

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 867**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 11/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2011 E 11172972 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2543998**

54 Título: **Método para la estandarización de resultados de medición en un sistema para la medición de la función de los trombocitos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2014

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
Patents and Licenses Emil-von-Behring-Strasse
76
35041 Marburg , DE**

72 Inventor/es:

RECHNER, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 524 867 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

Método para la estandarización de resultados de medición en un sistema para la medición de la función de los trombocitos.

5 La presente invención se encuentra en el área del diagnóstico de la coagulación, y hace referencia a métodos in vitro para la determinación de la función de los trombocitos con la ayuda de células de medida. Los métodos permiten la obtención de resultados de medición que se pueden comparar entre sí, independientemente del tipo de célula de medida utilizado.

10 Los procesos fisiológicos que, por una parte, garantizan la fluidez de la sangre en el sistema vascular y, por otra parte, evitan pérdidas de sangre extravasculares mediante la formación de coágulos, se resumen bajo el término hemostasia. En la regulación de la hemostasia participan una pluralidad de factores proteicos, así como componentes celulares, como por ejemplo, los trombocitos (plaquetas sanguíneas). En el caso de un daño vascular, en primer lugar se fijan trombocitos sobre el colágeno subendotelial. La adhesión mencionada se obtiene mediante proteínas adhesivas, como el factor de Willebrand (VWF). Durante el proceso de adhesión se activan los trombocitos, y se liberan mediadores de sus gránulos, con lo cual se induce la agregación de trombocitos
15 adicionales, así como un refuerzo de la activación. De esta manera, se realiza un cierre primario de las paredes vasculares (hemostasia primaria), que se estabiliza mediante otras reacciones adicionales del sistema de coagulación plasmático (hemostasia secundaria). Las regulaciones erróneas de los procesos mencionados, pueden conducir a una tendencia a la trombosis o a una tendencia a la hemorragia y, según la gravedad, puede presentar consecuencias que representan un peligro para la vida.

20 En el diagnóstico de la coagulación se conocen diferentes métodos y sistemas, con la ayuda de los cuales se puede determinar si la sangre de un paciente puede coagular perfectamente, o si existe una coagulación deficiente. En el caso de una coagulación deficiente, resulta necesario generalmente conocer con precisión la causa de la deficiencia existente, para poder seleccionar las medidas terapéuticas óptimas. Una función parcial importante del sistema de coagulación, que se puede investigar puntualmente, es la hemostasia primaria que depende esencialmente de la capacidad funcional de los trombocitos.
25

Un método conocido para la investigación de la función de los trombocitos, es la determinación del tiempo de hemorragia. En este caso, se trata de una prueba global in vivo, que detecta la hemostasia primaria. El tiempo de hemorragia se determina en tanto que al paciente se le causa una pequeña herida de corte o pinchazo, y se mide el tiempo hasta la detención de la hemorragia. Se trata de una prueba que difícilmente se puede estandarizar y es
30 informativa a grandes rasgos, que se utiliza principalmente en situaciones de emergencia para obtener un panorama general de la hemostasia primaria. La toma de inhibidores de la agregación de trombocitos, conduce a una prolongación del tiempo de hemorragia. En la determinación del tiempo de hemorragia, resulta una desventaja que durante un tiempo normal de hemorragia, no se pueda excluir una deficiencia en la función de los trombocitos.

35 Los métodos in vitro permiten una detección esencialmente más sensible de las deficiencias de la función de los trombocitos. En los métodos mencionados, en una muestra de sangre completa o en una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP), se induce convencionalmente la agregación de trombocitos mediante la adición de un agente activador, y se mide la reacción de la agregación. Los agentes activadores más utilizados, que se utilizan para la inducción de la agregación de trombocitos, son: ADP (adenosin-5'-difosfato), colágeno, epinefrina (adrenalina), ristocetina y diferentes combinaciones de ellos, así como trombina, TRAP (proteína activadora del receptor de trombina), U-46619, heparina (particularmente en el caso de trombocitopenia inducida por heparina) o serotonina.
40

Un sistema conocido para la determinación in vitro de la función de los trombocitos, es el denominado sistema analizador de la función plaquetaria, es decir, el sistema PFA (PFA-100®, PFA-200, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania). Con la ayuda del sistema PFA, en las muestras de sangre completa se mide la hemostasia primaria bajo las condiciones del flujo y, de esta manera, en presencia de fuerzas de corte elevadas.

