



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 753**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04009738 .8**

86 Fecha de presentación : **20.03.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1447135**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

54 Título: **Cámara de ensayo diagnóstico *in vitro* mejorada por fluidez.**

30 Prioridad: **21.03.2000 US 191324 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.**
630 Clyde Court
Mountain View, California 94043, US

72 Inventor/es: **Innerst, Dianna;**
Kassinis, Adonis;
Wooley, C. Benjamin;
Wilmarth, Brett;
Sell, William J.;
Zychilinsky, Emi;
Marino, Donald;
Yamada, Sandy;
Ryan, Renee;
Ding, Karen y
Zatzke, Michael

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Cámara de ensayo diagnóstico *in vitro* mejorada por fluidez.

5 Este invento tiene que ver con un aparato y método para uso en el análisis diagnóstico de una muestra líquida a través de ensayos de enlace. Más en particular, se revela una cámara de prueba diagnóstica *in vitro* mejorada óptimamente y por fluidos, relacionada con el método y aparato revelados en Sell *et al* US Patent 4.567.149 emitida en 28 de enero de 1986.

10 **Antecedentes de la invención**

En Sell *et al*, US Patent 4.567.149 concedida el 28 de enero de 1986, se revela un aparato y un método relacionado con él para uso en el análisis diagnóstico de una muestra líquida a través de pruebas de enlace. El aparato incluía un cuerpo rígido y una cantidad de hilos elongados, referidos algunas veces como filamentos y/o cintas, cada uno de ellos recubierto con un componente enlazante de ensayo y soportado sobre el cuerpo en relaciones espaciadas para contacto simultáneo con una muestra líquida. Esta pluralidad de hilos elongados se posicionaba a lo largo de un pozo elongado bien formado en el cuerpo rígido, generalmente en forma transversal al eje longitudinal del pozo. Una pieza transparente, de ahora en adelante referida como una cubierta, se aseguraba al cuerpo rígido cubriendo el pozo elongado entre una entrada y una salida a lo largo de un flujo común de reactivo desde la entrada hasta la salida. Los hilos se protegían durante la manipulación del aparato.

Durante el uso, se podía confinar y aislar en el pozo un volumen específico de la muestra líquida donde ésta se podía incubar con los hilos. El aparato de la invención era particularmente adecuado para el tamizaje de alergias, con cada hilo consistente en un hilo de algodón recubierto con una sustancia alergénica específica.

25 El cuerpo rígido empleado en Sell *et al* se construía preferiblemente de plástico e incluía una superficie plana alrededor del pozo elongado. El hilo se tensionaba a lo largo del pozo desde orillas de lados opuestos del mismo. La cubierta quedaba por encima de los hilos y se aseguraba a extremos de lados opuestos del pozo. El cuerpo rígido incluía un puerto en cada extremo del pozo elongado para facilitar la inserción de varios líquidos dentro del pozo, incluyendo la muestra líquida a probar, las soluciones lavadoras adecuadas y una solución anticuerpo marcada. El aparato incluía adicionalmente una proyección en forma de pipeta alineada con el puerto localizado en un extremo del pozo.

35 La cubierta incluía preferiblemente una lámina plástica delgada en contacto directo con la superficie del cuerpo rígido. La cubierta tenía una pantalla de seda con una serie de aperturas angostas paralelas, cada una alineada con cada uno de los hilos de algodón por separado. La pantalla de seda optimiza la medición de la reacción de cada hilo de algodón al reducir los efectos interferentes de hilos adyacentes. La cubierta se aseguraba preferiblemente a la superficie del cuerpo sólido mediante soldadura ultrasónica.

40 El aparato de Sell *et al* US Patent 4.567.149 es ampliamente aceptado y aún se utiliza en la actualidad. Cuando está en uso, el soporte y los hilos se llenan e incuban con una muestra líquida tal como suero humano. Un anticuerpo secundario (por ejemplo un anticuerpo conjugado a peroxidasa del rábano, el cual reacciona al luminol) es incubado por alrededor de unas cuatro horas. Luego de esto los hilos eran lavados con una solución tampón - una solución salina - y eran drenados. Este lavado se hacía tres veces. Luego de este paso se introducía un fluido que induce una reacción de quimiluminiscencia. La cantidad de múltiples agentes biológicos que interactúan con los componentes enlazantes de la prueba recubiertos sobre los hilos se determina notando la presencia y ausencia de luz que es emitida de cada uno de los pozos. Por ejemplo, cuando se tamiza para la presencia de múltiples anticuerpos alergénicos específicos clase IgE en una muestra líquida, el aparato se incubaba con la muestra de prueba y luego, después del lavado, se incubaba con una solución que contiene anticuerpos marcados para los anticuerpos clase IgB que se han enlazado a los hilos. Se analizan entonces los hilos para determinar la presencia de los anticuerpos marcados. Si los anticuerpos marcados son etiquetados con un trazador radiactivo, tal como ¹²⁵I, este análisis se puede realizar empleando un contador gamma. Alternativamente, el análisis se puede realizar colocando los hilos adyacentes a una película fotográfica para su exposición y luego midiendo el grado de exposición o más recientemente, registrando en un detector de luz ya sea mediante fibra óptica o por detección directa.

