

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 877**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/44 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2010 E 10733768 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2382322**

54 Título: **Dispositivo y método para la detección de tiras reactivas de orina comprometidas por la humedad**

30 Prioridad:

26.01.2009 US 147272 P

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

14.02.2014

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**ZIMMERLE, CHRIS T. y
PUGIA, MICHAEL J.**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 442 877 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

Dispositivo y método para la detección de tiras reactivas de orina comprometidas por la humedad

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere de manera general a mejorar el rendimiento y la fiabilidad de tiras reactivas que emplean reactivos sensibles a la humedad, particularmente las usadas para determinar la presencia de analitos en muestras de orina, tales como albúmina, proteína, creatinina, nitrato, uristatina, esterasa leucocitaria (glóbulos blancos), hemoglobina (glóbulos rojos), cetonas, glucosa, bilirrubina, urobilógeno y otros que resultan familiares para los expertos en la técnica. Las mediciones de proteasas e inhibidores de proteasas tales como esterasa leucocitaria (elastasa humana) o inhibidor de tripsina urinaria (bikunina, uristatina) son especialmente importantes porque pueden indicar infecciones del riñón o del aparato genitourinario. Estas proteasas y tiras de inhibidores de proteasas se basan en la hidrólisis de sustratos proteolíticos por proteasas para generar señales detectables. Dado que las reacciones bioquímicas requieren agua para que se produzca la hidrólisis enzimática, tienden a ser sensibles a la humedad y pueden interferir con las señales detectables mediante reacciones de fondo.

La patente estadounidense 5.663.044 describe la técnica anterior en el campo de la detección de leucocitos, esterases o proteasas y para enseñar de manera general el uso de una composición que incluye una sal de diazonio, uno de un grupo de ésteres propensos a hidrólisis en presencia de leucocitos, esterases o proteasas y un metal alcalinotérreo. La patente '044 enseña la medición de la reflectancia de la luz a aproximadamente 570 nm para determinar la cantidad de leucocitos en la muestra de orina. Se compara la reflectancia a 570 nm con una medida de patrón de la reflectancia a 690 nm. La patente indica que la presencia de metal alcalinotérreo fomenta la estabilidad de la sal de diazonio. También sugiere que el metal alcalinotérreo absorbe humedad que puede provocar un cambio de color de fondo. La experiencia ha mostrado que este sistema de reactivos es sensible a la humedad y que las tiras reactivas deben mantenerse en un entorno oscuro antes de su uso. El contenido en humedad de las tiras reactivas debe mantenerse por debajo del 2% en peso para evitar que se degrade el rendimiento. Sin embargo, la medición de humedad en las tiras reactivas no es muy precisa. Existe una necesidad particular de medir el contenido en humedad de manera muy precisa para garantizar que las tiras reactivas son estables en un recipiente seco cerrado a lo largo de varios años.

Otro ejemplo del uso de reactivos sensibles a la humedad se comenta en las patentes estadounidenses 6.770.764; 6.955.921 y 7.001.737. En las reacciones descritas, la presencia de inhibidores de tripsina urinaria en una muestra de orina se detecta añadiendo una muestra a tiras reactivas que contienen una cantidad conocida de tripsina, un sustrato de tripsina, es decir ésteres de arginina hidrolizados por tripsina para producir un alcohol, y una sal de diazonio. Cuando están presentes inhibidores de tripsina, inhiben la reacción entre tripsina y el sustrato. Esto reduce el color producido por la sal de diazonio a partir de su reacción con el fenol producido cuando el sustrato de tripsina reacciona con la cantidad conocida de tripsina. Midiendo el color producido, puede determinarse la presencia de inhibidores de tripsina.

En la patente estadounidense 6.316.264 se añade un colorante infrarrojo (IR) en una ubicación predeterminada sobre tiras con reactivos con el fin de garantizar que las tiras están apropiadamente alineadas en el instrumento usado para detectar y/o medir la presencia de analitos en una muestra aplicada a la tira. El rango IR para los colorantes era en general de entre 700 y 2500 nm, pero se decía que se preferían colorantes que tienen una fuerte absorbancia en el intervalo de 825-855 nm, siendo la absorbancia en el rango visible (400-700 nm) inferior al 20%.