45 Para la simulación de las condiciones del flujo y de las fuerzas de corte, como se presentan en los vasos sanguíneos arteriales más pequeños, en una célula de medida PFA que se utiliza en la unidad de análisis de PFA, se genera una presión negativa de alrededor de -40 mbar, y la sangre completa tratada con citrato que se encuentra en un depósito de muestras, fluye a través del tubo capilar que presenta un diámetro de alrededor de 200 µm. Los tubos capilares desembocan en una cámara de medición que se encuentra cerrada con un elemento de separación, por ejemplo, una membrana, la cual presenta un orificio central capilar (abertura), a través del cual pasa la sangre
50 debido a la presión negativa. En la mayoría de los casos, en la membrana, al menos, en la zona alrededor de la abertura, se adiciona uno o una pluralidad de agentes activadores que inducen la agregación de los trombocitos, de manera que la sangre que fluye, entre en contacto con las sustancias que inducen la agregación, en la zona de la abertura. Debido a la adhesión y a la agregación inducida de los trombocitos, en la zona de la abertura se conforma un tapón de trombocitos (trombo) que cierra el orificio de la membrana y detiene el flujo sanguíneo. En el sistema mencionado, se mide el tiempo requerido hasta el cierre del orificio de la membrana. El tiempo de obturación mencionado presenta correlación con la capacidad funcional de los trombocitos. Una célula de medida para utilizar
55

5 en un método para la determinación de la función de los trombocitos mediante el tiempo de obturación, se describe, por ejemplo, en el documento de la patente WO 97/34698. Hasta el momento, en el método para la determinación del tiempo de obturación, se utilizan células de medida que se encuentran dotadas de una membrana que se encuentra recubierta con colágeno (Kol) y adicionalmente ya sea con ADP o con epinefrina (Epi). Otras células de medida que resultan apropiadas particularmente para la determinación de antitrombóticos a partir del grupo de los antagonistas de P2Y(12), como por ejemplo, de Clopidogrel, están provistas con una membrana que presenta ADP y prostaglandina E1 (INNOVANCE® PFA P2Y, EP-A1-1850134).

Un método conocido para la determinación de la función de los trombocitos en una muestra, mediante un sistema PFA, comprende las siguientes etapas del método:

- 10 a) Utilización de una célula de medida, en donde la célula de medida presenta los siguientes elementos:
- i) una cámara de retención para retener la muestra,
 - ii) un tubo capilar, a través del cual la muestra se conduce desde la cámara de retención hacia una cámara de medición,
 - 15 iii) una cámara de medición que se divide en dos compartimentos mediante un elemento de separación, en donde el primer compartimento recibe la muestra que proviene del tubo capilar,
 - iv) un elemento de separación que divide la cámara de medición en dos compartimentos y que presenta un orificio, a través del cual la muestra puede fluir desde el primer compartimento hacia el segundo compartimento;
- b) Llenado de la cámara de retención de la célula de medida con la muestra;
- 20 c) Posicionamiento de la célula de medida en un dispositivo para la determinación automática de la función de los trombocitos, en donde el dispositivo presenta los siguientes elementos:
- i) Medios para la aplicación de una presión negativa en la cámara de medición de la célula de medida,
 - ii) Medios para la determinación del volumen completo, el cual se obtiene mediante la aplicación de una presión negativa desde la célula de medida, cuando en la cámara de medición de la célula de medida se aplica una presión negativa;
 - 25 d) Aplicación de una presión negativa en la cámara de medición de la célula de medida, y conducción de la muestra a través del tubo capilar y a través del orificio del elemento de separación.

El volumen completo que se obtiene mediante la aplicación de una presión negativa desde la célula de medida, se determina de manera continua. A partir del volumen que se obtiene por unidad de tiempo desde la célula de medida, se determina el caudal ($\mu\text{L}/\text{min}$).

30 El caudal decrece convencionalmente a lo largo del tiempo, dado que el tapón de trombocitos estrecha progresivamente la abertura y, de esta manera, dificulta el paso del líquido de la muestra.

Como resultado de la prueba, se proporciona el tiempo de obturación en segundos. El tiempo de obturación se define como el momento en el que el caudal es menor al 10% del caudal inicial, por una duración de tres segundos. El caudal inicial es el caudal al comienzo de la medición, cuando en la abertura aún no se ha formado un tapón de trombocitos, pero el volumen muerto ya ha sido obtenido del sistema.

35 En el caso que el tiempo de obturación de la muestra de un paciente difiera del rango de referencia, esto indica una deficiencia en la función de los trombocitos. Los tiempos de obturación prolongados indican una función de los trombocitos en el sentido de una capacidad de agregación reducida. Los tiempos de obturación reducidos indican una función de los trombocitos en el sentido de una capacidad de agregación incrementada.

40 El tiempo de obturación de una muestra de un donante sano, con una función normal de los trombocitos, depende de una pluralidad de factores.

En primer lugar, el tiempo de obturación es influenciado por el tipo de célula de medida utilizado. Como se ha explicado anteriormente, se utilizan células de medida que presentan diferentes combinaciones de activadores o inhibidores de trombocitos. Cuando se utiliza una célula de medida (Kol/Epi) que contiene colágeno y epinefrina, el tiempo de obturación de una muestra normal se encuentra entre los 84-160 segundos. Cuando se utiliza una célula de medida (Kol/ADP) que contiene colágeno y ADP, el tiempo de obturación de una muestra normal se encuentra

entre los 68-121 segundos. Cuando se utiliza una célula de medida (ADP/PGE 1) que contiene ADP y prostaglandina E1, el tiempo de obturación de una muestra normal es inferior a los 106 segundos. Las diferencias considerables de los rangos de referencia, presentan la desventaja de que un tiempo de obturación como tal, no resulta de gran valor informativo, sino que siempre se debe interpretar en relación con el tipo de célula de medida utilizada. Un tiempo de obturación de, por ejemplo, 130 segundos, es un resultado normal en las células de medida de colágeno/epinefrina y, por el contrario, en las células de medida de colágeno/ADP o ADP/PGE1, es un resultado anormal que permite deducir una tendencia a la hemorragia.

