

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 352**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/62 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

A61B 10/00 (2006.01)

A61F 13/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2002 E 02751589 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1419268**

54 Título: **Artículos para la monitorización de secreciones**

30 Prioridad:

19.07.2001 US 907926

18.03.2002 US 365684 P

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

27.03.2013

73 Titular/es:

**COMMON SENSE LTD. (100.0%)
7 HAESHEL STREET, ZONE 2
CEASARE INDUSTRIAL PARK 38900, IL**

72 Inventor/es:

**KRITZMAN, AMNON;
NACHSHON, NITSA, G. y
BEHAR, YAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 399 352 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

Artículos para la monitorización de secreciones.

5 CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico médico y más específicamente, a una identificación mejorada de fluidos biológicos secretados usando un artículo para la monitorización de las secreciones para identificar fluidos amnióticos o secreciones asociadas con infecciones bacterianas, fúngicas o de levaduras incluso con la presencia de fluidos biológicos interferentes. También se divulgan métodos mejorados de unir un indicador a un sustrato y métodos para preparar y usar un artículo para la monitorización de secreciones para identificar una secreción.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Muchos fluidos corporales pueden ser fácilmente identificados por las propiedades químicas como el pH. Un método excepcionalmente útil para determinar el pH de una muestra líquida es a través de un indicador, un compuesto químico o una combinación de compuestos, que tiene un color dependiente del pH. Ejemplos bien conocidos incluyen el té y el vino. Los detalles generales y descripciones de algunos indicadores se pueden encontrar, por ejemplo, en "indicators", E. Bishop, Pergamon Press, 1972, capítulo 3.

A menudo un indicador está fijado a un sustrato sólido como el papel. Una muestra de un líquido del que se necesita determinar el pH se aplica al sustrato. El pH del líquido se determina determinando el color del indicador presente en el sustrato. Dependiendo de cómo esté fijado el indicador al sustrato, la aplicación de la muestra de líquido puede causar que el indicador se filtre fuera del sustrato. El indicador filtrado no es deseable y por lo tanto el indicador es a menudo inmovilizado sustancialmente en el sustrato.

Muchas condiciones químicas se pueden diagnosticar identificando las propiedades químicas y físicas de una secreción vaginal, como, identificando el pH de la secreción. Se conocen en la técnica un número de dispositivos que implican salva-slips con indicadores de pH, por ejemplo en las Patentes US 5.217.44, 5.823.953 y 6.106.461. Estos dispositivos se pueden llevar por el usuario y siempre que haya una secreción esta es inmediatamente detectada por el indicador de pH. La solicitud de patente internacional WO01/13097, que divulga un indicador unido a un sustrato de membrana sintético hidrofílico y un dispositivo, como un salva-slip con un indicador unido al sustrato de membrana sintético hidrofílico.

Un problema general, sin embargo, con estos indicadores de pH es que a menudo proporcionan "falsos positivos" debido a cambios en el pH durante el secado, fluidos biológicos interferentes y los ciclos respectivos de secado/humectación. A menudo la secreción vaginal no puede ser identificada con certeza absoluta por un indicador debido a la existencia de una pluralidad de fluidos recogidos con un pH similar. Las lecturas de "falsos positivos" pueden ser estresantes y consumidoras de tiempo para el usuario. Se necesita un dispositivo que minimice estas lecturas de "falsos positivo".

Las lecturas de falsos positivos pueden ser causadas, por ejemplo, por fluidos biológicos interferentes, como la orina. Las secreciones vaginales de un paciente con vaginosis tienen un pH de entre 4,7 y 6,5. Como la orina de un paciente sano tiene un pH de entre 5,0 y 8,0, es muy difícil diagnosticar una secreción que surge de la vaginosis con un grado alto de confianza ajustando sólo una prueba de indicador basada en el pH. Una solución conocida en la técnica es muestrear fluido del interior de la vagina, donde no se encuentra orina habitualmente. Esto es incómodo y requiere la visita un profesional de la salud.

Un segundo ejemplo es la identificación de fluido amniótico que se pierde desde la vagina de una mujer embarazada. Durante el embarazo la integridad del saco amniótico puede verse comprometida y una pequeña cantidad de fluido amniótico puede perderse a través de la cervix y desde la vagina. Si se diagnostica como tal, pueden ser prescritas medidas como el reposo del paciente o el sellado del saco amniótico usando pegamento biológico. Si no se diagnostica el saco amniótico puede romperse posteriormente causando el aborto del embarazo, o requerir la hospitalización de la mujer y el bebé- Si el bebé nace prematuramente, puede dar como resultado la muerte o minusvalías severas. A menudo es necesario la hospitalización extendida del bebé en una incubadora.

Debido a las consecuencias severas de la pérdida de fluido amniótico, las mujeres embarazadas experimentan estrés severo y a menudo van a profesionales del cuidado de la salud en el momento de la secreción de cualquier líquido desde la vecindad de la vagina. El profesional del cuidado de la salud observa la presencia de fluido amniótico comprobando el pH de las secreciones vaginales, el fluido amniótico tiene un pH de entre 6,0 y 8,0. Como las mujeres embarazadas a menudo tienen incontinencia urinaria y como la orina típicamente tiene un pH de entre 5,0 y 8,0 si sólo se comprueba el pH, puede tener lugar un resultado de falso positivo, siendo la orina identificada como fluido amniótico. En consecuencia, es necesario que dicha secreción vaginal sea examinada usando un microscopio para la presencia de un patrón en forma de hehecho indicativo de fluido amniótico.

Como el tiempo entre la secreción del fluido y la llegada al profesional del cuidado de la salud puede ser largo, a menudo no hay evidencia de fluido amniótico en el momento del examen. Puede asumirse erróneamente que la secreción es orina, a menudo con consecuencias trágicas. Por otro lado, el profesional del cuidado de la salud puede decidir errar por el lado de la precaución, diagnosticando erróneamente la secreción de orina como fluido amniótico llevando a una hospitalización innecesaria y a estrés para el paciente.

La Patente U.S. Nº 6.126.597 (la patente '597) y la Patente U.S. Nº 6.149.590 (la patente 590), una continuación en parte de la patente '597, están dirigidas a divulgar un dispositivo en la forma de una compresa sanitaria con un indicador de pH configurado para identificar la presencia de fluido amniótico en una secreción vaginal. Las patentes '597 y '5900 están sujetas al problema de dar resultados positivos falsos. El dispositivo de la '590 se encarga de este problema incluyendo adicionalmente en el dispositivo una lámina visualizable en microscopio configurada para recoger una parte de una secreción vaginal. Si el indicador muestra el pH que se corresponde con el del fluido amniótico, el usuario presenta se presenta a un profesional del cuidado de la salud con la lámina. El profesional del cuidado de la salud examina la lámina con la ayuda de un microscopio para los patrones con forma de helecho típicos indicativos de la presencia de fluido amniótico.

Hay un par de desventajas asociadas con este dispositivo. Primero, requiere que el paciente visite al profesional del cuidado de la salud para distinguir entre positivos y falsos positivos y segundo, una cantidad significativa de tiempo se pierde en tener que ver la lámina por un profesional para determinar si se está perdiendo realmente fluido amniótico.

La Patente U.S. nº 5.897.834 divulga un dispositivo útil en un entorno clínico para la diferenciación entre secreciones urinarias y vaginales asociadas con vaginosis o fluido de orina o amniótico. El dispositivo incluye el uso de indicadores con un grupo cargado negativamente inmovilizado a un sustrato de polímero sólido que contiene grupos de amonio cuaternarios. Además el dispositivo incluye un reactivo liberador de amina gaseoso y un indicador de amina. Se divulga que el uso del sustrato de polímero que contiene grupos de amonio cuaternarios tiene una ventaja de agudizar la transición de color dependiente del pH. Sin embargo, se ha descubierto que estos sustratos de polímero son menos útiles en entornos no clínicos: el pH indicado de secreciones vaginales secas es lo suficientemente bajo para ser diagnosticada mal indicando vaginosis. Por lo tanto aunque el dispositivo divulgado en la Patente US 5.897.834 es útil en un entorno clínico donde el profesional del cuidado de la salud aplica la secreción vaginal al dispositivo y observa el cambio de color, si se integra en un dispositivo utilizable por el paciente, como un salva-slip, el dispositivo da abundantes resultados de falsos positivos.

Hay una necesidad para un sistema indicador que pueda diferenciar entre un fluido biológico específico de interés y un fluido biológico interferente como la orina. Además hay una necesidad para un dispositivo que pueda distinguir entre secreciones vaginales normales y las asociadas con pérdida de fluido amniótico o vaginosis. Además, también se necesita un sistema en el que los resultados de falsos positivos se minimicen a la vez que se reduce la cantidad de tiempo requerida para conseguir resultados fiables. Tal sistema es utilizable idealmente por el paciente para llevar una mayor tranquilidad y minimizar las visitas innecesarias al hospital. Las características de dicho sistema indicador no deben cambiar debido al uso prolongado o como resultado de un ciclo de humectación secado y debe distinguir entre fluidos biológicos interferentes y minimizar las lecturas de falsos positivos. La presente invención ahora supera estos problemas y satisface estas necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención, como se define en la reivindicación 1, supera las desventajas del estado de la técnica por el uso de un sistema indicador integrado en varios productos auto utilizables. De forma general, la invención comprende un artículo que incluye un material absorbente para absorber un fluido biológico secretado por una persona y un sistema indicador que tiene al menos un miembro determinante del pH y opcionalmente, un reactivo para reaccionar con el fluido biológico para alterar su pH de tal forma que la secreción se pueda distinguir. El sistema indicador está asociado con un material absorbente de tal forma que los fluidos biológicos entran en contacto con el sistema indicador de tal forma que se puede obtener una información fiable del pH de ese fluido.

El artículo se puede presentar al usuario de muchas maneras. Es preferible, sin embargo, que el artículo esté en la forma de un hisopo, gasa, salva-slip, compresa sanitaria, pañal o estructura absorbente interlabial. Además, cualquier usuario, masculino o femenino, joven o viejo, puede usar el artículo. Los ejemplos particulares de la invención como se presentan en la presente no se pretende que limiten al ámbito de la invención, sino que simplemente ilustren y representen las numerosas formas potenciales en las que se puede usar la invención.

De forma general, el miembro determinante del pH puede ser cualquier cosa que indique el pH de un fluido. Preferiblemente el miembro determinante del pH registra o indica un cambio de pH después de entrar en contacto con el fluido biológico y es resistente al cambio debido al uso prolongado o los ciclos de humectación y secado. Ventajosamente, el reactivo usado en el sistema indicador es uno que reacciona con el fluido amniótico, una secreción asociada con una infección bacteriana, fúngica o de levadura, o la orina para cambiar su pH.

Preferiblemente, el artículo tiene medios de montaje para posicionar el cuerpo absorbente para recibir los fluidos secretados durante la actividad normal del usuario, dichos medios de montaje siendo, por ejemplo, una tira adhesiva u otro miembro de unión.

