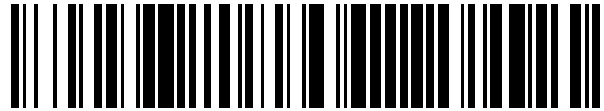


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 967**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/03** (2006.01)

**G01N 33/49** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2009 E 09010109 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2159565**

54 Título: **Microcubeta desechable para determinar el contenido en hemoglobina de la sangre entera**

30 Prioridad:

**25.08.2008 DE 102008039810**

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

**16.06.2015**

73 Titular/es:

**EKF - DIAGNOSTIC GMBH (100.0%)  
EBENDORFER CHAUSSEE 3  
39179 BARLEBEN, DE**

72 Inventor/es:

**DUMSCHAT, CHRISTA, DR.;  
HENSEL, SIKE y  
HIRSCHFELDER, MONIKA, DR.**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 537 967 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).

**MICROCUBETA DESECHABLE PARA DETERMINAR EL CONTENIDO EN HEMOGLOBINA DE LA SANGRE ENTERA****DESCRIPCIÓN**

5

La invención se refiere a una microcubeta desechable para determinar el contenido en hemoglobina de la sangre entera sin transformación química de la hemoglobina, con una cavidad con forma de intersticio, configurada para aspirar la sangre entera hacia el interior de la cavidad de la cubeta mediante una fuerza capilar y que al menos en una zona está limitada por dos paredes de la cubeta esencialmente paralelas, que en su superficie orientada hacia la cavidad están recubiertas al menos parcialmente por un agente hemolizante seco, pudiendo disolverse el agente hemolizante mediante la sangre entera y siendo adecuado para la hemólisis de células de sangre y siendo translúcidas las paredes de la cubeta al menos en algunas zonas para fines de medida.

10

15

Una microcubeta desechable para determinar la hemoglobina se conoce por ejemplo por el documento US 5,674,457. La microcubeta se fabrica preferiblemente como pieza moldeada por inyección en una sola pieza a partir de un plástico transparente adecuado, que en las zonas translúcidas de las paredes de la cubeta está pulida ópticamente, para poder realizar una medición sin perturbaciones de una reacción cromogénica. Las paredes interiores de la cavidad están recubiertas con un reactivo seco, compuesto por desoxicolato sódico, azida sódica y nitrito sódico. Para determinar la hemoglobina en una muestra de sangre entera se utiliza así el método de la azida-metahemoglobina, en el que se utilizan tres reactivos. Como agente hemolizante se utiliza por ejemplo desoxicolato sódico, que disuelve o deshace las paredes celulares de los glóbulos rojos. La hemoglobina antes incluida en los eritrocitos se encuentra así como solución libre.

20

25

Mediante otro reactivo, nitrito sódico ( $\text{NaNO}_2$ ), se oxida el hierro divalente de la oxihemoglobina y de la desoxihemoglobina para formar hierro trivalente en la metahemoglobina. Los iones azida del tercer reactivo, azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) forman con la metahemoglobina un complejo de color que presenta máximos de absorción a 540 y 575 nm y por ello puede determinarse cuantitativamente de forma fotométrica. Se realiza adicionalmente una medición de control para una longitud de onda en la que ninguna de las formas de hemoglobina relevantes presenta una absorción perceptible. La medición de control sirve por lo tanto para la compensación de la turbiedad en la trayectoria óptica del rayo y se realiza por ejemplo para una longitud de onda de 880 nm.

30

35

Las microcubetas desechables sirven para una determinación rápida y económica del contenido en hemoglobina, por ejemplo para una prueba de selección de donantes de sangre. Para lograr una secuencia efectiva, es deseable que el aparato medidor de la hemoglobina tenga un tiempo de medición lo más corto posible.

