

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 057**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2017 PCT/EP2017/075681**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18065626**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2017 E 17781110 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024 EP 3523026**

54 Título: **Método y sistema para mediciones ópticas o eléctricas en fluidos dispersos**

30 Prioridad:

07.10.2016 EP 16192938

07.10.2016 EP 16192939

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2024

73 Titular/es:

ACOUSORT AB (50.0%)

Medicon Village

223 81 Lund, SE y

INSTRUMENTATION LABORATORY COMPANY

(50.0%)

72 Inventor/es:

AUGUSTSSON, PER;

OHLSSON, PELLE DANIEL;

JAKOBSSON, OLA;

PETERSSON, KLARA;

BLANKENSTEIN, GERT;

KERIMO, JOSEF y

SCHONBRUN, ETHAN

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 990 057 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 y sistema para mediciones ópticas o eléctricas en fluidos dispersos

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de métodos y sistemas para mediciones ópticas o eléctricas en fluidos dispersos. Además, la presente invención se refiere específicamente al campo de las mediciones de absorbancia en fluidos biológicos, donde la absorbancia se mide en una parte del fluido desprovista de partículas y/o células.

Antecedentes de la invención

Los fluidos dispersos están formados de partículas dispersas en una o más fases continuas, por ejemplo fluidos. Un fluido disperso de especial interés es la sangre, que está formada de aproximadamente un 45 % de glóbulos rojos o eritrocitos, aproximadamente un 0,7 % de glóbulos blancos o leucocitos, y siendo el 54,3 % restante plasma sanguíneo; sin embargo, estos valores pueden variar entre individuos y estos valores también pueden variar en gran medida en algunas enfermedades en las que la fracción de volumen de glóbulos rojos puede ser del 25 al 60 % del volumen de la sangre.

Las mediciones ópticas o eléctricas realizadas en muestras de sangre incluyen mediciones de absorbancia para la determinación de la concentración de hemoglobina libre en una muestra de sangre, siendo esta medición una indicación de la cantidad de glóbulos rojos que se han roto liberando así hemoglobina en el plasma sanguíneo. El grado de hemólisis, es decir, la cantidad de glóbulos rojos que se han roto, es un parámetro de diagnóstico importante para evaluar directamente la salud de un paciente. Además, es de interés que la hemólisis y la correspondiente liberación de los contenidos de los glóbulos rojos en el plasma sanguíneo, afecten a los resultados de otras mediciones realizadas en la muestra de sangre.

Típicamente, las muestras de sangre se analizan utilizando un análisis de gases en sangre en donde se determinan las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono, así como una serie de otros parámetros de la muestra, tal como pH, HCO_3^- , p_{50} , $s\text{O}_2$, exceso de base, ctHb, COHb, MetHb, Ca^{2+} y K^+ . Al menos ocho de estos parámetros comúnmente medidos se ven afectados al devolver valores más bajos para pH, $p\text{O}_2$, $s\text{O}_2$, COHb y Ca^{2+} , y al devolver valores más altos para $p\text{CO}_2$, HCO_3^- y K^+ , cuando se compara con los valores obtenidos de una muestra de sangre no hemolizada.

La cantidad de hemoglobina libre se puede determinar mediante mediciones de absorbancia en una porción libre de células de la sangre. Esta porción libre de células se crea haciendo sedimentar los glóbulos rojos y blancos, ya sea espontáneamente bajo la fuerza de la gravedad o en una centrifuga, de modo que la muestra de sangre se divide en una primera porción que comprende plasma sanguíneo claro y una segunda porción que comprende las células sanguíneas.

Estos métodos, sin embargo, tienen inconvenientes ya que requieren cantidades significativas de tiempo (sedimentación espontánea) o requieren equipos costosos (centrifuga) y no son prácticos para integrar en sistemas automatizados que manejan pequeñas cantidades de sangre.

El documento DE102004013960 propone un método de determinación del grado de hemólisis en un recipiente estéril, es decir, una bolsa de sangre, en el que se va a utilizar ultrasonido para crear o acelerar la sedimentación de células sanguíneas en el tubo conectado a la bolsa de sangre, con el objetivo de formar un área ópticamente clara de plasma sanguíneo para determinar ópticamente la concentración de hemoglobina. Como no se proporcionan ejemplos prácticos, sigue existiendo la duda de si el ultrasonido podría de hecho utilizarse como se propone -en particular, los presentes inventores se han dado cuenta de que, debido a las dimensiones no estandarizadas de la bolsa de sangre y de los tubos, sería dudoso que las células sanguíneas pudieran separarse del plasma sanguíneo como se propone. Además, ese enfoque no es adecuado para muestras de pequeño volumen procedentes de extracción de sangre o punciones en el dedo.

El documento US 2016/202237 A1 divulga un dispositivo y un método para la detección de analitos y analitos en un fluido portador de partículas, tal como sangre entera, que tiene un instrumento, tal como un transductor acústico, que genera una onda estacionaria acústica en la frecuencia de resonancia de la cavidad microfluidica, para dividir las partículas del fluido que está integrado con un detector para análisis de uno o más analitos del fluido portador de partículas mientras las partículas en el fluido portador partículas se dividen.

Andreas Lenshof et al: "Acoustofluidics 8: Applications of acoustophoresis in continuous flow microsystems", LAB ON A CHIP, vol. 12, núm. 7, 7 de marzo de 2012, divulga aplicaciones de acustoforesis en microsistemas de flujo continuo.

El documento US 4854170 A divulga un aparato de ultrasonidos para determinar el hematocrito utilizando una

muestra de sangre colocada en un tubo capilar de microhematocrito y acoplado este tubo a un transductor de ultrasonido accionado a una cierta frecuencia para empaquetar glóbulos rojos en bandas, cuyo espesor, en relación con el espesor de las bandas del plasma restante, es una indicación del hematocrito de las células sanguíneas.

5

Dae-Cheol Seo et al: "Ultrasonic flow-through filtration of microparticles in a microfluidic channel using frequency sweep technique" Journal of mechanical Science and technology vol. 27, núm. 3, 1 de marzo de 2013) divulga una filtración de partículas por flujo utilizando ultrasonidos de frecuencia variable, trasladando el barrido de frecuencia de la onda estacionaria ultrasónica partículas a través de un microcanal para filtrar las partículas sin barreras.

10

Mark V. Brooks: "2.2.2 Acoustic Properties of Crystal Materials" En: "Ultrasonic Inspection Technology Development and Search Unit Design" 1 de enero de 2012, John Wiley & Sons, divulga características acústicas promedio de algunos materiales.

15

Objeto de la invención

La presente invención tiene como objetivo obviar las desventajas y deficiencias antes mencionadas de los métodos previamente conocidos para mediciones ópticas o eléctricas en fluidos dispersos tales como sangre, en particular las desventajas acompañadas por el uso de la fuerza gravitacional o la centrifugación en la obtención de una porción clara para las mediciones.

20

Un objeto principal de la presente invención reivindicada es, por lo tanto, proporcionar un método de realización de mediciones ópticas o eléctricas en fluidos dispersos de acuerdo con la reivindicación 1.

25

Otro objeto de la presente invención reivindicada es proporcionar un sistema microfluídico para la realización de mediciones ópticas o eléctricas en fluidos dispersos de acuerdo con la reivindicación 9.

Compendio de la invención

30

Al menos uno de los objetos mencionados anteriormente o al menos uno de los objetos adicionales que serán evidentes a partir de la siguiente descripción, se logran de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención mediante un método de realización de una medición óptica o eléctrica en una muestra de un fluido disperso, comprendiendo la muestra partículas y un fluido, que comprende los pasos de:

35

a) posicionar la muestra en una cavidad microfluídica que tiene una frecuencia de resonancia,

b) someter la muestra, en la cavidad, a una onda estacionaria acústica configurada para provocar que las partículas se congreguen en al menos una primera región de la cavidad, provocando de este modo que el fluido ocupe al menos una segunda región de la cavidad, en donde la frecuencia de la onda estacionaria acústica se varía repetidamente entre una frecuencia por debajo de la frecuencia de resonancia y una frecuencia por encima de la frecuencia de resonancia, y

40

c) realizar una medición óptica o eléctrica en el fluido en al menos una de la al menos una segunda región de la cavidad.

45

Por lo tanto, la presente invención se basa en el descubrimiento por parte de los presentes inventores de que, aunque generalmente es una necesidad de cavidades microfluídicas formadas con una precisión muy alta y un ajuste fino apropiado de la frecuencia de la onda estacionaria acústica para obtener una congregación o partición apropiada de partículas, al variar repetidamente la frecuencia como se define en el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, estos requisitos se pueden prescindir en gran medida. De este modo, al variar la frecuencia entre una frecuencia por debajo de la frecuencia de resonancia y una frecuencia por encima de la frecuencia de resonancia se logra una congregación más estable de las partículas en la al menos una primera región de la cavidad. Esto fue inesperado y representa un progreso significativo en comparación con experimentos anteriores en una sola frecuencia donde pequeñas irregularidades en la cavidad microfluídica o un ligero desajuste de la frecuencia de la onda estacionaria acústica dieron como resultado una congregación/partición insuficiente. Además, es sorprendente que a pesar de variar la frecuencia, lo que podría esperarse que hiciera menos efectiva la congregación o partición de las partículas ya que la activación a la frecuencia óptima solo podía realizarse una pequeña fracción del tiempo, se logró una congregación rápida y reproducible de las partículas. El método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención es, por lo tanto, útil porque proporciona una congregación eficiente de las partículas incluso cuando el sustrato con cavidad se fabrica con tolerancias mayores y, por lo tanto, con frecuencias de resonancia variables entre sustratos individuales, permitiendo así utilizar sustratos desechables baratos. Esto hace que sea más fácil y más barato implementar mediciones ópticas o eléctricas en el punto de atención en fluido disperso y no requiere una centrifugación que consume mucho tiempo. Este enfoque prescinde de las rutinas de calibración por chip/sustrato y por medición, o de la vigilancia visual o de otro tipo de la congregación

65

de las partículas durante el accionamiento, de otro modo necesarias, ya que compensa que la velocidad del sonido sea dependiente del tipo de muestra. Esto da como resultado además que la al menos una segunda región, cuando la muestra se somete a la onda estacionaria acústica, se forme en una ubicación más predecible y reproducible con respecto a la cavidad. Esto hace que sea más fácil realizar la medición óptica o eléctrica, además permite disponer el detector de manera que se dirija hacia una de las al menos una segundas regiones antes de someter la muestra a la onda estacionaria acústica. Esto hace posible utilizar un detector simple, tal como por ejemplo una única fuente de luz y un único fotodetector o fotodiodo, o un electrodo simple, incluso cuando el sustrato se fabrica con tolerancias mayores, ya que se puede esperar que la segunda región en la que se van a realizar las mediciones ópticas o eléctricas se forme en aproximadamente la misma posición con respecto a las dimensiones de la cavidad cada vez, lo que a menudo no es el caso cuando la activación se realiza en una única frecuencia.

Las mediciones ópticas incluyen mediciones de absorbancia, mediciones de fluorescencia, espectroscopia Raman, quimioluminiscencia y dispersión. Las mediciones eléctricas incluyen mediciones de impedancia eléctrica (espectroscopia), mediciones electroquímicas, voltamperometría y conductividad.

Preferiblemente, las mediciones ópticas o eléctricas son una medición de absorbancia. La medición de absorbancia puede comprender mediciones de absorbancia óptica, mediciones de transmisión óptica, mediciones de absorbancia en una o más longitudes de onda, mediciones de transmisión en una o más longitudes de onda.

La muestra debe estar en forma fluida y en una viscosidad adecuada para que sea posicionada en la cavidad.

El fluido disperso puede comprender, por ejemplo, sangre entera sin diluir o diluida, fluido intracelular, fluido intersticial, fluido sinovial, fluido peritoneal, orina, cultivos de células de levadura, médula ósea, estroma, células disociadas de tejido normal o canceroso, leche.

Las partículas pueden comprender glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, células cancerosas, células bacterianas, virus, células de levadura, partículas de polvo, partículas de sílice y partículas de polímero.

El fluido puede ser plasma, agua, orina, caldo de células de levadura, medio de cultivo celular, soluciones salinas, solución salina tamponada con fosfato, fluido intracelular o fluido intersticial, plasma de leche.

Algunas realizaciones del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención pueden comprender pasos adicionales de adición de otros componentes moleculares, tales como reactivos, modificadores de pH (ácidos, bases) al fluido disperso para mezclar con el fluido disperso antes de que el fluido disperso se posicione en la cavidad para afectar a las propiedades ópticas del fluido.

La muestra puede posicionarse en la cavidad por bombeo, por presión, por succión, por la acción de campos eléctricos, por gravedad y por acción capilar.

