

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 449**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2004 E 04023728 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **13.04.2005 EP 1522859**

54 Título: **Control integrado para elementos de análisis**

30 Prioridad:

09.10.2003 DE 10346863

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

12.02.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**UNKRIG, VOLKER;
NORTMEYER, CHRISTINE;
HORN, CARINA;
MARQUANT, MICHAEL;
LUNGU, MIHAIL-ONORIU;
HOENES, JOACHIM;
KOTZAN, HOLGER y
DREIBHOLZ, JOERG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 395 449 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

Control integrado para elementos de análisis

5 La invención se refiere a un elemento de análisis, por ejemplo, en forma de una tira de pruebas, en especial una tira de pruebas para la determinación de un parámetro de coagulación, que contiene un sistema de reactivo de control, que permite distinguir elementos de análisis funcionales de los elementos de análisis no funcionales. Además, la invención se refiere a un correspondiente procedimiento para el control de elementos de análisis.

10 Para el análisis cualitativo y cuantitativo de componentes de una muestra líquida, en especial un líquido corporal humano de animales, se utilizan de manera creciente las llamadas pruebas asociadas a un soporte. En ellas, se utilizan elementos de análisis (designados también como elementos de prueba) en los que se incorpora, como mínimo un reactivo en un campo de pruebas que comprende una o varias capas, el cual se pone en contacto con la muestra. La reacción de la muestra y el reactivo conduce a una variación evaluable de modo visual o con ayuda de un aparato (principalmente un aparato fotométrico de reflexión o electroquímico) del elemento de análisis. Después de la realización de una prueba, el elemento de análisis es eliminado.

20 Se conocen múltiples tipos de elementos de análisis distintos, que se diferencian por el principio de medición (por ejemplo, óptico o electroquímico) y los reactivos utilizados, así como por su consideración, en especial con respecto a la disposición y fijación de las capas de prueba. Son especialmente significativos desde el punto de vista práctico los elementos de análisis en forma de tiras. Estos elementos de análisis designados como tiras de prueba comprenden esencialmente una capa de soporte longitudinal de un material plástico, sobre el que se han aplicado uno o varios campos de prueba.

25 Los elementos de análisis son envasados en envases primarios, en cuyo interior se encuentran hasta el momento de la utilización, es decir, de la extracción por el usuario y de la realización de una prueba, con su eliminación al final. Los elementos de análisis pueden ser envasados individualmente en su envase primario. De manera predominante, se utilizan unidades de envasado para los elementos de análisis, en los que se encuentran varios elementos de análisis en el interior de un envase primario conjunto. Habitualmente, los envases de tipo primario contienen un medio de secado.

30 El recinto interior del envase primario está habitualmente cerrado de manera esencialmente estanca al aire. Las condiciones de almacenamiento quedan, por lo tanto, determinadas esencialmente por las condiciones del entorno en el envase primario durante el almacenamiento.

35 Muchos elementos de análisis contienen reactivos que, a causa de determinadas condiciones de almacenamiento, por ejemplo, temperatura, humedad, oxígeno, luz, etc. pueden averiarse, de manera que no resultan utilizables para la realización de una prueba fiable. Para evitación de daños, es necesario, por lo tanto, que el envase de los elementos de análisis quede almacenado bajo determinadas condiciones de almacenamiento recomendadas de modo adecuado por el fabricante. Por parte del fabricante, la conservación del elemento de análisis, en caso de almacenamiento adecuado, se garantiza para un determinado periodo de tiempo.

40 La utilización de un elemento de análisis con un reactivo averiado, puede llevar a un resultado erróneo de la prueba, de lo que, en ciertas circunstancias, puede resultar una evaluación errónea grave, por ejemplo, del estado de salud de una persona. Por esta causa, se han realizado en el pasado esfuerzos de diferente tipo para reducir el peligro de utilización de elementos de análisis con averías por almacenamiento.

45 Por ejemplo, se han desarrollado reactivos de pruebas que son relativamente insensibles con respecto a influencias externas. Otro desarrollo se basa en la utilización de envases primarios costosos para reducir los efectos de influencias externas sobre los reactivos de los elementos de análisis. Ambas soluciones están relacionadas con costes de fabricación esencialmente más elevados. Por motivos de seguridad, se indica un periodo de tiempo de conservación relativamente más corto. Esto conduce, por lo tanto, a que el elemento de análisis después de transcurrida la fecha de caducidad, ya no puede ser utilizado, de manera que, no obstante, no se puede comprobar si se han producido realmente condiciones que puedan haber provocado una avería de los reactivos.

50 Las tiras de pruebas para diagnóstico sanguíneo están sometidas antes de su utilización a importantes controles de calidad. Las condiciones apropiadas de envío, y condiciones de almacenamiento son investigadas intensamente antes de la introducción en el mercado y, por ejemplo, se indican en el envase o en el folleto anexo al mismo. No obstante, no se excluye por completo que en el transporte de las mercancías a los clientes o por la manipulación poco cuidadosa por parte de los clientes, las tiras reciban averías antes de la fecha de caducidad, existiendo el peligro que en su utilización se puedan conseguir valores de medición erróneos.

55 Las condiciones de transporte y/o almacenamiento no apropiadas pueden ser reveladas mediante mediciones con controles líquidos que se llevan a cabo principalmente de forma descentralizada (es decir, fuera de laboratorios especializados, es decir, por ejemplo, en gabinetes médicos, farmacias, o por los pacientes en su casa) los llamados "Point-of-Care-Systeme" (PoC-Systeme) como otros componentes del sistema a parte de aparatos y tiras. Es un

inconveniente de la utilización de controles líquidos en los sistemas PoC (por ejemplo, sistemas de medición de coagulación) la manipulación que no es completamente sencilla, los costes de la utilización de, como máximo, 2 tiras de pruebas y 2 líquidos de control (control nivel 1 – nivel 2), así como el hecho de que en las mediciones de control se deben utilizar principalmente tiras del mismo lote de fabricación y envase que, de todas maneras son forzosamente tiras distintas de aquellas con las que realmente se investigará la muestra de sangre de un paciente.

Estos inconvenientes se evitan con un “On-Board-Kontrolle” (inglés: On-Board control, control incorporado, en lo que sigue de manera simplificada “OBC”), que está integrado en cada tira de prueba y que funciona sin una prueba adicional de líquido. Los sistemas con “On-Board-Kontrollen” (controles incorporados) no necesitan líquidos de control, sino que funcionan con el mismo líquido de la muestra de la que se determina el parámetro a determinar con el sistema de medición.