Tal como se sugirió anteriormente, sería ventajoso si las tiras reactivas de orina que se ven comprometidas por la humedad pudieran identificarse con una precisión mejorada para evitar un uso no seguro y para corregir los resultados afectados por la humedad. Dado que los reactivos que implican hidrólisis de sustratos proteolíticos son especialmente sensibles a la humedad, si pueden usarse los propios reactivos para indicar la presencia de humedad no deseada se habrá obtenido una mejora significativa. La presente invención proporciona un método de este tipo, que se comentará en detalle a continuación.

55 Sumario de la invención

La invención tiene aplicación para tiras reactivas sensibles a la humedad que se usan para medir la hidrólisis de sustratos proteolíticos usados para detectar proteasas o inhibidores de proteasas. Se encuentra un ejemplo en la detección de leucocitos, esterases o proteasas, tal como se describe en la patente estadounidense 5.663.044. Se encuentra otro ejemplo en la detección de inhibidores de tripsina urinaria descrita en las patentes estadounidenses 6.770.764; 6.955.921 y 7.001.737.

En general, la invención es un método de detección de humedad excesiva en tiras reactivas que emplean reactivos sensibles a la humedad. Midiendo el color u otra respuesta desarrollada por reactivos sensibles a la humedad justo después de aplicar una muestra y comparando el resultado con un colorante de referencia infrarrojo conocido, se identifican reactivos comprometidos por la humedad y entonces puede marcarse o descartarse el resultado.

Cuando se mide el color desarrollado mediante reflectancia de la luz, se compara el valor de la razón de reflectancia (es decir la razón de la reflectancia de los reactivos con respecto a la reflectancia del colorante de referencia) inmediatamente después de aplicar una muestra con el valor de la razón de reflectancia tomada poco tiempo después y se usa para determinar el efecto de humedad excesiva y para rechazar los reactivos si están comprometidos por la humedad. Puede medirse una segunda razón de reflectancia para determinar si la muestra tiene un color no habitual y puede estar afectando a los resultados.

En una realización preferida, para detectar reactivos leucocitarios comprometidos por la humedad, los reactivos incluyen una sal de diazonio, por ejemplo DNSA (ácido 1-diazo-2-naftol-4-sulfónico), que reacciona con un éster hidrolizable, por ejemplo PPTA (éster de 2-hidroxi-5-fenil-pirrol-N-tosil-L-alanina). Cuando está presente esterasa leucocitaria en la muestra de orina, se produce un color en proporción a la cantidad de leucocitos presentes. En esta realización, se compara la reflectancia a una longitud de onda de luz de 520-570 nm con la reflectancia de aproximadamente 825 nm característica del colorante de referencia.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La única figura es un diagrama de flujo o bien para determinar el contenido en leucocitos de una muestra o bien para rechazar el resultado por estar comprometido por la humedad.

20 **Descripción de realizaciones preferidas**

La invención incluye un método mejorado de medición de la hidrólisis de sustratos proteolíticos en muestras de orina aplicadas a tiras reactivas. En general, pueden usarse reactivos basados en sustratos proteolíticos para detectar cualquier proteasa. Se hace corresponder la secuencia de aminoácidos de los reactivos con el tipo preferido por la proteasa que está detectándose y se fija la secuencia de aminoácidos a un resto generador de señal que tras la hidrólisis forma la señal. Un ejemplo de este principio es la detección de esterasa leucocitaria, que se usa para detectar la presencia de leucocitos en una muestra, tal como se describe en la patente estadounidense 5.663.044. La presencia de leucocitos se correlaciona con la reflectancia de la luz a la longitud de onda característica de los reactivos con referencia a la reflectancia de la luz a una longitud de onda característica de un colorante de referencia infrarrojo. La comparación de la reflectancia medida se correlaciona con la presencia de leucocitos tras un tiempo de incubación de aproximadamente 20 segundos a 3 minutos tras la aplicación de una muestra de orina a los reactivos. Tales tiras reactivas pueden verse comprometidas por una humedad excesiva, lo que puede reducir la actividad de los reactivos y mostrar de manera falsa desarrollo de color indicativo de la presencia de leucocitos en una muestra de orina. Midiendo la razón de reflectancia a partir de los reactivos con respecto al colorante de referencia infrarrojo durante el primer minuto tras haberse aplicado una muestra de orina a los reactivos, el método de la invención determina si los reactivos se han visto comprometidos por una humedad excesiva.

