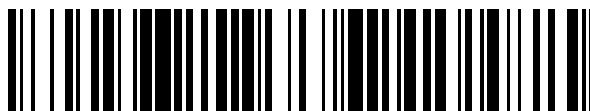


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 753**

51 Int. Cl.:
G01N 33/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05813040 .2**
96 Fecha de presentación: **25.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1825255**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **DISOLUCIÓN PARA CALIBRAR UN ANALIZADOR QUÍMICO PARA ENSAYOS DE ALCOHOL, CARBONATO Y AMONÍACO.**

30 Prioridad:
02.11.2004 US 979664

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2011

73 Titular/es:
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
1717 DEERFIELD ROAD
DEERFIELD, IL 60015, US**

72 Inventor/es:
CLARK, Douglas, Paul

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 370 753 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

Disolución para calibrar un analizador químico para ensayos de alcohol, carbonato y amoníaco

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a disoluciones normalizadas que contienen estabilizadores y analitos ajustados a niveles específicos para la calibración de analizadores químicos. En particular, esta invención se refiere a una disolución patrón estabilizada de base acuosa para la calibración de ensayos clínicos para evaluar niveles de dióxido de carbono total, amoníaco y alcohol, en sangre.

15 Descripción de la técnica relacionada

15 Generalmente, los analizadores bioquímicos automatizados emplean una combinación de reactivos químicos específicos de analito y medios de monitorización de reacción para someter a ensayo o determinar la presencia o concentración de una sustancia o analito específicos dentro de una muestra líquida que se sospecha que contiene ese analito particular. Tales analizadores son muy conocidos y emplean de manera casi universal algún tipo de
20 curva de calibración para determinar la concentración de analito a partir de la señal generada por los medios de monitorización de reacción en respuesta a la presencia del analito.

25 Es una práctica habitual dentro de la industria de análisis bioquímico establecer una curva de calibración completa para un analizador químico usando múltiples disoluciones de calibración o calibradores que se han preparado cuidadosamente con concentraciones predeterminadas y conocidas de analito. Estas disoluciones patrón o de calibración se someten a ensayo una o más veces y se representan gráficamente las señales de reacción
30 resultantes medias frente a sus respectivas concentraciones de analito conocidas. Se produce entonces una curva de calibración continua usando cualquiera de varias técnicas matemáticas elegidas para producir una reproducción precisa de la relación entre una señal de reacción y la concentración de analito. La forma de la curva de calibración se ve afectada por una interacción compleja entre reactivos, analitos y el diseño electromecánico del analizador. Por tanto, incluso si se conoce la reacción teórica analito-reactivo, generalmente es necesario emplear técnicas matemáticas para obtener una curva de calibración aceptable. Para mayor precisión, las curvas de calibración se establecen en intervalos regulares, para compensar particularidades de los reactivos, y en analizadores individuales, para compensar el rendimiento del equipo. El intervalo de concentraciones de analito usados al establecer una curva
35 de calibración completa se elige normalmente para extenderse por debajo y más allá del intervalo de concentraciones de analito que se espera que se encuentren dentro de muestras biológicas como sangre, suero, plasma, orina y similares.

40 Puesto que los procedimientos clínicos analíticos se diseñan normalmente para analizar muestras de suero, las disoluciones de calibración pueden formularse usando una matriz que es idéntica a o equivalente de manera bioactiva al suero. Normalmente, se ha usado el suero humano como material de partida para disoluciones de calibración; sin embargo, las técnicas usadas para eliminar productos químicos interferentes producen a menudo artefactos de proceso y amplias variaciones de lote a lote haciendo que sea difícil fabricar estas disoluciones de
45 manera reproducible. Una desventaja adicional de las disoluciones de calibración que contienen suero humano es que no pueden almacenarse durante periodos más prolongados puesto que el suero contiene muchos componentes lábiles que afectan negativamente a la estabilidad del producto. Por este motivo, los materiales de calibración se proporcionan a menudo en un estado seco (liofilizado); sin embargo, la rehidratación errónea de estos materiales conduce comúnmente a medidas de calibración erróneas. Por estos motivos, es sumamente ventajoso que las disoluciones de calibración se preparen usando una disolución tamponada o acuosa como matriz base.

50 La patente estadounidense n.º 3.960.497 da a conocer los conceptos básicos de calibración y verificación de la calibración de un analizador químico usando disoluciones patrón que tienen valores conocidos de la característica particular que está midiéndose.

55 La patente estadounidense n.º 4.843.013 da a conocer un patrón de control líquido sintético que comprende una disolución acuosa y varias fracciones de hemoglobina, y sales de sodio, potasio, litio y calcio.

60 La patente estadounidense n.º 5.342.788 da a conocer una disolución patrón libre de suero que contiene TBG, albúmina y tampón. Cuando se añade T4 o T3 a la disolución, se establece un equilibrio entre la hormona unida y libre que se parece al observado en el suero humano. Se dice que la estabilidad de la disolución patrón sintética es superior a una disolución basada en suero humano y además, la TBG bovina ofreció una estabilidad superior que la TBG derivada del suero humano.

65 La patente estadounidense n.º 5.518.929 da a conocer disoluciones acuosas que contienen tampones y electrolitos ajustados para la calibración y el control de calidad de ambos gases sanguíneos tales como dióxido de carbono y oxígeno, usando electrodos selectivos de iones.

La patente estadounidense n.º 5.795.789 da a conocer una disolución patrón estabilizada para la calibración de ensayos clínicos útil en la evaluación de la función tiroidea, incluyendo tiroxina total, tiroxina no unida, triyodotironina total, triyodotironina no unida y hormona estimulante de la tiroides.

Para ampliar la cantidad de tiempo que una disolución de calibración líquida puede usarse con precisión para calibrar un analizador, se añaden estabilizadores y conservantes a la disolución para ampliar la vida útil de un calibrador reduciendo la degradación del analito y garantizando que no haya contaminantes. En consecuencia, se encuentra que los requisitos exigidos a un químico de formulación para producir una combinación de matriz, analito, estabilizadores y conservantes que sean compatibles con el sistema analítico, que puede contener las concentraciones deseadas de todos los analitos deseados, y que al mismo tiempo puedan mantener estabilidad son bastante restrictivos. Estos requisitos constituyen particularmente un reto en el caso de que un analito en una disolución de calibración de múltiples analitos sea básico y otro analito sea ácido. En tal caso, se ha enseñado a los expertos en la técnica que los analitos básicos y ácidos reaccionarían rápidamente entre sí para formar agua y una sal y por tanto se esperaba que un calibrador que contenga analitos básicos y ácidos tenga una vida útil muy corta. Como resultado de tal enseñanza, se han requerido anteriormente al menos dos disoluciones de calibración diferentes para soportar protocolos de calibración para los analitos ácidos, alcohol y carbonato o carbono total, y para el analito básico, amoníaco. Esto impone gastos de producción no deseados por el fabricante así como gastos de manipulación y compra aumentados por el laboratorio clínico.

Por consiguiente, sigue habiendo una necesidad de una única disolución de calibración que contiene cantidades conocidas de los analitos alcohol, carbonato y amoníaco para aumentar la flexibilidad en su uso así como reducir todos los gastos. Sin embargo, tradicionalmente se espera en la técnica que la combinación de analitos básicos y ácidos afectaría inherente y adversamente a la estabilidad de la disolución de calibración. Se conoce que los carbonatos en particular se descomponen inmediatamente por ácidos. Normalmente, las disoluciones básicas requieren un intervalo de pH mayor que aproximadamente $\text{pH} = 8$ para que sean estables y las disoluciones ácidas un intervalo de pH menor que aproximadamente $\text{pH} = 5$ para que sean estables. A pesar de las enseñanzas de la técnica, es un objeto de la presente invención proporcionar una única disolución de calibración estabilizada que tiene cantidades conocidas de alcohol ácido, carbonato ácido y amoníaco básico de modo que las ventajas de tener una disolución de calibración de múltiples analitos pueda realizarse durante un periodo de tiempo prolongado.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que puede establecerse un intervalo de pH en una única disolución patrón o de calibración líquida formulada simultáneamente con cantidades específicas de alcohol (EtOH) en sangre, carbonato (CO_2) en suero total y amoníaco (NH_4) en sangre. De manera inesperada, se ha descubierto que la presencia de analitos básicos y ácidos no tiene ningún efecto adverso sobre la utilidad de la disolución de calibración en la medición de los analitos o sobre la estabilidad de la disolución en su totalidad. Además, puede lograrse un periodo de uso prolongado o una estabilidad de la disolución de calibración incluyendo una combinación de agentes antimicrobianos que se ha demostrado que son activos frente a bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, hongos formadores de esporas y hongos no formadores de esporas sin que afecte de manera adversa a la utilidad de la disolución de calibración.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de la misma tomada en conexión con los dibujos adjuntos que forman una parte de esta solicitud y en la que:

la figura 1 es una ilustración de estabilidad de amoníaco en el calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención;

la figura 2 es una ilustración de estabilidad de alcohol en el calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención;

la figura 3 es una ilustración de estabilidad de carbonato en el calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención;

la figura 4 es una primera ilustración de inestabilidad de amoníaco en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco fuera del intervalo de pH aceptable de la presente invención;

la figura 5 es una segunda ilustración de inestabilidad de amoníaco en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco fuera del intervalo de pH aceptable de la presente invención;

la figura 6 es una tercera ilustración de inestabilidad de amoníaco en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco fuera del intervalo de pH aceptable de la presente invención;

la figura 7 es una ilustración de estabilidad de alcohol en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención con conservantes en el mismo;

5 la figura 7A es una ilustración de estabilidad de alcohol en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención sin conservantes en el mismo;

la figura 8 es una ilustración de estabilidad de carbonato en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención con conservantes en el mismo;

10 la figura 8A es una ilustración de estabilidad de carbonato en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención sin conservantes en el mismo;

la figura 9 es una ilustración de estabilidad de amoníaco en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención con conservantes en el mismo; y,

15 la figura 9A es una ilustración de estabilidad de amoníaco en un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención sin conservantes en el mismo.

