

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 335**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2010 E 10290082 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **29.09.2010 EP 2233923**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la caracterización de la dinámica de coagulación o sedimentación de un fluido tal como la sangre o el plasma sanguíneo**

30 Prioridad:

26.03.2009 FR 0901435

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.02.2013

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
BÂTIMENT "LE PONANT D" 25, RUE LEBLANC
75015 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**POUTEAU, PATRICK;
FAIVRE, MAGALI;
PELTIE, PHILIPPE y
PLANAT CHRETIEN, ANNE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 395 335 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para la caracterización de la dinámica de coagulación o sedimentación de un fluido tal como la sangre o el plasma sanguíneo

- 5 La invención se refiere a un procedimiento de caracterización de la dinámica de coagulación o de sedimentación de un fluido tal como la sangre completa, una fracción de sangre o el plasma sanguíneo, así como a un dispositivo para aplicar dicho procedimiento.
- 10 La medición del tiempo de coagulación de la sangre presenta un gran interés médico. En efecto, los problemas de la coagulación pueden conllevar trastornos fisiológicos importantes tales como hemorragias abundantes durante las intervenciones médicas o heridas hemorrágicas (tiempo demasiado largo) o tales como trombosis o embolias (tiempos demasiado cortos). Numerosas enfermedades, patologías, tratamientos médicos, seguimientos terapéuticos, necesitan un control más o menos regular de este tiempo de coagulación. A menudo esto se traduce
- 15 por una extracción venosa que necesita la intervención de un especialista. Esta extracción después se analiza en un laboratorio especializado donde se pueden realizar varios ensayos diferentes para medir el tiempo de coagulación, en función de la patología o del tratamiento terapéutico del paciente que es objeto de análisis. Se pueden citar en particular: el tiempo de Quick (Factor TQ), el tiempo de la cefalina activada (factor TCA), el tiempo de coagulación con caolín (TCC). Con frecuencia no son directamente los valores absolutos de estos tiempos de coagulación los
- 20 que interesan a los técnicos clínicos, sino sus relaciones con testigos de tiempo de estos mismos ensayos realizados en una muestra testigo formada a partir de una mezcla de una cincuentena de pacientes considerados normales. Además, el tiempo de coagulación medido depende del procedimiento físico de caracterización del fenómeno de coagulación, de la forma de mezclar la muestra con el factor de coagulación estudiado (tiempo de mezcla), así como de los reactivos usados para producir la reacción. Por lo tanto, es habitual aplicar una corrección con el fin de
- 25 obtener un resultado independiente de estos factores. A modo de ejemplo, se pueden citar el INR ("International Normalized Ratio", es decir índice internacional normalizado) calculado a partir del tiempo de Quick dividido entre el tiempo del testigo y elevado a la potencia ISI (índice de sensibilidad internacional) que da el fabricante del lote de reactivos usado para llevar a cabo el ensayo.
- 30 Clásicamente, la medida del tiempo de coagulación sanguínea consta de las siguientes etapas.
- En un primer momento se extrae sangre del paciente en un tubo que contiene un anticoagulante adaptado que permite un retraso razonable entre el sitio de la extracción y el sitio del análisis (como mínimo algunos minutos) sin que la muestra coagule.
- 35 Después, se extrae el plasma de la muestra de sangre por centrifugación y se mezcla en las proporciones adecuadas con diferentes reactivos necesarios para inhibir el anticoagulante usado durante la extracción de sangre (por ejemplo, iones de calcio) y con los reactivos necesarios para producir la coagulación (por ejemplo, tromboplastina) según el factor estudiado.
- 40 Finalmente, la medición del tiempo de coagulación propiamente dicho se realiza con ayuda de diferentes equipamientos.
- El documento US 4.252.536 describe un dispositivo y un procedimiento óptico de medición del tiempo de coagulación. Este dispositivo y este procedimiento se basan en la evolución de la intensidad de una señal óptica detectada, debida a la modificación de la difusión en una muestra de plasma durante la formación de un coágulo de
- 45 sangre.
- El documento US 3.635.678 describe otro método usado actualmente, que consiste en introducir en la muestra de plasma una bola magnética, que se pone en movimiento oscilatorio con ayuda de un imán o electroimán exterior. La observación del desplazamiento de la bola se realiza por vía óptica. La medición del tiempo que tarda la bola en paralizarse en el plasma, inmovilizada por el coágulo que se forma, corresponde al tiempo de coagulación.
- 50 Estos métodos no son convenientes para usar con sangre completa, que es demasiado opaca.
- 55 El documento US 6.352.630 describe un procedimiento electroquímico de medición del tiempo de coagulación. La aplicación de este procedimiento necesita un consumible que consta de electrodos en contacto con la muestra biológica, un equipo que permite la reanudación de los contactos eléctricos en el consumible, y la adición a dicha muestra de agentes electroquímicos que permitan la medición.

El artículo de Yann Piederrière y col. "Evaluation of blood plasma coagulation dynamics by speckle analysis" describe dos procedimientos de estudio de la dinámica de coagulación de la sangre mediante análisis del granulado (o manchas) láser.

5 Estos procedimientos se basan en la observación del hecho de que las partículas (plaquetas, proteínas) en suspensión en el plasma difractan y difunden la luz; si se ilumina una muestra de plasma mediante un haz láser, espacial y temporalmente coherente, se produce un patrón de moteado (o de manchas, "speckle" en inglés). Debido al movimiento browniano de las partículas, este patrón varía con el tiempo, mientras el plasma permanece líquido, y
10 después se paraliza una vez que se ha formado el coágulo.

En el primer procedimiento descrito en el artículo citado antes, se registra la intensidad luminosa que corresponde a un punto del patrón de moteado en función del tiempo. La aplicación de este procedimiento es bastante delicada: en efecto, la transparencia del plasma disminuye en el transcurso del proceso de coagulación; por lo tanto es necesario
15 aumentar la intensidad luminosa de la iluminación a lo largo del tiempo, o iluminar la muestra suficientemente fuerte durante todo el tiempo que dura la adquisición, con el riesgo de saturar el detector. Además, como solo se considera la intensidad luminosa en un punto, la señal óptica es débil, lo que implica una relación señal-ruido que no es satisfactoria, salvo que se utilice una intensidad luminosa de la iluminación relativamente importante.

20 El segundo procedimiento descrito implica la adquisición de una serie temporal de imágenes del patrón de moteado, y la determinación del contraste de cada imagen. Antes de la formación del coágulo, el movimiento browniano de las partículas en suspensión "nubla" las imágenes, y reduce su contraste; esto último aumenta cuando el patrón de moteado se paraliza debido a la coagulación del plasma. Los propios autores declaran que este procedimiento no permite una determinación precisa del tiempo de coagulación.

25 Todos los procedimientos descritos anteriormente utilizan plasma y no funcionan con sangre completa. Por lo tanto, necesitan una etapa previa de fraccionamiento de la sangre que solo puede realizarse en un laboratorio especializado.

