



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 890**

51 Int. Cl.:
G01N 21/03 (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01941435 .8**
96 Fecha de presentación : **25.06.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1303746**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

54 Título: **Procedimiento y cubeta de análisis.**

30 Prioridad: **28.06.2000 SE 2000102443**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2009

73 Titular/es: **Migrata U.K. Limited**
P.O. Box 4425
Limassol, CY

72 Inventor/es: **Lilja, Jan;**
Nilsson, Sven-Erik;
Svensson, Johnny y
Eriksson, Annika

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 322 890 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

Procedimiento y cubeta de análisis.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de análisis y a una cubeta para la realización de este análisis. Concretamente la invención se refiere a un procedimiento para la determinación de hemoglobina en sangre entera no diluida y a una cubeta desechable que puede utilizarse en dicha determinación.

10 Antecedentes de la invención

Con anterioridad se conoce de la patente estadounidense US nº 4.088.448 una cubeta desechable para tomar muestras de un líquido, mezclar la muestra con un reactivo y directamente realizar un análisis óptico de la muestra mezclada. Esta cubeta ya conocida presenta varias ventajas ya que, entre otras cosas, simplifica el procedimiento de tomar muestras, reduce el número de utensilios y mejora de forma considerable la precisión del análisis llevando a cabo el procedimiento de análisis independientemente de la técnica de operación del operario que lleva a cabo el análisis. Se describe una construcción de una cubeta basada en el mismo principio y con características de flujo mejoradas en la patente estadounidense US 5 674 457.

Actualmente se utiliza extensamente una cubeta desechable desarrollada según estas patentes para la medición de la hemoglobina (determinación de Hb) de la sangre entera no diluida. Con este fin, la cavidad de la cubeta ha sido tratada previamente con un reactivo, de manera que cuando entra una muestra de sangre en la cubeta, las paredes de los glóbulos rojos se desintegran y se inicia una reacción química. El resultado de la reacción permite la determinación de Hb mediante medición por absorción directamente a través de las paredes transparentes de la cubeta que, en la zona de medición, también denominada ventana óptica, tiene una distancia predeterminada y definida con precisión entre las superficies interiores de las paredes planas opuestas. El procedimiento de medición está basado en un procedimiento modificado de azidmetahemoglobina según Vanzetti, G., Am. J. Lab. & Clin. Med. 67, 116 (1966).

Las mediciones espectrofotométricas se han realizado a 570 nm y 880 nm. Este procedimiento de medición cuantitativa basado en la química seca ha tenido un éxito considerable como puede verse en, por ejemplo, el artículo de von Schenck *et al.* en *Clinical Chemistry*, vol 32, No 3, 1986 ya que el procedimiento proporciona unos resultados iguales e incluso mejores comparándolos con los resultados obtenidos con procedimientos estándares húmedos para la determinación de Hb. El reactivo utilizado está compuesto por desoxicolato de sodio que hemoliza los glóbulos rojos, azida sódica y nitrito sódico, que convierte la hemoglobina en azidmetahemoglobina.

Debido a las propiedades higroscópicas de los reactivos utilizados, la durabilidad es limitada y es necesario almacenar las cubetas en paquetes precintados que incluyen un agente secante. Incluso más problemático es el hecho de que, en climas con una alta humedad, la cubeta debe utilizarse en el transcurso de unos pocos minutos tras haber sido retirada del paquete, ya que de lo contrario los reactivos resultarán destruidos y la medición será imprecisa y por lo tanto no tendrá utilidad alguna.

45 Objetivos de la invención

Es un propósito de la presente invención proporcionar un procedimiento rápido y cuantitativo para la determinación de hemoglobina en sangre entera.

Un segundo propósito es proporcionar un procedimiento para la determinación de hemoglobina en sangre entera, que puede llevarse a cabo en una microcubeta desechable.

Un tercer propósito es proporcionar una microcubeta para la determinación de la hemoglobina en sangre entera no diluida en cuyo procedimiento quedan eliminados los problemas originados a partir de las propiedades higroscópicas de los reactivos.

Otros objetivos quedarán aparentes a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones que la acompañan.

Sumario de la invención

60 La presente invención es definida por las reivindicaciones anexas.

Por lo tanto se ha descubierto de forma inesperada que las determinaciones cuantitativas de la hemoglobina pueden llevarse a cabo sin los reactivos químicos azida sódica y nitrito sódico anteriormente indicados. Más concretamente, se ha descubierto que las determinaciones cuantitativas puede llevarse a cabo directamente sobre la sangre hemolizada a condición de que se seleccione un agente hemolizante adecuado o una mezcla de los mismos.