20 Descripción detallada de la invención

Importantes ensayos clínicos incluyen alcohol, carbonato y amoníaco en sangre. Las primeras culturas sociales aprendieron que las frutas y los granos fermentados producían un brebaje que contenía etanol o alcohol que producía una sensación de bienestar. Además, se han usado medicinas que contienen etanol para el tratamiento de múltiples enfermedades. Sin embargo, el consumo en exceso de alcohol afecta a aquellas partes del cerebro responsables de las funciones corporales más altamente integradas. Habitualmente se mide el alcohol en sangre por motivos médico-legales para determinar si una persona está en estado de embriaguez o en el diagnóstico de coma en el que el alcohol pueda ser la única o una causa contribuyente.

30 La medición del CO₂ en suero total es útil al determinar el estado ácido-base de un paciente. La concentración de CO₂ total se reduce enormemente en la acidosis metabólica que resulta de muchas enfermedades diferentes, tales como insuficiencia renal, envenenamiento, cetoacidosis diabética (CAD) y choque. La concentración de CO₂ total se aumenta levemente en la acidosis respiratoria que proviene como consecuencia de cualquier enfermedad pulmonar que impide la eliminación de dióxido de carbono. Las enfermedades pulmonares comunes que conducen a acidosis respiratoria incluyen: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, síndrome de hipoventilación por obesidad, fatiga excesiva del diafragma o los músculos de la caja torácica, o deformidades graves de la columna vertebral y la caja torácica. El dióxido de carbono total en suero o plasma existe como CO₂ disuelto, derivados de carbamino de proteína plasmática y anión bicarbonato y éstos generalmente se acidifican para encubrir las tres formas de gas de CO₂ para la medición.

40 Los niveles de amoníaco en sangre se usan en pacientes pediátricos para el diagnóstico de síndrome de Reye porque el amoníaco en sangre se eleva a menudo antes que las enzimas hepáticas y también en el diagnóstico de determinadas metabolopatías congénitas. En los adultos, las mediciones de amoníaco en sangre se usan comúnmente en el tratamiento del coma hepático y para monitorizar el equilibrio de nitrógeno en pacientes que están tratándose por sobrealimentación.

45 Tal como se describe en el presente documento y según la presente invención, se proporciona una disolución patrón, o disolución de calibración, con estabilidad ampliada y que puede utilizarse simultáneamente en métodos para la determinación de alcohol (EtOH) en sangre, carbonato (CO₂) en suero total y amoníaco (NH₄) en sangre que puede producirse de una manera sencilla a partir de materiales de partida que pueden obtenerse fácilmente. La disolución de calibración según la presente invención contiene sólo agua purificada como base. Una característica clave de la presente invención es la mejora y el mantenimiento de la capacidad de tamponamiento de la disolución de calibración estableciendo el pH en un intervalo de entre aproximadamente 7,8 y 8,6, proporcionando de ese modo una disolución de calibración estabilizada de múltiples analitos que contiene cantidades conocidas de alcohol ácido, carbonato ácido y amoníaco básico.

55 Tras la adición de los analitos alcohol, carbonato ácido y amoníaco, pueden incluirse agentes activos frente a microbios contaminantes en la disolución de calibración para lograr una cantidad deseada de estabilización. Estos agentes pueden consistir en cualquier número de compuestos que son eficaces contra bacterias y hongos, son inertes en el sistema analítico, y no son reactivos frente a componentes de la matriz de la disolución de calibración y los analitos específicos contenidos en la misma. En una realización a modo de ejemplo, se añade polimixina B, un antibiótico aislado de cepas de *Bacillus polymyxa*, a una concentración de aproximadamente 0,02 g/l; opcionalmente puede añadirse piritiona de sodio (Omadine) a una concentración de 0,2 – 0,4 g/l. A estas concentraciones, la polimixina B es un agente activo principalmente frente a bacterias y la piritiona de sodio es un agente activo principalmente frente a hongos. También puede encontrarse útil añadir un agente antimicrobiano de amplio espectro para reforzar las actividades de los demás. Como ejemplo, puede añadirse 0,2 g/l de una disolución acuosa al 20% de polihexametilenbiguanida (Cosmocil CQ) o 0,2 g/l de estreptomycin como protección frente a bacterias tanto

gram-positivas como gram-negativas. También se ha usado ventajosamente un conservante registrado conocido como ProClin 300 y disponible de Sigma-Aldridge. Se ha descubierto que este grupo de agentes particular es muy eficaz para proporcionar un entorno estéril para la disolución de calibración de la presente invención para un periodo prolongado de 400 días o más tal como se comenta a continuación en el presente documento. Lo sorprendente es que se ha descubierto que la estabilidad de la presente disolución de calibración depende enormemente del pH de la disolución y casi no depende de la combinación de conservantes usada, siendo algunas combinaciones a modo de ejemplo:

1. Omadine 0,4 g/l y polimoxina B 4 mg/l y Cosmocil CQ 20 mg/l

2. Omadine 0,2 g/l y estreptomocina 0,2 g/l

3. Omadine 0,2 g/l y polimoxina B 2 mg/l

4. Proclin 300 al 0,5%

Tras la preparación de la matriz de base acuosa, se añaden los analitos específicos de interés para producir un calibrador que tiene los niveles deseados del analito en el mismo, dependiendo de las particularidades del analizador que esté calibrándose. Preferiblemente, se añade alcohol en un intervalo de entre 0 - 500 mg/dl, un intervalo que cubre las concentraciones fisiológicamente relevantes que se encuentran en el suero humano. Preferiblemente, se usa carbonato en un intervalo de disolución de entre 0 y 50 mmol/l puesto que estas concentraciones abarcan el intervalo fisiológicamente relevante de concentraciones de dióxido de carbono total que se encuentran en el suero humano. Preferiblemente, se usa amoníaco en un intervalo de disolución de entre 0 y 1000 $\mu\text{mol/l}$ puesto que estas concentraciones abarcan el intervalo fisiológicamente relevante de concentraciones de amoníaco que se encuentran en el suero humano.

Puede formularse cualquier combinación de niveles de alcohol, carbonato y amoníaco en una disolución de calibración para lograr los valores objetivo deseados en una disolución de calibración, siendo la única limitación mantener el nivel de pH en un intervalo de entre aproximadamente 7,8 y 8,4.

Las figuras 1 a 3 ilustran la estabilidad de la concentración de analito tal como se midió durante un período de 400 días para el calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención. La figura 1 ilustra particularmente que la estabilidad de amoníaco permanece dentro de un intervalo del $\pm 3\%$ de un valor de amoníaco de 1085 $\mu\text{mol/l}$ normal para dos muestras, almacenadas en un recipiente cerrado tanto a -70°C como a $+4^\circ\text{C}$. Tal como se describió anteriormente, el pH del calibrador de múltiples analitos se ajustó a 8,2.

De manera similar, la figura 2 ilustra particularmente que la estabilidad de alcohol permanece dentro de un intervalo del $\pm 3\%$ de un valor de alcohol de 310 mg/dl normal para las mismas dos muestras, almacenadas en un recipiente cerrado tanto a -70°C como a $+4^\circ\text{C}$. Según la presente invención, el pH del calibrador de múltiples analitos se ajustó a 8,2.

Finalmente, la figura 3 ilustra particularmente que la estabilidad de carbonato permanece dentro de un intervalo del $\pm 5\%$ de un valor de carbonato de 46,5 mmol/l normal para las mismas dos muestras, almacenadas en un recipiente cerrado tanto a -70°C como a $+4^\circ\text{C}$. Según la presente invención, el pH del calibrador de múltiples analitos se ajustó a 8,2.

En cambio, la figura 4 ilustra el efecto adverso sobre la estabilidad de amoníaco como consecuencia de ajustar el pH del calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco de la presente invención por debajo de 8,2 a 7,8. Después de aproximadamente 250 días, tal como se indica mediante la flecha descendente, la estabilidad de amoníaco se aproxima a un intervalo del $\pm 3\%$ de un valor de 1085 $\mu\text{mol/l}$ normal para la muestra almacenada en condiciones normales a $+4^\circ\text{C}$. No se completaron los datos de estabilidad para la muestra almacenada en condiciones de congelador a -70°C en vista de datos recogidos a pH 7,4 descrito más adelante.

La figura 5 ilustra el efecto adverso sobre la estabilidad de amoníaco como consecuencia de reducir adicionalmente el pH del calibrador de múltiples analitos a 7,4. Después de aproximadamente 300 días, tal como se indica mediante la flecha ascendente, la estabilidad de amoníaco se encuentra fuera del intervalo del $\pm 3\%$ de un valor de 1085 $\mu\text{mol/l}$ normal para la muestra almacenada en condiciones normales a $+4^\circ\text{C}$.