Estos “controles incorporados” se han descrito, por ejemplo, en las Patentes US 5.504.011 (ITC), US 6.084.660 (Lifescan) y US 6.060.323 (Hemosense). Los sistemas de control que se han dado a conocer en los mencionados documentos tienen en común que se toma una muestra de sangre mediante un canal capilar en un elemento de análisis, y es transportada por capilaridad a un punto de investigación dentro del elemento de análisis. Mediante una o varias ramificaciones del sistema capilar, la muestra es dividida y conducida a uno o varios canales laterales. En estos canales laterales se encuentran reactivos que constituyen el OBC propiamente dicho.

Un inconveniente común de estos “controles incorporados” es que las tiras de pruebas, además del canal de medición propio para la muestra del paciente, requieren otros varios canales (principalmente dos). En estos canales adicionales, después del llenado de los mismos con sangre de los pacientes, se llevan a cabo las mediciones que deben facilitar la información sobre la integridad de la tira. Este concepto conduce a costes de fabricación elevados ya que se deben constituir canales individuales separados con diferentes reactivos. Además, estos sistemas de control requieren volúmenes de muestra relativamente elevados, puesto que, aparte del canal de medición propiamente dicho, se debe llenar, como mínimo, un canal de control adicional y, principalmente, no obstante, varios de ellos con la muestra. Los volúmenes elevados de muestra resultan especialmente poco convenientes en los casos en los que los propios pacientes deben conseguir regularmente la muestra, por ejemplo, mediante el llamado “Home-Monitoring”, es decir, control doméstico, en especial en diabéticos o pacientes que deben controlar por sí mismos los valores de la coagulación, puesto que el conseguir muestras de sangre por punción de la piel es doloroso y, en algunos casos, más doloroso si se requiere una mayor muestra de sangre. Además, los sistemas de control incorporados de canales múltiples están perjudicados por los dificultosos mecanismos de llenado dado que la muestra debe entrar por sí misma en varios canales llenando los mismos.

Por el documento DE-A 198 31 519 es conocido colocar sobre los elementos de pruebas o sus envases elementos indicadores irreversibles de humedad o de temperatura, que deben mostrar las averías de los elementos de prueba, por ejemplo, por temperatura, humedad, luz, demasiado elevadas, o por efecto del oxígeno.

El objetivo básico de la invención consiste en desarrollar sistemas de control incorporados que no presenten los inconvenientes antes mencionados, en especial referentes a los costes de fabricación y al volumen de las muestras y que, a pesar de ello, muestren la posible inutilidad de elementos de pruebas, en especial en base a condiciones no apropiadas de almacenamiento o de transporte. En especial, se deben reconocer los perjuicios de la humedad y/o temperatura de los elementos de pruebas con ayuda del OBC objeto de la invención. El OBC que se pretende debe posibilitar, además, una reacción no demasiado temprana para posibilitar un prolongado almacenamiento del producto a temperatura ambiente, posibilitando una satisfactoria discriminación de alta precisión de tiras intactas y defectuosas.

Este objetivo se consigue mediante el objeto de la invención

El objeto de la invención es un elemento de análisis con un sistema de reactivo para indicación directa o indirecta de condiciones de entorno que pueden influir en la fiabilidad del elemento de análisis, de acuerdo con la reivindicación 1, su utilización según la reivindicación 16, así como un procedimiento para el control de elementos de análisis según la reivindicación 10. Las realizaciones ventajosas de la invención son el objeto de las reivindicaciones dependientes.

La invención será explicada de manera más detallada mediante la descripción detallada siguiente, figuras y ejemplos.

El concepto según la invención, que también se puede designar como control incorporado de un canal, prevé que una zona de reactivo sobre un elemento de prueba que sirve preferentemente para la medición propia de la muestra del paciente, contiene una sustancia que se modifica al ser sometida a sollicitación. La modificación de esta sustancia conduce preferentemente a un producto de descomposición que será detectado visualmente o mediante un aparato previsto para la medición de tiras de pruebas. Por ejemplo, una tira reconocida como defectuosa no puede ser autorizada por el aparato para la medición de muestras de pacientes.

El elemento de análisis, según la invención, con un sistema de reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones de ambiente que pueden influir en la fiabilidad del elemento de análisis, es apropiado para el control incorporado de elementos de análisis. El sistema reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones de ambiente que pueden influir en la fiabilidad del elemento de análisis, contiene, como mínimo, una sustancia química, preferentemente, no obstante, una mezcla de sustancias químicas. Como mínimo, una de las sustancias es apropiada para la indicación directa o indirecta de condiciones de entorno que pueden influir en la fiabilidad de un elemento de análisis. Esta propiedad se designa como propiedad de autocontrol incorporado. En esta situación, las influencias ambientales perjudiciales, tales como temperatura, humedad, luz, oxígeno, etc. son utilizadas para provocar en la sustancia indicada o con la sustancia indicada, una variación preferentemente irreversible que posibilita una detección a posteriori de las influencias perjudiciales. En ello, es principalmente poco significativo, el determinar el tipo exacto de las influencias perjudiciales; es suficiente habitualmente, manifestar el hecho de que ha tenido lugar una acción perjudicial.

El sistema de reactivo para el control incorporado puede contener, además de la sustancia que provoca propiamente la función de control incorporado, otras sustancias auxiliares. Por ejemplo, se pueden encontrar sustancias tampón, sustancias de carga, sustancias formadoras de película y similares, que son conocidas para los expertos en múltiples formas de realización en relación con las formulaciones de reactivos para elementos de prueba analíticos.

En el sentido de la presente invención, son elementos de análisis (indicados también como elementos de prueba, elementos de prueba analíticos, tiras de pruebas, chips de pruebas, dispositivos de pruebas), preferentemente para la determinación de analitos u otros parámetros en muestras líquidas, en especial en muestras líquidas de origen humano, tales como sangre, suero, plasma, orina, y similares. Los elementos de análisis en el sentido de la presente invención, contienen siempre sobre un material de soporte un reactivo o sistema reactivo que, con dependencia del analito a investigar en la muestra, o bien de las propiedades a investigar de la muestra, generan una señal detectable. Estos elementos de análisis, son conocidos para los expertos en múltiples formas de realización. Por ejemplo, se pueden nombrar las tiras de pruebas ópticas o electroquímicas para la indicación de metabolitos en la sangre o líquidos de muestra derivados de la misma, en especial, para la determinación de glucosa, colesterol, y similares. Además, se conocen tiras de pruebas con las cuales se pueden determinar parámetros de coagulación en una muestra de sangre.