5 Una realización preferida es una en la que el artículo para la monitorización de la secreción tiene un sustrato con un primer indicador de pH en un primer área, un segundo indicador de pH en una segunda área, y un reactivo unido al sustrato en la segunda área, o alternativamente una tercera área. Los indicadores son seleccionados de tal forma que las transiciones de color sustanciales tienen lugar a diferentes valores de pH. Un líquido que contacta con el sustrato interactúa con los indicadores y el reactivo. Si el líquido tiene el pH de un fluido que ha de ser identificado, al menos parte del primer área sufre un cambio de color sustancial. El líquido puede, sin embargo, ser un fluido interferente con un pH que cambia el color del primer indicador. Por lo tanto, en una realización, el reactivo es seleccionado para reaccionar con el fluido interferente (por ejemplo), cambiando el pH del líquido y consecuentemente cambiando sustancialmente el color de al menos parte de la segunda área. La presencia del segundo indicador de pH actúa como garantía contra resultados de falsos positivos permitiendo una diferenciación colorimétrica de dos fluidos con un pH similar.

De acuerdo con otra característica de la presente invención, el primer indicador de pH cambia de color a un pH sustancialmente más bajo que el segundo indicador de pH. Habitualmente, el primer área es distinta de la segunda área y la forma del área puede variar y ser cualquier forma geométrica, número, letra, icono, palabra o una combinación de los mismos.

Otra realización no limitativa de la invención es un artículo para la monitorización de secreciones en donde el sistema indicador tiene al menos un miembro determinante del pH que tiene una composición química que reacciona con fluidos biológicos que contienen cationes de aminos protonadas de forma diferente que los fluidos corporales que no contienen cationes de aminos protonadas. Típicamente, el sistema indicador está asociado con el material absorbente de tal forma que los fluidos biológicos entran en contacto con el sistema indicador mientras se lleva.

Ventajosamente, el artículo para la monitorización de secreciones se puede usar para la identificación de orina infectada. En esta realización el artículo comprende un cuerpo que incluye un material absorbente para absorber orina de una persona y un sistema indicador que tiene al menos un indicador que tiene una composición química que reacciona con la orina normal de forma diferente que con la orina infectada. El indicador en esta realización cambia de color cuando entra en contacto con la orina, pero si la orina está infectada el cambio de color del indicador es no reversible.

35 Una realización adicional es una en la que el artículo para la monitorización de las secreciones está diseñado específicamente para la identificación de secreciones vaginales infectadas por bacterias. En esta realización el artículo comprende un cuerpo que incluye un material absorbente para absorber secreciones vaginales y un sistema indicador que tiene al menos un indicador que tiene una composición química que reacciona con las secreciones vaginales de candidiasis o normales de forma diferente que las secreciones vaginales infectadas por bacterias, en donde el indicador cambia de color cuando entra en contacto con secreciones vaginales infectadas por bacterias que tienen un nivel de pH por encima de 5 y una concentración de aminos más alta que las secreciones vaginales de candidiasis o normales.

Otra realización preferida de la invención comprende un artículo que incluye un miembro determinante del pH con una composición que reacciona de forma diferente a la orina que a otros fluidos biológicos, como el fluido amniótico. La composición del miembro determinante del pH es capaz de reaccionar de forma diferente debido a ciertos químicos que están presentes en cantidades sustanciales sólo en la orina, y no en otros fluidos biológicos a ser identificados. El sustrato que contiene el miembro determinante del pH se retiene en la vecindad de un área vaginal de la persona durante un periodo de tiempo extendido para absorber los fluidos. Después de lo que el artículo es retirado y observado para determinar el estado de salud de la persona de la que se recogió el fluido biológico.

También se incluye un método para proporcionar una indicación del estado de salud de un apersona proporcionando un sustrato al que está unido un primer indicador de pH en una primera área, un segundo indicador de pH en una segunda área, y un reactivo unido al sustrato en la segunda área, donde las transiciones de color de cada uno de los dos indicadores tienen lugar a un pH sustancialmente distinto. Un líquido, como un fluido biológico se aplica al sustrato y se inspeccionan la primera y la segunda área para un cambio en el color indicativo del estado de salud de la persona. De acuerdo con una característica de la presente invención, el sustrato se retiene en la vecindad de un área vaginal de la persona durante un periodo de tiempo extendido como minutos, horas o incluso más tiempo, para absorber los fluidos secretados.

De acuerdo con una característica adicional de la presente invención, el primer indicador de pH está configurado para cambiar sustancialmente de color en el momento del contacto con fluido amniótico y el segundo indicador de pH está configurado para cambiar sustancialmente de color en el momento de contacto con orina que reacciona con el reactivo. Un reactivo preferido es la ureasa. Alternativamente, el primer indicador de pH está configurado para cambiar sustancialmente de color en el momento del contacto con las secreciones vaginales asociadas con la

vaginosis y el segundo indicador de pH está configurado para cambiar de color sustancialmente en el momento del contacto con la orina que reacciona con el reactivo.

5 También se divulga un método de unir un indicador a un sustrato. El sustrato puede estar hecho de muchos materiales, por ejemplo, polipropileno, papel o algodón, membranas de poliéster y puede ser de muchas estructuras incluyendo de membrana, tela, malla, gasa, hilo, fibra y hoja. Se prepara una mezcla de un polímero pre-formado (como la celulosa), un plastificante, un agente humectante, un reactivo de equilibrio de iones y un indicador (sólo o con un reactivo como la ureasa). En algunos casos es preferible añadir un solvente a la mezcla. La mezcla se aplica a un sustrato por ejemplo sumergiendo el sustrato en la mezcla o pulverizando o esparciendo la mezcla en el sustrato. Se permite que seque el sustrato con la mezcla aplicada. Cuando está seco, el indicador se une al sustrato con la ayuda de un polímero. Este método es excepcionalmente útil cuando los indicadores tienen un grupo funcional cargado sustancialmente negativamente como un acetato o un sulfonato.

15 También se proporciona un método adicional de hacer un artículo de diagnóstico que comprende los pasos de unir un indicador a un sustrato, especialmente un sustrato neutro, aplicando una solución surfactante al sustrato y dejando que seque, preferiblemente bajo vacío, después una vez que el surfactante está seco, se aplica una solución indicadora o una solución con un reactivo al sustrato y se permite que seque, preferiblemente bajo vacío, en donde el indicador a ser unido al sustrato preferiblemente es un grupo funcional cargado sustancialmente negativamente con un surfactante catiónico; y colocar el indicador en asociación con un cuerpo absorbente.

20 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La invención es descrita en la presente, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos acompañantes.

25 Las **FIGURAS 1A-C** son vistas superiores esquemáticas de una realización del artículo para la monitorización de secreciones de la presente invención con ampliación de los detalles de los indicadores aplicados al sustrato.

30 La **FIGURA 2** es una vista superior esquemática de una realización diferente del artículo para la monitorización de secreciones de la presente invención.

La **FIGURA 3** es una vista en perspectiva esquemática de una realización diferente del artículo para la monitorización de secreciones de la presente invención con una membrana microporosa.

35 Las **FIGURAS 4 A-C** son vistas esquemáticas superiores de una realización del artículo para la monitorización de secreciones con dos indicadores de pH.

40 Las **FIGURAS 5 A-B** son vistas superiores esquemáticas de una realización del artículo para la monitorización de secreciones con un dispositivo indicador de pH que puede distinguir entre orina y otros fluidos corporales, como el fluido amniótico.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

45 Antes de pasar a los detalles de la presente invención, se debería apreciar que la presente invención proporciona un artículo para la monitorización de secreciones y un método para el uso que permite a un usuario inexperto monitorizar los fluidos biológicos secretados con confianza. La presente invención permite la identificación de un fluido biológico específico incluso cuando hay una posibilidad de presencia de un fluido biológico interferente con un pH similar.

50 La presente invención es una mejora sobre el estado de la técnica, proporcionando un artículo para la monitorización de secreciones que es más fiable y conveniente para el usuario.

55 En una realización de la invención, el artículo para la monitorización de las secreciones comprende un cuerpo que incluye un material absorbente para absorber un fluido biológico secretado de una persona y un sistema indicador que comprende al menos un miembro determinante del pH y un reactivo para reaccionar con el fluido biológico para alterar su pH de tal forma que la secreción pueda ser distinguida, en donde el sistema indicador está asociado con el material absorbente de tal forma que los fluidos biológicos entran en contacto con el sistema indicador.

60 En una segunda realización de la invención, el artículo de seguimiento de secreciones comprende un cuerpo que incluye un material absorbente para absorber un fluido biológico secretado de una persona y un sistema indicador que comprende un miembro determinante del pH que consiste de una composición especial que reacciona con el fluido biológico de forma diferente. un ejemplo de dicho miembro determinante del pH tiene una composición especial que reacciona con fluidos que contiene cationes de aminos protonadas, como la orina, de una forma diferente de al que reacciona con otros fluidos biológicos que tienen una proporción baja de cationes de aminos protonadas, como el fluido amniótico.

65

En todavía otra realización de la invención, el artículo de seguimiento de secreciones comprende un cuerpo que incluye un material absorbente para absorber un fluido biológico secretado de una persona y un sistema indicador que comprende un miembro determinante del pH que consiste de una composición especial que reacciona con la orina normal de forma diferente que con la orina infectada o que contiene proteínas. En un ejemplo no limitativo, el indicador reacciona con la orina normal (pH 5-8), que cambia de color de amarillo a verde o turquesa. Durante el proceso de secado el cambio de color del indicador que ha entrado en contacto con la orina normal se desvanece mientras se seca y se vuelve amarillo de nuevo. Por el contrario, cuando el indicador entra en contacto con orina infectada o que contiene proteínas la tira del indicador cambia de color de amarillo a verde o turquesa y no se desvanece cuando se seda. Ventajosamente, esta realización es muy adecuada para todos los tipos de uso, por ejemplo en pediatría, geriatría y ginecología, y puede ser presentada al usuario de muchas formas, preferiblemente como un pañal o salva-slip.

El artículo para la monitorización de secreciones puede ser implementado usando muchos métodos y dispositivos. En una realización preferida, el artículo de la presente invención es implementado de una manera que puede ser fácilmente usada por personal no cualificado, específicamente un usuario. El cuerpo del artículo para la monitorización de secreciones de la presente invención que comprende un material absorbente puede ser suministrado al usuario, por ejemplo, en la forma de una almohadilla, gasa, hisopo, bola de fibra, pero más preferiblemente, como una compresa sanitaria, pañal, salva-slip, y estructura interlabial. Los detalles de fabricación de los mismos son bien conocidos para alguien experto y han sido completamente descritos en el estado de la técnica, por ejemplo Patentes US 5.217.444, 5.897.864 y 6.149.590.

Además, cualquier usuario, masculino o femenino, joven o viejo, puede usar el artículo en una variedad de formas. Los ejemplos particulares de la invención como se presentan en la presente no se pretende que limiten el ámbito de la invención, sino que simplemente ilustren y representen las numerosas formas potenciales en las que la invención se puede usar.

En una realización de la invención, un sistema indicador está compuesto de un miembro determinante del pH y se proporciona un reactivo a ser incluido en el cuerpo del artículo para la monitorización de secreciones. En otra realización, un sistema indicador está compuesto del miembro determinante del pH que reacciona de forma diferente con diferentes fluidos corporales.

El miembro determinante del pH del sistema de indicación puede ser cualquier dispositivo determinante del pH, por ejemplo como un indicador del cambio de color (por ejemplo, papel de tornasol) o una sonda de pH móvil. Es preferible, sin embargo, que el miembro determinante del pH sea un indicador de cambio de color, como un miembro determinante del pH hecho de la mezcla de indicador de pH descrita en la presente más abajo y/o usando el método de unir la mezcla a un sustrato. Como se tratará con más detalle a continuación, más de un miembro determinante del pH puede ser parte del sistema indicador. los miembros indicadores del pH deben ser capaces de determinar rangos de pH sustancialmente diferentes o capaces de reaccionar de forma diferente con fluidos biológicos diferentes para producir un cambio de color diferente.

