

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 064**

51 Int. Cl.:  
**G01N 27/333** (2006.01)  
**G01N 33/487** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05747397 .7**  
96 Fecha de presentación: **11.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1747451**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2007**

54 Título: **SISTEMA DE DETERMINACIÓN DE HEPARINA EN EL LUGAR DE ATENCIÓN AL PACIENTE.**

30 Prioridad:  
**17.05.2004 US 572071 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.02.2012**

73 Titular/es:  
**MEDTRONIC, INC.**  
**710 MEDTRONIC PARKWAY**  
**MINNEAPOLIS MN 55432-5604, US**

72 Inventor/es:  
**BONNEMA, Kelvin;**  
**HOBOT, Christopher, M.;**  
**MEYER, Randy;**  
**NIPPOLDT, Douglas, Dean;**  
**QIN, Wei;**  
**RAMAMURTHY, Narayanan;**  
**SITKO, Vitaly, G.;**  
**YE, Quingshan (Sam) y**  
**CHEEK, Daniel S.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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).

ES 2 375 064 T3

**DESCRIPCIÓN**

Sistema de determinación de heparina en el lugar de atención al paciente

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere de manera general a sistemas médicos de atención a los pacientes. Más específicamente, la presente invención se refiere a sistemas para medir los niveles de poliones en una disolución. Aún más específicamente, la presente invención se refiere a sistemas para medir los niveles de heparina (incluyendo de bajo peso molecular y no fraccionada) en la sangre.

Antecedentes

10 La heparina es un anti-coagulante usado comúnmente en algunos procedimientos quirúrgicos. La heparina se usa en dosis altas en la mayor parte de los procedimientos a corazón abierto. Los dos tipos más comunes de procedimientos a corazón abierto son el procedimiento quirúrgico cardiaco con corazón parado, en el que el paciente se pone en una máquina de bypass cardiopulmonar, y el procedimiento quirúrgico con corazón palpitante. La heparina reduce significativamente la formación de coágulos o coagulación de la sangre del paciente.

15 Al final del procedimiento, es deseable la formación normal de coágulos de la sangre de nuevo. Con el fin de eliminar eficazmente la heparina de la sangre del paciente, se añade protamina. La protamina se une a la heparina, desactivando la heparina. El complejo heparina-protamina es eliminado del cuerpo por el hígado.

20 Es necesario determinar la cantidad de heparina en la sangre del paciente a varios puntos de tiempo. Como algunos pacientes pueden tener heparina ya en su sistema, puede requerirse una determinación inicial de la concentración de heparina en la línea base. Después de añadir heparina, la concentración de heparina se determina para asegurar que la heparina se ha añadido apropiadamente. Mientras que el paciente está heparinizado, la concentración de heparina se monitoriza para asegurar que la concentración de heparina se mantiene por encima de un nivel umbral. Con el fin de determinar la cantidad apropiada de protamina que debe añadirse para desactivar la heparina, debe determinarse la concentración de heparina. Después de añadir protamina, la concentración de heparina puede determinarse de nuevo para asegurar que la heparina se ha desactivado apropiadamente.

25 Actualmente se usan varios métodos para determinar o deducir las concentraciones de heparina. En un método, se extrae la sangre del paciente y se envía a un laboratorio. En el laboratorio, la heparina puede titularse con protamina hasta que la heparina se ha unido completamente a la protamina. La concentración de heparina puede determinarse como una función de la estequiometría del titulante protamina usado. La estequiometría de la protamina puede determinarse por titulación frente a muestras estándar de heparina. El método no es ni mucho menos ideal para  
30 usarse para proporcionar información a tiempo al médico responsable del tratamiento, debido al tiempo requerido para obtener los resultados.

35 Un método usado más comúnmente para la medida de la heparina en el marco del laboratorio central es un ensayo colorimétrico anti-Factor Xa (FXa). Este ensayo es una característica estándar en varios analizadores y se realiza en muestras de plasma. Usa el principio de la inhibición de FXa mediada por heparina. El inconveniente de este ensayo es que necesita corregirse por el hematocrito (ya que se realiza en plasma) así como por la fuente de heparina (si es una variable). Este ensayo es más adecuado para ensayar un alto número de muestras y no es favorable para ensayar pocas muestras. Otro inconveniente significativo es un tiempo de respuesta alto porque es un ensayo de laboratorio central).

40 En otro método, se usa un ensayo de Tiempo de Coagulación Activada (ACT). En este ensayo, se mide el tiempo requerido para que la sangre del paciente se coagule y se usa para deducir un nivel probable de heparina. Este método es indirecto y puede producir resultados engañosos, ya que los valores de ACT pueden verse influidos por hemodilución e hipotermia. Este método no mide directamente la heparina y tiene una exactitud limitada.

45 En otro método más, la concentración de heparina se localiza en un intervalo usando múltiples muestras de protamina mediante el uso de una propiedad de la interacción heparina-protamina. El tiempo requerido para que la heparina y la protamina se unan se minimiza cuando la cantidad de protamina se aproxima a la cantidad estequiométrica necesaria para unir exactamente la heparina. Una cantidad de protamina insuficiente o en exceso resulta en tiempos de coagulación mayores. El Sistema de Gestión de la Hemostasia (HMS) HEPCON disponible en Medtronic, Inc. (Minneapolis, Minnesota) usa esta propiedad.

50 El sistema de ensayo HMS se basa en una titulación con protamina y usa la formación de coágulos para la detección del punto final. El ensayo se realiza en un cartucho que contiene de cuatro a seis canales que contienen diferentes cantidades de protamina así como tromboplastina diluida (para acelerar la formación de coágulos). El punto final de la titulación es la detección de la formación de coágulos, que se determina midiendo la velocidad de descenso de un mecanismo de émbolo en cada cartucho. El canal que contiene la cantidad más baja de protamina que neutraliza completamente la heparina presenta el tiempo de coagulación más corto. La concentración de heparina se mide a  
55 partir de la cantidad de protamina en ese canal (tomando como base la estequiometría heparina-protamina). Cada cartucho Hepcon ensaya así un intervalo limitado de concentraciones en sangre.

El sistema HMS puede utilizar hasta 12 cartuchos diferentes que tienen en ellos diferentes cantidades conocidas de protamina. El médico responsable del tratamiento puede estimar el intervalo esperado de heparina y seleccionar un número limitado de cartuchos en ese intervalo, nominalmente dos del intervalo de cartuchos. Una jeringa llena de sangre se inserta en una máquina que inyecta la sangre en el cartucho seleccionado. La formación de coágulos se usa para la detección del punto final. En unos pocos minutos, el cartucho que tiene la cantidad apropiada de protamina se indica automáticamente, junto con una concentración de heparina. El uso de este dispositivo requiere la estimación inicial correcta de la heparina, requiere pocos minutos para operar, y tiene una exactitud limitada a un intervalo discreto de concentraciones de heparina tomando como base la resolución de la titulación con protamina. Pueden almacenarse numerosos cartuchos si se quiere medir el intervalo completo de concentraciones posibles de heparina. Los cartuchos tienen una vida útil limitada y deben desecharse si no se usan en el periodo de la vida útil. E.P.A. 1376123 describe un sistema para determinar la concentración de heparina en una muestra de sangre, comprendiendo el sistema un cartucho que incluye una vía de fluido y un puerto de muestra en comunicación fluida con la vía de fluido. El sistema también comprende un par de electrodos sensibles al ion protamina, disponiéndose una cantidad conocida de protamina en el sistema.

La titulación de la heparina con protamina se ha estudiado en marcos académicos y de laboratorio, pero no ha resultado en ningún dispositivo en el lugar de atención al paciente que pueda usarse para proporcionar concentraciones de heparina a tiempo a un médico responsable del tratamiento. Deberían superarse varios obstáculos con el fin de proporcionar el dispositivo ideal de medición de heparina en el lugar de atención al paciente. Serían deseables un sensor de medida rápido y exacto, un sistema de determinación de referencia o de línea base exacto, cartuchos desechables adecuados y sistemas para manejar y analizar todo lo anterior y todavía no se han desarrollado.

#### Resumen de la Invención

La presente invención proporciona un sistema, como se define en la reivindicación 1, para la determinación automática de la concentración de heparina (incluyendo heparina de bajo peso molecular y no fraccionada) en fluidos tales como la sangre. El dispositivo de la presente invención puede usarse en un dispositivo en el lugar de atención al paciente, proporcionando una determinación rápida de la concentración de heparina en la sangre de un paciente automáticamente.

Se proporcionan cartuchos que incluyen electrodos sensibles al ion (ISE) protamina y electrodos de referencia y sistemas para la determinación automática de la concentración de heparina en los cartuchos. Algunos sistemas añaden sangre a un bolo de protamina suficiente para unir toda la heparina, dejando protamina en exceso. La concentración de protamina en exceso se determina midiendo la pendiente inicial de la velocidad de cambio del potencial del electrodo y comparando la pendiente con valores de pendiente conocidos de concentración de protamina. En los cartuchos según la invención, una fuente de presión oscilante mueve la mezcla sangre-protamina hacia atrás y adelante a través del ISE de protamina.

La presente invención podría incluir el uso de un electrodo selectivo de ion (ISE) sensible a protamina que incluye segmentos duros y blandos de poliuretano alternantes. En algunos polímeros, el segmento blando incluye grupos alifáticos de cadena lineal y grupos alifáticos cíclicos unidos por los grupos uretano. Los grupos alifáticos de cadena lineal y los grupos alifáticos cíclicos no tienen preferiblemente grupos éter o éster, lo que crea un núcleo lipofílico. En uno de dichos segmentos blandos de poliuretano, el segmento blando se forma como un producto de reacción del dímero diisocianato, con butanodiol y/o dímero diol.

El segmento duro de poliuretano puede incluir partes de metilen difenilisocianato y dioles alternantes, por ejemplo, butanodiol y/o dímero diol. Las regiones de segmento duro entre los grupos derivados de isocianato pueden ser así hidrógeno o hidrocarburos alifáticos de cadena lineal o hidrocarburos alifáticos cíclicos que pueden tener hidrógeno o grupos alifáticos de cadena lineal laterales de las partes cíclicas.

En algunos ejemplos, este poliuretano que tiene los segmentos duros y blandos descritos anteriormente puede mezclarse o combinarse junto con uno o más poliuretanos adicionales, por ejemplo, Peletano. Una combinación de polímeros puede proporcionar un rendimiento mejorado respecto a cada uno de los poliuretanos combinados solo. En otra realización más, un co-polímero formado a partir de los segmentos blandos y segmentos duros descritos anteriormente, así como segmentos encontrados en uno o más poliuretanos adicionales, por ejemplo, Peletano, puede proporcionar un único núcleo de polímero que tiene las propiedades deseadas.

Un electrodo selectivo de ion (ISE) que es sensible a protamina puede comprender uno o más de los polímeros de poliuretano especializados descritos anteriormente. Algunos electrodos pueden incluir el plastificante NPOE y/o el ionóforo DNNS.

En un dispositivo según la presente invención, se proporcionan numerosas alicuotas de protamina seca que puede tener cada una la misma concentración, a varios puntos a lo largo de una vía tubular. La protamina seca puede usarse como la alicuota. La cantidad de protamina seca en cada alicuota corresponde a la cantidad requerida para neutralizar una cantidad conocida de heparina (por ejemplo, cada alicuota puede corresponder a 5µg de protamina que es suficiente para neutralizar 0,5 unidades de heparina). Las numerosas alicuotas de protamina pueden tener

- electrodos selectivos de ion posicionados entre las alicuotas en la vía, en los que los electrodos selectivos de ion son sensibles a protamina. Un volumen predeterminado de muestra de sangre puede forzarse a través de la vía, encontrando en secuencia, primero una primera alicuota de protamina y mezclando la muestra de sangre (que contiene heparina) con esta alicuota de protamina. La muestra de sangre, que ahora tiene parte de la heparina unida a la protamina disuelta, continúa sobre el primer par de electrodos de medición de protamina. La respuesta del par de electrodos es proporcional a la concentración de la protamina libre en la muestra. Se observa una respuesta del electrodo insignificante si la cantidad de protamina no es suficiente para neutralizar completamente la heparina en la muestra. La muestra de sangre puede continuar hacia una segunda alicuota de protamina y mezclarse con la siguiente alicuota, uniendo adicionalmente más heparina de la muestra de sangre. La muestra de sangre que tiene la heparina inicial unida adicionalmente por la protamina de la segunda alicuota puede continuar hacia un segundo sensor de protamina en el que la respuesta se mide de nuevo. Esto puede continuar hasta que la muestra de sangre haya fluido a través de todas las numerosas alicuotas de protamina, mezclándose con las alicuotas y pasando a través de todos los electrodos de medición de protamina, registrando las respuestas de cada uno de los sensores en secuencia.
- 5 Pueden analizarse los potenciales eléctricos de todos los numerosos electrodos sensibles a protamina. El electrodo que tiene un valor intermedio entre los valores extremadamente bajo y extremadamente alto puede usarse para aproximar el punto similar que se encontraría en la titulación de la muestra de sangre que contiene heparina con alicuotas secuenciales de protamina.
- 10 La FIG.1 es un diagrama esquemático de un sistema automático en el lugar de atención al paciente para la determinación de la concentración de heparina que incluye de manera general un controlador, un titulante administrado usando una fuente de presión y un cartucho que incluye un par de electrodos selectivos del ion protamina y un elemento de mezclado;
- 15 La FIG. 2A es una vista lateral de un cartucho para medir la concentración de heparina que incluye un recipiente sellado usando un cierre perforable, un electrodo selectivo del ion protamina, un electrodo de referencia y una aguja de jeringa de protamina todo en un tubo vacutainer;
- 20 La FIG. 2B es un gráfico profético del potencial eléctrico diferencial entre los electrodos de trabajo y de referencia frente al tiempo a medida que se infunde la protamina en una muestra que contiene heparina;
- 25 La FIG. 3A es una vista lateral de un dispositivo en el lugar de atención al paciente para la determinación de la concentración de heparina que incluye dos recipientes tubulares sellados, incluyendo cada uno un electrodo selectivo del ion protamina, un electrodo de referencia y una jeringa de protamina, en el que en uno de los dos cartuchos se ha eliminado o inactivado la heparina para crear una muestra blanco;
- 30 La FIG. 3B es un gráfico profético similar al de la FIG. 2B, que tiene FEM diferencial frente al tiempo de infusión de protamina para una muestra que contiene heparina y una muestra blanco de la que se ha eliminado la heparina;
- 35 La FIG. 4A es una vista lateral de otro dispositivo en el lugar de atención al paciente para la determinación de la concentración de heparina que incluye un electrodo selectivo de protamina y un electrodo de referencia dispuestos coaxialmente, junto con una jeringa de protamina;
- 40 La FIG. 4B es una vista superior, de sección transversal a través del par de electrodos coaxial de la FIG. 4A;
- La FIG. 4C es una vista superior, de sección transversal de una configuración alternativa de 4A, con un par de electrodos uno al lado del otro;
- 45 La FIG 4D es una vista lateral del par de electrodos de la FIG. 4C, que muestra el aislante eliminado sobre cada electrodo, con el electrodo de trabajo recubierto con una membrana ISE selectiva de protamina;
- La FIG. 5A es una vista frontal de un electrodo selectivo del ion protamina plano serigrafiado, que incluye una membrana selectiva del ion protamina y un electrodo de referencia, ambos serigrafiados en un sustrato y que se extienden hacia una región de exposición inferior de la muestra;
- 50 La FIG. 5B es una vista transversal, de sección transversal del par de electrodos de la FIG. 5A, que muestra un canal de administración de protamina dispuesto en el sustrato;
- La FIG. 5C es una vista frontal del par de electrodos de la FIG. 5A incorporado en un cartucho que tiene un pocillo de muestra en la parte inferior;
- La FIG. 5D es una vista lateral del cartucho de la FIG. 5C;
- La FIG. 6 es una vista lateral, de sección transversal de un electrodo selectivo del ion protamina que incluye un electrodo selectivo del ion protamina y un electrodo de referencia en un sustrato;
- La FIG. 7A es una vista frontal de un sensor de titulación de protamina que incluye una región inferior que tiene capacidad sensora para múltiples analitos;

- La FIG. 7B es una vista fragmentada, en perspectiva de la región inferior de la FIG. 7A, que tiene un canal de entrada de protamina y un canal sensor múltiple;
- La FIG. 8A es una vista lateral de un sensor plano que tiene un electrodo selectivo del ion protamina serigrafiado y un electrodo de referencia;
- 5 La FIG. 8B es una vista superior, transversal, de sección transversal del electrodo plano de la FIG. 8A después de que el sustrato flexible se haya formado en un tubo;
- La FIG. 8C es una vista lateral del electrodo tubular de la FIG. 8B incorporado en un cartucho que tiene una muestra en él y un dispositivo de inyección de protamina por debajo;
- 10 La FIG. 8D es una vista lateral esquemática de un cartucho similar al de la FIG. 8C, pero que tiene una bolsa de protamina que avanza hacia una aguja para perforar la bolsa para inyectar la protamina en la muestra;
- La FIG. 9 es una vista superior de un diseño de sensor plano diferencial con agitadores rotatorios, que tiene una primera cámara para la sangre que contiene heparina y una segunda cámara para la sangre desprovista de heparina;
- 15 La FIG. 10A es una vista superior de un sensor de protamina en serie que tiene varios electrodos selectivos del ion protamina dispuestos entre varias alicuotas de protamina;
- La FIG. 10B es una vista superior, detallada de un par de electrodos selectivos del ion protamina de la FIG. 10A;
- La FIG. 10C es un grafico del potencial eléctrico frente al número de sensor de la FIG. 10A, que muestra los resultados proféticos para una muestra de sangre con una baja concentración de heparina y una muestra de sangre con una alta concentración de heparina;
- 20 La FIG. 11 es una vista superior de un dispositivo de matriz con múltiples sensores que incluye varios sensores de protamina en serie similares a los de la FIG. 10A;
- La FIG. 12A es una vista frontal de una matriz de sensores selectivos del ion protamina paralela que tiene varios canales de flujo en paralelo, teniendo cada canal de flujo una alicuota de protamina aguas arriba de un electrodo selectivo del ion protamina;
- 25 La FIG. 12B es un gráfico del potencial eléctrico de los electrodos selectivos del ion protamina frente al número de sensor, que muestra un resultado profético tanto para una muestra de sangre con una baja concentración de heparina como para una muestra de sangre con una alta concentración de heparina;
- La FIG. 13A es una vista superior de un sistema para la determinación de la concentración de heparina que incluye una cinta que presenta múltiples pares de electrodos selectivos de ion que se extienden desde una bobina de sensor hasta una bobina de toma;
- 30 La FIG. 13B es una vista frontal, detallada de la cinta de la FIG. 13A que presenta los numerosos pares de electrodos selectivos del ion protamina;
- La FIG. 13C es una vista detallada de un par de electrodos selectivos de ion de la FIG. 13B;
- La FIG. 13D es una vista detallada de la cabeza del sensor de la FIG. 13A;
- 35 La FIG. 13E es similar a la FIG. 13A, pero tiene los sensores y el puerto de la muestra separados entre sí;
- La FIG. 14A es una vista frontal de un sensor que tiene un único electrodo de protamina y múltiples alicuotas de protamina;
- La FIG. 14B es una vista frontal de otro sensor, que tiene un único electrodo de protamina, múltiples alicuotas de protamina y una vía en serpentín;
- 40 La FIG. 15A es una vista frontal de otro sensor más que tiene un único electrodo de protamina y múltiples alicuotas de protamina dispuestas en canales que tienen entradas de muestra individualmente direccionables, controladas;
- La FIG. 15B es una vista superior del sensor de la FIG. 15A;
- La FIG. 15C es una vista superior de otro sensor más que tiene un único electrodo de protamina y múltiples alicuotas de protamina dispuestas en canales orientados como radios que irradian hacia fuera desde un puerto de la muestra, que tienen entradas de muestra individualmente direccionables, controladas;
- 45 La FIG. 16A es una vista esquemática, superior de un cartucho para la determinación de la concentración de heparina que tiene agitación de la columna de fluido;

- La FIG. 16B es una vista final, transversal, de sección transversal del cartucho de muestra de la FIG. 16A;
- La FIG. 16C es una vista esquemática, lateral de una fuente de presión del fluido oscilante para usarse con la FIG. 16A, que incluye una leva rotatoria o cojinete excéntrico frente a un depósito que contiene aire;
- 5 La FIG. 17A es una vista lateral, transversal, de sección transversal de una fuente de presión constante de titulación que incluye una bolsa de protamina en una cámara cerrada herméticamente que tiene un líquido volátil y vapor de líquido en ella;
- La FIG. 17B es una representación esquemática de un sistema para controlar el dispositivo de presión constante de la FIG. 17A;
- 10 La FIG. 18 es un diagrama de flujo de un método para titular la heparina con protamina usando una velocidad ajustable de dispensación de gotitas dependiente del potencial recibido desde el electrodo sensible a protamina;
- La FIG. 19 es un resultado experimental, un gráfico de potencial frente al tiempo y velocidad de cambio del potencial por tiempo frente al tiempo, para el método de dispensación ajustable de gotitas de la FIG. 18;
- 15 La FIG. 20 es un resultado experimental, un gráfico de potencial frente al tiempo, para varias velocidades constantes de dispensación de gotitas y el método de velocidad de dispensación ajustable de la FIG. 18, en el que no hay heparina presente;
- La FIG. 21 es un resultado experimental, un gráfico de potencial frente al tiempo, para varias velocidades constantes de dispensación de gotitas y el método de velocidad ajustable de la FIG. 18, en el que están presentes 6 unidades de heparina;
- 20 La FIG. 22 es un resultado experimental, un gráfico de potencial frente al tiempo, para la titulación de varias cantidades de heparina tanto con una velocidad de dispensación lenta y constante de gotitas como con el método de velocidad de dispensación ajustable de la FIG. 18;
- La FIG. 23 es una tabla que contiene los resultados experimentales de la FIG. 22, que muestra una comparación de recuentos de gotitas para métodos de dispensación de gotitas fijos frente a ajustables;
- 25 La FIG. 24A es una representación esquemática de la membrana de electrodo selectivo del ion protamina, que incluye el ionóforo DNNS antes de la difusión del polication protamina en la membrana;
- La FIG. 24B es una representación esquemática de la membrana de electrodo selectivo del ion protamina, que incluye el ionóforo DNNS después de la difusión del polication protamina en la membrana;
- La FIG. 25 ilustra los resultados experimentales de la titulación de varias cantidades de heparina con protamina, mostrados como un gráfico de potencial frente al tiempo;
- 30 La FIG. 26A muestra los resultados experimentales de exponer un electrodo sensible al ion protamina a varias concentraciones de protamina, para determinar el tiempo del pico de la velocidad de cambio del potencial frente al tiempo, que puede usarse para calibrar los electrodos selectivos del ion protamina para el método denominado de "bolo";
- 35 La FIG. 26B muestra los resultados experimentales de exponer un electrodo sensible al ion protamina a varias cantidades de heparina añadidas a un bolo de protamina en exceso, para determinar la velocidad inicial de cambio del potencial eléctrico diferencial para varias concentraciones de heparina en la muestra, que puede usarse para calibrar los electrodos selectivos del ion protamina para el método de "bolo";
- 40 La FIG. 26C muestra los resultados del log de  $dFEM/dt$  frente a la concentración de heparina de la FIG. 26B, que ilustran una relación lineal que puede usarse en algunas realizaciones para determinar la concentración de heparina en una muestra, para el método de "bolo";
- La FIG. 27 muestra una simulación teórica que representa la concentración inmediatamente dentro de la membrana del electrodo selectivo de ion frente al tiempo tanto para la válvula de dispensación de protamina convencional en la titulación de heparina como para la exposición inmediata de la membrana a varias concentraciones de protamina;
- 45 La FIG. 28 es una estructura química de un poliuretano que puede usarse en el electrodo selectivo del ion protamina, que incluye regiones alifáticas lineales y alifáticas cíclicas entre los grupos uretano;
- La FIG. 29A es un diagrama gráfico de un sistema basado en cartucho que usa una bomba de fluido reversible de desplazamiento positivo con un cartucho de dos sensores que tiene una única vía de fluido;
- La FIG. 29B es una vista superior del cartucho de dos sensores de la FIG. 29A;
- La FIG. 29C es una vista inferior en perspectiva del cartucho de dos sensores de la FIG. 29A;

La FIG. 29D es una vista superior en perspectiva del cartucho de dos sensores de la FIG. 29A;

La FIG. 30A ilustra los resultados experimentales de FEM frente al tiempo usando un sistema similar al de la FIG. 29A con varias concentraciones de heparina en un método de bolo; y

5 La FIG. 30B ilustra un gráfico log de la pendiente inicial frente a la concentración de heparina a partir de los resultados experimentales de la FIG. 30A.

#### Descripción Detallada

10 La FIG. 1 ilustra de manera general un sistema 50 para medir la concentración de heparina en sangre usando un titulante protamina. El sistema 50 puede implementarse como un sistema en el lugar de atención al paciente, que puede proporcionar métodos rápidos no basados en la coagulación para determinar directamente la concentración de heparina en la sangre u otros fluidos corporales. Este método también es aplicable en términos generales a muestras que carecen de/son deficientes en factores de la coagulación (por ejemplo, plasma acuoso bajo en plaquetas, etc) y que no son mensurables por ensayos de coagulación así como a muestras con color o turbias (por ejemplo, la sangre), que no son mensurables por ensayos colorimétricos. El sistema 50 variará según la realización de la invención, como se discute para las distintas realizaciones más adelante.

15 El sistema 50 incluye un controlador 52 acoplado a un dispositivo de visualización 53. El controlador 52 puede ser un dispositivo electrónico cableado formado por componentes discretos analógicos y digitales en algunas realizaciones. En otras realizaciones, el controlador 52 es un dispositivo programable basado en un microprocesador que tiene al menos un microprocesador en su interior. En otra realización más, el controlador 52 es un ordenador de uso general, por ejemplo, un ordenador de escritorio, que corre algoritmos de control para implementar la presente invención. Un controlador de este tipo es un ordenador de uso general que ejecuta el programa informático Lab View®. El visualizador 53 puede ser un visualizador especializado, con fines específicos en el dispositivo o puede ser un visualizador de un ordenador de uso general, por ejemplo, un monitor CRT o LCD. También pueden acoplarse al controlador 52 varios dispositivos diferentes de entrada, por ejemplo, botones, interruptores, mandos giratorios, teclados, dispositivos de control del cursor y semejantes, pero no se muestran en la FIG. 1.

25 El sistema 50 incluye un cartucho 54 que también puede verse como una cámara de la muestra o una cámara de reacción. El cartucho 54 es preferiblemente un cartucho de un solo uso, desechable que puede acoplarse fácilmente a las partes no desechables del sistema 50. El sistema 50 también incluye una fuente de titulante 58, una válvula de control del titulante 68 y una fuente de presión del titulante 60. El titulante es comúnmente protamina usada a una concentración pre-determinada, fija. La válvula 68 es una válvula Lee® (o cualquier válvula de precisión de dispensación de fluido como ésta) en algunas realizaciones. En otras realizaciones, una bomba de jeringa u otro dispositivo de precisión de dosificación de fluido puede utilizarse para sustituir la fuente de presión del titulante 60 y la fuente de titulante 58. El cartucho 54 contiene típicamente un electrodo de medición 62, un electrodo de referencia 64 y un elemento de mezclado 66. Los electrodos 62 y 64 así como el elemento de mezclado 66 pueden estar acoplados eléctricamente al controlador 52, por ejemplo, por los cables 70. Un componente acoplado al controlador 52 es un amplificador tampón con una impedancia de entrada muy alta, que le permite realizar una medición potenciométrica de la diferencia en la fuerza electromotriz (FEM) entre el electrodo de medición 62 y el electrodo de referencia 64. También se ilustra una fuente de sangre 56, para alimentarse en el cartucho 54. Para el propósito de la titulación, normalmente es importante que el volumen de la muestra de sangre sea constante.

40 En un uso altamente esquemático de una realización de la invención, un peso o volumen conocido de sangre se inyecta en el cartucho 54. La sangre puede mezclarse con otros compuestos químicos no titulantes tales como citrato de sodio y EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) disódico. Estos dos compuestos químicos son compuestos químicos anticoagulantes para evitar que la muestra de sangre se coagule, útiles cuando se usa como muestra sangre completa fresca heparinizada, típicamente en forma líquida. El elemento de mezclado 66 puede activarse para mezclar la sangre y los compuestos químicos no titulantes, así como el titulante, que se va a añadir después.

45 En una titulación de heparina con protamina, el controlador 52 puede regular la adición del titulante protamina a una velocidad fija a través de la válvula 68 y monitorizar la diferencia en el potencial de salida desde los electrodos 62 y 64. En una titulación general heparina-protamina, la protamina puede añadirse hasta que haya pasado el punto de inflexión en la curva sigmoideal de titulación. La cantidad (concentración) de protamina añadida en el punto de inflexión de la curva de titulación puede determinarse conociendo la concentración del titulante (protamina), su velocidad de infusión y el volumen de la muestra. La cantidad de protamina requerida para alcanzar el punto de inflexión de la titulación y neutralizar la heparina es una función de la cantidad de heparina en la muestra original. Como la protamina se une a la heparina con una estequiometría fija, la concentración de heparina en la muestra puede calcularse a partir de la concentración de protamina requerida para alcanzar el punto de inflexión. Por lo tanto, el conocimiento de la cantidad de protamina requerida para neutralizar la heparina permite el cálculo de la heparina en la muestra.

55 En la práctica común, el titulante puede añadirse a una velocidad constante, hasta que se haya pasado y sobrepasado el punto de inflexión en el potencial eléctrico. Para permitir una medición rápida de la heparina en la

muestra, puede emplearse una infusión en gradiente de la protamina. En dicho método, el titulante protamina puede añadirse rápidamente hasta que se alcanza un primer nivel de potencial, seguido de una velocidad de adición más lenta por encima de ese umbral de potencial. En otro método como éste, el titulante protamina se añade a una tercera velocidad incluso más lenta después de que se haya sobrepasado un segundo umbral. Mediante el uso de velocidades más lentas de la infusión de protamina cerca del punto final de la titulación, puede conseguirse una mejor resolución de las concentraciones de heparina. Además, esto permite una determinación más rápida de la concentración de heparina en la muestra.