La cavidad microfluídica puede estar cerrada al entorno. La cavidad microfluídica es preferiblemente un canal que tiene una sección transversal cuadrada o rectangular. La cavidad microfluídica puede tener, por ejemplo, un ancho de sección transversal de 1 a 100, tal como de 1 a 20 veces la altura de la sección transversal. En este caso, la longitud de la cavidad microfluídica es al menos igual que el ancho. El ancho puede ser, por ejemplo, de 0,3 mm a 5 mm. La altura puede ser, por ejemplo, de 0,025 mm a 1 mm.

Las frecuencias de resonancia de la cavidad microfluídica son dependientes de las dimensiones porque, para que se forme una onda estacionaria, la longitud de onda λ de la onda, cuya longitud de onda es inversamente proporcional a la frecuencia, debe ser $n\lambda/2$ donde n es un entero positivo.

Las siguientes son las 3 primeras resonancias para una onda estacionaria dirigida a lo largo de la dimensión del ancho de la cavidad: una primera frecuencia de resonancia f está asociada con una onda estacionaria acústica $\lambda/2$ correspondiente a un primer armónico donde los antinodos de presión de la onda estacionaria están posicionados cerca de las paredes de la cavidad y un solo nodo de presión se forma en el medio de la cavidad, provocando así que las partículas se congreguen en el centro de la cavidad, siendo esta la primera región y siendo las regiones cerca de las paredes laterales de la cavidad las segundas regiones. Así se obtiene: pared 1 - fluido 1 - partículas 1 - fluido 2 - pared 2.

En un segundo armónico, correspondiente a una frecuencia de resonancia que es dos veces la primera frecuencia de resonancia, es decir $2f$, se forma una onda estacionaria λ que tiene dos nodos y tres antinodos, forzando así generalmente a las partículas a congregarse en dos bandas a ambos lados del centro de la cavidad, siendo estas las primeras regiones y siendo el centro y los lados de la cavidad las segundas regiones. Así se obtiene: pared 1 - fluido 1 - partículas 1 - fluido 2 - partículas 2 - fluido 3 - pared 2. Esta es la frecuencia de resonancia preferida.

Una tercera frecuencia de resonancia, correspondiente a un tercer armónico, es tres veces la primera frecuencia de resonancia, es decir $3f$, y está asociada a una onda estacionaria $3\lambda/2$ que tiene 3 nodos y cuatro antinodos, forzando así a las partículas a congregarse en tres posiciones en la cavidad, siendo estas tres las primeras regiones, estando estas posiciones espaciadas unas de otras y de las paredes de la cavidad para formar tres segundas regiones. Así se obtiene: pared 1 - fluido 1 - partículas 1 - fluido 2 - partículas 2 - fluido 3 - partículas 3 - fluido 4 - pared 2.

En consecuencia, el término frecuencia de resonancia debe entenderse que comprende cualquier frecuencia en la que se pueda formar una onda estacionaria en la cavidad, y una frecuencia que provoque la formación de una onda estacionaria se considera una frecuencia configurada para provocar que las partículas se congreguen en al menos una primera región. Además, debe mencionarse que incluso si la resonancia, y por lo tanto la onda estacionaria, está predominantemente en unas dimensiones de ancho, siempre habrá componentes de resonancia a lo largo de la dimensión de longitud de la cavidad y potencialmente también en la dirección de la altura. Estas resonancias tridimensionales dan como resultado varias frecuencias de resonancia cercanas a la frecuencia de resonancia unidimensional, cada una con un patrón de enfoque asociado. El barrido de la frecuencia de activación sobre varias de estas frecuencias de resonancia hace posible aprovechar todas ellas y crear un enfoque acústico más predecible y uniforme, generado por el promedio ponderado resultante de los campos acústicos para las resonancias separadas y, por lo tanto, patrones de enfoque combinados.

La comprensión de que las resonancias acústicas deben entenderse en tres dimensiones y no sólo simplificarse a una dimensión genera así efectos prácticamente cruciales, al generar un patrón de enfoque acústico predecible, repetible y robusto y una congregación de las partículas. Esto, a su vez, permite la detección en posiciones predecibles y repetibles en el sistema, lo que no es posible con la activación de una sola frecuencia.

La frecuencia de resonancia de la cavidad, y por tanto la frecuencia de la onda estacionaria acústica, puede ser así de 0,15 MHz a 10 MHz.

La frecuencia puede variarse desde una frecuencia un 20 % por debajo de la frecuencia de resonancia hasta una frecuencia un 20 % por encima de la frecuencia de resonancia. Preferiblemente, la frecuencia se varía desde una frecuencia un 10 % por debajo de la frecuencia de resonancia hasta una frecuencia un 10 % por encima de la frecuencia de resonancia. La frecuencia puede variarse de forma continua o, alternativamente, solo durante un tiempo, durante el tiempo en que la muestra/fluido disperso está sometido a la onda estacionaria acústica. La frecuencia puede variarse lineal o logarítmicamente.

La frecuencia no debe variarse desde una frecuencia que sea tan baja, o a una frecuencia que sea tan alta, que la frecuencia corresponda a una frecuencia de resonancia diferente de la cavidad que conducirá a un número diferente de nodos y antinodos que el que se obtiene en la frecuencia de resonancia.

En otras palabras, la frecuencia f_{DN} , para provocar que las partículas se congreguen en al menos una primera región de una cavidad que tiene alguna dimensión D correspondiente a N semilongitudes de onda de la onda estacionaria acústica correspondiente a f_{DN} , debe, cuando varía de acuerdo con los aspectos de la presente invención, ser siempre mayor que $(c*(N-1))/(2*D)$ y menor que $(c*(N+1))/(2D)$, donde c es la velocidad del sonido en el fluido.

En la práctica, un rango de barrido del 1 % al 40 % de f_{DN} , es decir, la frecuencia que se varía en el rango de $\pm 0,5$ -20 % de f_{DN} , es suficiente para cubrir las frecuencias de resonancia correspondientes a un cierto número de nodos de presión, así como las tolerancias de fabricación del canal y la variación en la velocidad del sonido de la muestra.

La señal de activación para el transductor de ultrasonido puede ser preferiblemente un seno linealmente con chirrido con una tasa de repetición de 1000 Hz y una amplitud de aproximadamente 15 Vpp (voltaje pico-pico).

En otras palabras, la señal de activación para el transductor de ultrasonido puede ser, por ejemplo, un seno linealmente con chirrido con un tiempo de barrido de 1 ms. La amplitud para la señal puede ser de 15 Vpp (voltaje pico-pico).

El tiempo de barrido debe ser mucho más corto que el período de tiempo durante el cual se produce la congregación. Por lo tanto, la tasa de repetición debe ser lo suficientemente alta para que el tiempo de barrido sea mucho más corto que el período de tiempo durante el cual ocurre la congregación. Como ejemplo, cuando las partículas se congregan en la cavidad durante un período de tiempo de 5 segundos, la tasa de repetición del barrido se puede establecer de tal manera que las frecuencias se repitan en ciclos de 100 veces o más, es decir, al menos 20 repeticiones por segundo correspondientes a un tiempo de barrido de 50 ms o menos.

Por lo tanto, el tiempo de barrido puede ser, por ejemplo, de 100 ns a 50 ms, tal como de 1 ms a 50 ms. Un tiempo de barrido demasiado lento conduce a que la forma de la primera y la segunda regiones cambien

durante el tiempo de medición, es decir, el tiempo en que la muestra está sometida a la onda estacionaria acústica.

5 El concepto de barrido de la frecuencia de activación no es específico para cavidades resonantes, sino que también es aplicable a ondas estacionarias generadas, por ejemplo, por ondas acústicas de superficie u otras resonancias en el sistema. Aquí tiene la misma función de compensación para variaciones en las propiedades acústicas o la temperatura de la muestra, la compensación para variaciones en las dimensiones del sistema debidas, por ejemplo, a las tolerancias de fabricación y la expansión de la temperatura, y utilizar varias ondas estacionarias para generar un patrón de enfoque más uniforme y predecible.

10 La medición óptica o eléctrica se realiza preferiblemente solo en una de las segundas regiones para simplificar, sin embargo, también es factible realizar la medición óptica o eléctrica en todas las segundas regiones para aumentar la precisión y la robustez del método. En el caso de una medición de absorbancia, se pueden adquirir imágenes de absorbancia o transmisión de toda la cavidad y todas las regiones clarificadas, es decir, segundas regiones, se pueden analizar con algoritmos de análisis de imágenes adecuados.

15 En una realización preferida del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la onda estacionaria acústica está configurada para provocar que las partículas se congreguen en una o dos primeras regiones de la cavidad. Esto es ventajoso ya que da como resultado segundas regiones grandes para realizar la medición óptica o eléctrica, aumentando así la probabilidad de que la medición no se vea afectada por las partículas. Esto corresponde a una frecuencia asociada con una longitud de onda de la onda estacionaria acústica que es la misma o $\frac{1}{2}$ de la dimensión relevante, típicamente el ancho, de la cavidad.

20 En una realización alternativa del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la onda estacionaria acústica, y/o la cavidad, están configuradas para provocar que las partículas se congreguen en más de dos primeras regiones de la cavidad. Esto puede ser ventajoso ya que proporciona segundas regiones adicionales en las que realizar la medición óptica o eléctrica. La frecuencia se puede configurar aumentándola a cuatro veces la primera frecuencia de resonancia o incluso más. La cavidad se puede configurar aumentando las dimensiones de la cavidad.

30 En la realización preferida del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el método comprende además el paso de:

35 d) generar un flujo de la muestra a través de la cavidad. Esto es ventajoso ya que permite utilizar el método para mediciones ópticas o eléctricas lineales y en línea.

El flujo puede generarse por bombeo, por presión, por succión, por la acción de campos eléctricos, por gravedad y por acción capilar.

40 La cavidad puede estar conectada de manera fluida a una entrada, a través de la cual se introduce la muestra en la cavidad, y conectada de manera fluida a una salida, a través de la cual la muestra sale de la cavidad. Se puede conectar de manera fluida más de una salida a la cavidad para conducir diferentes partes de la muestra a diferentes salidas.

45 En la realización preferida del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la cavidad es alargada y está conectada de manera fluida en un extremo a una entrada y en el otro extremo opuesto a una salida. Esto es ventajoso ya que permite el uso de capilares de vidrio simples para proporcionar la cavidad. Típicamente, la longitud de la cavidad debe ser al menos 5 veces su ancho. En algunas realizaciones, la dimensión transversal de la cavidad es mayor que las dimensiones transversales de una entrada y una salida a la cavidad.

50 En la realización preferida del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la cavidad se forma en un sustrato. El sustrato puede estar hecho de silicio, pero puede estar hecho de material polimérico, tal como plástico o, alternativamente, vidrio. También son posibles otros materiales como cerámica y metales. Estos materiales son baratos y, por lo tanto, adecuados para realizar las mediciones ópticas o eléctricas en el campo en un centro de punto de atención, como consumibles desechables.

55 El sustrato puede ser plano, tal como un chip, o alternativamente el sustrato puede estar formado como un capilar.

60 En la realización preferida del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la energía de ultrasonido, para provocar la onda estacionaria acústica, se transfiere al sustrato desde al menos un transductor de ultrasonido únicamente a través de un miembro de acoplamiento de vidrio conectado al transductor de ultrasonido y al sustrato. Esto es ventajoso ya que hace más fácil acceder a la cavidad para realizar, en particular, mediciones ópticas. El miembro de acoplamiento de vidrio se puede conectar al transductor de ultrasonido y al sustrato mediante adhesivos, o posicionándolo de manera que entren en

contacto entre sí.

5 En la realización preferida del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la muestra es una muestra de sangre entera en la que las partículas comprenden al menos glóbulos rojos y el fluido comprende al menos plasma sanguíneo. Las partículas pueden comprender además glóbulos blancos.

10 En la realización preferida del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la medición óptica o eléctrica es una medición de absorbancia que comprende determinar la cantidad o concentración de hemoglobina libre en el plasma sanguíneo. La cantidad o concentración de hemoglobina libre está relacionada con el grado de hemólisis, es decir, el porcentaje de glóbulos rojos en la muestra que se han lisado y liberado, entre otras cosas, hemoglobina. En base al resultado de la medición de absorbancia, cuyo resultado puede ser, entre otras cosas, un valor de absorbancia o un valor de transmisión, la cantidad o concentración correspondiente de hemoglobina libre puede determinarse, por ejemplo, a través de la comparación de este valor con valores obtenidos a partir de la medición de muestras de referencia con grados conocidos de hemólisis.

20 En una realización del método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, el método, donde la muestra es una muestra de sangre entera y/o donde la medición de absorbancia comprende la determinación de la cantidad o concentración de hemoglobina libre en el plasma sanguíneo, el método comprende además los pasos de:

25 d) determinar una relación entre el volumen de los glóbulos rojos en la al menos una primera regiones y el volumen del plasma sanguíneo en la al menos una segunda regiones, y e) determinar el hematocrito de la muestra de sangre en base a la relación.

La determinación de la relación y la determinación del hematocrito se deben realizar como se comenta en relación con los aspectos tercero y cuarto descritos más adelante.

30 Por lo tanto, la determinación de la relación se puede hacer midiendo el volumen de la al menos una primera región y el volumen de la al menos una segunda región.