También pueden usarse reactivos basados en sustratos proteolíticos para detectar un inhibidor de proteasa. De nuevo, se hace corresponder la secuencia de aminoácidos con el tipo preferido por el inhibidor de proteasa, fijándose la secuencia a un resto generador de señal que tras la hidrólisis forma la señal. Se añade la proteasa al reactivo y por tanto genera una señal cuando no hay inhibidor presente en la muestra. Se usa la ausencia de una señal para determinar la presencia de inhibidor de proteasa en una muestra. Un ejemplo de este principio es la detección de inhibidor de tripsina urinaria tal como se describe en las patentes estadounidenses 6.770.764; 6.955.921 y 7.001.737.

La hidrólisis de un sustrato proteolítico no alcanza el punto final de la reacción en el corto periodo de tiempo de menos de unos pocos minutos necesario para las tiras usadas en aplicaciones en el centro de atención. Las reacciones de hidrólisis siguen creando una señal con el tiempo y normalmente se miden cinéticamente para permitir lecturas que no dependen del tiempo por parte del operario. Por ejemplo, puede medirse el color desarrollado por la reacción para detectar leucocitos en orina a los 20 y 60 segundos y usarse la razón de las señales en ambos momentos como resultado cinético, es decir, que muestra la tasa de cambio de color. Esto evita que el usuario tenga que esperar 3 minutos completos para obtener un resultado.

La invención puede aplicarse a muchos formatos en los que los reactivos son sensibles a la humedad. Es decir, los reactivos pueden reaccionar en presencia de humedad e indicar de manera falsa la presencia de un analito, que no está realmente presente en la muestra que está midiéndose. Anteriormente se han mencionado ejemplos de tales reactivos sensibles a la humedad. Resultó de particular importancia para los presentes inventores la sensibilidad a la humedad de reactivos usados para detectar leucocitos en muestras de orina por esterasa en los leucocitos, tal como se comenta a continuación con referencia a una realización preferida. Sin embargo, resultará evidente que los métodos de la invención tienen aplicación para otros reactivos sensibles a la humedad, incluyendo, pero sin limitarse a, otros reactivos que pueden usarse para medir la presencia de leucocitos. Se entiende que las tiras reactivas pueden tener muchos formatos, incluyendo, pero sin limitarse a, tiras reactivas de tipo sumergible y cartuchos de flujo lateral.

Química de reactivo leucocitario

En la patente estadounidense 5.663.044 mencionada anteriormente se comentan reactivos leucocitarios útiles en la invención que pueden proporcionar un método de medición del contenido en leucocitos de muestras de orina. En la tabla 4 de la patente '044 se describió una composición preferida de la invención. Un compuesto de alanina (PPTA; éster de 2-hidroxi-5-fenil-pirrol-N-tosil-L-alanina) sirvió como sustrato para esterasa leucocitaria, que hidroliza PPTA, tras lo cual el producto hidrolizado reacciona con el indicador de diazonio (DNSA; ácido 1-diazo-2-naftol-4-sulfónico) para producir color. Se midió el color mediante el grado de reflectancia cuando se examina a una longitud de onda de luz de 520-570 nm (570 nm en la patente '044). Se relacionó la reflectancia a 520-570 nm con una longitud de onda de patrón a 690 nm. Se usó esta comparación para compensar diferencias en el color de fondo blanco del sustrato de la tira, que era celulosa blanca sobre un poliestireno blanco que tenía una reflectancia >60%, y que se aproximaba a incoloro a longitudes de onda >690 nm. El color de fondo blanco es particularmente sensible a la humedad y una pequeña cantidad puede provocar un gran cambio en la razón de reflectancia. El fondo blanco también es sensible al color de la orina y pequeñas cantidades pueden provocar grandes cambios en la razón de reflectancia. Como resultado, no puede usarse tal razón de reflectancia para medir con precisión la humedad tras sumergir la tira en orina.