Otro factor que influye en el tiempo de obturación, es la arquitectura de las células de medida. Diferentes diámetros de la abertura o de los tubos capilares influyen en la formación del trombo y, de esta manera, en la velocidad con la cual se obtura la abertura.

Por consiguiente, resulta conveniente perfeccionar el método anteriormente descrito, para la determinación de la función de los trombocitos, de manera que la medición de la función de los trombocitos se pueda unificar y estandarizar en un sistema PFA para todos los tipos de células de medida utilizadas, de manera que se puedan comparar los resultados de medición entre sí directamente, independientemente del tipo de célula de medida utilizado.

El objeto mencionado se resuelve mediante la determinación del volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido a través del orificio del elemento de separación, y mediante la comparación del valor determinado del volumen de la muestra con un valor de volumen de muestra de referencia para una función normal de los trombocitos.

La determinación del volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido a través del orificio del elemento de separación, se realiza preferentemente mediante la medición del volumen completo, el cual se obtiene mediante la aplicación de una presión negativa desde la célula de medida, y la determinación de la diferencia entre el volumen completo medido, y el volumen muerto de la célula de medida utilizada.

La medición del volumen completo, el cual se obtiene mediante la aplicación de una presión negativa desde la célula de medida, cuando en la cámara de medición de la célula de medida se aplica una presión negativa, se puede determinar de una manera conocida, mediante la medición del volumen que obtiene el medio para la aplicación de una presión negativa en la cámara de medición de la célula de medida, desde la célula de medida. El medio para la aplicación de una presión negativa está conformado preferentemente por un cilindro con un émbolo, en donde el émbolo se puede desplazar en el sentido axial del cilindro, mediante un motor paso a paso y un vástago del émbolo. Mediante el desplazamiento del émbolo se genera una presión negativa en la célula de medida. En la cámara de medición de la célula de medida o bien, en el espacio que se conforma mediante la conexión de la célula de medida con el cilindro, y en el cual se genera la presión negativa, un sensor de presión mide la presión existente. En un dispositivo de control se compara la presión medida con un valor nominal predeterminado de la presión. Cuando la sangre fluye hacia los tubos capilares, se incrementa la presión. Para mantener constante la presión, por ejemplo, en -40 mbar, el dispositivo de control controla el motor paso a paso que desplaza axialmente el émbolo en correspondencia. Mediante el trayecto recorrido del émbolo en el cilindro, con un diámetro conocido, se puede calcular el volumen completo, el cual se obtiene de la célula de medida.

El volumen completo que se obtiene de la célula de medida, está conformado por el volumen muerto de la célula de medida y el volumen de la muestra separada efectivamente a través del orificio del elemento de separación (volumen de la muestra). La diferencia entre el volumen completo medido y el volumen muerto conocido, específico de la célula de medida, da como resultado el volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido o hasta alcanzar la obturación de la abertura a través del orificio del elemento de separación.

El volumen muerto de una célula de medida corresponde al volumen que cuando en la cámara de medición de la célula de medida se aplica una presión negativa, pasa a través del orificio del elemento de separación, antes de que atravesase por primera vez líquido de la muestra a través del elemento de separación. El volumen muerto de una célula de medida está conformado generalmente por aire contenido particularmente en el tubo capilar de la célula de medida, y en el compartimento de la cámara de medición dispuesto antes del elemento de separación, el cual recibe la muestra que proviene del tubo capilar.

El volumen muerto depende de la arquitectura de la célula de medida. El volumen muerto de un tipo particular de célula de medida, se puede calcular o se puede determinar previamente de manera experimental. Para la determinación experimental, se determina preferentemente el volumen muerto de una pluralidad de células de medida del mismo tipo, y el valor promediado de los volúmenes muertos medidos se utiliza como el volumen muerto para las células de medida de la clase mencionada.

De manera alternativa, la determinación del volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido a través del orificio del elemento de separación, se puede realizar mediante la determinación eléctrica u óptica del nivel del volumen de la muestra en el segundo compartimento de la cámara de medición.

5 A continuación, el valor determinado del volumen de la muestra, se compara con un valor de volumen de muestra de referencia para una función normal de los trombocitos.

10 El valor de volumen de muestra de referencia para una función normal de los trombocitos, depende del tipo de célula de medida utilizado, y se determina previamente de manera experimental. Para la determinación experimental, el volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido o hasta alcanzar la obturación de la abertura a través del orificio del elemento de separación, de una cantidad suficientemente grande de muestras, evidentemente de donantes de sangre sanos (muestras normales), se determina en células de medida del mismo tipo, y el valor promediado de los volúmenes medidos de las muestras se utiliza como el valor de referencia para el volumen de la muestra, para células de medida del tipo mencionado.