El volumen combinado de todas las primeras regiones y el volumen combinado de todas las segundas regiones se pueden medir para determinar la relación.

35 La relación de los volúmenes se puede determinar midiendo el área de la al menos una primera región y el área de la al menos una segunda región, determinándose las áreas en un plano formado por dos dimensiones ortogonales (XY, largo-ancho) de la cavidad siempre que las regiones tengan la misma extensión en la tercera dimensión (Z, altura) de la cavidad, o que la medición se ajuste a la variación de profundidad.

40 Al menos uno de los objetos mencionados anteriormente, o al menos uno de los objetos adicionales que serán evidentes a partir de la siguiente descripción, se logran de acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención mediante un sistema microfluídico para realizar una medición óptica o eléctrica en una muestra de un fluido disperso, comprendiendo la muestra partículas y un fluido, comprendiendo el sistema:

45 un sustrato con una cavidad microfluídica formada en el sustrato, teniendo la cavidad microfluídica una entrada para permitir que la muestra ingrese a la cavidad microfluídica,

50 un transductor de ultrasonido conectado al sustrato para generar una onda estacionaria acústica en la cavidad microfluídica,

55 un circuito de accionamiento conectado operativamente al transductor de ultrasonido y configurado para accionar el transductor de ultrasonido con una frecuencia que varía repetidamente entre una frecuencia por debajo de una frecuencia de resonancia de la cavidad microfluídica y una frecuencia por encima de la frecuencia de resonancia, de modo que provoque que las partículas se congreguen en al menos una primera región de la cavidad, provocando así que el fluido ocupe al menos una segunda región de la cavidad, y

un detector dispuesto para realizar una medición óptica o eléctrica en el fluido en al menos una de la al menos una segunda región de la cavidad.

60 Como se comentó anteriormente para el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, mediante la variación de la frecuencia del transductor de ultrasonido se logra una congregación más estable de las partículas en la al menos una primera región de la cavidad.

65 El sistema microfluídico puede comprender además un recipiente para almacenar la muestra, una bomba u otro dispositivo para provocar que la muestra entre en la cavidad, un dispositivo de control de temperatura para calentar o enfriar el sustrato según sea necesario, y un receptáculo para recibir la muestra una vez que se ha

realizado la medición óptica o eléctrica.

Como anteriormente, el sustrato puede estar hecho de silicio, polímeros tales como plástico o vidrio.

5 Como anteriormente, la cavidad microfluídica es preferiblemente alargada.

El transductor de ultrasonido es preferiblemente un actuador piezoeléctrico. El transductor de ultrasonido se puede conectar al sustrato. La onda estacionaria acústica se genera por las vibraciones del transductor de ultrasonido que se transfieren al sustrato y provocan que las paredes de la cavidad vibren.

10

El circuito de accionamiento puede comprender un generador de funciones conectado eléctricamente al transductor de ultrasonido. El circuito de accionamiento está configurado, al comprender un generador de funciones, para accionar el transductor de ultrasonido con una frecuencia que varía. Como anteriormente, la frecuencia se puede variarse de varias maneras.

15

El detector puede estar dispuesto para realizar la medición óptica o eléctrica en un solo punto solamente. En el caso de que el detector sea un detector óptico, puede comprender una fuente de luz y un único detector o sensor para detectar la luz procedente de la fuente de luz, o alternativamente el sensor puede detectar la luz procedente de la fuente de luz en una pluralidad de posiciones espaciales con respecto a la cavidad. El detector o sensor puede así comprender una pluralidad de diodos sensibles a la luz, una cámara, un CCD, un CMOS o similar. El detector óptico puede comprender una única fuente de luz o una pluralidad de fuentes de luz, cada una de las cuales puede emitir luz en una única, en un número finito de longitudes de onda, o como un espectro continuo. Preferiblemente, la fuente de luz emite luz en una o un número finito de longitudes de onda. Un detector eléctrico puede comprender electrodos provistos en la cavidad.

20

En la realización preferida del sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el sistema comprende además una carcasa que comprende un receptáculo dispuesto para recibir al menos parte del sustrato,

25

en donde el transductor de ultrasonido está provisto en la carcasa y está dispuesto para conectarse al sustrato cuando el sustrato se recibe en el receptáculo, y

en donde el detector está provisto en la carcasa y está dispuesto en una posición predeterminada con respecto al sustrato cuando el sustrato se recibe en el receptáculo,

30

estando dispuesta la posición predeterminada para permitir que el detector realice la medición óptica o eléctrica en al menos una de la al menos una segunda región de la cavidad.

35

Esto es ventajoso ya que permite utilizar un detector simple ya que las posiciones relativas del sustrato con cavidad y la carcasa con detector pueden estar dispuestas de manera que el detector sea capaz de realizar la medición óptica o eléctrica en al menos una de las segundas regiones. La posición de una o más segundas regiones con respecto al sustrato se puede determinar en base a las dimensiones de la cavidad y la posición de la cavidad sobre el sustrato, y además en base a qué armónico, es decir, sobre cuál de la primera, segunda, tercera, etc. frecuencia de resonancia de la cavidad, varía la frecuencia de la onda estacionaria acústica. Como la variación de la frecuencia asegura que se logre una congregación estable y reproducible de las partículas, se puede predecir una segunda región adecuada para la medición óptica o eléctrica y posicionar el detector en consecuencia.

40

La carcasa puede comprender una carcasa portátil para una medición óptica o eléctrica de campo o de punto de atención.

45

El receptáculo puede estar provisto dentro de la carcasa o sobre la superficie de la carcasa. Al menos una parte del sustrato debe recibirse en el receptáculo de modo que el sustrato pueda mantenerse en posición con respecto a la carcasa.

50

Para que el transductor de ultrasonido sea capaz de generar la onda estacionaria acústica en la cavidad, debe conectarse al sustrato. Esta conexión puede establecerse por contacto físico.

55

En la realización preferida del sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el sistema comprende además un miembro de acoplamiento de vidrio fijado al transductor de ultrasonido para conectar el transductor de ultrasonido al sustrato. Esto es ventajoso ya que permite posicionar el transductor de ultrasonido separado del sustrato, haciendo así más fácil la disposición de detectores ópticos para obtener acceso a las segundas regiones.

60

En algunas realizaciones del sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, la cavidad es alargada y está conectada de manera fluida en un extremo a una entrada y en el otro extremo opuesto a

65

una salida, como se describió anteriormente.

En algunas realizaciones del sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el detector está dispuesto además para determinar una relación entre el volumen de las partículas en la al menos una primera regiones y el volumen del fluido en la al menos una segunda regiones.

El detector puede estar dispuesto como se comenta en relación con los aspectos tercero y cuarto que se describen más adelante. Alternativamente, el sistema puede comprender un primer detector para mediciones ópticas o eléctricas y un segundo detector para determinar la relación.

El detector puede estar configurado para determinar la relación al estar configurado para medir el volumen de la al menos una primera región y el volumen de la al menos una segunda región.

Como anteriormente, se puede medir el volumen de todas las regiones y, alternativamente, se puede determinar la relación a partir de las áreas de las regiones.

Ventajas adicionales y características de la invención serán más evidentes a partir de las otras reivindicaciones dependientes, así como a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas.

Breve descripción de los dibujos y descripción detallada

Una comprensión más completa de las características y ventajas mencionadas anteriormente y otras de la presente invención será evidente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas junto con los dibujos adjuntos, en donde:

La Fig. 1 es una vista esquemática desde arriba de una primera realización del método y sistema de acuerdo con el primer y segundo aspecto de la presente invención,

La Fig. 2 son fotografías que muestran la congregación de glóbulos rojos con y sin variación de la frecuencia de la onda estacionaria acústica.

La Fig. 3 es una vista esquemática desde arriba de una segunda realización del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención,

La Fig. 4 es una vista esquemática en sección transversal de parte de una primera realización de un sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención,

La Fig. 5 es una vista esquemática de una realización del método de acuerdo con el tercer aspecto que se realiza utilizando una primera realización del sistema de acuerdo el cuarto aspecto,

La Fig. 6 muestra fotografías de la cavidad microfluídica y las técnicas de umbralización subsiguientes utilizadas para determinar el área ocupada por glóbulos rojos frente al área ocupada por plasma sanguíneo,

La Fig. 7 es un gráfico que muestra la correlación entre el volumen celular acústicamente empaquetado (APCV) y el volumen celular empaquetado (PCV),

La Fig. 8 muestra la evolución temporal de la relación entre el área ocupada por glóbulos rojos frente al área ocupada por plasma sanguíneo, y

La Fig. 9 es un gráfico que muestra la correlación entre APCV y PCV obtenidos en diferentes puntos de tiempo.

En las figuras y la descripción se utiliza el mismo numeral de referencia para referirse a la misma característica. Una ' añadida a un numeral de referencia indica que la característica a la que se hace referencia tiene una función, estructura o significado similares a los de la característica que lleva el numeral de referencia sin la ', pero que sin embargo no es idéntica a esta característica.

La Fig. 1A y B es una vista esquemática desde arriba de una primera realización del método y sistema de acuerdo con el primer y segundo aspecto de la presente invención. La Fig. 1A muestra un sustrato de silicio 10 que tiene formado en él un canal microfluídico 12, que define una cavidad, que tiene una entrada 14, una salida 16 central y dos salidas 18 y 20 laterales. Un transductor 22 de ultrasonido está fijado a la parte inferior del sustrato 10, y el canal está delimitado verticalmente por una lámina de vidrio 24 unida a la parte superior del sustrato 10. El transductor 22 de ultrasonido también puede estar fijado al lado del sustrato 10. Una muestra de sangre entera 2 se admite en el canal 12 a través de la entrada 14, es decir, ubicada como se designa en el paso 1000 en la Fig. 1B, y provoca que fluya hacia las salidas 16, 18 y 20, es decir, generando flujo como se designa en el paso opcional 1006 en la Fig. 1B. El transductor 22 de ultrasonidos se activa con una frecuencia que varía desde una frecuencia por debajo de la frecuencia de resonancia transversal del canal 12

hasta una frecuencia por encima de la frecuencia de resonancia. Esto da lugar a una onda estacionaria acústica, representada por 26, correspondiente a el paso 1002 en la Fig. 1B de someter la muestra a una onda estacionaria, que provoca que los glóbulos rojos, uno de los cuales está designado con el numeral de referencia 4, que representa partículas, en la sangre entera 2 se congreguen en el nodo central de presión de la onda estacionaria acústica, provocando así que los glóbulos rojos 4 se congreguen en una primera región, correspondiente a la porción central, del canal 12. A medida que la sangre entera 2 pasa entonces por el transductor 22 de ultrasonido, la porción central del flujo, incluidos los glóbulos rojos 4, sale por la salida 16 central, mientras que el resto de la sangre, es decir, el plasma 6, sale por las salidas 18 y 20 laterales. Ahora se puede realizar una medición óptica o eléctrica, en particular una medición de absorbancia, como se indica mediante el paso 1004 en la fig. 1B, cerca de la salida 18 lateral en el área designada por el círculo 28 para, por ejemplo, determinar la concentración de hemoglobina, y de ese modo determinar el porcentaje de glóbulos rojos 4 que se han lisado, es decir, el grado de hemólisis en la muestra de sangre entera.

Como se hará evidente al estudiar la Fig. 1, la eficiencia de congregación de los glóbulos rojos 4 en la porción central del canal 12 es de suma importancia si el plasma 6 que fluye a través de la salida 18 lateral debe estar libre de glóbulos rojos 4, ya que incluso una concentración muy baja de glóbulos rojos impedirá la medición de la absorbancia. De este modo, cuando el transductor 22 de ultrasonido se acciona a una única frecuencia que no corresponde con una frecuencia de resonancia del canal 12, por ejemplo porque el sustrato 10 y el canal 12 se han fabricado con amplias tolerancias o a partir de un material, tal como un material polimérico, que no permite tolerancias estrechas, entonces la eficiencia de congregación de los glóbulos rojos 4 en la salida 16 central será baja y la medición de la absorbancia se verá obstaculizada. Esto también se aplica cuando se utilizan diferentes muestras 2, ya que la frecuencia de resonancia en el canal 12 es dependiente también de la velocidad del sonido en la muestra y de otros factores tales como la temperatura y la longitud del canal 12.

Aunque en la Fig. 1 las mediciones de absorbancia se hacen en una muestra de sangre entera, otros fluidos dispersivos pueden procesarse de manera similar para hacer mediciones ópticas o eléctricas en las regiones del fluido que las partículas no ocupan después de ser forzadas a congregarse en otras regiones.

Además, en ciertas realizaciones del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención donde la muestra es sangre entera, la relación entre el volumen de los glóbulos rojos en la al menos una primera regiones 32, ver la fig. 2A, y el volumen del plasma sanguíneo en la al menos una segunda regiones 36, 38 en la fig. 2A, se determina como se especifica en el paso 1008 midiendo el volumen de la al menos una primera regiones 32 y el volumen de la al menos una segunda regiones 36, 38 donde después se puede determinar el hematocrito como se indica en el paso 1010.