30 La invención tiene como objetivo superar al menos algunos de los inconvenientes de la técnica anterior. En particular, el dispositivo y el procedimiento de la invención permiten estudiar la dinámica de la coagulación tanto en sangre completa como en el plasma. Además, son sencillos y económicos de aplicar en el sitio de tratamiento, y proporcionan resultados precisos.

35 Además, la invención permite también estudiar la dinámica de sedimentación de la sangre, que también tiene interés médico.

Un objeto de la invención es un procedimiento de caracterización de la dinámica de coagulación o de sedimentación de un fluido tal como la sangre completa, una fracción de sangre o el plasma sanguíneo, que comprende:

40 - la iluminación de una muestra de dicho fluido (ES) con un haz de luz coherente;
- la adquisición de una serie temporal de imágenes de un patrón de moteado generado por la interacción entre dicha muestra y dicho haz de luz espacialmente coherente; y
- el tratamiento de dicha serie temporal de imágenes;

45 **caracterizado porque** dicha etapa de tratamiento comprende:

- el cálculo de una función (r) representativa de la variación espacial de dicho patrón de moteado entre dos o varias imágenes de la serie; y
50 - el análisis de la evolución temporal de dicha función.

El procedimiento de la invención se diferencia del conocido del artículo de Yann Piederrière y col. citado antes, esencialmente por el tratamiento de las imágenes que aplica. En el procedimiento de la técnica anterior, cada imagen de moteado se considera independientemente de las otras, y se trata de forma que proporcione un valor
55 numérico global (el contraste) que indica la fluidez de la muestra; la variación temporal de estos valores numéricos proporciona la información requerida de la dinámica de coagulación. Al contrario, en el caso de la invención, dos imágenes sucesivas adquiridas en instantes diferentes, se analizan conjuntamente, pixel por pixel; solo después de este análisis conjunto se calcula una función, o un valor numérico, "global", que indica el cambio del patrón de moteado entre dos puntos de tiempo de adquisición de imágenes. Un análisis de la evolución temporal de esta

función proporciona una información sobre la dinámica de coagulación o de sedimentación del fluido.

Las pruebas realizadas por los autores de la invención muestran que el procedimiento de tratamiento de datos aplicado por la invención proporciona resultados más precisos que los de la técnica anterior. Además, al contrario que en esta última, sirve igualmente para el estudio de la coagulación de la sangre completa, y no solo del plasma (aunque las razones de esto no se entiendan bien).

Otro objeto de la invención es un dispositivo para aplicar un procedimiento de caracterización de la dinámica de coagulación o de sedimentación de un fluido, tal como el descrito antes, que comprende:

- 10 - un dispositivo microfluídico que presenta un conducto de fluido susceptible de recibir una muestra de dicho fluido y que permite su iluminación;
- un medio de iluminación de dicha muestra por un haz de luz coherente;
- un sensor de imágenes dispuesto para la adquisición de una serie temporal de imágenes de un patrón óptico de moteado generado por la interacción entre dicha muestra y dicho haz de luz coherente; y
- 15 - un medio de tratamiento de dicha serie temporal de imágenes;

caracterizado porque dicho medio de tratamiento está adaptado para calcular una función representativa de la variación de dicho patrón de moteado entre dos o varias imágenes de la serie y para analizar la evolución temporal de dicha función.

Diferentes modos de realización del procedimiento y del dispositivo de la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes.

25 Otras características, detalles y ventajas de la invención saldrán mediante la lectura de la descripción hecha con referencia a las figuras adjuntas, dadas a modo de ejemplo y que representan, respectivamente:

- Figura 1, una imagen de moteado de una muestra de sangre completa;
- Figuras 2A y 2B, una cámara microfluídica usada como portaobjetos;
- 30 - Figuras 3A y 3B, esquemas que corresponden a dos modos de realización de un dispositivo de acuerdo con la invención;
- Figuras 4A y 4B, respectivamente, una curva de correlación obtenida por un procedimiento de acuerdo con la invención y que trabaja con sangre completa, y su derivada;
- Figuras 5A y 5B, respectivamente, una curva de correlación obtenida por un procedimiento de acuerdo con la invención y que trabaja con plasma, y su derivada;
- 35 - Figuras 6A y 6B, gráficas que permiten comparar los resultados obtenidos aplicando la técnica de la invención, con los proporcionados por un procedimiento convencional de medición del tiempo de Quick (6A) y del INR (6B);
- Figura 7, una gráfica que muestra la pequeña influencia del hematocrito en los resultados obtenidos aplicando la técnica de la invención;
- 40 - Figura 8, una gráfica que muestra la variación de la correlación obtenida por un procedimiento de acuerdo con un modo de realización de la invención a través de una muestra de sangre y provocada por la sedimentación de las células; y
- Figuras 9A, 9B, 9C y 10A, 10B, 10C, gráficas que permiten comparar el procedimiento de la invención y el descrito por el artículo citado antes de Yann Piederrière y col.

45 Como es bien sabido en óptica, un objeto difusor o una superficie rugosa sometida a un rayo láser (o más habitualmente a un rayo espacial y temporalmente coherente) forma una imagen de granulada debido a los efectos de la difracción generada por la rugosidad o los centros de difusión, y de las interferencias entre los patrones de difracción individuales. Este efecto se conoce con el nombre de moteado o manchas, o "speckle" en inglés.

50 La figura 1 representa la imagen de moteado de una muestra de sangre total, en la que las células (leucocitos y eritrocitos) y las otras partículas en suspensión en el plasma (plaquetas, proteínas grandes) actúan como centros de difusión de la luz.

55 Las partículas en suspensión en una muestra de sangre tienen un movimiento incesante; por lo tanto, la imagen de moteado evoluciona con el transcurso del tiempo, hasta que se paraliza cuando la sangre está totalmente coagulada y forma un coágulo sólido. Es este efecto el que, de acuerdo con la invención, permite medir el tiempo de coagulación.

Como muestran las figuras 2A a 3B, un dispositivo para aplicar el procedimiento de la invención comprende una cámara microfluídica (CMF), al menos parcialmente transparente, una fuente de iluminación de luz espacial y temporalmente coherente, tal como un láser semiconductor o de helio-neón (L) y una cámara (C). La referencia (M) indica un espejo usado para dirigir el haz láser hacia la cámara fluídica.

5

De acuerdo con el modo de realización de ejemplo de la invención, la cámara microfluídica utilizada está compuesta de 2 láminas de vidrio separadas por espaciadores y mantenidas a una distancia mutua de 160 μm . Se pone previamente en el banco de medición.

10 Se añade una cantidad de 10 μl de sangre total a 20 μl de Néoplastine® (mezcla de tromboplastina y cloruro de calcio, fabricado por STAGO diagnostics).