55 Este aparato ha experimentado un alto grado de éxito comercial. Esta revelación es un mejoramiento de dicho aparato. Específicamente, hemos efectuado un análisis sistemático y extensivo de este aparato que antes era el estado del arte. En lo que sigue, el lector encontrará enumeradas las áreas específicas de mejoramiento.

60 El aparato de Sell *et al* US Patent 4.567.149 tenía un pozo o canal elongado poco profundo, uniforme en su sección transversal, interrumpido solamente por los hilos que cruzaban la cámara. El resultado era un aparato que requería aproximadamente de 1,5 ml de suero para producir el resultado esperado de la prueba. Desafortunadamente las muestras pediátricas son, en la mayoría de los casos, de menor volumen. Por ejemplo, se determinó que un aparato con un requerimiento de 0,500 mililitros o menor tendría una mayor utilidad, especialmente en el campo pediátrico.

65 Segundo, se ha determinado que los hilos en general, y los de algodón en particular, requieren volúmenes mayores de alergen/antígeno/reactivo en su proceso de absorción. Por ejemplo, 40 mililitros de extracto de sustancia alergénica se requerían para recubrir 12 yardas de hilo que podían ser usadas como uno de los 600 hilos en las unidades de Sell

et al US Patent 4.567.149. Esta rata de uso aumenta el costo de la prueba ya que requiere de la extracción del alergen a muy grande escala. Esto es una desventaja porque aumenta el costo del producto. Adicionalmente, el hilo es un producto natural (algodón) y puede ser difícil y costoso el controlar la calidad lote a lote.

5 Como será revelado aquí más adelante estos mismos 40 mililitros de alergen pueden ser usado ahora en 20.000 pruebas! En el nuevo diseño el alergen está directamente unido a la cubierta de poliestireno y no se usan hilos.

10 Tercero, la alineación y registro de los hilos individuales en las superficies individuales requería constante atención y esfuerzo. Se tenía que evitar la desalineación de los hilos para prevenir “falsos positivos” y “falsos negativos”.

10 Cuarto, una vez que los hilos habían sido incubados con los reactivos, tales como suero, se requería que fueran lavados y escurridos. Con solo un flujo el lavado de los hilos requiere un exceso de fluido. Aún más, los hilos de algodón usados proveían a la vez, resistencia al lavado uniforme y retención fluida del suero humano o solución salina. Específicamente, en la unión de los hilos y el paso de flujo se tendía a acumularse solución residual, ya fuera de suero o de solución salina. Esta acumulación ocurría debido a la combinación de la tensión superficial y las superficies irregulares provistas donde los hilos entraban al canal del aparato. Específicamente, los hilos de algodón introducían características salientes adicionales (superficies) donde el fluido podía quedar inmovilizado por tensión superficial (fuerzas capilares). El operario se mantenía retirando este fluido manualmente.

20 El aparato se usa en la actualidad para pruebas *in vitro* de reacciones inmunológicas a varios alergenitos. Desde una perspectiva de la mecánica de fluidos, la operación del aparato requiere que el suero sanguíneo sea inyectado a la cámara de prueba donde entra en contacto con los diferentes alergenitos depositados en los hilos. El suero es seguidamente drenado (por gravedad) desde la cámara de prueba y se usa una solución salina para hacer un lavado adicional del dispositivo. Durante el ciclo de lavado, se introduce una boquilla en la entrada en la parte superior del aparato formando un sello hermético que permite al fluido el ser inyectado a presión en la cámara de prueba. Cuando este sello se interrumpe por la remoción de la boquilla se alivia la presión de vacío resultante lo cual permite al fluido el ser evacuado del dispositivo. La evacuación incompleta o aún inconsistente de la solución de lavado de la cámara de prueba representa un problema potencial de dilución para las demás operaciones del dispositivo, requiriendo que el operario se asegure que todo el fluido ha sido retirado de la cámara luego del lavado.