El sistema de reactivo que está dispuesto sobre el elemento de análisis y que es el responsable de una señal indicadora detectable para un analito en la muestra o bien para una propiedad de la muestra, puede conducir, preferentemente, a una señal de medición ópticamente detectable y evaluable o a una señal detectable electroquímicamente. Ambas variantes son conocidas para el experto en múltiples formas de realización.

Preferentemente, el sistema de reactivos, según la invención, para control integrado está incorporado en el sistema de reactivo para la reacción indicadora. No obstante, se puede pensar, y ello es posible, aplicar a un elemento de análisis en zonas espacialmente separadas, sistemas de reactivos para la reacción indicadora y sistemas de reactivos para el control incorporado.

Para el caso preferente de que el sistema de reactivos esté incorporado en el sistema de reactivos para la reacción indicadora como control incorporado, se debe tener en cuenta que los reactivos no actúen de manera contraria entre sí.

El sistema de reactivos para el control incorporado y el sistema de reactivos para la reacción indicadora se pueden basar en los mismos principios indicadores o en principios distintos. Así es posible, según la invención, evaluar ópticamente o electroquímicamente el control incorporado. También es posible captar la reacción indicadora propiamente dicha ópticamente o electroquímicamente. Es especialmente preferente captar tanto el control incorporado como también la reacción indicadora de forma electroquímica. La indicación óptica puede tener lugar visualmente o mediante aparatos con ayuda de un fotómetro, de manera que se pueden utilizar las técnicas deseadas habituales para los expertos, tales como medición de la reflexión, medición de la absorción, medición de la transmisión, medición de la luminiscencia, y similares. Para una detección electroquímica, son apropiadas nuevamente técnicas conocidas para el experto tales como potenciometría, amperometría, coulombiometría, cronoamperometría, y similares.

En especial, la variación a evaluar ópticamente del campo de control incorporado o bien del campo del reactivo indicador, puede tener lugar sin el auxilio de aparatos de medición, a "ojo desnudo". No obstante, es preferente la evaluación del control incorporado y del campo indicador con ayuda de un aparato de medición, por ejemplo, un fotómetro o un aparato de medición electroquímica. También es posible, no obstante, efectuar la medición del control incorporado sin aparato de medición, pero la reacción indicadora con un aparato de medición.

Las formulaciones de reactivos de los controles incorporados y del campo indicador, pueden ser aplicadas sobre un soporte de un elemento de análisis mediante los métodos deseados, conocidos por los expertos. En este caso, los diferentes reactivos pueden ser aplicados con los mismos métodos o con métodos distintos. Se indicarán como métodos a título de ejemplo: aplicación en forma líquida y, a continuación, secado superficial o interno sobre un soporte; aplicación como masa de recubrimiento mediante rasqueta, recubrimiento mediante toberas laminares, y

similares; procedimientos a presión, tales como impresión por chorros de tinta, serigrafía, dispersión, etc. También, es posible aplicar los reactivos ya colocados sobre un primer soporte con este primer soporte sobre el segundo soporte propiamente dicho del elemento de análisis, uniéndolo a éste, por ejemplo, mediante encolado, soldadura, etc.

5 El control incorporado, según la invención, permite detectar de manera fiable elementos de pruebas sometidos a solicitudes. Por solicitudes, se comprenderá en esta descripción que los elementos de pruebas son sometidos a condiciones ambientales que pueden conducir a una avería o a influir en los reactivos para la reacción indicadora propiamente dicha. Para elementos de análisis, para los que se prevé un almacenamiento a temperatura ambiente en recipientes cerrados con un medio de secado o elementos laminares estancos a la humedad, se debe comprender por solicitud, por ejemplo, que estén sometidos a elevadas temperaturas en recipientes o envases laminares propiamente cerrados (por ejemplo, en el transporte a los clientes, o situados detrás del cristal de un escaparate a la luz del sol) o un almacenamiento con humedad (para recipientes no propiamente cerrados después de la extracción de tiras de pruebas o envases laminares defectuosos). Naturalmente, también una combinación de factores de solicitud como, por ejemplo, simultáneamente humedad o temperatura elevada, pueden provocar averías. Es importante, en este caso, solamente que la solicitud conduzca finalmente a una alteración o a la desactivación del sistema de reactivos indicadores. Para diferentes elementos de análisis, pueden ser distintas por completo las circunstancias concretas. El experto en la materia conoce la forma de identificar acciones perjudiciales correspondientes para el respectivo sistema de reactivos.

20 De acuerdo con la invención, la solicitud de elemento de análisis o bien del sistema de reactivos para el control incorporado, conduce a una variación, preferentemente irreversible, del sistema de reactivos para el control incorporado. De esta manera, se garantiza que las influencias perjudiciales del entorno pueden ser reconocidas incluso cuando las condiciones del medio ambiente han variado circunstancialmente a condiciones apropiadas. Por ejemplo, se puede identificar de manera fiable una elevación de temperatura perjudicial que ha ocurrido una sola vez o un efecto durante un tiempo corto y por una sola vez de humedad, que ha conducido a producir averías.

30 De manera sorprendente, se ha descubierto que reactivos que contienen óxidos de nitrógeno o compuestos nitrosos, en especial en relación con medios de reducción, tales como azúcares, polialcoholes, proteínas que contienen cisteína, glicina, etc., se reducen en las mismas condiciones de influencias de entorno, bajo las que debe mostrar un OBC influencias no deseadas y variaciones negativas de una tira de pruebas. Los productos de degradación producidos por reducción de los óxidos de nitrógeno o compuestos nitrosos, pueden ser detectados en las tiras de pruebas mediante procedimientos apropiados, preferentemente electroquímicos u ópticos. En especial, para el caso de que como medio de reducción se utilice azúcar, se pueden ajustar las propiedades Redox y, por lo tanto, la cinética de la reacción Redox, mediante el valor del pH del reactivo.

De acuerdo con la invención, se ha mostrado como molécula especialmente apropiada para la "reacción indicadora" descrita y, por lo tanto, como preferente el óxido de nitrógeno resazurina.

40 La resazurina azul, en condiciones de solicitud en condiciones en las que se pueden dañar las tiras de pruebas (elevada temperatura, humedad y luz), se puede reducir a resorufina roja (ver figura 1), de manera que la reducción tiene lugar, en especial, en presencia de un asociado redox apropiado, preferentemente el de la formulación de los reactivos. La modificación, es decir, la reducción de la concentración de resazurina para aumento simultáneo de la concentración de resorufina, puede ser comprobada visualmente mediante un detector óptico en un aparato de medición o mediante un sensor electroquímico.