La Fig. 2 son fotografías que muestran la congregación de glóbulos rojos con y sin variación de la frecuencia de la onda estacionaria acústica y tomadas en diferentes momentos. Así, las Fig. 2A y 2B muestran la misma sección de un canal cuando se utiliza una onda estacionaria de una sola frecuencia. Los glóbulos rojos se congregan en el centro del canal, es decir, la primera región 32 y el plasma ocupa las segundas regiones 36 y 38 que flanquean el centro del canal. En primer lugar, cabe señalar que la primera región 32 no es de sección transversal uniforme, sino que el ancho de esta región varía a lo largo del canal. En segundo lugar, como se ve al comparar la Fig. 2A con la Fig. 2B, las primeras regiones no son uniformes a lo largo del tiempo porque en la Fig. 2B, que está tomada aproximadamente 5 segundos más tarde, la porción ensanchada de las primeras regiones 32 se ha movido hacia la izquierda. Claramente, sería difícil seleccionar un área de las segundas regiones 36 y 38 donde siempre sería posible realizar la medición óptica ya que existe el riesgo de que los glóbulos rojos en las primeras regiones 32 puedan oscurecer el área seleccionada.

Las Fig. 2C y 2D muestran la misma sección del canal, sin embargo esta vez la frecuencia se varía, es decir, se barre, entre una frecuencia por debajo de la frecuencia de resonancia para una onda estacionaria en la dimensión de ancho del canal y una frecuencia por encima de esta frecuencia. Como se muestra cuando se comparan las Fig. 2C y 2D, la primera región es uniforme tanto espacialmente, es decir, a lo largo del canal, como temporalmente (las fotografías se toman separadas en aproximadamente 0,8 segundos). Así, en este caso, se puede seleccionar un área de las segundas regiones como se muestra mediante el círculo 28' discontinuo.

En consecuencia, la variación de la frecuencia de la onda estacionaria acústica produce una congregación más uniforme de los glóbulos rojos tanto espacial como temporalmente, provocando así la formación confiable de al menos una segunda región libre de glóbulos rojos/partículas, a través de la cual se puede hacer una medición óptica o eléctrica, tal como una medición de absorbancia o transmisión de la cantidad o concentración de hemoglobina libre.

La frecuencia puede barrerse, por ejemplo, entre 1850 kHz y 2050 kHz. La luz transmitida se puede medir para medir la hemoglobina libre a 420 nm.

La Fig. 3 es una vista esquemática desde arriba de una segunda realización del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. La Fig. 3 muestra un sustrato 10' de vidrio alargado que tiene formado

en su interior un canal 12' de 2 mm de ancho y 200 um de alto. En un extremo del sustrato 10' se proporciona una entrada 14' al canal 12', y en el otro extremo se proporciona una salida 16' opuesta. El sustrato 10' se asemeja así a un capilar de vidrio. Un transductor 22' de ultrasonidos está acoplado al sustrato 10' a través de una lámina 30 de vidrio, cuya lámina de vidrio funciona como un miembro de acoplamiento para transferir la energía acústica del transductor 22' de ultrasonidos al sustrato 10'. El uso de la lámina 30 de vidrio hace posible realizar mediciones de absorbancia en el canal 12' ya que el transductor de ultrasonido ya no está unido al sustrato debajo del canal. En la Fig. 3, el transductor 22' es accionado con una frecuencia que varía alrededor de un múltiplo mayor de la frecuencia de resonancia más baja del canal 12', lo que produce la onda estacionaria acústica indicada por 26', cuya onda estacionaria acústica tiene dos nodos de presión. En consecuencia, cuando se ha introducido una muestra de sangre entera 2 en el canal 12', los glóbulos rojos, al menos en la proximidad de la onda estacionaria acústica 26', se congregarán en dos bandas en las primeras regiones 32' y 34', una para cada nodo de presión, dejando que el plasma 6, es decir, el fluido, ocupe las tres segundas regiones 36', 38' y 40' restantes. Así, es posible realizar la medición óptica o eléctrica en una de estas segundas regiones.

La Fig. 4 es una vista esquemática en sección transversal de parte de una primera realización de un sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención. La Fig. 4A muestra un sistema que comprende, por una parte, un sustrato 10" con un canal 12" con entrada 14" y salida 16", y, por otra parte, una carcasa 50 que tiene un receptáculo o abertura 52 para recibir al menos parte del sustrato 10" y topes 54, 56, 58 y 60 para posicionar el sustrato 10". La carcasa 50 aloja además un transductor 22" de ultrasonido con una lámina 30' de vidrio que actúa como un miembro de acoplamiento para transferir energía de ultrasonido al sustrato 10" cuando el sustrato es recibido en el receptáculo 52. Una fuente de luz 62 está posicionada debajo de la lámina 30' de vidrio en una posición predeterminada con respecto al receptáculo 52 y los topes 54, 56, 58, 60 y un sensor 64 está posicionado encima, ver la Fig. 3B, para recibir la luz de la fuente de luz 62 a través del sustrato 10", representando la fuente de luz 62 y el sensor 64 un detector. Una fuente de potencia eléctrica 66, tal como una batería, así como un circuito 68 de control y un circuito 70 de accionamiento para el transductor 22" de ultrasonidos también están contenidos dentro de la carcasa 50.

Durante el uso, se permite que una muestra de un fluido disperso, por ejemplo sangre, fluya hacia el canal 12" a través de la primera entrada 14". El sustrato 10" se inserta después en el receptáculo 52, con lo que los topes 54, 56, 58 y 60 entran en contacto con el sustrato 10" para posicionarlo en una posición predeterminada. El circuito 68 de control controla después el circuito 70 de accionamiento para energizar el transductor 22" de ultrasonido. En esta posición el sustrato 10" está en contacto con la lámina 30' de vidrio de manera que se le puede transferir energía de ultrasonido para provocar que las partículas en el fluido disperso, en este caso glóbulos rojos, se congreguen en al menos una primera región del canal 12". La posición y dimensión del canal 12" con respecto al sustrato, y la posición de la fuente de luz 62 y el sensor 64, están dispuestas de tal manera que siempre se formará una segunda región desprovista de glóbulos rojos de modo que se pueda realizar una medición de absorbancia. Esto se debe a que el circuito 70 de accionamiento está configurado para accionar el transductor 22" de ultrasonido con una frecuencia que varía alrededor de una frecuencia de resonancia del canal, por lo que incluso cuando puede haber variaciones en el ancho del canal 12" debido a la fabricación del sustrato 10", los glóbulos rojos 4 se congregarán apropiadamente dejando una segunda región desprovista de glóbulos rojos para la medición de absorbancia. El circuito 68 de control recibe el resultado de la medición de absorbancia del sensor 64 y puede, directamente o después de convertir el resultado de la medición de absorbancia (estando el resultado en forma de un valor de transmisión) en un valor de grado de hemólisis utilizando una tabla de búsqueda o función derivada de mediciones de muestras con grados de hemólisis conocidos, mostrar el resultado o el nivel de hemólisis en una pantalla (no mostrada) provista en la carcasa, o puede almacenar el resultado o el nivel de hemólisis dentro del circuito 68 de control para su posterior recuperación.

Tercer y cuarto aspectos que no forman parte de la invención reivindicada

Como se muestra a partir de la discusión y la divulgación anteriores, es ventajoso variar la frecuencia de la onda estacionaria acústica en una cavidad microfluídica. Los presentes inventores han encontrado que estas ventajas pueden emplearse también para otras mediciones.

En consecuencia, el tercer y cuarto aspectos correspondientes se refieren a un método y sistema para determinar el hematocrito en sangre entera.

El hematocrito (HCT) es la fracción de volumen de glóbulos rojos en la sangre, que es un indicador importante del estado sanguíneo de un paciente. La medición del HCT es útil para el diagnóstico de varias enfermedades y afecciones, tales como anemia, policitemia, deshidratación y pérdida de sangre debido al sangrado. Tradicionalmente, se ha utilizado el método del microhematocrito para medir el HCT. En este método, se centrifuga un capilar lleno de sangre y se mide la altura relativa de la fracción celular empaquetada, también conocida como volumen celular empaquetado (PCV). El método del microhematocrito ha sido reemplazado en la mayoría de los hospitales modernos (a menudo con instalaciones de laboratorio centralizadas) por analizadores de sangre entera, que son instrumentos basados en mediciones de impedancia eléctrica (el

principio de Coulter). Sin embargo, el método del microhematocrito todavía se utiliza en hospitales más pequeños y en consultorios médicos debido a su menor costo y su lectura sencilla.

5 Se ha sugerido la microfluídica para la determinación de HCT, sin embargo, con precisiones no mejores que el 2,6 % de HCT y tiempos de muestra a respuesta de 5 minutos, todavía existe una necesidad de mediciones más rápidas y más precisas de HCT.

10 En consecuencia, un objeto adicional es proporcionar un método y un sistema rápidos y/o más precisos para determinar el hematocrito en sangre entera.

Otro objeto adicional es proporcionar un método y un sistema para determinar el hematocrito en sangre entera que se pueda automatizar y/o que no requiera productos químicos adicionales.

15 Al menos uno de estos objetos, o al menos uno de los objetos adicionales que se harán evidentes a partir de la siguiente descripción, se logran de acuerdo con los aspectos tercero y cuarto correspondientes mediante un método de medición del hematocrito de una muestra de sangre, comprendiendo la muestra de sangre al menos glóbulos rojos y al menos plasma sanguíneo, comprendiendo el método los pasos de:

20 a) posicionar la muestra de sangre en una cavidad microfluídica que tiene una frecuencia de resonancia,

b) someter la muestra de sangre, en la cavidad, a una onda estacionaria acústica configurada para provocar que los glóbulos rojos se congreguen en al menos una primera región de la cavidad, provocando de este modo que el plasma sanguíneo ocupe al menos una segunda región de la cavidad, en donde la frecuencia de la onda estacionaria acústica se varía entre una frecuencia por debajo de la frecuencia de resonancia y una frecuencia por encima de la frecuencia de resonancia, y

25 c) determinar una relación entre el volumen de los glóbulos rojos en la al menos una primera región y el volumen del plasma sanguíneo en la al menos una segunda región, y

30 d) determinar el hematocrito de la muestra de sangre en base a la relación, y

un sistema microfluídico para medir el hematocrito de una muestra de sangre, comprendiendo la muestra de sangre al menos glóbulos rojos y al menos plasma sanguíneo, comprendiendo el sistema

35 un sustrato con una cavidad microfluídica formada en el sustrato, teniendo la cavidad microfluídica una entrada para permitir que la muestra de sangre ingrese a la cavidad microfluídica,

40 un transductor de ultrasonido conectado al sustrato para generar una onda estacionaria acústica en la cavidad microfluídica,

45 un circuito de accionamiento conectado operativamente al transductor de ultrasonido y configurado para accionar el transductor de ultrasonido con una frecuencia que se varía entre una frecuencia por debajo de una frecuencia de resonancia de la cavidad microfluídica y una frecuencia por encima de la frecuencia de resonancia, de modo que provoque que los glóbulos rojos se congreguen en al menos una primera región de la cavidad, provocando así que el plasma sanguíneo ocupe al menos una segunda región de la cavidad,

un detector dispuesto o configurado para determinar una relación entre el volumen de los glóbulos rojos en la al menos una primera región y el volumen del plasma sanguíneo en la al menos una segunda región, y

50 un ordenador para determinar el hematocrito de la muestra de sangre en base a la relación.

La muestra de sangre puede ser una muestra de sangre entera diluida o sin diluir.

55 La muestra de sangre puede posicionarse en la cavidad por bombeo, por presión, por succión, por la acción de campos eléctricos, por gravedad y por acción capilar.

60 La cavidad microfluídica puede estar cerrada al entorno. La cavidad microfluídica es preferiblemente un canal que tiene una sección transversal cuadrada o rectangular. La cavidad microfluídica puede tener, por ejemplo, un ancho de sección transversal de 1 a 20 veces la altura de la sección transversal. En este caso, la longitud de la cavidad microfluídica es al menos igual que el ancho. El ancho puede ser, por ejemplo, de 0,3 mm a 5 mm. La altura puede ser, por ejemplo, de 0,025 mm a 1 mm.

65 Las frecuencias de resonancia de la cavidad microfluídica son dependientes de las dimensiones porque, para que se forme una onda estacionaria, la longitud de onda λ de la onda, cuya longitud de onda es inversamente proporcional a la frecuencia, debe ser $n\lambda/2$ donde n es un entero positivo.

ES 2 990 057 T3

Las siguientes son las 3 primeras resonancias para una onda estacionaria dirigida a lo largo de la dimensión del ancho de la cavidad:

5 una primera frecuencia de resonancia f está asociada con una onda estacionaria acústica $\lambda/2$ correspondiente a un primer armónico donde los antinodos de presión de la onda estacionaria están posicionados cerca de las paredes de la cavidad y un solo nodo de presión se forma en el medio de la cavidad, provocando así que las partículas se congreguen en el centro de la cavidad, siendo esta la primera región y siendo las regiones cerca de las paredes laterales de la cavidad las segundas regiones. Así se obtiene: pared 1 - fluido 1 - partículas 1 - fluido 2 - pared 2.