30 Quinto, se podría mejorar la salida de luz del dispositivo que indica la reacción. Específicamente, los hilos que sufren una reacción grande podían radiar luz por fuera de su área de lectura lo que hacía que se requiriera un reactivo de extinción. Más aún, en los casos donde la reacción era demasiado débil, se necesitaba un aumento en el sustrato.

35 Sexto, la cubierta es fabricada de poliestireno extruido el cual es dado a rayarse lo que requiere esfuerzos de aseguramiento de la calidad para la selección de los componentes. Aunque las rayas son solamente defectos cosméticos, una parte obtenida en molde los eliminaría y proporcionaría mayor efectividad de costos.

40 En resumen, nuestro estudio detallado hizo claro que un mejoramiento era posible.

Resumen de la invención

La presente invención está relacionada con una cámara cerrada usada en un sistema para el tamizaje de una muestra líquida mediante ensayos de enlace tal como se reivindica en la reivindicación 1 y con un proceso correspondiente tal como se reivindica en la reivindicación 12. La cámara cerrada incluye una entrada, una salida y una gama de pozos discretos que contienen reactivos los cuales están comunicados por un trayecto común para el flujo de reactivos entre la entrada y la salida. Un componente de la cubierta, que opcionalmente es transparente, tiene definidos en su parte interna la gama de pozos. Cada pozo tiene un fondo para la recepción del reactivo el cual emite luz al reaccionar. La cubierta puede tener adicionalmente definidos entre el fondo de la variedad de pozos y el exterior de ella pasajes de luz para la detección de la reacción. Esta cubierta puede opcionalmente tener definida una lente sobre cada pozo la cual es una parte moldeada. Este pasaje de luz reemite al exterior de la cubierta la luz proveniente de las reacciones que ocurren dentro del pozo indicando la ocurrencia o no de una reacción. Un componente inferior define para cada uno de la variedad de pozos un componente de desviación de flujo. Este componente de desviación de flujo es una superficie continua, que sobresale desde y hacia uno de la variedad de pozos con el fin de desviar hacia el interior de los pozos el flujo que va de la entrada a la salida. Esta desviación permite el lavado de los fluidos en la pluralidad de pozos. Al mismo tiempo la superficie continua aumenta y substancialmente mejora el drenaje de la inyección de solución -usualmente una solución salina. Cuando se emplea una solución que presenta, ya sea emisión o ausencia de luz, para indicar la ocurrencia de la reacción, el pasaje de luz y las lentes opcionales sirven tanto para concentrar la luz emitida así como para inhibir falsos positivos. Finalmente, se revela una partición opaca con rendijas para rodear los lentes individuales y de esta manera individualizar la luz proveniente de cada uno de los pozos. El resultado es una detección mejorada, ensamblando una cubierta, un componente inferior y una partición opaca se obtiene una cámara que emplea un pequeño volumen de suero proveniente del paciente. Dicha cámara se llena con aproximadamente 270 μ l de líquido. Esta cámara es especialmente útil para los casos de muestras pediátricas. A la par de esto la reducción en volumen no genera características de mal lavado. El diseño fluídico de la cámara permite el uso de pequeños volúmenes de suero del paciente y asegura un lavado suficiente.

La cámara de prueba interna con sus características de flujo aumentado ha sido diseñada, basada en principios de Mecánica de Fluidos, para optimizar el lavado de los pozos alérgicos y las características de drenaje del dispositivo.

La *forma, tamaño y ubicación* de (a) las cavidades alergénicas, (b) la “superficie continua” que aumenta el flujo y (c) las secciones de entrada y salida de la cámara han sido seleccionadas para: (1) minimizar el volumen interno de la cámara de prueba, (2) reducir la retención capilar de fluido durante el drenaje, (3) mantener el lavado óptimo de las cavidades alergénicas a tasas de flujo altas y bajas y (4) permitir la operación eficiente del dispositivo en un rango más amplio de posiciones.

La “superficie continua” delineada mejora las características de lavado del dispositivo redireccionando el flujo del canal principal hacia las cavidades alergénicas. El dispositivo puede ser operado sin pérdidas significativas en su eficiencia lavado/drenaje hasta con una inclinación de 35 grados con respecto a la posición vertical nominal.