50 Para la resazurina, se descubrió de modo sorprendente que la glicina era un medio de reducción muy específico. La combinación de cantidades apropiadas de resazurina con glicina en un reactivo OBC es especialmente preferente, de acuerdo con la invención. Para la resazurina se ha demostrado como preferente una concentración mínima de aproximadamente 0,01 g/l puesto que, por debajo de esta concentración, es muy difícil una indicación práctica de la resazurina. La cantidad más elevada de resazurina no debe superar 20 mmol/l, puesto que de lo contrario pueden aparecer problemas de solubilidad. Tal como se ha descrito en lo anterior, la glicina no es imprescindible para las funciones del OBC con resazurina; como cantidad máxima de glicina se ha demostrado una concentración aproximada de 250 g/l puesto que por encima de esta cantidad aparecen problemas de solubilidad, y la glicina en ciertas circunstancias, precipita de la solución por cristalización, lo que puede ser nuevamente problemático en el recubrimiento de masas de reactivo, y posiblemente puede conducir a fallos de homogeneidad en la masa dotada de recubrimiento.

60 Para la detección electroquímica de la reacción OBC, puede ser utilizada la cuantificación de la resazurina restante y/o la cuantificación de la resorufina generada.

65 La cuantificación de resazurina se debe favorecer para grandes variaciones de concentración y se puede llevar a cabo, por ejemplo, por reducción electroquímica de la resazurina para un potencial de -700mV con respecto a Ag/AgCl. Para este potencial, la resorufina que se genera será reducida adicionalmente a dihidro-resorufina (ver figura 1).

5 Cuando en un reactivo OBC se encuentra resazurina de manera predominante (y el reactivo a continuación recibe poca o ninguna sollicitación), se provoca una transferencia de 4 electrones que conduce a una corriente más elevada que cuando existe la resorufina de modo predominante, cuya reducción lleva solamente a una conversión de 2 electrones. La corriente y eventualmente carga medidos para un determinado potencial, en especial de modo preferente un potencial de -700mV con respecto a Ag/AgCl, permite la deducción de la magnitud de la sollicitación del reactivo por temperatura/humedad.

10 La cuantificación de la resorufina no es posible por re-oxidación electroquímica de la resorufina a resazurina, porque la reducción de resazurina a resorufina discurre de forma irreversible. Para una indicación reductiva en el sistema OBC descrito, es necesario específicamente solo la reducción de resorufina, pero no la reducción de la resazurina eventualmente existente en el reactivo. Esto tiene lugar, por ejemplo, por utilización de un potencial específico de reducción que con preferencia se encuentra de -450 a 550 mV con respecto a Ag/AgCl.

15 De manera sorprendente, ha sido descubierto que la cuantificación de resorufina en el sistema descrito OBC es especialmente posible cuando se convierte en una primera etapa la resorufina existente en la tira de pruebas por vía electroquímica en dihidro-resorufina (a continuación, se designará "OBC Prepare") y en una segunda etapa (a continuación designada "prueba OBC"), se re-oxida in situ por vía electroquímica la dihidro-resorufina generada en resorufina. Esta reacción de oxidación discurre de manera especialmente específica, preferentemente para un potencial de -100mV con respecto a Ag/AgCl.

20 Mediante la duración de la "OBC Prepare Phase" (Fase de Preparación OBC), se puede controlar la intensidad y especificidad de la "señal de prueba OBC".

25 Además del sistema especialmente preferente de resazurina/resorufina, otro ejemplo preferente para una clase de sustancias que bajo las circunstancias que pueden dañar las tiras de pruebas se pueden transformar en productos que pueden mostrar la avería de una tira de pruebas, se encuentran los compuestos nitrosos, en especial p-Nitrosanilina. Las p-Nitrosanilinas pueden, por ejemplo, ser reducidas, por ejemplo, en condiciones que pueden dañar también los re-agentes en una reacción indicativa. Los productos generados reductivamente (tales como, por ejemplo, Fenilendiamina) pueden ser detectados igualmente de forma óptica o electroquímica. Otros compuestos nitrosos que pueden ser utilizados, según la invención, son los descritos en los documentos US 5.206.147, US 5.334.508, US 5.122.244 y US 5.286.362. Es especialmente preferente, una combinación de los compuestos nitrosos dados a conocer en estas 4 patentes US con heteropoliácidos, en especial heteropoliácidos en forma precipitada, según el documento US 5.240.860, que en caso de sollicitación en presencia de medios de reducción constituyen heteropoliácidos de color azul fácilmente visibles.

35 Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 muestra las fórmulas estructurales de resazurina 1, que mediante reducción se transforma en resorufina 2, y por reducción adicional en dihidro-resorufina 3.

La figura 2 muestra espectros de absorción (absorción relativa A relacionada con respecto a la longitud de onda λ (en mm)) de la resazurina 1 y resorufina 2.

45 La figura 3 muestra los espectros de remisión (remisión relativa R (en %) representada con respecto a la longitud de onda λ (en mm)) en campos de reactivos de elementos de prueba con diferentes sollicitaciones (sin sollicitación 1, poca sollicitación 2, fuerte sollicitación 3).

50 La figura 4 muestra, en base al aumento de la remisión relativa R (en %) (medida para una longitud de onda de 620 nm) con respecto al tiempo de sollicitación t (en h) el aumento en productos de descomposición (resorufina) en una película de reactivo que contiene resazurina.

55 La figura 5 muestra, en base a la carga Q medida con dependencia del tiempo de sollicitación t (en h) la variación de las señales electroquímicas medibles durante una primera fase de medición con una duración de 3 segundos a -700mV con respecto a Ag/AgCl (Q_{700}) (ambas curvas inferiores) y una segunda fase de medición con una duración de 1,5 segundos a -100mV con respecto a Ag/AgCl (Q_{100}) (ambas curvas superiores).

60 La invención se caracterizará de manera más detallada de acuerdo con los siguientes ejemplos. En ellos, se describirán a título de ejemplo, en base a tiras de pruebas para la medición de coagulación (con el ejemplo de una prueba de tiempo de protombina o pruebas PT) las ventajas y características del OBC, según la invención. Para el experto, es evidente que las afirmaciones realizadas en base al ejemplo de tiras de prueba de coagulación son también válidas para otros tipos de tiras de prueba (en especial, para las de determinación óptica o electroquímica de glucosa en sangre, lípidos tales como colesterol y HDL-Colesterol, triglicéridos, etc. para la determinación de otros parámetros de la coagulación a parte de PT, tales como, por ejemplo, aPTT, ACT, ECT, pruebas anti-factor Xa, y también para elementos de pruebas inmunológicos, en especial tiras de pruebas cromatográficas evaluables de forma óptica), y dichas afirmaciones se pueden trasladar a éstas.

