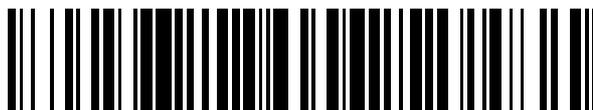


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 494**

51 Int. Cl.:

G01N 33/80 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

G01N 1/44 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10172912 .7**

96 Fecha de presentación: **02.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2249164**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2010**

54 Título: **Un método para procesar un fluido biológico para la determinación de un analito**

30 Prioridad:

03.07.2006 EP 06013762
25.07.2006 EP 06015470

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

11.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

11.12.2012

73 Titular/es:

SEBO GMBH (100.0%)
Karpfengasse 8
69117 Heidelberg, DE

72 Inventor/es:

SEIDEL, DIETRICH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 494 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un método para procesar un fluido biológico para la determinación de un analito

5 La presente invención se refiere a un método para procesar un fluido biológico que comprende eritrocitos mediante tratamiento térmico. El método es particularmente útil para preparar muestras biológicas para la detección de analitos. Adicionalmente, la invención se refiere a un fluido biológico procesado, que comprende componentes celulares disgregados sustancial y cuantitativamente.

10 La determinación de analitos en muestras procedentes de fluidos biológicos requiere a menudo procedimientos de pretratamiento complicados y tediosos a fin de eliminar componentes celulares de la muestra fluida. Por ejemplo, la sangre completa contiene componentes, a saber, eritrocitos, leucocitos y trombocitos. A fin de determinar analitos en una muestra de sangre, estos componentes celulares a menudo tienen que ser eliminados mediante procedimientos de pretratamiento tales como centrifugación, filtración, sedimentación y/u homogeneizados mediante lisis usando reactivos químicos o tratamiento mecánico. Sin embargo, estos procedimientos a menudo son difíciles de integrar en un formato de ensayo automatizado. Esto también es aplicable para una situación en la que los analitos diana están presentes en los componentes celulares, por ejemplo fármacos inmunosupresores en eritrocitos. En este caso, los componentes celulares se aíslan o se enriquecen mediante centrifugación y/o filtración antes de la adición de un reactivo de lisis, o se desnaturalizan mediante adición de un agente desnaturalizante a la muestra original, por ejemplo una mezcla de $ZnSO_4$ y acetonitrilo, o la muestra original se trata con temperaturas de -20 a $-170^\circ C$.

Un objeto de la presente invención fue proporcionar un método mejorado para procesar fluidos biológicos, que no tenga las desventajas asociadas con procedimientos de la técnica anterior.

20 Un primer aspecto de la presente invención es un método para procesar un fluido biológico que comprende eritrocitos, como se define en la reivindicación 1.

Un aspecto adicional de la presente invención es un fluido biológico procesado que comprende eritrocitos cuantitativamente disgregados, que está libre de productos de sedimentación, precipitación, desnaturalización, aglutinamiento y gelificación, como se define en la reivindicación 8.

25 Aún un aspecto adicional de la presente invención es un método para determinar un analito en una muestra de fluido biológico, en el que el fluido biológico se procesa como se describe anteriormente, y el analito se determina en el fluido biológico procesado.

30 Sorprendentemente, se ha encontrado que se puede lograr una digregación completa de componentes celulares, preferiblemente células o agrupamientos de células de organismos superiores, más preferiblemente células de animales tales como células de mamífero, incluyendo células de seres humanos, y lo más preferible células de la sangre tales como eritrocitos, leucocitos y/o trombocitos, en muestras de sangre, mediante tratamiento térmico en condiciones predeterminadas de tiempo y temperatura. Por medio de este tratamiento térmico, los componentes celulares contenidos en un fluido biológico se disgregan sin sedimentación, precipitación, desnaturalización, aglutinamiento y/o gelificación sustancial de los componentes del fluido.

35 El tratamiento térmico se puede llevar a cabo a una temperatura de $60-90^\circ C$, preferiblemente de $60-75^\circ C$, y más preferiblemente de $65-70^\circ C$. El tratamiento térmico se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para lograr una disgregación deseada a la temperatura de tratamiento escogida. Preferiblemente, el tratamiento térmico se lleva a cabo durante un tiempo de 5 segundos a 1 minuto, más preferiblemente de 10 segundos a 40 segundos. Se prefiere especialmente una temperatura de $70^\circ C$ durante 30-40, por ejemplo 35 segundos. El tratamiento térmico se puede llevar a cabo en cualquier recipiente adecuado, por ejemplo un capilar de vidrio ($55 \times 0,5$ mm de diámetro interno).