La migración desde la cubierta plana hacia los nuevos pozos alergénicos introduce nuevas complejidades al diseño. Donde el drenaje era uno de los principales aspectos con la configuración de cubierta plana, aquí la “lavabilidad” del dispositivo en presencia de cavidades alergénicas se convierte en el área de mayor preocupación. Esto es, la habilidad del patrón de flujo inducido por la inyección de la solución de lavado para desplazar el reactivo más viscoso o el suero sanguíneo de las superficies y esquinas de las cavidades alergénicas. Así, la forma interna de la cámara de prueba se diseña para permitir la penetración a éstas cavidades de un flujo suficientemente fuerte para su lavado.

Desde un punto de vista estrictamente de la mecánica de fluidos, es deseable que estas cavidades sean tan anchas en la dirección del flujo como sea posible e igualmente tan profundas como sea posible. Sin embargo, las cavidades tienen que ser suficientemente profundas para permitir el depósito de la cantidad requerida de material de prueba tal como el alergen. Aún más, las cavidades no pueden ser excesivamente anchas sin que se presente un efecto adverso en la óptica del dispositivo, por ej., en la habilidad de la transmisión de luz y del sistema de partición (con o sin las lentes opcionales) para concentrar en forma eficiente la luz para la detección y para aislar la luz proveniente de los pozos adyacentes. Por lo tanto, el diseño de las cavidades alergénicas ha sido efectuado de una forma que satisface el flujo, la óptica y los requerimientos químicos del dispositivo.

Uno de los cambios requeridos fue el diseñar una cámara que pudiera enfocar la salida de la luz. Este cambio en el diseño es importante por tres razones. Primero, la nueva cámara es diseñada para aumentar la especificidad del ensayo cuando se experimenta una respuesta de paciente muy alta. Segundo, la cámara es diseñada para aumentar la sensibilidad del ensayo al enfocar la luz hacia el sistema de detección. Tercero, la luz ya no es emitida desde una fuente lineal tal como un hilo; en su lugar es emitida desde el fondo plano del pozo.

Desde una perspectiva de la óptica, el objetivo del diseño es el desarrollar una cámara de diagnóstico *in vitro* que permita a la luz emitida por múltiples alergenitos colocados dentro de ella ser recolectada eficientemente a la vez que se obtiene el mínimo de entrecruzamiento de la luz de estos múltiples alergenitos. El sistema de detección que detecta la emisión de luz opera (como por barrido) a lo largo de una línea que recolecta la luz que penetra en la apertura de entrada dentro de un rango angular dado. En un dispositivo de detección que utiliza el anterior estado del arte descrito aquí, el alineamiento de la óptica de detección (hace las lecturas al realizar un barrido) colecta la luz de un solo alergen ubicado en un sitio en particular a lo largo de la línea de barrido. Esencialmente, debido al requerimiento de que sea compatible con los equipos de detección existentes, parte de la geometría de la cámara es fijada. Dos partes componen la cámara; un cuerpo principal ópticamente absorbente y la cubierta ópticamente transparente.

El alergen es colocado en pozos espaciados (que pueden estar o no igualmente espaciados) directamente sobre la cubierta transparente. La superficie del pozo típicamente puede ser tratada mediante radiación tal como gamma o ultravioleta. La profundidad de los pozos y la forma de los bordes cónicos son determinados como una solución con el fin de minimizar el entrecruzamiento de luz y maximizar las capacidades de lavado. La parte superior de la cubierta posee una serie de indentaciones entre cada uno de los pozos que no se extienden completamente a lo largo de la pieza. Sobre la parte superior de la cubierta hay una pieza de partición ópticamente opaca la cual tiene ranuras localizadas directamente por encima de cada pozo del alergen. Estas ranuras permiten el paso de la luz, a través de las lentes, hacia el detector. La pieza de partición posee dedos o particiones opacas individuales con rendijas que se extienden hacia las indentaciones en la cubierta con el fin de bloquear el paso de la luz a las áreas de lectura adyacentes.