La medición de heparina en muestras clínicas puede ser "absoluta" o "diferencial". En la medición absoluta de los niveles de heparina, sólo se realiza una titulación con la muestra. No se aplica ninguna corrección para las contribuciones no debidas a la heparina (efectos de la matriz) en el punto final. En la "estrategia diferencial", la sangre se divide en al menos dos corrientes, habiéndose eliminado, neutralizado o unido completamente la heparina en una corriente antes de entrar en un cartucho. Un "blanco" de sangre puede titularse de esta manera en paralelo con la sangre que todavía tiene la heparina, lo que permite corregir el potencial para las contribuciones no debidas a la heparina. Diferentes métodos, descritos más adelante, ofrecen variaciones respecto al método general descrito anteriormente. En un método, la fuente de presión 60 es una fuente controlada de presión de gas usada para forzar el titulante 58 a través de una válvula a una presión conocida y, por lo tanto, una velocidad conocida, a menudo gota a gota. En algunos sistemas, el líquido se empuja a través de un orificio estrecho. En un método, la fuente de presión 60 es una bomba de vapor, formada por un titulante en un depósito cerrado dispuesto en un contenedor rígido que tiene una mezcla volátil líquido-vapor dispuesta fuera del depósito pero en el interior de la estructura rígida. El control de la temperatura de la estructura rígida controla así la presión de vapor de la mezcla líquido-vapor y controla la presión ejercida sobre el depósito, que controla la fuente de presión del titulante.

En algunos métodos, el elemento de mezclado 66 es un lecho u otro elemento operado magnéticamente. En algunos métodos, el elemento de mezclado 66 es un dispositivo de mezclado de columna de aire, descrito adicionalmente más adelante.

En un método, diferente del método de titulación descrito previamente, un bolo de titulante se añade al cartucho 54, suficiente para neutralizar totalmente la heparina esperada en la sangre. La concentración de protamina remanente se determina a partir de los electrodos 62 y 64, calculándose y usándose la protamina consumida para determinar la cantidad inicial de heparina presente en la sangre. Este método de bolo se describe con más detalle más adelante.

#### Diseños de los Cartuchos

La FIG. 2A ilustra un cartucho 100 que puede usarse para determinar la concentración de heparina usando bien el método de titulación o de bolo. El cartucho 100 incluye un cuerpo de cartucho 102 y un tapón o septo del cartucho 104. El cuerpo del cartucho 102 puede estar formado por vidrio, mientras que el tapón 104 puede estar formado por goma de silicona o Kraton®. El cartucho 102 puede estar formado en un tubo vacutainer. El tubo puede estar recubierto con EDTA, muy conocido para los expertos en la técnica. El cartucho 100 puede tener un sensor de protamina 106 y un electrodo de referencia 108. El sensor de protamina 106 puede estar compuesto por una membrana polimérica sensible a protamina que está recubierta, por ejemplo, recubierta por inmersión o recubierta por goteo, sobre un electrodo de plata (Ag)/cloruro de plata (AgCl). La composición preferida de la membrana sensible a protamina se describe en otras secciones. El sensor de referencia 108 puede consistir en un electrodo de Ag/AgCl que está expuesto directamente a la muestra. Se ilustra una jeringa de protamina 110 perforando el tapón 104.

En la práctica, el cartucho puede estar formado por un tubo vacutainer de volumen fijo y que tiene un sensor y electrodo de referencia incluidos en la tapa o septo y en el cuerpo. La muestra de sangre puede administrarse perforando la tapa usando una aguja. El vacío puede retirar el volumen exacto de muestra mediante succión. El cartucho puede ponerse en el instrumento de manera que los electrodos estén en contacto con el sistema y el mezclado se inicia con un elemento de mezclado 112 para mezclar la mezcla de heparina, protamina y sangre. La jeringa de protamina puede perforar el tapón y la inyección de protamina comienza la titulación. En el cartucho 100, la fuente de presión de protamina discutida previamente es la jeringa de protamina 110.

La FIG. 2B ilustra el potencial eléctrico diferencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia durante el tiempo a medida que se inyecta la protamina en la muestra.

La FIG. 3A ilustra otro cartucho 114. El cartucho 114 tiene los electrodos 108 y 106 como se ha descrito previamente respecto a la FIG. 2A. El tapón 104 y el elemento de mezclado 112 también pueden ser como se ha descrito previamente. El cartucho 114 incluye una primera parte 116 ("cámara de la muestra") en la que la heparina estará presente y una segunda parte 115 ("cámara blanco") en la que la heparina se eliminará. La heparina puede eliminarse de la segunda parte 115 usando heparinasa o cualquier otra enzima que degrada heparina. En otro método, puede usarse un sustrato inmovilizado, por ejemplo, protamina, poli-lisina, poli-arginina, polibreno o combinaciones de éstos, para unir esencialmente toda la heparina antes de inyectar la sangre en la segunda parte 115 "cámara blanco" del cartucho. En cualquier caso, el fluido resultante que se encuentra en la segunda parte 115 del cartucho esencialmente no tendrá heparina, lo que proporciona un control o blanco que puede usarse para tener en cuenta las contribuciones de las contribuciones no debidas a la heparina (tales como efectos de la matriz

incluyendo hemodilución u otros fármacos). Puede observarse una jeringa de protamina 118, que tiene una primera parte 119 insertada en la primera parte 116 del cartucho y una segunda parte 117 para insertarse en la segunda parte 115 del cartucho. Como se ha discutido previamente, en algunas realizaciones, pueden usarse dos canales diferentes de inyección, teniendo un canal de inyección heparinasa o protamina unida para unir o inactivar eficazmente la heparina antes de que la sangre entre en la segunda parte 115 del cartucho.

La FIG. 3B ilustra el potencial eléctrico diferencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia durante el tiempo tanto para el blanco (la curva de la izquierda) como para la muestra que contiene heparina (la curva de la derecha) a medida que se inyecta la protamina en cada cámara. El punto final de la curva de la cámara blanco a la izquierda corresponde al efecto de la matriz. El punto final de la curva de la cámara de la muestra a la derecha corresponde al efecto de la matriz más la heparina, que prolonga el punto final.

La FIG. 4A ilustra otro cartucho 120 que tiene un sensor de protamina coaxial, tubular y un electrodo de referencia. El cartucho 120 incluye la jeringa de protamina 110 y el tapón 104 como se ha descrito previamente. El cartucho 120 también incluye un tubo vacutainer 122 recubierto de EDTA que tiene un electrodo de medición y de referencia coaxial juntos en un único par de electrodos tubular 121. El par de electrodos 121 incluye un electrodo sensor de protamina 126 dispuesto en un aislante 128 que está dispuesto en un electrodo de referencia tubular 124 dispuesto en un aislante 125. Las capas del aislante 125 y 128 pueden desprenderse selectivamente para exponer el electrodo de referencia y los electrodos sensores de protamina. Una membrana polimérica sensible a protamina puede dispensarse selectivamente o recubrirse en la punta del electrodo sensor de protamina 126 expuesto en la parte inferior. El par de electrodos 121 puede ofrecer la ventaja de facilitar la fabricación, ya que ambos están incorporados en el mismo cable del electrodo.

La FIG. 4B ilustra una sección transversal del electrodo 121. Yendo desde fuera hacia dentro, la capa exterior del aislante 125 está seguida de la capa Ag 124 para usarse como el electrodo de referencia, seguido de la capa del aislante 128, seguido del conductor Ag 126 para usarse para el electrodo de trabajo. Yendo desde la parte superior a la inferior, el aislante exterior 125 puede desprenderse para formar el electrodo de referencia, seguido de la capa interior del aislante 128 que puede desprenderse para formar el electrodo de trabajo después de recubrir con la membrana del electrodo selectivo de ion (ISE).

La FIG. 4C ilustra una vista superior, transversal, de sección transversal de otra versión alternativa del diseño coaxial con el par de electrodos 390 que tiene un aislante 391, un electrodo de referencia 393 y un electrodo de medición 392. Como se muestra en la FIG. 4D, los electrodos 392 y 393 pueden extenderse en paralelo en el aislante 391, con el aislante desprendido cerca del extremo. El electrodo de referencia 393 puede tener un recubrimiento de membrana ISE 394 o permanecer sin recubrir, dependiendo de la realización. El electrodo sensor 392 puede tener un recubrimiento de membrana ISE 394.

Las FIGS. 5A-5D ilustran un diseño de sensor de protamina plano y de cartucho. La FIG. 5A ilustra un sensor de protamina plano serigrafiado 130 desde una vista superior. El sensor 130 puede hacerse usando serigrafía u otras tecnologías de deposición o formación de capas muy conocidas para los expertos en la técnica. Respecto tanto a la FIG. 5A como a la FIG. 5B, los electrodos sensores y de referencia así como los canales de protamina se incorporan en un material de sustrato (base), que puede ser un polímero termoplástico, policarbonato, acrílico o cualquier otro material de sustrato adecuado. El sustrato 132 puede tener un canal de administración de protamina insertado en el material de sustrato, mostrado en 136. En algunas realizaciones, el canal 136 es una aguja o un lumen. El canal de administración de protamina 136 se abre hacia la superficie en la parte inferior del sustrato. El canal de protamina 136 interactúa con el mecanismo de administración de protamina, por ejemplo, una bomba de jeringa, para administrar la protamina en la muestra.

Continuando hacia arriba, pueden depositarse tiras metálicas conductoras en el sustrato, con una primera tira conductora 133 depositada para el electrodo sensible a protamina y una segunda tira conductora de la electricidad 134 depositada para el electrodo de referencia. Las tiras conductoras de la electricidad 133 y 134 pueden estar formadas por plata/cloruro de plata. Las tiras conductoras pueden depositarse por técnicas apropiadas tales como serigrafía, pulverización catódica o deposición química de vapor. Puede depositarse una capa aislante 135 sobre las tiras eléctricas para aislarlas eléctricamente. Se pueden dejar expuestos los electrodos para que los contactos eléctricos 133 y 134 interactúen con el equipo de adquisición de datos. Una membrana de polímero sensible a protamina 137 puede depositarse sobre el conductor 133 para servir como el electrodo de trabajo. La parte 138 puede dejarse como Ag/AgCl sobre el conductor 134 para servir como el electrodo de referencia.

En la práctica, el sensor 130 puede incorporarse como un lado de un receptáculo cerrado o cámara de la muestra 139, ilustrado en las FIGS. 5C y 5D. La cámara se llena con sangre (o muestra) hasta un nivel por encima de los dos electrodos (137 y 138) y del canal de administración de protamina 136. Durante la medición, la protamina se administra a través del canal de administración 136. Pueden usarse dispositivos similares que no tengan el canal de administración de protamina como se ilustra en las FIGS. 5A y 5B. En estos dispositivos similares, la protamina puede administrarse usando un método diferente tal como una aguja o canal separado incorporado en otro lugar en el cartucho.

La FIG. 6 ilustra un par de electrodos 140 que incluye un electrodo de medición 142 y un electrodo de referencia 144. El par de electrodos 140 incluye un sustrato 143 que tiene una vía conductora 146 para el electrodo de medición y una segunda vía conductora 154 para el electrodo de referencia. Las vías conductoras 146 y 154 pueden estar formadas por plata o cualquier otro conductor eléctrico adecuado. El electrodo de medición 142, en la realización mostrada, incluye una primera capa 147 formada por cloruro de plata. Una segunda capa 148 que incluye un hidrogel se dispone sobre la capa de cloruro de plata. La capa de hidrogel 148 puede usarse en algunas realizaciones para mantener el electrodo en condiciones húmedas, hidratadas, de manera que no requiere ninguna hidratación antes de usarse. Una tercera capa 149 incluye la capa ISE. Como se discute más adelante, una capa ISE incluye un polímero, un plastificante y un ionóforo para permitir la respuesta selectiva a un analito específico en la muestra. Como se discute más adelante, algunos electrodos usan un poliuretano lipofílico que no tiene esencialmente grupos éter o éster en el núcleo del polímero. El polímero puede incluir partes alifáticas lineales y cíclicas del núcleo así como partes aromáticas del núcleo, entre los grupos uretano. Un conjunto de electrodos utiliza DNNS como el ionóforo para detectar protamina. Algunos electrodos utilizan NPOE como plastificante. También puede incluirse una capa superior 150, que forma una capa protectora sobre las demás capas. La capa protectora puede diseñarse para tener un punto de corte de peso molecular alto, para permitir que sólo las moléculas por debajo de un umbral de peso molecular entren en contacto con la capa de electrodo selectiva de ion 149.

El electrodo de referencia 144 varía con las distintas realizaciones de la presente invención. En la realización ilustrada en la FIG. 6, el electrodo de referencia 144 incluye una primera capa 155 formada por cloruro de plata, una segunda capa 156 formada por un hidrogel, una tercera capa 157 formada por un polímero y una cuarta capa 158 formada por un material protector. Las capas 155, 157 y 158 pueden ser similares a las capas 147, 149 y 150, descritas previamente. La capa polimérica 157 puede estar formada, en algunas realizaciones, por el mismo polímero que la capa ISE 149 y el electrodo de medición 142. El electrodo de referencia 144 puede tener una capa polimérica 157 sustancialmente similar al electrodo de medición 142, pero careciendo la capa polimérica 157 del ionóforo mientras que la capa ISE 149 sí tiene el ionóforo. En algunas realizaciones, la capa protectora 150 y 158 pueden tener poros formados en las capas, para permitir la difusión de moléculas grandes hacia la capa de abajo. Las distintas capas descritas en la FIG. 6 pueden depositarse en un sustrato usando muchas tecnologías muy conocidas para los expertos en la técnica, por ejemplo serigrafía, fundición, pulverización catódica, deposición química de vapor, deposición de plasma y/o deposición por goteo. Algunas de estas tecnologías utilizan tecnologías de impresión con chorro de tinta que utilizan tintas, colorantes y/o compuestos químicos especializados. Esta impresión con chorro de tinta puede usarse para depositar repetidamente materiales en capas en un sustrato alimentado a través de la impresora o dispositivo de formación de capas.

Algunas realizaciones de la invención no tienen una membrana o capa polimérica sobre la capa de AgCl en el electrodo de referencia. Algunas realizaciones de la invención sí incluyen un ionóforo en una membrana o capa polimérica sobre la capa de AgCl en el electrodo de referencia, pero en una concentración sustancialmente diferente de la que está presente en el electrodo de medición, como se discute con más detalle más adelante.

Las FIGS. 7A y 7B ilustran un sensor de protamina 140 que tiene una capacidad sensora para múltiples analitos. El sensor 140 incluye generalmente una parte superior 141 que puede tener canales de flujo en ella y estar cerrada y una parte inferior 142 que puede tener el canal de flujo expuesto a un cartucho o parte de la cámara de la muestra, como se ha discutido respecto a las FIGS. 5A-2DD. La FIG. 7B ilustra parte de la parte superior 141 y parte inferior 142, en una vista en perspectiva, mostrando un canal de administración de calibrador expuesto 147 y un canal de administración de protamina expuesto 146. La muestra puede introducirse en la cámara de la muestra y en la parte inferior 142 usando una aguja o un canal de administración, como se ha discutido previamente. En el canal 147 se muestra un sensor de protamina 148, en el que el electrodo de referencia y otros sensores (mostrados en la FIG. 7A) también pueden estar dispuestos en el canal 147. Los canales 146 y 147 pueden estar formados en un sustrato, como se ha descrito previamente, teniendo aquí una parte inferior 143 y una parte superior o cubierta 144.

El sensor 140 es un sensor para múltiples analitos. En el ejemplo ilustrado, el sensor 140 incluye un electrodo de referencia 150, un sensor de pH 151, un sensor de sodio 152, un sensor de potasio 153 y un sensor de protamina o electrodo 148. También pueden incluirse en el sensor 140 otros sensores y electrodos de analitos. Los sensores pueden depositarse en una cavidad, en el canal del calibrador 147. Los sensores distintos del sensor de protamina pueden calibrarse previamente para su pendiente de respuesta antes de usarse.

El sensor 140 puede incluir un accionador 155 para administrar el calibrador a través del canal del calibrador 147 y un accionador de protamina 156 para administrar la protamina a través del canal de protamina 146. Las demás fuentes de administración de protamina discutidas en otra parte de la presente solicitud pueden usarse para administrar protamina en algunos sistemas.

En la práctica, antes de la introducción de la muestra, puede administrarse una disolución de calibrador, que contiene concentraciones conocidas de cada ion que tiene un sensor, a través del canal de calibrador 147 y pasarse sobre los sensores. El volumen de la disolución de calibrador puede ser mucho menor que el volumen de la muestra, por ejemplo, menos de 5% del volumen de la muestra. Esto puede servir para establecer una respuesta en la línea base para los sensores. Una vez que los sensores han alcanzado una lectura estacionaria, los valores de los sensores pueden anotarse y registrarse.

La muestra puede introducirse entonces en el cartucho para entrar en contacto con la parte inferior 142 del sensor, con mezclado usando los métodos y dispositivos descritos en otro lugar de la presente solicitud. Los cambios a la salida del sensor, distinto del sensor de protamina, se basan en las concentraciones de analito, siendo el cambio de la respuesta proporcional a la concentración de analito, de manera que puede usarse la ecuación de Nernst para calcular la concentración de analito. La respuesta del sensor de protamina, y de cualesquiera otros sensores de poliiones, puede analizarse como se describe en otro lugar de la presente solicitud. La titulación de protamina (o infusión de bolo) puede iniciarse y la respuesta de la salida del sensor de protamina analizarse para determinar la concentración de protamina como anteriormente. El mezclado de la muestra debe continuar durante la titulación, para asegurar el mezclado de la protamina del canal 146 con la muestra, para detectarse en la región de los sensores.

Las FIGS. 8A, 8B y 8C demuestran todas un sensor plano junto con su material de sustrato que se ha formado en un receptáculo tubular para albergar la muestra. La FIG. 8A ilustra un sustrato 162 que tiene un electrodo sensor 164 y electrodo de referencia 167 depositados en un sustrato, que incluye las placas de contacto 165 y 168 y la placa de referencia 163 y la placa de detección de ion, por ejemplo protamina, 166. Los electrodos pueden depositarse usando serigrafía u otros métodos descritos en otro lugar de la presente solicitud. Sobre los electrodos puede depositarse una capa dieléctrica 169, excepto para las regiones indicadas con el número de referencia 161. Puede depositarse una membrana sensible a ion tal como una membrana sensible a protamina para formar una placa 171 sobre la placa 166.

La FIG. 8B ilustra el sustrato 162 enrollado en una forma tubular, con el electrodo sensor 163 y electrodo de referencia 166 dispuestos en el interior de la pared del tubo.

La FIG. 8C ilustra el tubo de 8B desde el lateral, mostrando de nuevo el sustrato 162 que presenta los electrodos 163 y 166. Desde la parte superior a la inferior, puede observarse un cierre superior 170, seguido de una disolución de muestra 172 que porta varios lechos magnéticos recubiertos de EDTA 174 en ella (los lechos magnéticos recubiertos de EDTA pueden estar ya incorporados en el tubo antes de la introducción de la muestra). Los lechos magnéticos recubiertos pueden usarse para mezclar o agitar la muestra. También se muestra un tapón inferior 176, que puede estar formado por Kraton®. El Kraton puede usarse como el material del tapón para asegurar que el cartucho puede cerrarse completamente para formar un vacío para retirar la muestra. El Kraton se perfora fácilmente con una aguja y forma un cierre hermético alrededor de la aguja, evitando así que la muestra gotee. Puede observarse una aguja 178 para perforar el tapón 176. Una fuente de protamina se ilustra de manera muy esquemática en 180, que se fuerza a través de la aguja 178 por una fuente de presión 182. La fuente de presión 182 puede ser un accionador lineal, tal como una jeringa. Al finalizar la titulación, la aguja puede extraerse.

La FIG. 8D ilustra un cartucho similar al de las FIGS. 8A-8C, que tiene paredes de sustrato 162 que contienen una disolución de muestra 172 como se ha discutido previamente. Los electrodos, etc, de las FIGS. 8A-8C no se muestran en la FIG. 8D. Se muestra una punta o aguja hueca 185 que tiene un lumen 186 en ella, dispuesta frente a una bolsa que contiene protamina 187, que puede estar hecha de Kraton. Un accionador lineal 188 se ilustra esquemáticamente, para empujar la bolsa 187 contra la aguja 185. La aguja 185 puede tener un calibre de 31 o mayor (diámetro menor).

En la práctica, después del inicio de la titulación, el accionador lineal 188 puede empujar la bolsa 187 a la punta 185, perforando la bolsa. La protamina puede ser expulsada como una función del calibre de la aguja y de la presión ejercida contra la bolsa. La bolsa debe tener un grosor razonable para evitar que estalle.

La FIG. 9 ilustra un sistema sensor heparina-protamina 190 que incluye un diseño de sensor plano acoplado con agitadores rotatorios o planos. El sistema 190 incluye una primera cámara de la muestra 191 para contener la sangre que tiene heparina y una segunda cámara de la muestra 192 para contener una muestra blanco, sangre que no tiene heparina. La primera cámara 191 incluye un electrodo sensor de protamina 195 acoplado a un conductor 196 acoplado a una placa 197. La cámara de la muestra 191 también incluye un electrodo de referencia 201 acoplado a una tira conductora 193 acoplada a una placa 194. Un agitador plano 198 se dispone en la cámara de la muestra 191 para agitar los contenidos de la cámara de la muestra. El agitador rotatorio puede ser un elemento agitador magnético con forma que puede rotarse para mezclar los contenidos de la cámara.

De manera similar, la segunda cámara de la muestra 192 incluye un sensor de protamina 200, un sensor de referencia 202 y un agitador rotatorio o plano 203. Cada una de las cámaras 191 y 192 puede estar ventilada a través de tapones de membrana de Teflon® 216 y 215, respectivamente. Este diseño permite un método de autorregulación para el relleno de la muestra. A medida que el usuario empuja la muestra a través del aire o gas en la cámara de la muestra, el aire o gas se ventila a través del tapón de Teflon. Cuando la muestra líquida golpea el tapón, la introducción adicional de líquido se hace difícil debido a la naturaleza del tapón. El tapón de Teflon está típicamente en la forma de una membrana o cinta fina. En esta configuración, es típicamente microporoso y funciona como un buen ventilador de gas. La baja humectabilidad del Teflon y su pequeño tamaño de poro evitan que el líquido pase a su través. Por el contrario, el Teflon sólido no tiene esta propiedad.

Un puerto de entrada de sangre 205 se acopla a través del primer canal 206 alimentando la primera cámara de la muestra 191 directamente. Un segundo canal 207 se extiende desde el puerto de entrada de la sangre 205 a través

de una cámara de eliminación o inactivación de la heparina 208 que conduce a la segunda cámara de la muestra 192. La cámara de eliminación o inactivación de la heparina 208 puede incluir heparinasa unida, heparinasa móvil, poli(lisina) unida o protamina unida, poli-arginina, polibreno u otras policonaciones que unen heparina, los cuales pueden eliminar, inactivar, degradar o neutralizar la heparina antes de la entrada de la sangre en la segunda cámara de la muestra 192. La heparinasa o poli(lisina) puede inmovilizarse en un soporte adecuado, por ejemplo, celulosa u otra matriz porosa adecuada que ofrezca una resistencia baja al flujo de la muestra.

Una fuente de disolución de protamina 212 se acopla de manera similar a la primera cámara de la muestra a través del canal 213 y a la segunda cámara de la muestra a través del canal 214. En otra realización, no hay acoplamiento en T, teniendo en su lugar un canal separado de infusión de protamina desde cada fuente presurizada de protamina. Puede usarse un accionador lineal u otra fuente de presión 210 para forzar la disolución de protamina en la primera y segunda cámaras de muestra. Dichas diferentes técnicas de medición que emplean una muestra blanco conjuntamente con una muestra heparinizada proporcionan una medición más exacta de la concentración de heparina en la muestra, porque tienen en cuenta las variaciones de la respuesta del sensor causadas por los efectos de la matriz. El uso de la cámara de la muestra de sangre que contiene heparina y la cámara de la muestra blanco puede usarse para proporcionar unas mediciones más exactas de la heparina ajustando los potenciales del electrodo para las contribuciones no debidas a la heparina.

Las FIGS. 10A y 10B ilustran un sistema de medición de heparina 220 que utiliza múltiples electrodos y múltiples alicuotas de contribución de protamina seca. El sistema 200 incluye un sustrato 222 que tiene una fuente o puerto de sangre 224 acoplado a un canal de flujo en serpentín 226 que está acoplado finalmente a un puerto de toma o succión de muestra 234. El canal de flujo de la muestra de sangre 226 se extiende a través de numerosos pares de electrodos o sensores de medición de protamina 228. Las alicuotas de protamina 230 (teniendo cada una preferiblemente la misma concentración) pueden disponerse entre los sensores 228. El sistema 220 puede concebirse para tener regiones de canales que contienen sangre 232 que preceden un frente principal 235 con regiones que esencialmente no contienen sangre 234 a partir de entonces. En algunos ejemplos de la invención, las regiones que contienen protamina 230 contienen protamina seca que puede mezclarse con el flujo de sangre que avanza y ser transportada a los sensores posteriores de medición de protamina 228 aguas abajo. En algunas realizaciones de la invención, el canal de flujo 226 se basa en un mezclado normal de la sangre y la protamina que resulta del flujo. En otros ejemplos, para incrementar el mezclado pueden usarse contribuciones que incrementen el flujo, tales como mezcladores turbulentos en línea, mediante ultrasonidos, o lechos movidos magnéticamente.

La FIG. 10B ilustra un sensor que mide protamina 228 con más detalle, incluyendo el canal de flujo de sangre 236 que tiene un electrodo sensible al ion protamina 237 y un electrodo de referencia 238, descritos previamente.

Puede considerarse que el sistema 222 realiza una titulación por etapas de la muestra de sangre con alicuotas de protamina. En esta titulación por etapas, las alicuotas iniciales de protamina probablemente se consumirán totalmente al unirse a la heparina. Así, el potencial eléctrico a través de los sensores iniciales de protamina deberá ser muy bajo. Al añadirse más alicuotas de protamina, en algún momento la protamina añadida excederá la necesaria para unirse a la heparina y resultará en una elevación del potencial eléctrico del sensor que mide protamina. Las adiciones adicionales de protamina resultarán en respuestas progresivamente mayores de los sucesivos sensores de protamina y resultarán finalmente esencialmente en un plató de las mediciones de los cambios de respuesta de los sensores de protamina. Las mediciones de los sensores de protamina que tienen un valor intermedio pueden usarse para acotar la concentración de heparina en la sangre. Aunque el punto de inflexión de la titulación o el cambio máximo del potencial con el tiempo no pueda localizarse exactamente, esta localización puede localizarse dentro de uno o más segmentos del sistema de sensor de múltiples segmentos. La cantidad de protamina total añadida a partir de varias alicuotas antes del sensor de protamina que tiene el valor intermedio de potencial puede usarse para determinar la protamina total que ha entrado hasta ese punto. La relación estequiométrica de la unión de la protamina puede usarse entonces para determinar la concentración de heparina en la muestra inicial.

En la práctica, puede introducirse un volumen fijo de muestra en el puerto de entrada de la muestra. El volumen de sangre puede controlarse con un dispositivo de succión conjuntamente con válvulas. La muestra de sangre se hace avanzar sobre la primera placa sensora. Se anota la diferencia de respuesta entre el electrodo de trabajo y de referencia. La respuesta de la primera placa sensora es la respuesta en la línea base, ya que no hay protamina en la muestra de sangre en ese punto. En algunos métodos, la muestra se mueve hacia atrás y adelante sobre la primera placa sensora para permitir que el sensor esté expuesto a una muestra más representativa.

La muestra puede hacerse avanzar sobre la primera cantidad de protamina. La protamina puede disolverse en la muestra y neutralizar la heparina presente, hasta el grado que es posible por la cantidad limitada de protamina presente. De nuevo, la muestra puede moverse hacia atrás y adelante sobre la cantidad para obtener un mezclado mejor. La muestra puede hacerse avanzar sobre la segunda placa sensora y anotarse la respuesta diferencial entre el electrodo de trabajo y de referencia. La muestra puede moverse hacia atrás y adelante sobre cualquiera o todas las cantidades de protamina o placas sensoras, dependiendo de la realización. Este avance de la muestra puede repetirse hasta que la muestra haya pasado el último sensor, hasta que se observe la saturación o hasta que se encuentre un punto de inflexión, de nuevo dependiendo de la realización.

La FIG. 10C ilustra un ejemplo profético de un resultado de una titulación del sensor de las FIGS. 10A y 10B para dos muestras que tienen concentraciones de heparina bajas y altas. Los puntos individuales están marcados con el número del sensor, siendo el sensor #1 el primer sensor, situado antes de la primera alícuota de protamina. La curva de titulación para una primera muestra de sangre que tiene una curva de concentración de heparina baja 240 puede verse en 240, que tiene una concentración de heparina baja. En este ejemplo, el tercer sensor de protamina en serie tiene registrado un valor intermedio que tiene una velocidad de cambio del potencial grande respecto al tiempo, observado en 241. La protamina total en las dos alícuotas añadidas antes del tercer sensor puede usarse para determinar la concentración de heparina en un rango estimado. Puede observarse que la adición continuada de protamina resulta en un plató en 244.

La curva de titulación para una segunda muestra de sangre que tiene una concentración de heparina alta puede observarse en 242. La ausencia de una respuesta en los sensores 1 a 4 indica que toda la protamina es utilizada para neutralizar la heparina. La observación de una respuesta en el quinto sensor indica que la protamina introducida en la alícuota 5 está en exceso después de neutralizar toda la heparina de la muestra. En el quinto sensor, permanece algo de protamina. En 243 se observa una pendiente máxima en el sexto sensor de protamina. La adición posterior de protamina causa la saturación de las respuestas de los sensores 8-10 y resulta esencialmente en el plató observado en 245. La concentración de heparina en la muestra es proporcional al sensor cercano a la mayor velocidad de cambio del potencial diferencial frente al número del sensor. El sistema 220 puede permitir la eliminación de la necesidad de una bomba de jeringa ya que el avance de la muestra puede conseguirse por la succión aplicada aguas abajo de los sensores. En algunos sistemas, pueden usarse tanto presiones positivas como negativas para mover la muestra atrás y adelante sobre los sensores.

