capa fina líquida para acelerar la disolución del reactivo y la mezcla del reactivo y la muestra líquida en la capa fina líquida en la  
25 cavidad capilar, siendo dicho movimiento equilibrado contra la fuerza capilar ejercida por las paredes sobre el líquido, de manera que la muestra líquida no fluya fuera del dispositivo.

Según la invención, la mezcla se lleva a cabo en una capa líquida capilar colocada entre dos paredes esencialmente  
30 paralelas planas por las paredes, que están esencialmente inmóviles una con relación a la otra, estando sometidas a un movimiento esencialmente en el plano de la capa líquida, equilibrando el movimiento contra la fuerza capilar ejercida por las paredes sobre el líquido y seleccionando la interfaz entre la capa líquida y el medio circundante de manera que funcione como una membrana elástica.

Este método es ideal para lograr la disolución más rápida de ciertos reactivos secos que son relativamente difíciles de disolver, y la mezcla más eficaz de muestra y reactivo en las capas líquidas finas que están presentes en los dispositivos desechables o microcubetas del tipo de más arriba. En principio, sin embargo, el método de mezcla se puede aplicar a todos los líquidos en forma de capas finas entre paredes esencialmente paralelas que están colocadas a  
40 distancia capilar una de la otra.

### Descripción detallada de la invención

La fuerza capilar depende del tipo de material de las paredes, el tipo de muestra incluyendo aditivos, si hay alguno, tales como reactivos, y la distancia entre las paredes. Los parámetros de frecuencia y amplitud del movimiento deben  
45 estar equilibrados contra la fuerza capilar que está presente en el caso individual, y estos parámetros deben ser suficientes para proporcionar mezcla sin riesgo de que parte del líquido escape de la microcubeta, lo que puede pasar si la frecuencia/amplitud es demasiado alta.

El límite superior de la longitud de la membrana elástica, es decir de la interfaz de la muestra hacia el medio circundante, tal como aire, se presenta en el caso en el que el volumen de la muestra líquida está limitado solamente por las paredes paralelas y no está encerrada en una cavidad. El límite inferior se determina experimentalmente sobre la base de la muestra líquida, reactivo, frecuencia adecuada de sacudida, profundidad de la cavidad, etc.

Cuando se presentan las condiciones correctas para el movimiento, la interfaz sirve como una membrana elástica  
55 que obliga a los compuestos químicos en la muestra líquida y una composición de reactivo, si hay alguna, que se disuelve o se va a disolver, a moverse con el movimiento del líquido, lo que da como resultado una mezcla del líquido de muestra y el reactivo en la capa fina líquida.

Según la presente invención, la mezcla se lleva a cabo así haciendo que un dispositivo con una capa líquida de una muestra líquida y el reactivo se mueva esencialmente en el plano de la capa líquida durante un periodo de tiempo y a una velocidad que es suficiente para conseguir la mezcla deseada. El movimiento puede ser giratorio pero se prefiere un movimiento de vaivén. También se puede utilizar cualquier combinación de estos movimientos. Como se ha mencionado más arriba, una característica importante del nuevo método de mezcla es que el movimiento está equilibrado contra la fuerza capilar de manera que la muestra líquida no fluya fuera del dispositivo. La fuerza capilar  
65 está determinada por el tipo de muestra y el material de las paredes del dispositivo, y la operación de equilibrado preferentemente se hace experimentalmente. Como se ha indicado más arriba, que la interfaz entre la muestra y el entorno se seleccione de manera que esta interfaz pueda servir como una membrana elástica es una característica crítica. La interfaz entre la muestra y el aire en la apertura de la entrada del dispositivo desechable o de la microcubeta

## ES 2 299 239 T3

servirá como una membrana elástica solamente con la condición de que la longitud de esta entrada sea suficiente o si el dispositivo contiene por lo menos una cavidad más, que es esencialmente no capilar y puede formar una membrana elástica adicional. En el último caso, la apertura de la entrada de la cubeta no necesita ser mayor que la distancia entre las paredes esencialmente paralelas planas que definen la cavidad de medida, mientras que en el primer caso, es decir  
5 cuando el volumen de la muestra líquida solamente forma una interfaz continua (una membrana continua) contra el medio circundante (aire), la longitud de la apertura de la entrada debe ser por lo menos 5, preferentemente por lo menos 10 veces mayor que la profundidad de la capa líquida en la cavidad de medida.