40 En la Tabla 1 se muestran condiciones adecuadas para el tratamiento térmico de una muestra de sangre completa con un recuento eritrocítico dado, opcionalmente suplementada con disolventes orgánicos y/o plasma del grupo sanguíneo AB. Estas condiciones de temperatura/tiempo se definen mediante un límite de tiempo superior (indicado como valor t_{max}) a una temperatura dada, y mediante un límite de tiempo inferior (indicado como valor t_{min}) a una temperatura dada. Si el tratamiento térmico se lleva a cabo durante un período de tiempo más prolongado que el valor t_{max} , se produce gelificación. Si el período del tratamiento térmico es más corto que el valor t_{min} , solamente se produce la disgregación incompleta. Si se añaden otros fluidos, por ejemplo disolventes orgánicos y/o fluidos acuosos, por ejemplo plasma, a la muestra antes del tratamiento térmico, los valores de t_{max} y t_{min} pueden variar como se muestra en las Tablas 2-6.

45 La gelificación de la muestra se puede determinar por un incremento de la viscosidad. La terminación de la disgregación se puede determinar mediante el recuento de células, por ejemplo en una cámara de recuento de Neubauer, mediante inspección microscópica para componentes particulares y/o mediante la falta de formación de sedimentos tras la centrifugación. En este contexto, se debería de señalar que alrededor de 95% de los componentes celulares de la sangre están representados por eritrocitos. De este modo, el recuento celular en una muestra de sangre se determina preferiblemente contando los eritrocitos.

50 Por medio de la presente invención, el recuento celular en la muestra se reduce preferiblemente hasta 0,1% o me-

nos, y más preferiblemente hasta 0,01% o menos del valor original. Por ejemplo, cuando se somete una muestra con 5×10^6 eritrocitos por μl a tratamiento térmico, el recuento celular se reduce preferiblemente hasta 5×10^3 células o menos por μl (véase el Ejemplo 1), más preferiblemente hasta 500 células o menos por μl . Lo más preferible, la muestra está libre de células detectables. La ausencia de componentes particulares también se puede determinar mediante observación microscópica a la luz, por ejemplo con un aumento de hasta 100x, y/o mediante centrifugación durante 10 minutos a una velocidad de hasta 3000g, preferiblemente hasta 7400g.

El tratamiento térmico se puede llevar a cabo cuando el fluido se mantiene estático, por ejemplo mientras que el fluido está en una vasija de reacción. En una realización preferida, sin embargo, particularmente para operaciones automatizadas, el tratamiento térmico se puede llevar a cabo mientras que el fluido está en circulación, por ejemplo mientras que el fluido se hace pasar a través de un conducto. El tratamiento térmico en un sistema que fluye se puede llevar a cabo mientras se hace pasar el fluido de la muestra a través de un conducto calentado, por ejemplo un conducto capilar, preferiblemente con un diámetro interno de alrededor de 0,1-0,8 mm, por ejemplo de alrededor de 0,5 mm, con un caudal predeterminado, en el que el conducto tiene una longitud predeterminada a fin de lograr el tiempo de permanencia deseado dentro del conducto calentado. El calentamiento se puede llevar a cabo por cualquier medio adecuado, y puede comprender, por ejemplo, calentamiento inductivo, tal como tratamiento con microondas, por ejemplo como se describe en el documento US 6.605.454, calentamiento convectivo, calentamiento resistivo y/o calentamiento mediante excitación con láser.

El fluido biológico puede ser un fluido biológico tal como sangre completa, tal como sangre venosa, arterial o capilar, particularmente sangre completa tratada con anticoagulantes, por ejemplo sangre completa tratada con EDTA, citrato, o heparina. Por ejemplo, se puede tomar una muestra con un dispositivo de extracción de sangre que contiene un anticoagulante, y se puede someter directamente a un procesamiento posterior como se describe más abajo.

El volumen de la muestra puede variar ampliamente, por ejemplo en el intervalo de 1 nl o más, preferiblemente 10 nl o más, y hasta 1 ml. De este modo, el método es adecuado para aplicaciones en miniatura, por ejemplo dispositivos microfluidicos en formato de chip, análisis nano LC-MS, etc.

El método de la presente invención no requiere etapas de sedimentación y/o de precipitación y/o de centrifugación y/o la adición de lisis química y/o reactivos de disgregación. De este modo, el tratamiento térmico se lleva a cabo preferiblemente sin eliminación y/o lisis previa de componentes celulares. El método se puede llevar a cabo en cualquier dispositivo adecuado, por ejemplo un dispositivo de un solo uso, o un dispositivo reutilizable. Preferiblemente, el método es un procedimiento automatizado, que se puede llevar a cabo en un dispositivo integrado, es decir, un dispositivo en el que la muestra de fluido se transfiere, opcionalmente tras el mezclamiento, por ejemplo con un fluido adicional, sin pretratamiento, particularmente sin eliminación y/o lisis de componentes celulares. Dentro del dispositivo, la muestra se somete preferiblemente de forma directa al tratamiento sin eliminación y/o una lisis previa de los componentes celulares. Después del tratamiento, se pueden llevar a cabo etapas subsiguientes, por ejemplo una determinación de un analito. Lo más preferible, el tratamiento térmico se lleva a cabo con una muestra sustancialmente pura, por ejemplo una muestra que comprende componentes celulares sustancialmente intactos tales como sangre completa.