La FIG. 11 ilustra otro sistema de sensores 260 que incluye sistemas de múltiples sensores tal como el ilustrado en la FIG. 10A. El sistema de sensores 260, en el ejemplo mostrado, muestra ocho sistemas de alguna manera similares al ilustrado en la FIG. 10A. El sistema 260 incluye una primera matriz de placa sensora 262, una segunda matriz de placa sensora 264 y una tercera matriz sensora 266. Las ocho matrices de placas sensoras pueden incluir cada una un mezclado en serpentina o en espiral y una vía de medición de flujo 273 que tiene un primer extremo 272 y un segundo extremo 270. Una vez que la medición se ha completado, la matriz sensora puede rotarse para exponer la siguiente matriz sensora y el proceso de la muestra se repite. Dicha rotación se indica con la flecha 268. Se ilustran los múltiples sensores de medición y las múltiples alícuotas de protamina, como se ha descrito previamente respecto a la FIG. 10A.

La FIG. 12A ilustra otro sistema de múltiples sensores 280 que comparte algunas similitudes con el sistema ilustrado en la FIG. 10A. El sistema 280 opera en paralelo mientras que el sistema 220 de la FIG. 10A opera en serie. El sistema 280 incluye un puerto de entrada de la muestra 282, una región colectora de distribución de la sangre 284 y múltiples vías que dan lugar a un puerto de succión o toma de la muestra 298. El sistema 280 de la FIG. 12A incluye ocho canales de flujo de la muestra 286 a 288. También pueden observarse ocho alícuotas de protamina 290 a 292. El número de canales - ocho, es sólo representativo. En la práctica, podría ser perfectamente mayor que éste. Cada una de las múltiples regiones contribuyentes 290 a 292 puede incluir cantidades crecientes de protamina. Finalmente, también se ilustran en la FIG. 12A ocho sensores de medición de protamina 294 a 296. El sensor que mide protamina de la matriz de sensores entre 294 y 296 que registra un valor de potencial eléctrico intermedio puede usarse para estimar el punto de inflexión de la "titulación" con protamina de heparina.

La FIG. 12B ilustra un resultado profético de usar una matriz de múltiples sensores similar a la mostrada en la FIG. 12A, excepto en que en este caso la matriz de múltiples sensores tiene más de ocho canales en paralelo. La FIG. 12B incluye un gráfico de la concentración de protamina frente al número de sensor en 300. Cada sensor se expone a una muestra de sangre que se ha mezclado con una concentración creciente de protamina. La curva de titulación para una primera muestra de sangre que tiene una concentración baja de heparina se ilustra en 302, resultando la tercera concentración de protamina más baja en el potencial eléctrico que tiene la mayor velocidad de cambio. Una segunda muestra de sangre que tiene una concentración mayor de heparina se muestra en 304, teniendo el canal con la sexta concentración más baja de heparina la mayor velocidad de cambio. Un sistema de matriz con múltiples sensores 280 puede requerir más sangre que el sistema 220 de la FIG. 10A. Sin embargo, el sistema de matriz paralelo de la Fig. 12A puede beneficiarse de tener menos pérdida de muestra por adhesión a las paredes de los tubos y también puede evitar problemas acumulativos de tiempos de humidificación del sensor, ya que los sensores se disponen en paralelo en lugar de en serie. Un diseño en paralelo puede permitir medir la muestra en un periodo de tiempo relativamente corto respecto a un diseño en serie.

La FIG. 13A ilustra otro sistema más de sensores múltiples 310 para medir la concentración de heparina usando la adición de protamina. El sistema 310 incluye una entrada de muestra 312 para admitir las muestras de sangre acoplada mediante una válvula 313, un reservorio de protamina 314 y una cámara de medición 318 que contiene una ventana del sensor 336. Puede usarse un puerto de succión o presión positiva 334 acoplado mediante una válvula 335 para hacer avanzar la muestra de sangre desde la entrada de la muestra 312 a través de la cámara de medición 318. Una cinta del sensor 315 incluye numerosos sensores nuevos 316 que pasan la cámara de la muestra 318 y que se convierten en sensores usados 326. Una bobina del sensor 322 puede alimentar la cinta 315 que presenta los sensores y tomarse por una bobina de toma 324. Puede observarse un cabestrante 320 para transportar la cinta 315 después de la cámara de medición 318.

Puede observarse un reservorio de lavado 328 que puede contener fluido de lavado usado para limpiar la cámara de medición 318 entre una muestra y otra y entre el uso de los nuevos sensores que avanzan 316. Puede usarse un reservorio de desechos 332 para albergar el fluido de lavado usado del reservorio de lavado 328.

5 La FIG. 13B muestra la cinta 315 que porta numerosos sensores de medición de protamina 316. La FIG. 13C ilustra un sensor de medición de protamina 316 que incluye un electrodo sensible a protamina 317 y un electrodo de referencia 319, como se ha discutido previamente. La FIG. 13E ilustra la cámara de medición 318 y el cabestrante 320 separados entre sí, lo que permite que las bobinas 322 y 324 roten para eliminar los sensores gastados 326 y el avance de sensores no usados 316 a la cámara de medición 318.

10 La FIG. 13D ilustra la cámara de medición 318 con más detalle. La cámara de medición 318 puede incluir un puerto de la muestra 340 (que está acoplado a la entrada 312 de la FIG. 13A) acoplado a un puerto de succión 342 (que está acoplado al puerto 334 de la FIG. 13A) para introducir la muestra de sangre en la cámara 318. La muestra de sangre se introduce en la cámara después de la ventana 336. La cámara de la muestra incluye una ventana del sensor 336 en la que el sensor puede situarse y mantenerse por el cabestrante 320 durante la medición de la muestra. Un puerto de lavado y de entrada de protamina 344 (que está acoplado a 327 de la FIG. 13A) puede observarse acoplado a un puerto de desecho 346 (que está acoplado a 331 de la FIG. 13A). Se suministra protamina a la cámara de medición 318 desde el reservorio de protamina 314 para determinar la concentración de heparina mediante el uso del sensor 316, seguido de un fluido de lavado para lavar la cabeza del sensor, suministrado desde el reservorio de lavado 328.

20 En una realización, el puerto de entrada de la muestra 340, el puerto de desecho 346 y el puerto de titulante/lavado 344 están localizados en la parte inferior de la cámara de la muestra. El puerto de manipulación de la muestra 342 está localizado en la parte superior de la cámara de la muestra. El contacto eléctrico con los sensores puede hacerse desde la parte trasera de los sensores, con la interfaz eléctrica contenida en el mecanismo de cabestrante 320, que también ayuda en el posicionamiento de los sensores 316 sobre la ventana 336.

25 En la práctica, antes de empezar el ensayo, los sensores pueden situarse en la ventana de la cámara de la muestra y la ventana de la cámara se cierra. En algunos dispositivos, el cierre se efectúa empujando la cinta del sensor en la ventana con el cabestrante 320. Se muestra el sensor de protamina 316 presionado contra la ventana 336. Las válvulas de entrada de la muestra y las válvulas de succión/soplado pueden abrirse para accionar la muestra.

30 La succión puede iniciarse a través del puerto de succión para introducir la muestra en la cámara de la muestra. El volumen de la muestra puede controlarse por el tiempo de apertura de la válvula, dosificación, volumen de succión u otros métodos adecuados. Las válvulas pueden cerrarse después de que la muestra se haya introducido en la cámara. La válvula en el puerto de titulante/lavado puede abrirse para empezar la titulación con protamina. El accionador lineal u otra fuente dispensa la protamina en la cámara de la muestra y realiza la titulación. Una vez que la titulación se ha completado, la válvula en el puerto del titulante/lavado puede cerrarse. La disolución de la muestra ensayada puede empujarse al reservorio de desecho 332. Esto puede hacerse abriendo las válvulas en los puertos de desecho y succión/soplado y purgando la cámara de la muestra. Puede aplicarse presión desde el puerto de soplado para empujar la muestra fuera de la cámara. Las válvulas del puerto de succión/soplado y de los puertos de titulante/lavado pueden abrirse para lavar la cámara. Puede aplicarse succión a través del puerto de succión para introducir la disolución de lavado en la cámara de la muestra. La barra de agitación u otro elemento de mezclado puede ponerse en marcha para ayudar en el proceso de lavado. La cámara de la muestra puede purgarse de la disolución de lavado y secarse realizando las mismas acciones usadas para purgar la cámara de la muestra, siendo empujada la disolución de lavado en el reservorio de desecho 332. El mecanismo de interfaz del sensor puede retraerse, alejando de esta manera el sensor. La bobina del sensor puede hacerse avanzar a la posición de la siguiente placa sensora en la ventana para cerrar la cámara.

45 El puerto de succión/soplado 334 de la FIG. 13A también puede usarse (como se muestra en la Fig. 13E) para proporcionar alternativamente succión para retirar la sangre de la cámara de medición 318, seguido de una presión positiva usada para soplar el fluido de lavado desde la cabeza de medición 318. Así, pueden usarse succión y presión positiva secuencialmente para proporcionar un flujo de sangre a la cabeza de medición, lavar y secar con aire la cabeza de medición para una muestra posterior.

50 El sistema 310 puede proporcionar así un pocillo reutilizable para contener muestra y una bobina que avanza que contiene sensores de un único uso. Un casete puede albergar las disoluciones de lavado y de desecho y puede activarse por un mecanismo de succión o de soplado accionado por válvulas que se abren secuencialmente. El diseño es adaptable para muestreo en línea y manejo de múltiples muestras. Las capacidades del sensor también pueden ampliarse según sea necesario.

55 La FIG. 14A ilustra otro sistema más 360 para medir la concentración de heparina usando alícuotas de protamina seca. El sistema 360 es similar al sistema 220 de la FIG. 10A, con múltiples cantidades 365, 366, 367, etc, de la misma concentración de protamina a lo largo de un canal 369. Sin embargo, la diferencia es que sólo hay una placa sensora 363 para hacer las mediciones. Además, en este caso, la muestra 364 se mueve atrás y adelante entre el sensor 363 y las cantidades de protamina, en lugar de avanzar en la misma dirección. La muestra puede introducirse

a través del puerto de entrada 361 y moverse atrás y adelante por presión positiva/negativa que se aplica entre la entrada 361 y un segundo puerto 362.

En la práctica, la muestra se introduce en el puerto de la muestra 361. Un volumen fijo de muestra se introduce en el canal 369. La muestra fluye sobre la placa sensora 363 y se hace una medición de respuesta en la línea base. La muestra 364 se hace avanzar hacia la primera cantidad de protamina 365, donde la protamina se disuelve en la muestra. La protamina neutraliza toda la heparina en la muestra (si está presente). La cantidad de la muestra puede manipularse apropiadamente para asegurar un buen mezclado. La muestra se hace retroceder a la placa sensora 363 y se hace una medición. Si la cantidad de protamina es mayor que la cantidad de heparina en la muestra, el sensor puede mostrar una respuesta por encima de la línea base. La muestra se hace avanzar hacia la segunda cantidad de protamina 366 y se mezcla. El proceso se repite y la muestra se devuelve a la placa sensora para la medición. El proceso de retroceso/avance se repite. En cada cantidad, más protamina se disuelve en la muestra. Eventualmente, la protamina supera a la heparina en la muestra. La curva de titulación representa la respuesta (dE) frente al número de cantidades a las que se ha expuesto la muestra. La curva de titulación para este diseño es similar a la del sistema 220 de la FIG. 10A, excepto en que el eje x corresponde al número de la cantidad, en lugar de al número del sensor.

La FIG. 14B ilustra el sistema 370 para medir la concentración de heparina usando la adición de protamina. El sistema 370 incluye un primer puerto de la muestra 371, una placa sensora 373, un canal tortuoso 379, un segundo puerto 372 y cantidades de protamina 375, 376, 377, etc. El sistema 370 es similar al sistema 360 de la FIG. 14B, pero tiene un canal tortuoso. El sistema 370 puede usarse de la misma manera que el sistema 360.

Las FIGs. 15A y 15B ilustran otro sistema 380 que tiene un puerto de la muestra/placa sensora 381 en comunicación fluida con varios canales 382, teniendo cada uno una cantidad de protamina en él. Los canales tienen una cantidad creciente de protamina en cada canal. El método resultante puede ser más rápido que un método previo porque la protamina en todos los canales se disuelve al mismo tiempo (a diferencia de disolverse cada una secuencialmente). La mayor parte del tiempo del análisis en una medición se gasta en disolver la muestra y hacerla avanzar atrás y adelante hacia el sensor. Este proceso no está implicado aquí lo que lo hace más rápido.

En una primera etapa, etapa de introducción y mezclado de la muestra, todos los canales se llenan con un volumen fijo de la muestra que disuelve las alicuotas de protamina en cada canal en la muestra. En una segunda etapa, se produce el paso secuencial de la muestra sobre el sensor. En este proceso, la muestra con "protamina disuelta" del canal-1 se pasa en primer lugar sobre el sensor y se registra la respuesta. Después de esto, se pasa la muestra del canal-2 y su respuesta se mide y así sucesivamente. El orden de paso de las muestras es en el orden de concentraciones crecientes de protamina. Como en los diseños previos, una vez que la alicuota de protamina en un determinado canal supera la heparina en la muestra, el sensor muestra una respuesta correspondiente a la protamina libre en ese canal (y respuestas crecientes para los canales posteriores). Este proceso es similar a la adición de cantidades crecientes de protamina a la muestra.

Cada canal también puede tener un dispositivo de ventilación permeable a gases 383 que puede incluir Teflon. La parte superior del sistema 380 puede incluir un distribuidor de válvulas 385 que tiene varias válvulas individualmente direccionables y controlables 384, de manera que permite introducir la muestra en un canal individual para ponerse en contacto con una alicuota de protamina. El sistema 380 es similar al sistema 280 de la FIG. 12A, con la característica de que permite que las alicuotas de protamina se disuelvan en paralelo en lugar de en serie. Sin embargo, sólo hay un sensor en lugar de múltiples sensores. En esta característica es similar al sistema 360 de la FIG. 14A.

En el sistema 380, las cantidades de protamina incrementan su concentración a lo largo de cada canal. El cartucho puede diseñarse para tener un tapón de ventilación que es permeable a gases pero impermeable a líquidos. Una película de Teflon podría conseguir este efecto. Esta característica asegura que se utiliza un volumen fijo de muestra para llenar cada canal. Alternativamente, la bomba puede usarse para introducir la muestra en cada canal. Cada uno de los canales es individualmente direccionable usando un sistema de válvulas (en el instrumento). Para manipular la muestra puede usarse succión/presión. Una única placa sensora 381 está presente en la confluencia de estos canales. Ésta contiene un sensor de protamina y un electrodo de referencia.

En la práctica, la muestra se dispensa en el puerto de entrada de la muestra 381. Un volumen fijo de la muestra se introduce (o empuja) en cada canal. La muestra se mezcla con protamina en cada uno de los canales. El mezclado puede incrementarse con ayudas apropiadas. Cada canal se dirige individualmente para empujar la muestra sobre la placa sensora. Los canales se empujan en orden de concentración creciente de protamina. La respuesta del sensor se registra. La titulación se realiza empujando sucesivamente cada muestra (disuelta en protamina) sobre el sensor y midiendo la respuesta. La representación de las respuestas del sensor frente al canal proporciona la curva de titulación. La heparina en la muestra corresponde al canal en el que se observa el punto de inflexión. Este método permite medir la muestra en un periodo de tiempo relativamente corto.

La FIG. 15C ilustra otro sistema 390 similar al sistema 380 de la FIG. 15A, pero circular. El sistema 390 incluye un puerto de la muestra/placa sensora central 391, acoplado a múltiples canales 392, teniendo cada uno una alicuota creciente de protamina en cada canal 394, y válvulas individualmente direccionables 393.

Método de Bolo de Protamina

Como se ha discutido previamente, la heparina puede medirse en la sangre usando protamina para titular la heparina con la unión de la protamina seguido del uso de un sensor electroquímico sensible a protamina para monitorizar el punto final de la titulación. En este método de detección, la protamina se introduce gradualmente en la disolución de la muestra, con una agitación suficiente para asegurar una unión homogénea entre la protamina introducida y la heparina en la muestra. Se requerirá un sistema relativamente complejo para infundir/dispensar la titulación de protamina, mezclar la heparina y la protamina y seguir el progreso de la titulación.

En un método alternativo, un bolo de protamina se precarga en un cartucho. Este bolo de protamina debe incluir una cantidad suficiente de protamina para neutralizar completamente la heparina máxima esperada en la muestra de sangre. El bolo de protamina puede precargarse en un cartucho cerrado, por ejemplo, e inyectarse una cantidad conocida de sangre a través del cierre y agitar o mezclar de otra manera. Después de un periodo de tiempo adecuado, la disolución que contiene heparina-protamina puede inyectarse en un segundo cartucho que incluye un electrodo sensible a protamina. El mezclado y reacción pueden hacerse así de manera separada y lejos de los electrodos selectivos de iones usados para medir la concentración de protamina.

La calibración puede lograrse usando los métodos descritos en otro lugar de la presente solicitud. Por ejemplo, el tiempo hasta la máxima velocidad de cambio del potencial eléctrico diferencial, máxima velocidad de cambio del potencial eléctrico y el log de la velocidad inicial de cambio del potencial eléctrico pueden usarse conjuntamente con valores de calibración obtenidos previamente para muestras que tienen concentraciones conocidas de protamina o heparina, dependiendo del método.

Así, la concentración de partida de protamina, la concentración final remanente de protamina y la estequiometría conocida de la disolución de protamina pueden usarse para determinar la heparina que se une a la protamina inicial. Este método de bolo también puede usarse cuando la cámara de mezclado está próxima al electrodo sensible a protamina, precargando o inyectando una cantidad en exceso conocida de protamina en el cartucho que alberga el electrodo sensible al ion protamina.

Con el uso de protamina seca precargada, puede eliminarse el sistema complejo de infusión/dispensación de protamina, simplificando así dramáticamente la instrumentación. Este método también puede proporcionar una sensibilidad mejorada. Como la respuesta del sensor depende de la difusión, un bolo de analito aportará más flujo de difusión que las adiciones en pequeños incrementos del analito en las titulaciones más típicas. Así, los solicitantes creen que el método de bolo será más sensible.

Con la mejora de la sensibilidad, siempre que permanezca un exceso de alta concentración de protamina después de que la heparina se haya neutralizado, habrá un flujo suficiente en el sensor como para proporcionar una señal significativa incluso sin la agitación de la muestra. Por lo tanto, el sistema de agitación puede eliminarse, miniaturizando así adicionalmente el sistema sensor.

Este método también puede usarse para realizar múltiples ensayos en el mismo cartucho y, por lo tanto, puede realizarse una calibración integrada y ensayos en paralelo. Si una barra de agitación o elemento de agitación se elimina del diseño, entonces puede eliminarse toda necesidad de controlar cada barra de agitación de la misma manera para cada cámara. El tamaño reducido de la cámara o canal puede hacer que los ensayos en paralelo sean más prácticos.

Agitación de la Columna de Fluido

Las FIGS. 16A-16C ilustran un sistema para mezclar y agitar una disolución a lo largo de los electrodos de medición. Se han usado barras de agitación magnética y placas de agitación magnética para mezclar las mezclas de heparina protamina durante la titulación con protamina de heparina. Sin embargo, este método de mezclado puede limitar la miniaturización del sistema. La presente invención incluye una columna de fluido oscilante para mezclar las mezclas de heparina y protamina, que puede eliminar la necesidad de un miembro de agitación magnética en la cámara de la muestra que contiene los electrodos. Esto también puede permitir una miniaturización adicional del cartucho que mide la muestra.

La FIG. 16A ilustra un sistema 420 que incluye un cartucho de medición de la muestra 422, una fuente de presión de fluido oscilante 422 y un sistema de medición de electrodos 424. El cartucho 422 incluye una cámara de la muestra 426 en él, que contiene el par de electrodos 432 que está acoplado a través de cables 433 al sistema de medición 424. Puede observarse que la cámara de la muestra 426 incluye tres partes, una parte llena con un fluido o gas compresible 440, una parte que contiene el analito líquido 438 y una parte de presión oscilante 436. La fuente de presión oscilante 422 está acoplada a través de un tubo 434 a un puerto 428 comunicado con la parte de presión oscilante 436 de la cámara de la muestra 426. La fuente de presión oscilante 422 puede comprender aire, que puede administrarse con una presión variable a través del tubo 434 a la parte de la cámara de la muestra 436. El fluido o gas compresible en la parte de la cámara de la muestra 440 puede ser aire. Puede observarse un puerto de introducción de la muestra 430 que puede usarse para inyectar la muestra de sangre y la protamina en la cámara de la muestra 426. El titulante protamina puede infundirse a través del puerto 430 en algunas aplicaciones. La parte 440 es, en efecto, una cavidad ciega que, al estar llena de fluido o gas compresible, se contraerá y expandirá en tamaño

en respuesta a la presión variable administrada a través del tubo 434. Una presión variable se indica con la flecha 441 que causa el movimiento. Cualquier fluido, gas u otro material compresible que no afecte de manera adversa la medición de los electrodos y el analito puede usarse en la parte 440.

#### Fuente de Titulante de Presión Constante

- 5 Los sistemas de titulación que usan un dispensador líquido basado en una válvula solenoide requieren una fuente de presión precisa para proporcionar la fuerza motriz para dispensar el líquido. Bajo los mismos parámetros de apertura de válvula y presión constante, pueden dispensarse volúmenes precisos de las gotitas de líquido hasta los nanolitros. Una fuente de presión fácil de usar, con bajo mantenimiento y económica sería valiosa para esta aplicación. En la presente invención, este sistema puede usarse en la titulación de la heparina mediante el control preciso de la cantidad del titulante protamina que se dispensa. Los dispositivos actuales para dispensar volúmenes de titulación usan habitualmente una bomba de jeringa. Otros han usado una bolsa de titulante que contiene líquido en una cámara de gas presurizada, en la que la presión del gas se mantiene con una bomba de gas. Una fuente de presión del titulante fácil de usar, económica y más fácil de controlar sería ventajosa. En particular, un sistema que no requiera una bomba de jeringa controlada sería beneficioso.
- 10
- 15 Las FIGS. 17A y 17C ilustran un sistema 460 que utiliza una bomba de vapor químico. Una fuente de fluido dirigida por una presión de vapor químico está siendo utilizada actualmente en el sistema de administración de fármacos implantable Isomed®, fabricado por Medtronic (Minneapolis, Minnesota).

La FIG. 17A muestra el sistema 460 que incluye un contenedor cerrado herméticamente que incluye una parte inferior 464 y una tapa superior 466 asegurada con rosca a la parte inferior 464. Una bolsa llena de fluido que contiene el titulante 462 se dispone en el contenedor cerrado herméticamente. Un líquido volátil, por ejemplo, el fluorocarbono FC87 (disponible en 3M, Minneapolis, Minnesota) también puede incluirse en la carcasa cerrada herméticamente. El líquido volátil se muestra en 471 en una fase líquida y en 470 en la fase gaseosa. La presión administrada por el líquido volátil y ejercida sobre la bolsa 462 es una función de la temperatura del líquido en la carcasa cerrada herméticamente. La temperatura de la carcasa y del líquido en ésta puede proporcionarse por serpentines calefactores 472 enrollados alrededor de la parte de la carcasa 464. Los contenidos de la bolsa pueden administrarse fuera de la carcasa cerrada herméticamente a través del tubo de administración 468 que pasa herméticamente a través de la carcasa.

20

25

La presión en el interior del tubo 468 puede controlarse directamente o indirectamente de varias maneras, dependiendo de la realización de la invención utilizada. Puede usarse un transmisor de la presión o transductor de la presión 474 para medir directamente la presión del titulante que se está administrando. Alternativamente, puede disponerse un transductor de la presión 476 en el interior de la carcasa cerrada herméticamente para medir directamente la presión en el interior de la carcasa cerrada herméticamente. La señal de la presión también puede pasarse herméticamente a través de la carcasa. En otro método más, la temperatura en el interior de la carcasa o de la carcasa en sí misma puede medirse por un transductor de la temperatura 478. En cualquier caso, la velocidad de administración del titulante debe usarse para calibrar el sistema, tanto si se usan mediciones de presión como de temperatura para controlar la velocidad de administración. Se espera que un sistema de administración gota a gota para el titulante pueda usarse conjuntamente con el sistema 460.

30

35

La FIG. 17B muestra un sistema de control altamente esquemático para controlar la fuente de presión para la administración del titulante a 468. Un transductor 480, que puede ser bien un transductor de presión o de temperatura, puede administrar una señal de medición al controlador 482, que puede ser, por ejemplo, un controlador PID. El controlador 482 puede aceptar un punto de ajuste 484 dada la presión o temperatura deseada. El controlador 482 puede producir una señal de control 486 que se usa para controlar el calentamiento a través de un calefactor de resistencia en 488 alrededor de la carcasa cerrada herméticamente.

40

Puede generarse una presión de vapor saturado calentando un reservorio líquido por encima de su punto de ebullición. El vapor saturado alcanzará el equilibrio con su fase líquida en la misma cámara. Se producirá el autoajuste del volumen del vapor si el volumen que se va a dispensar desde la bolsa de líquido se reduce por la dispensación. Por lo tanto, una presión constante de direccionamiento está siempre presente.

45

#### Diseño del Electrodo de Referencia para Sensores Electro Químicos de Poliiiones

Los sensores potenciométricos se han usado ampliamente en los laboratorios clínicos para medir potasio, sodio, cloruro y ph, etc. El rendimiento de los sensores, tal como precisión, exactitud y vida útil depende en gran medida del electrodo de referencia. En particular, de la estabilidad y la vida útil del electrodo de referencia. Cuando se aplican sensores potenciométricos en ensayos de sangre completa, la absorción de proteínas tanto en el electrodo de trabajo como en el electrodo de referencia causará una deriva de potencial en ambos electrodos, aunque la diferencia de potencial se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, y ambos electrodos normalmente serán diferentes en cuanto a material y diseño. Sin embargo, la deriva del potencial no se anulará. Para un sensor potenciométrico de poliiiones, aunque es un tipo especial de sensor potenciométrico, el buen rendimiento depende en gran medida del rendimiento del electrodo de referencia.

50

55

La señal a través de la medición diferencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia será una combinación de la contribución de la diferencia real de la actividad/concentración del analito y también de la contribución de la absorción de la proteína no emparejada, adhesión celular e hidratación del electrodo, etc. Esta contribución de la absorción de la proteína y la adhesión celular generalmente es incontrolable e irreproducible en la mayor parte de las situaciones.

Este componente de deriva no emparejado entre el electrodo de trabajo y de referencia se considera y se tiene en cuenta al menos en parte aprovechando el mecanismo de respuesta único del sensor potenciométrico de poliiones. De manera sorprendente, el tiempo de respuesta del sensor de poliiones será significativamente diferente si la membrana selectiva de iones se dosifica con una cantidad diferente de intercambiador iónico. Cuanta más alta es la concentración del intercambiador iónico, más retraso se observa en el tiempo de respuesta a la misma cantidad de analito poliion en la disolución de la muestra. En sistemas de la técnica anterior, si se empieza con un par de sustratos idénticos del sensor, por ejemplo, dos trazas idénticas de plata/cloruro de plata en poliéster en la práctica actual, sólo el electrodo de trabajo de plata/cloruro de plata contiene la membrana polimérica sensible a ion que contiene el intercambiador iónico.

En este aspecto de la presente invención, tanto el electrodo de trabajo como de referencia están recubiertos con la misma mezcla polimérica, pero contienen diferentes concentraciones del intercambiador iónico. El electrodo de referencia está recubierto preferiblemente con la disolución que tiene una concentración mayor de intercambiador iónico, que por lo tanto se retrasará significativamente en su respuesta a la misma cantidad de analito en la disolución de la muestra. Debido a que al hacer esto el material de la superficie del electrodo de trabajo y de referencia serán casi idénticos, es decir, tienen el mismo polímero y plastificante, la absorción de proteínas y la adhesión celular serán casi idénticas y pueden anularse. Usando este diseño, el proceso de hidratación del sensor también será similar tanto para el electrodo de trabajo como de referencia. Para comparación, bajo el diseño y fabricación previos, resultará una deriva de potencial significativa debido a la diferencia en el material de la superficie entre el electrodo de trabajo y de referencia. Otra propiedad de este aspecto de la invención es que cualquier variación o variables en la fabricación, especialmente en la deposición de la membrana polimérica, se anulará probablemente por la deposición de una mezcla polimérica similar en ambos electrodos.

En varias realizaciones, la concentración del ionóforo en el electrodo de referencia es al menos cuatro, cinco o diez veces la concentración en el electrodo de trabajo o de medición, dependiendo de la realización.

#### Ejemplo de Titulación y Control Digitalizados para un Sistema de Sensor Sensible a Protamina

La presente invención proporciona un sistema de control de la titulación automático, digitalizado para determinar automáticamente la concentración de heparina en una muestra de sangre mediante la titulación con protamina usando un electrodo selectivo del ion protamina para determinar el punto final de la titulación. En una realización, la presente invención proporciona un sistema de titulación automático heparina protamina que tiene un tiempo reducido de titulación a la vez que mantiene o mejora la exactitud. Este sistema puede visualizarse con respecto a la FIG. 1, discutida previamente. En lugar de usar una bomba de jeringa para administrar continuamente protamina en un cartucho desechable, la titulación digitalizada se realiza sustituyendo la bomba de jeringa por un micro dispensador de líquido (válvula Lee), que es capaz de disparar de manera discreta la disolución de protamina en forma de gotitas (menos de 30 nanolitros por gota en este ejemplo) en la muestra. El volumen de cada gota de líquido puede controlarse mediante los tiempos de apertura de la válvula solenoide y la contrapresión ejercida en el reservorio de protamina. La FIG. 1 ilustra la presión 60 en el reservorio de protamina 58 que suministra la válvula 68 que está bajo el control del controlador 52. El control de esta válvula Lee es sencillo y el coste de la unidad de dispensación es significativamente menor que el de una bomba de jeringa. La cantidad total de protamina dispensada para cada ensayo puede controlarse en la respuesta del sensor y puede determinarse por un contador que monitoriza los pulsos de apertura de la válvula.

La FIG. 18 ilustra un método que puede usarse para realizar la titulación automática. Este método puede implementarse usando un sistema similar al ilustrado en la FIG. 1. El método 500 ilustrado en la FIG. 18 puede implementarse en componentes discretos análogos y/o digitales, como firmware ejecutable en un instrumento microprocesador de control especializado, y/o como un programa informático ejecutado en un ordenador de uso general. El método 500, en este caso, se ejecutó como un programa ejecutable Lab View en un ordenador de uso general.

Empezando en la etapa 502, el contador DPS (gotas por segundo) se pone a cero. En la etapa 504, si va a empezar la adquisición de datos se ejecuta la etapa 506, de otra forma el programa itera en la etapa 504 esperando a que empiece la adquisición de datos. En la etapa 506, se recogen los datos de la línea base, por ejemplo, la parte plana inicial de la representación del diferencial eléctrico.