En la presente invención, se añade un colorante de referencia infrarrojo que tiene una respuesta característica a la luz a una longitud de onda al menos 120 nm superior al intervalo de 520-570 nm. Se ha encontrado que la longitud de onda del colorante IR y la cantidad usada afectan a la precisión de las mediciones reduciendo la interferencia del fondo. La adición de un colorante IR a los reactivos leucocitarios proporciona un color de fondo menor con una reflectancia $\leq 60\%$ a ≥ 700 y 2500 nm. Este fondo menor reduce el efecto del color de la orina sobre la razón de reflectancia, pero no el efecto de la humedad. Por tanto, puede usarse la razón de reflectancia para medir con exactitud la humedad tras sumergir una muestra en orina.

Sin embargo, este color de fondo menor con una reflectancia $\leq 60\%$ a ≥ 700 y 2500 nm puede reducir la capacidad de los reactivos para detectar la hidrólisis de sustratos proteolíticos. Este efecto se muestra en la siguiente tabla, en la que el efecto del color de fondo del sustrato de reactivo se reduce a medida que se aumenta la cantidad del colorante IR. La cantidad de colorante IR que puede tolerar un reactivo depende de la longitud de onda de referencia usada para medir el fondo, la longitud de onda de señal de los sustratos, la sensibilidad del sustrato a la humedad y la sensibilidad del sustrato a la hidrólisis de proteasas y la cantidad de señal de colorante de fondo < 700 nm. La tolerancia de cualquier sustrato de hidrólisis dado puede determinarse tal como se muestra en la tabla 1 en la que la reducción deseada de la interferencia del fondo con respecto al color en la muestra se produce a más de 0,2 mg/dl, o a aproximadamente el 0,5% en peso con respecto al colorante de referencia. Sin embargo, cuando se eleva la cantidad de colorante hasta 20 mg/dl, se aumenta la razón de reflectancia hasta 1,6 y se reduce la señal desde la señal de $\sim 1,0$ esperada. Por tanto debe limitarse la cantidad de colorante usada a la necesaria para minimizar la interferencia del fondo.

Tabla 1		
Colorante (1) mg/dl	Razón de reflectancia de 570/690 nm (2)	Interferencia del fondo (3)
20	1,649	3%
2	1,042	4%
0,2	0,976	5%
0,02	0,967	22%
0	0,964	45%

(1) DTO 141 que es colorante 3 en la tabla 2 del documento U.S. 6.316.264 y tiene el nombre químico 3-(5-carboxipentil)-2-[2-[3-[[3-(5-carboxipentil)-1,3-dihidro-1,1-dimetil-2H-benzo[e]indol-2-iliden]etiliden]-2-(n-hexiltio)-1-ciclohexen-1-il]etenil]-1,1-dimetil-1H-benzo[e]indolio, sal interna.
(2) Reacción frente a leucocitos 42 células/ul en orina en orina con densidad relativa media y medido usando el instrumento CLINITEK Status® (Siemens Healthcare Diagnostics).
(3) Diferencia entre orina clínica con intenso color marrón y una orina con color amarillo normal. Ambas orinas carecían de leucocitos y se midieron usando el instrumento CLINITEK Status®.

En el experimento anterior, se preparó el reactivo leucocitario a partir de dos saturaciones secuenciales de papel de filtro. La primera saturación fue con una mezcla acuosa que contenía ácido bórico, Bio-Terge AS40, polímero PVP y NaCl para controlar la fuerza iónica. Se ajustó el pH de la mezcla a de 8,8 a 9,3 usando hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. La segunda saturación fue una mezcla de disolventes de acetona/DMSO que contenía DNSA, PPTA, decanol y ácido bórico. En la tabla a continuación se facilitan las funciones, concentración preferida e intervalo permisible de cada componente. Se usaron las disoluciones de mezcla para saturar papel de filtro, en este caso papel de filtro Ahlstrom de grado 205C, y se secó el papel a 121°C durante 9 minutos tras la primera saturación, y a 100°C durante 7 minutos tras la segunda saturación. Se procesó el reactivo seco resultante para dar tiras con reactivos que se sometieron a prueba usando el instrumento CLINITEK Status®.