15 Preferentemente, el volumen determinado de la muestra se expresa en relación con un valor de referencia para el volumen de la muestra, para una función normal de los trombocitos. En este caso, el valor de referencia para el volumen de la muestra, para una función normal de los trombocitos, asciende de una manera particularmente preferente al 100 %. Un resultado de la prueba determinado de esta manera, es una medida para la función de los trombocitos en comparación con la norma (% de la norma). También se puede denominar hemostasia primaria de capacidad 1 (PHC 1).

Una fórmula para realizar el cálculo, consiste, por ejemplo, en ("fórmula (1) "):

$$20 \quad \text{PHC (1) \%} = \frac{(\text{TV}_{\text{promedio}} - \text{DV}_{\text{promedio}}) \times 100}{(\text{TV} - \text{DV}_{\text{promedio}})}$$

en donde

TVpromedio = promedio del valor del volumen completo para una función normal de los trombocitos,

DVpromedio = promedio del volumen muerto del tipo de célula de medida utilizada,

TV = volumen completo de la muestra a analizar.

25 El objeto conforme a la presente invención se resuelve también mediante la determinación del volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido a través del orificio del elemento de separación, y mediante la determinación del caudal inicial, y a continuación mediante el establecimiento de la diferencia entre el quíntuplo del caudal inicial, y el volumen de la muestra, y la comparación de la diferencia con un valor diferencial de referencia para una función normal de los trombocitos.

30 La determinación del volumen de la muestra se realiza de la manera anteriormente descrita.

35 El caudal inicial es el caudal máximo del líquido de la muestra, al comienzo de la medición. La determinación del caudal inicial se realiza preferentemente mediante la determinación continua del caudal, es decir, del volumen que se obtiene por unidad de tiempo desde la célula de medida, desde el comienzo de la medición, es decir, desde el momento en el cual se aplica una presión negativa en la cámara de medición de la célula de medida. Completamente al comienzo de la medición, entre otros, debido al volumen muerto aspirado en primer lugar, se presentan determinadas fluctuaciones en el caudal hasta que finalmente se ajusta un caudal que decrece de manera continua. El caudal inicial se define como el caudal que ha sido medido antes de que el caudal disminuyera de manera continua, exclusivamente durante, al menos, 10 segundos.

40 Se establece la diferencia entre el quíntuplo del caudal inicial determinado, y el volumen determinado de la muestra, y la diferencia se compara con un valor diferencial de referencia para una función normal de los trombocitos.

45 El valor diferencial de referencia se determina individualmente para cada medición de una muestra, en tanto que se establece la diferencia entre el quíntuplo del caudal inicial medido, específico de la muestra, y el valor de referencia para el volumen de la muestra, para una función normal de los trombocitos. La determinación del valor de referencia para el volumen de muestra, para una función normal de los trombocitos, se realiza de la manera anteriormente descrita.

Preferentemente, la diferencia determinada entre el quintuplo del caudal inicial determinado, y el volumen determinado de la muestra, se proporciona en relación con un valor diferencial de referencia para una función normal de los trombocitos. En este caso, el valor diferencial de referencia, para una función normal de los trombocitos, asciende de una manera particularmente preferente al 100 %. Un resultado de la prueba determinado de esta manera, es una medida para la función de los trombocitos en comparación con la norma (% de la norma). También se puede denominar hemostasia primaria de capacidad 2 (PHC 2).

Una fórmula para realizar el cálculo, consiste, por ejemplo, en ("fórmula (2) "):

$$PHC(2) \% = \frac{(5 \text{ min} \times IF - (TV - DV_{\text{promedio}})) \times 100}{5 \text{ min} \times IF - (TV_{\text{promedio}} - DV_{\text{promedio}})}$$

en donde

10 IF = caudal inicial de la muestra a analizar,

TVpromedio = promedio del valor del volumen completo para una función normal de los trombocitos,

DVpromedio = promedio del volumen muerto del tipo de célula de medida utilizada,

TV = volumen completo de la muestra a analizar.

15 La ventaja de la presente invención consiste en que independientemente del tipo de célula de medida utilizada, es decir, independientemente del tipo de sustancias utilizadas para la activación o la inhibición de los trombocitos, e independientemente de la arquitectura de la célula de medida, las muestras con una función reducida de los trombocitos (riesgo de hemorragia) presentan siempre resultados de prueba menores al 100%, y las muestras con una función incrementada de los trombocitos (riesgo de trombosis) presentan siempre resultados de prueba mayores al 100%. Los rangos normales de los diferentes tipos de células de medida, no se diferencian entre sí en absoluto
20 debido a la estandarización mencionada.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1

25 La figura 1 muestra una curva convencional del flujo de una muestra de sangre completa, de un donante sano con una actividad normal de los trombocitos, en una célula de medida de INNOVANCE PFA P2Y. Después de fluctuaciones iniciales del caudal al comienzo de la medición, se ajusta un caudal que decrece de manera continua. El caudal que ha sido medido al comienzo de la disminución continua, representa el caudal inicial (IF). El tiempo de obturación (VZ) se define como el momento en el que el caudal es menor al 10% del caudal inicial, por una duración de tres segundos.