Continuando hacia la etapa 508, comienza la titulación si se indica. En un ejemplo, después de que haya pasado un tiempo de preajuste, por ejemplo 5 segundos, puede empezar la titulación. Con la ejecución continuando hacia la etapa 510, empieza la titulación, por ejemplo a 10 gotas por segundo, y el contador DPS empieza a contar las gotitas. En la etapa 512, se monitoriza la monitorización del potencial eléctrico diferencial entre el electrodo de trabajo o de medición y el electrodo de referencia. También se registra la velocidad de cambio del potencial

diferencial. Así, se registra tanto la medición absoluta del diferencial como la velocidad de cambio de la medición del diferencial respecto al tiempo. Continuando hacia la etapa 514, si la respuesta del sensor indica un potencial diferencial de al menos 10 milivoltios, entonces la velocidad de la titulación se ralentiza en la etapa 516 a 5 gotas por segundo. Si el potencial eléctrico diferencial no está todavía a 10 milivoltios, la etapa 512 se ejecuta de nuevo. En la etapa 518, se continúa la monitorización, tanto del potencial eléctrico diferencial como de la velocidad de cambio con el tiempo. En la etapa 520, si el potencial diferencial es al menos 15 milivoltios, la velocidad de la titulación se baja adicionalmente a 2 gotas por segundo, en caso contrario la etapa 518 se ejecuta de nuevo.

En la etapa 524, se continúa la monitorización, tanto del potencial eléctrico diferencial como de la velocidad de cambio.

En la etapa 526, si el potencial eléctrico diferencial es al menos 20 milivoltios, la velocidad de titulación se disminuye a una gota por segundo en la etapa 528, en caso contrario la etapa 524 se ejecuta de nuevo. En la etapa 530, se continúa la monitorización de la respuesta del sensor y de la velocidad de cambio del sensor. La velocidad de cambio del potencial eléctrico diferencial puede monitorizarse y almacenarse, de varias maneras. En un método potencialmente ruidoso, la velocidad de cambio se toma como la velocidad de cambio sobre dos puntos sucesivos. En otro método menos ruidoso, una ventana deslizante puede deslizarse sobre varios puntos sucesivos, tomando la velocidad de cambio como la velocidad de cambio desde el primer punto de la ventana hasta el último punto de la ventana sobre el periodo de tiempo de la ventana deslizante. También pueden usarse varios algoritmos de filtración. En algún momento, la velocidad de cambio formará un pico y descenderá. La velocidad de cambio máxima puede almacenarse en la memoria. Cuando la velocidad de cambio actual haya disminuido hasta un valor umbral por debajo del de la velocidad de cambio máxima, la titulación puede detenerse. La captura del pico o velocidad de cambio máxima se observa en 532. En la etapa 534, cuando la velocidad de cambio alcanza el 30% por debajo del valor del pico, la titulación se detiene. En la etapa 536, el tiempo del pico de la velocidad de cambio puede usarse para determinar la cantidad total de protamina añadida en ese tiempo del pico. En un método, el número total de gotas se almacena en cada intervalo de tiempo junto con la medición del diferencial para esa franja de tiempo así como la velocidad de cambio de la medición con el tiempo para esa franja de tiempo. Dada la cantidad total de protamina en el pico de la velocidad de cambio, las propiedades estequiométricas de la unión de la protamina pueden usarse para determinar la heparina unida en ese pico. Esto determina la cantidad de heparina en la muestra.

La FIG. 19 muestra una representación del potencial eléctrico entre el electrodo de medición y el electrodo de referencia para el par de electrodos selectivo del ion protamina respecto al tiempo. El potencial diferencial se representa en 550 con la velocidad de cambio máxima indicada en 554. La velocidad de cambio respecto al tiempo del potencial eléctrico diferencial se representa en 552, con la velocidad de cambio máxima indicada en 556. La velocidad de cambio puede referirse algunas veces como la "primera derivada", aunque se mide típicamente usando puntos discretos. El primer umbral del potencial diferencial se muestra en 558, que en el presente ejemplo, es 10 milivoltios. Como se ha discutido previamente respecto a la FIG. 18, cuando el potencial diferencial alcanza 10 milivoltios, la velocidad de titulación cae de 10 gotas por segundo a 5 gotas por segundo. Cuando el potencial eléctrico diferencial alcanza el segundo umbral en 560, que es 15 milivoltios, la velocidad de titulación cae de 5 gotas por segundo a 2 gotas por segundo. Cuando se alcanzó el tercer umbral en 562, 20 milivoltios, la velocidad de titulación cayó a una gota por segundo. Esto permite una rápida infusión hasta que se alcanza el umbral, con una titulación más lenta con el fin de capturar de manera más exacta la velocidad de cambio máxima del potencial con respecto al tiempo en el punto 554.

La FIG. 20 ilustra un resultado experimental que muestra una respuesta del electrodo selectivo del ion protamina a la infusión de protamina en una muestra que no tiene heparina presente. La representación del potencial diferencial frente al tiempo para una gota por segundo se indica en 580. Como se esperaba, esto tarda el tiempo mayor en alcanzar la velocidad de cambio máxima y el plató. La representación para 5 gotas por segundo se observa en 582 y la de 10 gotas por segundo se observa en 586. La representación para la velocidad ajustable descrita en el método 500 de la FIG. 18 se observa en 584. La adición de 10 gotas por segundo alcanzó el plató en primer lugar y alcanzó el pico de la velocidad de cambio en primer lugar como se esperaba. Sin embargo, como el pico de la velocidad de cambio se alcanzó más lentamente, este punto pudo determinarse con más exactitud.

La FIG. 21 ilustra la respuesta del electrodo sensible al ion protamina para titular 6 unidades de heparina con protamina. La representación de una gota por segundo puede observarse en 590, 5 gotas por segundo en 592, 10 gotas por segundo en 594 y la velocidad de titulación ajustable del Método 500 en 596. La velocidad ajustable logra un resultado similar en el tiempo al de las 10 gotas por segundo.

La FIG. 22 ilustra otro resultado experimental, que muestra el potencial eléctrico frente al tiempo para varias cantidades de heparina usando una gota por segundo frente al método ajustable de la FIG. 18. La representación que muestra la titulación usando una gota por segundo para cero unidades de heparina se indica en 603, para 1 unidad de heparina en 602, para 3 unidades de heparina en 601 y para 6 unidades de heparina en 600. Las representaciones usando el método de la velocidad de titulación ajustable pueden observarse para cero unidades de heparina en 604, 1 unidad de heparina en 605, 3 unidades de heparina en 606 y 6 unidades de heparina en 607. Como se observa en la FIG. 22, las velocidades ajustables acortaron significativamente el tiempo del ensayo. Por ejemplo, para 6 unidades de heparina presentes, el pico de la velocidad de cambio se localizó alrededor de 6

minutos usando una gota por segundo mientras que el pico de la velocidad de cambio correspondiente se localizó alrededor de un minuto usando el método ajustable.

La FIG. 23 ilustra los resultados experimentales para la velocidad de dispensación ajustable frente a una velocidad fija de 5 gotas por segundo para titular 1 unidad, 3 unidades y 6 unidades de heparina. El método de la velocidad de dispensación ajustable produjo resultados que tienen una mayor exactitud. La FIG. 23 muestra que para cero unidades de heparina, se requirieron 262 gotas para alcanzar el pico de la velocidad de cambio comparado con sólo 154 gotas usando el método ajustable. A partir de este resultado se puede inferir una acumulación o una exactitud reducida, en casos que tienen unidades distintas de cero. Para el caso de cero unidades, esto puede deberse a que el flujo de iones proporcionado sea diferente, y no ser una indicación de acumulación o exactitud reducida. En la tercera columna, el número de gotas para 1 unidad, 2 unidades y 6 unidades de heparina se ha corregido por el número de gotas requerido para cero unidades de heparina. En la cuarta columna de la FIG. 23, se muestra la relación del número de gotas requerido para 3 unidades y 6 unidades respecto al de para 1 unidad, lo que representa que la velocidad de titulación ajustable proporciona una relación real comparado con la velocidad de dispensación fija rápida, es decir, los números 1, 3 y 6.7 son más cercanos a 1U, 3U y 6U de heparina comparado con los números 1, 6 y 11.8.

Usando el presente sistema, la titulación de la heparina a alta concentración puede hacerse en dos minutos. El análisis y presentación de los datos se simplifica correlacionando la respuesta del sensor, la velocidad de dispensación del micro dispensador y contando el número de gotas dispensado. Comparando los resultados obtenidos con la velocidad alta de dispensación fija, el esquema de la velocidad de dispensación variable puede proporcionar unos resultados más exactos.

#### Electrodo Sensible al Ion Protamina

Las FIGS. 24A y 24B ilustran un electrodo sensible al ion protamina en 620 que incluye numerosos ionóforos o moléculas de intercambio iónico en 622. La FIG. 24A ilustra la membrana antes de la unión de la protamina y 24B después de la unión de la protamina. El ionóforo preferido es DNNS, que tiene grupos laterales  $\text{SO}_3^-$ . El ionóforo DNNS puede observarse formado un complejo con iones sodio en 624. Un polication, tal como protamina, puede observarse en 626. En la parte inferior de la FIG. 24B, puede observarse que la membrana 620 tiene ionóforos 622 formando un complejo con protamina 626 lo que resulta en un potencial eléctrico positivo, medido bien directamente a partir de la carga positiva de la membrana 620 o retirando los iones sodio 624 lo que incrementa el potencial eléctrico de un conductor y causa un flujo de corriente a través del circuito de medición.

#### Sensores Potenciométricos de Poliiones que Usan Poliiones Inmovilizados

Actualmente, para los sensores de poliiones, las membranas poliméricas se dosifican con intercambiadores aniónicos o catiónicos lipofílicos apropiados, tales como tridodecilmetilamonio (TDMA) para polianiones y sulfonato de dinonilnaftaleno (DNNS) para policationes. La respuesta del sensor se basa en las interacciones electrostáticas entre DNNS o TDMA y los poliiones en el interior de la membrana. Sin embargo, estas uniones no son eficaces y el cambio total del voltaje es relativamente pequeño. Un aspecto de la presente invención incluye una nueva clase de intercambiador iónico. Los poliiones inmovilizados tales como protamina y heparina, por ejemplo, en el núcleo de la molécula de la matriz polimérica pueden usarse como intercambiadores iónicos para ensayos con polianiones y policationes, respectivamente, lo que incrementa el cambio total de potencial y disminuye el límite de detección.

Comparado con DNNS o TDMA, este nuevo tipo de intercambiador iónico puede ofrecer varias características. En primer lugar, la interacción entre la protamina o heparina inmovilizada y otros poliiones es muy fuerte con constantes de unión altas. Esto incrementará el cambio total del potencial del sensor de poliiones. En segundo lugar, como el intercambiador iónico está inmovilizado en la matriz polimérica, el coeficiente de difusión del par iónico en la membrana disminuirá de manera que puede obtenerse un límite de detección bajo. Debido a las constantes de unión altas, esta nueva clase de sensor mostrará un cambio de voltaje alto e incrementará la relación señal a ruido para la medida de poliiones en muestras de sangre completa.

#### Calibración de un ISE de Protamina

En métodos previos, se adicionaron en primer lugar varias cantidades de heparina separadamente en 1 mililitro de tampón fosfato en recipientes desechables que contienen sensores sensibles a protamina. Después se realizaron las titulaciones con protamina usando una inyección gota a gota de protamina en los recipientes. En el nuevo método, se mezclaron en primer lugar varias cantidades de protamina con 1 mililitro de tampón fosfato en recipientes desechables, después los sensores se pusieron en los recipientes. Esto mimetiza un escenario de aplicación real, en el que una cantidad conocida de protamina se mezclará en primer lugar con la muestra que contiene una cantidad desconocida de heparina, después el sensor se aplica para medir la reducción de la cantidad de protamina. Esto se refiere en otro lugar como el método de bolo en la presente solicitud.

La FIG. 25 ilustra los resultados experimentales obtenidos con el método previo, discutido anteriormente. Los cambios en el potencial eléctrico con el tiempo se muestran para varias cantidades de heparina. El eje x de la FIG. 25 es tiempo marcado pero también puede verse como la cantidad acumulativa de protamina añadida, en lugar de tiempo. Esto asume una velocidad de titulación constante para la infusión de protamina. El incremento en el

potencial con el tiempo para cero unidades de heparina se indica como 638, para 0,25 unidades en 636, para 0,50 unidades en 634, para 0,70 unidades en 632 y para 1 unidad en 630.

La FIG. 26 ilustra los resultados experimentales usando el nuevo método. En este nuevo método, se añade una cantidad fija de protamina al recipiente y se añaden cantidades variables de heparina. En la FIG. 26, está presente la misma cantidad de protamina en todos los recipientes de muestra para todas las concentraciones de heparina mostradas. Se pusieron varias cantidades de protamina en 1 mililitro de tampón fosfato. Se pusieron 5 microgramos de protamina en 1 mililitro de tampón fosfato, con los resultados indicados en 660. También se pusieron 6 microgramos, 7 microgramos, 8 microgramos, 10 microgramos y 14 microgramos en 1 mililitro de tampón fosfato, con los resultados indicados en 658, 656, 654, 652 y 650, respectivamente.

La FIG. 26A ilustra los resultados de concentraciones variables de protamina de un sistema de ensayo. Los resultados de la FIG. 26A pueden usarse para interpretar la salida de los electrodos del método de bolo. Los resultados obtenidos para la FIG. 26A son sólo los resultados de concentraciones variables de protamina que están expuestas a los electrodos sensibles a protamina, con el cambio en potencial medido en el tiempo. El eje X de la FIG. 26A es así puramente tiempo y no incluye ninguna cantidad de infusión o infusión acumulativa de cualquier otra sustancia. La FIG. 26A puede observarse como la inserción simultánea de electrodos sensibles al ion protamina similares en diferentes estándares de protamina y los resultados se anotan.

La protamina de concentración más alta, 14 microgramos en 1 mililitro de tampón fosfato, se observa en 650. Ésta logra la elevación más rápida del potencial eléctrico. La elevación más lenta del potencial eléctrico se observa con el electrodo sensible al ion protamina insertado en la muestra de protamina más diluida de 5 microgramos por 1 mil. de tampón fosfato, observada en 660. Puede observarse que la muestra de protamina concentrada de 14 microgramos logra una velocidad de cambio máxima a aproximadamente 15 segundos, logrando la muestra de protamina más diluida de 5 microgramos la velocidad de cambio máxima a aproximadamente 100 segundos.

El pico de la velocidad de cambio también se muestra en la FIG. 26A, representando 651 la velocidad de cambio o primera derivada de la representación 650, para 14 microgramos de protamina por mililitro de tampón fosfato. Las representaciones de la velocidad de cambio del potencial para 10 microgramos pueden observarse en 653, para 8 microgramos en 654, para 7 microgramos en 656, para 6 microgramos en 658 y para 5 microgramos en 661.

Una representación insertada 670 puede observarse en la FIG. 26A, que muestra una representación de la concentración de protamina frente al tiempo del pico en segundos. Así, la concentración de protamina de una muestra puede obtenerse a partir del tiempo requerido para lograr el pico de la velocidad de cambio del potencial eléctrico frente al tiempo. En otro método, la concentración de protamina de una muestra puede obtenerse a partir de la pendiente máxima de la curva, es decir, la pendiente en el punto de inflexión. Por ejemplo, inspeccionar las representaciones de "primera derivada", las representaciones con números impares de 651 a 661, prestando atención a la variación en la altura del pico con la concentración de protamina.

Este método para determinar la concentración de protamina, puede usarse para determinar la concentración de heparina. Esto puede hacerse usando el método de "bolo" de la presente invención. Puede añadirse un bolo conocido de protamina, suficiente para unir completamente la heparina que se espera en una muestra, suficiente para dejar un exceso de protamina en disolución.

El electrodo selectivo del ion protamina puede exponerse a la protamina en exceso y registrarse el tiempo hasta el pico de la velocidad de cambio del potencial. Este tiempo puede usarse conjuntamente con una curva de calibración tal como 670 para obtener la protamina remanente en la muestra. Usando la protamina inicial, conocida y la unión estequiométrica de la protamina conocida a la heparina, puede calcularse la concentración de heparina en la muestra. Este método no requerirá titulación. Este método también podría usarse conjuntamente con un cartucho de muestra que tiene una cantidad conocida de protamina precargada en un cartucho, listo para recibir una muestra de heparina inyectada en el cartucho.

#### Método de Bolo Log (dFEM/dt)

Las FIGS. 26B y 26C ilustran resultados experimentales y un método que puede usarse con el método de bolo para determinar la concentración de heparina en una muestra.

Como introducción, la detección de la heparina puede conseguirse con titulaciones potenciométricas automáticas de heparina, usando la adición continua de una disolución estándar de protamina en una disolución de muestra usando un sistema de dispensación que tiene, por ejemplo, una bomba de presión y una micro-válvula. Sin embargo, la instrumentación es compleja y puede no ser fácilmente miniaturizable.

Para eliminar el sistema de dispensación, los solicitantes han desarrollado un método que incluye precargar una cantidad fija de protamina seca en el cartucho para neutralizar la heparina en la muestra y medir la respuesta de potencial del electrodo de la protamina libre extra. En este método, se registra el proceso de la respuesta y el tiempo requerido para lograr la velocidad de respuesta máxima se usa para la cuantificación de la heparina. Sin embargo, este método cuantitativo puede requerir mucho tiempo con el fin de obtener lo suficiente de la curva de respuesta,

especialmente para muestras que contienen altas concentraciones de heparina. Además, no existe una relación lineal entre el tiempo de punto final medido y la concentración de heparina en la muestra (véase la FIG. 26A).

5 Aquí describimos un nuevo método cuantitativo para el concepto de bolo de protamina seca. En este método, se mide la velocidad inicial de la respuesta de potencial ( $dFEM/dt$ ) (véase la FIG. 26B) y se usa una buena relación lineal entre la concentración de heparina y el logaritmo de  $dFEM/dt$  para la calibración de la heparina (véase la FIG. 26C).

10 Con este método, no existe necesidad de esperar para el proceso completo de respuesta; sino que sólo puede ser necesario registrar la respuesta inicial, de manera que el análisis completo puede completarse rápidamente. Además, los solicitantes creen que el intervalo lineal óptimo para la medición de la heparina puede ajustarse fácilmente cambiando la velocidad de agitación de la muestra. Las velocidades altas muestran un intervalo lineal estrecho, pero con una alta resolución, para concentraciones bajas de heparina, que es adecuado para usarse en un Laboratorio de Cateterismo; mientras que las velocidades de agitación bajas muestran un intervalo lineal más amplio con una resolución relativamente baja y pueden usarse en CVOR.

#### Ejemplo de Sistema de Cartucho de Ensayo de Heparina Usando el Método de Bolo

15 La FIG. 29A muestra un diagrama de los elementos primarios de un sistema basado en cartucho 700 que usa una bomba de fluido bidireccional de desplazamiento positivo 730 para el transporte y agitación de fluidos. El sistema 700 incluye un cartucho 750, un aplicador de muestra 740 y un controlador/analizador representado por un ordenador 728.

20 El cartucho 750 incluye un cuerpo de cartucho 752 que contiene una vía de fluido 756. La vía de fluido 756 se extiende desde una cámara de la muestra o puerto de muestra 754, pasa una primera cámara sensora 758, pasa una segunda cámara de la muestra opcional 759, hasta un puerto de presión 760. La vía de fluido 756 incluye una primera parte 720 dispuesta entre el puerto de la muestra 754 y las cámaras sensoras 758 y 759, y una segunda parte 722 dispuesta entre las cámaras sensoras y el puerto de presión 760. Un primer sensor 762 se muestra insertado en la cámara sensora 758 para poner en contacto el ISE o ISEs con la vía de fluido 756. En algunos sistemas, el ISE está serigrafiado en un sustrato poliéster y la cámara sensora está abierta inicialmente hacia la parte inferior. El ISE puede aplicarse con adhesivo a la parte inferior de la cámara sensora, cerrando la cámara sensora. El ISE puede incluir un ISE de protamina y un ISE de referencia y puede incluir un segundo ISE y el ISE de referencia correspondiente, en el que el segundo ISE puede usarse para medir un analito diferente. La cámara de la muestra 758 puede contener una cantidad de protamina seca suficiente para neutralizar la mayor cantidad de heparina que se espera encontrar en la muestra.

30 La bomba bidireccional 730 puede estar unida a través de una línea de presión 734 al puerto de presión 760 en el punto más distal de la vía de fluido. La bomba bidireccional puede ser controlable en incrementos discretos del trayecto lineal, indicado en 732, por un motor de bomba 736. El motor de bomba 736 puede controlarse por un circuito controlador del motor 738, que a su vez está conectado por un cable controlador del motor 739 en algunos sistemas, al circuito de interfaz de un instrumento de laboratorio instalado en el ordenador 728.

35 La cámara sensora 758 puede estar localizada en la mitad de la vía de fluido del cartucho 756 y puede contener un sensor sensible a protamina 762. El sensor puede estar conectado mediante un conector del sensor 708 a un amplificador del sensor 724 que puede tamponar y amplificar la señal desde el sensor de alta impedancia. El amplificador del sensor 724 puede estar conectado por un cable amplificador del sensor 726 a un circuito de interfaz de un instrumento del laboratorio instalado en el ordenador 728. El ordenador 728 se usa para representar un dispositivo de adquisición de datos y control de uso general. Dicho dispositivo puede usarse para dirigir la bomba 730 y monitorizar el sensor 762. Cualquier dispositivo especializado adecuado, dispositivo programable o microcontrolador puede usarse como este dispositivo.

40 Un volumen dosificado de muestra que contiene heparina puede introducirse en la cámara o puerto de la muestra 754 usando un aplicador de muestra 740. La bomba bidireccional 730 puede activarse para introducir repetidamente la muestra desde la cámara a la vía de fluido 756 y devolver la muestra a la cámara, con el fin de agitar y disolver la protamina en la muestra. Esta acción podría empezar bien automáticamente por un sensor o por la presión de una tecla del usuario.

45 Después de que la protamina se ha disuelto en la muestra, la bomba bidireccional 730 puede introducir la muestra en la cámara sensora 754. La muestra puede estar estacionaria en la cámara sensora durante aproximadamente 30 segundos para "humidificar" la membrana del sensor en el sensor 762, monitorizando el ordenador la señal del sensor. La bomba bidireccional 730 puede mover la muestra en una oscilación atrás y adelante a través de la cámara de la muestra 758 mientras que el ordenador continúa monitorizando la señal del sensor. La oscilación facilita la difusión de los iones en la membrana del sensor mientras que el ordenador mide la respuesta del sensor y la concentración de heparina puede determinarse a partir de la pendiente de la curva de respuesta a protamina libre en el primer minuto o dos después de empezar la oscilación.

Un Ejemplo del Método de Bolo

Un procedimiento para la medición de la heparina usando un sistema de cartucho con protamina seca precargada y bolo de citrato se proporciona más adelante. Este ejemplo utilizó un programa Labview que corre en un programa informático con interfaz con una realización prototipo con placa de prueba según la presente invención. Se utilizó un sistema similar al de la FIG. 29A.

- 5 1. Cuando la muestra de sangre (0,15 mL) se añade al reservorio de la muestra, el operador puede presionar "Empezar Medición" en el teclado para empezar el programa. El pistón de la bomba de jeringa puede introducir la muestra en el canal del cartucho y mover la muestra atrás y adelante durante aproximadamente 1 min para mezclar la protamina seca y el citrato precargados en el canal.
- 10 2. Después, la disolución de la muestra resultante puede introducirse en la cámara sensora y el programa Labview se activará para registrar los potenciales de la membrana del sensor (midiendo cada segundo). La disolución de la muestra se mantendrá en la superficie del sensor durante un periodo de humidificación de 30 seg.
3. Después de la humidificación, la bomba empieza la oscilación y los potenciales de la membrana se incrementan dramáticamente debido a la rápida difusión de la protamina en la fase de la membrana.
- 15 4. La oscilación tarda 30 seg y la medición ha finalizado.
5. El pistón de la bomba volverá a su posición original para la siguiente medición.
6. La velocidad de respuesta inicial ( $dFEM/dt$ , la pendiente de la curva lineal) puede calcularse usando los 5 potenciales medidos a 33, 34, 35, 36 y 37 seg. En algunos métodos, la pendiente de la respuesta inicial se mide en la parte definida por tres puntos en los que los segmentos lineales a cada lado del punto medio son los más cercanos a la línea entre los dos puntos más alejados o la distancia mínima entre el punto medio y una línea dibujada a través de los dos puntos a cada lado del punto medio. En otros métodos, la media de la pendiente de los segmentos lineales entre los puntos medidos se usa como la pendiente inicial.
- 20 7. Las concentraciones más altas de heparina en la sangre neutralizan más protamina en el cartucho y, por lo tanto, muestran una respuesta menor. Véase la FIG. 30A. Después de la conversión logarítmica de  $dFEM/dt$  para cada concentración, puede obtenerse una curva de calibración lineal (Véase la FIG. 30B).
- 25

Cartucho con Dos Sensores

Las FIGS. 29B-29D ilustran adicionalmente un cartucho 750 que tiene dos cámaras con sensor ISE. La FIG. 29B es una vista superior, 29C una vista en perspectiva inferior y 29D una vista en perspectiva superior del cartucho. El cartucho 750 incluye el cuerpo 752 que tiene una primera cámara de la muestra o puerto de muestra 754 acoplado con la vía de fluido 756 que incluye una primera cámara sensora 758, segunda cámara sensora 759 y puede terminar bien en una cavidad ciega o en un puerto de presión 760. El primer sensor 762 puede observarse insertado en la primera cámara sensora 758, que, en esta realización, está abierta en su parte inferior.

- 30
- 40

Método de Compensación de la Viscosidad

Una ventaja del sistema de bomba bidireccional sobre una cámara de la muestra agitada por rotación es que el sistema de bomba tiene desplazamiento positivo y debería ser relativamente insensible a los cambios de viscosidad de la sangre completa debidos a un hematocrito y hemodilución variables. Si la viscosidad debe tenerse en cuenta para una mayor precisión, esto podría hacerse usando un sensor y una vía de fluido separados adicionales, en el que las dimensiones de la vía de fluido causan el flujo capilar de la muestra y el tiempo que tarda la muestra en atravesar una longitud conocida de la vía de fluido hasta alcanzar el sensor se mide y se usa para calcular la viscosidad relativa de la muestra.

- 35
- 40

Realizaciones Alternativas para el Sistema de Cartucho de Ensayo de Heparina

Pueden usarse varios métodos para incrementar el rendimiento del Sistema de Cartucho de Ensayo de Heparina.

Un método podría estar incorporado en el cartucho para dosificar automáticamente el volumen de la muestra. Esto podría implementarse usando un dispositivo de ventilación permeable a gas en combinación con la bomba bidireccional. Alternativamente, podría usarse una disposición usando válvulas o dos bombas para aislar y transportar un volumen dosificado.

- 45

Un anticoagulante tal como citrato de sodio o EDTA disódico puede combinarse en la muestra para incrementar la sensibilidad del sistema cuando se usa con sangre completa. Esto puede hacerse bien antes de la introducción de la muestra en la cámara de la muestra o como una etapa inicial en el interior de la cámara de la muestra.

- 50

de protamina y podrían seleccionarse bien automáticamente por un código en el cartucho o manualmente por el usuario. Alternativamente, podría usarse un algoritmo adaptativo para monitorizar la pendiente inicial y después cambiar automáticamente el ajuste de la velocidad de la bomba para la mejor combinación de sensibilidad y rango.

5 El usuario podría seleccionar ajustes separados para aplicar diferentes algoritmos de pendiente a concentración para los diferentes tipos de heparina de bajo peso molecular así como heparina no fraccionada. Para la heparina de bajo peso molecular, los resultados podrían presentarse en varias unidades incluyendo correlación anti-Xa. Alternativamente, podría seleccionarse un algoritmo para medir el efecto combinado de múltiples tipos de heparina contenidos en la muestra.

10 La cámara de la muestra podría contener protamina líquida en lugar de protamina seca. La protamina podría albergarse en el interior de la cámara por una película fina ajustada sobre la parte superior de la cámara y el aplicador de la muestra podría usarse para penetrar simultáneamente la película e introducir la muestra en la cámara.

#### Sensor Directo de Heparina

15 Las realizaciones anteriores usan un sensor de protamina para medir la cantidad de heparina mediante estequiometría. También se ha desarrollado un sensor de heparina que responde directamente a la heparina de la muestra. Cuando se usa un electrodo sensible a heparina en el sistema de cartucho de ensayo de heparina, no hay necesidad de poner protamina en el cartucho y puede no requerirse un volumen exacto de la muestra. La heparina se mide directamente y la pendiente de la respuesta puede convertirse directamente en la concentración de heparina. El uso de un blanco de la muestra, que tiene la heparina inactivada, puede ser útil en este método.

#### 20 Tira de Ensayo con Intercambio Iónico Dirigido por Corriente

Otra realización del ensayo de heparina desechable y su interfaz instrumental producirá una tira de ensayo laminada económica que no requiere una parte móvil en el instrumento. Esta realización usa un sensor directo de heparina en combinación con un dispositivo desechable diseñado para producir flujo capilar de la muestra hacia la cámara de la muestra después de que el usuario deposite la muestra en el dispositivo desechable. Además, esta realización no requiere una bomba bidireccional para agitar la muestra a través del sensor. En lugar de esto, se aplica un voltaje en el sensor para facilitar el intercambio iónico a través de la membrana del sensor. Este método podría usar periodos de tiempo alternantes de toma de corriente y monitorización del sensor o podría considerarse un circuito de sensor compensado para proporcionar toma de corriente y monitorización del sensor simultáneamente.

#### Sensibilidad Incrementada

30 A diferencia de otros sensores electroquímicos potenciométricos, los sensores de electrodo selectivo del ion protamina tienen una respuesta única que no es una típica respuesta de Nernst. En lugar de esto, se basa en el proceso de intercambio iónico en estado estacionario no de equilibrio que ocurre en la interfaz entre la membrana polimérica del sensor y la disolución de la muestra. La respuesta del sensor sensible a protamina se determina tanto por la difusión de la protamina en la fase de la muestra como por la difusión del complejo protamina-intercambiador iónico en el interior de la fase de la membrana polimérica. El límite de detección bajo del sensor puede mejorarse significativamente rotando el sensor a alta velocidad, por ejemplo, 3.000 RPM, que puede o no ser practicable cuando se usa conjuntamente con varias realizaciones de la presente invención.