10 En un segundo armónico, correspondiente a una frecuencia de resonancia que es dos veces la primera frecuencia de resonancia, es decir $2f$, se forma una onda estacionaria λ que tiene dos nodos y tres antinodos, forzando así generalmente a las partículas a congregarse en dos bandas a ambos lados del centro de la cavidad, siendo estas las primeras regiones y siendo el centro y los lados de la cavidad las segundas regiones. Así se obtiene: pared 1 - fluido 1 - partículas 1 - fluido 2 - partículas 2 - fluido 3 - pared 2. Esta es la frecuencia de resonancia preferida.

20 Una tercera frecuencia de resonancia, correspondiente a un tercer armónico, es tres veces la primera frecuencia de resonancia, es decir $3f$, y está asociada a una onda estacionaria $3\lambda/2$ que tiene 3 nodos y cuatro antinodos, forzando así a las partículas a congregarse en tres posiciones en la cavidad, siendo estas tres las primeras regiones, estando estas posiciones espaciadas unas de otras y de las paredes de la cavidad para formar tres segundas regiones. Así se obtiene: pared 1 - fluido 1 - partículas 1 - fluido 2 - partículas 2 - fluido 3 - partículas 3 - fluido 4 - pared 2.

25 En consecuencia, el término frecuencia de resonancia debe entenderse que comprende cualquier frecuencia en la que se pueda formar una onda estacionaria en la cavidad, y una frecuencia que provoque la formación de una onda estacionaria se considera una frecuencia configurada para provocar que las partículas se congreguen en al menos una primera región. Además, debe mencionarse que incluso si la resonancia, y por lo tanto la onda estacionaria, está predominantemente en unas dimensiones de ancho, siempre habrá componentes de resonancia a lo largo de la dimensión de longitud de la cavidad y potencialmente también en la dirección de la altura. Estas resonancias tridimensionales dan como resultado varias frecuencias de resonancia cercanas a la frecuencia de resonancia unidimensional, cada una con un patrón de enfoque asociado. El barrido de la frecuencia de activación sobre varias de estas frecuencias de resonancia hace posible aprovechar todas ellas y crear un enfoque acústico más predecible y uniforme, generado por el promedio ponderado resultante de los campos acústicos para las resonancias separadas y, por lo tanto, patrones de enfoque combinados.

40 La comprensión de que las resonancias acústicas deben entenderse en tres dimensiones y no sólo simplificarse a una dimensión genera así efectos prácticamente cruciales, al generar un patrón de enfoque acústico predecible, repetible y robusto. Esto, a su vez, permite la detección en posiciones predecibles y repetibles en el sistema, lo que no es posible con la activación de una sola frecuencia.

45 La frecuencia de resonancia de la cavidad, y por tanto la frecuencia de la onda estacionaria acústica, puede ser así de 0,15 Mhz a 10 MHz.

50 La frecuencia puede variarse desde una frecuencia un 20 % por debajo de la frecuencia de resonancia hasta una frecuencia un 20 % por encima de la frecuencia de resonancia. Preferiblemente, la frecuencia se varía desde una frecuencia un 10 % por debajo de la frecuencia de resonancia hasta una frecuencia un 10 % por encima de la frecuencia de resonancia. La frecuencia puede variarse de forma continua o, alternativamente, solo durante un tiempo, durante el tiempo en que la muestra/fluido disperso está sometido a la onda estacionaria acústica. La frecuencia puede variarse lineal o logarítmicamente.

55 La frecuencia no debe variarse desde una frecuencia que sea tan baja, o a una frecuencia que sea tan alta, que la frecuencia corresponda a una frecuencia de resonancia diferente de la cavidad que conducirá a un número diferente de nodos y antinodos que el que se obtiene en la frecuencia de resonancia.

60 En otras palabras, la frecuencia f_{DN} , para provocar que las partículas se congreguen en al menos una primera región de una cavidad que tiene alguna dimensión D correspondiente a N semilongitudes de onda de la onda estacionaria acústica correspondiente a f_{DN} , debe, cuando varía de acuerdo con los aspectos de la presente invención, ser siempre mayor que $(c*(N-1))/(2*D)$ y menor que $(c*(N+1))/(2D)$, donde c es la velocidad del sonido en el fluido.

65 En la práctica, un rango de barrido del 1 % al 40 % de f_{DN} , es decir, la frecuencia que se varía en el rango de $\pm 0,5-20$ % de f_{DN} , es suficiente para cubrir las frecuencias de resonancia correspondientes a un cierto número de nodos de presión, así como las tolerancias de fabricación del canal y la variación en la velocidad del sonido de la muestra.

La señal de activación para el transductor de ultrasonido puede ser preferiblemente un seno linealmente con chirrido con una tasa de repetición de 1000 Hz y una amplitud de aproximadamente 15 Vpp (voltaje pico-pico).

5 En otras palabras, la señal de activación para el transductor de ultrasonido puede ser, por ejemplo, un seno linealmente con chirrido con un tiempo de barrido de 1 ms. La amplitud para la señal puede ser de 15 Vpp (voltaje pico-pico).

10 El tiempo de barrido debe ser mucho más corto que el período de tiempo durante el cual se produce la congregación. Por lo tanto, la tasa de repetición debe ser lo suficientemente alta para que el tiempo de barrido sea mucho más corto que el período de tiempo durante el cual se produce la congregación. Como ejemplo, cuando las partículas se congregan en la cavidad durante un período de tiempo de 5 segundos, la tasa de repetición del barrido se puede establecer de tal manera que las frecuencias se repitan en ciclos de 100 veces o más, es decir, al menos 20 repeticiones por segundo correspondientes a un tiempo de barrido de 50 ms o menos. Por lo tanto, el tiempo de barrido puede ser, por ejemplo, de 100 ns-50 ms, tal como de 1-50 ms.

15 Un tiempo de barrido demasiado lento conduce a que la forma de la primera y la segunda regiones cambien durante el tiempo de medición, es decir, el tiempo en que la muestra está sometida a la onda estacionaria acústica.

20 La relación puede ser, por ejemplo, una proporción o porcentaje del volumen o área de los glóbulos rojos.

25 La relación puede determinarse, por ejemplo, utilizando un detector tal como una cámara o una matriz de sensores sensibles a la luz. Se puede proporcionar una fuente de luz en el lado opuesto de la cavidad desde la cámara o matriz sensible a la luz. La relación se puede determinar estableciendo mediante umbralización de una imagen de al menos una parte de la cavidad y asignando un recuento del número de píxeles que tienen un valor por debajo del umbral frente al número total de píxeles.

30 No es necesario calcular el volumen de los glóbulos rojos en la al menos una primera regiones y el volumen del plasma sanguíneo en la al menos una segunda regiones siempre que la cavidad sea de dimensiones uniformes donde se realiza la determinación de la relación.

35 Así, la relación de los volúmenes se puede determinar midiendo el área de la al menos una primera región y el área de la al menos una segunda región, determinándose el área en un plano formado por dos dimensiones ortogonales (XY) de la cavidad, siempre que las regiones tengan la misma extensión en la tercera dimensión (Z) de la cavidad, o que la medición se ajuste a la variación de profundidad en la dirección Z.

40 El volumen combinado de todas las primeras regiones y el volumen combinado de todas las segundas regiones se pueden medir para determinar la relación.

El hematocrito se puede determinar a partir de la relación utilizando el método en muestras de hematocrito conocido y determinando las relaciones para estas muestras para preparar una correlación entre los valores de hematocrito y la relación.

45 El ordenador está preferiblemente dispuesto y programado además para activar primero el circuito de accionamiento y después activar el detector.

50 El método y sistema de acuerdo con el tercer y cuarto aspectos también podrían utilizarse para determinar la fracción de volumen de partículas en otros fluidos dispersos tales como fluido intracelular, fluido intersticial, fluido sinovial, fluido peritoneal, orina, cultivos de células de levadura, médula ósea y estroma.

55 En la realización preferida del método de acuerdo con el tercer aspecto, la muestra de sangre se somete a la onda estacionaria acústica durante 20 segundos o menos, tal como 5 segundos o 2 segundos antes del paso de determinación de la relación entre el volumen de los glóbulos rojos en la al menos una primera región y el volumen del plasma sanguíneo en la al menos una segunda región.

60 Correspondientemente, el detector y/o el ordenador pueden estar dispuestos o configurados para determinar la relación entre el volumen de los glóbulos rojos en la al menos una primera región y el volumen del plasma sanguíneo en la al menos una segunda región después de que la muestra de sangre se someta a la onda estacionaria acústica durante 20 segundos o menos, tal como 5 segundos o 2 segundos.

El detector puede estar configurado para determinar la relación al configurarse para obtener la lectura o la imagen en estos tiempos, o al proporcionar al ordenador una imagen o lectura en estos tiempos.

65 El detector puede estar configurado para determinar la relación que se está programando o configurando para obtener, del detector, una imagen o lectura en estos tiempos.

Además, el circuito de accionamiento puede estar configurado para proporcionar la onda estacionaria acústica para estos tiempos.

5 En la realización preferida del método y sistema de acuerdo con el tercer y cuarto aspecto correspondientes, la cavidad se forma en un sustrato. El sustrato puede estar hecho de silicio, pero puede estar hecho de material polimérico, tal como plástico o, alternativamente, vidrio. También son posibles otros materiales como cerámica y metales. Estos materiales son baratos y, por lo tanto, adecuados para realizar las mediciones ópticas o eléctricas en el campo en un centro de punto de atención, como consumibles desechables.

10

El método y sistema de acuerdo con el tercer y cuarto aspectos se describirán ahora además con referencia a las Fig. 5-9.

15

Las Fig. 5A y B son una vista esquemática de una realización del método de acuerdo con el tercer aspecto que se realiza utilizando una primera realización del sistema de acuerdo con el cuarto aspecto. Así, la fig. 5A muestra un sistema 100 que comprende un sustrato 110 de vidrio con un canal 112 que tiene una entrada 114 y una salida 116. Un transductor 122 de ultrasonido está conectado al sustrato 110, por ejemplo pegándolo a él, para someter la muestra a una onda estacionaria como se designa mediante el paso 1022 en la fig. 5B. Una fuente de luz 162 está posicionada debajo del canal 112 y una cámara 164 está dispuesta de manera que sea capaz de obtener una imagen de transmisión del canal 112 de acuerdo con el contorno 172, por ejemplo para determinar la relación entre el volumen de los glóbulos rojos en la al menos una primera regiones y el volumen del plasma sanguíneo en la al menos una segunda regiones midiendo el volumen de la al menos una primera regiones y el volumen de la al menos una segunda regiones como se designa mediante el paso 1024 en la fig. 5B, y está conectada a un ordenador 168 para determinar el hematocrito en base a esta relación, como se designa mediante el paso 1026 en la fig. 5B. El ordenador 168 está conectado además para controlar un generador 170 de funciones que está configurado para activar el transductor de ultrasonidos con una frecuencia que varía desde por debajo de una frecuencia de resonancia de la dimensión de ancho del canal 112 hasta una frecuencia por encima de esta frecuencia de resonancia. Una muestra de sangre 102 se aspira mediante una jeringa 176 a través del canal 112, es decir, posicionada en la cavidad como se designa mediante el paso 1020 en la fig. 5B, y se proporcionan dos válvulas 178 y 180 de tres vías para dirigir la muestra de sangre a través del canal 112, o para dirigir alternativamente una solución de limpieza a través del canal 112 entre muestras. También se proporciona un canal 182 de derivación entre las válvulas 178 y 180.

20

25

30

35

Para evaluar el sistema 100, se utilizaron las siguientes especificaciones experimentales:

40

El canal 112 microfluídico fue fabricado por Micronit Microfluidics (Enschede, Países Bajos) y se fabricó en sustrato 110 de vidrio de borosilicato utilizando fotolitografía y grabado húmedo isotrópico. El canal microfluídico tenía 400 μm de ancho y 150 μm de profundidad. El acceso fluídico se permitió puliendo con chorro de arena los orificios en los extremos del canal, y se unieron tubos de silicona sobre los orificios utilizando pegamento de silicona (Elastosil A07, Wacker Elastics) para proporcionar los puertos 114, 116 fluídicos. El transductor 122 de ultrasonido era un transductor piezocerámico (Ferropem AS, Dinamarca) que se pegó al chip/sustrato 110 utilizando pegamento de cianoacrilato (Loctite).

45

Se obtuvieron 102 muestras de sangre de donantes sanos después del consentimiento informado de todos los participantes. Para obtener una serie estándar, se obtuvieron diferentes niveles de HCT añadiendo o bien plasma autólogo o células sanguíneas a la muestra del donante. Experimentalmente, la sangre entera de un único donante sano se dividió en dos partes. Una parte se centrifugó (2000 \times g durante 10 min) para generar plasma sanguíneo y células sanguíneas separadas, que a su vez se mezclaron en porciones definidas con la sangre del donante sin centrifugar para obtener muestras con los niveles de hematocrito utilizados en el estudio.