El método de la presente invención puede incluir la adición de otro fluido al fluido biológico antes y/o después del procesamiento. El fluido adicional puede ser un disolvente orgánico, preferiblemente en una cantidad de hasta 20% (vol/vol), más preferiblemente en una cantidad de hasta 10% (vol/vol), basada en el volumen del fluido biológico. El disolvente orgánico se selecciona preferiblemente de disolventes miscibles con agua, tales como metanol, etanol, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, y sus combinaciones. La adición de disolventes orgánicos puede tener una influencia sobre las condiciones de temperatura/tiempo para el tratamiento térmico como se muestra en las Tablas 2 y 3.

Preferiblemente, el fluido adicional no efectúa sustancialmente la lisis de los componentes celulares. Más preferiblemente, el fluido adicional es un fluido acuoso, por ejemplo una disolución tampón acuosa o un fluido biológico adicional, que tiene preferiblemente una fuerza iónica que corresponde a 0,5-1,4% de NaCl, más preferiblemente 0,7-1,2% de NaCl, y lo más preferible alrededor de 0,9% de NaCl. Preferiblemente, el fluido acuoso es un fluido biológico sin componentes celulares, tal como plasma. Más preferiblemente, el plasma es plasma del grupo sanguíneo AB. El fluido acuoso adicional puede comprender un disolvente orgánico, por ejemplo en una cantidad de hasta 20% (vol/vol), preferiblemente hasta 10% (vol/vol), basada en el volumen del segundo fluido biológico, tal como metanol, etanol, acetonitrilo, dimetilsulfóxido y/o sus combinaciones. El segundo fluido biológico se añade preferiblemente en una relación en volumen de 5:1 a 1:10, basada en el volumen del primer fluido biológico. Preferiblemente, el segundo fluido se añade antes del tratamiento térmico. La adición del segundo fluido puede influir en las condiciones adecuadas de temperatura/tiempo para la etapa de tratamiento térmico como se muestra en las Tablas 4-6. Sorprendentemente, se encontró que la adición de plasma AB, opcionalmente con un disolvente orgánico, incrementa realmente el intervalo adecuado de tiempo de tratamiento a una temperatura dada.

El fluido adicional puede ser un fluido de estandarización y/o calibrador que comprende una cantidad predeterminada de al menos un compuesto de estandarización y/o calibrador. La adición de compuestos de estandarización y/o calibradores es particularmente adecuada si el fluido biológico tratado con calor se analiza posteriormente por medio de métodos cromatográficos, espectrométricos y/o espectroscópicos. Los compuestos de estandarización y/o calibradores pueden ser análogos de analitos que contienen isótopos estables tales como ^2H y/o ^{13}C , y de este modo se

pueden detectar mediante espectrometría de masas.

El método también puede incluir la adición de un compuesto marcador/de tinción para lípidos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono al fluido biológico, antes y/o después del procesamiento.

5 También se describe una composición que comprende plasma AB, un disolvente orgánico en una cantidad de hasta 20% (vol/vol), preferiblemente hasta 10% (vol/vol) basada en el volumen del plasma, tal como metanol, etanol, acetoneitrilo y/o dimetilsulfóxido, y una cantidad predeterminada de al menos un compuesto de estandarización y/o calibrador. El compuesto se puede usar como un fluido de estandarización y/o calibrador, particularmente en combinación con el procedimiento de tratamiento térmico como se describe anteriormente.

10 Aún un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un fluido biológico procesado que es obtenible como se describe anteriormente. Este fluido procesado representa una nueva matriz que es particularmente adecuada para el ensayo clínico. El fluido procesado es estable al menos 1 semana, preferiblemente al menos 2 semanas a 4°C, y/o al menos 1 día, preferiblemente al menos 5 días, a 25°C. De este modo, la manipulación del fluido procesado es mucho menos complicada en comparación con una muestra de sangre completa no tratada. El término "estable" significa particularmente que no se produce sedimentación.

15 El fluido procesado comprende eritrocitos sustancial y cuantitativamente disgregados. El fluido procesado está libre de productos de sedimentación, precipitación, desnaturalización, aglutinamiento y/o gelificación, y

(i) está libre de componentes particulares al observarlo al microscopio (por ejemplo, un aumento de 100 x);

(ii) está libre de sedimento tras la centrifugación durante 10 min. a una velocidad de 3000g, preferiblemente hasta 7400g, y/o

20 (iii) está libre de células según se determina en una cámara de recuento celular.