Una microcubeta que es adecuada para mezclar según la invención, comprende un cuerpo con una cavidad de  
10 medida que se define por dos superficies esencialmente paralelas, que definen un paso óptico y se colocan a una distancia predeterminada la una de la otra. La cavidad de medida tiene un volumen predeterminado y una entrada o apertura capilar conecta la cavidad con el entorno fuera del cuerpo. Bajo la acción de la fuerza capilar, se recoge la muestra en la cavidad de medida a través de la entrada o apertura. Una cantidad predeterminada de reactivo seco se  
15 coloca en la cavidad de medida, por ejemplo aplicado a la superficie de la cavidad. Las paredes de la microcubeta son preferentemente transparentes y no elásticas. El volumen de la cubeta puede variar entre 0,1  $\mu$ l y 1 ml y el espesor de la capa fina puede variar entre 0,01 y 2,00 mm, y preferentemente entre 0,1 y 1,0 mm. La distancia entre las paredes en la entrada o apertura de la cubeta puede estar preferentemente entre 0,01 y 1 mm y es preferentemente mayor que la distancia entre las paredes en la cavidad de medida.

El método de mezcla según la presente invención, por su puesto, también es adecuado para mezclar en dispositivos  
20 que no están pensados para ser utilizados para mediciones ópticas, por ejemplo, turbidimétricas o nefelométricas, si no que es aplicable en general a la mezcla en capas finas líquidas. Ejemplos de otros tipos de mediciones son mediciones radioactivas, en las que no se requieren longitud de paso óptico ni transparencia de las paredes. En términos generales, se puede decir que el dispositivo de muestreo se diseña con respecto a los análisis para los que está pensado, y los  
25 dispositivos de muestreo tienen la característica común de que bajo la acción de la fuerza capilar la muestra se puede recoger dentro de una cavidad capilar y la mezcla de la muestra y el reactivo tiene lugar en una capa líquida capilar.

El método para mezclar según la invención definido en la reivindicación 1 es particularmente aplicable cuando  
30 es deseable llevar a cabo de manera esencialmente simultánea la toma de muestra y la determinación cuantitativa de un componente en una muestra líquida en un dispositivo capilar desechable, tal como una microcubeta. Esta toma de muestra y determinación comprende las etapas de

- insertar la muestra que contiene el componente que se va a determinar dentro de un dispositivo desechable, que  
35 contiene por lo menos un reactivo seco par el componente y dentro del cual la muestra se toma bajo la acción de la fuerza capilar a través de una entrada en una cavidad capilar, que está definida por dos paredes esencialmente paralelas planas,

- someter al dispositivo a un movimiento para acelerar la disolución del reactivo y la mezcla en la capa fina líquida  
40 del reactivo y la muestra, formándose dicha capa entre las paredes paralelas planas que definen la cavidad, teniendo lugar el movimiento esencialmente en el plano de la capa líquida y estando equilibrado contra la fuerza capilar ejercida por las paredes sobre la capa líquida, y seleccionándose la interfaz entre la capa líquida y el medio circundante de manera que funcione como una membrana elástica, y

- someter la mezcla resultante a medición en un área de medida.  
45

Una característica importante del método de mezcla según la invención es que el movimiento tiene lugar esencial-  
mente en el plano de la capa líquida, es decir que el movimiento, que preferentemente puede ser una vibración de  
vaivén a una frecuencia y amplitud determinadas experimentalmente, tiene lugar esencialmente en paralelo con el pla-  
no principal de la cavidad capilar. Se pueden tolerar desviaciones menores del plano principal, pero se ha encontrado  
50 que desviaciones por encima de 20° de este plano dan como resultado un efecto de mezcla claramente deteriorado.