Ejemplo 1: 2 Formulaciones de reactivos con diferentes medios de reducción para un control incorporado evaluable ópticamente

Tabla 1

Formulación para un OBC evaluable ópticamente con glicina como medio de reducción		
Producto químico	Procedencia	Concentración
Sacarosa	Sigma	3,2 g / dl
Moviol 4/86	Clariant GmbH	1,3 g / dl
Keltrol F	Kelco	2,98 g / ml
Glicina	Sigma	1,35 g / dl
HEPES ¹	Sigma	0,33 mg / ml
Polietilenglicol PEG 3,350	Sigma	1,33 g /dl
Seroalbúmina de vaca	Sigma	0,4 g / dl
Mega 8	Sigma	0,67 mg / ml
Resazurina	Riedel de Haen	0,96 mg / ml
¹ HEPES: ácido [4-(2-Hidroxietil)-piperazino]-etansulfónico		

5

10

Las sustancias indicadas en la Tabla 1 fueron mezcladas de forma homogénea, y ajustadas con NaOH a un valor de pH 7,4. La masa de reacción conseguida de este modo fue aplicada como recubrimiento con una anchura de 20mm y unos 10µm de espesor de banda de reactivo sobre una tira de pruebas a medir por fotometría de reflexión.

Tabla 2

Formulación para un OBC evaluable ópticamente con glucosa como medio de reducción				
pH de la formulación	7,5	9	10	11
Producto químico	Pesos en g			
Solución de polivinilpirrolidona ¹	7,09	7,09	7,09	7,09
Glucosa	1,2	1,2	1,2	1,2
HEPES ²	1,25	--	--	--
CHES ³	--	1,04	1,04	--
CAPS ⁴	--	--	--	1,11
Agua bidestilada	7,72	7,93	7,93	7,86
Solución Keltrol F ⁵	17,04	17,04	17,04	17,04
BM Propiofan 70 D	5,69	5,69	5,69	5,69
Suspensión dióxido de titanio ⁶	55,32	55,32	55,32	55,32
Resazurina	0,28	0,28	0,28	0,27
Hexanol	0,17	0,17	0,17	0,17
Metoxi-2-propanol	4,25	4,25	4,25	4,25
¹ Polivinilpirrolidona (PVP) es dispersada en agua en una cantidad de 40g/l y sometida a agitación unos 30 minutos ² HEPES: ácido [4-(2-Hidroxiethyl)-piperazino]-etansulfónico ³ CHES: ácido 2-(Ciclohexilamino)-etansulfónico ⁴ CAPS: ácido 3-(Ciclohexilamino)-propansulfónico ⁵ Se dispersó Keltrol en una cantidad de 6,8 g/l con agitación en agua y se prosiguió la agitación varias horas. Para asegurar un tratamiento completo se dejó la preparación antes de otra utilización durante una noche en reposo a temperatura ambiente. ⁶ 15g de dióxido de titanio son dispersados por agitación en 38 ml de agua a continuación homogeneizados en un agitador de disolución a elevada velocidad de agitación				

5 El valor del pH de la masa de reactivos es ajustado al valor predeterminado con solución de lejía sódica.

Los materiales indicados en la tabla 2 fueron mezclados de forma homogénea. La masa de reacción conseguida de este modo fue aplicada como recubrimiento de 20mm de ancho y unos 10µm de grosor de banda de reactivo sobre una tira de pruebas a medir por fotometría de reflexión.

10 La velocidad de reacción de la reacción OBC, es decir, la conversión de resazurina en resorufina dependiente de las condiciones ambientales, puede ser ajustada mediante el valor de pH. Cuanto más alcalino es el valor de pH, más rápidamente tiene lugar esta conversión y, por lo tanto, más sensible es el OBC.

15 Ejemplo 2: Detección espectroscópica de masas del producto de descomposición después de sollicitación de la formulación de reactivos según la Tabla 1 del Ejemplo 1.

Para las tiras de pruebas para las que se ha previsto un almacenamiento a temperatura ambiente en recipientes cerrados dotados de medios de secado o en elementos laminares impermeables a la humedad, en estas

condiciones de almacenamiento no debe tener lugar reacción de descomposición o solamente en una proporción muy reducida.

Como “fallo de almacenamiento” son, en primer lugar:

- 5 • elevadas temperaturas en recipientes cerrados/envases laminares (por ejemplo, en el transporte a los clientes o detrás de un cristal de escaparate a la luz del sol), y
- 10 • detección a partir del control incorporado de almacenamiento en húmedo (recipientes no cerrados de forma adecuada después de la extracción de tiras de prueba o envases laminares defectuosos).

Estas exigencias fueron simuladas mediante los siguientes modelos de solicitud:

- 15 • almacenamiento durante varias semanas a 50°C en recipientes cerrados
- almacenamiento durante varias horas y varios días a 50°C y humedad elevada del aire (50%/75%)
- almacenamiento durante varios días con envases abiertos o defectuosos con condiciones ambientales de la zona climática 4 (30°C, 70% humedad del aire)

20 El espectro de masas de una formulación de reactivos sometida a solicitud que fue fabricada de acuerdo con la Tabla 1 del ejemplo 1, muestra que después de la solicitud (6 horas a 50°C y 75% de humedad relativa de aire) un cierto porcentaje de resazurina se transformó en resorufina (ver también figura 1). Además del pico principal del espectro de masas de resazurina a 228,17 unidades de masa, existe el pico principal del espectro de la resorufina (212,20 unidades de masa).

25 Ejemplo 3: Espectros de absorción de resazurina y resorufina (figura 2).

Los espectros de absorción reproducidos en la figura 2 de resazurina 1 (material de color azul) y resorufina 2 (material de color rojo) muestran que en principio es posible una detección óptica (por ejemplo, visual o por fotometría de reflexión) de la conversión de resazurina 1 en resorufina 2, que tiene lugar, tal como muestra el ejemplo 2, en la solicitud de una formulación de reactivos.

Ejemplo 4: Espectros de reflexión de tiras de pruebas sometidas a solicitud y no sometidas a solicitud.