50

Las mediciones de referencia de todas las muestras se hicieron utilizando una centrifuga de hematocrito (Hematokrit 210, Hettich GMBH, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se centrifugó un capilar lleno de sangre a 130k rpm durante 2 minutos, y el valor de PCV se leyó manualmente desde una barra de escala con incrementos de 1 punto porcentual (p.p) y se redondeó al valor entero más cercano, lo que produjo un error de redondeo de $\pm 0,5$ p.p. Cada muestra se midió tres veces, y la precisión del método estuvo dentro del error de redondeo.

55

60

Se aspiró una muestra de 200 μL de un tubo Eppendorf de 1,5 ml al canal 112 microfluídico utilizando una bomba 176 de jeringa (NeMESYS, Cetoni GMBH, Alemania). El flujo se detuvo cortocircuitando la entrada y la salida utilizando dos válvulas 178, 180 de tres vías de dos posiciones (NeMESYS).

65

El transductor 122 piezocerámico se activó por una señal amplificada (AR 75A250, Amplifier Research, Souderton, PA, EE. UU.) generada por un generador 170 de funciones (Tectronix AFG3022B). La señal de activación era un seno linealmente con chirrido que oscilaba de 1,8-2,1 MHz con un ciclo de trabajo de 1 ms y una amplitud de pico a pico de aproximadamente 15 V. El software LabVIEW desarrollado internamente controlaba el generador de funciones.

Del canal microfluídico 112 se tomaron imágenes utilizando un microscopio (DM2500 M, Leica Microsystems CMS GmbH, Alemania) con una cámara CCD de escala de grises de 8 bits 164 (EoSens mini MC-1370, Mikrotron GmbH, Unterschleissheim, Alemania). Una matriz de LED blancos utilizados como fuente de luz 162 y colocados bajo el chip/sustrato 110 para la obtención de imágenes de transmisión. Se tomó una imagen de un segmento de aproximadamente 3,5 mm por 0,6 mm del canal 112 microfluídico. La adquisición de imágenes a 20 Hz se activó por hardware al activarse la activación ultrasónica.

El volumen celular acústicamente empaquetado, APCV, se midió a partir de las imágenes adquiridas utilizando un algoritmo de análisis de imágenes básico implementado en MatLab. Brevemente, los glóbulos rojos absorben fuertemente en la microscopía de modo de transmisión y se representan como píxeles oscuros en las imágenes. El plasma sanguíneo es transparente y se representa como píxeles brillantes. La imagen se recortó a lo largo de las paredes del canal utilizando límites establecidos inicialmente por el usuario y se convirtió a binario de 1 bit mediante umbralización utilizando un nivel de umbral del 30 % del valor máximo de píxel. Este valor umbral se eligió inicialmente porque generaba un resultado similar a lo que el usuario percibía como el límite entre la sangre y el plasma en la imagen sin procesar. Se invirtió la imagen y se calculó el valor APCV como el número de píxeles brillantes (suma de la imagen binaria), dividido por el número total de píxeles de la imagen (tamaño de la imagen).

la Fig. 6 muestra fotografías de la cavidad microfluídica y las técnicas de umbralización subsiguientes para determinar el área ocupada por glóbulos rojos frente al área ocupada por plasma sanguíneo. Así, el panel A de la Fig. 6 muestra todo el canal microfluídico lleno de sangre antes de someter la muestra de sangre a la onda estacionaria acústica; mostrando las líneas discontinuas las paredes del canal. El panel B muestra sangre entera (40 % PCV) que se enfoca hacia el centro del canal después de 20 s de activación ultrasónica. La onda estacionaria acústica se indica mediante líneas discontinuas en forma de reloj de arena. El panel C muestra la imagen de umbral invertida utilizada para la medición de APCV.

Al realizar el experimento y obtener las fotografías de la Fig. 6 es claramente perceptible el efecto de utilizar el barrido de frecuencia lineal para la activación del transductor 122 de ultrasonido. En primer lugar, se promediaron las resonancias dirigidas a lo largo de la longitud del canal y se redujo la presencia de "puntos calientes" acústicos para que el campo acústico se volviera invariante a lo largo del canal. En segundo lugar, la señal de chirrido eliminó la necesidad de un ajuste específico de la frecuencia de activación de la muestra. Como la velocidad del sonido en la sangre depende del nivel de hematocrito, un operador tendría que ajustar la frecuencia de activación para que coincida con la condición $\frac{1}{2} \lambda$ requerida.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra la correlación entre el volumen celular acústicamente empaquetado (APCV) y el volumen celular empaquetado (PCV). Este gráfico se obtuvo para probar la linealidad del método de medición. Se preparó una serie estándar de dilución de muestras de sangre con diferentes niveles de hematocrito. La serie estándar contenía un total de 17 muestras de sangre con HCT que oscilaba del 20 % al 60 %, en incrementos de 2,5 puntos porcentuales (p.p). El HCT de cada muestra se midió 3 veces con el método de acuerdo con el tercer aspecto y 3 veces mediante centrifugación como control. La medición de la centrifugación tuvo una resolución de 1 p.p.

Los valores de APCV de las muestras de la serie estándar se midieron después de 20 s de activación acústica y mostraron una correlación lineal con los valores de PCV. Una regresión lineal ($y = 0,986x + 4,12$) produjo un valor R2 de 0,987. Para los residuos, ver SI.2. Todo el proceso de medición de una sola muestra, incluyendo la carga de la muestra, el empaquetado acústico de las células, el análisis de imágenes y el lavado del canal, se puede realizar en menos de 60 s.

La Fig. 8 muestra la evolución temporal de la relación entre el área ocupada por glóbulos rojos frente al área ocupada por plasma sanguíneo. Así, se encontró que, si bien la lectura óptica se realizó preferiblemente después de 20 s de activación acústica para asegurarse de que la señal obtenida había alcanzado el estado estable, el valor medido alcanzó una meseta después de aproximadamente 5 s. Además, se observa un aumento de tiempo para alcanzar el estado estable para la sangre con mayor PCV, ver el panel A. Los paneles B-E muestran fotografías del canal en diferentes puntos de tiempo.

Se realizaron pruebas adicionales para evaluar la precisión del método y del sistema. Así, se midieron los valores de APCV de muestras de sangre de un donante masculino (Y1) y de 4 donantes femeninos (X1-4) sanos. Para comparación, se utiliza la relación lineal entre los valores de APCV y PCV obtenidos de la serie estándar, ver Fig. 7, para calcular el equivalente de PCV del valor de APCV, designado como PCVE, cuyos resultados se proporcionan en la siguiente tabla:

Muestra	APCV medio (%)	PCVE medio (%)	Desviación estándar del PCVE (p.p)	PCV medio (referencia)	Error medio (p.p)
---------	----------------	----------------	------------------------------------	------------------------	-------------------

X1	46,28	42,7	0,99	43 %	-0,27
X2	44,89	41,3	0,99	42 %	-0,68
X3	44,34	40,8	0,67	43 %	-2,24
X4	46,65	43,1	0,96	44 %	-0,90
Y1	51,18	47,7	0,66	48 %	-0,64

5 Cada muestra se midió tres veces (n=3). El error de medición para cada muestra (calculado como el PCVE medio-PCV medio) fue <1 p.p para todas las muestras excepto la muestra X3, donde este método en promedio subestimó el PCV de la muestra en 2,24 p.p. La desviación estándar de tres mediciones fue inferior a 1 p.p para todas las muestras. Como indicador de la precisión del sistema, se calculó que el error absoluto promedio fue de 1,13 p.p y el error promedio fue de 0,95 p.p.

10 La Fig. 9 es un gráfico que muestra la correlación entre APCV y PCV obtenidos en diferentes puntos de tiempo. Así, este gráfico muestra que se puede realizar una predicción precisa del equivalente de PCV ya después de 2 s de activación acústica. A modo de comparación con el APCV de serie estándar de APCV de 20 segundos de la Fig. 7, los valores de APCV también se derivaron después de 2 y 5 s de activación acústica, mostrando una correlación lineal con el PCV, ver la Fig. 9. La siguiente tabla muestra los parámetros lineales para los tres puntos de tiempo de lectura de APCV:

Tiempo	Ajuste lineal eq.	Valor R ²
20 segundos	y=0,9867x+0,0412	0,9861
5 segundos	y=1,0544x+0,0369	0,9884
2 segundos	y=1,1899x+0,0253	0,9887

15 Los tres puntos de tiempo de APCV mostraron un rendimiento lineal que permite una estimación precisa de HCT. Sin embargo, la estimación del APCV en la fase inicial del enfoque acústico hace que el procedimiento de medición sea más sensible a las variaciones del sistema, es decir, a las desviaciones en la energía acústica y al momento de la recopilación de datos. Al recopilar datos en la fase temprana del enfoque, la derivada temporal de la curva APCV temporal es grande y, por lo tanto, cualquier variación en la energía acústica o en el tiempo tendrá un impacto mayor en la lectura que en la región de derivada baja donde las células están estrechamente empaquetadas. La estimación del APCV para las cinco muestras clínicas en los puntos de tiempo 2 y 5 segundos da un PCVE ligeramente mayor, aunque dentro de un margen de error de aproximadamente el 1 %, ver la siguiente tabla.

Muestra	5 segundos			2 segundos			PCV (referencia)
	PCVE medio	Desviación estándar (p.p)	Error medio (p.p)	PCVE medio	Desviación estándar (p.p)	Error medio (p.p)	
X1	44,5 %	1,83	1,15	45,1 %	2,06	2,1	43 %
X2	42,3 %	1,72	0,34	42,7 %	1,98	0,74	42 %
X3	41,8 %	0,84	-1,18	42,5 %	1,41	-0,46	43 %
X4	44,7 %	1,36	0,69	45,1 %	1,16	1,16	44 %
Y1	49,6 %	1,11	1,25	49,7 %	1,08	1,40	48,3 %

Modificaciones factibles de la invención

30 La invención no se limita únicamente a las realizaciones descritas anteriormente y mostradas en los dibujos, que tienen principalmente un propósito ilustrativo y ejemplificativo. Esta solicitud de patente pretende cubrir todos los ajustes y variantes de las realizaciones preferidas descritas en el presente documento, por lo que la presente invención se define por la redacción de las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, el equipo puede modificarse de todo tipo de formas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

35 Por ejemplo, se debe señalar que los aspectos estructurales de las realizaciones del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención se deben considerar aplicables a las realizaciones del sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención y, a la inversa, los aspectos metódicos de las realizaciones del sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención se deben considerar aplicables a las realizaciones del método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

40 También se debe señalar que toda la información sobre/relativa a términos tales como encima, debajo, superior, inferior, etc., se debe interpretar/leer teniendo el equipo orientado de acuerdo con las figuras, teniendo los dibujos orientados de manera que las referencias se puedan leer correctamente. Por lo tanto, dichos términos solo indican relaciones mutuas en las realizaciones mostradas, relaciones que pueden cambiarse si el equipo inventivo se proporciona con otra estructura/diseño.