De acuerdo con la presente invención se ha descubierto de tal manera que los reactivos higroscópicos pueden ser eliminados. Además, se ha descubierto que el tiempo para obtener la determinación analítica se podría reducir. Como

los análisis se llevan a cabo en grandes cantidades, es decir, en hospitales y en bancos de sangre, la característica de la duración es importante.

Descripción detallada de la invención

5

La microcubeta desechable utilizada según la presente invención puede ser del tipo descrito en la patente estadounidense US 4 088 488 o preferentemente en la patente estadounidense US 5 674 457. Puede definirse como un cuerpo unitario que incluye por lo menos una cavidad con una ventana óptica (zona de medición) en la que se sitúan dos superficies planas o curvas de cara a la cavidad a una distancia predeterminada entre las dos y de esa manera definir una longitud de trayectoria óptica predeterminada. Esta distancia entre las superficies que definen la zona de medición es un parámetro crítico en proporcionar la longitud de trayectoria óptica adecuada para la medición de la hemoglobina y en una forma de realización preferente, esta distancia es de entre 0,05 mm y 0,2 mm. La distancia entre las superficies interiores del resto de la cavidad es preferentemente del orden de entre 0,1 mm y 2 mm, lo que es efectivo para permitir la entrada de la muestra en la cavidad por fuerza capilar a través de la entrada de la cavidad, que está en comunicación con el exterior del cuerpo. Además, la cavidad tiene un volumen fijo predeterminado inferior a aproximadamente 25 μ l. La superficie de la cavidad está recubierta con un agente hemolizante seco. El agente hemolizante se encuentra preferentemente presente en una cantidad superior a la cantidad requerida para la reacción de hemolización. No se necesitan más aditivos para la determinación según el procedimiento de la invención.

10

15

20

Las cubetas según la presente invención pueden formarse mediante cualquier material adecuado, que permita la formación de los niveles de tolerancia restringida necesarios. Preferentemente, la cubeta se fabrica mediante moldeo por inyección de un material polimérico transparente.

25

Una característica crítica de la presente invención es el agente hemolizante. Concretamente, este agente debería ser esencialmente no higroscópico y fácilmente soluble en agua o más exactamente sangre entera no diluida. Además, como es importante que el procedimiento ofrezca resultados reproducibles, este agente debería tener preferentemente una estructura química bien definida. Como el agente hemolizante se introduce preferentemente en la cavidad de la cubeta como una solución, que es posteriormente cuidadosamente secada mediante el uso de calor, también es adecuado que el agente hemolizante sea fácilmente soluble en solventes orgánicos que no destruyan el agente hemolizante y que puedan evaporarse con facilidad a bajas temperaturas. Por lo tanto resulta preferente que el agente hemolizante sea fácilmente soluble en alcoholes, como el metanol.

30

35

Otro aspecto importante al seleccionar el agente hemolizante es que este agente en su forma seca, que está presente en la microcubeta lista para usar, permita una introducción rápida e uniforme de la sangre entera a la cubeta. En particular, el periodo de tiempo para la introducción de la sangre entera a la microcubeta debería ser inferior al periodo de tiempo requerido por esta sangre para disolver el agente hemolizante en la microcubeta.

40

Un grupo particularmente preferente de agentes hemolizantes es el de las sustancias tensioactivas iónicas y no iónicas con propiedades hemolizantes. Ejemplos de dichas sustancias son las sales de amonio cuaternario seleccionadas de entre el grupo de la sales de alquil trietilamonio, sales de alquildimetilbencilamonio, y sales de alquilpiridio que consisten en: bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB), cloruro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridio y otras sales de amonio cuaternario, lauril sulfato sódico, y sales de ácido desoxicólico. En particular, agentes hemolizantes adecuados a utilizar según la invención son desoxicolato de sodio, desoxicolato de potasio, desoxicolato de calcio, desoxicolato de morfolina, desoxicolato de ciclohexilamonio y desoxicolato de amonio o combinaciones de los mismos. El agente hemolizante más preferente en la actualidad que cumple con el requisito de proporcionar una determinación rápida y cuantitativa de la hemoglobina es una combinación de desoxicolato de sodio y desoxicolato de amonio. La cantidad de desoxicolato de amonio es preferentemente de entre el 20% y el 80% en peso de esta combinación.