El fluido procesado tiene preferiblemente una fuerza iónica que corresponde a 0,5-1,4% de NaCl, más preferiblemente 0,7-1,2% de NaCl, y lo más preferible una concentración salina sustancialmente fisiológica. El fluido procesado puede estar libre de reactivos de disgregación y/o de lisis y/o de detergentes añadidos. Por otro lado, el fluido procesado también puede comprender disolventes orgánicos y/o fluido acuoso añadido, tal como plasma del grupo sanguíneo AB como se describe anteriormente. Lo más preferible, el fluido procesado es sangre completa procesada.

30 La presente invención también se refiere a un método para determinar un analito en una muestra de fluido biológico que se ha sometido a un tratamiento térmico como se describe anteriormente. El analito puede ser cualquier analito que se pueda detectar en fluidos biológicos, por ejemplo un compuesto biológico tal como un ácido nucleico, un polipéptido, péptido, lípido, azúcar, hormona, metabolito, etc. Por otro lado, el analito puede ser un compuesto no biológico, por ejemplo un compuesto farmacéutico. En una realización preferida, el analito es un fármaco inmunosupresor, tal como ciclosporina, rapamicina o tacrolimus, o compuestos relacionados.

35 La determinación del analito en el fluido biológico procesado se puede llevar a cabo según cualquier método conocido. Por ejemplo, la determinación del analito se puede llevar a cabo según métodos químicos, bioquímicos y/o físico-químicos, y puede comprender una reacción de hibridación, una reacción inmunológica, una reacción enzimática, por ejemplo una amplificación de ácidos nucleicos, un análisis cromatográfico, un análisis espectrométrico, tal como un análisis espectrométrico de masas o un análisis de RMN, y/o un análisis espectroscópico. En una realización especialmente preferida, la invención se refiere a un método para determinar un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre completa, en el que la sangre completa se procesa mediante un tratamiento térmico como se describe anteriormente, y el fármaco inmunosupresor se determina en la sangre completa procesada según métodos estándar, por ejemplo mediante métodos espectrométricos de masas.

En una realización adicional preferida, el analito es un parámetro clínico-químico, por ejemplo un parámetro clínico-químico asociado con un trastorno metabólico innato, por ejemplo fenilcetonuria. En esta realización, la muestra es preferiblemente una muestra de sangre capilar que se puede obtener de neonatos.

45 En aún una realización adicional preferida, el método es adecuado para procesar muestras de sangre procedentes de animales no humanos, preferiblemente ratones, cobayas y ratas. Por ejemplo, las muestras se pueden tomar mediante sistemas automatizados y se pueden procesar directamente como se describe anteriormente. Un sistema automatizado preferido es el Accu Sampler® de DiLab®.

50 Un dispositivo descrito en la presente invención puede comprender un puerto de introducción de fluido, en el que por ejemplo se puede inyectar en el dispositivo una muestra de un fluido biológico. El fluido es transportado en el dispositivo mediante un elemento de transporte de fluido, por ejemplo un elemento de bombeo. Además, el dispositivo puede comprender un conducto de procesamiento del fluido que es al menos parcialmente calentable. La parte calentable del conducto de procesamiento del fluido puede ser una parte integrante del dispositivo, o puede estar unida de forma retirable al dispositivo. El conducto de procesamiento del fluido tiene preferiblemente un diámetro interno de alrededor de 0,1-0,8 mm. A fin de lograr un tiempo de permanencia deseado en la porción calentable del conduc-

55

to, se puede ajustar un caudal predeterminado del fluido biológico. El elemento de calentamiento puede ser cualquier elemento de calentamiento adecuado, por ejemplo un elemento para calentamiento inductivo, un elemento para calentamiento convectivo, un elemento para calentamiento resistivo, y/o un elemento para calentamiento mediante excitación por láser. Por ejemplo, el elemento de calentamiento puede ser un alambre calefactor enrollado alrededor de una parte predeterminada del conducto de procesamiento de fluido o un emisor de microondas. El elemento de control proporciona control del procesamiento de la muestra, particularmente el calentamiento de la muestra, por ejemplo controlando la intensidad del calentamiento y/o el tiempo y/o el caudal del fluido en la parte calentable del conducto de procesamiento del fluido.