La disolución se homogeneiza por aspiraciones y descargas sucesivas de esta mezcla en una micropipeta y se disponen 20 μl a la entrada de la cámara microfluídica que se llena por simple migración capilar, como se representa

15 en las figuras 2A y 2B, en las que la referencia (ES) indica la muestra constituida por la sangre y los reactivos.

La medición se produce en el momento en el que los reactivos se ponen en contacto. Por lo tanto, existe un retraso, típicamente de una decena o algunas decenas de segundos, entre el inicio de la medición y el momento en el que se podrán visualizar en realidad imágenes que corresponden al llenado de la cámara y después a la coagulación. El

20

Las dimensiones del dispositivo microfluídico (CMF) y los volúmenes de sangre y de reactivos dados antes solo son indicativos, y no constituyen en absoluto limitaciones de la invención. Más en general, en el caso de sangre completa, el conducto microfluídico definido por la cámara (CMF) podrá tener un espesor que va desde algunas

25

decenas de micrómetros a 1 mm aproximadamente. Si el espesor es demasiado fino, no habrá suficientes partículas en el trayecto del haz luminoso, y el contraste de la imagen de moteado será insuficiente; si el espesor es demasiado importante, la absorción de luz por la sangre dará una imagen demasiado oscura para poder ser usada.

La figura 3A ilustra de forma esquemática un primer modo de realización de la invención, en el que la cámara

30

microfluídica (CMF) es totalmente transparente, constituida, por ejemplo, por dos láminas de vidrio, y la medición se realiza por transmisión. Para hacer esto, el haz luminoso de iluminación de luz coherente incide sobre la cámara (CMF) por un primer lado de esta última, y la cámara (C) está dispuesta en el lado opuesto. Hay que indicar que la cámara (C) está desplazada con respecto a la trayectoria del haz luminoso en ausencia de difusión/difracción, con el

35

fin de evitar el deslumbramiento.

Como se ha mencionado anteriormente, la fuente de luz (L) puede ser típicamente un láser de helio-neón o semiconductor. La longitud de onda del rayo es ventajosamente aproximadamente 650-690 nm, con el fin de permitir una buena penetración en la sangre. La potencia de la iluminación está comprendida entre 100 μW y varios mW, o decenas de mW pueden ser suficientes.

40

El espesor de la cámara microfluídica (CMF) puede estar comprendido en general entre 20 y 1000 μm , y preferiblemente entre 30 μm y 300 μm .

La superficie del haz luminoso que incide en la cámara microfluídica puede estar comprendida preferiblemente entre

45

aproximadamente 10 μm^2 y varios mm^2 , ajustándose las dimensiones de la cámara microfluídica en concordancia con esto.

La cámara (C) está constituida esencialmente por un sensor de imágenes, de tipo matriz de CCD o sensor de imágenes con tecnología CMOS, dispuesto a una distancia de varios centímetros o decenas de centímetros de la

50

cámara microfluídica (dicha distancia de propagación es necesaria para la formación de una imagen de moteado), sin sistema de focalización. El muestreo puede ser modesto: se ha usado un sensor de 30x30 píxeles con resultados satisfactorios. En concreto, puede tratarse de una cámara de tipo "webcam" sin su lente, incluso sin el sistema óptico de un ratón láser de ordenador.

La cadencia de adquisición de las imágenes no tiene que ser particularmente alta: una cadencia de 0,5 Hz ha mostrado ser suficiente para estudiar la dinámica de coagulación de la sangre. Una cadencia demasiado alta es inútil: el intervalo temporal que separa dos imágenes sucesivas debe ser al menos igual al tiempo característico de variación de la imagen de moteado.

55

El tiempo de adquisición de cada imagen puede ser ventajosamente de 50 ms, incluso menos si la intensidad luminosa es suficiente. Un tiempo de adquisición demasiado largo conduce a una disminución del contraste de las manchas, puesto que entonces el movimiento de las partículas en suspensión puede ser suficientemente rápido para hacer la imagen borrosa.

5

La figura 3B ilustra esquemáticamente un segundo modo de realización de la invención, en el que la cámara microfluídica (CMF) está constituida por una lámina superior transparente y un sustrato reflectante (SR), por ejemplo de silicio. En este caso, el haz láser atraviesa la lámina transparente y la muestra, y después es parcialmente reflejada por el sustrato (SR), atraviesa de nuevo la muestra y después la señal es detectada por la cámara (C) situada del mismo lado de la muestra que el láser (L). Esta configuración puede ser interesante si, por ejemplo, es necesario agitar o calentar la muestra mediante un módulo puesto debajo de la cámara microfluídica. También puede permitir la integración de un dispositivo de acuerdo con la invención en un chip microfluídico hecho de silicio, plástico, vidrio. Dicho chip microfluídico puede constar de medios de alimentación, una zona de mezcla con los reactivos, líquidos o secos, previamente dispuestos en la cámara microfluídica, una zona que permite la

10

15

20

homogeneización de la mezcla mediante perturbaciones opcionalmente externas (agitador acústico), seguida de una zona de análisis. Los reactivos usados pueden estar secos, por ejemplo, liofilizados. Igualmente, la zona de análisis puede estar situada al nivel de la zona de mezcla con los reactivos secos. El medio de alimentación puede ser directamente una aguja de extracción, realizándose entonces la aspiración de la sangre por capilaridad o por aspiración. Puede haber medios de calentamiento y de control de la temperatura en contacto o cerca de la cámara microfluídica.

En este segundo modo de realización de la invención, el grosor del conducto microfluídico podrá ser la mitad que el del primer modo de realización, para dar un camino óptico en la muestra que tenga la misma longitud.

25

Cualquiera que sea el modo de realización elegido, las imágenes adquiridas por la cámara (C) son digitalizadas y transmitidas, en diferido o en tiempo real, a un medio de tratamiento de datos (MT), que típicamente puede ser un ordenador portátil o de sobremesa equipado con un software adecuado, o un componente de tipo DSP (procesador digital de señales) que permite tratar directamente las imágenes, pudiendo estar igualmente los medios de tratamiento directamente integrados en el chip de silicio de toma de imágenes.

30

Como se ha discutido antes, la etapa esencial del tratamiento de imágenes de acuerdo con la invención, está representada por el cálculo de una función representativa de la variación espacial de dicho patrón de moteado entre dos o varias imágenes adquiridas en instantes diferentes.

35

Se pueden considerar varias funciones de este tipo.

Una primera posibilidad consiste en calcular, pixel por pixel, la diferencia de intensidad entre dos imágenes sucesivas, y sumar los valores absolutos de estas diferencias entre dos imágenes para dar un valor de la variación entre dos imágenes sucesivas:

40

$$f_1 = \sum_{i=1}^N |x_i - y_i|$$

en el que:

45

- N es el número total de píxeles;

- x_i (con $i = 1-N$) son los valores de la intensidad de los píxeles de una imagen;

- y_i son los valores de intensidad de los píxeles de la imagen precedente o siguiente x.