50

Tabla 2

Componente	Función	Conc. preferida usada	Intervalo permisible
1ª aplicación			
Agua	Disolvente	1000 ml	---
NaCl	Agente de fuerza iónica	14,6 g	1-30 g/l
Bio-Terge AS40	Tensioactivo	2 g	0-4 g/l
Ácido bórico	Tampón	24,7 g	5-35 g/l
PVP	Polímero	20,0 g	5-50 g/l
2ª aplicación			
Acetona	Disolvente	955 ml	---
DMSO	Disolvente	30 ml	10-60 ml
DNSA	Indicador de diazonio	0,174 g	0,050-0,5 g/l
PPTA	Sustrato enzimático	0,422 g	0,10-0,8 g/l
Decanol	Activador enzimático	15 ml	5-40 ml/l
Ácido bórico	Tampón	0,5 g	0-3,0 g/l
DNSA = ácido 1-diazo-2-naftol-4-sulfónico			
PPTA = éster de 2-hidroxi-5-fenil-pirrol-N-tosil-L-alanina			

5 Pueden usarse diversos colorantes, incluyendo los descritos en la patente estadounidense 6.316.264 que tienen una absorbancia característica en la región del infrarrojo de aproximadamente 700 a aproximadamente 2500 nm. Los ejemplos incluyen compuestos de ftalocianina y naftalocianina, colorantes de complejos de metales (por ejemplo colorantes de complejos de metales con ditioleno) y colorantes de polimetino, incluyendo colorantes de cianina. Otros colorantes incluyen colorantes de di y trifenilmetano, colorantes de quinona, colorantes azoicos y colorantes de transferencia de carga y de resonancia de carga. Su característica común es que la reflectancia de la luz a una longitud de onda única se mide al menos 120 nm por encima de la longitud de onda del reactivo. En relación con los reactivos leucocitarios comentados anteriormente, el colorante debe tener una reflectancia característica de al menos 700 nm, preferiblemente por encima de 700 e inferior a 2500 nm.

15 Aunque incluir el colorante de referencia con los reactivos leucocitarios es una realización preferida, también es posible colocar el colorante de referencia en otra ubicación, tal como se realizó para fines de alineación de una tira reactiva (documento U.S. 6.316.264). Los cambios debidos a la humedad que se producen cuando el colorante entra en contacto con la muestra pueden diferir de los que se producen cuando el colorante está dentro de los reactivos. Sin embargo, los expertos familiarizados con la técnica pueden adaptar tales diferencias.

20 Detección de contaminación por humedad en una tira reactiva de leucocitos

Tal como se comentó anteriormente, la humedad provoca que se degraden los reactivos leucocitarios y que produzcan un cambio de color falso. No se necesitan las enzimas en leucocitos para hidrolizar el sustrato proteolítico, por ejemplo PPTA. Se ha encontrado que los reactivos son sensibles a una humedad de tan sólo el 0,1% en un lecho de reactivos leucocitarios. Esencialmente, la tasa de cambio de color es directamente proporcional a la cantidad de agua presente. La importancia del control de la humedad resulta evidente cuando tras una exposición de 10 minutos a humedad relativa >60 la prueba proporciona resultados falsos positivos.

30 En la invención se usa esta sensibilidad a la humedad para determinar si se ha contaminado con humedad un lecho con reactivos. En primer lugar se determina el cambio de color aproximadamente 20 segundos tras haber aplicado una muestra de orina. Si se detecta color tras 20 segundos, entonces se sospecha que hay contaminación por humedad. Esto se confirma si el color no ha aumentado significativamente tras 60 segundos, es decir, se ha reducido la actividad de los reactivos. Este método se confirmó en un experimento en el que se expusieron tiras reactivas a 30°C a una humedad del 80% durante 10 minutos, condiciones que se sabe que provocan un fallo de los reactivos. Se encontró que veintitrés de las veinticuatro tiras habían fallado cuando se usó la razón de la reflectancia a 520 nm con respecto a la reflectancia a 820 nm. La cantidad del colorante DTO 141 aplicado fue de 0,2 mg/dl, con respecto a 42 mg/dl de PPTA de los reactivos leucocitarios. Un experimento paralelo en el que sólo se midió la reflectancia a 520 nm, es decir sin colorante presente, no logró detectar tiras contaminadas por humedad en el 42% de las tiras, esto también era cierto cuando se usó una razón de reflectancia de 520 nm/870 nm, pero sin colorante presente.