Figura 2

30 La figura 2 muestra la distribución y los percentiles de los valores de PHC(1) de determinaciones de la actividad de los trombocitos en muestras de sangre completas de donantes sanos (N = 138 donantes de sangre sanos) con células de medida de colágeno/epinefrina, colágeno/ADP y de INNOVANCE PFA P2Y- (P2Y). Se observa que el límite superior y el límite inferior del 95% de los intervalos centrales de PHC(1) de los tres tipos de células de medida, se encuentran muy próximos uno de otro.

Figura 3

35 La figura 3 muestra la distribución y los percentiles de los valores de PHC(2) de determinaciones de la actividad de los trombocitos en muestras de sangre completas de donantes sanos (N = 138 donantes de sangre sanos) con células de medida de colágeno/epinefrina, colágeno/ADP y de INNOVANCE PFA P2Y- (P2Y). También en este caso, se observa que el límite superior y el límite inferior del 95% de los intervalos centrales de PHC(2) de los tres tipos de células de medida, se encuentran muy próximos uno de otro.
40

Figura 4

La figura 4 muestra la distribución de los valores PHC(1) y PHC(2) de determinaciones de la actividad de los trombocitos en muestras de sangre completas en pacientes cardiológicos antes (N = 23) y después (N = 23) de la

toma de Clopidogrel, con células de medida de INNOVANCE PFA P2Y. Se observa que tanto PHC(1) como PHC(2), también ante una función considerablemente reducida de los trombocitos, proporcionan resultados diferenciables.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos explican la presente invención y no se deben entender como una limitación.

5 **Ejemplo 1:** Determinación de la función de los trombocitos en % de la norma, mediante PHC(1) y PHC(2) en muestras de donantes sanos

10 Las muestras de sangre de 138 donantes de sangre sanos, en citrato de sodio tamponado del 3,2 % y del 3,8 %, han sido medidas mediante una determinación doble con tres tipos diferentes de células de medida PFA en una unidad de PFA (PFA-100, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH). Se han utilizado células de medida que se encuentran dotadas de una membrana, la cual se encuentra recubierta con colágeno (Kol) y con ADP (Kol/ADP), o que se encuentra recubierta con colágeno (Kol) y con epinefrina (Epi) (Kol/Epi), o que se encuentra recubierta con ADP y prostaglandina E1 (INNOVANCE® PFA P2Y, de manera abreviada P2Y). A partir de los datos brutos determinados por la unidad, han sido determinados el volumen completo, el volumen muerto (el volumen de aire que se obtiene de la célula de medida durante los primeros cuatro segundos de la medición) y el caudal inicial. A partir del volumen completo y del volumen muerto de todas las mediciones (cuatro mediciones con células de medida de P2Y o bien, dos mediciones con células de medida de colágeno/epinefrina y colágeno/ADP para cada donante), se ha calculado el promedio del valor del volumen completo para una función normal de los trombocitos TVpromedio, es decir, el valor de referencia para el volumen de muestra para una función normal de los trombocitos, y el promedio del volumen muerto del tipo de célula de medida utilizada DVpromedio. Los valores promedio se representan en la tabla 1.

Tabla 1

Tipo de célula de medida	TVpromedio [μl]	DVpromedio [μl]
Colágeno/ADP	300	159
Colágeno/epinefrina	350	159
P2Y	223	144

Los valores promedio mencionados han sido utilizados en las fórmulas anteriormente mencionadas (1) y (2), como constantes para el cálculo de la función de los trombocitos en % de la norma de cada muestra.

25 La distribución de los valores de PHC(1) normalizados, se muestra en la figura 2. La distribución de los valores de PHC(2), se muestra en la figura 3.

30 Se observa que el límite superior y el límite inferior del 95% de los intervalos centrales de PHC(1) y de PHC(2) de los tres tipos de células de medida, se encuentran oportunamente muy próximos uno de otro. Las pequeñas diferencias se atribuyen a la característica de las células de medida, por ejemplo, la magnitud y la concentración de los agonistas de trombocitos utilizados.

Con el método conforme a la presente invención, los resultados determinados para la función de los trombocitos, se pueden comparar directamente entre sí, independientemente del tipo de célula de medida utilizado.

Ejemplo 2: Determinación de la función de los trombocitos en % de la norma, mediante PHC(1) y PHC(2) en muestras de pacientes anticoagulados

35 La influencia de la toma de Clopidogrel, un inhibidor de la función de los trombocitos, sobre los valores de PHC(1) y PHC(2) de mediciones de INNOVANCE PFA P2Y, ha sido analizada mediante pacientes cardiológicos. Para el fin mencionado, se les ha extraído sangre a los pacientes respectivamente antes y, al menos, 4 horas después de la toma de Clopidogrel (300 mg) en 3,2 % de citrato de sodio tamponado, y se ha medido la actividad de los trombocitos con células de medida INNOVANCE PFA P2Y. Para el cálculo de la función de los trombocitos en % de la norma de cada muestra, se han utilizado los valores promedio como se muestra en la tabla 1. En la figura 4 se muestran los valores de PHC(1) y PHC(2) antes y después de la toma de Clopidogrel.