En una realización el sistema indicador comprende un reactivo. El reactivo se usa para distinguir el pH del fluido biológico que está siendo monitorizado de otros fluidos biológicos que podrían interferir con los resultados y posiblemente dar un resultado de "falso positivo, con estrés y gasto injustificado para el usuario. El reactivo se puede elegir en base al fluido biológico a ser monitorizado y el tipo de fluidos biológicos que podrían interferir con la monitorización preciso de este fluido. El reactivo del sistema indicador de la presente invención es elegido para producir productos de la reacción que sustancialmente cambian el pH de una secreción probada cuando la secreción probada es o el fluido a ser identificado o su fluido interferente, o ambos. Si el reactivo es elegido para reaccionar con ambos fluidos, el cambio de pH resultante de la reacción con el fluido a ser identificado debe ser diferente del cambio de pH resultante de la reacción con el fluido interferente.

En una realización no limitativa preferida de la presente invención, cuando o se debe identificar el fluido amniótico o se debe diagnosticar vaginosis, se elige la ureasa (CAS 9002-13-5) como reactivo. Si hay orina presente, la orina reacciona con la ureasa, liberando amoníaco en la secreción probada elevando su pH bien por encima del pH de las secreciones relacionadas con el fluido amniótico o la vaginosis.

El reactivo puede ser también elegido para reaccionar sólo con el fluido a ser identificado, cambia el pH suficientemente para distinguirlo de cualquier posible fluido interferente. Cuando el reactivo es elegido para reaccionar sólo con el fluido a ser identificado, es preferible que el reactivo reaccione con el fluido amniótico o una secreción asociada con una infección bacteriana, fúngica o de levadura y que el pH cambie lo suficiente para distinguir el fluido de otros posibles fluidos interferentes.

En una realización de la invención, el sistema indicador tiene sólo un indicador de pH y el reactivo es seleccionado para reaccionar con el fluido a ser identificado de tal forma que el pH es sustancialmente cambiado de tal forma que la presencia del fluido pueda ser fácilmente identificada. en esta realización de la invención, el indicador de pH es seleccionado para indicar el pH del fluido a ser identificado después de que ha reaccionado con el reactivo.

En una realización preferida del artículo para la monitorización de secreciones, se incluye un medio para montar el artículo para facilitar la recogida del fluido biológico secretado. Un ejemplo de un medio de montaje que es bien conocido en la técnica es una tira adhesiva asociada con el artículo. En una realización preferida el artículo tiene una o más tiras adhesivas. El usuario retira la cinta de liberación para exponer la tira adhesiva del artículo y coloca el artículo en la parte de la entrepierna de su prenda interior. Esto evita que el artículo se mueva fuera de su posición durante el uso regular. Los tipos de compuestos adhesivos que se pueden usar son bien conocidos en la técnica.

Ejemplos de artículos de seguimiento de secreciones

La presente invención será ejemplificada por realizaciones del artículo de seguimiento de secreciones de la presente invención en la forma de un salva-slip en las Figuras 1-5. el artículo puede ser configurado para identificar fluido amniótico y secreciones asociadas con infección bacteriana, fúngica o de levadura, como secreciones vaginales o orina infectadas. Además, el artículo está diseñado para minimizar las lecturas de falsos positivos asociadas con los fluidos biológicos interferentes.

Una realización preferida de la invención es una en la que el sistema indicador comprende un primer indicador, un segundo indicador y un reactivo. el primer indicador del sistema de la presente invención es elegido para identificar un primer pH. El primer pH se corresponde con el pH del fluido que ha de ser identificado. Además, el primer pH puede ser también el del fluido interferente. Cuando se ha de identificar fluido amniótico, es elegido un primer indicador para indicar que una secreción vaginal probada tiene un pH de fluido amniótico. Debido al pH similar de la orina y el fluido amniótico, dicho primer indicador también cambiará de color cuando se exponga a la orina. Cuando se ha de diagnosticar vaginosis, es elegido un primer indicador para indicar un pH típico de secreciones de vaginosis y consecuentemente también de la orina. En la Figura 1A, se aplica un primer indicador en un primer área 12 en un sustrato 14 integrado en un salva-slip 10. El primer área 12 puede estar dispuesta como patrones, letras, palabras o iconos, como se describe en la Patente US 5.97.834. En las Figuras 1A-C, el primer indicador es amarillo de nitrazina, que es amarillo a un pH por debajo de 7 y violeta azulado a un pH por encima de 7.

El reactivo del sistema indicador de la presente invención es elegido para producir productos de la reacción que cambien sustancialmente el pH de una secreción probada como se ha descrito en detalle anteriormente.

El segundo indicador de pH del sistema de la presente invención es elegido de tal forma que indique el cambio del pH como un resultado de la reacción con el reactivo. Por ejemplo, el segundo indicador en las Figuras 1A-C es púrpura de m-cresol, el púrpura de m-cresol es amarillo a un pH por debajo de 7,5 y es violeta a un pH por encima de 8,0. El segundo indicador y el reactivo se aplican en una segunda área 16 en el sustrato 14, distinta de la primera área 12 en el sustrato 14, Figura 1A.

En la Figura 1B, el fluido amniótico 18 entra en contacto con el salva-slip 10. el fluido amniótico 18 entra en contacto con la primera área 12 y la segunda área 16. Como el pH del fluido amniótico 18 está entre 7,0 y 7,5, el amarillo de nitrazina presente en el primer área 12 se vuelve violeta azulado, deletreando la palabra "AMNIO". Está claro para alguien experto en la técnica que si se aplica una pequeña cantidad de fluido al salva-slip 20, es posible que sólo cambie de color parte de la primera área 12. El púrpura de m-cresol presente en la segunda área 16 permanece amarillo.

Cuando el usuario del salva-slip 20 en la Figura 1B examina el salva-slip 10, lee la palabra "AMNIO" y puede ir a un profesional del cuidado de la salud que puede tomar las acciones correspondientes a un alto grado de certeza de secreción de fluido amniótico.

En la Figura 1C, la orina 22 entra en contacto con el salva-slip 10. La orina 22 entra en contacto con la primera área 12 y la segunda área 16. Como el pH de la orina 22 es 7,2, el amarillo de nitrazina presente en la primera área 12 se vuelve violeta azulado, deletreando la palabra "AMNIO". La orina 20 reacciona con la ureasa presente en la segunda área 16, liberando amoníaco. El amoníaco aumenta el pH del líquido presente en la segunda área 16 a un pH de 9. Como resultado del pH alto, el púrpura de m-cresol presente en la segunda área 16 se vuelve violeta deletreando la palabra "NO".

TABLA 1			
Indicador	Rango de transición de pH acuoso	Cambio de color	CAS
1. Rojo de Cresol	7.2-8.8	Amarillo a púrpura rojizo	1733-12-6
2. Alizarina	5.5-6.8	Amarillo a violeta	72-48-0
3. Púrpura de Bromocresol	5.2-6.8	Amarillo a púrpura	115-40-2
4. Rojo de Clorofenol	5.2-8.8	Amarillo a rojo	4430-20-0
5. Amarillo de Nitrazina	6.0-7.2	Amarillo a azul brillante	5423-07-4
6. Azul de Bromotimol	6.0-7.6	Amarillo a azul	34722-90-2
7. Azul de Bromoxilenol	6.0-7.6	Amarillo a azul	40070-59-5
8. Rojo Neutro	6.8-8.0	Rojo a amarillo	553-24-9
9. Rojo de Fenol	6.8-8.2	Amarillo a rojo	34487-61-1
10. Azul de Timol	8.0-9.2	Amarillo a azul	81012-93-3
11. Azul de Xilenol	8.0-9.6	Amarillo a azul	125-31-5
12. Púrpura de m-Cresol	7.4-9.0	Amarillo a púrpura	2303-01-7

Quando el usuario del salva-slip 24 en la Figura 1C examina el salva-slip 10, lee las palabras "NO AMNIO". El usuario que se puso nervioso con la pérdida inesperada de fluido se calma inmediatamente y es aliviado de la necesidad de una visita estresante a un profesional del cuidado de la salud. Está claro para alguien experto en la técnica que disponer la primera área 12 y la segunda área 16 para deletrear palabras no es necesario, y en realizaciones alternativas de la presente invención la primera área 12 y la segunda área 16 pueden tener cualquier forma. Por ejemplo, en la Figura 2, se representa un salva-slip 26 configurado de acuerdo con la presente invención donde cada uno de la primera área 28 es de una forma sustancialmente circular y cada una de la segunda área 30 es sustancialmente de forma cuadrada.

Quando se usa en un entorno médico, es imperativo que no haya sustancialmente filtración de los componentes del sistema indicador desde el sustrato al que el sistema indicador está unido. La unión de indicadores a un sustrato está dentro de las capacidades de alguien experto en la técnica. Una familia de compuestos químicos que es adecuada para el uso como un primer indicador y un segundo indicador de la realización preferida de la presente invención sin filtrarse son indicadores con grupos funcionales negativos. Los indicadores adecuados incluyen el amarillo de nitrazina, azul de timol, azul de bromotimol, azul de xilenol, azul de bromoxilenol, rojo de fenol, púrpura de m-cresol, rojo de clorofenol, púrpura de bromocresol, alizarina, rojo neutro, y rojo de cresol, ver Tabla 1. un alista de otros indicadores adecuados se puede encontrar, por ejemplo, en la Patente US 5.897.834. Está claro para alguien experto en la técnica que los indicadores específicamente mencionados en la presente son sólo ejemplos y se puede usar cualquier indicador adecuado. Además, puede haber casos donde el primer indicador y/o el segundo indicador estén compuestos de una combinación de indicadores individuales.

Otra realización no limitativa del sistema indicador de la presente invención es un artículo para el seguimiento de secreciones para la identificación de infecciones vaginales como la vaginosis bacteriana (BV). De acuerdo con la presente invención, un sistema indicador está hecho con un primer indicador que indica la presencia de un fluido con un pH de alrededor de 4,7 a 7,0. El primer indicador se puede elegir, por ejemplo, de uno o más del grupo que incluye amarillo de nitrazina, azul de bromotimol y azul de bromoxilenol. Como se puede ver en la Tabla 1, estos tres indicadores muestran típicamente un color azulado cuando se exponen a un fluido con un pH por encima de 7,0. El segundo indicador puede ser elegido, por ejemplo, del grupo que incluye rojo de fenol, azul de timol, azul de xilenol y púrpura de m-cresol. Como se puede ver en la Tabla 1, en el momento de la exposición a un fluido con un pH por encima de 8,0 estos cuatro indicadores se vuelven rojo, azul, violeta y violeta, respectivamente. El reactivo añadido a la segunda realización del artículo para la monitorización de secreciones de la presente invención es, por ejemplo, ureasa.

Como se ha tratado en la presente anteriormente, la orina de un paciente sano tiene un pH de entre 5,0 y 8,0. Un paciente que tiene BV también tiene secreciones con un pH de entre 4,7 y 6,5. Si el líquido examinado en la segunda realización del artículo para la monitorización de secreciones de la presente invención está asociado con BV, el primer indicador cambia de color mientras el segundo indicador permanece amarillo. Si el líquido examinado contiene orina, el primer indicador cambia de color. Además, la ureasa reacciona con la orina, produciendo amoníaco, elevando el pH del fluido, y consecuentemente causando que el segundo indicador cambie de color.