45 En el método de la invención también se tiene en cuenta la influencia del color en la muestra de orina. Se mide el color de la muestra mediante la absorbancia de luz a aproximadamente 460 nm (dentro del rango visible). Con el fin de realizar la medición del color desarrollado por los reactivos leucocitarios se determina una nueva razón, es decir la reflectancia a aproximadamente 460 nm (para el color de la muestra) dividida entre la reflectancia a aproximadamente 625 nm. Esta razón evita que se considere que muestras de orina oscuras están comprometidas por la humedad. Si la razón (multiplicada por 1000) está por encima de 600, el color de la muestra es claro y la reflectancia es alta. Si es así, entonces se confirmará que la tira que está sometándose a prueba está comprometida por la humedad si las razones de reflectancia a los 20 y 60 segundos han indicado que la tira

responde de manera anómala. Si la razón está por debajo de 600, la muestra tiene un color oscuro que puede haber afectado a los resultados y no se rechaza la tira si los resultados a los 20 y 60 segundos han sido satisfactorios.

Se usa la diferencia entre la razón de reflectancia a 525 nm con respecto a la reflectancia a 825 nm tomada a los 20 y 60 segundos tras aplicar una muestra para determinar si los reactivos se han degradado por la humedad. En general, si la primera lectura (20 s) proporciona una razón inferior a aproximadamente 700 (razón x 1000), entonces se indica humedad excesiva ya que la reflectancia a 525 indica que ya se ha desarrollado un color significativo. Si la segunda lectura se toma a los 60 segundos y se compara con la primera lectura y la diferencia de las lecturas es inferior a aproximadamente 50 (razón x 1000), entonces se confirma la presencia de humedad excesiva ya que los reactivos han perdido su actividad normal.

Por ejemplo, se miden tres valores cuando los reactivos incluyen PPTA y DNSA y el colorante de referencia es DTO 141.

Tabla 3

	Razón, nm	Momento	Razón de valor crítico x 1000	significado
L ₂₀	525/845	20 s	< 700	Alta absorción, humedad excesiva probable
L ₆₀	525/845	60 s	L ₂₀ - L ₆₀ <50	Humedad que reduce la actividad del reactivo
H	470/625	40 y 60 segundos	> 600	Alta reflectancia, muestra de color claro

Aplicando esos valores a las lecturas según el procedimiento mostrado en la figura 1 se prevé el rechazo de los resultados por estar comprometidos por la humedad o la notificación de los leucocitos medidos en la muestra. En un ejemplo, se usa un instrumento CLINITEK Status® para analizar la muestra de orina para determinar la presencia de leucocitos. A una tira absorbente (por ejemplo, papel de filtro) saturada con disoluciones de reactivos tal como se describió anteriormente en la tabla 2 se le aplica una muestra de orina y se miden los cambios de color resultantes mediante la reflectancia de la luz en el instrumento CLINITEK Status® según el procedimiento de la invención.

Si el valor medido de L₂₀-L₆₀ es inferior a 50, es posible que la humedad excesiva haya reducido la actividad de reactivos leucocitarios. Si está por encima de 50, entonces puede usarse el valor de L₂₀-L₆₀ para calcular la concentración de leucocitos en la muestra. Sin embargo aunque esté por debajo de 50, la razón de 525/845 nm todavía puede proporcionar una concentración de leucocitos. Se considera el valor inicial de la razón de 525/845 nm (L₂₀). Si el valor está por debajo de 700 (razón x 1000) entonces se indica una alta absorción de luz a 525 nm, lo que sugiere que puede haber estado presente humedad excesiva en el lecho de prueba. Entonces, en combinación con el resultado de L₂₀-L₆₀, es probable que los reactivos leucocitarios se hayan visto comprometidos por la humedad excesiva. Pero, dado que los resultados pueden haberse visto influidos por una muestra oscura no habitual, se mide la razón H, de 470/625 nm. Si el resultado está por encima de 600 (razón x 1000) se indica una alta reflectancia, lo que significa que la muestra no tiene un color intenso. Si es así, entonces se considera que los reactivos leucocitarios se han visto comprometidos por una alta humedad. Si la muestra es oscura, es decir la razón crítica H está por debajo de 600, pero los valores anteriormente determinados de L₂₀-L₆₀ y L₂₀ eran aceptables, entonces se considera que la muestra no está comprometida y se calcula el contenido en leucocitos.