Además, se muestra que tanto PHC(1) como PHC(2), también ante una función considerablemente reducida de los trombocitos, proporcionan resultados diferenciables, hecho que no sucede en el caso del tiempo de obturación utilizado generalmente, dado que por lo tanto todos los resultados se informan como >300 s.

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de la función de los trombocitos en una muestra, en donde el método comprende las siguientes etapas:

a) Utilización de una célula de medida, en donde la célula de medida presenta los siguientes elementos:

5 i) una cámara de retención para retener la muestra,

ii) un tubo capilar, a través del cual se conduce la muestra desde la cámara de retención hacia una cámara de medición,

iii) una cámara de medición que se divide en dos compartimentos mediante un elemento de separación, en donde el primer compartimento recibe la muestra que proviene del tubo capilar,

10 iv) un elemento de separación que divide la cámara de medición en dos compartimentos y que presenta un orificio, a través del cual la muestra puede fluir desde el primer compartimento hacia el segundo compartimento;

b) Llenado de la cámara de retención de la célula de medida con la muestra;

c) Posicionamiento de la célula de medida en un dispositivo para la determinación automática de la función de los trombocitos, en donde el dispositivo presenta los siguientes elementos:

15 i) Medios para la aplicación de una presión negativa en la cámara de medición de la célula de medida,

ii) Medios para la determinación del volumen completo, el cual se obtiene mediante la aplicación de una presión negativa desde la célula de medida, cuando en la cámara de medición de la célula de medida se aplica una presión negativa;

20 d) Aplicación de una presión negativa en la cámara de medición de la célula de medida, y conducción de la muestra a través del tubo capilar y a través del orificio del elemento de separación;

caracterizado porque el método comprende, además, las siguientes etapas:

e) Determinación del volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido a través del orificio del elemento de separación, y

25 f) Comparación del volumen determinado de la muestra, con un valor de volumen de muestra de referencia para el funcionamiento normal de los trombocitos; o

g) Determinación del volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido a través del orificio del elemento de separación, y

h) Determinación del caudal inicial, y

30 i) Establecimiento de la diferencia entre el quíntuplo del caudal inicial, y el volumen de la muestra, y comparación de la diferencia con un valor diferencial de referencia para la función normal de los trombocitos.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa e) o en la etapa g), la determinación del volumen de la muestra, el cual se presenta dentro de un intervalo de tiempo definido a través del orificio del elemento de separación, se realiza mediante la medición del volumen completo, el cual se obtiene mediante la aplicación de una presión negativa desde la célula de medida, y la determinación de la diferencia entre el volumen completo medido, y el volumen muerto de la célula de medida utilizada.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa f) el volumen determinado de la muestra se expresa en relación con un valor de referencia para el volumen de la muestra, para la función normal de los trombocitos.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el valor de referencia para el volumen de la muestra, para la función normal de los trombocitos, asciende al 100 %.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa i) la diferencia obtenida se expresa en relación con un valor diferencial de referencia para la función normal de los trombocitos.

6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el valor diferencial de referencia para la función normal de los trombocitos, asciende al 100 %.