Finalmente, la figura 6 ilustra el efecto adverso sobre la estabilidad de amoníaco como consecuencia de elevar el pH del calibrador de múltiples analitos por encima de 8,2 a 8,6. Después de 225 días, tal como se indica mediante la flecha ascendente, la estabilidad de amoníaco se encuentra fuera del intervalo del $\pm 3\%$ de un valor de 1085 $\mu\text{mol/l}$ normal para la muestra almacenada en condiciones normales a $+4^\circ\text{C}$. La combinación de las figuras 1 a 6 muestra que un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco que tiene un pH ajustado a un intervalo de entre 7,8 y 8,6, centrado en 8,2, tal como se enseña por la presente invención, permanece dentro de condiciones de estabilidad aceptables cuando se almacena a $+4^\circ\text{C}$ de forma normal en un recipiente cerrado. Para enfatizar esta

dependencia de la estabilidad con el pH de la disolución y como no se vio afectado por ningún conservante en el calibrador de múltiples analitos, se llevaron a cabo pruebas de estabilidad a alta temperatura y en condiciones aceleradas con un calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco que tenía un pH ajustado a un intervalo de entre 7,8 y 8,6, centrado en 8,2, tal como se enseña por la presente invención con conservantes, ilustrado en las figuras 7-8-9. Estas figuras 7-8-9 pueden compararse con las figuras 7A-8A-9A, respectivamente, para el mismo calibrador de múltiples analitos de alcohol, carbonato y amoníaco pero que no tiene ningún conservante incluido.

Las figuras 7 y 7A ilustran que la estabilidad de alcohol permanece dentro de un intervalo del $\pm 5\%$ de un valor de alcohol de 310 mg/dl normal para muestras con y sin conservantes, almacenadas tanto a $+4^{\circ}\text{C}$ como a $+35^{\circ}\text{C}$. Los conjuntos de datos son esencialmente equivalentes, con la excepción de un probable valor atípico a aproximadamente 33 días en la figura 7A, indicando que la presencia o ausencia de conservantes no era relevante.

De manera similar, las figuras 8 y 8A ilustran que la estabilidad de carbonato permanece dentro de un intervalo del $\pm 5\%$ de un valor de carbonato de 50 mmol/l normal para muestras con y sin conservantes. Nuevamente, los conjuntos de datos son esencialmente equivalentes, con la excepción de un probable valor atípico a aproximadamente 15 días en la figura 8A.

Finalmente, las figuras 9 y 9A ilustran que la estabilidad de amoníaco se encuentra fuera de un intervalo del $\pm 5\%$ de un valor de 1085 $\mu\text{mol/l}$ normal para muestras con y sin conservantes a aproximadamente 15 días para una muestra almacenada a $+35^{\circ}\text{C}$ pero que permanece generalmente dentro de un intervalo del $\pm 5\%$ hasta el día 63 almacenada a 4°C .

Esta invención se entenderá mejor mediante referencia al siguiente ejemplo que se incluye en el presente documento con fines de ilustración y no se considerará como limitativo. Las técnicas de formulación tales como mezclado, pesada y manipulación de fluidos se realizan usando equipo de laboratorio convencional (por ejemplo pipetas, balanzas y agitadores magnéticos) y técnicas conocidas en la industria.

DISOLUCIÓN DE CALIBRACIÓN DE ALTO NIVEL

Preparación de tres disoluciones de ácido clorhídrico normal

Llevando puesta ropa de protección resistente al ácido (mascarilla, guantes, manoplas y delantal de goma) y trabajando bajo una campana extractora, se ponen 150 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 250 ml. Se añaden 62,5 ml de HCl concentrado. Se hace girar para mezclarlo. Se añade agua destilada hasta la marca de 250 ml. Se tapa el matraz y se hace girar suavemente para mezclarlo. Se transfiere a una botella dimensionada apropiadamente, se tapa y se etiqueta en consecuencia.

Preparación de una disolución de calibración de alto nivel

Puede emplearse el siguiente procedimiento para proporcionar una disolución de calibración de múltiples analitos de "alto nivel" que tiene aproximadamente 5 g/l de carbonato de sodio, 80 mg/l de bicarbonato de amonio y 3 g/l de alcohol etílico, siendo estos niveles aproximadamente un 20% mayores que los que se hallaron en suero humano normal. Pueden lograrse otros niveles de intervalo medio de carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y alcohol etílico simplemente ajustando las cantidades iniciales de analito añadidas a la disolución de calibración.

1. Se etiqueta un matraz volumétrico de 2 l como "Alto nivel de cal. AAC" incluyendo un número de lote, la fecha actual e información de seguridad convencional. Se miden 1500 ml de agua purificada en el matraz volumétrico de 2 l etiquetado.

2. Se pesan 10,60 g ($\pm 0,01$ g) de carbonato de sodio en un vaso de precipitados de plástico. Se añade el carbonato de sodio al matraz volumétrico de 2 l etiquetado. Se enjuaga el vaso de precipitados con aproximadamente 10 ml de agua purificada y se añade al matraz volumétrico etiquetado.

3. Se pesan 0,166 g ($\pm 0,001$ g) de bicarbonato de amonio en un vaso de precipitados de plástico. Se añade el bicarbonato de amonio al matraz volumétrico de 2 l etiquetado. Se enjuaga el vaso de precipitados con aproximadamente 10 ml de agua purificada y se añade al matraz volumétrico etiquetado.

4. Se pesan 6,30 g ($\pm 0,01$ g) de alcohol etílico en un vaso de precipitados de plástico. Se añade el alcohol etílico al matraz volumétrico de 2 l etiquetado. Se enjuaga el vaso de precipitados con aproximadamente 10 ml de agua purificada y se añade al matraz volumétrico etiquetado.

5. Se añaden 10,0 ml de Proclin 300 (disponible comercialmente de Sigma Aldridge) al matraz volumétrico etiquetado.

6. Se añaden 20 ml de HCl 3 N al matraz volumétrico etiquetado.

7. Se enrasa con agua purificada. Se añade una barrita de agitación magnética al matraz volumétrico etiquetado y se mezcla durante 30 minutos a velocidad moderada.

5 8. Se mide la lectura de pH inicial. Se ajusta el pH a 8,2 añadiendo HCl 3 N en incrementos de 2 ml, o menos, al matraz volumétrico de 2 l etiquetado, mezclando después de cada adición. Cuando los resultados están dentro de los límites aceptables de pH de entre 8,0 y 8,4, se filtra el calibrador de alto nivel a través de un filtro de 0,22 μ en un recipiente con tapa de plástico de 2 l esterilizado en autoclave.

10 Preparación de una disolución de calibración de nivel bajo (cero)

1. Puede emplearse el siguiente procedimiento para proporcionar una disolución de calibración de múltiples analitos de "nivel cero" que no tenga ninguna cantidad carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y alcohol etílico en la misma, pero que es útil al establecer una ordenada en el origen de nivel cero en una curva de calibración.

15 2. Se etiqueta un matraz volumétrico de 2 l como "Nivel bajo de cal. AAC" incluyendo un número de lote, la fecha actual e información de seguridad convencional. Se miden 1500 ml de agua purificada en el matraz volumétrico de 2 l etiquetado.

20 3. Se añaden 19,98 ml de HCl 3 N al matraz volumétrico etiquetado.

4. Se añaden 10,0 ml de Proclin 300 (disponible comercialmente de Sigma Aldridge) al matraz volumétrico etiquetado.

25 5. Se enrasa con agua purificada. Se añade una barrita de agitación magnética al matraz volumétrico etiquetado y se mezcla durante 30 minutos a velocidad moderada.

30 6. Se mide la lectura de pH. Cuando los resultados están dentro de los límites aceptables de pH de entre 0,0 y 0,2, se filtra el calibrador de nivel bajo a través de un filtro de 0,22 μ en un recipiente con tapa de plástico de 2 l esterilizado en autoclave.

MEDICIONES DE ESTABILIZACIÓN

35 Puede determinarse la estabilización de la disolución de calibración de múltiples analitos de la presente invención que tiene cantidades controladas y conocidas de carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y alcohol etílico en la misma, usando cualquiera de una serie de criterios generalmente aceptados. Para los fines de la presente invención, la estabilidad aceptable se define en el presente documento como los niveles de disolución de calibración de múltiples analitos de carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y alcohol etílico que cambian menos que aproximadamente el 5% cuando la disolución se almacena en un recipiente con tapa mantenido a una temperatura constante de aproximadamente 4°C durante 400 días.

40 Las técnicas para el análisis clínico de las cantidades de carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y alcohol etílico en la disolución de calibración de múltiples analitos de la presente invención se conocen bien en la industria. Un analizador como el descrito en la patente estadounidense n.º 5.985.672 y cedida al cesionario de la presente invención y las técnicas de calibración como las descritas en la patente estadounidense n.º 6.277.584 y cedida al cesionario de la presente invención son típicos de tales técnicas.

50 En particular, se midió el carbonato enzimático (ECO₂) usando una reacción enzimática acoplada con fosfoenolpiruvato carboxilasa-malato deshidrogenasa y un análogo estable del cofactor NADH. El anión bicarbonato reacciona con fosfoenolpiruvato en presencia de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y Mg⁺⁺ para formar oxaloacetato y fosfato inorgánico. El oxaloacetato se reduce a malato por la malato deshidrogenasa (MDH) con la oxidación simultánea de la forma reducida de un análogo (aNADH) del cofactor, NADH. La reducción en absorbancia de aNADH es proporcional a la concentración de CO₂ total en la muestra y se mide de manera bicromática a longitudes de onda de 405 nm (principal) y 700 nm (secundaria).

55 El amoníaco se midió usando una adaptación del método enzimático de la deshidrogenasa (GLDH) de van Anken y Schiphorst, Clin Chim Acta 1974; 56:151-157. La sustitución de NADPH por NADH elimina las interferencias procedentes de otras reacciones que consumen NADH. La glutamato deshidrogenasa (GLDH) cataliza la condensación de amoníaco y a-cetoglutarato con la oxidación simultánea de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). La reducción en absorbancia a 340 nm, debido a la desaparición de NADPH, es directamente proporcional a la concentración de amoníaco en la muestra y se mide usando una técnica de índice bicromático (340, 383 nm).