Incluso si se puede aplicar cualquier tipo de reactivo en la cubeta, se consiguen ventajas especiales cuando se  
utilizan reactivos que son comparativamente difíciles de disolver, tales como proteínas y carbohidratos.

Los componentes que son particularmente interesantes de analizar con el método de medida de la invención son  
55 compuestos macromoleculares tales como proteínas, por ejemplo albúmina u otras proteínas, por ejemplo CRP (siglas en inglés de Proteína C Reactiva), con las cuales se pueden producir agregados antígeno-anticuerpo que pueden ser medidos turbidimétricamente. La aplicación de la presente invención también puede comprender antígenos no basados en proteínas, tales como polisacáridos. El principio de la invención se puede aplicar en muchos contextos en los que  
60 puede tener lugar la cuantificación turbidimétrica de un analito. En tal medición óptica en una microcubeta, las paredes en el área de medida se colocan con una longitud de paso óptico predeterminada.

Un ejemplo de un análisis en el que la mezcla en una microcubeta tiene amplio uso práctico, son los análisis que  
se basan en reacciones antígeno-anticuerpo, tal como en la determinación de  $\mu$ -albúmina en orina, en la que se hacen  
65 reaccionar anticuerpos contra albúmina humana con albúmina en una muestra de orina. A la cavidad de la cubeta se le suministra una cantidad predeterminada de anticuerpos antialbúmina junto con PEG 6000 y se seca. Cuando la muestra entra en la cavidad de la cubeta, que tiene un volumen y anchura de separación predeterminados, el reactivo se disuelve si la cubeta se hace vibrar a una frecuencia de 60 batidos/s. La albúmina que está presente en la muestra de

## ES 2 299 239 T3

orina, reacciona con los anticuerpos disueltos y forma agregados, que causan turbidez que se puede medir espectrofotométricamente a 470 nm y que es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra. Correspondientemente, los análisis se pueden llevar a cabo sobre albúmina o alguna otra proteína en sangre o plasma. Una operación de mezcla según la presente invención, que preferentemente se lleva a cabo en un espectrofotómetro del tipo descrito en la Solicitud de Patente Sueca 9800072-2, es una condición importante para una respuesta rápida y reproducible.

Según una realización preferida, la cavidad esencialmente no capilar se coloca adyacente a la cavidad capilar de medida que contiene el reactivo seco y se coloca esencialmente en línea con la entrada y la cavidad de medida. Cuando la muestra líquida en esta realización se recoge en la cubeta y se mezcla según la invención, el líquido en la cavidad y el medio, normalmente aire, que está presente en la cavidad no capilar, forman una interfaz separada que también sirve como una membrana elástica.

Cubetas de medida de la invención se ilustran en los dibujos adjuntos, en los que

la Fig. 1 es una vista en perspectiva de una microcubeta,

la Fig. 2 es una vista transversal de la microcubeta de la Fig. 1

la Fig. 3 es una vista en perspectiva de una microcubeta con dos cavidades, y

la Fig. 4 es una vista transversal de la microcubeta de la Fig. 3.

En la Fig. 1, 1 designa la microcubeta y 2 la entrada o apertura capilar, que, cuando se ha tomado la muestra en la cubeta, forma una membrana elástica contra el aire circundante.

De manera correspondiente, se forman dos membranas elásticas contra aire en la microcubeta ilustrada en las Figs. 3 y 4, en las que 3 indica la entrada o apertura capilar y 4 una cavidad de una profundidad mayor, cavidad que es esencialmente no capilar.

La agitación según la invención se puede ejemplificar como sigue.