De acuerdo con una variante, se puede calcular:

50

$$f_1 = \sum_{i=1}^N |x_i - y_i|^2$$

Una segunda posibilidad consiste en realizar un cálculo del factor de correlación r entre dos imágenes sucesivas

para dar un valor de la variación entre esas dos imágenes:

$$f_2 = r = \frac{\sum_{i=1}^N \sqrt{(x_i - \bar{x})^2} \times \sqrt{(y_i - \bar{y})^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$$

5 en el que:

- N es el número total de píxeles;
- x_i (con $i = 1-N$) son los valores de la intensidad de los píxeles de una imagen;
- \bar{x} es el valor medio de intensidad para la imagen x;

10

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i ;$$

- y_i son los valores de intensidad de los píxeles de la imagen precedente o siguiente x; y
- \bar{y} es el valor medio de intensidad para la imagen y;

15

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i .$$

El denominador usado en el cálculo de la función f_2 es opcional. Sin embargo es útil en cuanto que permite neutralizar el efecto de variaciones de luminosidad de las imágenes.

20

De forma más general, se puede usar cualquier función que permita medir el grado de similitud entre dos imágenes.

La figura 4A muestra la gráfica de una curva que representa el valor del coeficiente de correlación r en función del tiempo t (en segundos), obtenido en las condiciones experimentales descritas antes. La cadencia de adquisición es de 1 Hz y el tiempo de adquisición de 50 ms.

25

En la curva se pueden distinguir 4 fases.

Inicialmente (fase P₁) la cámara microfluídica (CMF) está vacía. No hay variación del moteado y el factor de correlación r es cercano a 1 (valdría exactamente 1 si no hubiera ruido, tanto electrónico como óptico).

30

Después, la sangre se introduce en la cámara microfluídica, y el factor de correlación disminuye bruscamente.

Durante la segunda fase P₂, previa a la coagulación propiamente dicha, el factor de correlación sigue siendo muy bajo. Efectivamente, entre una imagen y la siguiente, el patrón de moteado cambia significativamente debido al movimiento de las partículas en suspensión en el plasma sanguíneo. Es interesante recordar que durante esta fase se produce una cascada de reacciones que preparan la coagulación.

35

La coagulación propiamente dicha, en el transcurso de la cual las células de sangre se ralentizan e incluso detienen su desplazamiento, se produce durante la tercera fase, P₃, en la que aumenta el factor de correlación rápidamente. Cuando el factor de coagulación usado es la tromboplastina, se habla del tiempo de Quick.

40

El tiempo de coagulación TC se define, de forma convencional, como el instante para el que la curva r(t) presenta un punto de inflexión PI (el tiempo de Quick TQ corresponde al tiempo de coagulación TC cuando el factor de coagulación es la tromboplastina). Durante la cuarta y última fase P₄, el coeficiente de correlación r prácticamente ya

45

no evoluciona, lo que indica que se ha formado un coágulo que paraliza las partículas en suspensión y, por consiguiente, el patrón de moteado. De hecho, el suero presente todavía permite una cierta agitación de las células, y por esto el coeficiente de correlación no es estrictamente igual a 1.

5 El punto de inflexión PI se puede determinar identificando un máximo local de la derivada temporal de $r(t)$, como se ilustra en la figura 4B.

El procedimiento de la invención se ha repetido 20 veces con sangre de un mismo donante sano, para probar la repetibilidad. El tiempo de coagulación medio medido fue de 34 s con una desviación típica de 1,5 s que
10 corresponde a un coeficiente de variación de 4,5 %, lo cual es muy satisfactorio teniendo en cuenta que la activación de la medición se ha hecho de forma manual.

Los rendimientos de la técnica se han evaluado en una gama de mediciones representativas de la realidad de la variabilidad entre individuos, reuniendo estos últimos donantes sanos y donantes enfermos. Esta evaluación
15 realizada en una base de 66 pacientes, se ha desarrollado en los centros de Hospices Civils de Lyon (HCL). La técnica de medición de la invención se ha comparado con una técnica clásica por medición de la transmisión óptica del plasma, aplicada en este laboratorio de análisis hospitalario.

La siguiente tabla resume las características de las dos técnicas:

20

	Referencia (HCL)	Invención
Sistema de medición	Analizador MDA, sociedad Trinity Biotech : medición de la transmitancia óptica	Correlación de imágenes de moteado láser
Muestra	10 μ l de plasma extraído en un tubo de 5 ml de sangre citrada centrifugada	10 μ l de sangre total citrada
Temperatura	37 °C	Ambiente
Repetición de mediciones	1	3
Intervalo de tiempo	10 s - 60 s	25 s - 150 s
Duración del análisis	20 min de centrifugación + 20 min en el analizador = 40 min	7 min
Coeficiente de variación	< 5 %	< 10 %

Las figuras 5A y 5B corresponden a las figuras 4A y 4B, respectivamente, pero se refieren a una medición realizada para el plasma sanguíneo. El grosor del conducto de fluido es de 50 μ m en los dos casos. Se puede constatar que el
25 procedimiento de la invención da resultados satisfactorios incluso en este caso; sin embargo, la variación del coeficiente de correlación es menor debido a la densidad de los difusores que es menor en el plasma (en este caso se trata esencialmente de plaquetas y proteínas) que en el caso de la sangre completa (en la que domina la contribución de las células).

La figura 6A muestra la recta de correlación para el tiempo de Quick medido por el método de la invención TQ_{INV} y el mismo tiempo medido por el procedimiento de referencia TQ_{HCL} . Se puede verificar que si los valores absolutos de los tiempos no coinciden, presentan un coeficiente de regresión muy bueno con respecto a la recta de correlación (coeficiente de regresión R^2 superior a 0,94). La correlación sería todavía mejor si no se tuvieran en cuenta las dos
30 muestras con $TQ_{HCL} > 40$ s, que corresponden a situaciones de urgencia médica en las que no se ha previsto el uso del dispositivo y el procedimiento de la invención.

35

Como se ha explicado antes, lo que interesa a los técnicos clínicos no es tanto el tiempo de coagulación como tal, sino sobre todo los parámetros normalizados tales como el INR definido por la siguiente fórmula:

$$INR = (TQ/TQ_R)^{ISI}$$

40

en la que:

- TQ es el tiempo de coagulación (tiempo de Quick) de la muestra considerada;

- TQ_R es un tiempo de referencia que corresponde al tiempo de Quick de una muestra de referencia, en el caso aquí
45 considerado $TQ_R = 12$ s para el procedimiento de HCL, $TQ_R = 34$ s para el método de la invención;

- ISI es un factor de corrección que depende de los reactivos usados para producir la coagulación; en el caso aquí considerado ISI = 1,3 para los dos métodos.