FIG 1

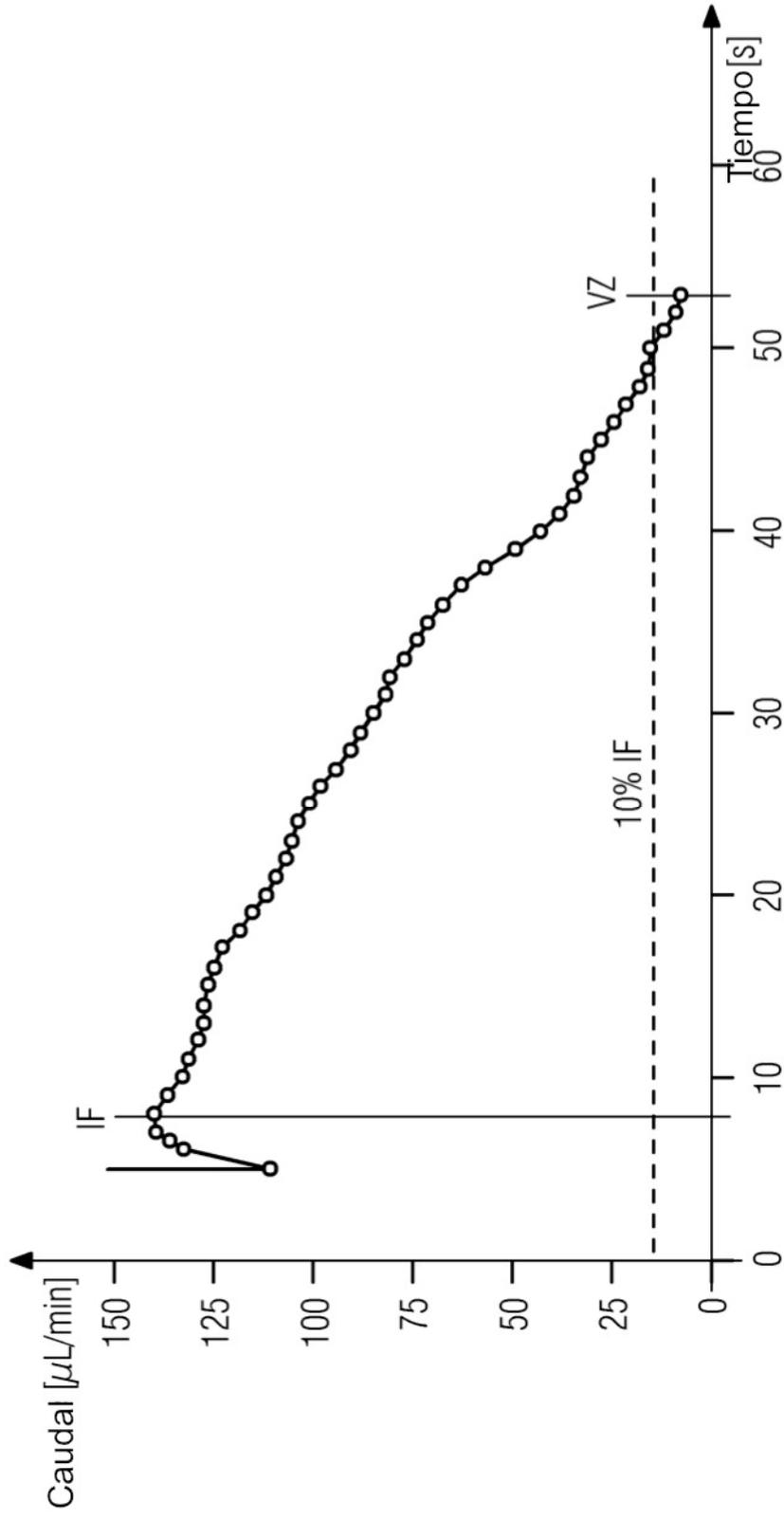


FIG 2

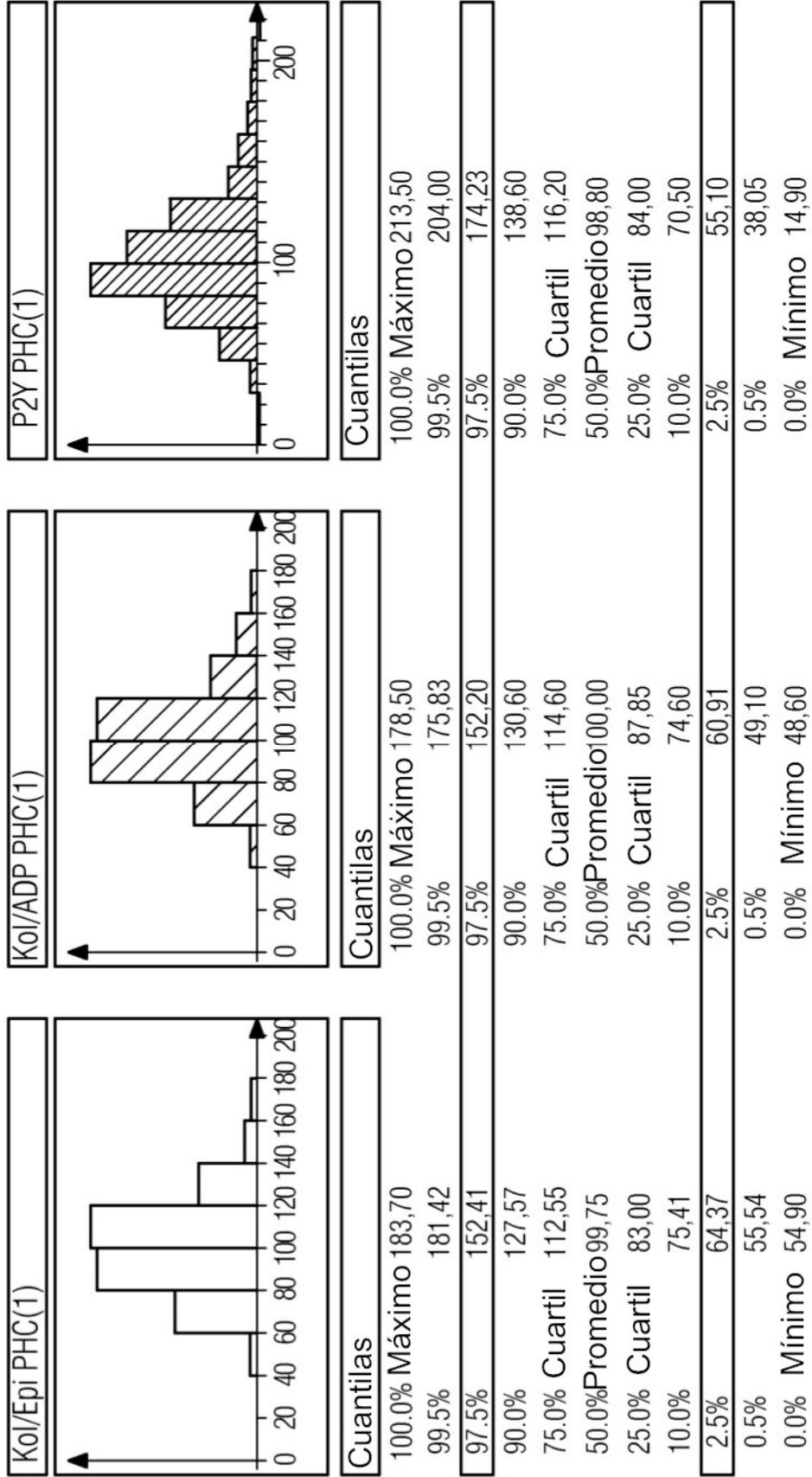