45 A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo

contrario, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderán como que implican la inclusión de un número entero o pasos o grupo de números enteros o pasos establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar una medición óptica o eléctrica en una muestra (2) de un fluido disperso, comprendiendo la muestra partículas (4) y un fluido (6), que comprende los pasos de:
- 5 a) posicionar (1000) la muestra (2) en una cavidad (12) microfluídica que tiene una frecuencia de resonancia,
- b) someter (1002) la muestra (2), en la cavidad (12), a una onda estacionaria acústica configurada para provocar que las partículas (4) se congreguen en al menos una primera región (32) de la cavidad, provocando de este modo que el fluido (6) ocupe al menos una segunda región (36, 38) de la cavidad (12), en donde la frecuencia de la onda estacionaria acústica se varía repetidamente entre una frecuencia por debajo de la frecuencia de resonancia y una frecuencia por encima de la frecuencia de resonancia, y
- 10 c) realizar (1004) una medición óptica o eléctrica en el fluido en al menos una de la al menos una segunda región de la cavidad.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la onda estacionaria acústica está configurada para provocar que las partículas (4) se congreguen en una o dos primeras regiones (32', 34') de la cavidad (12).
- 20 3. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además el paso de:
- d) generar (1006) un flujo de la muestra (2) a través de la cavidad (12).
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la cavidad (12) es alargada y está conectada de manera fluida en un extremo a una entrada (14) y en el otro extremo opuesto a una salida (16).
5. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la cavidad (12) está formada en un sustrato (10), y en donde, preferiblemente, la energía de ultrasonido, para provocar la onda estacionaria acústica, se transfiere al sustrato (10) desde al menos un transductor (22') de ultrasonido únicamente a través de un miembro (30) de acoplamiento de vidrio conectado al transductor de ultrasonido y al sustrato.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra (2) es una muestra de sangre en la que las partículas comprenden al menos glóbulos rojos (4) y el fluido comprende al menos plasma sanguíneo (6).
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la medición óptica o eléctrica es una medición de absorbancia que comprende determinar la cantidad o concentración de hemoglobina libre en el plasma sanguíneo (6).
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el método comprende además los pasos de:
- d) determinar (1008) una relación entre el volumen de los glóbulos rojos (4) en la al menos una primera región (32) y el volumen del plasma sanguíneo (6) en la al menos una segunda región (36, 38) midiendo el volumen de la al menos una primera región (32) y el volumen de la al menos una segunda región (36, 38), y
- 45 e) determinar (1010) el hematocrito de la muestra de sangre en base a la relación, y
- 50 9. Un sistema microfluídico para realizar una medición óptica o eléctrica en una muestra (2) de un fluido disperso, comprendiendo la muestra partículas (4) y un fluido (6), comprendiendo el sistema
- un sustrato (10) con una cavidad microfluídica (12) formada en el sustrato, teniendo la cavidad microfluídica una entrada (14) para permitir la entrada de la muestra en la cavidad microfluídica,
- 55 un transductor (22'') de ultrasonido conectado al sustrato para generar una onda estacionaria acústica en la cavidad microfluídica,
- un circuito (70) de accionamiento conectado operativamente al transductor (22'') de ultrasonido y configurado para accionar el transductor de ultrasonido con una frecuencia que varía repetidamente entre una frecuencia por debajo de una frecuencia de resonancia de la cavidad microfluídica y una frecuencia por encima de la frecuencia de resonancia de modo que provoque que las partículas se congreguen en al menos una primera región (32) de la cavidad, provocando de este modo que el fluido ocupe al menos una segunda región (36, 38) de la cavidad, y
- 60 un detector (64) dispuesto para realizar una medición óptica o eléctrica en el fluido en al menos una de la al menos una segunda región de la cavidad.
- 65

10. El sistema microfluídico de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además una carcasa (50) que comprende un receptáculo (52) dispuesto para recibir al menos parte del sustrato (10"),
- 5 en donde el transductor (22") de ultrasonido está dispuesto en la carcasa y está dispuesto para conectarse al sustrato cuando el sustrato se recibe en el receptáculo, y
- en donde el detector (64) está dispuesto en la carcasa y está dispuesto en una posición predeterminada con respecto al sustrato cuando el sustrato es recibido en el receptáculo,
- 10 estando dispuesta la posición predeterminada para permitir que el detector realice la medición óptica o eléctrica en la al menos una de las al menos una segunda región (36, 38) de la cavidad (12").
11. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-10, que comprende además un miembro (30') de acoplamiento de vidrio unido al transductor (22") de ultrasonido para conectar el transductor de ultrasonido al sustrato (10").
- 15
- 12.El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el detector está dispuesto además para determinar una relación entre el volumen de las partículas (4) en las al menos una primera regiones (32, 34) y el volumen del fluido (6) en la al menos una segunda regiones (36, 38), al estar configurado para medir el volumen de la al menos una primera región (32) y el volumen de la al menos una segunda región (36, 38).
- 20

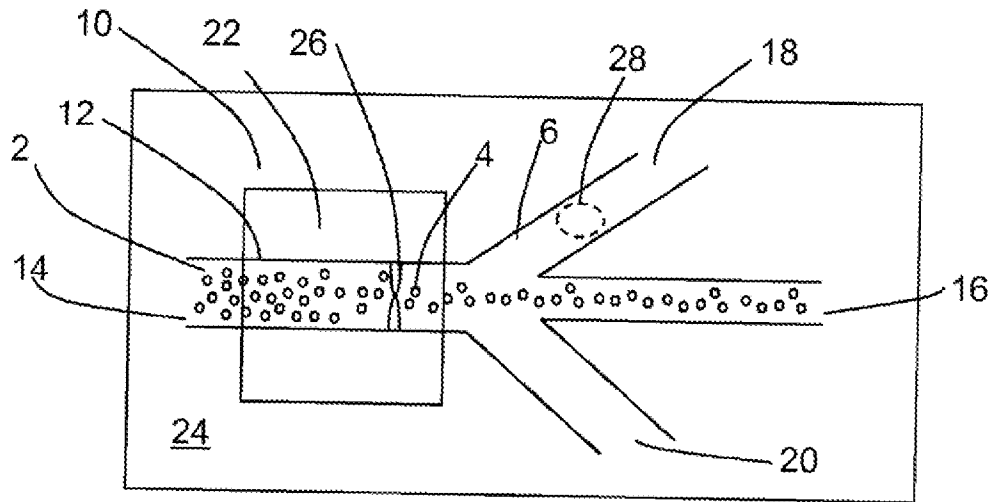


FIG. 1A

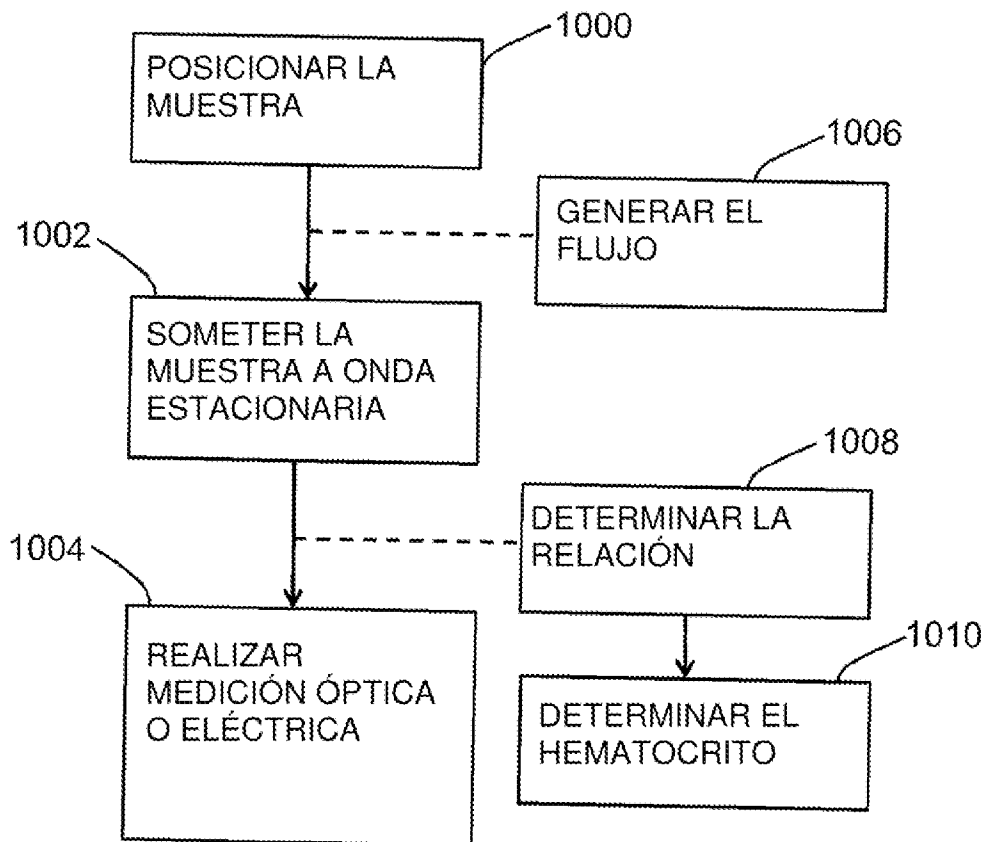


FIG. 1B

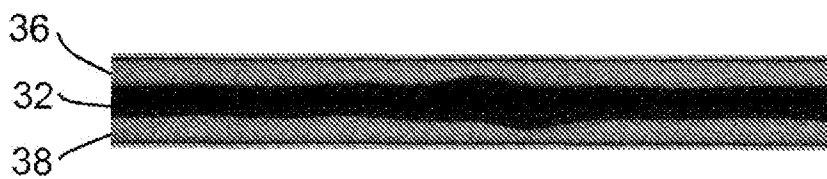


FIG. 2A

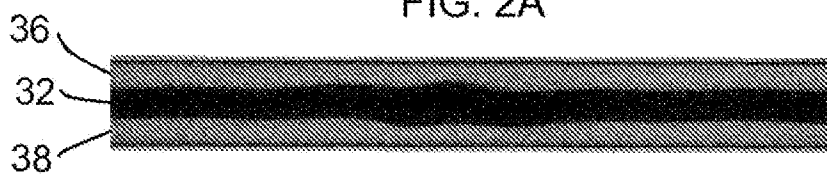


FIG. 2B

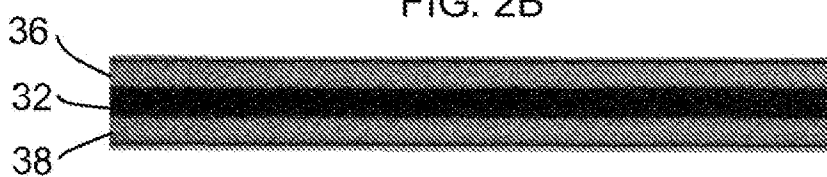


FIG. 2C

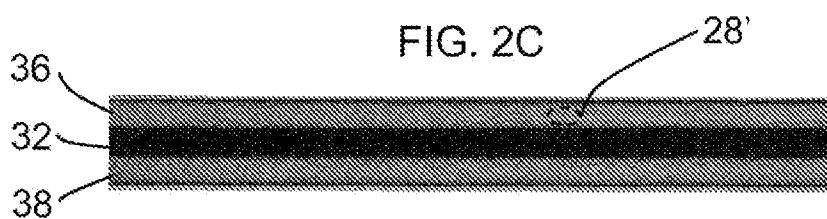


FIG. 2D

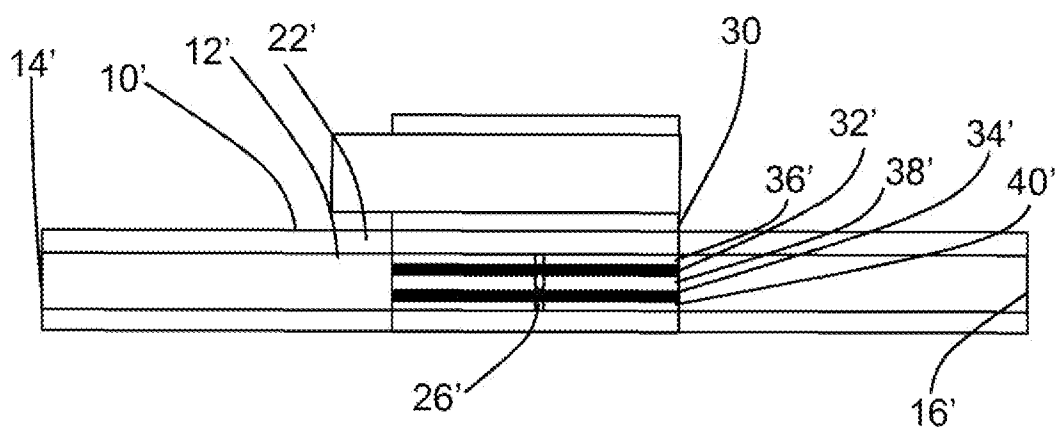


FIG. 3

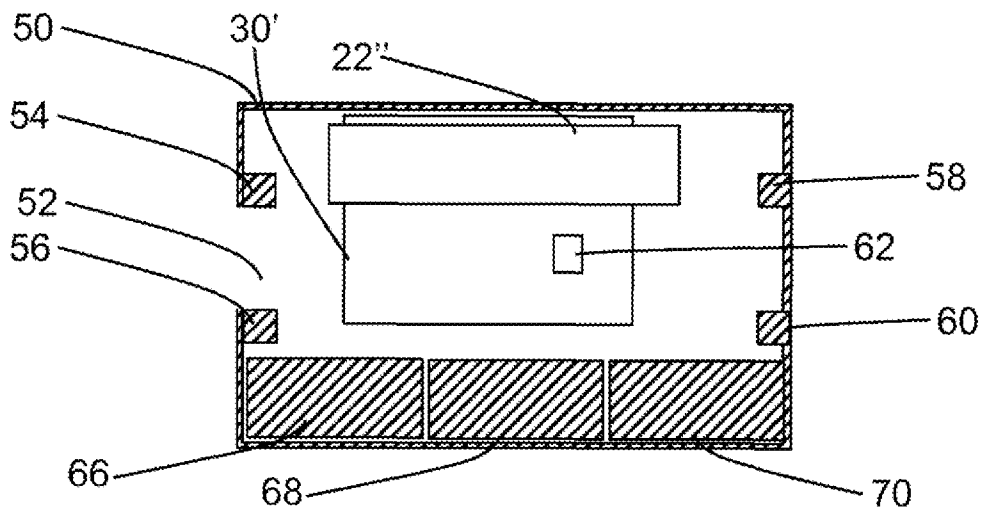
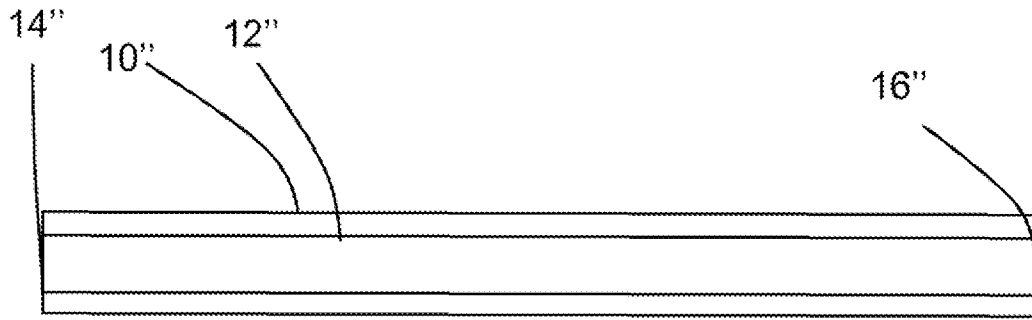