45

50

Durante los experimentos resultaron en la presente invención se descubrió que tal vez el grupo de agentes más comúnmente utilizado para la hemolización de la sangre, es decir, las saponinas que son productos naturales extensamente distribuidos por plantas y que son mezclas de diferentes estructuras químicas, no proporcionan resultados reproducibles en el procedimiento de la invención. Las saponinas son unos agentes hemolizantes potentes incluso a concentraciones muy bajas.

55

60

Una característica crítica del procedimiento de la invención y una diferencia importante comparado con el procedimiento conocido y actualmente utilizado comercialmente para la determinación de Hb en microcubetas, es también que la medición por absorción debe llevarse a cabo a otra longitud de onda. De esta manera, se ha descubierto que la determinación por absorción debería llevarse a cabo en un intervalo de entre 490 nm y 520 nm, preferentemente de entre 500 nm y 510 nm. La medición por absorción secundaria compensatoria se lleva preferentemente a cabo en el intervalo de entre 850 nm y 910 nm, preferentemente de entre 860 nm y 900 nm.

65

Las mediciones para la determinación de la sangre a estas longitudes de onda se describen en la patente estadounidense US 5 064 282. De acuerdo con esta patente la medición se lleva a cabo en una cubeta reutilizable, que contiene sangre que ha sido anteriormente hemolizada con saponina. En particular este procedimiento implica la colocación de una gota de sangre en una placa de vidrio, agitar la sangre hasta que quede translúcida con un bastoncillo que contiene saponina e introducir la sangre hemolizada en la cubeta.

ES 2 322 890 T3

En lo que respecta a la potencial alteración de la determinación debida a la presencia de metahemoglobina según la presente invención se aprecia que se puede producir tal alteración en pacientes con una anomalía enzimática congénita poco frecuente, en algunas variantes poco frecuentes de la hemoglobina normal y tras la exposición a determinados fármacos y químicos, como la fenacetina, los nitratos, las quinonas, el clorato. Tal vez en estos casos habrá una cantidad de metahemoglobina en la sangre de entre el 10% y el 20%, pero cuando suceden resultará lo suficientemente obvio clínicamente para indicar la necesidad de utilizar el procedimiento con azida, es decir, el procedimiento actual en las microcubetas, o en su lugar, el procedimiento de hemoglobincianuro (un procedimiento de referencia del ICSH). En este contexto, hay que añadir que este problema, en caso de haberlo, también se da con el procedimiento tradicional y universalmente aceptado que utiliza la oxihemoglobina. También elevadas concentraciones de carboxihemoglobina en personas que fuman mucho y las sulfohemoglobina pueden causar alteraciones.

Se pueden obtener fotómetros adecuados para la realización de estas mediciones modificando fotómetros existentes con filtros adecuados y diodos emisores de luz (LED). Según una forma de realización preferente de la invención un fotómetro mide la absorbancia que hay en las dos longitudes de onda y un embebido microprocesador calcula, de acuerdo con un algoritmo programado, la concentración total de hemoglobina en sangre.

El siguiente ejemplo no limitativo ilustra el procedimiento de la invención.

Se disolvió un agente hemolizante que consta de partes iguales de desoxicolato de sodio y de amonio en metanol y se introdujo el mismo en una microcubeta desechable de una construcción como la anteriormente indicada. A continuación se evaporó el metanol.

En una comparación entre el procedimiento de la invención llevado a cabo en microcubetas que contenían únicamente la mezcla seca de desoxicolato de sodio y de amonio y el procedimiento de determinación de hemoglobina en las conocidas y utilizadas actualmente microcubetas HemoCue[®] que contienen el reactivo de nitrito sódico/azida sódica así como desoxicolato de sodio, se descubrió que el periodo de tiempo para hemolizar la sangre era de aproximadamente 15 segundos menos utilizando el agente hemolizante preferente según la presente invención. En particular el periodo para hemolizar la sangre presente en la microcubeta debería ser inferior a 40 segundos. Esto permite una reducción adicional de hasta el 25% del tiempo total para la determinación de la hemoglobina lo que puede resultar ventajoso en hospitales con una gran tasa de ocupación y en otras situaciones en las se llevan a cabo muchas determinaciones.