FIG 3

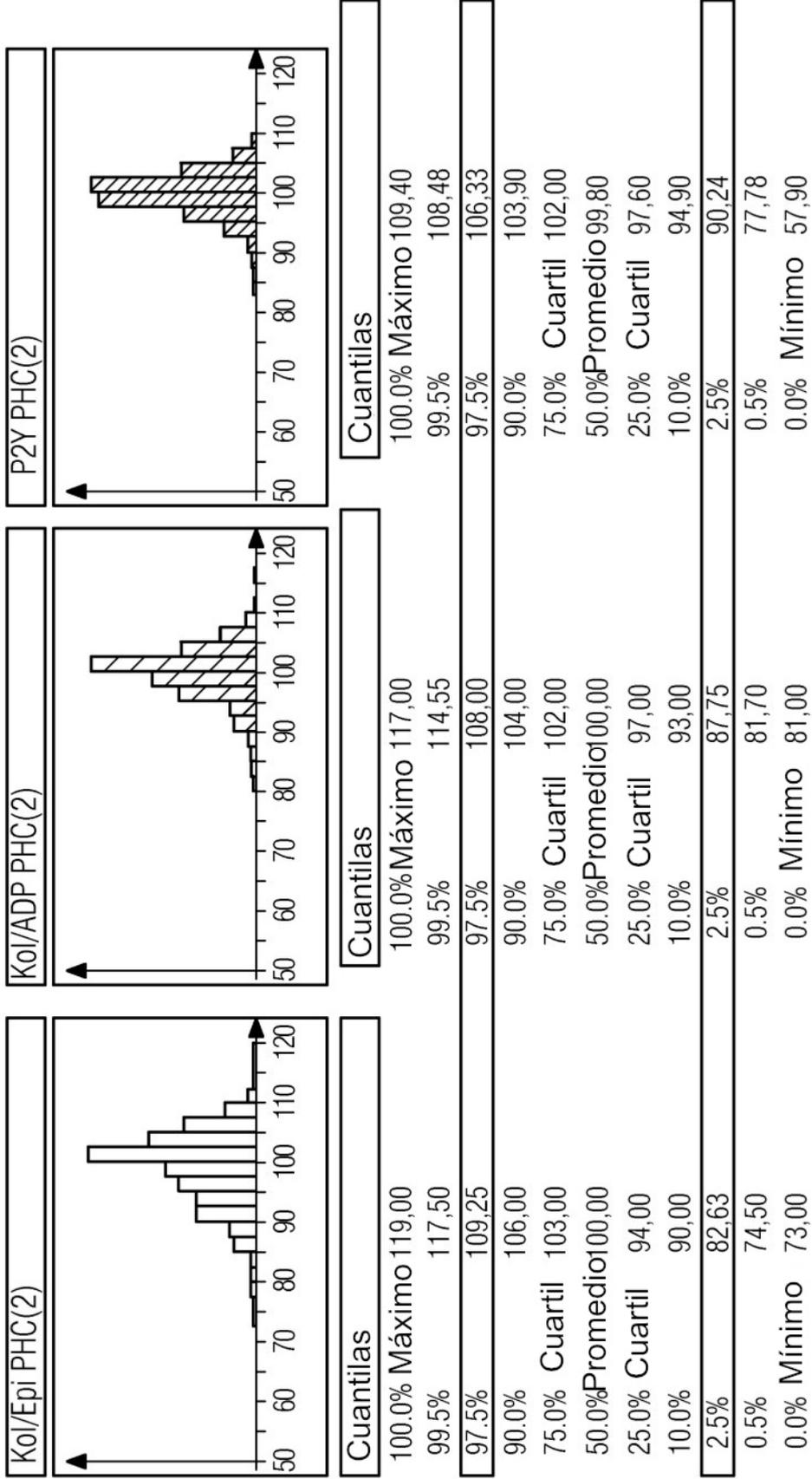


FIG 4