Sobre la superficie de la cubierta, directamente por encima de los pozos que albergan el alergen, hay una serie de lentes igualmente espaciados. Estos lentes sobresalen de las rendijas en la partición y pueden tener varias formas. Modelando adecuadamente la curvatura de los lentes la cantidad adecuada de luz de cada alergen que es recolectada y detectada por el sistema de detección puede ser optimizada. Los lentes pueden tener un perfil de forma cilíndrica, de forma toroidal o de forma esférica con el fin de optimizar la eficiencia en la recolección de luz.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1A es una vista lateral de la cámara de diagnóstico *in vitro* ensamblada, donde se ilustra de abajo a arriba la parte inferior del cuerpo de la cámara de prueba, el volumen del reactivo común; la parte superior de la cubierta donde se definen los pozos individuales y los lentes; y la partición óptica suprayacente;

la Fig 1B es una vista lateral de la cámara de diagnóstico *in vitro* ensamblada donde se ilustra, de abajo a arriba, la parte inferior del cuerpo de la cámara de prueba, el volumen del reactivo común; el componente transparente superior que define los pozos individuales, los pasos de luz sin los lentes y la partición óptica suprayacente;

ES 2 282 753 T3

la Fig 2 es una representación diagramática agrandada de la acción del paso de flujo desviando un caudal interior de un pozo dentro de la cubierta transparente;

la Fig 3A es una vista en perspectiva del componente inferior de la cámara donde se define la protrusión lineal continua entre la entrada y la salida de la cámara de esta invención;

la Fig 3B es una vista en perspectiva de la cubierta desde el lado del pozo. Se aprecia que para lograr el ensamblaje se requiere una rotación de 180° de la cubierta;

la Fig 3C es una vista en perspectiva de la partición óptica para la superposición de los lentes individuales de cada uno de los pozos de diagnóstico;

la Fig 4A es una vista de planta de la parte inferior del cuerpo de la cámara;

la Fig 4B es una vista lateral de la parte inferior del cuerpo de la cámara;

la Fig 4C es una vista de planta de la parte superior del interior del cuerpo de la cámara;

la Fig 4D es una sección extrema elevada de la entrada a la cámara en la parte inferior del cuerpo de la cámara;

la Fig 4E es una vista de planta de la entrada a la cámara en la parte inferior del cuerpo de la cámara;

la Fig 5A es una vista de planta de la cubierta que incorpora las lentes cilíndricas;

la Fig 5B es una vista lateral de la cubierta que ilustra la vista lateral de las lentes;

la Fig 5C es una vista de planta de la parte inferior de la placa de la Fig 5A;

la Fig 5D es una vista de planta de la parte superior de la cubierta sin las lentes;

la Fig 5E es una vista lateral de la cubierta sin las lentes;

la Fig 5F es una vista de la parte inferior de la cubierta sin las lentes;

la Fig 6A es una vista de la parte inferior de la partición óptica de la cámara;

la Fig 6B es una vista lateral de la partición óptica del cuerpo de la cámara;

la Fig 6C es una vista de la parte superior de la partición óptica del cuerpo de la cámara y

la Fig 6D es una vista lateral agrandado tomado en la partición óptica.

Descripción de las modalidades específicas

Con relación a la vista de planta de la figura 1A, se puede lograr un entendimiento global de la cámara C ensamblada. La cámara C incluye la parte inferior B que define las protrusiones de flujo P. Como será declarado aquí más adelante, es función de la parte inferior B y de las protrusiones de flujo P el proveer una acción eficiente de limpieza a los pozos individuales W que contienen los reactivos deseados R. Para ayudar a minimizar el traslado de la luz el fondo B se fabrica de un material que absorba luz. Preferimos utilizar un material opaco que absorba luz en contraposición a materiales que de alguna manera la reflejen.

Por encima de la parte inferior B y espaciado del fondo, tal como se muestra en la Fig 1, está el componente transparente o cubierta T. La cubierta T cumple tres funciones principales. La primera, cuando se encuentra invertida con relación a la disposición mostrada en las Fig 1A y 1B, los pozos individuales W reciben el reactivo R. El reactivo R se adhiere al fondo de los pozos W cuando la cubierta T se invierte (ver Fig 2).

Segundo, la cubierta transparente o cubierta T permite que la luz escape del reactivo R en los pozos W una vez se ha completado el proceso de diagnóstico. Tomando como ejemplo el tamizaje de una prueba para alergia, uno o más pozos pueden emitir luz indicando con ello la presencia o ausencia de una reacción alérgica de tipo específico.

Tercero, la cubierta T define las lentes L en la Fig 1A, solamente. Estas lentes L son típicamente cilíndricas, cubren los pozos W y una vez terminada la reacción de diagnóstico permiten escapar del reactivo R un rayo de luz generalmente colimado. En la Fig 1B se muestra una modalidad que no incluye las lentes L.