40 En un método según la presente invención, la difusión se incrementa en el interior de la membrana polimérica cambiando la condición de contorno de cambio/flujo de concentración constante (como en un método previo) a una concentración constante. El incremento de la difusión en el interior de la fase de membrana se confirma por simulación teórica. Específicamente, una simulación teórica muestra que en un caso de concentración constante en el contorno, hay una concentración más alta de analito en el interior de la fase de membrana que la presente en el caso de flujo constante. Esto significa un cambio de potencial mayor del sensor, lo que significa una sensibilidad mejorada.

45 La FIG. 27 muestra una representación teórica que indica una concentración a 5 micrómetros del contorno, en el interior de la membrana. Las representaciones 684-696 indican la concentración a 5 micrómetros en el interior del contorno de la membrana del sensor. Se presentan varias cantidades de protamina en la fase acuosa de la muestra como concentración constante (684-696) frente a la dispensación continua de protamina en la fase acuosa (682). En esta representación teórica, en el marco de tiempo de 250 segundos, cuando la membrana de intercambio iónico se expone a una alta concentración de protamina, la concentración en el interior de la membrana se eleva más rápidamente, como se observa en 684. En cambio, la concentración de protamina en el interior de la membrana se eleva más lentamente cuando se expone a una concentración más baja de protamina, observado en 696. Los resultados para concentraciones variables de protamina, específicamente concentraciones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 micromolar de protamina se observan, respectivamente, en 696, 694, 692, 690, 688, 686 y 684. La concentración teórica de protamina 5 micrómetros en el interior de la membrana usando el método de dispensación de válvulas previo se muestra en 682. Así, a 300 segundos, el método viejo mostraría aproximadamente una concentración 0,2 (unidades arbitrarias) de protamina mientras que la concentración 10 micromolar de protamina en el caso de

concentración constante mostraría casi el doble de esa concentración (unidades arbitrarias) en el interior de la membrana.

Así, comparado con el método de titulación previo, el nuevo método de bolo es más sensible y no necesita que se dispense protamina durante el ensayo. Por lo tanto, la instrumentación puede simplificarse. Además, puede ser posible la calibración simultánea después de filtrar o eliminar de otra manera la heparina de la muestra separadamente, ya que pueden hacerse múltiples ensayos en el mismo cartucho desechable sin usar múltiples unidades de dispensación. Los límites de detección más bajos y la resolución mejorada pueden permitir que este sensor monitorice un nivel terapéutico de heparina (tanto heparina de alto como de bajo peso molecular).

#### Polímero de Electrodo Selectivo de Ion

La presente invención puede utilizar de manera general una membrana polimérica que forma un electrodo selectivo de ion que es selectivo de protamina. Generalmente, el electrodo selectivo de ion puede incluir un polímero, un ionóforo o intercambiador iónico que se usa preferentemente a la protamina, y cero, uno o más plastificantes que faciliten o incrementen la difusión de la protamina en la membrana. En la presente invención pueden usarse, si se desea o si es necesario, varios polímeros, ionóforos y plastificantes y/o aditivos, con grados variables de éxito. En una realización de la invención, se usa un poliuretano especializado como al menos un polímero en la matriz polimérica. Este polímero especializado incluye bloques alternantes de segmentos denominados "blandos" o gomosos (que tienen rotaciones de los segmentos fáciles a temperatura ambiente) y segmentos "duros" (cristalinos, semi-cristalinos o vítreos). Los segmentos duros y blandos pueden separarse unos de otros, formando de esta manera micro-dominios de segmentos duros y blandos. La primera etapa de la síntesis de este polímero especializado, que es un elastómero termoplástico, es la producción de un pre-polímero en el que los extremos de la cadena polimérica terminan en grupos isocianato ( $-N=C=O$ ) o grupos hidroxilo ( $-OH$ ). La producción del prepolímero puede implicar el uso de una cadena preformada terminada en grupos hidroxilo, por ejemplo un poliéster glicol, poliéter glicol, hidrocarburo glicol, polidimetilsiloxano glicol o un policarbonato glicol. La cadena glicol se hace reaccionar con uno o más diisocianatos, por ejemplo metilen-4,4'-difenil isocianato (MDI), dímero isocianato, metilen-4,4'-dicitloxil isocianato (H12-MDI), hexilmetilen diisocianato o cualquier otro diisocianato adecuado. El pre-polímero resultante se hace reaccionar con uno o más dioles y/o diaminas, por ejemplo etilen diamina y/o butano diol, para unir los extremos de las cadenas del prepolímero entre sí y generar así las cadenas poliméricas del elastómero termoplástico.

Un poliuretano usado según una realización de esta invención se ilustra en la FIG. 28 que tiene una combinación de segmentos blandos y segmentos duros. Los segmentos blandos se forman generalmente por la reacción de dímero isocianato, por ejemplo, 1-decil-4-nonil ciclohexil diisocianato (que tiene un grupo pentilo en la posición 2 del anillo y un grupo hexilo en la posición 3), con butano diol y/o dímero diol, por ejemplo 1-decil-4-nonil ciclohexil diol (que tiene un grupo pentilo en la posición 2 del anillo y un grupo hexilo en la posición 3).

La FIG. 28 muestra un ejemplo del segmento blando que puede formarse en el producto de reacción del dímero diisocianato, dímero diol y butano diol cuando reaccionan en una proporción molar de 2:1:2, respectivamente. En general, los segmentos blandos contienen tanto regiones alifáticas de cadena lineal como regiones alifáticas cíclicas entre los grupos uretano. Las regiones alifáticas cíclicas pueden tener grupos alifáticos de cadena lineal laterales en ellas. En el ejemplo mostrado en la FIG. 28, se muestra que los grupos alifáticos cíclicos tienen grupos lineales alifáticos pentilo y hexilo en las posiciones 2 y 3 del anillo, respectivamente, sin embargo son posibles muchos otros isómeros para el dímero isocianato. Los solicitantes no creen que la longitud de las regiones alifáticas de cadena lineal, tal como butano diol, sea crítica. Los solicitantes creen que los grupos alifáticos de cadena lineal o los grupos alifáticos cíclicos pueden usarse para formar la región del segmento blando del electrodo selectivo de ion, sin embargo otros restos hidrofóbicos también pueden proporcionar poliuretanos aceptables.

La FIG. 28 también muestra un ejemplo de un segmento duro de poliuretano que puede formarse como el producto de reacción de metilen difenilisocianato, dímero diol (por ejemplo 1-decil-4-nonil ciclohexil diol) y butano diol, cuando reaccionan en una proporción molar de 5:3:1, respectivamente. Los segmentos duros contienen así regiones alternantes de metilen difenilisocianato con regiones alifáticas cíclicas o regiones alifáticas de cadena lineal, como se ha descrito anteriormente respecto al segmento blando.

Los poliuretanos que pueden usarse en la presente invención se describen en la Patente U.S. No 4.873.308, incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad.

#### Ejemplo de Preparación de Sensor de Protamina

A continuación aparece un ejemplo de cómo preparar una disolución de polímero de electrodo selectivo de ion para usarse en la producción de un sensor de protamina:

Combinar 21,0 mg de sulfonato de dinonil naftaleno (DNNS) de King Industries, Norwalk, CT con 300 mg de éter de 2-nitrofeniloctilo (NPOE) de Fluka Chemika Biochemika, Ronkonkoma, NY en un contenedor de vidrio. Añadir 3,0 mg de tetradodecilonio tetraquis (4-clorofenil) borato (ETH500) de Fluka Chemika Biochemika, Ronkonkoma, NY y 80 mg de Terpolímero (PVC/PVA/acrilato de polihidroxipropilo) de Scientific Polymer Products, Ontario, Nueva York en el mismo contenedor de vidrio. Después, añadir 197 mg del poliuretano descrito en otra parte de la presente solicitud

5 y 395 mg de Peletano 2363-AE de Dow Chemical, Midland, MI en el mismo contenedor de vidrio. Después, añadir 5,68 ml de disolvente ciclohexanona y agitar usando una barra de agitación y un agitador magnético. Dejar que los componentes se disuelvan completamente. Preferiblemente, la disolución de polímero resultante no tendrá sólidos presentes y tendrá una viscosidad de aproximadamente 450 cp. Si la viscosidad de la disolución de polímero es demasiado baja, la disolución de polímero puede concentrarse para elevar la viscosidad. Si la viscosidad de la disolución de polímero es demasiado alta, puede añadirse disolvente a la disolución de polímero para disminuir la viscosidad.

10 Los electrodos de plata de un sensor se tratan con disolución 0,1 M  $\text{FeCl}_3$  que contiene 0,5 M HCl durante 5 min para formar electrodos Ag/AgCl. Los electrodos se lavan con agua desionizada y se secan toda la noche en una campana extractora a temperatura ambiente. Se aplica una gota (3  $\mu\text{L}$ ) de la disolución de polímero en un electrodo, por ejemplo el electrodo de la derecha. El otro electrodo o electrodo de la izquierda no se recubre y sirve como un electrodo de referencia. Los sensores recubiertos de polímero se ponen en la campana extractora y se secan durante 3 horas a temperatura ambiente. Pueden repetirse aplicaciones adicionales de la disolución de polímero en el electrodo seguido de secado según se desee para conseguir un espesor de la membrana deseado. Después de la aplicación de la última etapa de recubrimiento con el polímero, los electrodos se secan concienzudamente, por ejemplo poniendo los electrodos en la campana extractora a temperatura ambiente durante 24 horas.

20 Preferiblemente, la punta de plata se cubre completamente con la membrana. El rendimiento de los sensores no se ve afectado si el lado del recubrimiento de la membrana (no la plata) se corta o tiene pequeñas burbujas. Si la viscosidad de la disolución del polímero es demasiado baja, el polímero puede extenderse en un área mayor y cubrir el electrodo de referencia de manera que el sensor puede desprenderse. Por otra parte, si la viscosidad de la disolución del polímero es demasiado alta, será difícil obtener una gotita con el tamaño óptimo. Los sensores son aceptables generalmente si la punta de plata está completamente cubierta por la membrana polimérica y si el polímero no cubre el electrodo de referencia.

25 Los intervalos de concentración (en términos de porcentaje en peso) de los componentes de la membrana para varias realizaciones del sensor de protamina se proporcionan más adelante. El "poliuretano especializado" es el poliuretano ilustrado en la FIG. 28 y que se discute en el texto adjunto. ETH 500 es una sal lipofílica usada comúnmente como aditivo en la membrana polimérica del sensor para reducir la impedancia de la membrana. El nombre químico es Tetradodecilamonio tetraquis (4-clorofenil) borato, obtenido de Fluka Chemika Biochemika, Ronkonkoma, NY. Peletano es una marca registrada de The Dow Chemical Company, e incluye un grupo de poliuretanos. El peletano usado en las membranas del sensor más adelante es Peletano 2363-80AE de Dow Chemical, Midland, MI. Actualmente, puede encontrarse más información en el sitio web de Dow en <http://www.dow.com/engineeringplastics/prod/na/pel.htm>.

30 El terpolímero (PVC/PVA/acrilato de polihidroxipropilo) está disponible en Scientific Polymer Products, Ontario, Nueva York. La composición es cloruro de vinilo 80%, acetato de vinilo 5% e hidroxil propilo 15%.

35

Primera Composición:

DNNS (0,5-8%)

NPOE (15-60%)

ETH 500 (0,1-1%)

5 Terpolímero (2-15%)

Poliuretano Especializado (10-50%)

Peletano (10-60%)

Segunda Composición:

DNNS (1-5%)

10 NPOE (20-40%)

ETH 500 (0,2-0,5%)

Terpolímero (5-12%)

Poliuretano Especializado (15-30%)

Peletano (30-50%)

15 Tercera Composición:

DNNS (2%)

NPOE (30%)

ETH 500 (0,3%)

Terpolímero (8%)

20 Poliuretano Especializado (20%)

Peletano (40%)

#### Membranas Auto-Plastificantes

En un aspecto de la invención, en una realización alternativa, la membrana/polímero ISE es auto-plastificante. Los plastificantes se usan típicamente en las membranas ISE y pueden formar una parte considerable (por ejemplo, incluso la mitad) del peso de la membrana. El plastificante permite que el analito migre a través de la membrana ISE. En algunas membranas ISE según la presente invención, no hay o esencialmente no hay plastificantes no unidos en las membranas ISE. La membrana puede formularse a partir de un polímero con un núcleo, que puede ser un núcleo de acrilato y tener una pluralidad de grupos plastificantes lipofílicos laterales.

La membrana puede formularse a partir de un polímero que tiene un núcleo acrilato y una pluralidad de grupos plastificantes lipofílicos laterales para proporcionar el polímero con una Tg de  $-10^{\circ}\text{C}$  o menos. La Tg del polímero puede medirse directamente usando cualquier aparato adecuado. La Tg del polímero está en el intervalo de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ , o de  $-30^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$ , en algunas realizaciones. Los grupos plastificantes lipofílicos son grupos alquilo C3-7 en algunos polímeros usados en la presente invención. El uso de acrilatos de alquilo C3-7 en el polímero puede proporcionar un polímero que es blando de manera inherente y que no requiere plastificante añadido, es decir, el polímero es en efecto auto-plastificante.

#### Otros Materiales de Membrana

Podrían usarse materiales tales como cerámica, óxidos metálicos, vidrio y polímeros como parte de la membrana que porta el ionóforo en algunas realizaciones alternativas. En una realización menos preferida, si se usaran vidrio o cerámica porosa, los poros pueden cargarse con una mezcla selectiva de iones o disolución polimérica. Algunos polímeros pueden incluir poliuretano, PVC y goma de silicona. Algunos polímeros pueden no requerir un plastificante separado añadido. El polímero usado según la invención puede tener un núcleo de acrilato y puede ser un polímero o copolímero de uno o más de los monómeros siguientes: acrilato de propilo, acrilato de butilo, acrilato de pentilo, acrilato de hexilo, acrilato de heptilo. El polímero puede ser un homopolímero o puede ser un copolímero que incluye dos o más unidades diferentes de monómero. Las diferentes unidades de monómero pueden obtenerse a partir de acrilatos de alquilo C3-7 como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo de Procedimiento de Titulación Usando un Sensor de Protamina

Se preparan disoluciones de heparina que contienen 1.000 U/mL y 100 U/mL de heparina por dilución seriada con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH=7,4) de una disolución madre de heparina USP que contiene 10.000 U/mL. La disolución madre de heparina de 100 U/mL se usa para preparar las muestras de heparina requeridas para titulación en tampón, sangre completa o plasma combinado (2, 4, 6 U/mL, etc.). Se prepara una disolución de protamina en disolución salina (0,9%) a partir de una disolución madre de Sulfato de Protamina USP Inyectable, que contiene 250 mg actividad por 25 ml de disolución. La concentración final de la disolución de protamina es 10 mg/ml. La disolución madre está refrigerada. La disolución de ensayo de protamina es estable habitualmente a temperatura ambiente durante una semana. La disolución de tampón PBS se prepara disolviendo 1 bolsa de aluminio de polvo de PBS seco (Sigma-Aldrich) en 1 litro de agua desionizada. Se prepara sangre completa citrada mezclando 5 ml de 3,4% citrato de sodio por 50 ml de sangre completa. El plasma se prepara centrifugando la sangre completa citrada. El plasma (aproximadamente 150 ml) puede almacenarse a -20°C en tubos de ensayo de centrifuga de 10 mL. El plasma congelado es estable generalmente durante 24 semanas.

El sensor se conecta al equipo informático apropiado, por ejemplo, un panel de circuito eléctrico de Alberta Printed Circuits y un circuito de control electrónico de National Instruments. Asegurarse de que el electrodo está puesto en la posición correcta. Después de conectar el sensor al equipo informático y programa informático apropiados, el sensor puede calibrarse. Cuando se esté preparado para calibrar el sensor, empezar a correr el programa informático de adquisición de datos o de control (por ejemplo, Labview Software) en un ordenador apropiado, por ejemplo, un ordenador portátil satélite 2065 CDS de Toshiba, conectado al equipo informático apropiado. El programa informático de control implementa los algoritmos descritos en la presente solicitud. Alternativamente, la titulación podría realizarse manualmente. Mientras se corre Labview, presionar "STARTDAQ". La respuesta de potencial (FEM) del sensor se mostrará en la ventana. La línea verde indica el cambio de FEM con el tiempo, mientras que la línea roja muestra el primer diferencial del cambio de la respuesta FEM (dFEM) con el tiempo. Cuando la línea base sea estable, presionar "Start LEE-VALVE". La protamina se dispensará en la muestra como un titulante a 1 gota por segundo a partir de una válvula microdispensadora con una boquilla integral (número de la parte: INKA2437210H, válvula VHS-LT, Lee Co., Essex, CT). La velocidad de dispensación puede multiplicarse 2, 5 ó 10 veces si se presiona "S0", "S1" o ambos. Presionar "STOP DISPENSE", cuando la curva de la respuesta alcanza un potencial máximo estable. Presionar "SAVE DATA" y proporcionar un nombre de archivo apropiado. Repetir las etapas para otra titulación. Salir de LABVIEW cuando se hayan completado todas las mediciones. La concentración de la heparina presente en la disolución y la cantidad de protamina necesaria para neutralizar la heparina pueden calcularse por el tiempo de calibración y el tiempo de la respuesta a partir de los desconocidos de heparina usando la misma hoja de cálculo de Excel.

Se hace una curva de calibración para cada una de las muestras usadas, tal como tampón, plasma o sangre completa. El tiempo de calibración para el plasma y la sangre completa es mayor que el de la disolución de tampón. Pueden hacerse un mínimo de 2 curvas de calibración/titulación para una de las muestras ensayadas. Las muestras usadas para la calibración no tienen heparina en ellas. El tiempo en segundos para alcanzar el punto final se usa para calcular la concentración de heparina de las muestras desconocidas. Se proporciona un tiempo de incubación de un (1) minuto para cada uno de los sensores ensayados antes de correr el experimento en sangre completa o plasma combinado (sin tiempo de incubación para la disolución tampón).

Para un experimento de titulación, pipetear un (1) ml de la disolución fresca de la muestra en un recipiente de muestra. Añadir una barra de agitación magnética a la disolución de la muestra. La disolución de la muestra se agita a una velocidad constante (por ejemplo, 600 rpm) usando un agitador magnético (American Scientific Products) con el fin de conseguir un mezclado rápido de la disolución. Es preferible mantener una velocidad constante de mezclado para obtener datos fiables. Asegurarse de que el sensor está conectado al panel del circuito eléctrico. Chequear dos veces para confirmar que el electrodo está puesto en la posición correcta. Poner el extremo de la membrana del sensor en la disolución de la muestra. Debe ponerse de manera tal que el sensor no toque el agitador magnético y que la membrana polimérica esté en la disolución de la muestra. Conectar una bomba de aire (DP0105, Nitto Kohki, Co., Ltd.) y aplicar una presión de aire de 300 mmHg (~5,9 psi) usando un regulador de la presión (Tipo 100, Controlair Inc.) alrededor de la bolsa de protamina líquida. En este caso, el volumen de una gota de la disolución de protamina dispensada a través de la válvula Lee es 25 nL. Seguir los procedimientos descritos anteriormente.

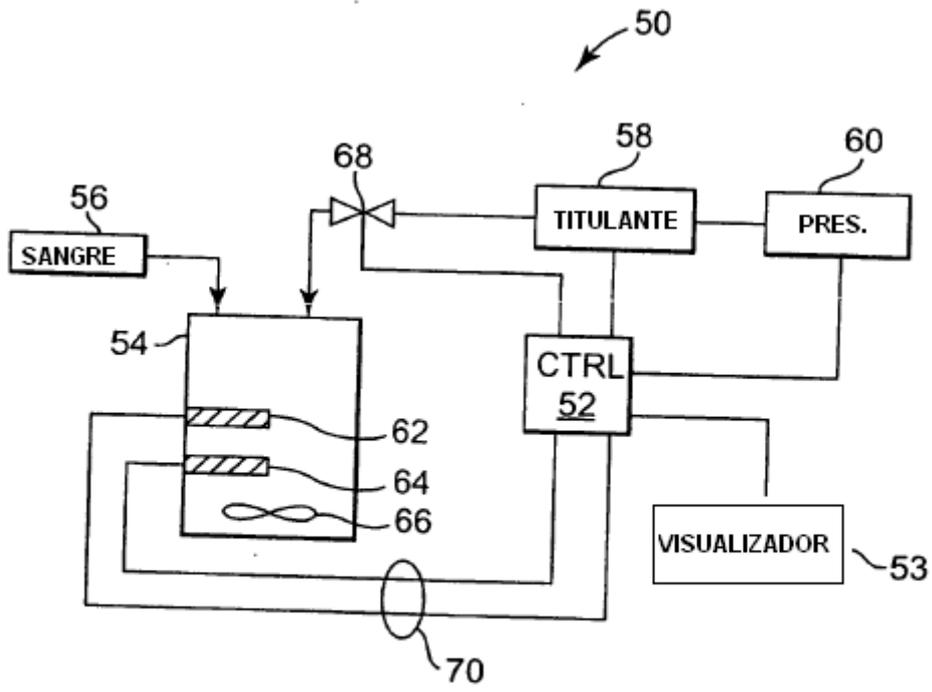
Cada unidad de heparina presente en la disolución de la muestra prolonga el tiempo de la respuesta (por ejemplo, heparina de pulmón de Buey 1 U/ml ~ 30 segundos, Heparina de la Mucosa Porcina ~ 25 segundos, Fragmina LMWH ~ 22,5 segundos, Normiflow LMWH ~ 35 segundos, Lovenox LMWH ~ 40 segundos). La concentración de heparina presente se calcula usando el tiempo de calibración, punto final de la titulación para las muestras desconocidas y el tipo de heparina. La cantidad de protamina requerida para neutralizar la heparina puede calcularse usando la estequiometría de la unión heparina-protamina (1 mg de protamina reacciona con 100 U de heparina).

Todas las publicaciones, patentes y documentos de patente se incorporan por referencia en la presente memoria, como si se incorporaran individualmente por referencia. La invención se ha descrito con referencia a varias

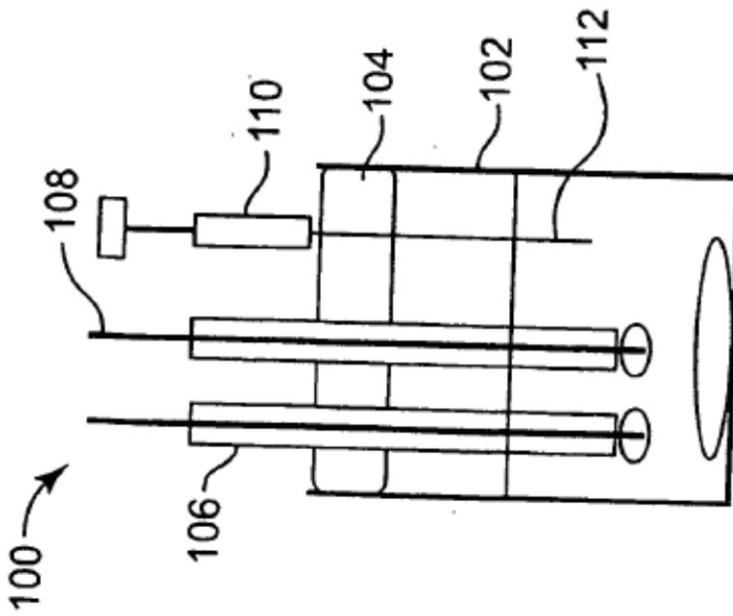
realizaciones y técnicas específicas y preferidas. Sin embargo, debe entenderse que pueden hacerse muchas modificaciones diferentes, permaneciendo en el alcance de la invención.

**REIVINDICACIONES**

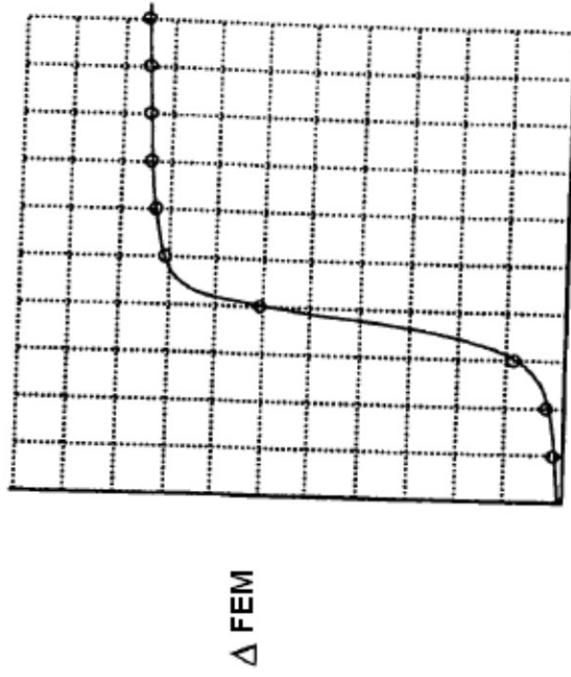
1. Un sistema (50) para determinar la concentración de heparina en una muestra, comprendiendo el sistema: un cartucho (54) que incluye una vía de fluido y un puerto de muestra en comunicación fluida con la vía de fluido; y un par de Electroodos Selectivos de Ion (ISE) protamina (62, 64) en comunicación fluida con la vía de fluido;
- 5 una reacción de unión conocida de heparina/protamina; una cantidad conocida de protamina dispuesta en comunicación fluida con la vía de fluido; y medios para medir una pendiente inicial de una velocidad de cambio del potencial del electrodo para determinar una concentración de protamina en exceso; y caracterizado por el sistema que comprende además: medios (422, 436) para presión oscilante en el canal de fluido.
- 10 2. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además: medios para determinar una primera velocidad de cambio de la señal de salida del par de ISE de protamina.
3. El sistema de la reivindicación 3, que comprende además: medios para calcular la concentración de heparina en la muestra al menos en parte como una función de la velocidad de cambio de salida del par de ISE de protamina durante el tiempo.
- 15 4. El sistema de la reivindicación 3, en el que los medios para calcular la concentración de heparina incluyen determinar una velocidad de un cambio inicial respecto al tiempo del par de ISE de protamina antes de aproximadamente 2 minutos de añadir la muestra al cartucho.
5. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además un puerto de presión en comunicación fluida con la vía de fluido.
- 20 6. El sistema de la reivindicación 5, en el que el puerto de presión y el puerto de la muestra están dispuestos en lados opuestos de la vía de fluido respecto al par de Electroodos Selectivos de Ion (ISE) protamina.
7. El sistema de la reivindicación 5, en el que el puerto de presión y el puerto de la muestra están dispuestos en el mismo lado de la vía de fluido respecto al par de Electroodos Selectivos de Ion (ISE) protamina.
- 25 8. El sistema de la reivindicación 7, en el que la vía de fluido incluye un fluido compresible en una región de la vía de fluido opuesta al par de Electroodos Selectivos de Ion (ISE) protamina desde el puerto de presión.
9. El sistema de la reivindicación 5, en el que el par de Electroodos Selectivos de Ion (ISE) protamina está dispuesto entre el puerto de presión y una parte cerrada de la vía de fluido que contiene un fluido compresible, de manera que la aplicación de presión en el puerto de presión comprime el fluido compresible y mueve la muestra a través del ISE.
- 30 10. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además una fuente de presión oscilante acoplada de manera operativa con la vía de fluido.
11. El sistema de la reivindicación 10, en el que la fuente de presión oscilante es mecánica.
12. El sistema de la reivindicación 10, en el que la fuente de presión oscilante es electromecánica.
13. El sistema de la reivindicación 10, en el que la fuente de presión oscilante es neumática.
- 35 14. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además una cantidad de citrato dispuesta en comunicación fluida con la vía de fluido.



**Fig. 1**

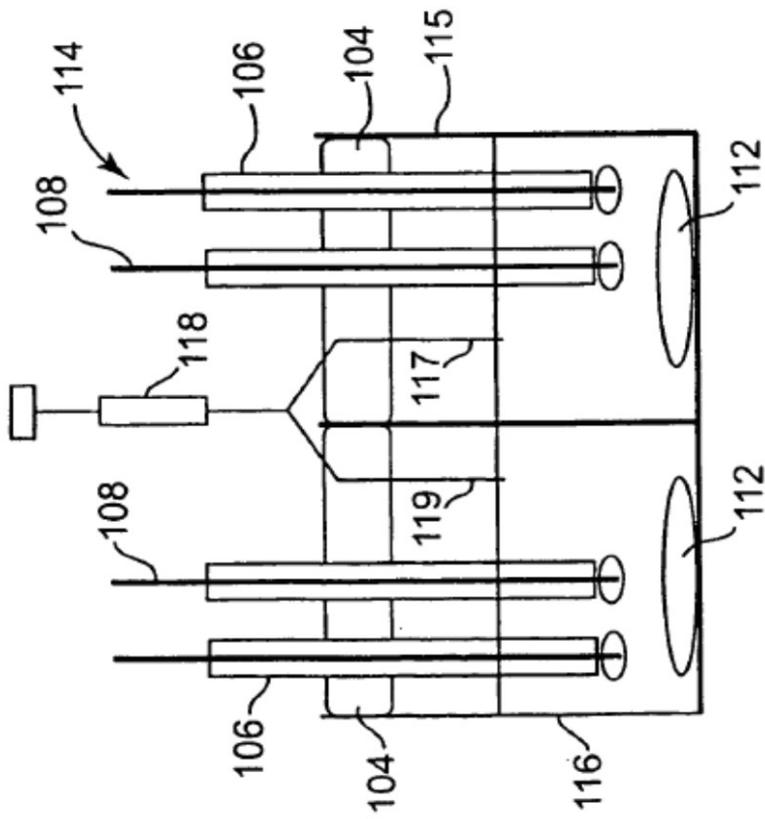


**Fig. 2A**

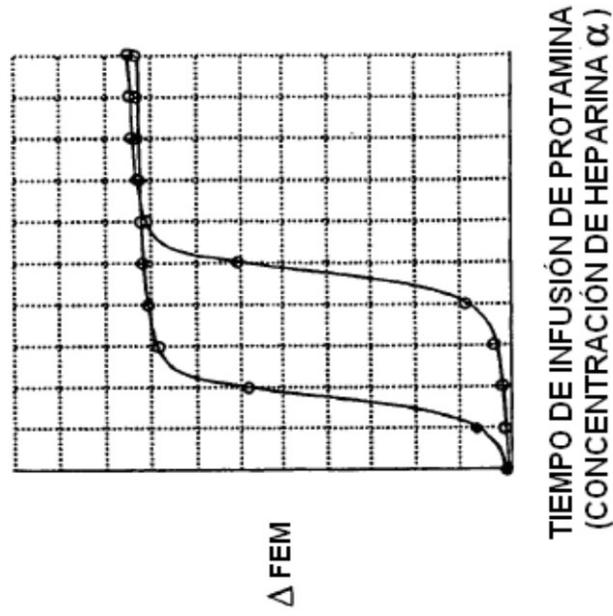


TIEMPO DE INFUSIÓN DE PROTAMINA  
(CONCENTRACIÓN DE HEPARINA  $\alpha$ .)