35 tiras de pruebas cuyas películas de reactivos fueron preparadas en base a la formulación de la Tabla 1 del ejemplo 1, fueron sometidas a solicitud 0 horas (sin solicitud, ver curva 1 de la figura 3), 6 horas (poca solicitud, ver curva 2 de la figura 3), y 12 horas (fuerte solicitud, ver curva 3 de la figura 3) a 50°C y 75% de humedad del aire. Se midió la variación de los espectros de remisión correspondientes (figura 3). Con una solicitud creciente se muestra un aumento de la remisión para una longitud de onda de 620nm que está asociada a una reducción de las cantidades de resazurina.

40 Ejemplo 5: Detección óptica del producto de descomposición resorufina en tiras de pruebas con solicitudes de diferente intensidad.

45 Tiras de pruebas cuyas películas de reactivos fueron preparadas en base a la formulación de la Tabla 1 del ejemplo 1 fueron sometidas a solicitud de diferente duración a 50°C y 75% de humedad del aire y, a continuación, medidas con un fotómetro de reflexión simple, cuyo LED trabajaba con una luz con longitud de onda de 620nm.

50 La figura 4 muestra el aumento de producto de descomposición (reconocible en el aumento de la reflectancia R) con respecto al tiempo de solicitud t (en h).

La variación del campo de prueba puede ser reconocida también de forma visual, es decir, por parte del usuario a ojo desnudo. La zona de reactivo inicialmente azul de la tira de pruebas sin solicitud modifica su color con el aumento de la solicitud a color rosa.

55

Ejemplo 6: formulación para una prueba de coagulación PT con OBC integrado y detección electroquímica.

Tabla 3

Formulación para una prueba amperométrica de tiempo de protombina con reactivos de OBC integrado		
Producto químico	Procedencia	Concentración
Relipidierres rekombinates humanes Tromboplastina (rhTF)	Dade Behring, Marburg	72 ng / ml
Sacarosa	Sigma	3,2 g / dl
Moviol 4/86	Clariant GmbH	1,3 g / dl
Keltrol F	Kelco	2,98 g / ml
Glicina	Sigma	1,35 g / dl
Polibren	Sigma	10 µg / ml
HEPES ¹	Sigma	0,33 mg / ml
Polietilenglicol PEG 3,350	Sigma	1,33 g / dl
Seroalbúmina de vaca	Sigma	0,4 g / dl
Mega 8	Sigma	0,67 mg / ml
Resazurina	Riedel de Haen	0,96 mg / ml
Electrozima TH	Roche Diagnostics	1,2 mg / ml
¹ HEPES: ácido [4-(2-Hidroxietil)-piperazino]-etansulfónico		

5

Las materias indicadas en la Tabla 3 fueron mezcladas de forma homogénea y se ajustó el pH a 7,4 con NaOH. La masa de reacción conseguida de este modo fue aplicada como recubrimiento con una anchura de 4mm y un grosor de unos 90 µm (húmedo) o bien de unos 10µm (seco) sobre una tira de pruebas a medir de forma amperométrica, de manera que el electrodo de trabajo quedó recubierto por completo con el reactivo. Como electrodo de referencia, se utilizó electrodo Ag/AgCl que sirvió también como contraelectrodo.

10

Ejemplo 7: Detección electroquímica de resazurina y de la producción por descomposición de resorufina en tiras de pruebas con sollicitaciones de diferente intensidad.

15

Las tiras de pruebas fabricadas según el ejemplo 6, fueron sometidas a sollicitación por periodos de tiempo distintos a 50°C y 75% de humedad del aire. Con estas tiras de prueba, se midieron de forma amperométrica sangre entera.

Para la cuantificación de resazurina y resorufina, se aplicaron los siguientes potenciales.

20

-700 mV contra Ag/AgCl durante 3 segundos (la llamada fase "OBC-Prepare"); a continuación
-100 mV contra Ag/AgCl durante 1,5 segundos (la llamada fase "OBC-Test"); a continuación
+200 mV contra Ag/AgCl durante 90 segundos (para la medición propiamente dicha de la coagulación).

25

Para la cuantificación de las señales "OBC-Prepare" y "OBC-Test" se calcularon las integrales por debajo de las curvas corriente-tiempo. La figura 5 muestra la variación de estas integrales (designados Q_{700} o bien Q_{100}) al aumentar la sollicitación de las tiras de pruebas.

30

Mientras que las señales OBC varían fuertemente, el tiempo de coagulación medido por la tira de pruebas sometida a sollicitación permanece estable durante un periodo de tiempo de sollicitación muy prolongado (ver Tabla 4).

Tabla 4

Efectos de una sollicitación a 50°C y 75% de humedad relativa del aire sobre la medición del tiempo de coagulación	
Tiempo de sollicitación (h)	Tiempo de coagulación (s)
0	12,78
0,33	12,38
0,66	12,72
1	13,14
2	12,52
4	13,53
6	13,26
12	12,78
24	13,16
36	14,00

5 De esta manera, se garantiza que el OBC muestra el almacenamiento defectuoso de las tiras de pruebas antes de que se generen tiempos de coagulación erróneos.

10 Ejemplo 8: Indicación de OBC con detección electroquímica en el almacenamiento de tiras sin envasar en zona climática IV.

15 El mayor peligro de averías de tiras de pruebas, cuyo envasado es defectuoso o que no se ha vuelto a cerrar, se presenta en clientes que viven en la zona climática IV (húmedo y cálido). Para esta zona climática, se describen en la literatura como "condiciones climáticas medias" una humedad del 70% y una temperatura de 30°C.

La Tabla 5 muestra que el OBC con detección electroquímica muestra variaciones de la tira de pruebas por almacenamiento en estas condiciones.

20 La Tabla 5 muestra para diferentes materiales de muestra (sangre normal (N) 1 y 2; sangre de donantes, tratados con Marcumar (M) 1 y 2), en base a la carga medida Q (en nAs) con dependencia del tiempo de sollicitación t (en h) la variación de la señal electroquímicamente medible en una fase de medición de 3 segundos a -700mV contra Ag/AgCl (Q₇₀₀), o bien durante una fase de medición de 1,5 segundos a -100mV contra Ag/AgCl (Q₁₀₀).