FIG. 4A

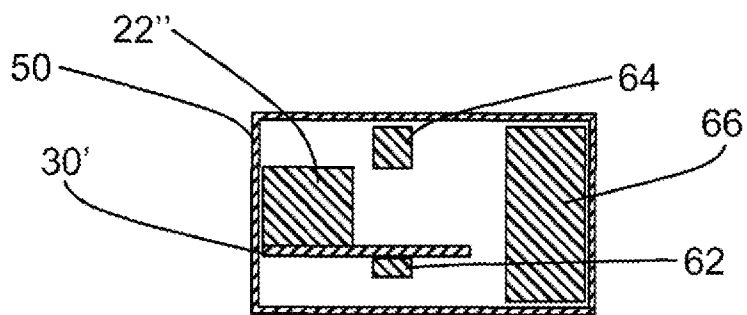


FIG. 4B

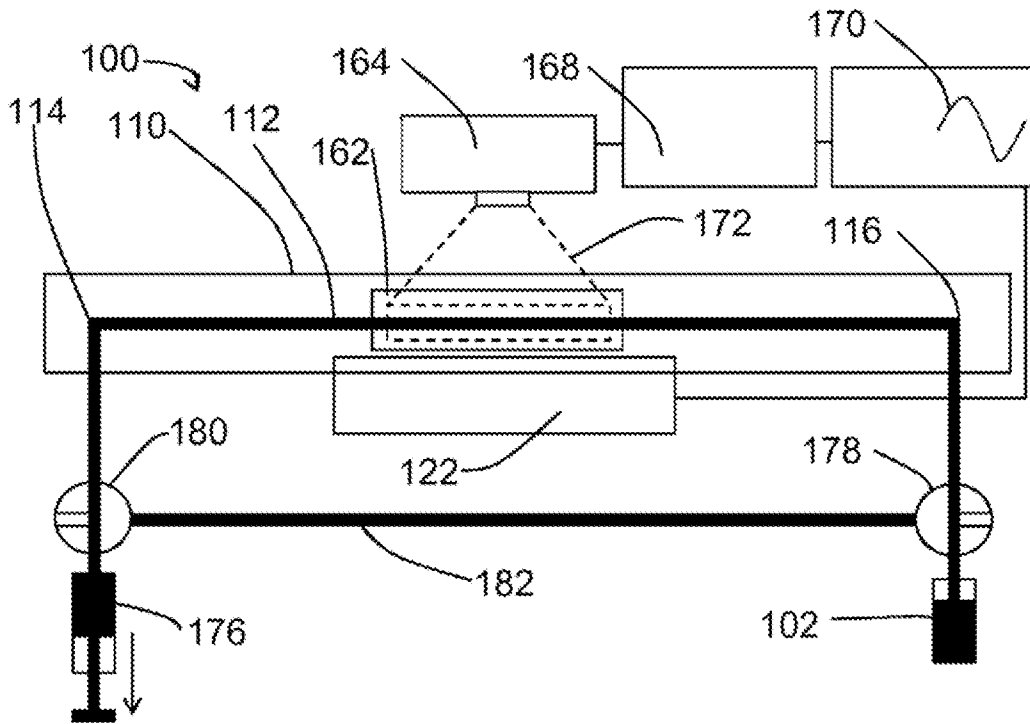


FIG. 5A

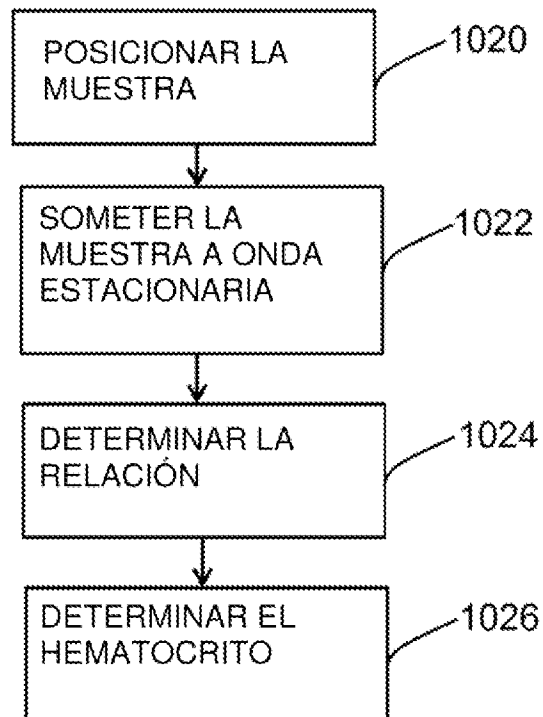


FIG. 5B

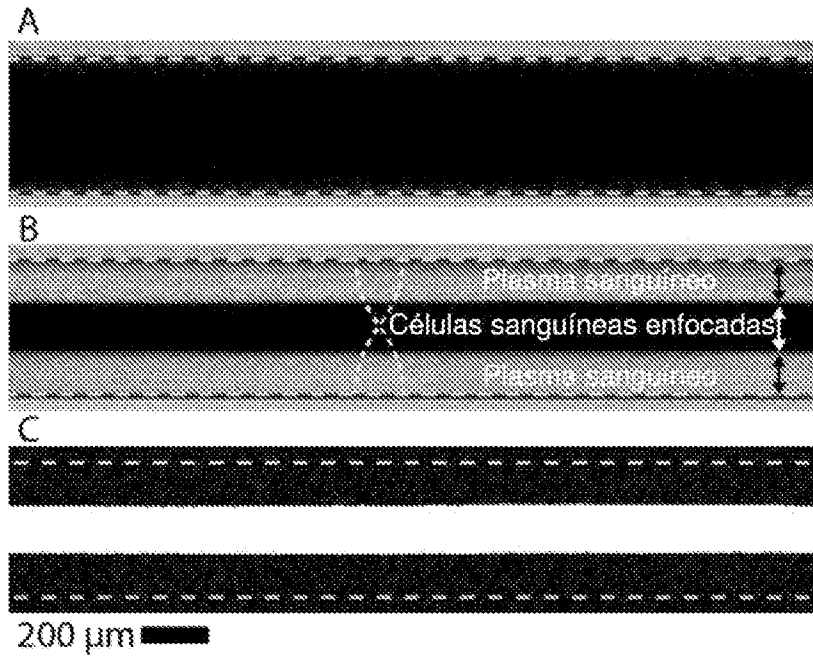


FIG. 6

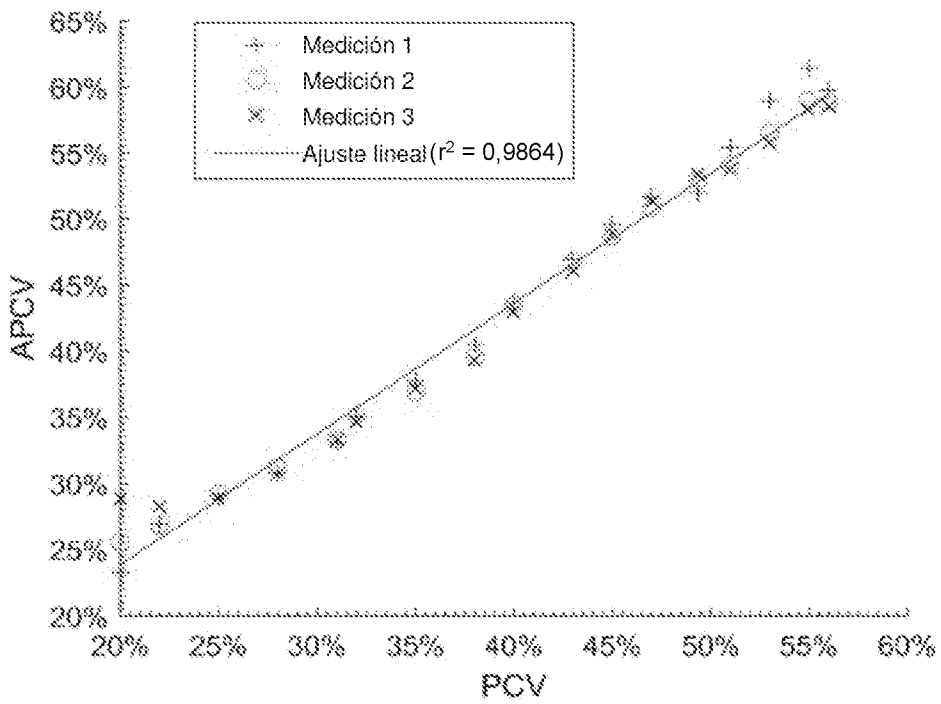


FIG. 7

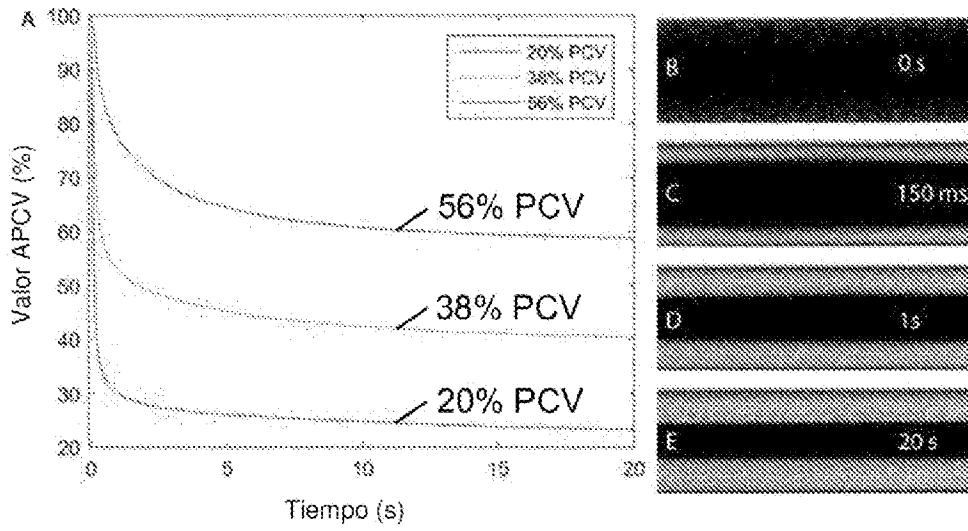


FIG. 8

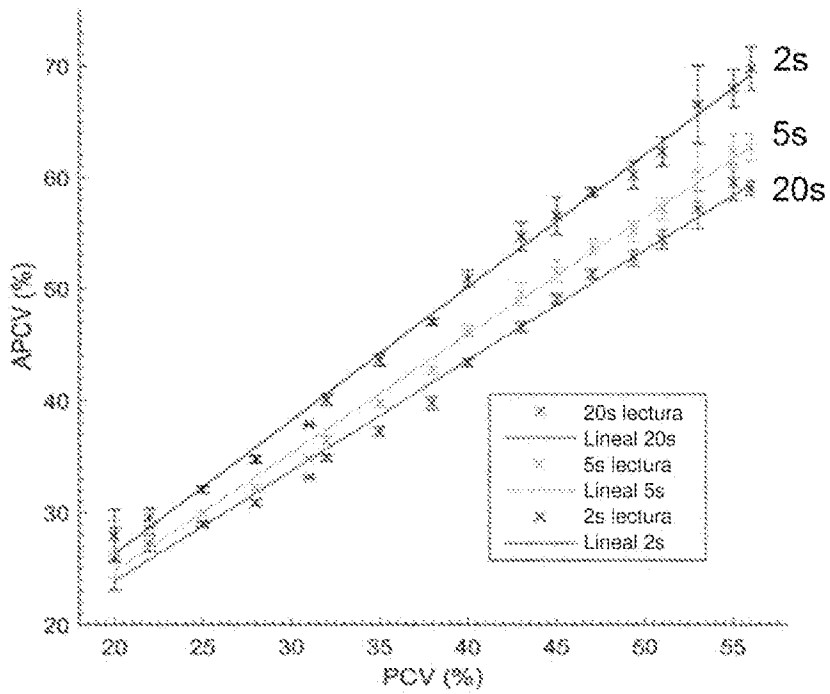


FIG. 9