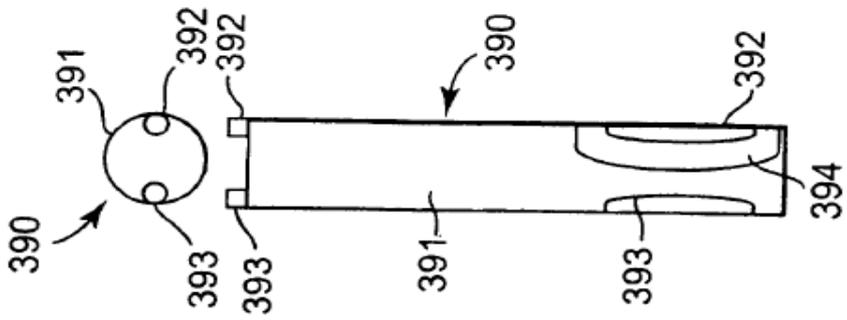
**Fig. 2B**



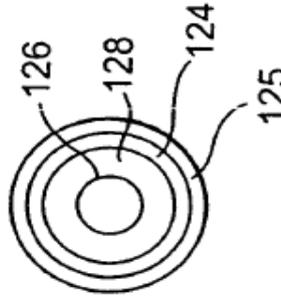
**Fig. 3A**



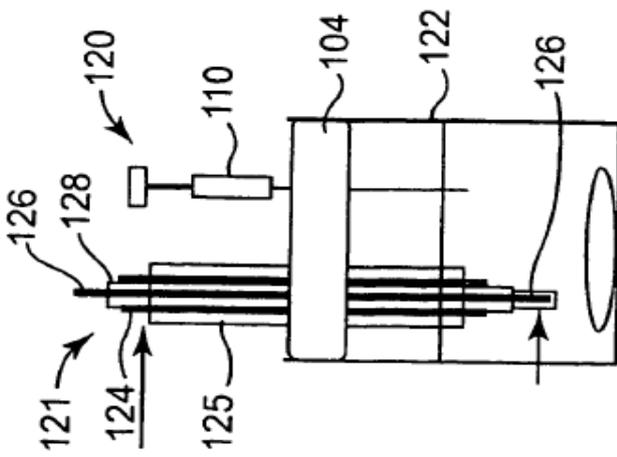
**Fig. 3B**



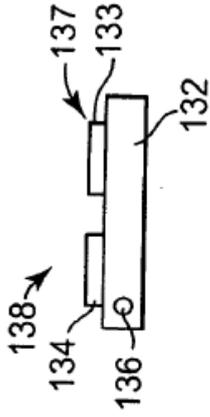
**Fig. 4C**



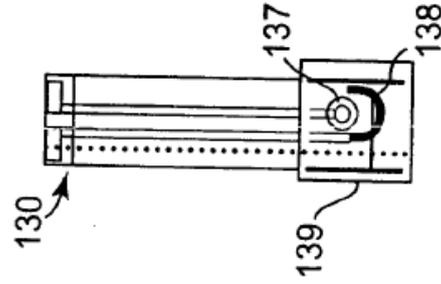
**Fig. 4B**



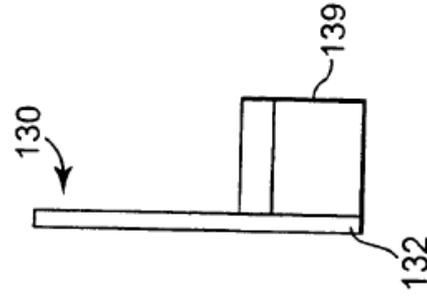
**Fig. 4A**



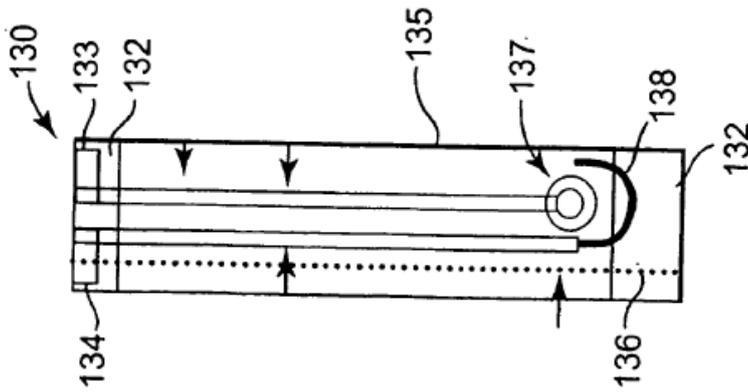
**Fig. 5B**



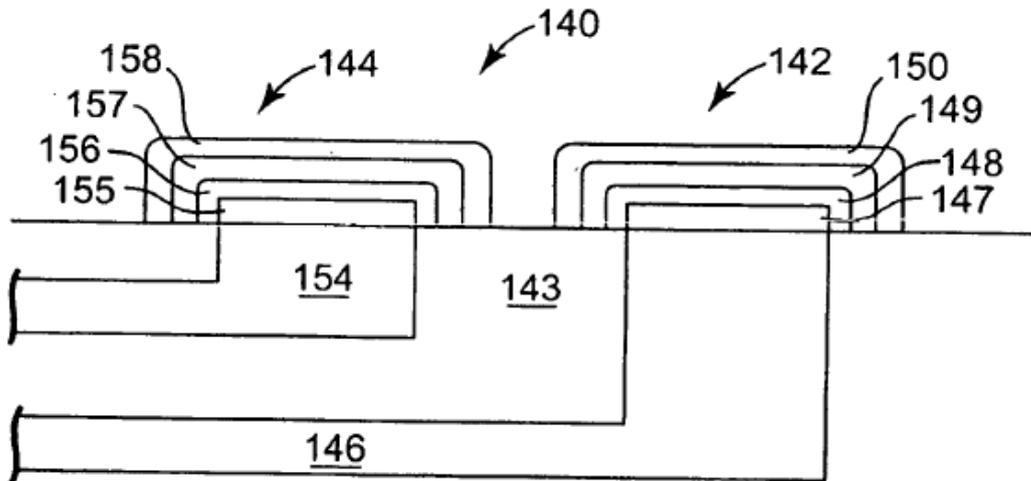
**Fig. 5C**



**Fig. 5D**



**Fig. 5A**



**Fig. 6**

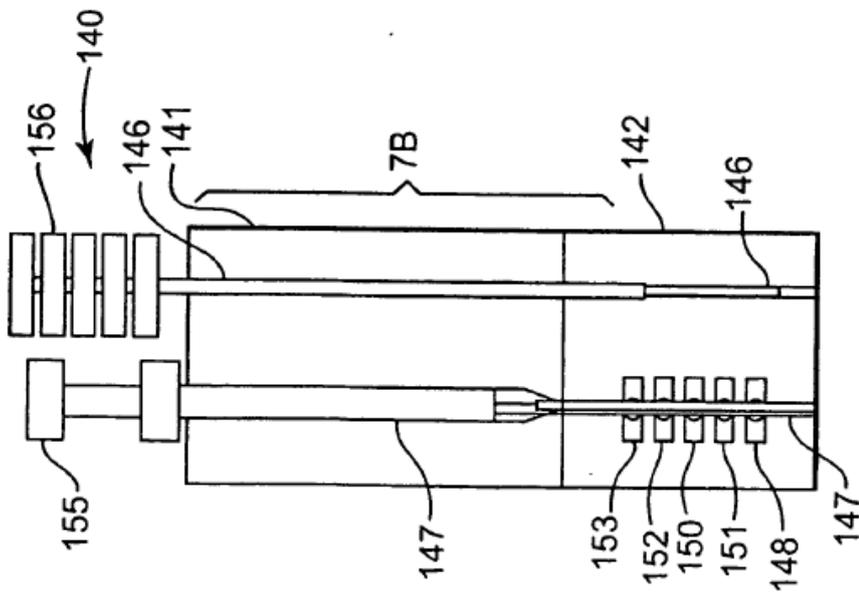


Fig. 7A

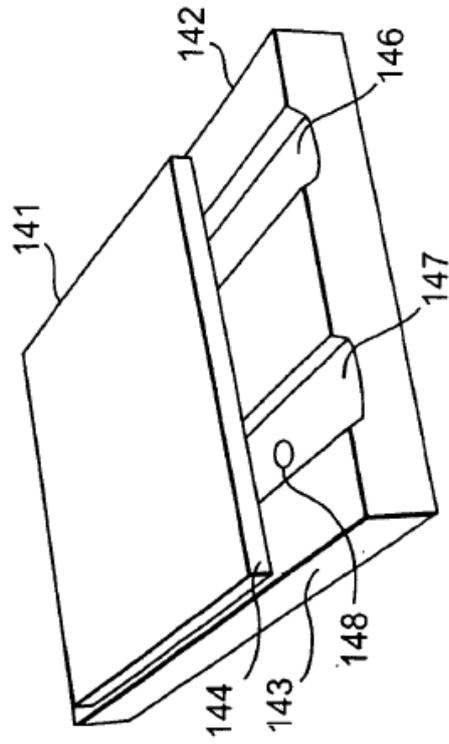
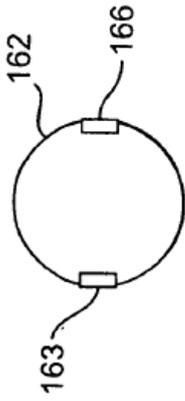
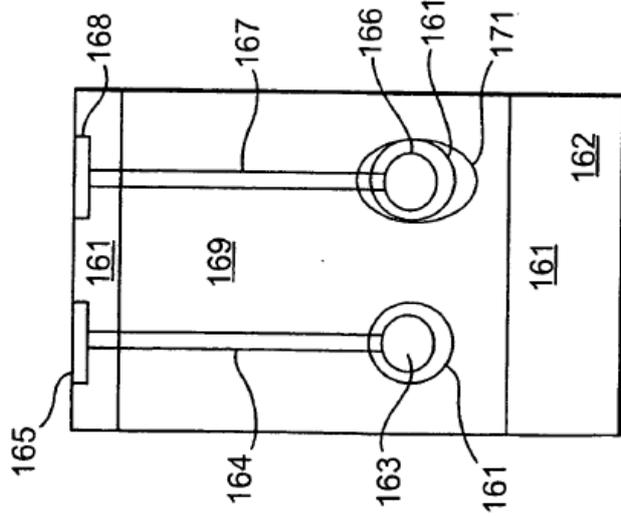


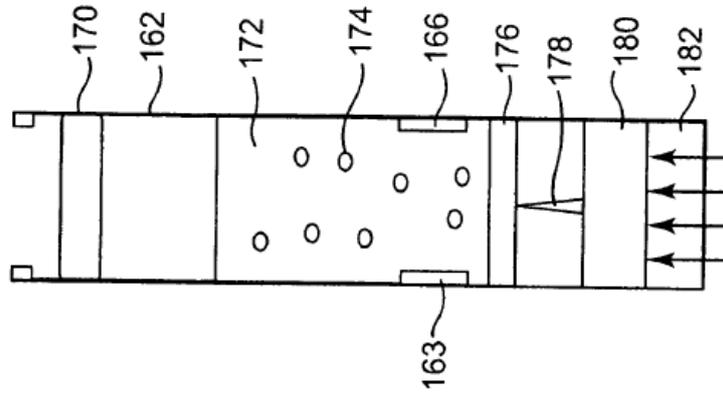
Fig. 7B



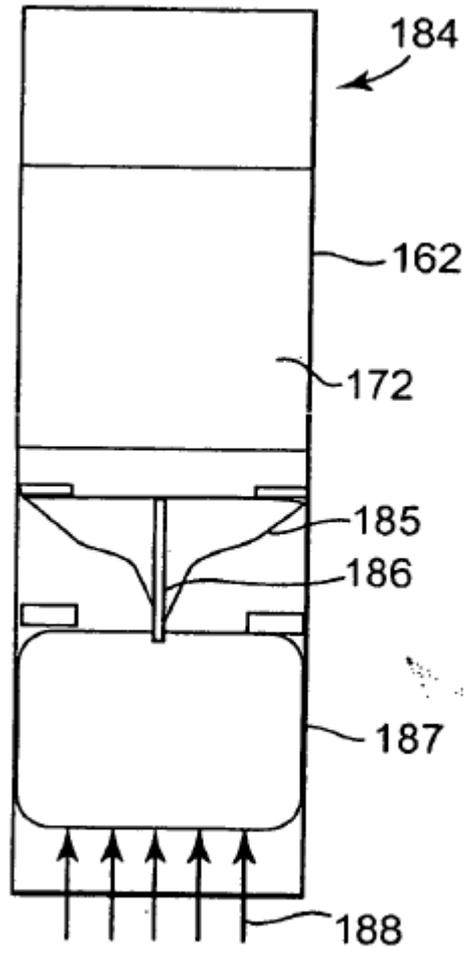
**Fig. 8B**



**Fig. 8A**



**Fig. 8C**



**Fig. 8D**

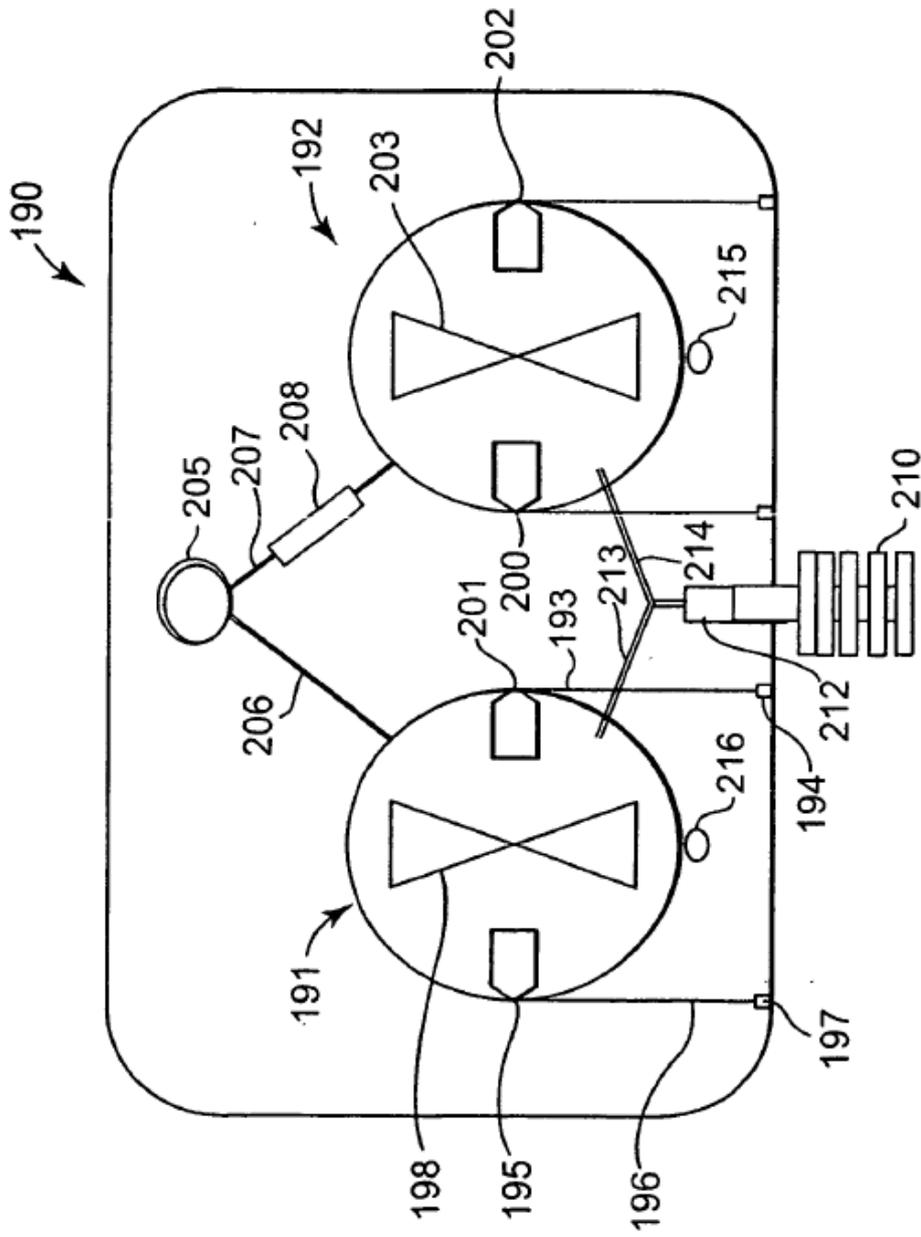
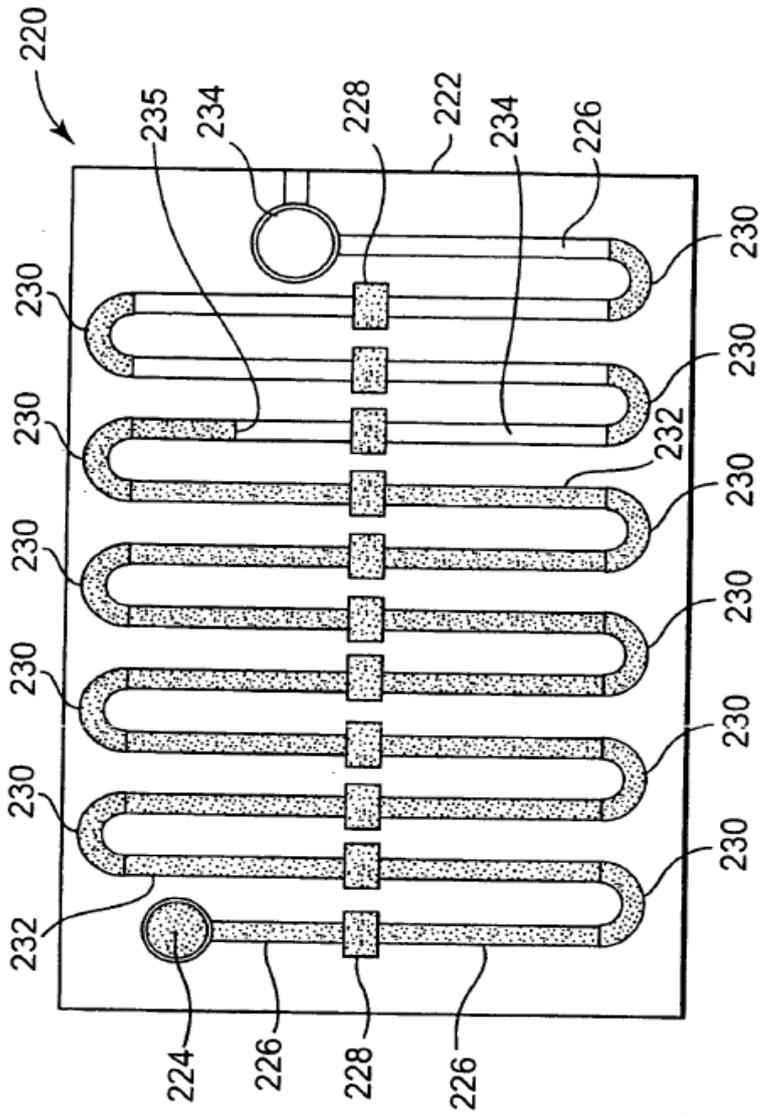
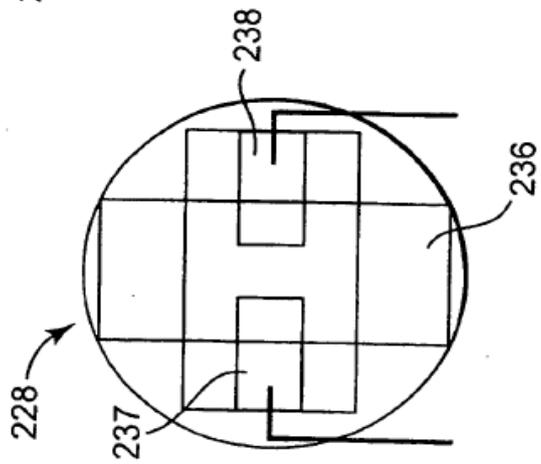