El dispositivo puede comprender opcionalmente un elemento de limpieza que es adecuado para limpiar el conducto de procesamiento del fluido, o al menos una parte del mismo. Por ejemplo, el elemento de limpieza se adapta para llevar a cabo una limpieza del conducto de procesamiento del fluido o una parte del mismo después de un número predeterminado de ciclos de procesamiento del fluido biológico. Preferiblemente, la limpieza comprende hacer pasar un fluido de limpieza a través del conducto de procesamiento del fluido o una parte del mismo. El fluido de limpieza es capaz de eliminar restos biológicos, por ejemplo proteínicos, en el conducto de procesamiento. Preferiblemente, el fluido de limpieza es una disolución alcalina de hipoclorito, por ejemplo una disolución alcalina de NaOCl. La limpieza puede implicar inundar el conducto de procesamiento del fluido o una parte del mismo con el fluido de limpieza, en el que el fluido de limpieza está preferiblemente a una temperatura elevada, por ejemplo a una temperatura de $T \geq 60^\circ\text{C}$. La eficacia de la limpieza se puede controlar monitorizando la presencia de materiales biológicos en el conducto de procesamiento del fluido, o una parte del mismo, tras un procedimiento de limpieza. La monitorización comprende preferiblemente una detección fotométrica de material biológico, por ejemplo material proteínico. La detección se puede llevar a cabo determinando materiales biológicos, que se han solubilizado/hidrolizado mediante fluido de limpieza, preferiblemente en un modo de detección en línea. Los materiales biológicos se pueden determinar mediante una reacción de color adecuada, por ejemplo la reacción de OPA en la que pueden reaccionar O-ftaldialdehído y cloruro de N,N-dimetil-2-mercaptoetilamonio con compuestos de amina primaria, por ejemplo proteínas o productos de hidrólisis, en condiciones alcalinas (por ejemplo 0,1 moles/l de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9,3) hasta un 1-alquilio-2-alquilisoindol, que se puede detectar fotométricamente a 340 nm.

Además, el dispositivo comprende opcionalmente un elemento de análisis de una muestra. El elemento de análisis de la muestra puede ser cualquier elemento que sea adecuado para la detección del analito en una muestra biológica. Preferiblemente, el elemento de análisis de la muestra comprende un elemento cromatográfico, por ejemplo un elemento de HPLC, un elemento de extracción, por ejemplo un elemento de Extracción en Fase Sólida (SPE), un elemento espectrométrico, por ejemplo un elemento espectrométrico de masas o de RMN, un elemento espectroscópico, un elemento enzimático y/o de inmunoensayo, y/o un elemento de ensayo de hibridación.

Finalmente, el dispositivo puede comprender una unidad procesadora que puede transferir datos a y/o recibir datos desde una unidad de control remoto. La transferencia de datos se puede producir en línea, por ejemplo mediante transferencia inalámbrica tal como vía transferencia de datos de GSM/GPRS/3G. La unidad de control remoto se puede adaptar para autorizar el procesamiento del fluido para un dispositivo respectivo, por ejemplo después de que se ha recibido el pago para llevar a cabo un número predeterminado de procedimientos de procesamiento del fluido (es decir, procedimiento por pago).

Adicionalmente, la presente invención se explica con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Tratamiento térmico de muestras de sangre (sistema estático)

Se llenó un capilar de vidrio (55 mm de longitud x 0,5 mm de diámetro interno) con alrededor de 10 μl de una muestra de sangre (eritrocitos: $5,18 \times 10^6/\mu\text{l}$; hemoglobina: 17,5 g/dl; hematocrito 50,1%), se cerró en un extremo con plastilina y se calentó en un baño de agua termostatzado a una temperatura dada durante un tiempo dado. Al final del proceso de calentamiento, el capilar de vidrio se sumergió inmediatamente en un baño de hielo (4°C). El cierre de plastilina se cortó, el capilar de vidrio se vació, y la muestra de sangre tratada se investigó adicionalmente en busca de gelificación y para determinar la plenitud de la disgregación de las células de la sangre. El parámetro t_{max} se define como el tiempo de calentamiento [segundos] en el cual se produce la gelificación de la muestra menos 1 segundo. El parámetro t_{min} se define como el tiempo de calentamiento mínimo en el cual no se detectan eritrocitos usando una cámara de recuento de Neubauer.

Ejemplo 2: Recuento de eritrocitos

A 10 μl de sangre completa o sangre tratada, se añadieron 990 μl de disolución de Hayemsch (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La mezcla se sometió a vórtex, y se introdujo una alícuota en una cámara de recuento de Neubauer. Los eritrocitos presentes en 5 cuadrados definidos se contaron usando un microscopio y un aumento de 100.

Cálculo:

$$\text{Eritrocitos}/\mu\text{l (muestra)} = \frac{\text{Número de eritrocitos contados} \times 100}{0,2 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}}$$

ES 2 392 494 T3

Los resultados se muestran en las siguientes Tablas 1-6.

Temperatura [°C]	t_{\max} [s]	t_{\min} [s]
90	3	3
85	5	4
80	9	5
75	23	9
70	48	21
65	242	33
60	802	349

Tabla 1: Tratamiento térmico de sangre completa (eritrocitos: $5,18 \times 10^6/\mu\text{l}$; hemoglobina: 17,5 g/dl; hematocrito 50,1%).