65 El alcohol etílico se midió usando una modificación del procedimiento enzimático de la alcohol deshidrogenasa (ADH) descrito originariamente por Bonnichsen y Lundgren y después presentado como procedimiento general por Bergmeyer. Este método usa tampón tris(hidroximetil)aminometano como agente de atrapamiento de aldehído. La alcohol deshidrogenasa (ADH) cataliza la oxidación de etanol a acetaldehído, con la reducción simultánea de

nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Un pH alcalino y un agente de atrapamiento de aldehído fuerzan la reacción a un mol de NADH por cada mol de alcohol presente. La absorbancia debido a NADH (y por tanto la concentración de alcohol) se determina usando una técnica de punto final con dos filtros (340-383 nm).

- 5 Los términos y las expresiones que se han empleado se usan como términos descriptivos y no limitativos, y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, reconociéndose que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención. Por tanto se entenderá que las realizaciones de la invención dadas a conocer en el presente documento son ilustrativas de los principios de la invención y que pueden emplearse otras modificaciones que todavía se encuentran dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita a aquellas realizaciones precisamente mostradas y descritas en la memoria descriptiva sino sólo por las siguientes reivindicaciones.
- 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Disolución de calibración de múltiples analitos que comprende carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y alcohol etílico, y un conservante seleccionado del grupo que consiste en ProClin 300, polimixina B, piritiona de sodio y polihexametilenbiguanida, teniendo la disolución un pH ajustado a un valor dentro de un intervalo de entre aproximadamente 7,8 y 8,4.