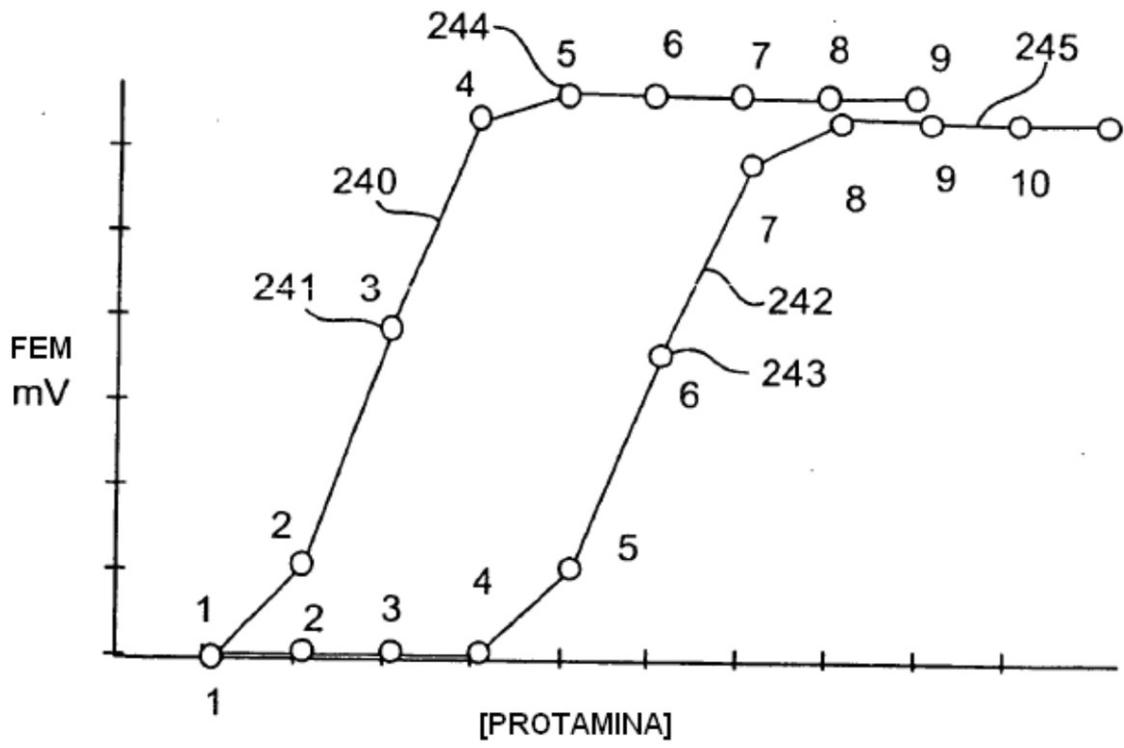
Fig. 9



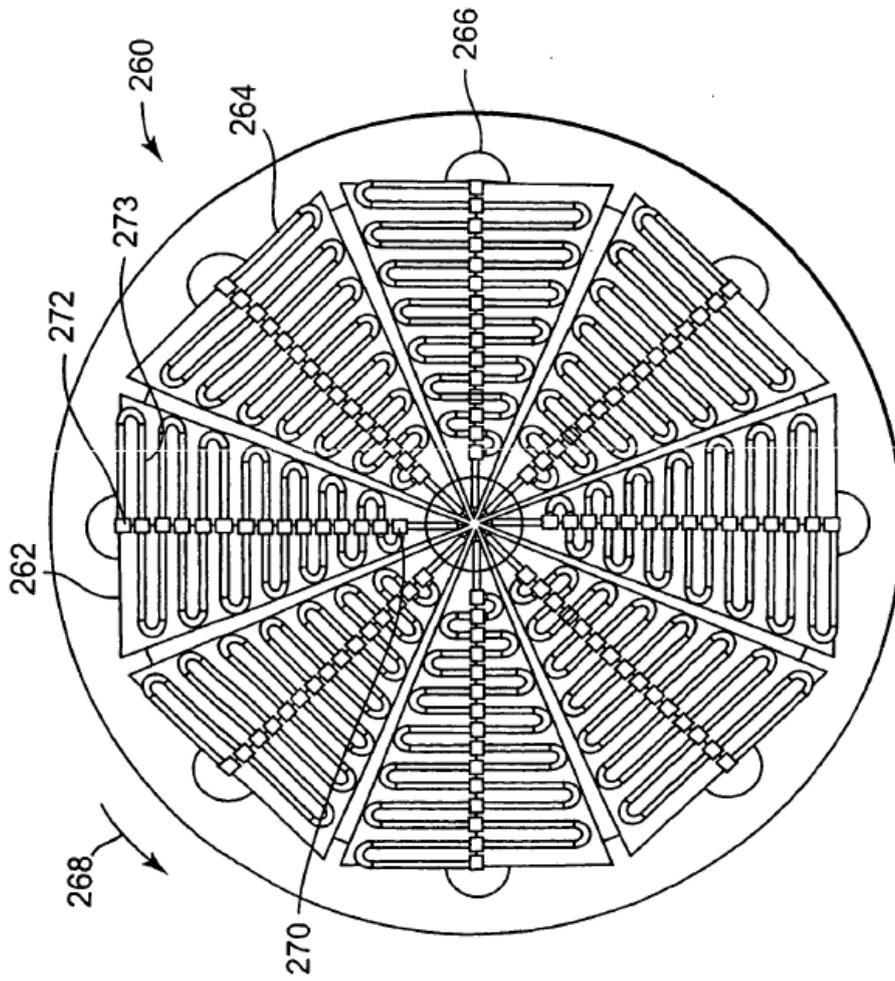
**Fig. 10A**



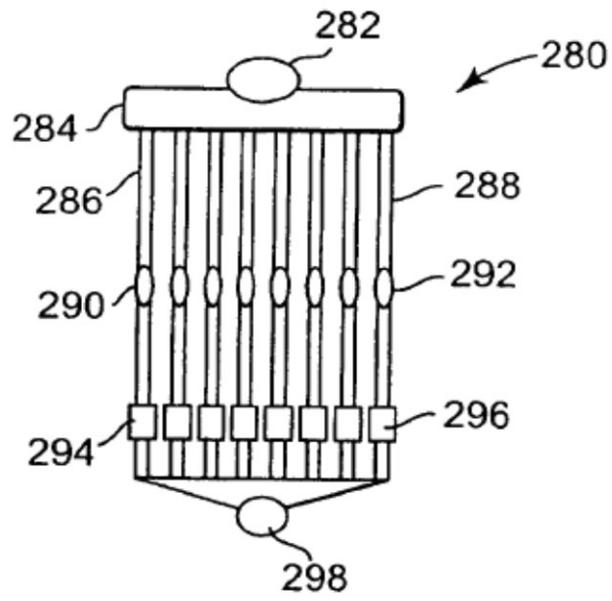
**Fig. 10B**



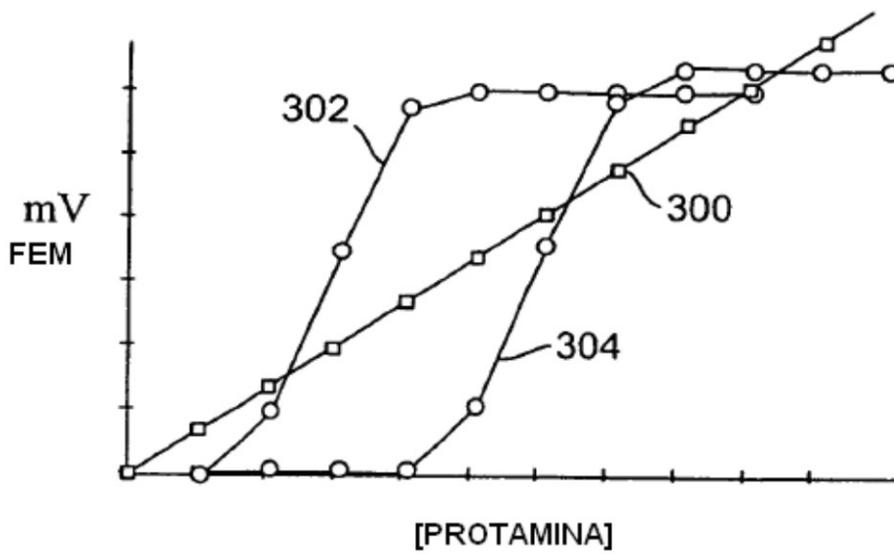
**Fig. 10C**



**Fig. 11**



**Fig. 12A**



**Fig. 12B**

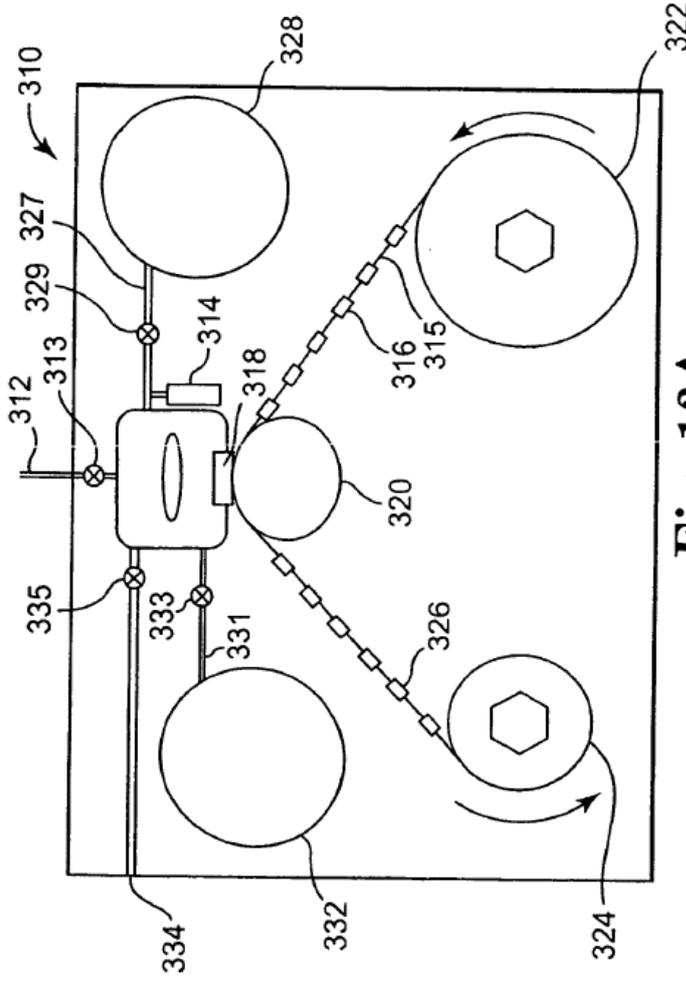


Fig. 13A

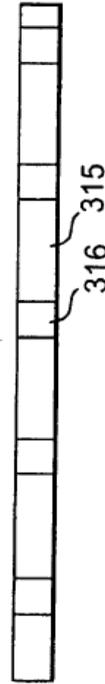


Fig. 13B

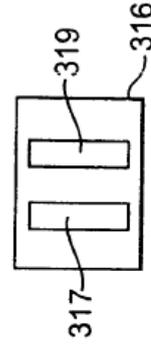


Fig. 13C

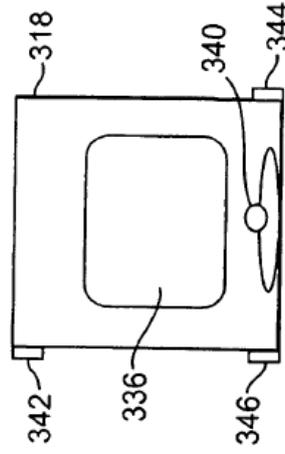


Fig. 13D

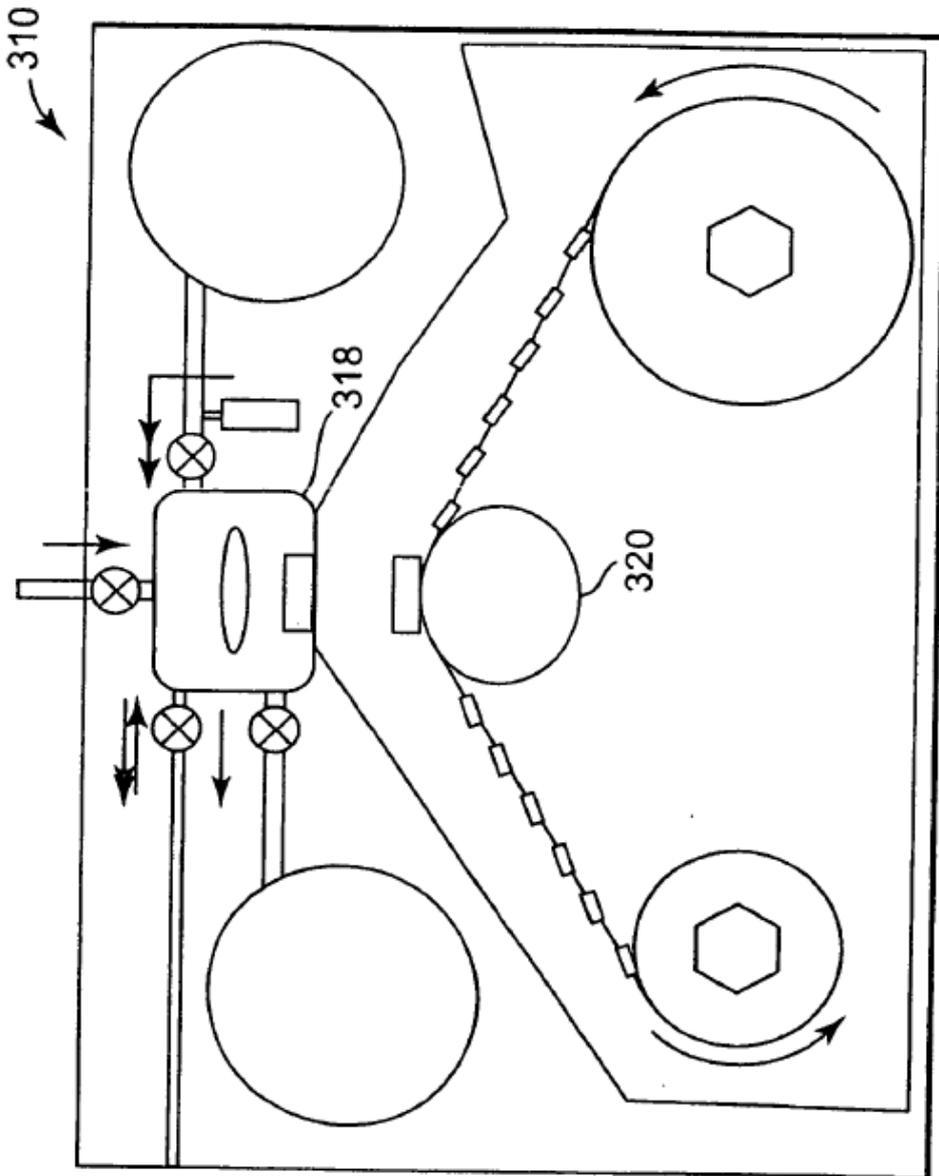


Fig. 13E

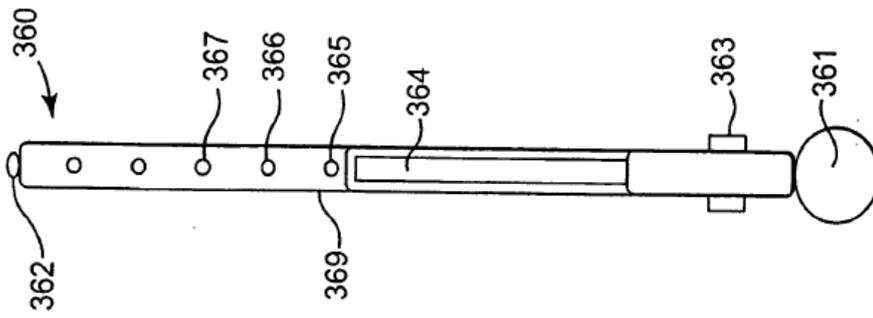


Fig. 14A

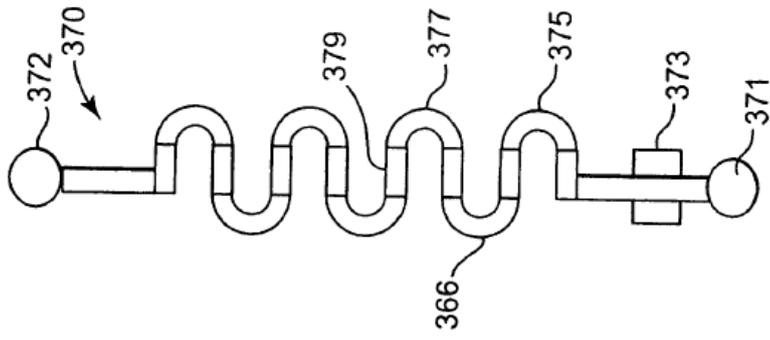
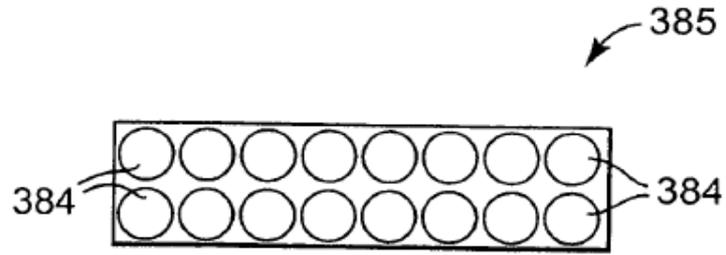
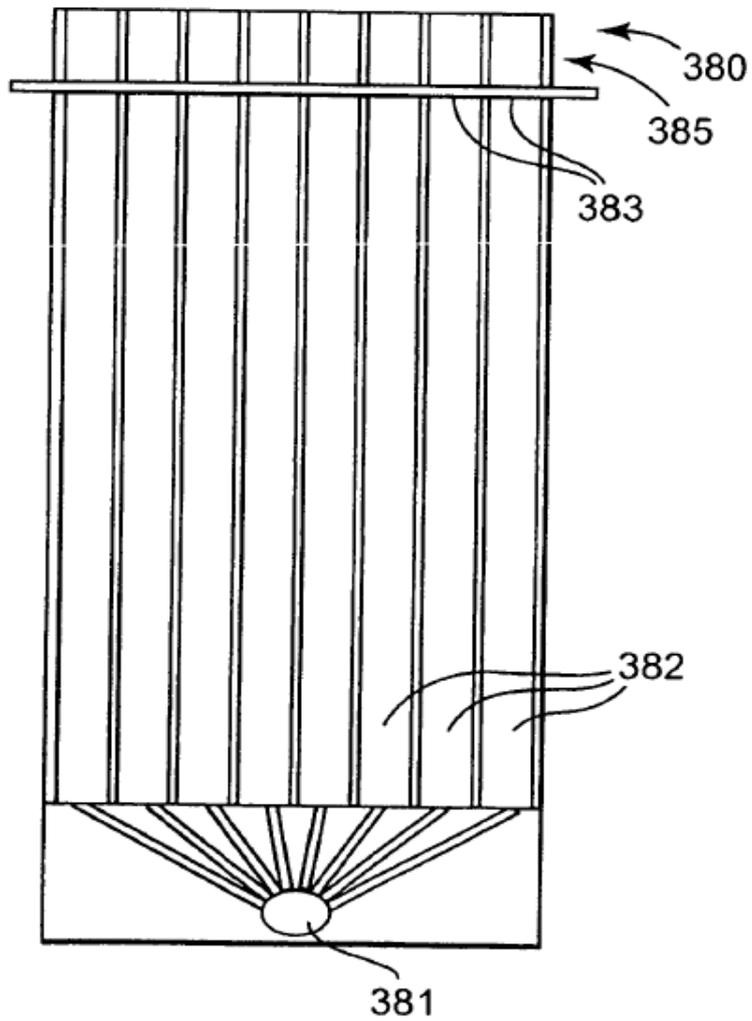


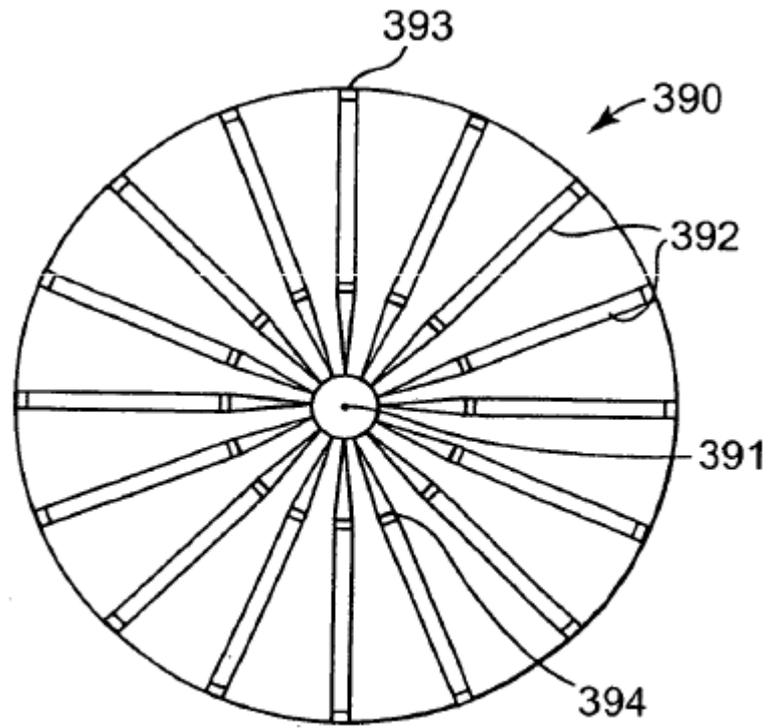
Fig. 14B



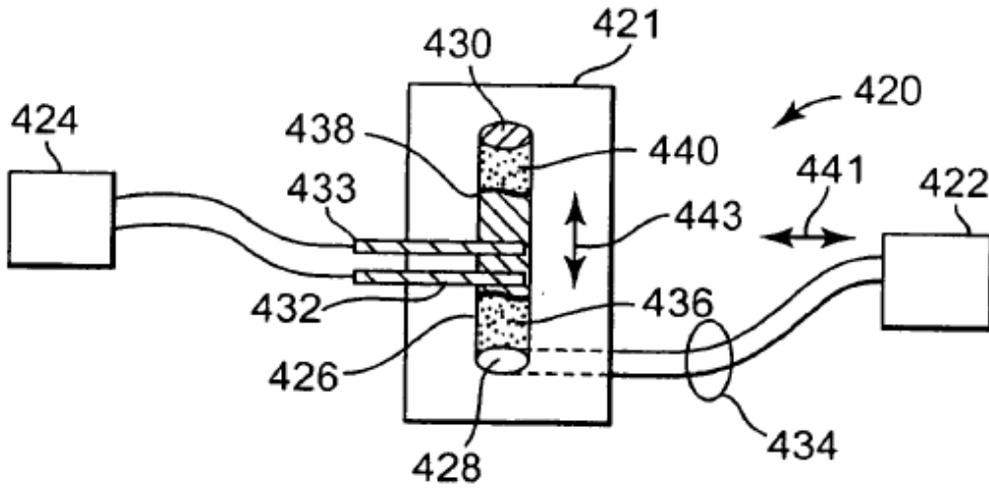
**Fig. 15B**



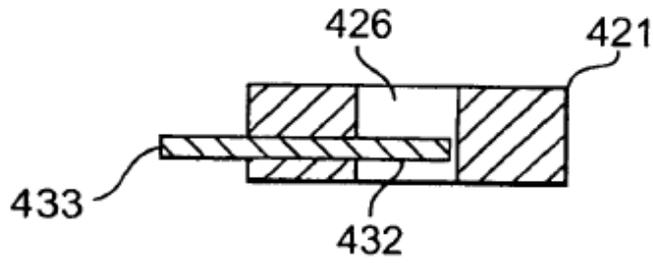
**Fig. 15A**



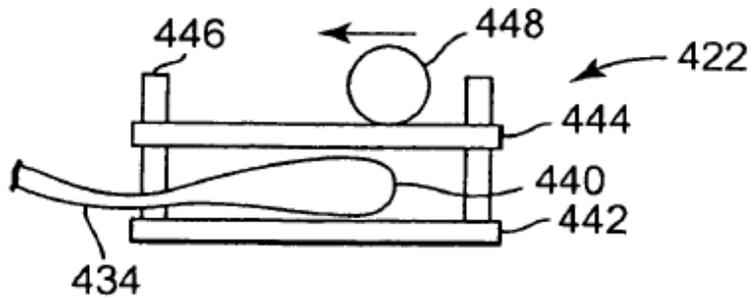
**Fig. 15C**



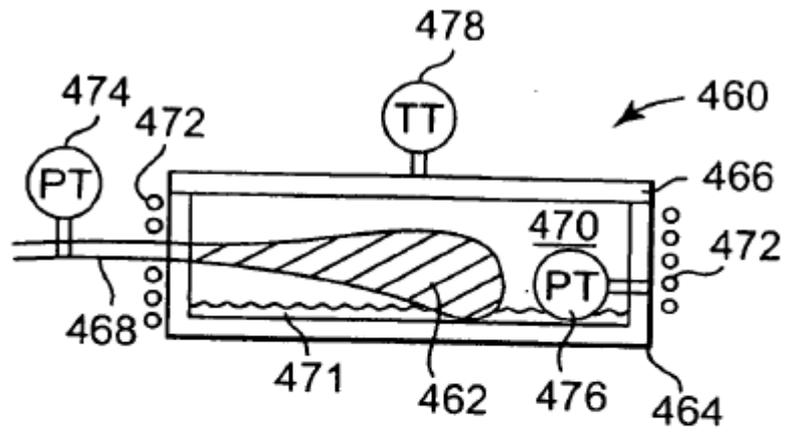
**Fig. 16A**



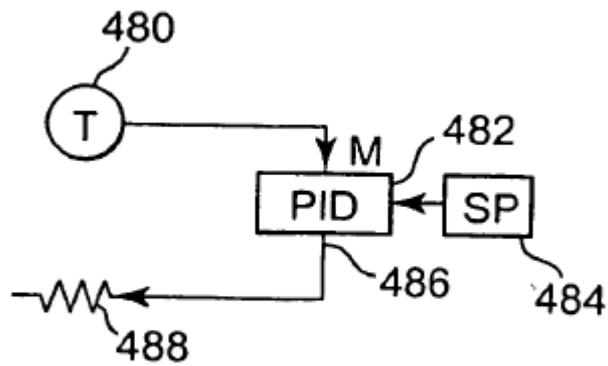
**Fig. 16B**



**Fig. 16C**



**Fig. 17A**



**Fig. 17B**

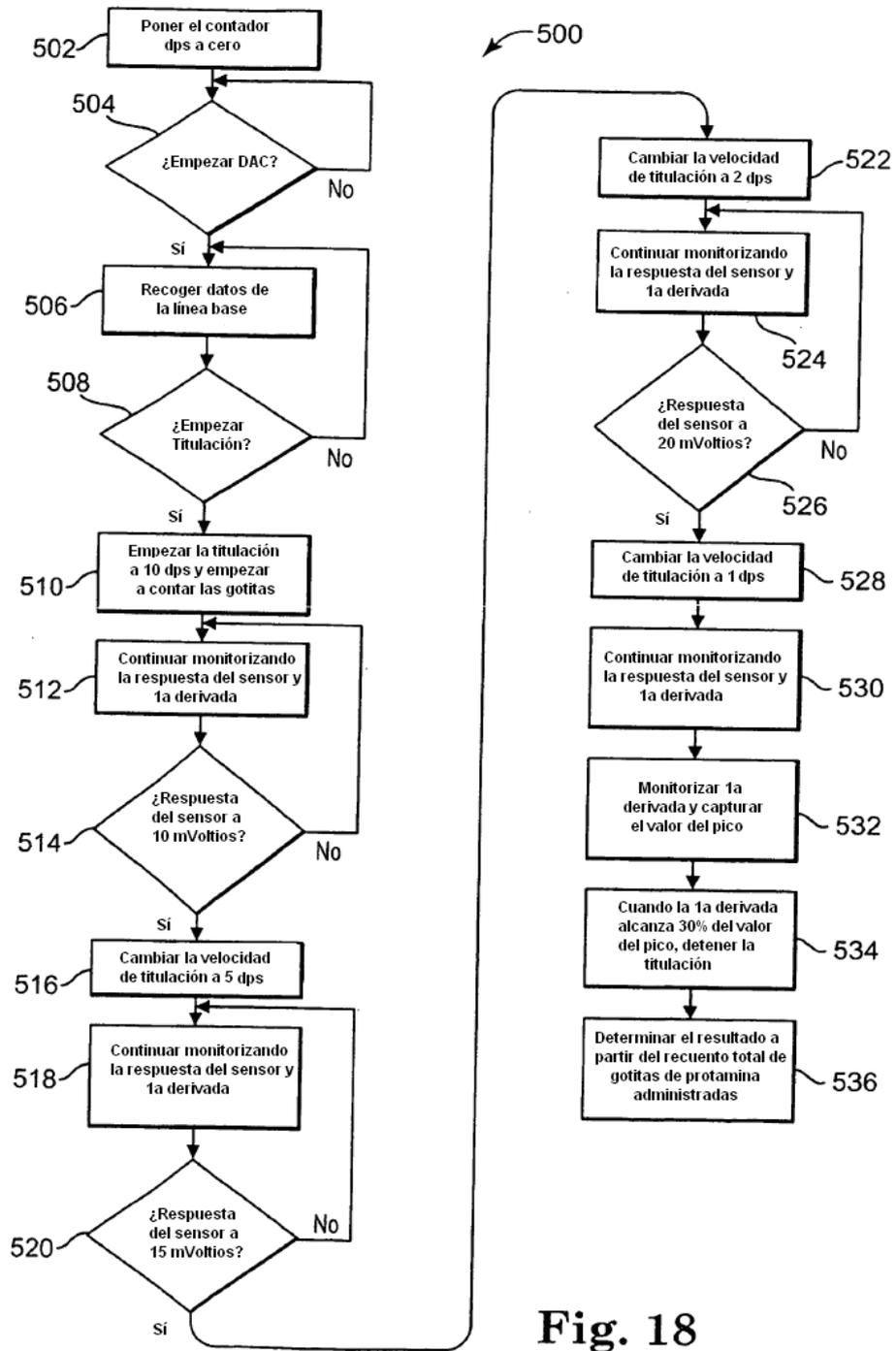


Fig. 18

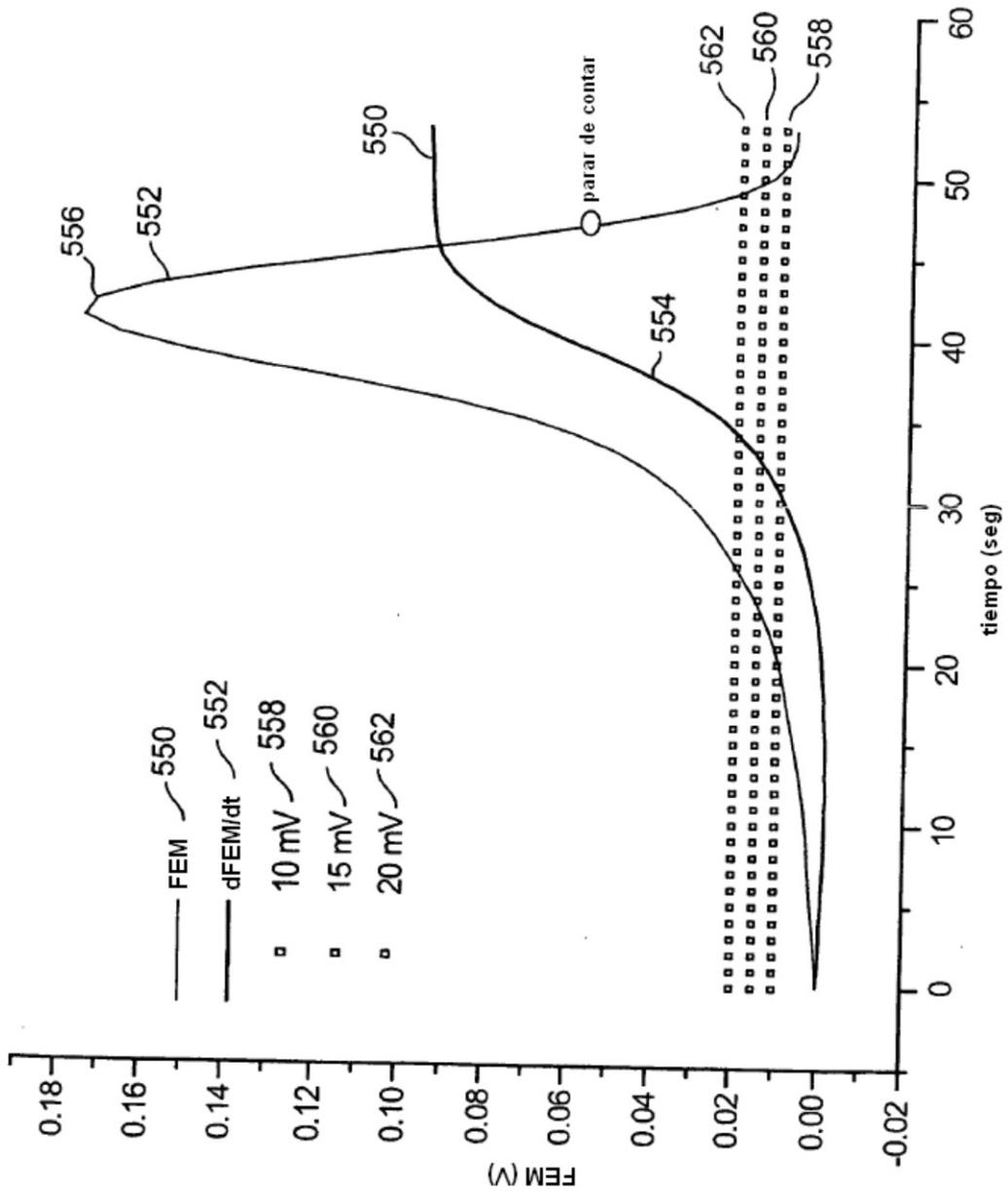
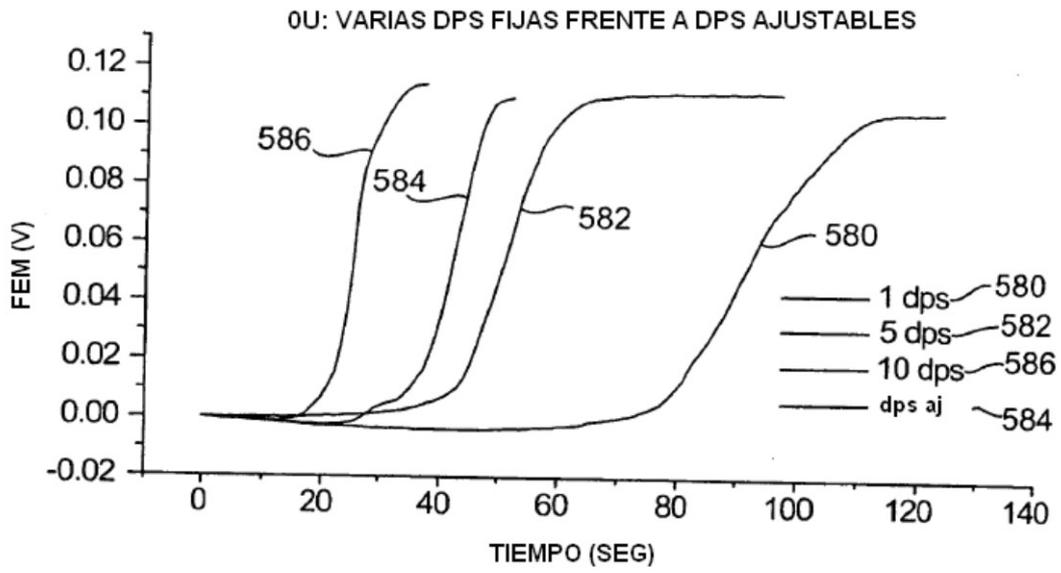
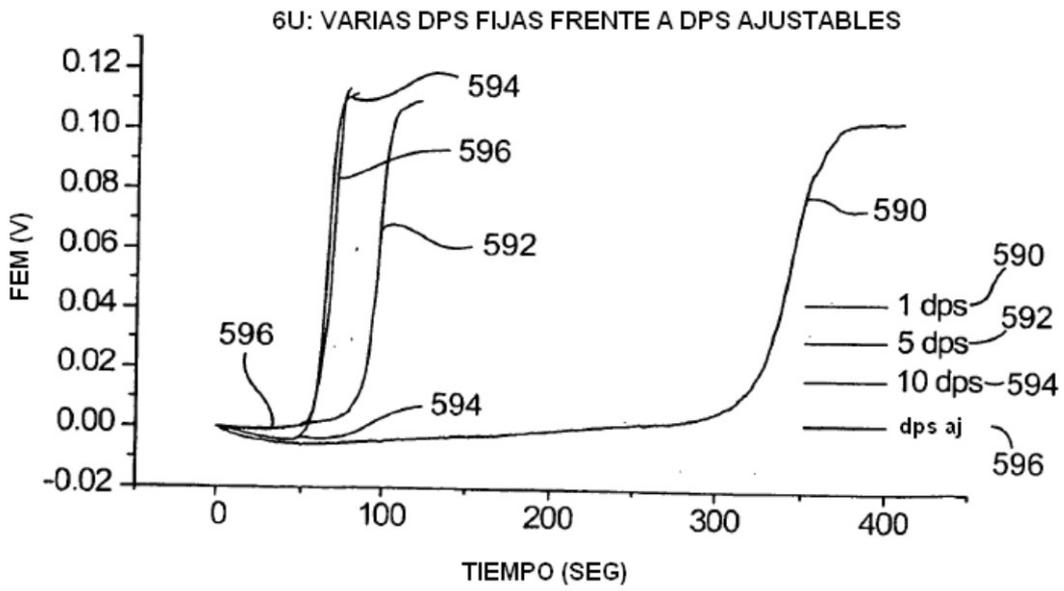