Debe entenderse que las longitudes de onda de luz y los momentos de medición específicos que acaban de describirse son útiles para determinar la presencia de leucocitos en muestras de orina con las cantidades de los reactivos descritos. Sin embargo, el método tiene aplicación más generalmente a muchos otros reactivos que son sensibles a la humedad y sin embargo se usan para detectar muestras que contienen agua. Deben establecerse protocolos de detección apropiados fácilmente por los expertos en la técnica habiendo revisado la invención dada a conocer por los presentes inventores.

Tal como se ilustró anteriormente, el instrumento Clinitek Status® es útil para llevar a cabo el método de la invención. Se describen aspectos de ese instrumento en las patentes estadounidenses 6.239.445; 5.877.863; 5.477.326 y 5.408.535. El instrumento Clinitek Status® es un espectroscopio de reflectancia en el que se ilumina una tira reactiva que lleva una muestra mediante una fuente de luz y se detecta la luz reflejada desde la tira reactiva y se usa para determinar la presencia y la cantidad del analito en la muestra. El funcionamiento de espectrofotómetros también se da a conocer en la patente estadounidense 6.316.264, a la que se hizo referencia anteriormente. Tal como se indica en la misma, también puede usarse un instrumento de tipo cámara, que crea una imagen de múltiples píxeles, para llevar a cabo el método de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de reactivos sensibles a la humedad, comprometidos por la humedad, poniéndose dichos reactivos en contacto con una muestra que contiene agua y detectándose la presencia de un analito en la muestra mediante su reacción con dichos reactivos sensibles a la humedad, comprendiendo el método:
- (a) medir la reflectancia de la luz a la longitud de onda de los productos de dicha reacción de dichos reactivos sensibles a la humedad con dicho analito en dos momentos predeterminados tras poner en contacto dichos reactivos con dicha muestra;
- (b) medir en los mismos dos momentos predeterminados la reflectancia de la luz a la longitud de onda de un colorante de referencia infrarrojo, combinándose dicho colorante con dichos reactivos sensibles a la humedad y teniendo una longitud de onda característica separada de la longitud de onda medida en (a) en al menos 120 nm;
- (c) calcular la razón de las longitudes de onda medidas en (a) y (b) y concluir que los reactivos tienen una actividad inferior a la esperada a partir del cambio en dicha razón entre dichos dos momentos predeterminados.
2. Método según la reivindicación 1, en el que se usa la razón de longitudes de onda medidas en (a) y (b) en el primero de dichos dos momentos predeterminados para indicar reactivos sensibles a la humedad, posiblemente comprometidos por la humedad.
3. Método según la reivindicación 2, en el que se usan en combinación la razón de longitudes de onda medidas en el primero de dichos dos momentos predeterminados y el cambio en la razón entre el primer y el segundo momento predeterminado para determinar si los reactivos sensibles a la humedad están comprometidos por la humedad.
4. Método según la reivindicación 3, que comprende además la etapa de medir la reflectancia de la luz a dos longitudes de onda predeterminadas para indicar la posibilidad de interferencia del color de la muestra con los resultados determinados.
5. Método según la reivindicación 1, en el que dichos reactivos sensibles a la humedad se basan en sustratos proteolíticos usados para detectar enzimas proteasas.
6. Método según la reivindicación 1, en el que dichos reactivos sensibles a la humedad se basan en sustratos proteolíticos usados para detectar inhibidores de proteasas.
7. Método según la reivindicación 5, en el que dicha muestra es orina y dicho analito es leucocitos.
8. Método según la reivindicación 6, en el que la muestra es orina y dicho analito es inhibidores de tripsina urinaria.
9. Método según la reivindicación 7, en el que dichos reactivos sensibles a la humedad incluyen una sal de diazonio y un éster propenso a hidrólisis en presencia de leucocitos.
10. Método según la reivindicación 1, que comprende además rechazar reactivos sensibles a la humedad, comprometidos por la humedad.
11. Método de medición de leucocitos en muestras de orina con tiras reactivas, conteniendo dichas tiras reactivas reactivos que incluyen una sal de diazonio y un éster propenso a hidrólisis en presencia de leucocitos, calculando dicho método la cantidad de leucocitos en una muestra de orina en función de la reflexión de la luz a una longitud de onda característica del producto de reacción de dicha sal de diazonio con éster hidrolizado y con referencia a la reflexión de la luz a una longitud de onda de referencia preseleccionada, midiéndose dicha luz reflejada aproximadamente de 1 a 3 minutos tras aplicar una muestra de orina a dichos reactivos, caracterizado porque comprende detectar reactivos comprometidos por la humedad mediante:
- (a) añadir un colorante de referencia infrarrojo a dichas tiras reactivas, teniendo dicho colorante de referencia una longitud de onda de reflectancia característica separada de la longitud de onda característica de dicho producto de reacción en al menos 120 nm;
- (b) medir la reflectancia de la luz a la longitud de onda de dicho producto de reacción y la longitud de onda característica del colorante de referencia a aproximadamente 20 segundos y aproximadamente 60 segundos tras aplicar dicha muestra de orina a dichos reactivos;