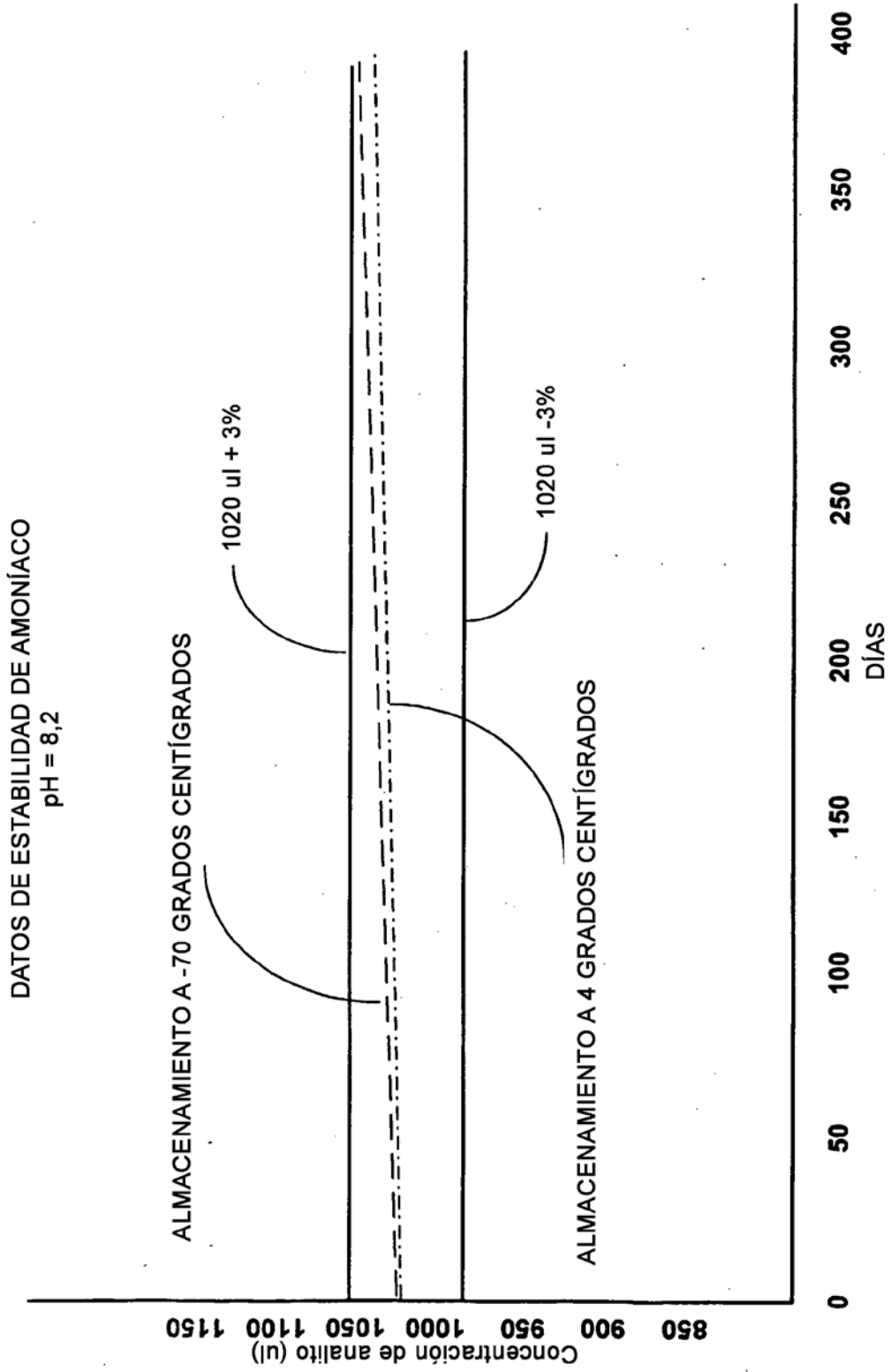


FIG. 1

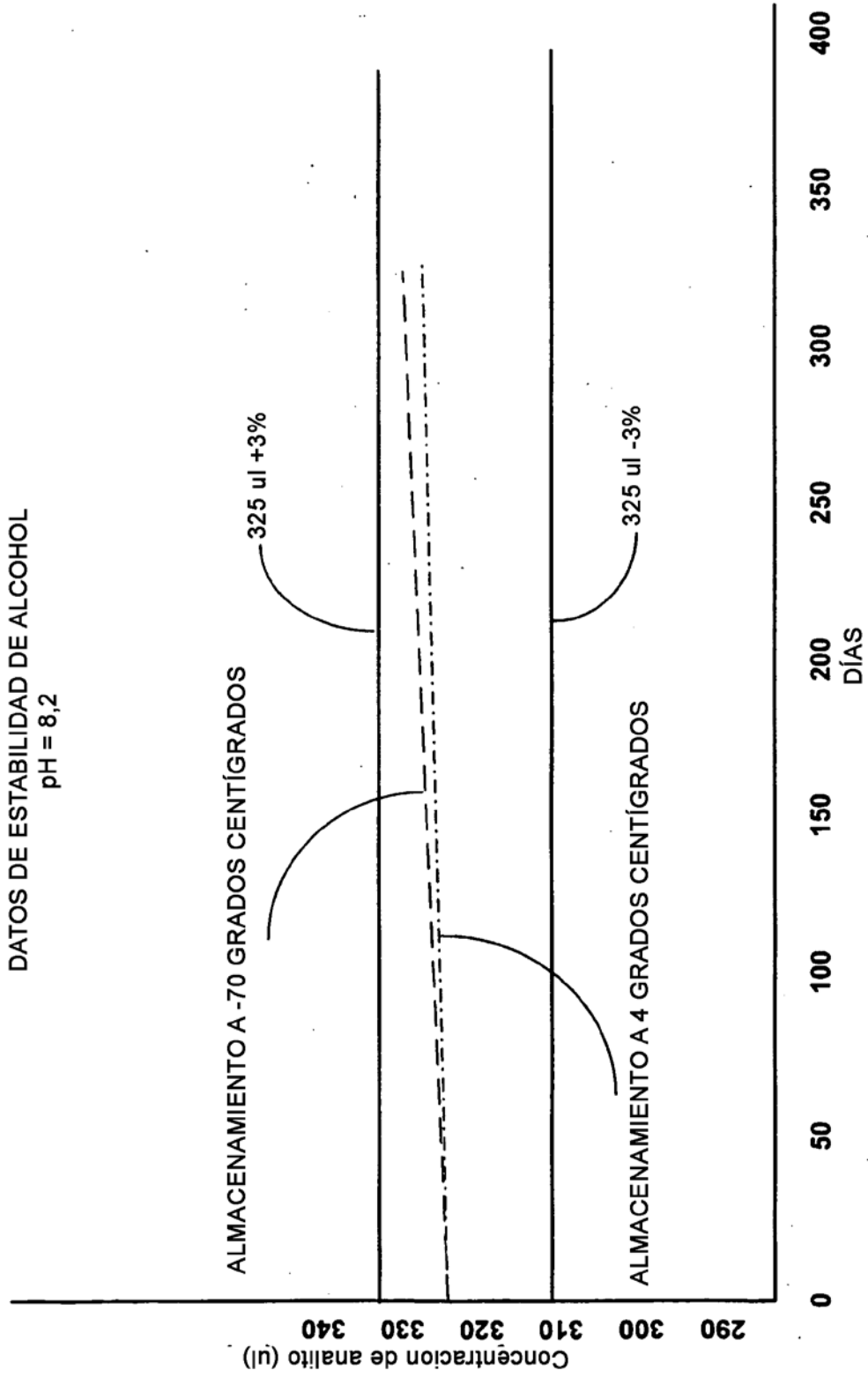


FIG. 2

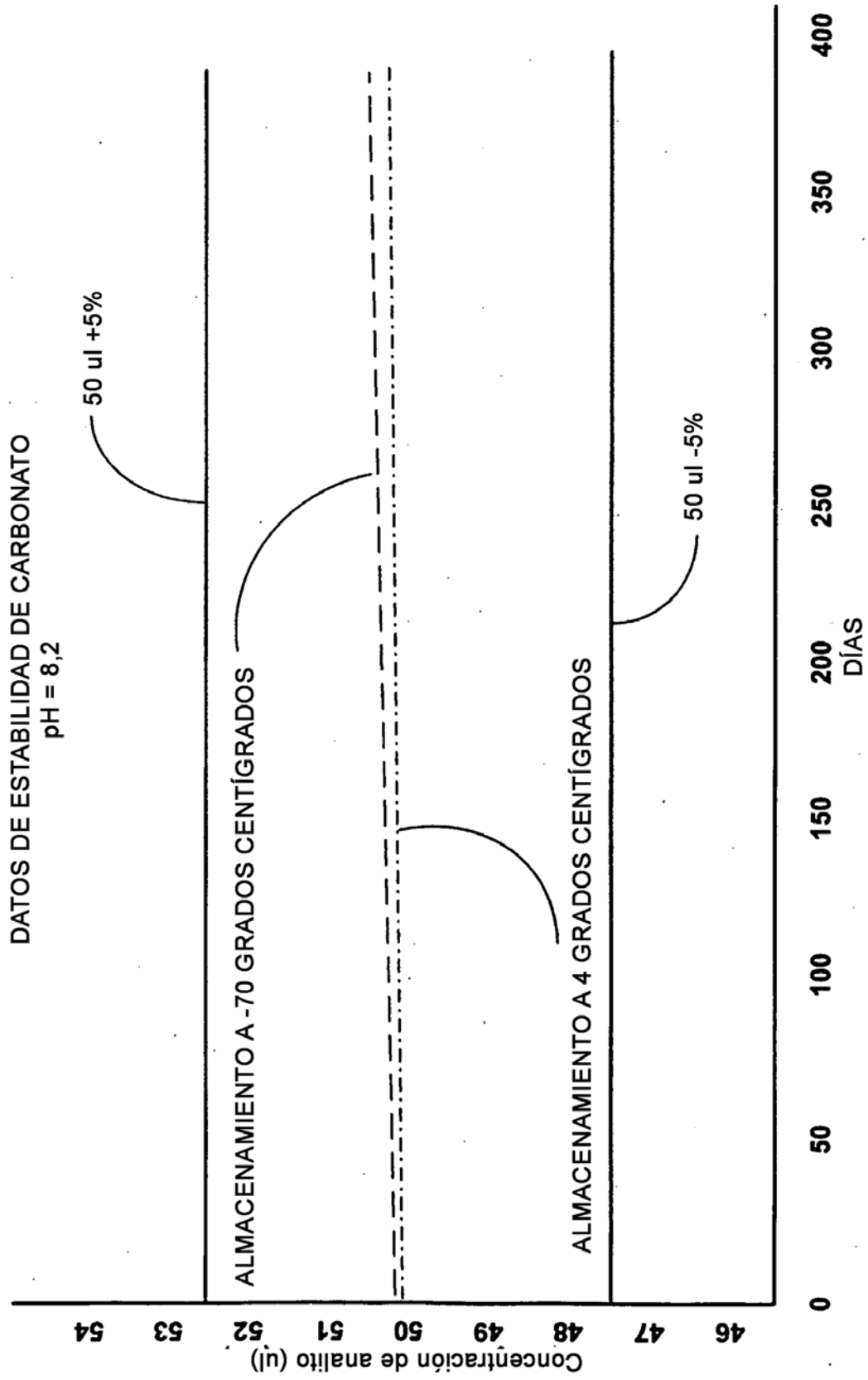


FIG. 3