Finalmente, y ajustando las lentes L, se muestra la pieza opaca S. La pieza opaca S incluye la partición con las ranuras 14 que sobresale de cualquiera de los lados de las lentes individuales L. Es función de la partición opaca con las ranuras 14 el prevenir que la luz de los reactivos R de un pozo W genere un “falso positivo”. Esto puede ocurrir debido a la luz que escapa de un pozo a una lente L situada sobre un pozo W adyacente. El propósito de la pieza opaca

ES 2 282 753 T3

S es también minimizar el que la luz que es emitida lateralmente de un pozo sea interceptada y luego dispersada a un pozo adyacente.

Con relación a las vistas yuxtapuestas de las Figs 3A, 3B y 3C y con atención especial a la Fig 3B, se puede entender fácilmente el ensamble de la cámara de diagnóstico de esta invención. La Fig 3B ilustra la cubierta T del lado que contiene los pozos individuales W, Inicia con el pozo W1 y termina con el pozo W38. En el ejemplo que aquí se muestra los pozos W1, W2 y W3 han sido llenados cada uno con un reactivo R1, R2 y R3. En el curso normal de eventos la cubierta T sería rotada 90° y tendría todos los treinta y ocho pozos llenos, cada uno con un reactivo diferente. Típicamente, cada reactivo sería tratado hasta que ocurra la adherencia al fondo de los pozos W. En el caso usual, esto requeriría solamente secado bajo condiciones controladas. Una vez que ha ocurrido esta adherencia, la cubierta T se regresa de la posición mostrada en la Fig 3B de tal manera que las lentes L (no mostradas) quedan hacia el observador.

El resto del ensamblaje es convencional. La cubierta T se ajusta al fondo B en una estrecha relación de fluidos. Entre la cubierta T y el fondo B se define un volumen de fluidos estrecho entre la entrada I y la salida O. Luego la pieza opaca S se ajusta sobre la cubierta T en las lentes L con la partición opaca con las rendijas 14 dispuestas a cada lado de cada lente L. Resulta así una cámara de diagnóstico C ensamblada.

Se puede describir el uso de la cámara C. Cuando está en uso se llena la cámara C a través de la entrada I, manteniendo abierta la salida O, hasta llenado completo con la muestra - que usualmente es suero para la detección de reacciones alérgicas. Una vez lleno, las muestras R son incubadas durante un intervalo de tiempo suficiente para indicar la presencia y/o ausencia de una reacción.

Un anticuerpo secundario (por ejemplo un anticuerpo conjugado a peroxidasa del rábano - el cual reacciona con luminol) es luego incubado. Luego de esto se lavan los pozos W con una solución salina y son drenados. Este lavado y drenado emplea las protrusiones de flujo P dentro del paso continuo de flujo de reactivos.

Luego de este paso, se introduce un fluido que induce una reacción quimiluminiscente. Esta reacción luminiscente ocurre en los pozos W donde los reactivos R sufren una reacción (ver Fig 2). La cantidad de múltiples agentes biológicos que interactúan con los componentes de enlace del ensayo recubiertos sobre los pozos W se determina notando la presencia y/o ausencia de luz que es emitida de cada uno de los pozos.

Por ejemplo, cuando se tamiza para la presencia de múltiples anticuerpos clase IgE de especificidad alérgica en una muestra líquida, el dispositivo es incubado con la muestra a ensayar y luego, después del lavado, con una solución que contiene los anticuerpos marcados contra los anticuerpos clase IgE que se han enlazado a los pozos. Los pozos son entonces analizados para determinar la presencia de los anticuerpos marcados. Si los anticuerpos marcados se marcan con un trazador radiactivo, tal como ^{125}I , el análisis puede ser realizado empleando un contador gamma. Alternativamente, el análisis se puede realizar colocando el dispositivo adyacente a una película fotográfica, exponiendo esta y luego midiendo el grado de exposición o, más recientemente registrando con un detector de luz ya sea de fibra óptica o de detección directa.

Luego de haber descrito la operación global se puede dirigir la atención a la dinámica del flujo y a la óptica que resulta de esta revelación.

La resistencia media en cizalla, τ , a lo largo de las paredes de la cavidad del pozo fue optimizada. Este esfuerzo en cizalla representa una medida de la fuerza que la solución de lavado sería capaz de ejercer sobre las partículas fluidas del reactivo o suero que se encuentran a lo largo del fondo de los pozos W.