Temperatura [°C]	t_{\max} [s]	t_{\min} [s]
80	6	6
75	13	7
70	42	11
65	169	18
60	646	21

5 Tabla 2: Tratamiento térmico de sangre completa que contiene 5% en volumen de metanol

Temperatura [°C]	t_{\max} [s]	t_{\min} [s]
80	6	5
75	10	9
70	21	10
65	49	11
60	184	32

Tabla 3: Tratamiento térmico de sangre completa que contiene 5% en volumen de acetonitrilo

Temperatura [°C]	t_{\max} [s]	t_{\min} [s]
80	15	8
75	31	9
70	65	41
65	412	66

Tabla 4: Tratamiento térmico de una mezcla 1:1 de sangre completa y plasma AB

Temperatura [°C]	t _{max} [s]	t _{min} [s]
80	5	3
75	13	3
70	38	3
65	126	8
60	693	28

Tabla 5: Tratamiento térmico de una mezcla 1:1 de sangre completa y plasma AB que contiene 5% en volumen de metanol

5

Temperatura [°C]	t _{max} [s]			t _{min} [s]		
	% en vol. de acetonitrilo			% en vol. de acetonitrilo		
	2,5	5	10	2,5	5	10
80	11	5	3	5	4	1
75	23	11	4	3	2	1
70	41	24	5	4	5	1
65	171	53	17	10	12	1
60	753	281	35	11	33	2

Tabla 6: Tratamiento térmico de una mezcla 1:1 de sangre completa y plasma AB que contiene 2,5, 5 ó 10% en volumen de acetonitrilo

Ejemplo 3: Tratamiento térmico de una muestra de sangre (sistema en circulación)

10

Para el tratamiento de una muestra de sangre (por ejemplo, 10 µl) usando un capilar de acero inoxidable calentado, con la dimensión de 0,5 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud, el tiempo de calentamiento a una temperatura dada se puede preajustar vía el caudal de un fluido de ensayo dado, tal como una disolución de NaCl al 0,9% en volumen.

15

Para una temperatura de 75°C, el tiempo de retención capilar mínimo t_{min} de 9 segundos (véase el Ejemplo 1, Tabla 1) se alcanzó con un caudal de 466 µl/min., y el tiempo de retención capilar máximo t_{max} de 23 segundos (véase el Ejemplo 1, Tabla 1) se alcanzó con un caudal de 183 µl/min. De este modo, un caudal preferido para tal tamaño de muestra y configuración de capilar estaría dentro de estos márgenes, por ejemplo ascendiendo hasta aproximadamente 325 µl/min. Este caudal también es óptimo para la ionización mediante electropulverización en espectrometría de masas.

Cálculo:

20

$$\text{Caudal } [\mu\text{l}/\text{min}] = \frac{\text{Volumen del capilar } [\mu\text{l}] + \text{Volumen de la muestra } [\mu\text{l}]}{t_{\min} \text{ (o } t_{\max}) [s]} \times 60$$

También se describen los siguientes apartados:

1. Un método para procesar un fluido biológico que comprende componentes celulares,

en el que el fluido se somete a un tratamiento térmico en condiciones

(i) para proporcionar una disgregación sustancialmente cuantitativa de dichos componentes celulares, y

25

(ii) para no provocar sedimentación, precipitación, desnaturalización, aglutinamiento y gelificación sustanciales de los componentes del fluido.

2. El método del apartado 1, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura de 60-90°C, preferiblemente de 60-75°C.
3. El método del apartado 1 ó 2, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo durante un tiempo de 5 segundos a 1 minuto.
- 5 4. El método de uno cualquiera de los apartados 1-3, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo mientras que el fluido está estático.
5. El método de uno cualquiera de los apartados 1-3, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo mientras que el fluido está en circulación.
- 10 6. El método de uno cualquiera de los apartados 1-5, en el que el tratamiento térmico comprende calentamiento inductivo, calentamiento convectivo, calentamiento resistivo y/o calentamiento mediante excitación con láser.
7. El método de uno cualquiera de los apartados 1-6, en el que el fluido biológico es un fluido corporal o un fluido de cultivo celular, preferiblemente sangre completa.
8. El método de uno cualquiera de los apartados 1-7, que no incluye
- (i) una etapa de sedimentación y/o de precipitación una etapa de centrifugación, ni/o
- 15 (ii) una adición de reactivos de disgregación química y/o de lisis.
9. El método de uno cualquiera de los apartados 1-8, que se lleva a cabo como un procedimiento automatizado, preferiblemente en un dispositivo integrado.
10. El método de uno cualquiera de los apartados 1-9, en el que se añade, antes y/o después del procesamiento, un fluido adicional.
- 20 11. El método del apartado 10, en el que el fluido adicional es un disolvente orgánico en una cantidad de hasta 20% (vol/vol) basada en el volumen del fluido biológico, tal como metanol, etanol, acetonitrilo y/o dimetilsulfóxido.
12. El método del apartado 10 u 11, en el que el fluido adicional es un fluido acuoso sin componentes celulares, que comprende opcionalmente un disolvente orgánico en una cantidad de hasta 20% (vol/vol) basada en el volumen del fluido acuoso.
- 25 13. El método del apartado 12, en el que el fluido adicional es plasma, particularmente plasma del grupo sanguíneo AB.
14. El método de uno cualquiera de los apartados 10-13, en el que el fluido adicional es un fluido de estandarización y/o calibrador, que comprende una cantidad predeterminada de al menos un compuesto de estandarización y/o calibrador.
- 30 15. Un fluido biológico procesado obtenible mediante el método de uno cualquiera de los apartados 1-14.
16. Un fluido biológico procesado que comprende componentes celulares sustancial y cuantitativamente disgregados, que está sustancialmente libre de productos de sedimentación, precipitación, desnaturalización, aglutinamiento y gelificación.
17. El fluido procesado del apartado 15 ó 16, que está sustancialmente
- 35 (i) libre de cualesquiera componentes particulares al observarlo al microscopio (por ejemplo, aumento de 100 x); y
- (ii) libre de sedimento tras la centrifugación durante 10 min. a una velocidad de hasta 3000g, preferiblemente hasta 7400g, y/o
- (iii) está libre de células según se determina en una cámara de recuento celular.
- 40 18. El fluido procesado de uno cualquiera de los apartados 15-17, que tiene una concentración salina sustancialmente fisiológica.
19. El fluido procesado de uno cualquiera de los apartados 15-18, que está libre de reactivos añadidos, particularmente reactivos de disgregación química y/o de lisis y/o de detergentes.
20. El fluido procesado de uno cualquiera de los apartados 15-19, que es sangre disgregada de células.
- 45 21. Un método para determinar un analito en una muestra de fluido biológico, en el que el fluido biológico se procesa según el método de una cualquiera de los apartados 1-14, y el analito se determina en el fluido biológico procesado.