Los siguientes ejemplos exponen realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplo 1: Reducir lecturas erróneas de dispositivos que cambian de color que dan una indicación de pH elevado en la secreción vaginal

5 El siguiente ejemplo divulga la solución para producir un indicador que no necesita tabla de color o escala para leer resultados, que muestra al usuario una indicación estable durante unos pocos días, y que no filtra incluso cuando entra en contacto con líquidos durante cualquier duración de tiempo práctica. Para la versión de seguimiento continua no invasiva, la invención divulga una solución para evitar lecturas de falsos positivos debido a la contaminación de la orina.

10 El dispositivo es una etiqueta adhesiva o un protege-slip que contiene dos tiras indicadoras diferentes, incorporadas entre capas de los tejidos absorbentes de una dirección. Los dos indicadores tienen un punto de transición de color a diferentes valores de pH. Las reacciones de color de los dos indicadores también tienen reversibilidad diferente en la secreción vaginal frente a la orina.

15 La primera tira indicadora cambia de color a azul estable, cuando detecta pH elevado en las secreciones vaginales (tira de pH). La tira de pH contiene el indicador de pH amarillo de Nitrazina, que tiene un pKa de 6,6 en solución acuosa, y con la composición específica innovadora, cambia el color cuando la secreción vaginal tiene un nivel de pH de 5,0 o mayor (la misma composición específica innovadora produce indicadores para varios niveles de pH, usando otros miembros cargados negativamente del grupo fenol ionizable).

20 La segunda tira es una tira de control para detectar orina (tira de orina). La tira de orina contiene ureasa, un enzima que hidroliza la urea a amoníaco, y un indicador de pH púrpura de m-Cresol que tiene un pKa de 8,2 en solución acuosa. Cuando la tira está en contacto con la orina, el amoníaco hidrolizado eleva el pH del medio y el color del púrpura de m-Cresol cambia de amarillo a gris/verde oscuro.

25 En un caso donde la secreción vaginal con pH elevado (5,0 - 7,0) llegará a las tiras sólo la tira de pH cambiará de color y el cambio permanecerá estable durante unos pocos días.

Método de Preparación

30 1) tira de pH:

Paso 1: A 10 ml de Acetona añadir 150 mg de Acetato de celulosa, 107 µl de Dibutilftalato, 23 µl de Aliquat, 150 µl de 2-Etoxi etanol y 2,4 mg de amarillo de nitrazina disueltos en 150 µl de DDW.

35 **Paso 2:** Agitar la mezcla durante unos pocos minutos para completar la disolución.

Paso 3: Cubrir una tela de cribado de monofilamento de poliéster con la solución de polímero (cubrir otros materiales insensibles a la acetona producirá varios dispositivos para varios usando instrucciones, con las mismas características).

40 2) Tira de orina:

Primera capa-paso 1: A un DDW de 4,15 mL añadir 45 mg de PVP, 0325 mL de solución de ureasa/glicerol.

Primera capa-paso 2: Cubrir una tela de cribado de monofilamento de poliéster con la solución de polímero.

Primera capa-paso 3: Las tiras recubiertas se secan durante la noche a temperatura ambiente.

45 **Segunda capa-paso 1:** A 10 mL de THF añadir 150 mg de acetato de Celulosa, 107 µl de Dibutilftalato, 23 µl de Aliquat, 150 µl de 2-Etoxi etanol y 1,2 mg de púrpura de m-Cresol disueltos en 120 µl de 1-Propanol.

Segunda capa-paso 2: Agitar la mezcla durante unos pocos minutos para completar la disolución.

Segunda capa-paso 3: Cubrir la tira con la segunda solución de polímero.

50 **Segunda capa-paso 4:** Después del secado durante la noche lavar la tira en una solución salina.

El dispositivo puede estar en la forma de un hisopo con una punta producida de la misma manera que se ha mencionado anteriormente, bajo el encabezamiento: tira de pH. La punta puede ser preparada usando una tira corta, enrollada en el bastón del hisopo, o cubriendo la punta de un hisopo integrado (paso de implementación 4), donde la punta consiste de cualquier tela de cribado.

55 **EJEMPLO 2: Un dispositivo capaz de distinguir con precisión entre una pérdida de fluido amniótico o una secreción descargada vaginal de pH elevado y humedad causada por incontinencia urinaria**

Debido a las severas consecuencias de la pérdida de fluido amniótico, las mujeres embarazadas sufren un fuerte estrés y tienden a buscar un proveedor de atención médica en el momento de cualquier sensación de humedad en el área de la vagina. Las maneras comunes para comprobaciones de presencia de fluido amniótico son examinando el pH de secreciones vaginales con indicadores de pH como indicadores de Nitrazina, ejecutar la prueba de Fern o identificando visualmente la fuente de la pérdida.

65 El fluido amniótico tiene un nivel de pH que varía entre 6-8 y puede ser identificado por un color púrpura-azul de un indicador de Nitrazina. Como la orina, tiene un nivel de pH que varía entre 5,0 - 8,0, medir los niveles de pH como un

único criterio puede llevar a decisiones erróneas. Como las otras dos maneras sólo se pueden realizar en clínicas y hospitales, y por personal cualificado, no hay una solución práctica para la monitorización en casa. En alguna situación, después de las pruebas de amniocentesis y otras ocasiones como embarazos de alto riesgo, existe la posibilidad de pequeñas pérdidas amnióticas que pueden ser detectadas sólo por seguimiento continuo.

5 Las soluciones actuales y las invenciones anteriores fallan para servir como un dispositivo de seguimiento continuo de uso doméstico, ya que filtran fluidos, el cambio de color es inestable, y la superposición entre el nivel de pH del fluido amniótico y el nivel de pH de la orina lleva a confusión a los usuarios en cómo un 30% de los casos.

10 La superposición de los niveles de pH, entre los fluidos amnióticos y la orina es también una gran desventaja para los médicos que tratan pacientes con sensaciones de humedad. El proporcionar a las mujeres embarazadas con un dispositivo de seguimiento continuo de uso doméstico, que distingue pérdidas de fluido amniótico de incontinencia urinaria son falsas alarmas, permitiendo la lectura de los resultados en un calendario y discreción personales, y detecta cualquier pérdida amniótica pequeña instantáneamente, puede por un lado ayudar a llegar al usuario al hospital a tiempo cuando se necesita, y por otro lado evitar hospitalización innecesaria y estrés para el paciente concomitante.

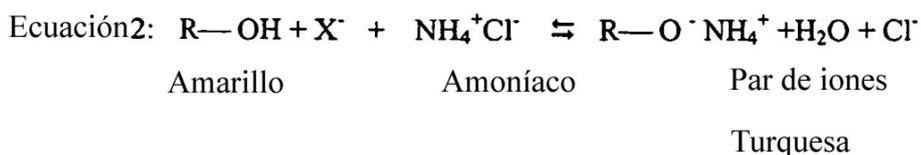
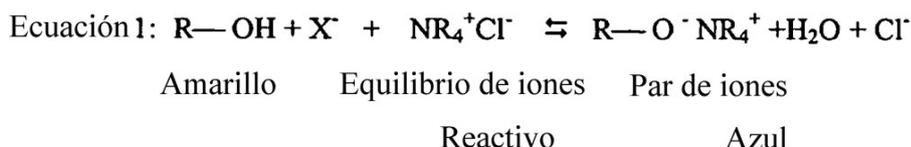
15 El proporcionar a los médicos con un artículo de detección instantánea clínica fiable, que distingue pérdidas de fluido amniótico de incontinencia urinaria sin falsas alarmas, puede servirles mucho mejor que las soluciones disponibles en la actualidad.

El artículo puede ser una etiqueta adhesiva o un protege-slip con una tira indicadora incorporada. la tira contiene el indicador de pH de amarillo de Nitrazina que tiene un pKa de 6,6 en solución acuosa.

25 La reacción del indicador con el fluido amniótico (pH 6-8) cambia el color de amarillo a azul oscuro estable. La reacción del indicador con la orina (pH 5-8) cambia el color a verde pálido o turquesa pálido. La orina con un pH más bajo de 5 - 5,5 no cambia el color del indicador.

30 La diferencia entre la reacción de color del indicador con el fluido amniótico y con la orina consiste de dos parámetros: la composición química de los fluidos y la estructura química del polímero del indicador.

Las siguientes dos ecuaciones demuestran las diferentes reacciones



35 CLAVE:

X- = base
 NR₄⁺ = reactivo de equilibrio de iones
 R- O⁻ NR₄⁺ = -fenolato -reactivo de equilibrio de iones

40 La proporción de reactivo de equilibrio de iones frente al indicador en la matriz de polímero controla el punto de transición del color y la estabilidad del color durante el secado. En el proceso de secado el fenolato del par de iones (el sitio activo del indicador) - reactivo de equilibrio de iones es estable, lo que causa un rendimiento estable del color (ecuación 1 - la concentración relativa del componente no cambia). En un caso diferente donde la concentración del reactivo de equilibrio de iones en el polímero es más alta, el color del indicador se vuelve oscuro mientras se seca. El oscurecimiento del color durante el secado se seca es debido a la desprotonación de continuidad del fenol del indicador por el exceso básico del reactivo de equilibrio de iones (ecuación 1 - durante el secado la concentración de la base se vuelve alta y el equilibrio gira a la derecha). La proporción molar óptima de reactivo de equilibrio de iones con el indicador es 10:1.

50 Los iones de amonio en la solución reaccionan como el reactivo de equilibrio de iones y compiten con el sitio activo de fenolato. Durante el secado el del par de iones fenolato - Amonio hidroliza espontáneamente para dar un fenol amarillo protonado (ecuación 2) mientras el par fenolato -reactivo de equilibrio de iones es estable (ecuación 1).

En un caso donde el medio contiene iones de amonio el color cambia regido por la concentración relativa del reactivo de equilibrio de iones en el polímero y el ión de amonio en el medio.

5 Por ejemplo. en 100 mM de solución reguladora que contiene 25 mM iones de amonio la concentración de amonio es en dos órdenes de magnitud más alta que el reactivo de equilibrio de iones en el polímero. Estas diferencias rigen el color turquesa en la solución y el color pálido en el secado.

10 La orina contiene iones de amonio en una concentración de 30 - 50 mM; el fluido amniótico no contiene ninguna cantidad sustancial de iones de amonio, no causando de este modo ninguna influencia pálida como lo hace la orina

Método de Preparación

15 **Paso 1:** A 10 ml de Acetona añadir 150 mg de Acetato de celulosa, 107 µl de Dibutilftalato, 23 µl de Aliquat, 150 µl de 2-Etoxi etanol y 2,4 mg de amarillo de nitrazina disueltos en 150 µl de DDW.

Paso 2: Agitar la mezcla durante unos pocos minutos para completar la disolución.

Paso 3: Cubrir una tela de cribado de monofilamento de poliéster con la solución de polímero para dar el producto deseado.

20 El dispositivo puede ser un hisopo con una punta producida de la misma manera que se ha mencionado anteriormente, bajo el encabezamiento: tira de pH. La punta se puede preparar usando una tira corta, enrollada en el bastón del hisopo, o cubriendo la punta de un hisopo integrado (implementando el paso 3) donde la punta consiste de cualquier tela de cribado.