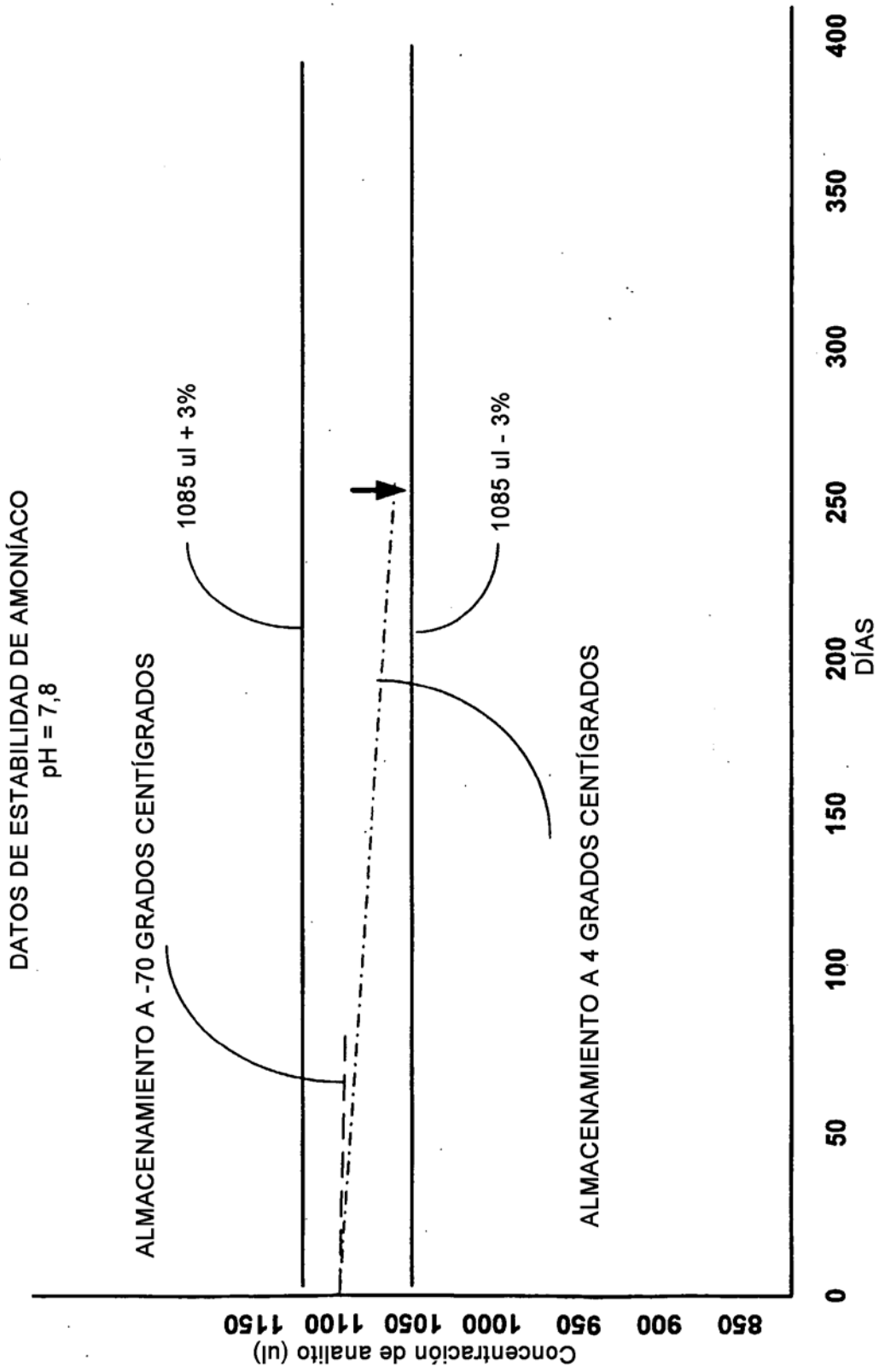


FIG. 4

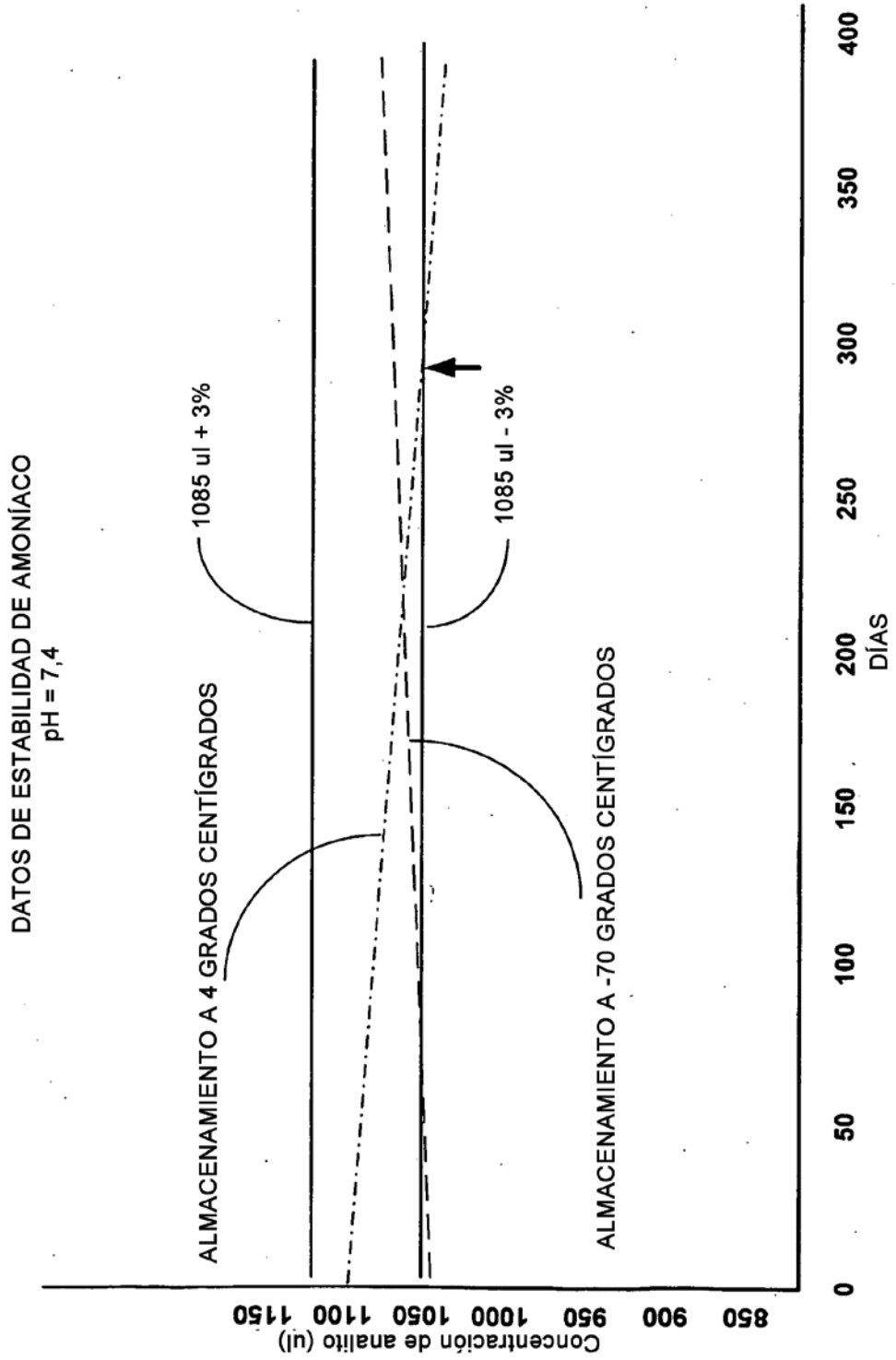


FIG. 5

DATOS DE ESTABILIDAD DE AMONÍACO
pH = 8,6

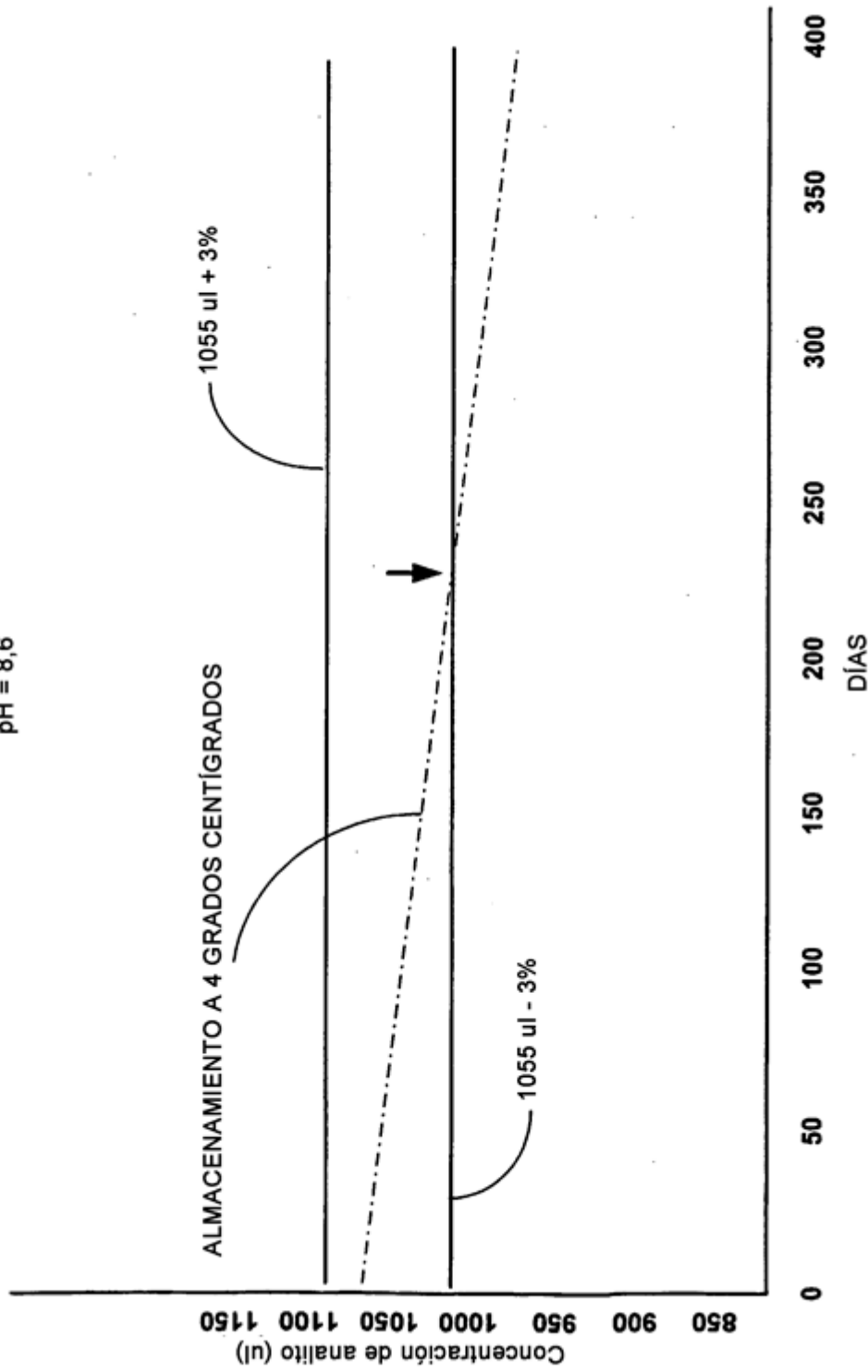