22. El método del apartado 21, en el que el analito se selecciona de compuestos biológicos tales como ácidos nucleicos, polipéptidos, péptidos, lípidos, azúcares, hormonas, metabolitos, etc., y compuestos farmacéuticos.
23. El método del apartado 21 ó 22, en el que el analito es un fármaco inmunosupresor, tal como ciclosporina, rapamicina o tacrolimus.
- 5 24. El método de uno cualquiera de los apartados 21-23, en el que la determinación comprende una reacción de hibridación, una reacción inmunológica, una reacción enzimática, un análisis cromatográfico, un análisis espectrométrico y/o un análisis espectroscópico.
- 10 25. Un método para determinar un fármaco inmunosupresor en una muestra de sangre completa, en el que la sangre completa se procesa según el método de uno cualquiera de los apartados 1-14, y el fármaco inmunosupresor se determina en la sangre completa procesada.
26. Un método para determinar un parámetro clínico-químico en una muestra de sangre completa procedente de neonatos, en el que la sangre completa se procesa según el método de uno cualquiera de los apartados 1-14, y el parámetro clínico-químico se determina en la sangre completa procesada.
- 15 27. El método de uno cualquiera de los apartados 21-26, en el que la muestra se procesa y se determina en un dispositivo integrado.
28. Una composición que comprende un plasma de grupo sanguíneo AB, un disolvente orgánico en una cantidad de hasta 20% (vol/vol) basada en el volumen del plasma, tal como metanol y/o acetonitrilo, y una cantidad predeterminada de al menos un compuesto de estandarización y/o calibrador.
29. Un dispositivo para procesar un fluido biológico, que comprende componentes celulares que comprenden:
- 20 (a) un puerto de introducción de fluido,
 (b) un conducto de procesamiento del fluido, que es al menos parcialmente calentable,
 (c) un elemento de calentamiento para calentar una parte predeterminada del conducto de procesamiento del fluido,
 (d) un elemento de transporte de fluido, por ejemplo un elemento de bombeo,
- 25 (e) un elemento de control para controlar el calentamiento del fluido en condiciones
 (i) para proporcionar una disgregación sustancialmente cuantitativa de dichos componentes celulares, y
 (ii) para no provocar sedimentación, precipitación, desnaturalización, aglutinamiento y gelificación sustanciales de los componentes del fluido,
- 30 (f) opcionalmente un elemento de limpieza, y
 (g) opcionalmente un elemento de análisis de la muestra.
30. El dispositivo del apartado 29, en el que el conducto de procesamiento del fluido comprende un conducto calentable, preferiblemente con un diámetro interno de alrededor de 0,1-0,8 mm.
- 35 31. El dispositivo del apartado 29 ó 30, en el que el elemento de calentamiento es un elemento para el calentamiento inductivo, un elemento para el calentamiento convectivo, un elemento para el calentamiento resistivo, y/o un elemento para el calentamiento mediante excitación por láser.
32. El dispositivo de uno cualquiera de los apartados 29-31, en el que la parte calentable del conducto de procesamiento del fluido es una parte integrante del dispositivo.
- 40 33. El dispositivo de uno cualquiera de los apartados 29-31, en el que la parte calentable del conducto de procesamiento del fluido está unida de forma retirable al dispositivo.
34. El dispositivo de uno cualquiera de los apartados 29-33, en el que el elemento de control está adaptado para controlar la intensidad del calentamiento y/o el tiempo de calentamiento y/o el caudal de fluido en la parte calentable del conducto de procesamiento del fluido.
- 45 35. El dispositivo de uno cualquiera de los apartados 29-34, en el que el elemento de limpieza está adaptado para limpiar el conducto de procesamiento del fluido o una parte del mismo después de un número predeterminado de ciclos de procesamiento del fluido biológico con un fluido de limpieza.
36. El dispositivo del apartado 35, en el que el fluido de limpieza es una disolución alcalina de hipoclorito.