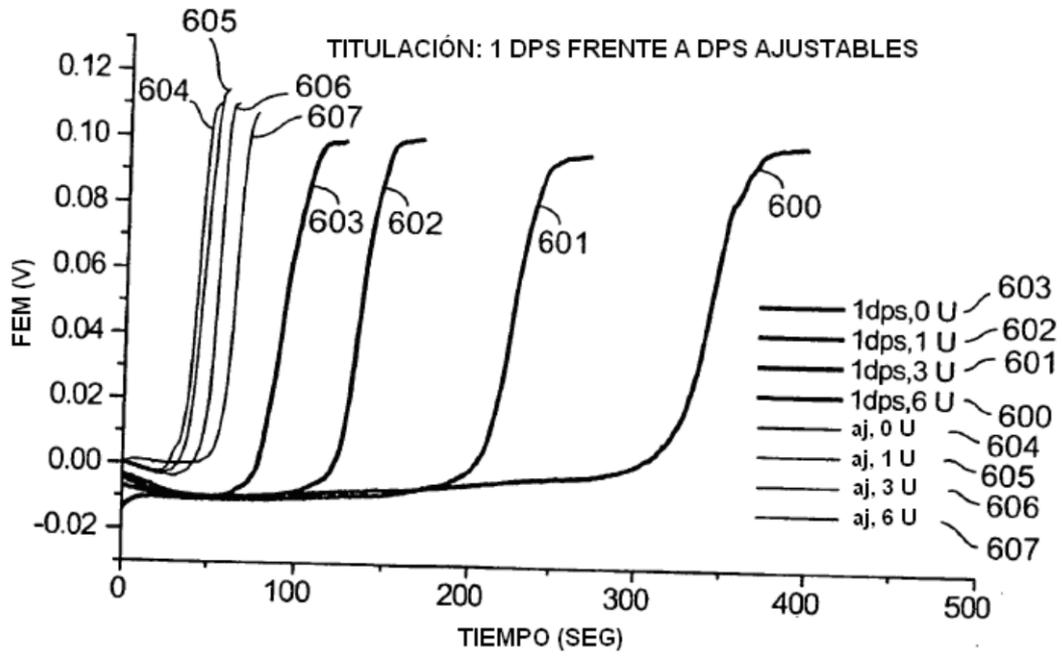
Fig. 19



**Fig. 20**



**Fig. 21**

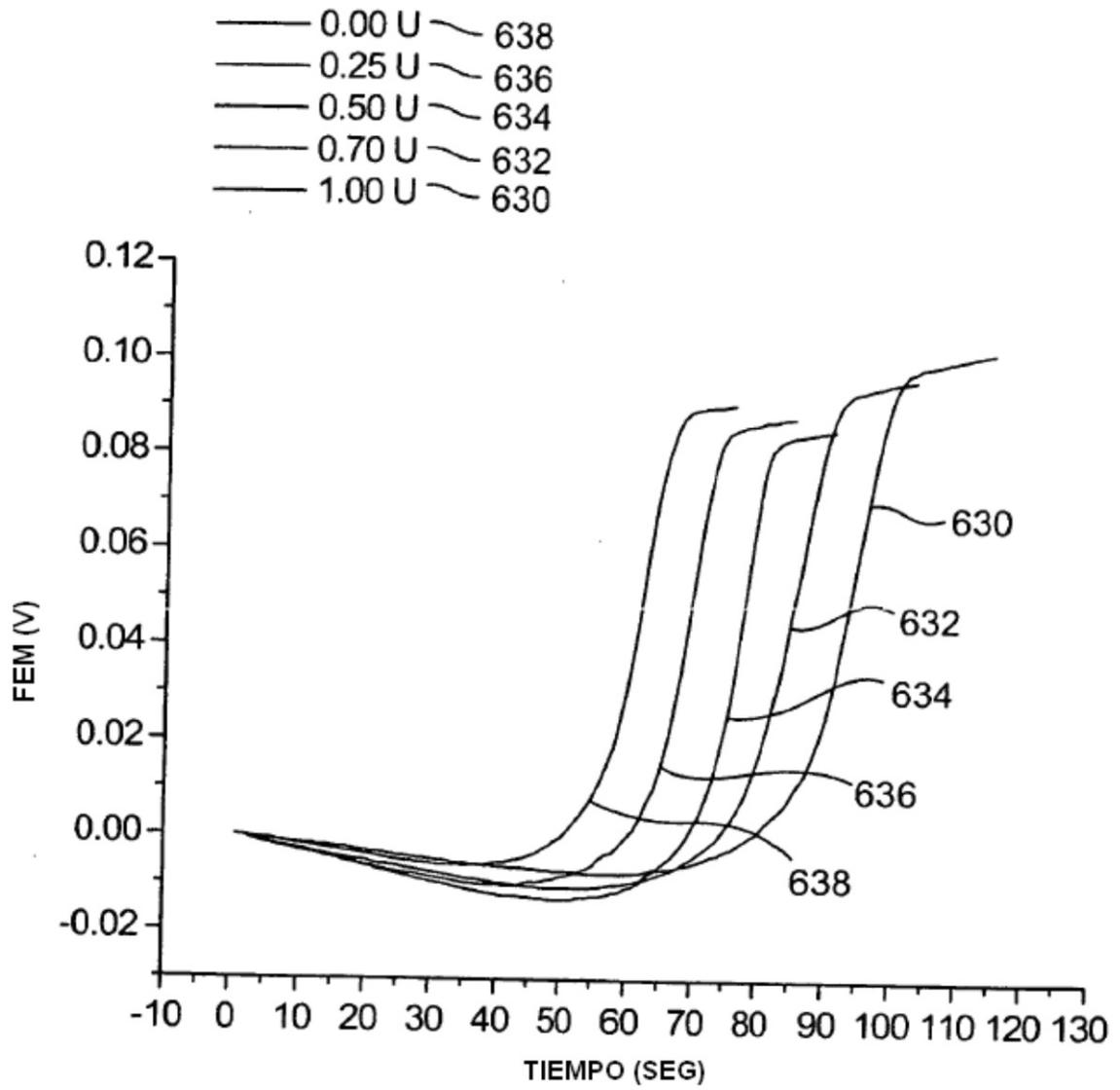


**Fig. 22**

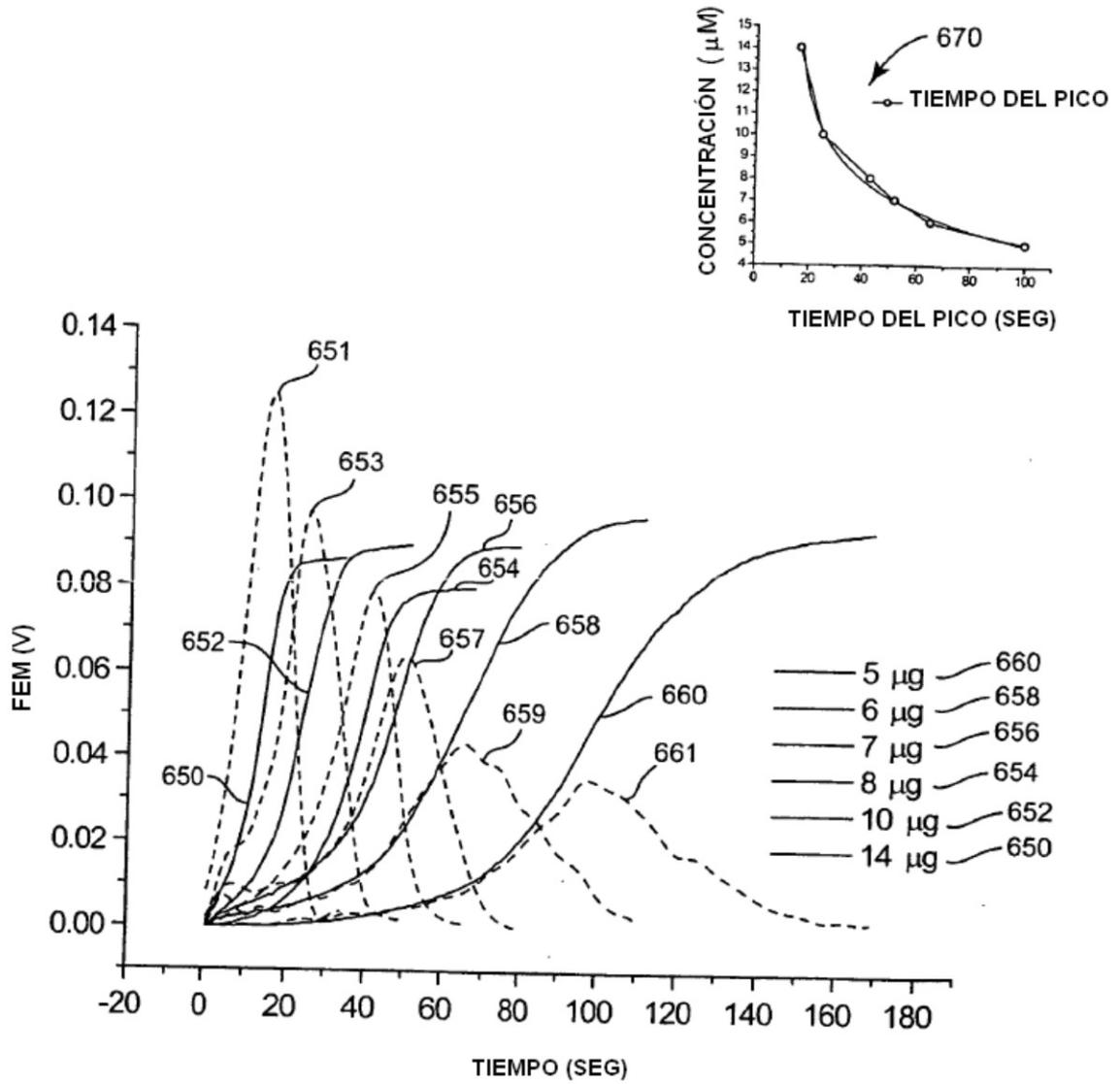
	heparina	recuento	Restar 0U	Relación respecto a 1U
5 dps	0 U	262		
	1 U	280	18	1
	3 U	370	108	6
	6 U	474	212	11.8
Dps ajustables	0 U	154		
	1 U	193	39	1
	3 U	270	116	3
	6 U	415	261	6.7

**Fig. 23**

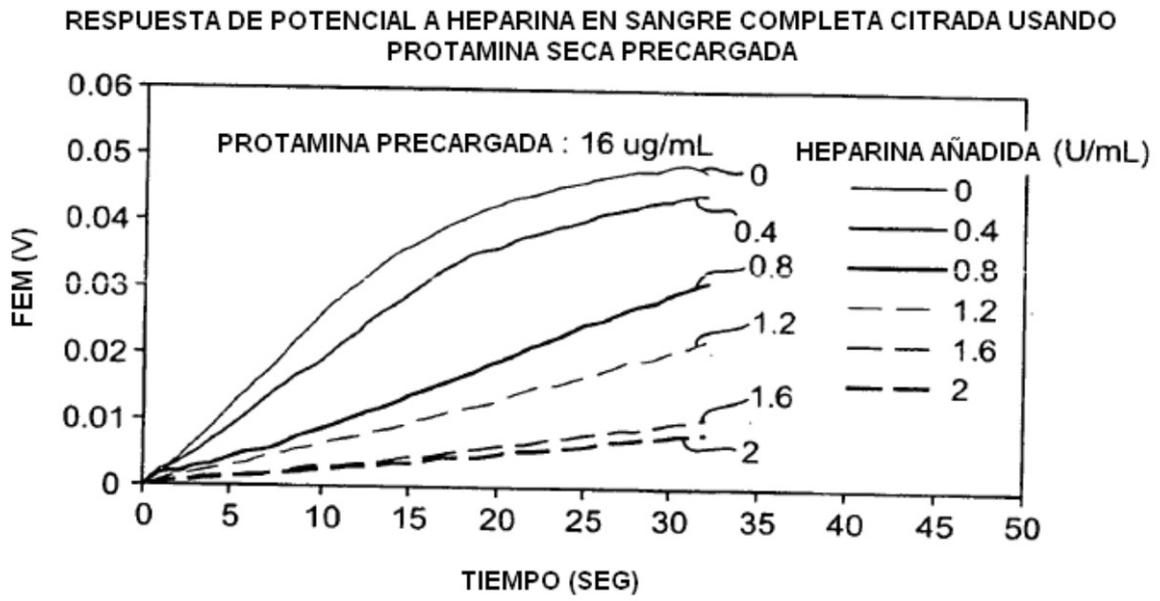




**Fig. 25**

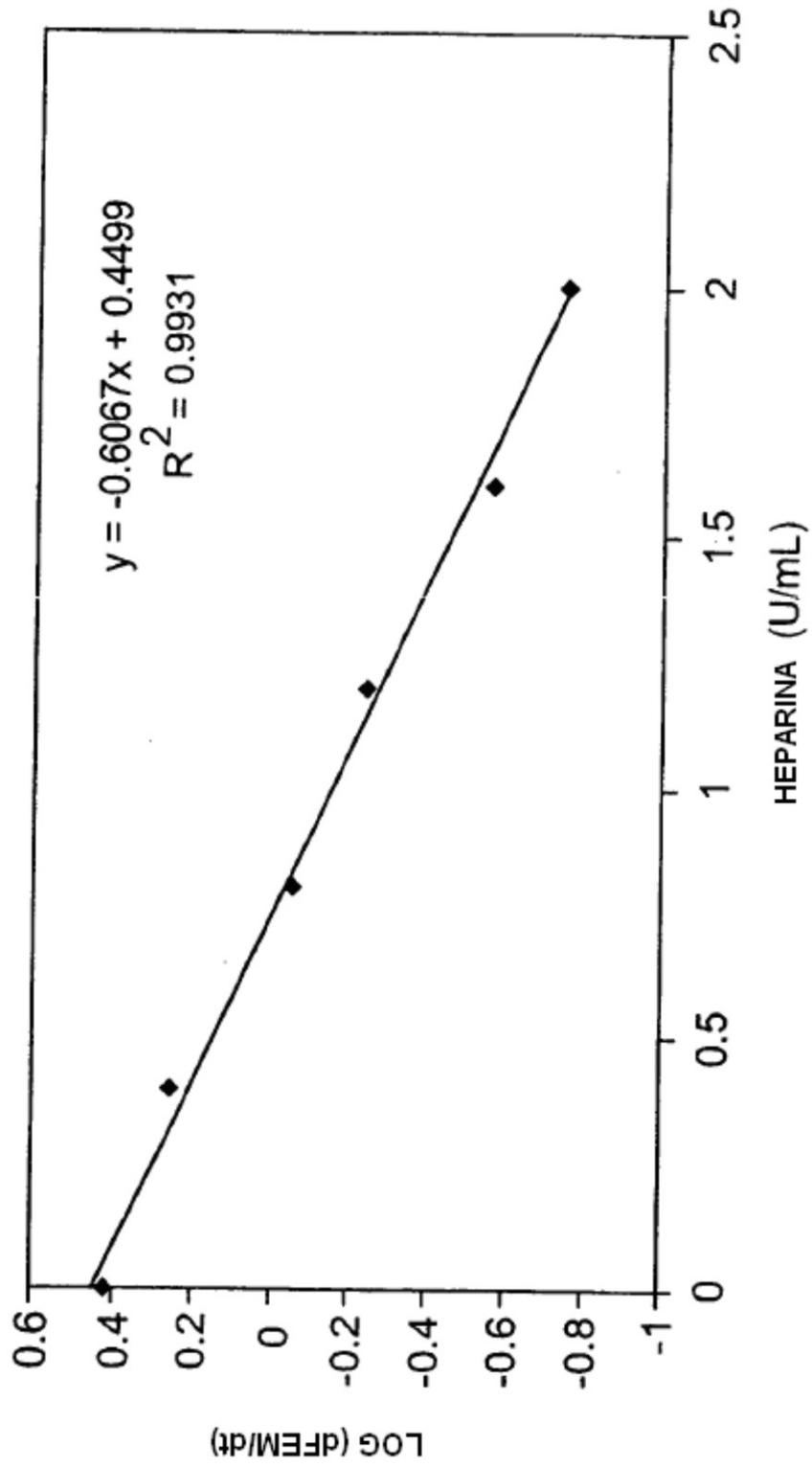


**Fig. 26A**

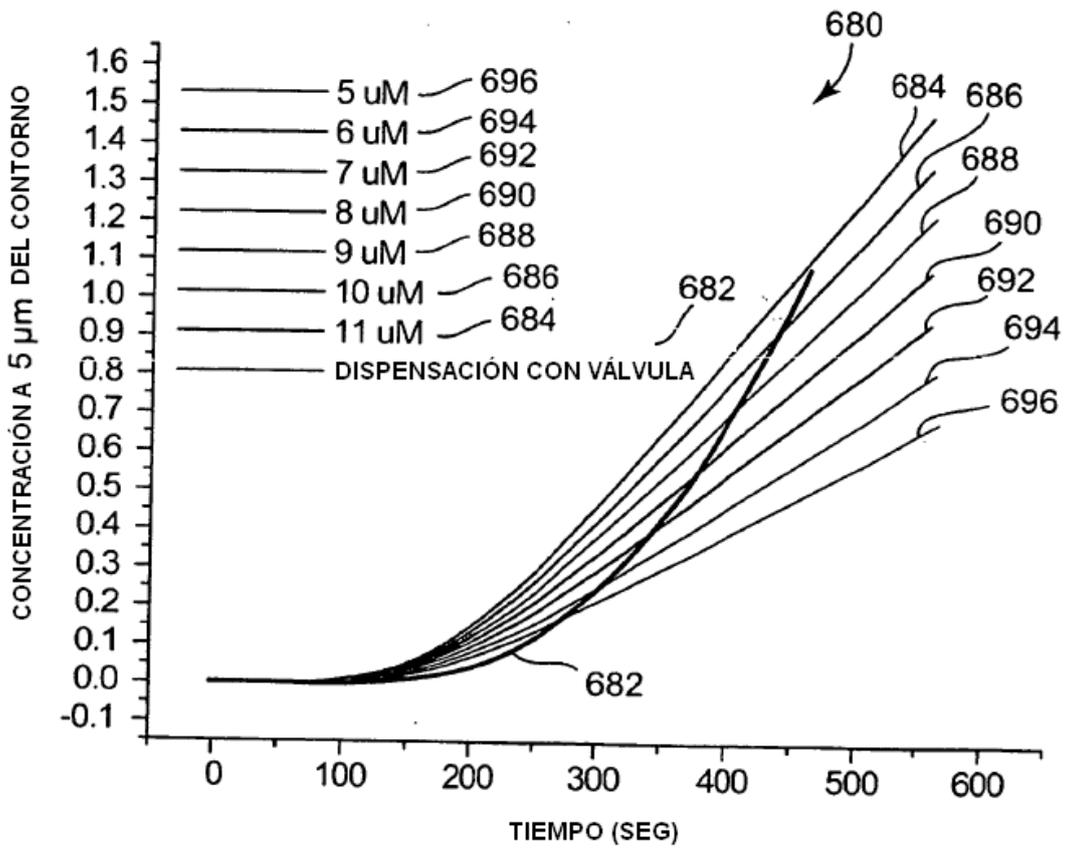


**Fig. 26B**

RELACIÓN LINEAL ENTRE EL LOGARITMO DE dFEM/dt Y HEPARINA

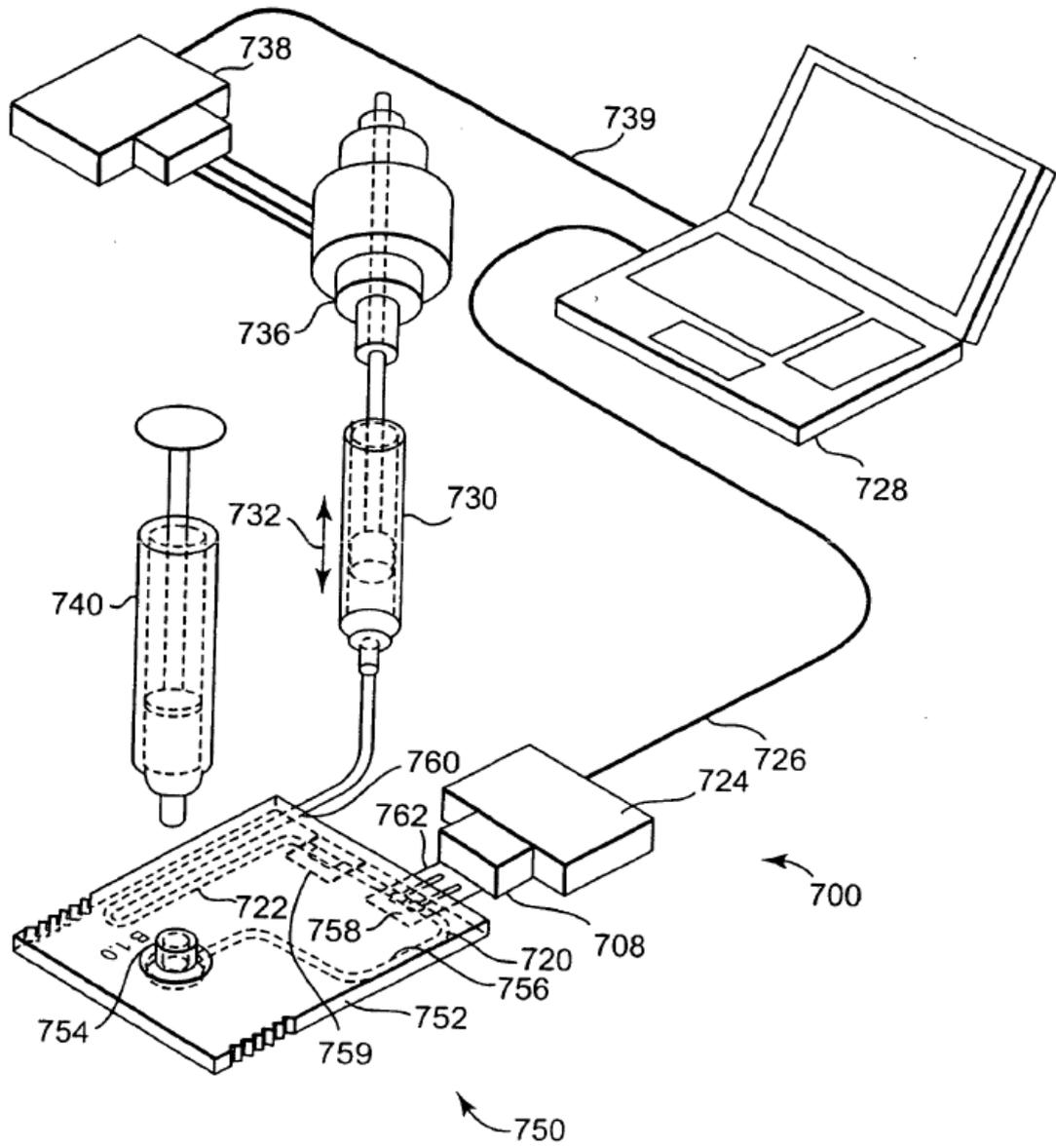


**Fig. 26C**



**Fig. 27**





**Fig. 29A**

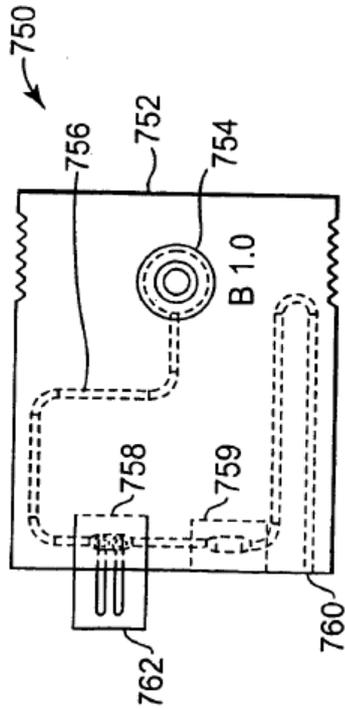


Fig. 29B

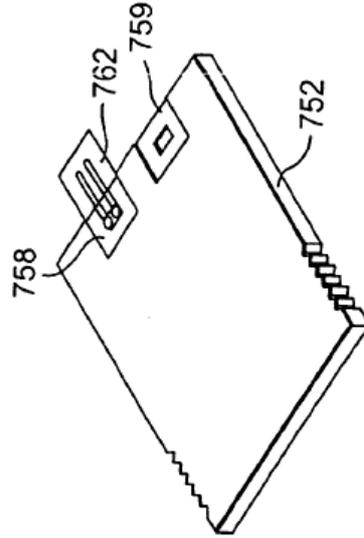


Fig. 29C

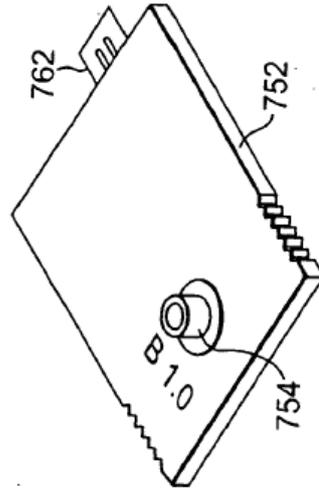


Fig. 29D

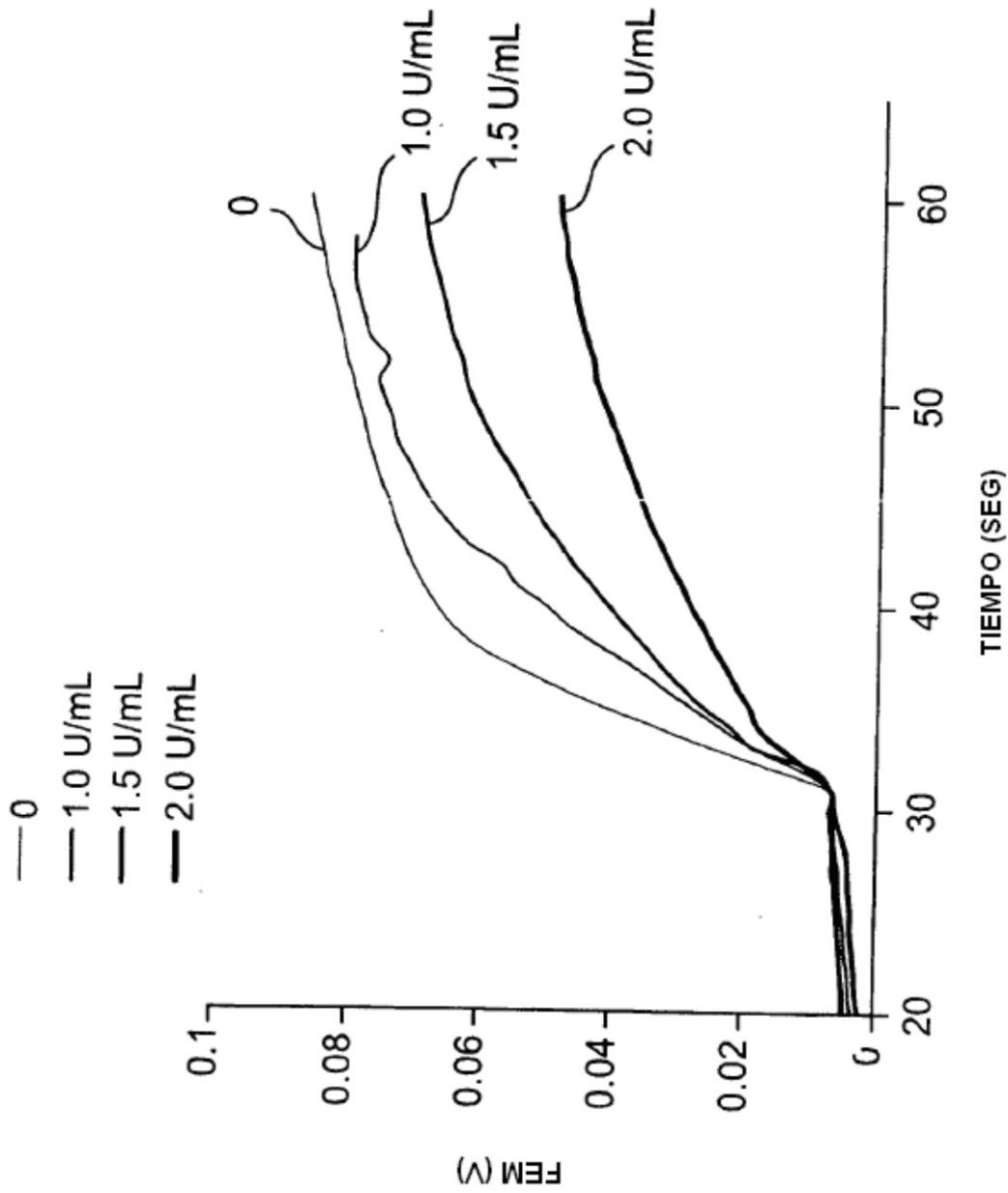
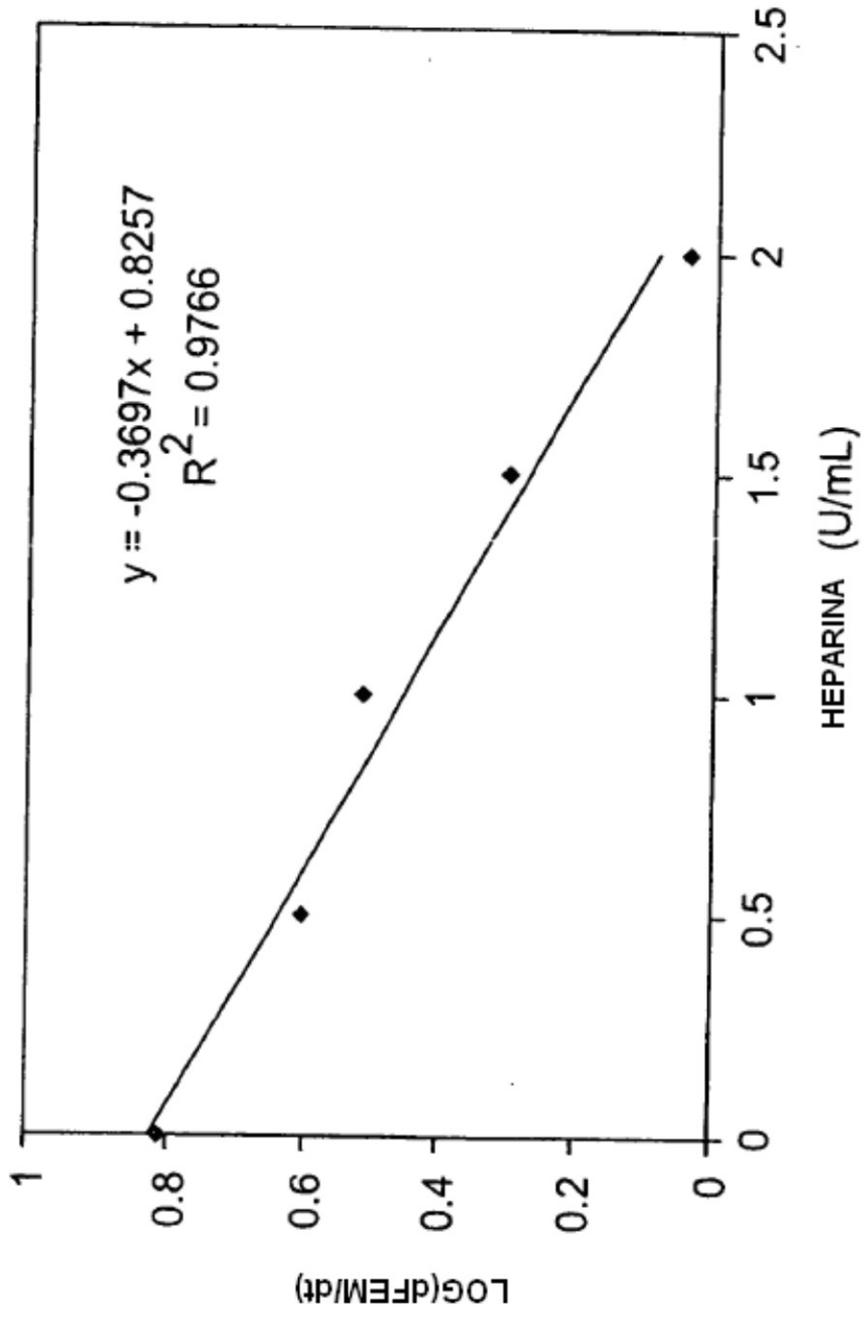


Fig. 30A



**Fig. 30B**