- (c) calcular la razón de la reflectancia medida a la longitud de onda de dicho producto de reacción con respecto a la longitud de onda medida de dicho colorante de referencia determinada en (b) para cada uno de dichos momentos a los 20 y 60 segundos y denominar dichas razones L_{20} y L_{60} ;
- 5 (d) cuando $L_{20} - L_{60}$ es inferior a un primer valor predeterminado y L_{20} está por debajo de un segundo valor predeterminado, concluir que el sustrato que contiene composición se vio comprometido por la humedad;
- (e) medir la reflectancia de la luz a longitudes de onda de aproximadamente 470 y aproximadamente 625 nm y calcular la razón 470/625 nm;
- 10 (f) si la razón de 470/625 nm está por encima de un tercer valor predeterminado, concluir que la muestra de orina no tiene color suficiente para afectar a la conclusión alcanzada en la etapa (d); y
- (g) rechazar el valor calculado para la concentración de leucocitos.
- 15 12. Método según la reivindicación 11, en el que la reflectancia de la luz de dicho producto de reacción es a aproximadamente 520-570 nm.
- 20 13. Método según la reivindicación 11, en el que la reflectancia de la luz de dicho colorante de referencia es a aproximadamente 825 nm.
14. Método según la reivindicación 11, en el que la razón de dicho colorante de referencia con respecto a dicho éster hidrolizable es superior a aproximadamente el 0,5%, reduciendo así la interferencia de fondo del color de dicha muestra y dicha tira reactiva.
- 25 15. Método según la reivindicación 11, en el que dicho colorante de referencia se selecciona del grupo que consiste en compuestos de ftalocianina y naftalocianina, colorantes de complejos de metales, colorantes de polimetino, colorantes de di y trifenilmetano, colorantes de quinina, colorantes azoicos, colorantes de transferencia de carga y colorantes de resonancia de carga.
- 30 16. Método según la reivindicación 15, en el que dicho colorante de referencia es DTO 141.
17. Método según la reivindicación 11, en el que dicho éster hidrolizable es PPTA y dicha sal de diazonio es DSNA.
- 35 18. Método según la reivindicación 11, en el que se multiplica $L_{20} - L_{60}$ por 1000 y, en el que dicho primer valor predeterminado es 50.
19. Método según la reivindicación 11, en el que se multiplica L_{20} por 1000 y, en el que dicho segundo valor predeterminado es 700.
- 40 20. Método según la reivindicación 11, en el que se multiplica la razón de 470/625 nm por 1000 y, en el que dicho tercer valor predeterminado es 600.
- 45 21. Método según la reivindicación 11, en el que se combina dicho colorante de referencia con dichos reactivos.
22. Método según la reivindicación 11, en el que dicho colorante de referencia se ubica separado de dichos reactivos.

FIG.1