25 **EJEMPLO 3:** Un dispositivo capaz de distinguir con precisión entre la orina normal y la orina infectada

AL reaparición de infecciones del tracto urinario en ciertos pacientes presenta la necesidad de diagnosticar rápida y fácilmente si el paciente tiene otra infección del tracto urinario. Actualmente, para determinar si un paciente tiene una infección del tracto urinario deben concertar una cita para visitar a un doctor. Además, si el paciente es susceptible a la reaparición de infecciones del tracto urinario deben hacer visitas periódicas a la consulta del doctor para asegurarse de que la infección no ha reaparecido. Teniendo un dispositivo que permitiría al usuario determinar si tienen de nuevo infección en el tracto urinario minimizaría el estrés y el tiempo consumido en visitas a la consulta del doctor y resultaría en un diagnóstico más rápido de la infección, resultando en una reducción del dolor sufrido por el paciente y un tratamiento más oportuno de la infección.

35 El artículo en este ejemplo es un pañal o protege-slip con un indicador que puede distinguir entre orina normal y orina infectada. El usuario lleva el artículo de tal forma que la orina puede entrar en contacto con el artículo. la reacción del indicador con la orina (pH 5-8) cambia el color de amarillo a verde o turquesa. El proceso de secado de la tira del indicador a temperatura ambiente es corto (5 minutos). Cuando la orina normal entra en contacto con la tira indicadora el color cambia a pálido durante el secado. El cambio de color es completamente reversible y la tira se vuelve amarilla de nuevo. por otro lado cuando la orina infectada entra en contacto con la tira indicadora el color cambia a verde o turquesa y permanece constante durante el secado.

45 la reversibilidad de los cambios de color depende de dos factores diferentes del ambiente:

1. Ambiente químico:

- a. El nivel de pH del fluido - un nivel de pH más alto que el pKa da un cambio de color estable..
- 50 b. Capacidad reguladora de la solución - en solución reguladora débil el indicador juega el papel de ácido débil y la reacción es reversible, mientras que en solución reguladora fuerte el cambio de color es estable.
- c. Contenido de sales de amonio en la solución - explicado extensivamente en el EJEMPLO 2.

2. Ambiente biológico:

- 55 a. La presencia de proteínas en la orina da un cambio de color estable y la reacción no es reversible.

La orina infectada proporciona un cambio de color estable al indicador, este cambio de color no es reversible. Además, la presencia de bacterias en el fluido de la secreción vaginal también da un cambio de color estable de tal forma que el cambio de color no es reversible.

60 **EJEMPLO 4:** Un dispositivo capaz de distinguir entre secreciones vaginales normales o de candidiasis y secreciones vaginales infectadas con bacterias

65 En esta realización, los solicitantes han sido capaces de proporcionar información referente a dos de los criterios Amsel con un único indicador.

El artículo en este ejemplo es típicamente un protector de slip con un indicador que puede distinguir entre secreciones vaginales normales o de candidiasis y secreciones vaginales infectadas con bacterias. El usuario lleva el artículo de tal forma que la orina puede entrar en contacto con el artículo. el indicador está diseñado para cambiar de color cuando la secreción tiene un pH por encima de 5 y altas concentraciones de aminas. Ventajosamente, sólo es necesario un indicador para distinguir detectar una secreción infectada con bacterias, siendo capaz de determinar dos de los criterios de Amsel, pH y concentración de aminas. otros indicadores pueden estar presentes en el artículo, pero no son necesarios para determinar con propiedad si el usuario tiene vaginosis.

El usuario lleva el artículo y si el usuario tiene vaginosis bacteriana, la secreción vaginal infectada con bacterias causará que el indicador cambie de color debido a la alta concentración de aminas y el pH por encima de 5. Mientras que, una secreción vaginal normal o de candidiasis no causará que el indicador cambie de color ya que no tienen un pH por encima de 5 ni una alta concentración de aminas. En este contexto una alta concentración de aminas se refiere a una concentración por encima de alrededor de 0,4 mM a 0,5 mM.

15 **Métodos mejorados para unir indicadores a un sustrato**

En el estado de la técnica están bien descritos detalles y variaciones concernientes al método de fabricación de un artículo para la monitorización de secreciones para implementar el sistema indicador de la presente invención o aplicar el método de la presente invención.

Como se describe en la presente anteriormente, la patente US 5.897.834 describe un polímero pre-formado sólido con el que se enlazan covalentemente grupos de amonio cuaternarios. Los indicadores cargados negativamente no están enlazados covalentemente con el polímero. Los enlaces no covalentes son los suficientemente fuertes para que los indicadores unidos no se filtren en una solución acuosa. Además, los indicadores enlazados con el polímero tienen una transición de color de pH agudizada, permitiendo una determinación precisa del pH del fluido aplicado. El polímero puede ser aplicado a varios sustratos. Sin embargo, los indicadores enlazados con estos polímeros son menos útiles en entornos no clínicos ya que el pH indicado de las secreciones vaginales después del secado es más bajo que el de las secreciones vaginales recientes, llevando a resultados de falsos positivos.

Se divulga un método adecuado para unir indicadores a un sustrato de tal forma que los indicadores no se filtren fuera en un fluido acuoso. Los indicadores especialmente adecuados son aquellos con un grupo cargado negativamente, como los enumerados en la Tabla I o, por ejemplo, en la Patente US 5.897.834. El polímero divulgado está excepcionalmente adecuado para unir el sistema indicador de la presente invención con un sustrato. Además, los experimentos muestran que al contrario que otros métodos y polímeros conocidos en la técnica, los cambios en el color del indicador unido de acuerdo con los métodos divulgados son rápidos. El color se mantiene durante un largo periodo de tiempo e incluso cuando el líquido aplicado se seca. Los ciclos repetidos de secado y humectación tampoco cambian el color. por lo tanto, en términos prácticos, hay tiempo para un usuario para ir a un profesional del cuidado de la salud sin que cambie el color del indicador.

40 **Aplicación del indicador a un sustrato**

En un primer método de unir un indicador a un sustrato, un indicador se mezcla con un polímero preformado en una solución adecuada y después se aplica al sustrato.

Con más detalle, se prepara una solución de polímero que contiene polímero pre-formado seco, plastificante, un agente humectante, un reactivo de equilibrio de iones, un solvente y un indicador. Cuando se pone en práctica el método, también se añade un reactivo como se describe.

El polímero preformado puede ser seleccionado de varios polímeros preformados, aunque se prefieren los polímeros de celulosa como la nitrocelulosa, el acetato de celulosa o la etilcelulosa. El polímero preformado compone de un 20% al 50% del peso de la solución. Se prefiere que el polímero componga de un 25% a un 45% de la solución, es más preferido que el polímero componga de un 30% a un 43% de la solución, y lo más preferido es que el polímero componga de un 36% a un 39% por peso de la solución. Como está claro para alguien experto en la técnica, también es posible usar una combinación de polímeros preformados adecuados cuando se hace una solución de polímero.

Aunque se puede usar cualquier plastificante adecuada, se prefieren el bis-(2-butoxiethyl) adipato (BBPA, CAS 141-18-4), bis-(2-etilhexil) sebacato (DOS, CAS 122-62-3), dietil ftalato (DEP, CAS 84-66-2) o el dibutil ftalato (DBP, CAS 84-74-2). El plastificante compone de un 15% a un 40% del peso de la solución se prefiere que el plastificante componga de un 20% a un 35% de la solución, es más preferido que el plastificante componga de un 25% a un 31% de la solución, y lo más preferido es que el plastificante componga de un 27% a un 29% por peso de la solución. Como está claro para alguien experto en la materia, es también posible usar una combinación de plastificantes adecuados cuando se hace una solución de polímero.

Aunque se puede usar cualquier agente humectante, se prefieren el trietilenglicol, etilenglicol, sorbitol o 2-etoxi etanol. El agente humectante compone de un 15% a un 45% del peso de la solución. Se prefiere que el agente

humectante componga de un 21% a un 40% de la solución, es más preferido que el agente humectante componga de un 26% a un 34% de la solución y lo más preferido es que el agente humectante componga de un 29% a un 31% por peso de la solución. Como está claro para alguien experto en la técnica, es también posible usar una combinación de agentes humectantes adecuados cuando se hace una solución de polímero.

5 Aunque se puede usar cualquier reactivo de equilibrio de iones, se prefieren el cloruro de tricaprilmilmetil amonio (Aliquat 336, CAS 5137-55-3) cloruro tridodecilmetil de amonio (TDMAC, CAS 7173-54-8) o el cloruro de cetiltrimetil amonio (CTAC, CAS 112-027). El reactivo de equilibrio de iones compone de un 0,1% a un 10% del peso de la solución. Se prefiere que el reactivo de equilibrio de iones componga de un 1% a un 8% de la solución, es más preferido que el reactivo de equilibrio de iones componga de un 3% a un 7% de la solución, y lo más preferido es que el reactivo de equilibrio de iones componga de un 4% a un 6% por peso de la solución. Como está claro para alguien experto en la técnica, es también posible usar una combinación de reactivos de equilibrio de iones adecuados cuando se hace una solución de polímero.

15 Los componentes de la solución se añaden de tal forma que la suma de los pesos del polímero pre-formado, el plastificante, el agente humectante y el reactivo de equilibrio de iones es igual al 100%.

El indicador deseado se añade a la solución. Aunque se puede usar cualquier indicador adecuado, se prefiere que las moléculas del indicador tengan un grupo funcional cargado negativamente como el acetato o el sulfonato. Más preferiblemente, los indicadores usados, por separado o en combinación, se eligen entre los indicadores enumerados en la Tabla 1 y en la Patente US .897.834. La cantidad total de indicador añadido es del 0,05% al 5% del peso de la solución de polímero como se ha descrito anteriormente. Se prefiere que el indicador sea de un 0,05% a un 3% de la solución de polímero, se prefiere más que el indicador sea de un 0,1% a un 1% de la solución de polímero, y lo más preferido es que el indicador sea de un 0,2% a un 0,4% del peso de la solución de polímero.

25 Cuando se desea añadir un reactivo en preparación del sistema indicador de la presente invención, el reactivo es añadido a la solución de polímero. Por ejemplo, cuando se usa ureasa se puede añadir cualquier cantidad adecuada de ureasa aunque se prefiere que la concentración de ureasa sea de alrededor de 10 unidades por cada 0,01% - 0,1% de indicador añadido a la solución de polímero.

30 Además, se añade una cantidad de solvente que es adecuada para hacer fácilmente cualquier mezcla de solución/indicador aplicado. Típicamente, se disuelven 150 mg de solución de polímero en entre 1 ml y 30 ml de solvente, preferiblemente entre 5 ml y 15 ml de solvente. Aunque se puede usar cualquier solvente o mezcla de solventes adecuados, se prefieren el acetato de etilo o éteres sustancialmente volátiles como el éter dietílico, el éter de isopropilo, el t-butil metil metil éter o tetrahidrofurano.

35 Una vez que la mezcla está preparada, se aplica por cualquier método adecuado al sustrato. La aplicación se puede hacer, por ejemplo, rociando o esparciendo la mezcla en el sustrato, o sumergiendo el sustrato en la mezcla. El sustrato puede ser de muchos materiales adecuados conocidos en la técnica como membranas de poliéster, membranas de polipropileno, membranas de celulosa, papel, algodón o lino. La estructura del sustrato puede ser, por ejemplo, una fibra, una malla, una gasa, una tela o una membrana. Se permite que el solvente de la mezcla evapore. Una vez que la mezcla se seca en el sustrato, el sustrato se integra en cualquiera que sea el artículo de seguimiento de secreciones deseado, como un salva-slip.