La figura 6B muestra la recta de correlación para el INR obtenido por el método de referencia (INR_{HCL} , eje de abscisas) y con el método de la invención (INR_{INV} , eje de ordenadas). Se puede ver que la correlación es muy buena (coeficiente de regresión = 0,93) y la pendiente de la recta es cercana a 1.

El procedimiento de la invención se ha ensayado con muestras de sangre completa, lo cual es ventajoso por las razones mencionadas antes. Sin embargo, plantea el problema de la posible influencia de las tasas de hematocritos de las muestras en el tiempo de correlación medido.

Para estudiar este efecto, las muestras de sangre completa se han subdividido en cuatro familias en función de su tasa de hematocritos;

- 15 F1: hematocritos inferiores a 31 %
- F2: hematocritos comprendidos entre 31 % y 36 %
- F3: hematocritos comprendidos entre 36 % y 40 %
- F4: hematocritos superiores a 40 %

y las rectas de correlación TQ_{INV}/TQ_{HCL} correspondientes se han trazado en la figura 7.

20 Las pendientes de las rectas de correlación de las diferentes familias están próximas, con una desviación máxima del orden de 10 %, lo que confirma que no hay una influencia significativa de la tasa de hematocritos en la medición del tiempo de coagulación por el procedimiento de la invención.

25 En ausencia de reactivos que permitan producir el fenómeno de la coagulación, por ejemplo en una medición del tiempo de coagulación natural, se puede producir un fenómeno de sedimentación de las células sanguíneas por el efecto de su propio peso. Este efecto conduce igualmente, como la coagulación, a un aumento del coeficiente de correlación entre imágenes de patrones de moteado, como se muestra en la figura 8.

30 La velocidad de sedimentación está ligada a un gran número de parámetros de la sangre tales como el número de eritrocitos, su volumen, la tasa de determinadas proteínas, la viscosidad de la sangre, etc. Este parámetro no es directamente específico de una enfermedad, sino que es un elemento de orientación del diagnóstico.

35 Como se ha explicado antes, la coagulación de la sangre va acompañada de una disminución de la transmisión óptica de la muestra y por lo tanto de la intensidad luminosa media registrada por la cámara. Al contrario, la sedimentación no implica una variación significativa de la transmisión óptica de la muestra. Por lo tanto, una medida conjunta del coeficiente de correlación y de la intensidad luminosa media permite diferenciar los dos fenómenos.

40 Las figuras 9A, 9B y 9C muestran la variación en el tiempo del coeficiente de correlación de las imágenes de moteado, medido de acuerdo con la invención, para tres muestras de sangre completa procedentes de tres pacientes diferentes. Los tiempos de coagulación TQ medidos son respectivamente 33,3 s, 51,3 s y 75,3 s.

Las figuras 10A, 10B y 10C muestran la variación en el tiempo del contraste C de las imágenes de moteado. El contraste se define como en el artículo previamente citado de Y. Piederrière.

45 Se puede ver que el contraste C cambia rápidamente en un periodo mucho más corto que TQ, y además presenta una "cola" de variación muy lenta que no permite determinar de forma precisa el tiempo de coagulación. Por lo tanto, la comparación de estos dos grupos de figuras pone de manifiesto la ventaja que proporciona el procedimiento de la invención.

50 En particular, cuando las mediciones permiten la determinación del tiempo de coagulación natural (sin agente de coagulación), se puede limitar el efecto de la sedimentación poniendo la cámara microfluidica en un medio de agitación, por ejemplo, una platina que genera ondas acústicas.

55 La invención se ha descrito de forma más particular en su aplicación al estudio de fenómenos de coagulación y/o de sedimentación de la sangre completa. Sin embargo, puede permitir el estudio de dinámicas de coagulación, sedimentación o secado de otros fluidos o suspensiones.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de caracterización de la dinámica de coagulación o de sedimentación de un fluido tal como la sangre completa, una fracción de sangre o el plasma sanguíneo, que comprende:
- 5
- la iluminación de una muestra de dicho fluido (ES) con un haz de luz coherente;
 - la adquisición de una serie temporal de imágenes de un patrón de moteado generado por la interacción entre dicha muestra y dicho haz de luz espacialmente coherente; y
 - el tratamiento de dicha serie temporal de imágenes; **caracterizado porque** dicha etapa de tratamiento
- 10 comprende:
- el cálculo de una función (r) representativa de la variación espacial de dicho patrón de moteado entre dos o varias imágenes de la serie; y
 - el análisis de la evolución temporal de dicha función.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha etapa de tratamiento comprende la determinación de un tiempo de coagulación o de sedimentación por análisis de la evolución temporal de dicha función (r) representativa de la variación de dicho patrón de moteado entre dos o varias imágenes de la serie.
3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha
- 20 fracción (r) representativa de la variación espacial de dicho patrón de moteado entre dos o varias imágenes de la serie, es una función de correlación (r) entre parejas de imágenes sucesivas.
4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 y 3, en el que dicha etapa de tratamiento comprende la identificación de un punto de inflexión (PI) de una curva representativa de la evolución temporal de
- 25 dicha función de correlación.
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende también la determinación de la variación temporal de la transmisión óptica de dicha muestra, y su uso para discriminar una dinámica de coagulación de una dinámica de sedimentación.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la variación temporal de la transmisión óptica de dicha muestra se determina a partir de dicha serie temporal de imágenes.
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas
- 35 imágenes son adquiridas con una cadencia superior o igual a 0,5 Hz.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra está constituida por sangre completa mezclada con reactivos, estando comprendida la longitud del camino óptico de dicho haz luminoso espacialmente coherente a través de dicha muestra, entre 20 y 1000 μm .
- 40 9. Dispositivo para aplicar un procedimiento de caracterización de la dinámica de coagulación o de sedimentación de un fluido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- un dispositivo microfluídico (CMF) que presenta un conducto de fluido susceptible de recibir una muestra de dicho
 - 45 fluido (ES) y que permite su iluminación;
 - un medio de iluminación (L) de dicha muestra por un haz de luz espacialmente coherente;
 - un sensor de imágenes (C) dispuesto para permitir la adquisición de una serie temporal de imágenes de un patrón óptico de moteado generado por la interacción entre dicha muestra y dicho haz de luz coherente; y
 - un medio de tratamiento (MT) de dicha serie temporal de imágenes;
- 50 **caracterizado porque** dicho medio de tratamiento está adaptado para calcular una función representativa de la variación de dicho patrón de moteado entre dos o varias imágenes de la serie y para analizar la evolución temporal de dicha función.
- 55 10. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho sensor de imágenes está desviado con respecto a la trayectoria directa de dicho haz de luz espacialmente coherente de forma que no deslumbre.
11. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, en el que dicho sensor de imágenes está desprovisto de lentes.

12. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicho medio de iluminación y dicho sensor de imágenes están dispuestos en los lados opuestos del conducto de fluido que es transparente, de modo que dichas imágenes son adquiridas por transmisión.
- 5
13. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho conducto de fluido tiene un grosor comprendido entre 20 y 1000 μm , y preferiblemente entre 30 μm y 300 μm .
14. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicho medio de iluminación y dicho sensor de imágenes están dispuestos del mismo lado del conducto de fluido, proporcionándose un elemento reflectante (SR) del lado opuesto a este último, de modo que dichas imágenes son adquiridas por reflexión.
- 10
15. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho conducto fluido tiene un grosor comprendido entre 25 y 500 μm , y preferiblemente entre 50 μm y 150 μm .
- 15

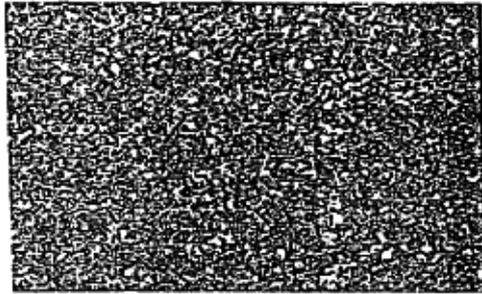


FIG. 1

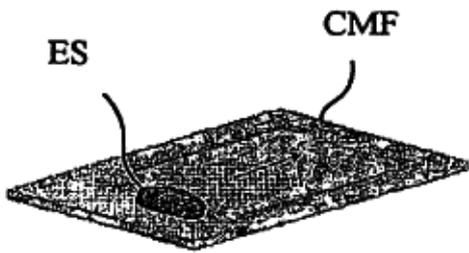


FIG. 2A

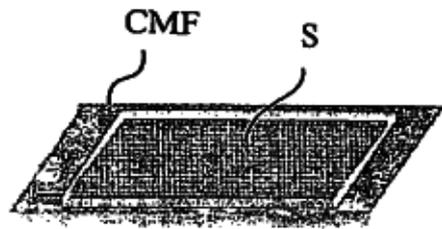


FIG. 2B

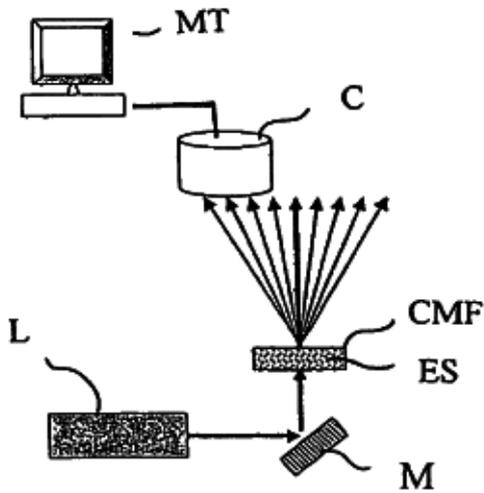


FIG. 3A

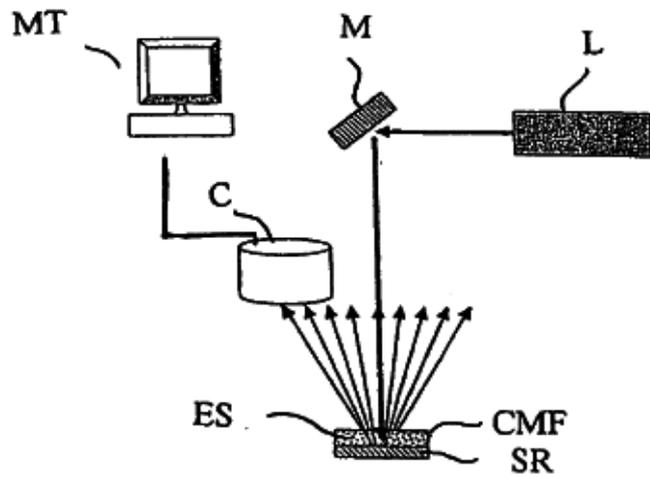


FIG. 3B

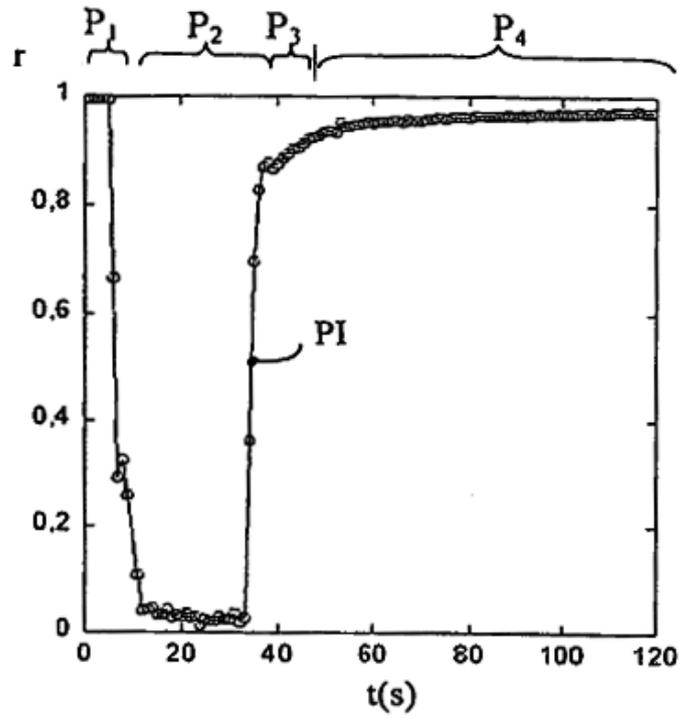


FIG.4A

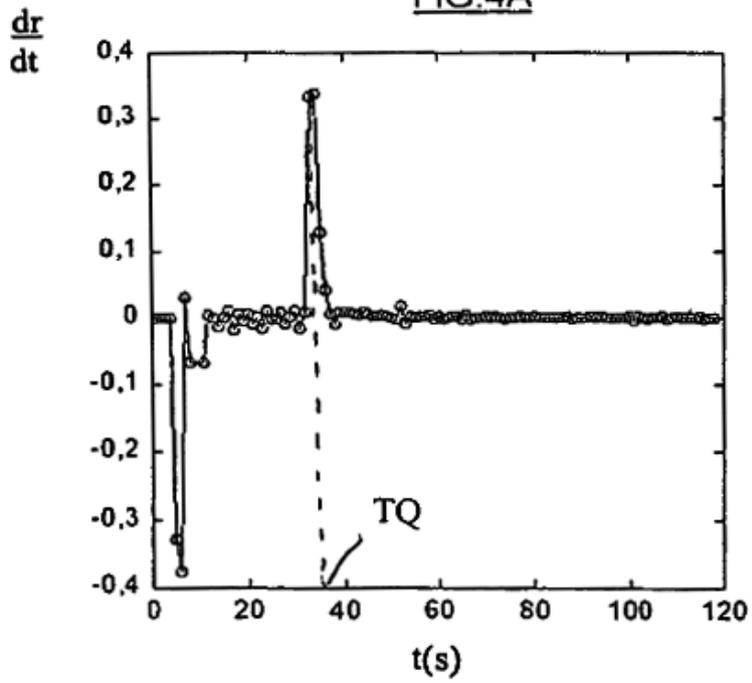
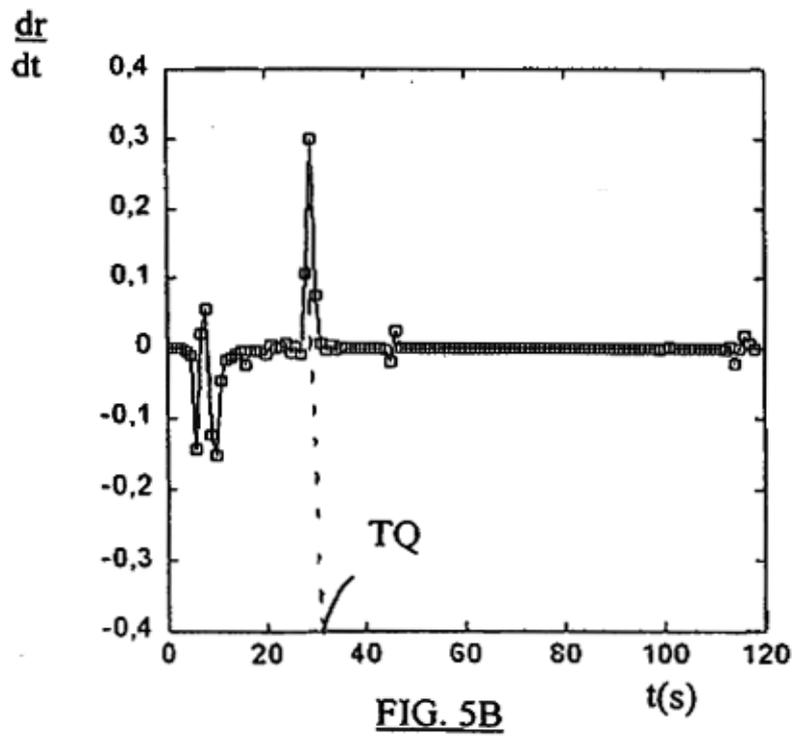
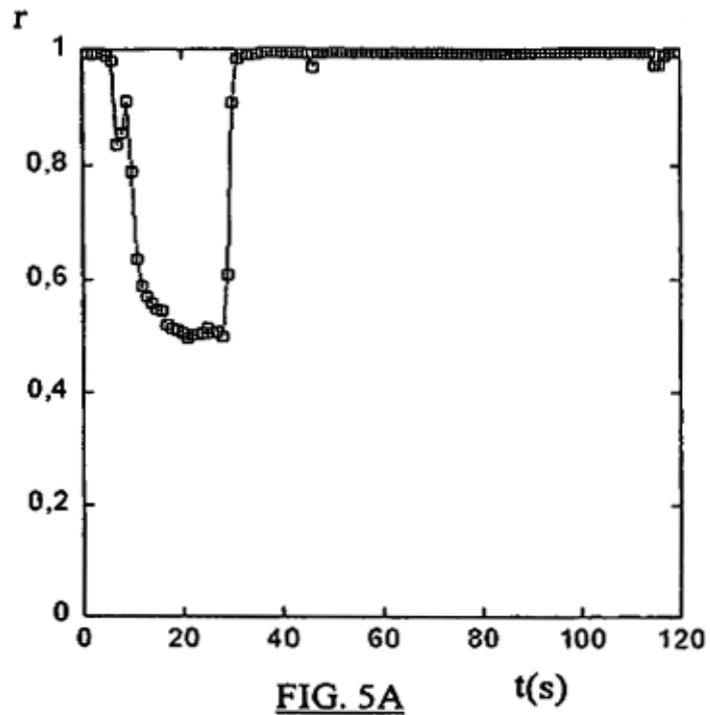
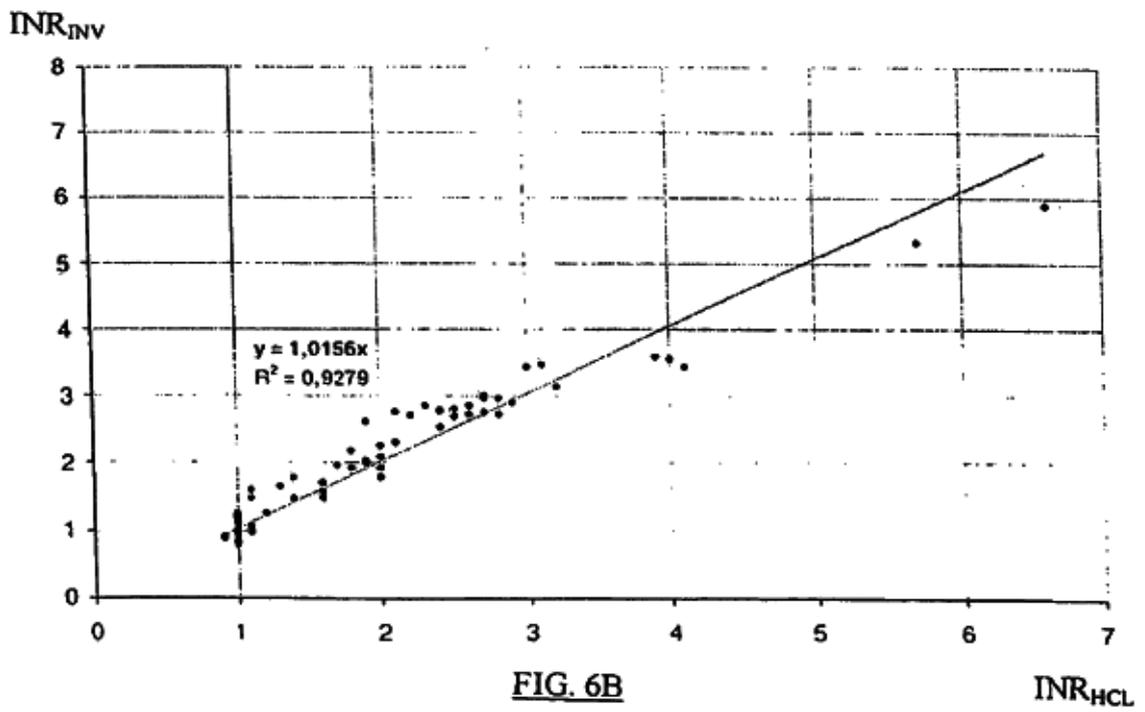
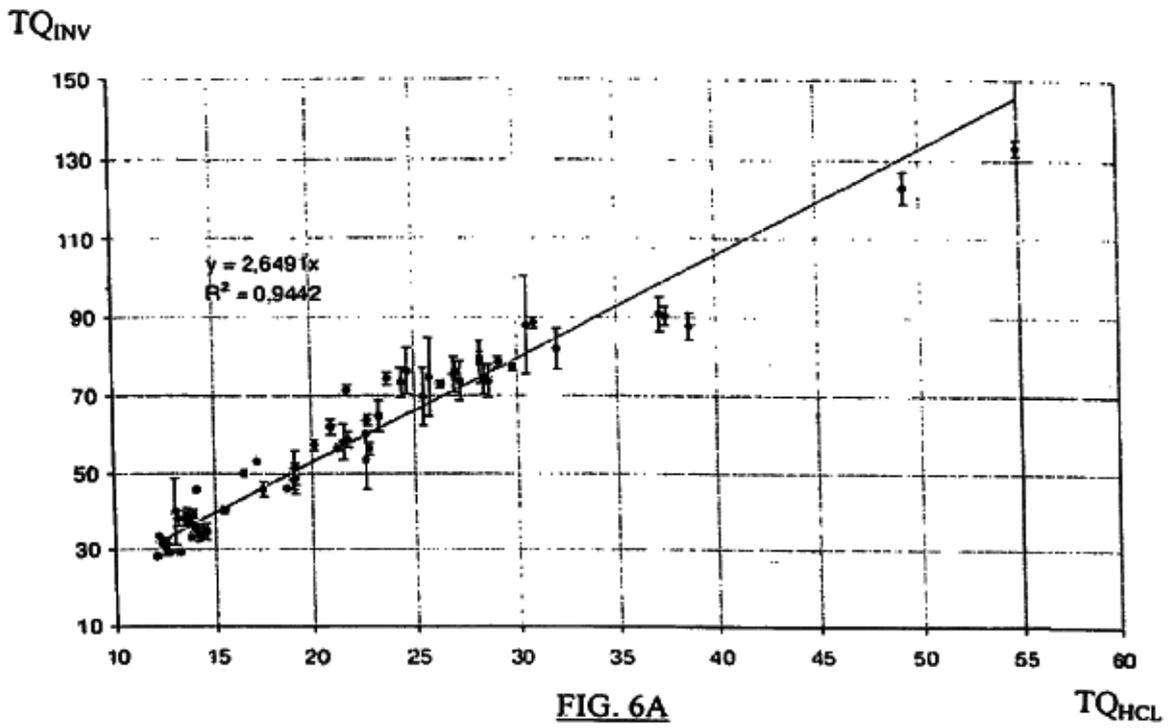