Tabla 5

Efectos de una sollicitación a 30°C y 70% de humedad relativa sobre el control integrado electroquímico para diferentes materiales de muestra								
t (h)	Q ₁₀₀ (nAs)				Q ₇₀₀ (nAs)			
	N 1	N 2	M 1	M 2	N 1	N 2	M 1	M 2
0	58,42	57,3	51,7	56,8	2663	2512	2580	2735
2	58,62	57,9	56,0	58,0	2779	2551	2619	2748
6	62	62,0	62,3	63,6	2673	2567	2568	2728
9	62,21	61,4	61,0	63,8	2644	2466	2535	2713
12	65,16	63,4	61,7	65,8	2637	2488	2480	2723
24	77,07	76,0	75,6	78,8	2608	2455	2485	2722
48	94,56	89,0	84,4	89,2	2622	2493	2526	2665
72	102,3	104,3	100,1	105,2	2615	2455	2545	2705
96	119	123,7	122,1	127,5	2575	2466	2479	2722
120	151	141,8	145,0	167,2	2491	2434	2467	2535

- 5 Tanto en base a datos de medición, que fueron conseguidos durante la llamada fase OBC-Prepare (ver ejemplo 7), como también durante la llamada fase OBC-Test (ver ejemplo 7), se pueden identificar los elementos de análisis "solicitados" de este modo.

- 10 Los tiempos de coagulación, tal como muestra la Tabla 6, son también sensiblemente estables en estas condiciones, de manera que se pueden reconocer de manera fiable las tiras de pruebas sometidas a sollicitación mediante OBC, antes de que bajo ciertas circunstancias se generen valores de medición de coagulación erróneos.

Tabla 6

Efectos de una sollicitación a 30°C y 70% de humedad relativa del aire sobre la medición del tiempo de coagulación	
tiempo de sollicitación (h)	Tiempo de coagulación (s)
0	11,66
2	11,94
6	12,28
9	12,14
12	12,27
24	11,82
48	11,88
72	11,66
96	11,63
120	11,67

- 15 Ejemplo 9: Glicina como asociado Redox específico para resazurina
- 20 Si se almacenan elementos de pruebas que contienen la formulación del ejemplo 6 a 25°C durante 48 horas, varía la proporción de resazurina con respecto a resorufina porque, a causa de la "reacción OBC", la primera se transforma en la última. La siguiente Tabla 7 muestra que la velocidad de reacción de esta reacción es influenciada por la presencia o ausencia de glicina. También es posible OBC en caso de ausencia de glicina; la sensibilidad del OBC se aumentará, no obstante de manera sensible, por la presencia de glicina.

Tabla 7

Cantidad relativa de resorufina (%) en relación con la cantidad total de resorufina y resazurina con dependencia de la duración de solicitud		
Duración solicitud (h)	Proporción resorufina (%)	
	Reactivo sin glicina	Reactivo con glicina
0	5	10
0,5	6	16
1	7	21
3	8	27
6	8	41
9	10	52
18	12	72
24	14	89
48	24	89

REIVINDICACIONES

- 5 1. Elemento de análisis que contiene un sistema reactivo para una reacción de detección y un sistema reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir en la fiabilidad del elemento analítico, caracterizado porque el sistema reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir en la fiabilidad del elemento analítico, contiene un óxido de nitrógeno orgánico o un compuesto nitroso.
- 10 2. Elemento de análisis, según la reivindicación 1, caracterizado porque el sistema de reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir en la fiabilidad del elemento de análisis experimenta, bajo solicitud, una variación que es detectable ópticamente o electroquímicamente.
- 15 3. Elemento de análisis, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el sistema de reactivo comprende un medio de reducción para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden afectar la fiabilidad del elemento de análisis.
- 20 4. Elemento de análisis, según la reivindicación 3, caracterizado porque el medio de reducción es seleccionado entre el grupo que comprende azúcar, polialcoholes, glicina y proteínas que contienen cisteína.
5. Elemento de análisis, según la reivindicación 4, caracterizado porque el medio de reducción es glicina o glucosa.
- 25 6. Elemento de análisis, según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el óxido de nitrógeno es resazurina.
7. Elemento de análisis, según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el compuesto nitroso es una p-Nitrosoanilina eventualmente sustituida.
- 30 8. Elemento de análisis, según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el sistema reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden afectar a la fiabilidad del elemento de análisis está integrado en el sistema de reactivo para la reacción de detección.
- 35 9. Elemento de análisis, según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el sistema de reactivo para la reacción de detección, contiene reactivos para la determinación de parámetros de coagulación.
10. Procedimiento para el control de elementos de análisis, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el sistema de reactivo, para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir en la fiabilidad del elemento de análisis, es investigado con ayuda de un aparato de medición óptico o electroquímico con respecto a las variaciones que pueden tener significación sobre la solicitud del elemento de análisis.
- 40 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, caracterizado porque el aparato de medición no autoriza elementos de análisis en los que se ha detectado una solicitud, para la medición de un líquido de muestras con ayuda de un sistema de reactivo para la reacción de detección.
- 45 12. Procedimiento, según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque tanto la investigación del sistema de reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir en la fiabilidad del elemento de análisis como también la investigación del sistema de reactivo para la reacción de detección tienen lugar de forma óptica.
- 50 13. Procedimiento, según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque tanto la investigación del sistema de reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir sobre la fiabilidad del elemento de análisis como también la investigación del sistema de reactivo para la reacción de detección tiene lugar electroquímicamente.
- 55 14. Procedimiento, según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque la investigación del sistema de reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir en la fiabilidad del sistema de análisis tiene lugar de forma óptica, y la investigación del sistema de reactivo para la reacción de detección tienen lugar de forma electroquímica.
- 60 15. Procedimiento, según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque la investigación del sistema de reactivo para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir en la fiabilidad del sistema de análisis tiene lugar de forma electroquímica, y la investigación del sistema de reactivo para la reacción de detección tiene lugar de forma óptica.
- 65 16. Utilización de un sistema de reactivo que contiene un óxido de nitrógeno orgánico, o bien un compuesto nitroso para la indicación directa o indirecta de condiciones ambientales que pueden influir en la fiabilidad de un elemento de análisis.