45 Como está claro para alguien experto en la técnica cuando el sistema indicador de la presente invención se implementa, se hace una primera mezcla con un primer indicador, y se hace una segunda mezcla con un segundo indicador y un reactivo, ambas mezclas se han descrito en la presente anteriormente. Cada una de las dos mezclas se aplica al área en el sustrato, como se ha descrito en la presente anteriormente. Preferiblemente el área de aplicación de la primera mezcla es sustancialmente distinta del área de aplicación de la segunda mezcla.

50 En ciertas aplicaciones, el líquido a ser probado puede contener polímeros biológicos como proteínas o grasas. Por ejemplo, el fluido amniótico y la orina a menudo contienen proteínas. Los polímeros biológicos pueden obturar los poros en el sustrato reduciendo la efectividad del método de prueba. esto puede ser excepcionalmente significativo en aplicaciones de salva-slip como el salva-slip 32 recogido en la Figura 3. En tal caso, es preferible interponer una membrana microporosa 34, como una membrana de diálisis (por ejemplo, membrana de celulosa, catálogo nº D-9402, Sigma-Aldrich, St. Louis MO), entre el sustrato indicador 36 y una fuente 38 de secreción 40. Los materiales de tamaño grande 42 en la secreción 40 no pueden penetrar la membrana microporosa 34 mientras que el componente fluido 44 de la secreción penetra la membrana microporosa 34 para reaccionar con el sustrato indicador 36. El salva-slip 32 en la Figura 3 incluye además dos aletas laterales 46 (sólo una es visible en la Figura 3) configuradas para permitir la unión del salva-slip 32 a una prenda interior de un usuario, de tal forma que se mantenga el salva-slip 32 en la proximidad de la vagina de un usuario.

65 En un segundo método de unir un indicador a un sustrato, un sustrato es primero tratado con una solución surfactante. Después de que la solución seca, se aplica una solución indicadora al sustrato. El sustrato puede entonces ser integrado en un producto.

Aunque se puede usar cualquier surfactante, cuando se desea unir indicadores cargados negativamente a un sustrato neutro, se usa un surfactante con un grupo funcional catiónico, preferiblemente Aliquat 336, TDMAC o CTAC. Aunque se puede usar cualquier solvente o mezcla de solventes adecuada, los preferidos son el acetato de etilo o éteres sustancialmente volátiles como el éter dietílico, el éter de isopropilo, el t-butil metil metil éter o el tetrahidrofurano. El surfactante es disuelto en el solvente a cualquier concentración adecuada. Se prefiere que el surfactante componga de un 0,01% a un 2% de la solución, es más preferido que el surfactante componga de un 0,1% a un 0,5% de la solución, y lo más preferido es que el surfactante componga de un 0,15% a un 0,25% por peso de la solución. Como está claro para alguien experto en la técnica, es también posible usar una combinación de surfactantes adecuados. La solución surfactante se aplica al sustrato. La aplicación se hace, por ejemplo, pulverizando o esparciendo la mezcla en el sustrato, o sumergiendo el sustrato en la mezcla. El sustrato puede ser de muchos materiales adecuados conocidos en la técnica como membranas de poliéster, membranas de polipropileno, membranas de celulosa, papel, algodón o lino. La estructura del sustrato puede ser, por ejemplo, una fibra, una malla, una gasa, una tela o una membrana. Se permite que el solvente de la solución surfactante evapore. Aunque se puede permitir que el solvente se evapore a presión ambiental, es preferible evaporar el solvente bajo vacío, preferiblemente a una presión de menos de 600 mm Hg, más preferiblemente menos de 200 mm Hg, e incluso más preferiblemente menos de 100 mm Hg.

después de que el solvente de la solución surfactante se ha evaporado, se aplica una solución indicadora al sustrato. Aunque se puede usar cualquier solvente o mezcla de solventes, los preferidos son el acetato de etilo o éteres sustancialmente volátiles como el éter dietílico, el éter de isopropilo, el t-butil metil metil éter o el tetrahidrofurano. Aunque se puede usar cualquier indicador adecuado se prefiere que las moléculas del indicador tengan un grupo funcional cargado negativamente como el acetato o el sulfonato cuando el surfactante usado es un surfactante catiónico. Más preferiblemente, los indicadores usados, por separado o en combinación son elegidos entre los listados en la Tabla 1 o, por ejemplo, en la Patente US 5.897.834. La cantidad de indicador añadido es de un 0,00001% a un 1% del peso de la solución indicadora como se ha descrito anteriormente. Se prefiere que el indicador sea de un 0,0001% a un 0,1% de la solución indicadora, es más preferido que el indicador sea de un 0,001% a un 0,01% de la solución indicadora, y lo más preferido es que el indicador sea de un 0,002% a un 0,004% del peso de la solución indicadora.

Cuando se desea añadir un reactivo en preparación del sistema indicador de la presente invención, el reactivo se añade a la solución indicadora. Por ejemplo, cuando se usa ureasa, se puede añadir cualquier cantidad adecuada de ureasa. Aunque se puede usar cualquier concentración adecuada de ureasa, lo preferido es una concentración de entre 1 y 100 unidades/ml. Es más preferida una concentración de 2 y 50 unidades/ml e incluso más preferida una concentración de 5 y 20 unidades/ml.

En una realización adicional de la presente invención, una solución de reactivo se prepara de forma separada de la solución indicadora. Cuando se usa ureasa como un reactivo, se puede usar cualquier concentración adecuada de ureasa. se prefiere que se use una concentración de entre 1 y 100 unidades/ml de ureasa, es más preferida una concentración de 2 y 50 unidades/ml e incluso más preferido una concentración de 5 y 20 unidades/ml.

la solución indicadora (o solución indicador/reactivo) se aplica al sustrato. La aplicación se puede hacer, por ejemplo, rociando o esparciendo la solución indicadora en el sustrato, o sumergiendo el sustrato en la solución indicadora. Se permite que el solvente de la solución indicadora se evapore. Aunque se puede permitir que el solvente se evapore a presión ambiente, es preferible evaporar el solvente bajo vacío, preferiblemente a una presión de menos de 600 mm Hg, más preferiblemente menos de 200 mm Hg, e incluso más preferiblemente menos de 100 mm Hg.

Cuando se prepara una solución de reactivo de forma separada de la solución indicadora, al solución del reactivo se aplica sustancialmente de la misma manera que se ha descrito en la presente anteriormente, o antes o después de la aplicación de la solución indicadora.

Independientemente de la concentración exacta de la solución indicadora y de la solución surfactante usadas, es preferible aplicar una cantidad de cada una de las soluciones de tal forma que la concentración molar del surfactante aplicado por área de unidad de sustrato es aproximadamente cien veces más grande que la concentración molar del indicador aplicado por área de unidad del sustrato. La solución indicadora se aplica al sustrato en áreas donde el surfactante había sido aplicado anteriormente.

Como está claro para alguien experto en la técnica, cuando el sistema indicador de la presente invención se implementa, se hace una primera solución con un primer indicador, y se hace una segunda solución con un segundo indicador y un reactivo, ambas soluciones como se ha descrito en la presente anteriormente. Cada una de las dos soluciones se aplica en áreas distintas del sustrato, como se ha descrito en la presente anteriormente.

EJEMPLO 5:

Solución A: se combinaron 370 mg de acetato de celulosa, 280 mg de DBP, 150 mg de sorbitol, 150 mg de e2-etoxietanol, 50 mg de TDMAC. Se añadieron 3 mg de Azul de Bromotimol, se añadieron 20 ml de THF. La solución fue agitada vigorosamente.

Solución B: Se combinaron 370 mg de acetato de celulosa, 280 mg de BBPA, 300 mg de etilenglicol, 50 mg de TDMAC. Se añadieron 3 mg de púrpura de m-cresol y 30 unidades de ureasa. Se añadieron 20 ml de 20 THF. La solución fue agitada vigorosamente.

5 1a. Una gasa de algodón se sumergió en la Solución A. Cuando la solución se secó, la gasa de algodón fue cortada por la mitad. La primera mita fue sumergida en una solución de prueba de pH 7. La primera
10 mitad se volvió púrpura. Se permitió que la primera mitad se secase a condiciones ambientales, sin cambio de color sustancial. Después de tres horas, la segunda mitad fue sumergida en una solución de prueba de pH 7. La segunda mitad se volvió púrpura. Los colores de la primera mitad y de la segunda
15 mitad fueron sustancialmente los mismos.

1b. Una gasa de algodón se sumergió en la Solución B. Cuando la solución se secó, la gasa de algodón fue cortada por la mitad. La primera mitad fue sumergida en orina. La primera mitad se volvió violeta. Se permitió que la primera mitad se secase a condiciones ambientales, sin cambio sustancial de color. Después de tres horas, la segunda mitad se sumergió en orina. La segunda mitad se volvió violeta. Los colores de la primera mitad y de la segunda mitad fueron sustancialmente los mismos.

1c. Se aplicaron la solución A y la Solución B en tiras alternas en una gasa de algodón a una densidad de alrededor de 50 ul/mm². se aplicó fluido amniótico a la gasa, cambiando el color de las tiras de la Solución A a púrpura. Se aplicó orina a la gasa, cambiando el color de las tiras de la Solución B a violeta. se permitió que la gasa secase a condiciones ambientales durante tres horas y se cortó pro la mitad. Se aplico orina a la primera mitad. Los colores de las tiras en la primera mitad y en la segunda mitad de la gasa fueron sustancialmente los mismos.

EJEMPLO 6:

25 Se prepararon tres soluciones:

Solución A: 0,2% de Aliquot en DDW (agua doblemente destilada);
Solución B: 10 unidades/ml de ureasa y 0,003% de púrpura de m-cresol; y
Solución C: 0,003% de amarillo de nitrazina en éter de isopropilo.

30 Se sumergió una membrana de nitrocelulosa en la Solución A y se transfirió a una atmósfera de 50 mm Hg. Después de 30 minutos, la membrana fue retirada del vacío. La Solución B se aplicó en un patrón que se asemejaba a la palabra "NO" a una densidad de 50 μ l / mm². La solución C fue aplicada en un patrón que se asemejaba a la palabra "AMNIO" a un densidad de 50 μ l / mm². La membrana fue transferida a una atmósfera de 50 mm Hg.
35 Después de 30 minutos, la membrana fue retirada de la vacío. La membrana fue sumergida en una solución de prueba de pH 7. La palabra AMNIO apareció en púrpura. Después del secado a condiciones ambientales durante tres horas, no se observó ningún cambio sustancial de color. La membrana fue sumergida en orina. apareció la palabra NO en violeta.

40 Está claro para alguien experto en la materia que la presente invención no está limitada por las realizaciones descritas en la presente sino que también se refiere a muchos tipos de modificaciones convencionales de la misma, que están dentro del ámbito de las reivindicaciones.

Método de construcción del artículo

45 Las Figuras 4A-C y 5A-B proporcionan ejemplos visuales de dos ejemplos no limitativos de métodos de construir el artículo. Las Figuras 4A-C muestran un artículo en la forma de un salva-slip 50 construido con dos indicadores 52 y 54. En la Figura 4A, el salva-slip 50 está construido con un indicador de pH 52 para detectar fluidos biológicos normales y un segundo indicador de pH con un colorante de pH alto y un reactivo, como la ureasa, para detectar fluidos biológicos interferentes, como la orina. La Figura 4B recoge el salva-slip 50 en donde un fluido normal, sin un fluido interferente, cambia el color 56 del indicador de pH 52. Por el contrario, la Figura 4C recoge el salva-slip 50, en donde un fluido biológico interferente, como la orina, cambia el color 58 del segundo indicador de pH54.