Con relación a la Fig 2, se construyeron modelos por computador de las configuraciones alternativas y estas fueron usadas para obtener el patrón de flujo con la cámara de prueba. La modalidad preferida resultante de estas pruebas se muestra en la Fig 2.

La magnitud del esfuerzo en cizalla resultante, promediada a lo largo de la pared de la cavidad, fue calculada y normalizada con relación al caso base. En ausencia de protuberancias sobre la pared inferior del canal el flujo medio de "alta velocidad" en el canal principal solamente indujo, como resultado del cizallamiento (o fricción) entre las capas, un flujo dentro de la cavidad. Este flujo es típicamente mucho menor que el flujo en el canal principal. El flujo más eficiente, en términos de cizalla de pared, ocurre a un factor de forma (profundidad a anchura) de aproximadamente 0,5. Si la cavidad es muy profunda entonces el flujo inducido se hace muy débil en el área adyacente a la pared superior de la cavidad. Si la cavidad es demasiado panda, impide el establecimiento de un patrón de flujo bien organizado y el cizallamiento de pared resultante empieza a caer (note la caída en τ a medida que disminuye la profundidad de la cavidad).

El diseño preferido para la configuración pozo/protrusión se puede ver en las Figs. 1A y 1B. La Fig 2 muestra un modelo de flujo real que ilustra el flujo del fluido a través de la cavidad de la Fig 4. Mientras que, las dimensiones normalmente no son importantes para la invención, el diseño de la cámara de flujo tiene aquí importancia.

Con referencia a las Figs 1A y 1B, la profundidad del canal de flujo es 0,011 pulgadas. El canal se inclina en un ángulo de 27,4° hacia arriba y hacia abajo. El canal varía en elevación 0,020 pulgadas. Cuando se le ve en planta el canal tiene una anchura aproximada de 0,157 pulgadas. La protrusión está centrada con respecto al pozo W. El volumen total para el llenado de la cavidad de flujo es del orden de 270 μl .

En resumen, la geometría de la configuración seleccionada ha sido determinada basada en numerosas iteraciones que permitieron el mejoramiento continuo del concepto de diseño. La forma básica de la cavidad fue cambiada de un rectángulo a la porción superior de un trapecoide.

5 Adicionalmente, las paredes de la cavidad facilitan más el drenaje del dispositivo.

10 Asumiendo que se usa una lente como la mostrada en la Fig 1A, la óptica a través de las lentes L tiene que permitir el paso de cantidades relativamente bajas de luz a cualquier sistema de detección en particular utilizado con el dispositivo. Igualmente se tiene que prevenir el paso de luz entre un pozo W en el que se ha efectuado una reacción y uno adyacente en el que esta reacción no ha ocurrido. Hemos descubierto que la combinación de las lentes cilíndricas L con el fondo plano de los pozos W produce una salida relativamente colimada de la luz proveniente de la reacción. Al fabricar el fondo B y la pieza opaca S con plástico opaco y absorbente de la luz emitida (que indica la presencia o ausencia de la reacción) se minimiza la contaminación cruzada de luz.

15 Se entenderá que la óptica revelada en combinación con el pozo W representa un compromiso cuidadoso que en gran medida ha sido determinado empíricamente.

20 Se ha hecho énfasis en que, debido al tamaño y volumen relativamente pequeños del dispositivo, las dimensiones son importantes. Consecuentemente suministramos como parte de la revelación los dibujos de producción ahora preferidos relacionados con el dispositivo actual. Las Figs. 4A-E ilustran el fondo opaco. Las Figs. 5A-5C ilustran la cubierta T con las lentes cilíndricas incorporadas al diseño. Las Figs. 6A-6D ilustran la partición óptica. Todo esto se suministra de tal manera que se pueda entender la dimensionalidad real de esta invención.