La agitación se estudió como una función de la profundidad de la cavidad y la frecuencia de batido. Se utilizaron cubetas que tenían el mismo diseño de la cavidad.

Profundidad de la Cavidad	Frecuencia de Batido (batidos/s)	Comentarios
150 $\mu\text{m}$	60	ninguna agitación
130 $\mu\text{m}$ en el ojo de medida / 400 $\mu\text{m}$ fuera	60	agitación en 400 $\mu\text{m}$ ninguna agitación en 130 $\mu\text{m}$
130 $\mu\text{m}$ en el ojo de medida / 400 $\mu\text{m}$ fuera	30	ninguna agitación
300 $\mu\text{m}$	60	ninguna agitación
300 $\mu\text{m}$	30	ninguna agitación
500 $\mu\text{m}$	60	buena agitación
500 $\mu\text{m}$	30	ninguna agitación
700 $\mu\text{m}$	60	buena agitación

El resultado muestra que la agitación es dependiente tanto de la frecuencia de batido como de la profundidad de la cavidad. Así, se obtiene buena agitación en cubetas de 400  $\mu\text{m}$  de profundidad a 60 batidos/s pero no a 30 batidos/s. Si la profundidad de la cavidad disminuye, no tiene lugar ninguna agitación.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para llevar a cabo mezcla en una capa fina líquida, en un dispositivo (1) desechable que tiene una  
entrada con una apertura (2,3) y una cavidad capilar definida por dos paredes paralelas planas que son esencialmente  
inmóviles una respecto a la otra y colocadas a una distancia capilar la una de la otra, y que incluye un reactivo seco,  
para permitir el análisis de un componente en una muestra líquida, conectando dicha entrada o apertura (2,3) la cavidad  
con un medio circundante fuera del dispositivo desechable, en el que, como una primera alternativa, dicha apertura de  
10 dicha entrada (2,3) tiene una longitud que es por lo menos 5, preferentemente por lo menos 10, veces mayor que la  
distancia entre las paredes paralelas planas o, en el que, como una segunda alternativa, dicho dispositivo (1) desechable  
incluye una cavidad (4) no capilar colocada adyacente a la cavidad capilar, comprendiendo el método las etapas de:

tomar la muestra líquida que contiene el componente que se va a determinar en el dispositivo (1) desechable por  
acción capilar para formar una capa fina líquida en la cavidad capilar de dicho dispositivo (1); y

15 someter el dispositivo (1) desechable a un movimiento esencialmente en el plano de la capa fina líquida para  
acelerar la disolución del reactivo y la mezcla del reactivo y la muestra líquida en la capa fina líquida en la cavidad  
capilar, siendo dicho movimiento equilibrado contra la fuerza capilar ejercida por las paredes sobre el líquido, de  
manera que la muestra líquida no fluya fuera del dispositivo.

20 2. Un método según la reivindicación 1, en el que el movimiento es un movimiento esencialmente de vaivén.

3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la distancia entre las paredes paralelas  
planas es como máximo 1000  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 400  $\mu\text{m}$  y 600  $\mu\text{m}$ .

25 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las paredes paralelas planas son transpa-  
rentes y esencialmente no elásticas.

5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el análisis es una medición óptica.

30 6. Un método según la reivindicación 5, en el que la medición óptica es una medición turbidimétrica o nefelomé-  
trica.

7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el componente es un compuesto macro-  
molecular, tal como una proteína o un carbohidrato.

35 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el reactivo es un anticuerpo o una lectina.

40 9. Un método según la reivindicación 7, en el que, al mezclar, el compuesto macromolecular y el reactivo forman  
un agregado que consiste en un complejo antígeno-anticuerpo o un complejo carbohidrato-lectina.

10. Un método según la reivindicación 2, en el que el compuesto macromolecular consiste en una proteína plas-  
mática, tal como albúmina o Proteína C Reactiva.

45

50

55

60

65