FIG. 6

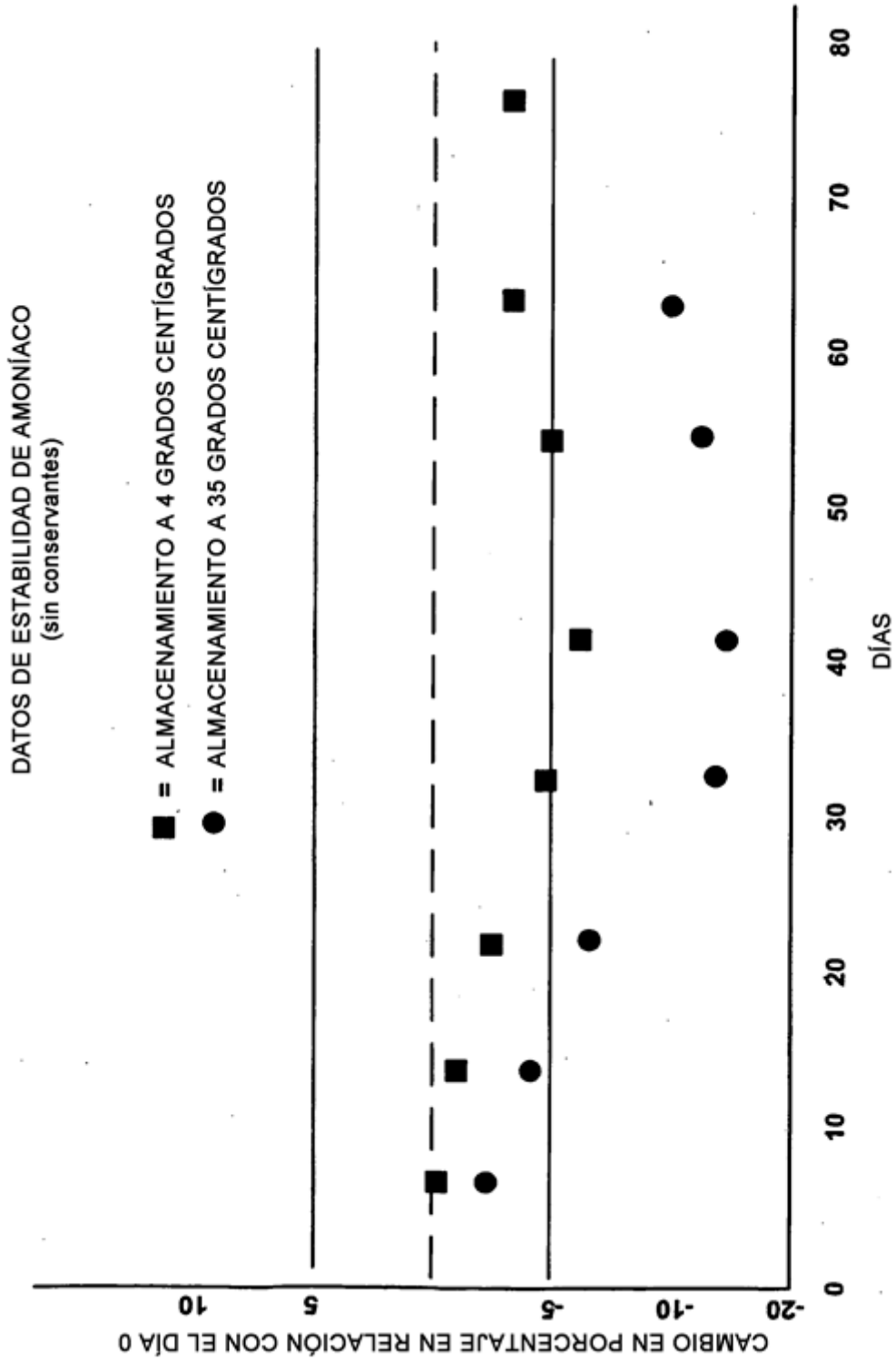


FIG. 7

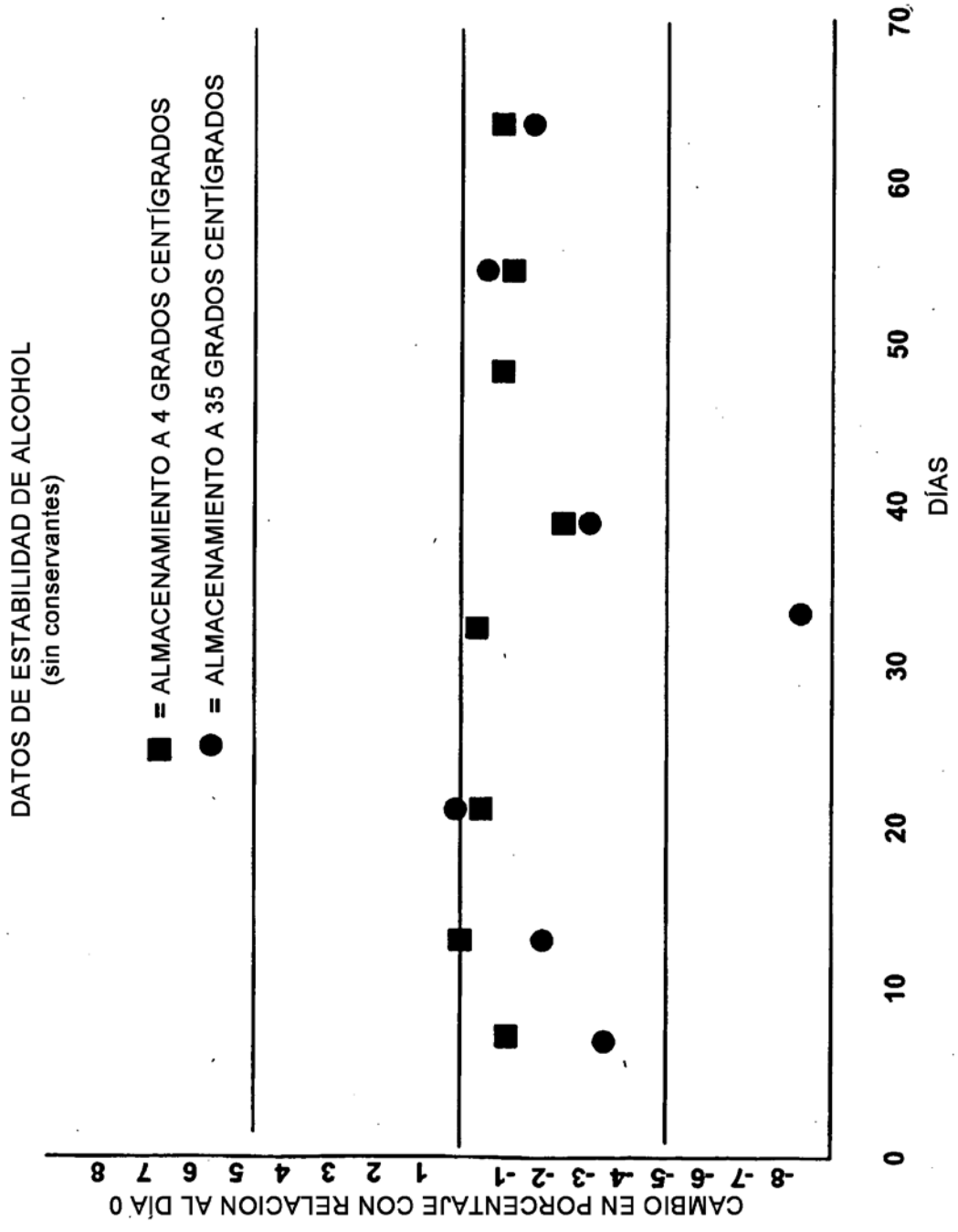


FIG. 7A

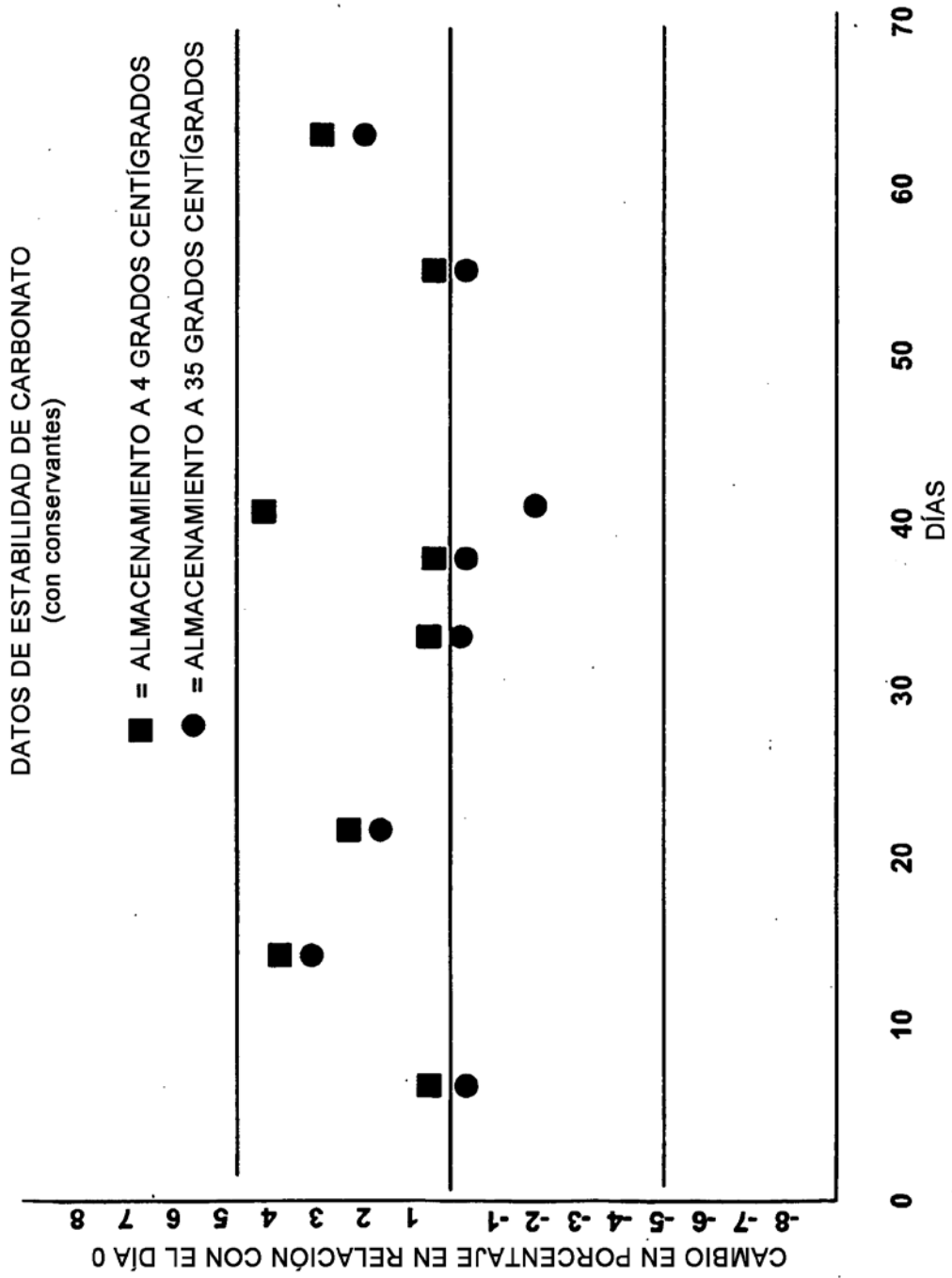