FIG.4B





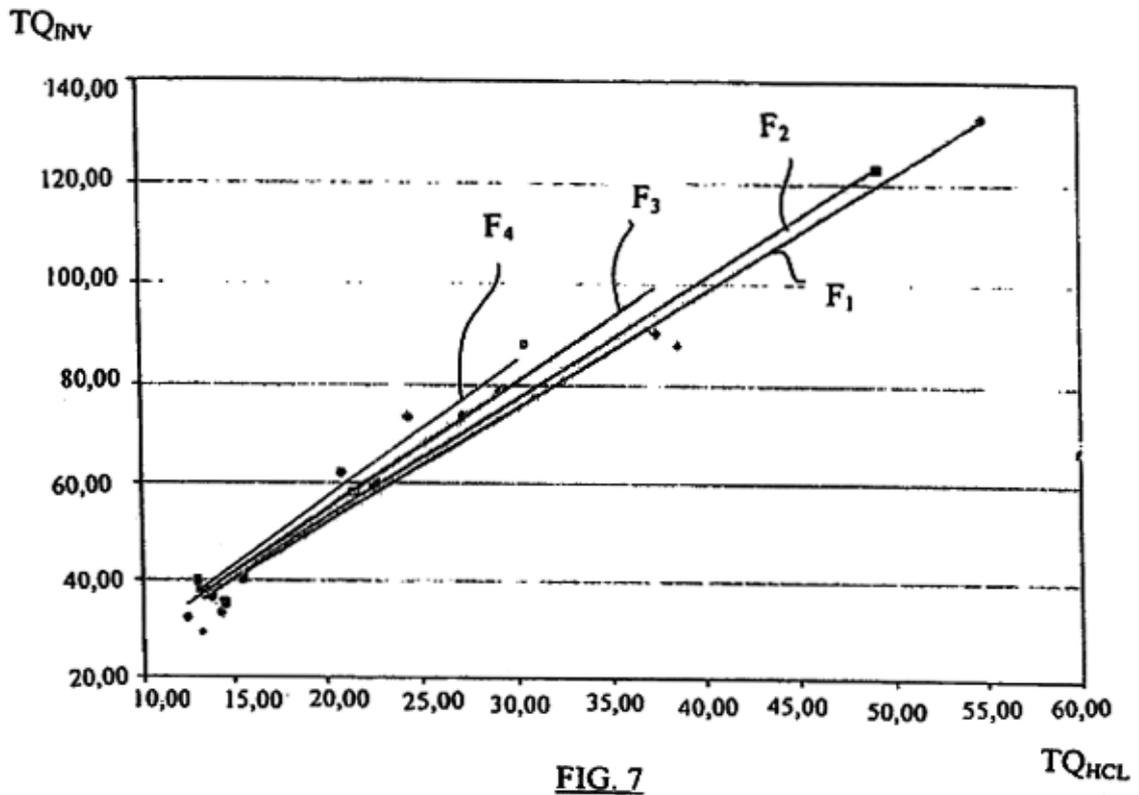


FIG. 7

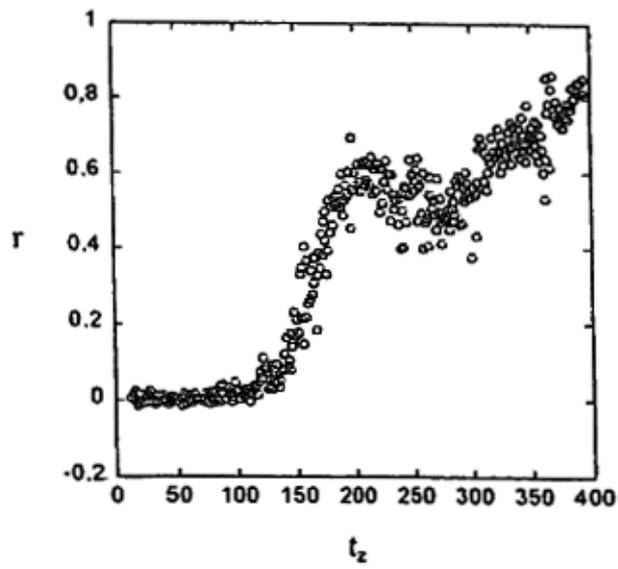


FIG. 8