En una correspondiente comparación que refiere a la estabilidad con respecto a la humedad, se descubrió que la estabilidad de las microcubetas que incluían la mezcla de desoxicolato anteriormente indicada era de 24 horas en una atmósfera de 45°C y humedad relativa del 80%, lo que debería compararse con aproximadamente 2 minutos para las microcubetas HemoCue[®] comercialmente disponibles en las mismas condiciones.

Una evaluación del nuevo procedimiento con esta mezcla hemolizante (y sin ningún otro químico) en comparación con el procedimiento estándar del ICSH se describe en la figura 1. La evaluación fue llevada a cabo en condiciones de laboratorio. Como puede observarse la concordancia entre los procedimientos es muy buena.

Las mediciones por absorción espectrofotométrica fueron llevadas a cabo a aproximadamente 570 nm para el procedimiento conocido y a aproximadamente 505 nm para el nuevo procedimiento. Para ambos procedimientos se realizaron mediciones compensatorias a 880 nm.

Lo anteriormente indicado ha sido una descripción de una forma de realización preferente determinada de la presente invención, pero no pretende en modo alguno ser limitativo de la invención. Al contrario, pueden llevarse a cabo muchas modificaciones, variaciones y cambios de detalle dentro del alcance de la presente invención.

50 **Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solamente para conveniencia del lector. La misma no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha tenido mucho cuidado durante la recopilación de las referencias, no deben excluirse errores u omisiones y a este respecto la OEP se exime de toda responsabilidad.

60 **Documentos de patente citados en la descripción**

- US 4088448 A
- US 5064282 A
- US 5674457 A

65 **Literatura (no patentes) citada en la descripción**

- VANZETTI, G. *Am. J. Lab. & Clin. Med.*, 1966, vol. 67, 116
- SCHENCK *et al. Clinical Chemistry*, 1986, vol. 32 (3)

ES 2 322 890 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de determinación cuantitativa de hemoglobina en sangre entera no diluida que consta de las siguientes etapas:

10 Introducir una muestra de sangre entera no diluida mediante acción capilar en una microcubeta desechable que presenta por lo menos una cavidad para recibir la muestra, incluyendo la cavidad un agente hemolizante esencialmente no higroscópico, seleccionado de entre el grupo que consiste en sustancias tensioactivas iónicas y no-iónicas, en una forma seca, en la que se disuelve el agente hemolizante, se hemolizan los glóbulos rojos y se libera la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos;

15 Llevar a cabo una primera medición por absorción a una longitud de onda en el intervalo de entre 490 nm y 520 nm directamente sobre la muestra hemolizada en la cubeta; y

Adicionalmente llevar a cabo una segunda medición por absorción a una longitud de onda en el intervalo de entre 850 nm y 910 nm para compensar las interferencias de fondo, en la que el periodo de hemolización de dicha sangre entera no diluida es inferior a 40 segundos.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que el agente hemolizante es soluble en solventes orgánicos.

3. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que el solvente orgánico es un alcohol como, por ejemplo, metanol.

25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el tiempo para la introducción de la sangre entera en la microcubeta es menor que el tiempo requerido para disolver el agente hemolizante.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el agente hemolizante se selecciona de entre el grupo que consiste en sales de ácido desoxicólico y sales de amonio cuaternario.

30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el agente hemolizante se selecciona de entre el grupo que consiste en desoxicolato de sodio, desoxicolato de potasio, desoxicolato de calcio, desoxicolato de morfina, desoxicolato de ciclohexilamonio y desoxicolato de amonio o combinaciones de los mismos.

35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el agente hemolizante esencialmente consiste en una mezcla de desoxicolato de sodio y desoxicolato de amonio.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 en el que la cantidad de desoxicolato de amonio es de entre el 20 por ciento y el 80 por ciento en peso.

40 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la primera medición por absorción se lleva a cabo en el intervalo de entre 500 nm y 510 nm.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la segunda medición por absorción se lleva a cabo en el intervalo de entre 860 nm y 900 nm.

45 11. Microcubeta desechable que presenta por lo menos una cavidad para la determinación espectrofotométrica de la hemoglobina en sangre entera no diluida, **caracterizada** porque la cavidad incluye un agente hemolizante seco, no higroscópico, a condición de que la cavidad esté básicamente libre de azida y de nitrito, y de cualquier otro aditivo, en la que el agente hemolizante se adapta para hemolizar sangre entera no diluida en menos de 40 segundos.

50 12. Microcubeta según la reivindicación 11 **caracterizada** porque el agente hemolizante es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

FIGURA 1