FIG. 8

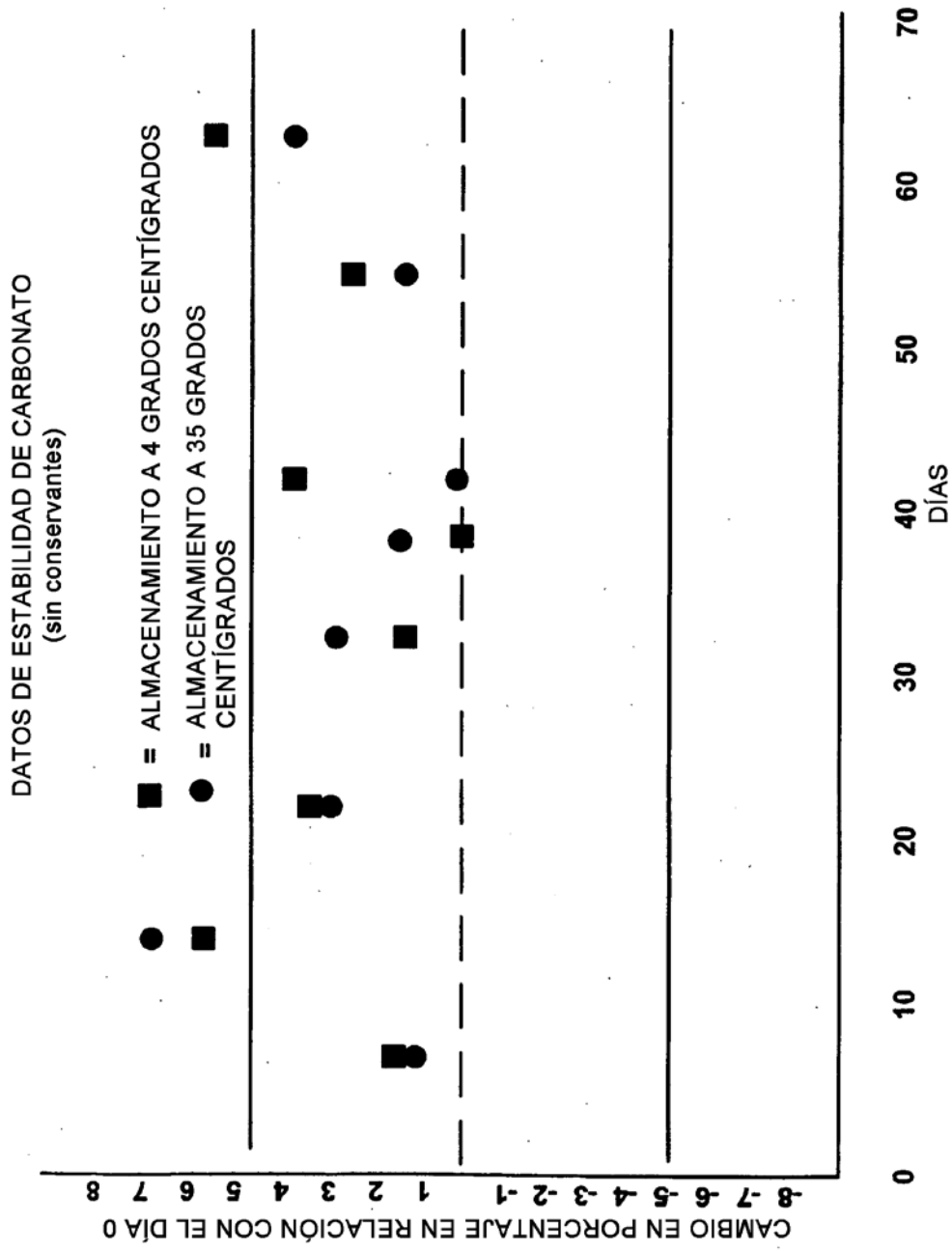


FIG. 8A

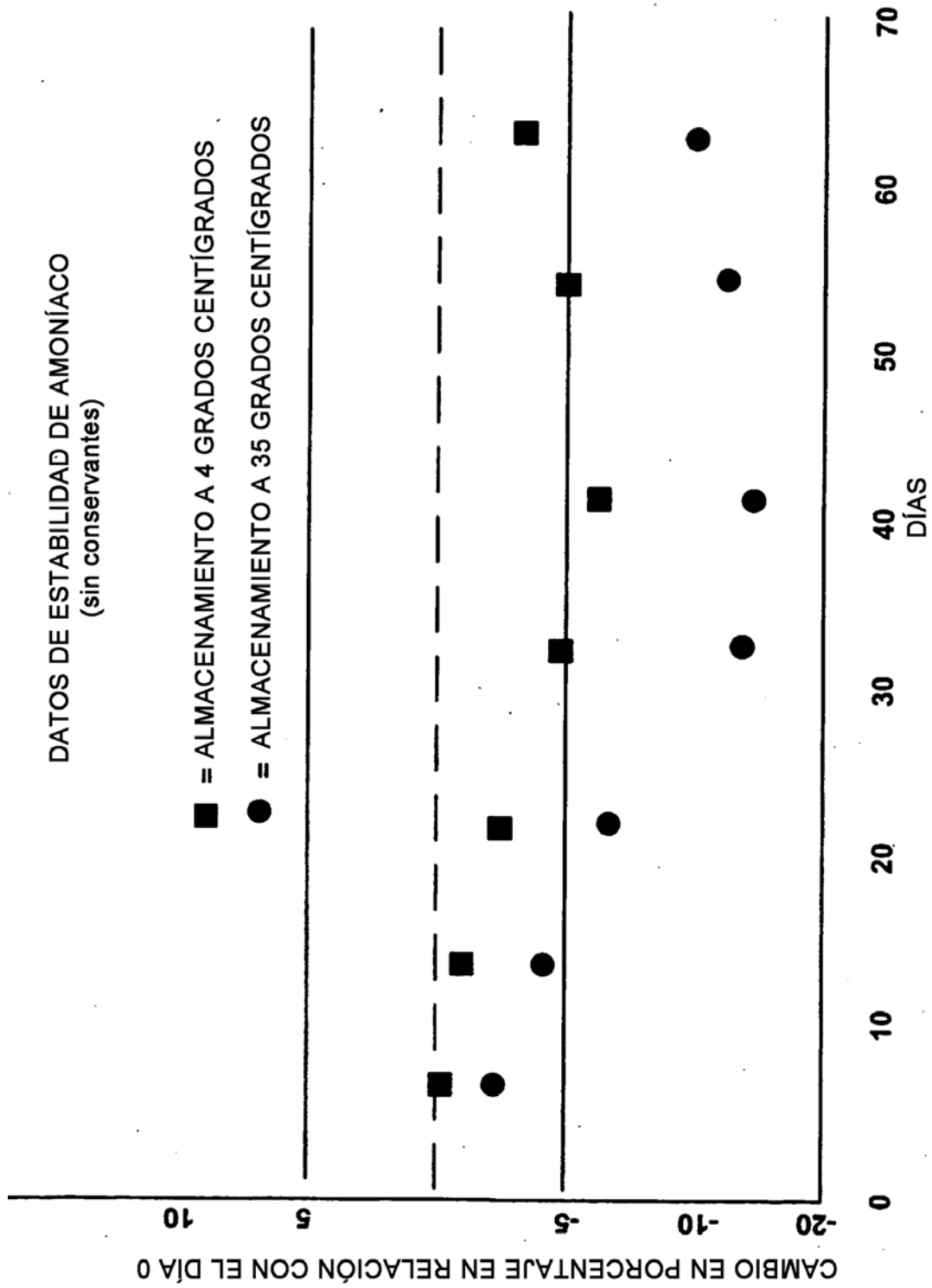


FIG. 9

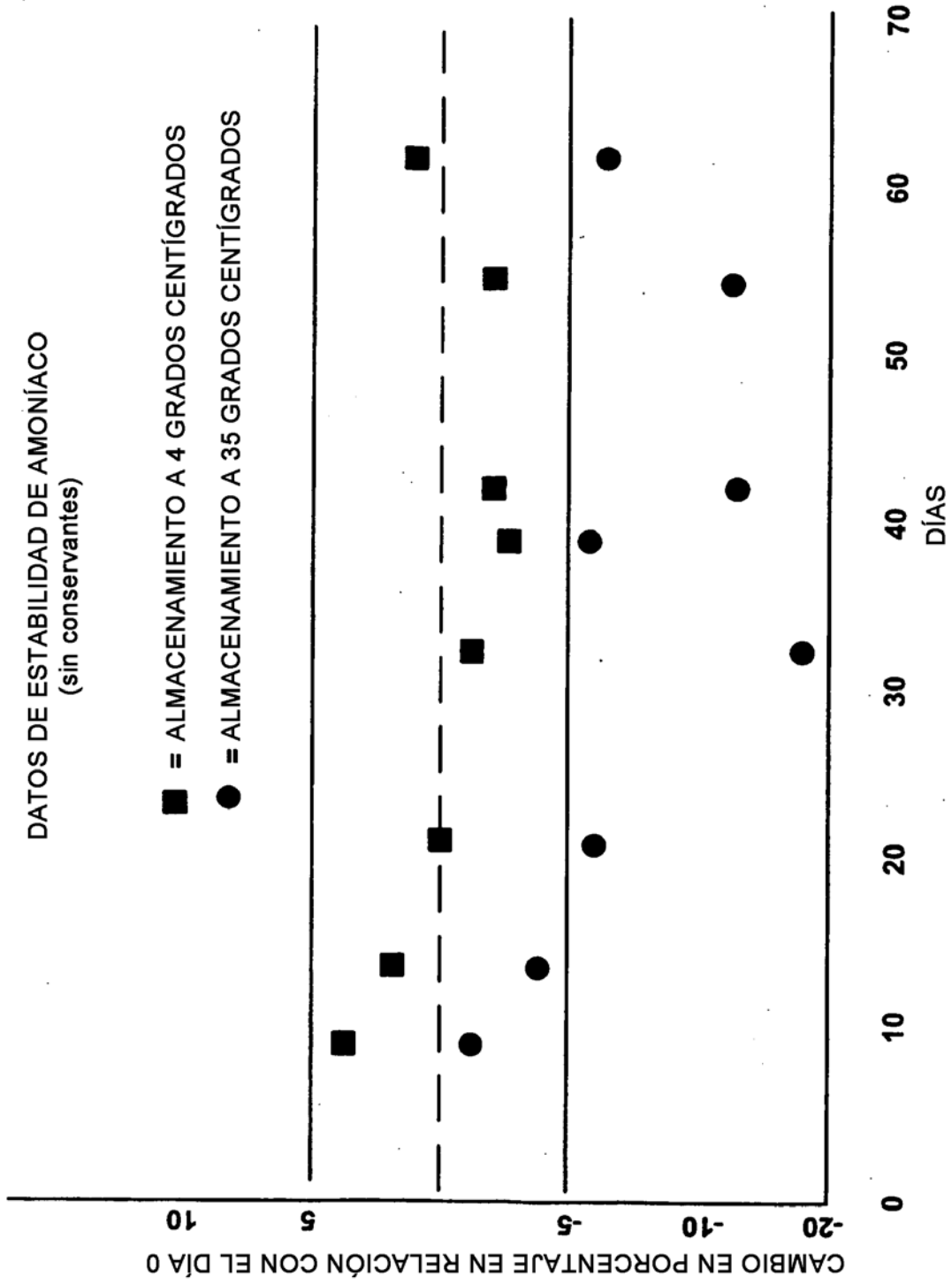


FIG. 9A