Fig. 1

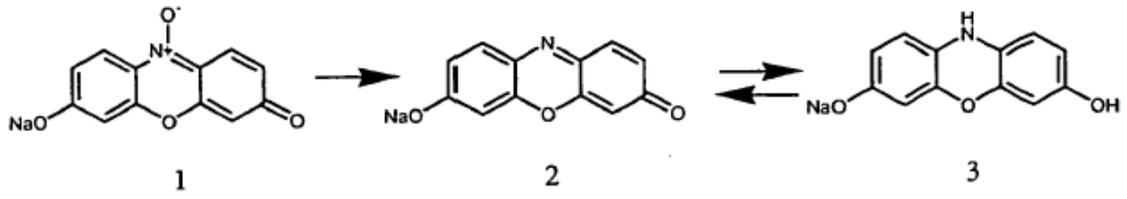


Fig. 2

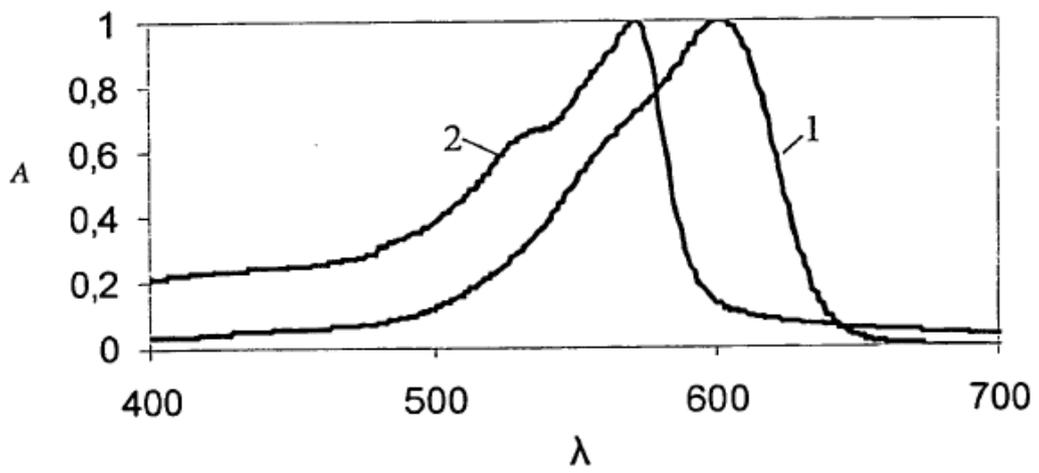


Fig. 3

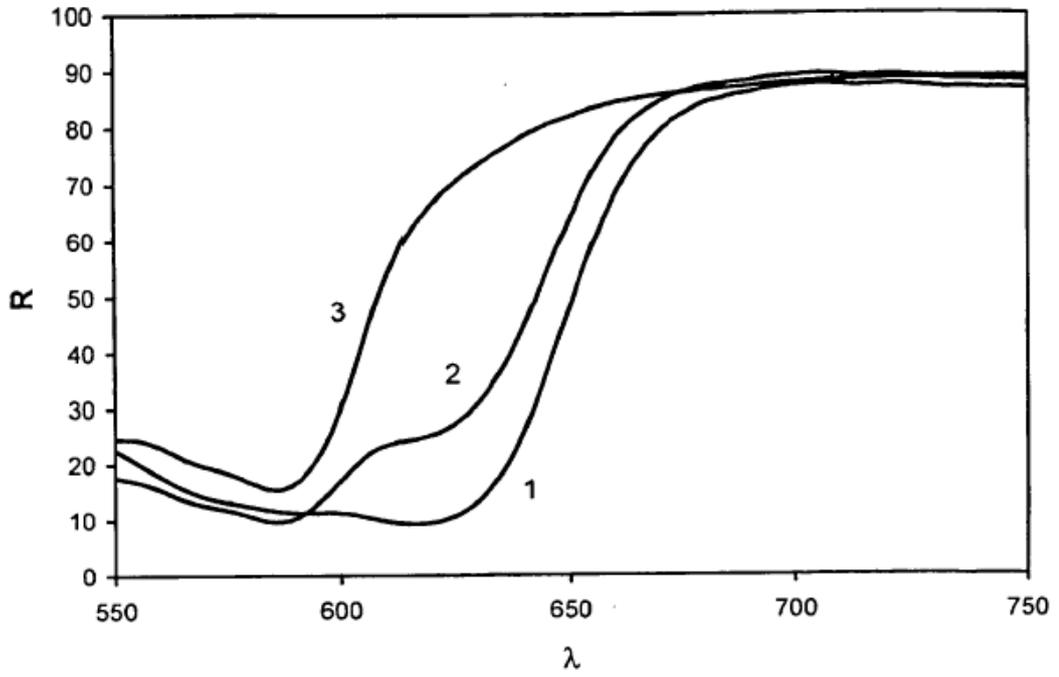


Fig. 4

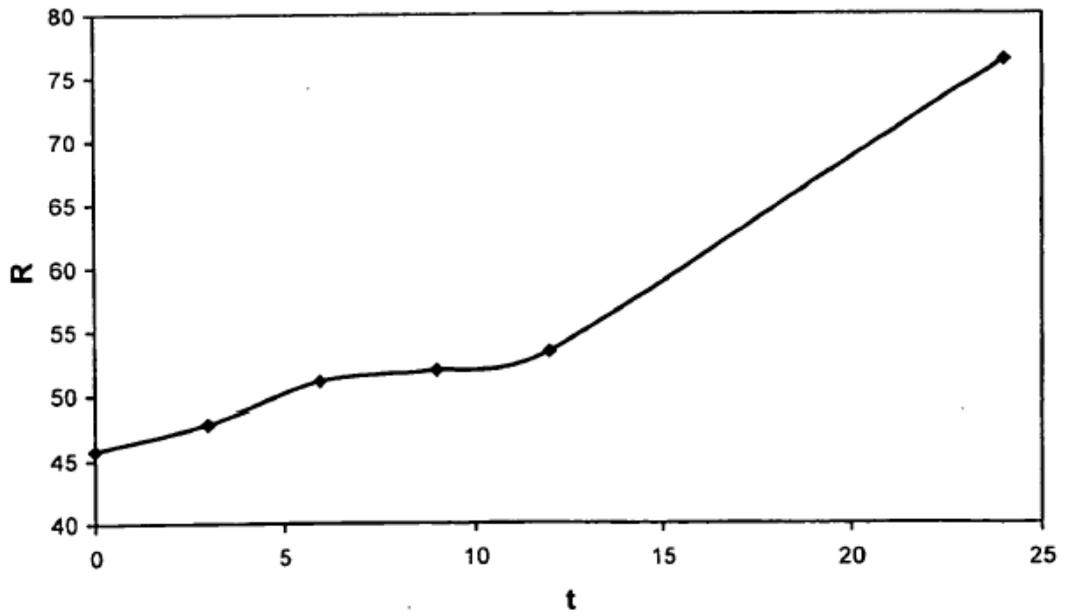


Fig. 5