55 En una realización separada, el artículo puede ser hecho con sólo un único indicador como se muestra en las Figuras 5A y 5B. La Figura 5A muestra el artículo en la forma de un salva-slip 60, que comprende una etiqueta adhesiva 64, con un indicador 62 construido para no reaccionar con un fluido biológico interferente como la orina. cuando el fluido biológico a ser detectado entra en contacto con el indicador, como se muestra en la Figura 5B, el indicador cambia el color 66, mientras que si el indicador entra en contacto con la orina no cambiará los colores.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un artículo para la monitorización de secreciones para la identificación de fluidos biológicos secretados que comprende: un cuerpo que incluye un material absorbente para absorber un fluido biológico secretado de una persona y un sistema indicador que comprende al menos un miembro determinante del pH y un reactivo de equilibrio de iones para reaccionar con el fluido biológico, en donde el sistema indicador proporciona una indicación de las condiciones de salud asociadas con el pH, catión de aminas protonadas y capacidades reguladoras de los fluidos biológicos, y en donde el sistema indicador está asociado con el material absorbente de tal forma que los fluidos biológicos entran en contacto con el sistema indicador.
- 10 2. El artículo de la reivindicación 1, en donde la indicación es resistente al cambio debido al uso prolongado o a los ciclos de humectación y secado.
- 15 3. El artículo de la reivindicación 1, comprendiendo además una pluralidad de miembros determinantes del pH.
- 20 4. El artículo de la reivindicación 1, comprendiendo además un reactivo que cambia sustancialmente de color en el momento del contacto con la orina.
- 25 5. El artículo de la reivindicación 4, en donde el reactivo es ureasa.
- 30 6. El artículo de la reivindicación 1, comprendiendo además un medio de montaje para colocar el cuerpo absorbente en una posición para recibir fluidos biológicos secretados de una persona.
- 35 7. El artículo de la reivindicación 1, en donde el material absorbente del cuerpo es un hisopo, gasa, salva-slip, compresa higiénica, un pañal o una estructura absorbente interlabial.
- 40 8. El artículo de la reivindicación 1, en donde el sistema indicador comprende un primer indicador de pH unido al sustrato en una primera área y que tienen una transición de color a un primer rango de pH; un segundo indicador de pH unido al sustrato en una segunda área y que tiene una transición de color en un segundo rango de pH, y un reactivo unido al sustrato en la segunda área, en donde el primer rango de pH y el segundo rango de pH son diferentes y en donde el mencionado reactivo cambia sustancialmente de color en el momento del contacto con la urea.
- 45 9. El artículo de la reivindicación 8, en donde la primera área y la segunda área están separadas.
- 50 10. El artículo de la reivindicación 8, que comprende una membrana microporosa para la secreción absorbida por el cuerpo a través de la cual el fluido biológico debe pasar antes de la absorción por el material absorbente.
- 55 11. El artículo de la reivindicación 8, en donde el primer indicador de pH está configurado para cambiar sustancialmente de color en el momento del contacto con el fluido amniótico o con las secreciones vaginales asociadas con vaginosis y el segundo indicador de pH está configurado para cambiar sustancialmente de color en el momento del contacto con la orina reaccionando con el reactivo.
- 60 12. El artículo de la reivindicación 8, en donde el primer y el segundo indicadores de pH tienen cada uno un grupo funcional cargado negativamente.
- 65 13. El artículo de la reivindicación 8, en donde el primer rango de pH es más bajo que el segundo rango de pH.
14. El artículo de la reivindicación 8, comprendiendo además un tercer indicador de pH.
15. Un método para monitorizar la condición de salud de una persona que comprende: posicionar el artículo de la reivindicación 1 para absorber fluidos secretados desde la vecindad del área vaginal de una mujer; e inspeccionar el indicador de pH para identificar el tipo de secreción que contacta con el indicador de pH.
16. El artículo de acuerdo con la reivindicación 1 para la identificación de orina infectada, en donde el sistema indicador reacciona con la orina normal de forma diferente que con la orina infectada, y en donde el cambio de color obtenido en el momento del contacto entre el sistema indicador y la orina infectada es no reversible.
17. El artículo de acuerdo con la reivindicación 1 para la identificación de secreciones vaginales infectadas con bacterias, en donde el sistema indicador reacciona con secreciones vaginales normales o de candidiasis de forma diferente que con secreciones vaginales infectadas con bacterias.
18. El artículo de la reivindicación 1, en donde el sistema indicador comprende además: un polímero pre-formado en una cantidad de alrededor de un 20 a un 50% del peso total, un polímero plastificante en una cantidad de alrededor del 15 al 40 % del peso total; un polímero de agente humectante en una cantidad de alrededor del 15 al 45% del peso total; un polímero de reactivo de equilibrio de iones en una cantidad de alrededor del 0,1 al 10% del peso total;

ES 2 399 352 T3

un polímero indicador en una cantidad de alrededor del 0,05 al 5% del peso total, en donde los porcentajes son porcentajes de peso basados en el peso total de la mezcla y el peso total de la mezcla es igual a 100%.

5 **19.** El artículo de la reivindicación 18, comprendiendo además un reactivo en una cantidad de alrededor de 10 unidades por cada 0,01 a 0,1% de indicador en la mezcla.

20. El artículo de la reivindicación 19, en donde el reactivo es ureasa.

10 **21.** El artículo de la reivindicación 18, comprendiendo además un solvente en un cantidad de alrededor de 1 a 30 ml por cada 150 mg de mezcla.

15 **22.** El artículo de la reivindicación 18, en donde el polímero preformado está presente en una cantidad de alrededor del 36 al 39%, el plastificante está presente en una cantidad de alrededor del 27 al 29%, el agente humectante está presente en una cantidad de alrededor del 29 al 31%, el reactivo de equilibrio de iones está presente en una cantidad de alrededor del 4 al 6%, el indicador está presente en una cantidad del 0,2 al 0,4%.