37. El dispositivo del apartado 35 ó 36, en el que el procedimiento de limpieza se lleva a cabo con un fluido de limpieza calentado.
- 5 38. El dispositivo de uno cualquiera de los apartados 29-37, en el que el elemento de limpieza está adaptado para monitorizar la presencia de materiales biológicos en el conducto de procesamiento del fluido o una parte del mismo después de un procedimiento de limpieza.
39. El dispositivo del apartado 38, en el que la monitorización comprende una detección fotométrica de material biológico.
- 10 40. El dispositivo de uno cualquiera de los apartados 29-39, en el que el elemento de análisis de la muestra comprende un elemento cromatográfico, por ejemplo un elemento de HPLC, un elemento de extracción, por ejemplo un elemento de Extracción en Fase Sólida (SPE), un elemento espectrométrico, por ejemplo un elemento espectrométrico de masas o de RMN, un elemento espectroscópico, un elemento enzimático y/o de inmunoensayo, y/o un elemento de ensayo de hibridación.
41. El dispositivo de uno cualquiera de los apartados 29-40, en el que el dispositivo comprende una unidad procesadora que puede transferir datos hacia y/o recibir datos desde una unidad de control remoto.
- 15 42. El dispositivo del apartado 41, en el que la unidad de control remoto está adaptada para autorizar el procesamiento del fluido en el dispositivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para procesar un fluido biológico que comprende eritrocitos, en el que el fluido se somete a un tratamiento térmico que se lleva a cabo a una temperatura de 60-90°C y durante un tiempo de 5 segundos a 1 minuto en condiciones
- 5 (i) para proporcionar una disgregación sustancialmente cuantitativa de dichos eritrocitos, y
(ii) para no provocar sedimentación, precipitación, desnaturalización, aglutinamiento y gelificación sustanciales de los componentes del fluido.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura de 60-75°C.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo durante un tiempo de 5 segundos a 40 segundos.
- 10 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el fluido biológico es un fluido corporal.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que no incluye
(i) una etapa de sedimentación ni/o una etapa de precipitación, ni/o una etapa de centrifugación, ni/o
(ii) una adición de reactivos de disgregación química y/o de lisis.
- 15 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que antes y/o después del procesamiento se añade un fluido adicional, en el que el fluido adicional es un disolvente orgánico en una cantidad de hasta 20% (vol/vol) basada en el volumen del fluido biológico, tal como metanol, etanol, acetonitrilo y/o dimetilsulfóxido.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que se lleva a cabo como un procedimiento automatizado, preferiblemente en un dispositivo integrado.
- 20 8. Un fluido biológico procesado que comprende eritrocitos obtenibles mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende eritrocitos sustancial y cuantitativamente disgregados que está libre de productos de sedimentación, precipitación, desnaturalización, aglutinamiento y gelificación, y que
(i) está libre de componentes particulares al observarlo al microscopio (por ejemplo, un aumento de 100 x);
(ii) está libre de sedimento tras la centrifugación durante 10 min. a una velocidad de 3000g, preferiblemente hasta
25 7400g, y/o
(iii) está libre de células según se determina en una cámara de recuento celular,
en el que dicho método no incluye una etapa de sedimentación ni/o una etapa de precipitación ni/o una etapa de centrifugación.
9. El fluido procesado de la reivindicación 8, que tiene una concentración salina sustancialmente fisiológica.
- 30 10. El fluido procesado de una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, que está libre de reactivos añadidos, particularmente reactivos de disgregación y/o de detergentes.
11. Un método para determinar un analito en una muestra de fluido biológico que comprende eritrocitos, en el que el fluido biológico se procesa según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y el analito se determina en el fluido biológico procesado.
- 35 12. El método la reivindicación 11, en el que el analito se selecciona de compuestos biológicos tales como ácidos nucleicos, polipéptidos, péptidos, lípidos, azúcares, hormonas, metabolitos, compuestos farmacéuticos, preferiblemente fármacos inmunosupresores, tales como ciclosporina, rapamicina o tacrolimus.
13. El método de la reivindicación 11 ó 12, en el que la determinación comprende una reacción de hibridación, una reacción inmunológica, una reacción enzimática, un análisis cromatográfico, un análisis espectrométrico y/o un análisis espectroscópico.
- 40 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que la muestra se procesa y se determina en un dispositivo integrado.