25 Contemplamos el uso de todos los diferentes marcadores para la detección de las reacciones. Mientras que nos hemos referido a las reacciones del ^{125}I y de quimiluminiscencia, otras formas de marcación pueden también ser empleadas. Por ejemplo, se pueden usar reacciones mejoradas de colorimetría. Más aún, mientras que nosotros describimos una reacción alérgica como utilización primaria del dispositivo, otros tipos de reacciones pueden ser usadas también. Estos otros tipos de reacciones pueden incluir la detección de marcadores para el cáncer, enfermedades infecciosas, autoinmunes, hormonas y drogas de abuso.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cámara cubierta para uso en un sistema para el tamizaje de una muestra líquida a través de ensayos de enlace. La cámara cubierta incluye una entrada y una salida. La cámara cubierta adicionalmente incluye:
un componente (T) que define en un interior suyo una pluralidad de pozos que tienen cada uno un fondo para la recepción de un reactivo;
un fondo (B) para albergar la pluralidad de pozos y definir, entre la entrada y la salida, un paso de flujo que conecta la pluralidad de pozos con el paso de flujo del reactivo común entre la entrada y la salida; y
el fondo que define, para cada uno de los múltiples pozos, un componente de división de flujos que define una superficie continua. La superficie continua sobresale de y hacia cada uno de los múltiples pozos para la deflexión del fluido que fluye desde la entrada a la salida y hacia el interior de la pluralidad de pozos con el fin de permitir el lavado de los fluidos provenientes de la pluralidad de pozos.
- 10 2. Una cámara de acuerdo a la Reivindicación 1, donde la profundidad del pozo desde la superficie superior es de 0,51 cm (0,2 pulgadas).
- 20 3. Una cámara de acuerdo a la Reivindicación 1 ó 2, donde el paso de flujo del reactivo común contiene menos de 300 microlitros.
- 25 4. Una cámara de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el componente divisor de flujo está centrado con respecto al pozo.
5. Una cámara de acuerdo a cualquiera de las anteriores reivindicaciones donde los pozos sean tratados con radiación para la retención de alergen/antígeno/reactivo colocados en el pozo.
- 30 6. Una cámara de acuerdo a cualquiera de las anteriores reivindicaciones donde el componente que define en el interior una pluralidad de pozos es transparente.
- 35 7. Una cámara de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-5 donde el componente que define un interior de una pluralidad de pozos define una lente sobre cada uno de los pozos con el fin de emitir la luz emitida de un reactivo en los pozos.
8. Una cámara de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde cada uno de una pluralidad de pozos incluye un fondo plano.
- 40 9. Una cámara de acuerdo a cualquiera de las anteriores reivindicaciones donde en cada uno de una pluralidad de pozos incluye lados que definen ángulos obtusos desde y hacia el paso del flujo del reactivo común desde la entrada hasta la salida.
10. Una cámara de acuerdo a cualquiera de las anteriores reivindicaciones donde cada uno de los pozos contiene recubierta una sustancia escogida entre un grupo que consiste de un alergen, un antígeno y un reactivo.
- 45 11. Una cámara de acuerdo a cualquiera de las anteriores reivindicaciones donde el paso del flujo del reactivo común desde la entrada hasta la salida conecta en forma serial la pluralidad de pozos.
- 50 12. Un proceso de tamizaje de una muestra líquida a través de una serie de ensayos de enlace entre la entrada y salida de una cámara encerrada. El proceso incluye los siguientes pasos:
suministro de un componente que define en el interior una pluralidad de pozos cada uno con un fondo para la recepción de un reactivo;
55 depósito y adherencia de diferentes reactivos en los diferentes pozos;
provisión de al menos una lente en cada pozo para la emisión al exterior del componente transparente de la luz proveniente de las reacciones que ocurren dentro de los pozos;
60 provisión de un fondo para albergar la pluralidad de pozos y definir la entrada, la salida y un paso de flujo entre la entrada y salida que conecta la pluralidad de pozos con el paso de flujo del reactivo común;
definición de un miembro divisor de flujo para cada uno de la pluralidad de pozos el cual define una superficie continua. La superficie continua sobresale desde y hacia uno entre la pluralidad de pozos con el fin de desviar el fluido que fluye entre la entrada y la salida hacia un interior de la pluralidad de pozos para permitir que los fluidos
65 entren en contacto con los reactivos dentro de los pozos;

ES 2 282 753 T3

hacer pasar un reactivo fluido desde la entrada hasta la salida para que fluya a lo largo del paso del flujo de reactivos y reaccione con los reactivos en la pluralidad de pozos; luego lavar el reactivo fluido en los pozos haciendo pasar líquido de lavado desde la entrada hasta la salida sobre las superficies continuas para permitir el lavado de los reactivos en la pluralidad de pozos individuales; y entonces

5

hacer pasar un indicador de reacción a través del paso encapsulado desde la entrada hasta la salida. El indicador indica la presencia y/o ausencia de reacción entre el analito y el reactivo en el pozo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65