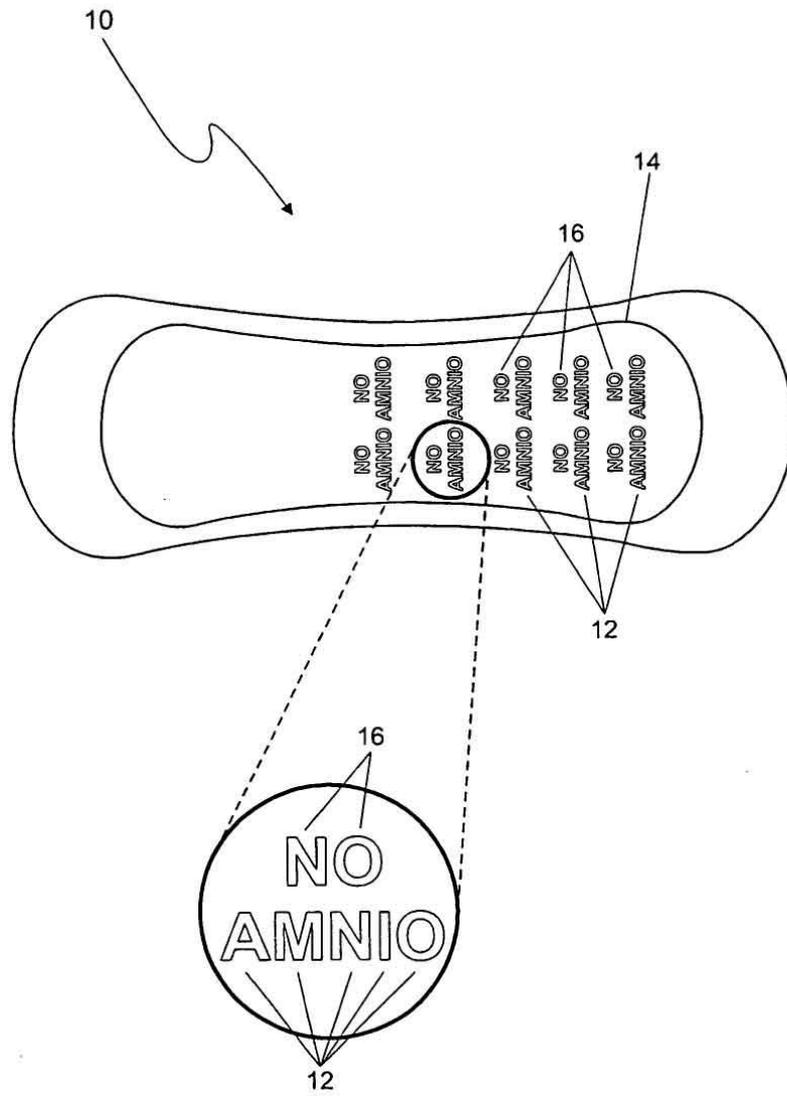


Fig. 1A

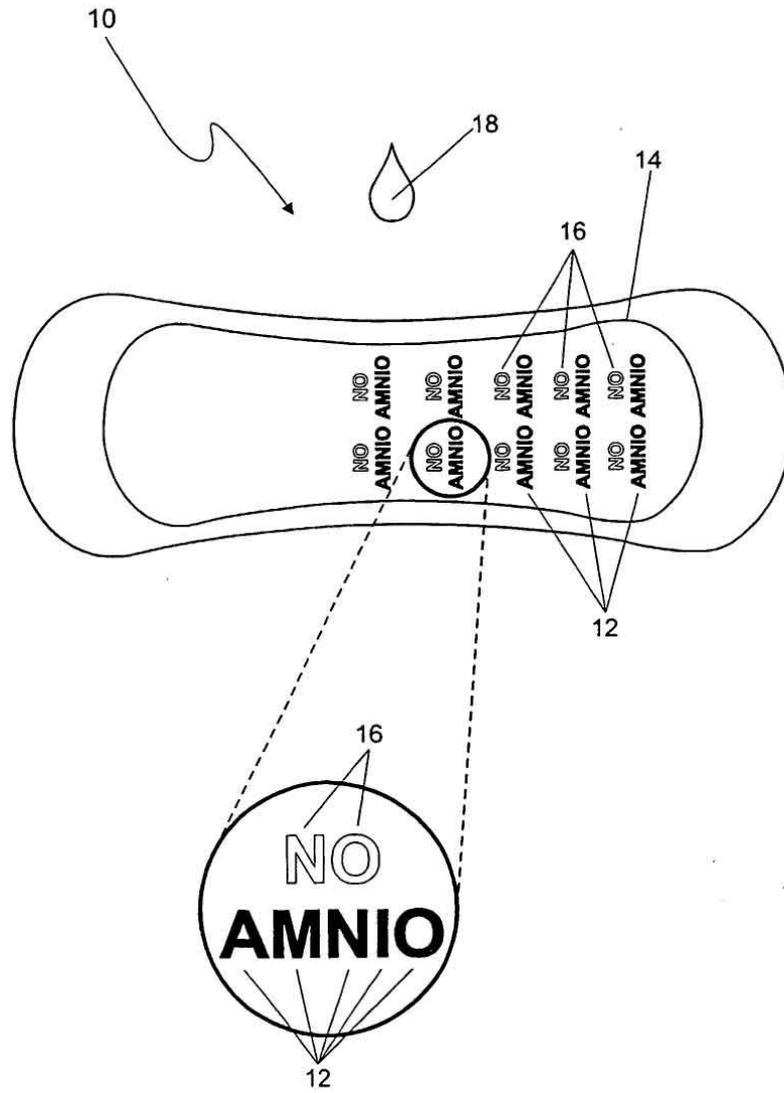


Fig. 1B

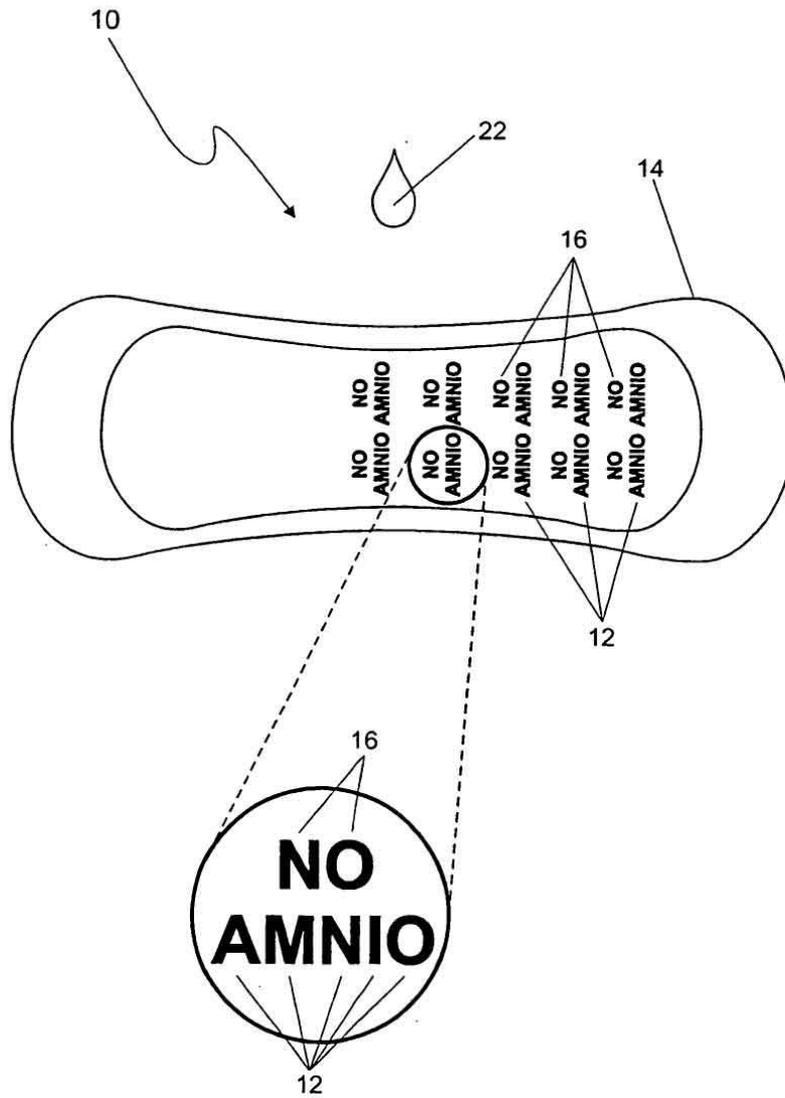


Fig. 1C

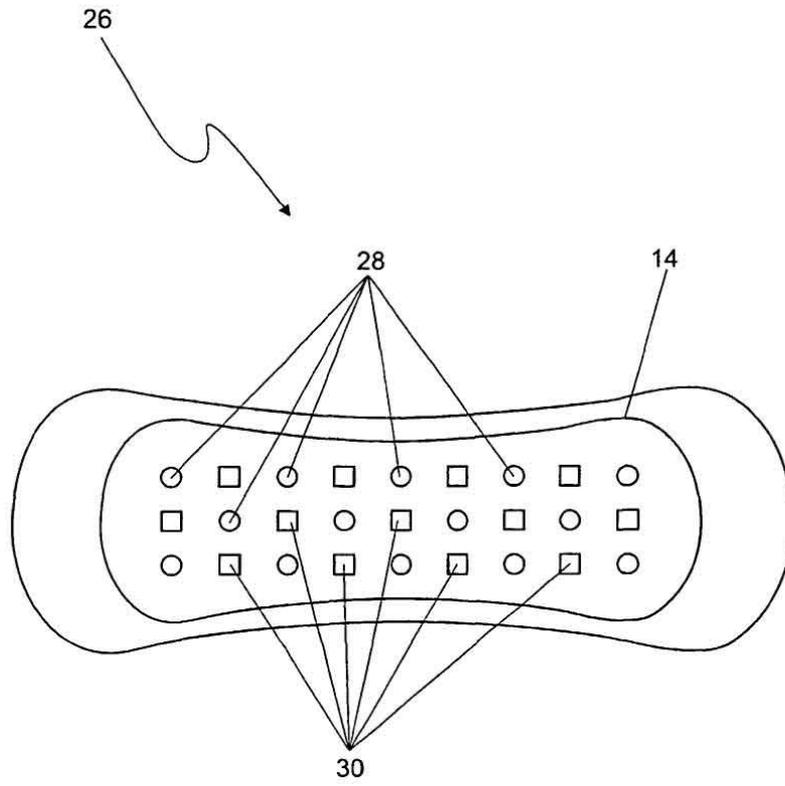


Fig. 2

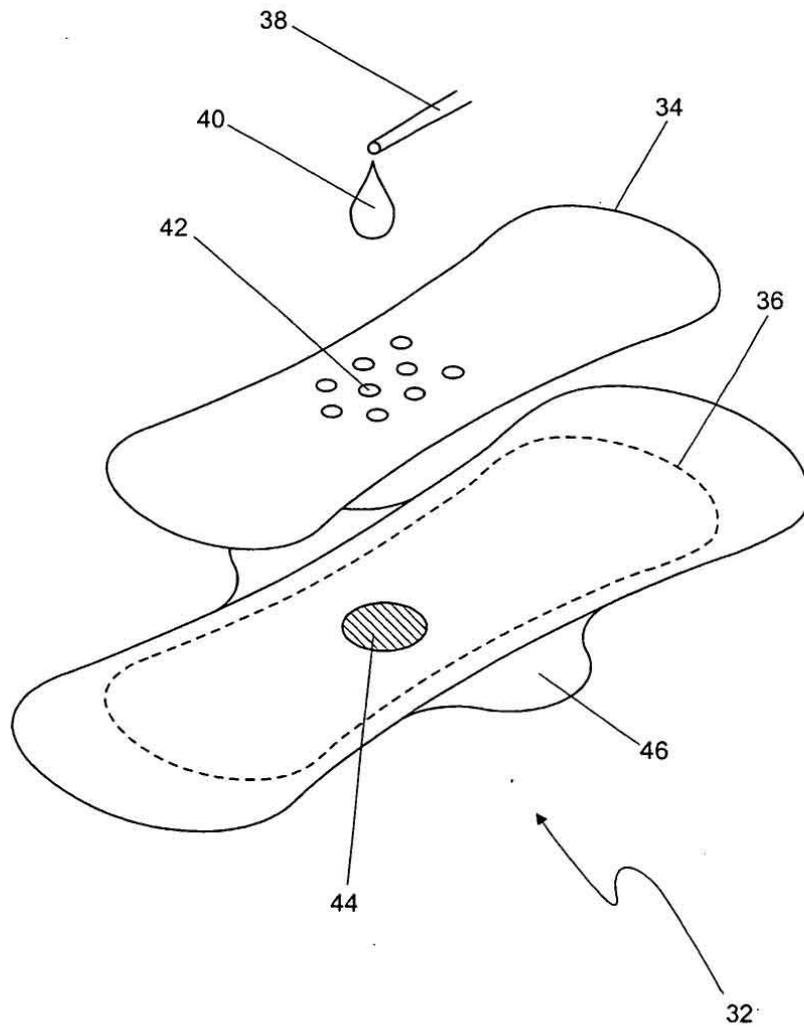


Fig. 3

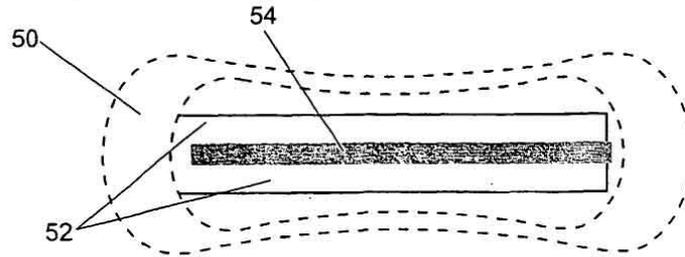


Fig. 4A

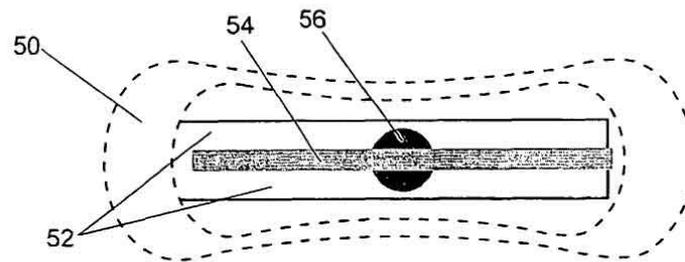


Fig. 4B

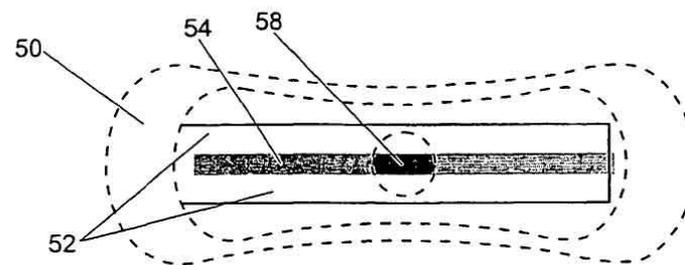


Fig. 4C

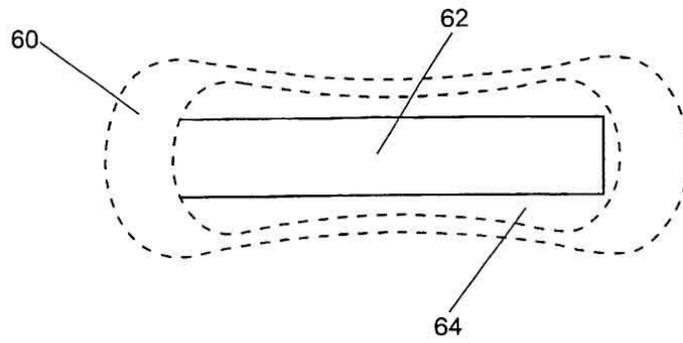


Fig. 5A

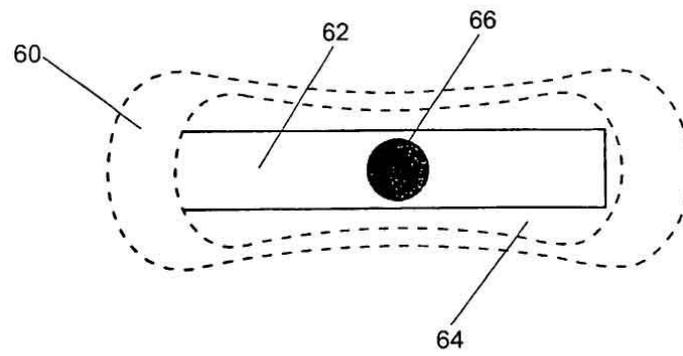


Fig. 5B