40

45

Se conoce además la realización de una hemólisis química o mecánica (mediante ultrasonido) de la muestra de sangre, sin una transformación química subsiguiente de la hemoglobina, por ejemplo en azida-metahemoglobina. Se mide entonces para determinadas longitudes de onda la absorción y se determina mediante un cálculo matricial la concentración total en hemoglobina y la de los derivados de la hemoglobina. Tales aparatos son usuales para los análisis clínicos, por ejemplo en unidades de cuidados intensivos. De manera similar se da a conocer en el documento WO02/01195A1 la realización solamente de la hemodiálisis mediante un agente hemolizante, preferiblemente desoxicolato sódico, desoxicolato potásico o una mezcla de ambos, sin una subsiguiente reacción con un nitrito y/o una azida. Estos reactivos adicionales se consideran higroscópicos y se les responsabiliza de una insuficiente posibilidad de almacenamiento de las microcubetas. Al faltar la transformación química de las formas de hemoglobina, se realiza una medición de absorción entre 490 y 520 nm. La medición de compensación para tener en cuenta la turbiedad se realiza en la gama usual entre 850 y 910 nm. Con este procedimiento se puede acortar un cierto tiempo de reacción, al no necesitarse las transformaciones químicas de la sangre hemolizada.

50

55

No obstante, la absorción de la sangre entera hacia el interior de la cavidad de la cubeta debido a una fuerza capilar es problemática. Cuando se utiliza desoxicolato como agente hemolizante tiene lugar una absorción muy retardada de la gota de sangre hacia el interior de la cavidad de la cubeta. En muchos casos no se realiza en absoluto la absorción o bien implica una perjudicial formación de pequeñas burbujas de aire. La aceleración que se pretende del proceso de medida no puede lograrse por lo tanto en la práctica de esta manera.

60

65

El documento DE 10 2006 025 477 A1 da a conocer una microcubeta desechable que sirve para alojar una gota de sangre en la cavidad de la microcubeta mediante absorción de la gota de sangre. Mediante el reactivo que se encuentra sobre las paredes de la cubeta paralelas entre sí que limitan la cavidad (es decir, sobre las paredes interiores) se hemoliza la sangre, es decir, debe poder disolverse mediante la sangre entera. En consecuencia el agente hemolizante, es decir, el reactivo aplicado sobre las paredes interiores de la cubeta, es ya suficientemente hidrófilo como para disolverse en la sangre acuosa conocida.

La presente invención parte de la problemática de lograr una aceleración de la secuencia desde la absorción de la gota de sangre hasta la realización de la medición con dictamen válido.

5 Para solucionar esta tarea se prevé en el marco de la invención en una microcubeta desechable del tipo citado al principio que con el agente hemolizante se deposite sobre las paredes al menos un aditivo y que al menos un aditivo presente la forma de una sal inerte o de una mezcla de sales inertes, con lo que la sangre entera puede absorberse mejor y más rápidamente hacia dentro de la cavidad.

10 Mientras los enfoques pasados destinados a acelerar el procedimiento de medida estaban orientados a la transformación química de la sangre con reactivos adecuados, se logra con la presente invención una aceleración del proceso de medida mediante la aceleración de procesos físicos. La adición de una sal inerte, es decir, no reactiva en relación con la hemoglobina, conduce sorprendentemente a que la sangre entera se absorba bastante mejor y más rápidamente hacia dentro de la cavidad con forma de intersticio de la microcubeta desechable mediante efectos capilares y además a que el agente hemolizante se disuelva más rápidamente en la sangre entera, con lo que se acelera la acción hemolizante sobre las células de la sangre. Es de especial importancia entonces la mejora del comportamiento en cuanto a absorción para las gotas de sangre hacia dentro de la cavidad con forma de intersticio de la microcubeta, ya que entonces se alcanza una aceleración en al menos el factor 2.

20 El efecto correspondiente a la invención de la absorción acelerada de la gota de sangre hacia dentro de la cavidad con forma de intersticio mejora aún más cuando sobre las caras interiores de las paredes de la cubeta se deposita como aditivo adicional un polímero no reactivo soluble en agua. En combinación con la sal inerte se logra así una aceleración adicional del comportamiento en cuanto a absorción.

25 Un efecto acelerador similar se logra, también de forma acumulativa, depositando sobre las caras interiores de las paredes de la cubeta un anticoagulante, como activo adicional. Puesto que el anticoagulante origina una aceleración de la gota de sangre absorbida hacia dentro de la cavidad con forma de intersticio bajo el efecto capilar, hay que suponer que la perturbación de la absorción de la gota de sangre en las microcubetas utilizadas hasta ahora resulta también de fenómenos de coagulación y agrupamientos en la sangre.

30 Finalmente se prevé en el marco de la invención que además del agente hemolizante se deposite como aditivo adicional un colorante sobre las paredes. De esta manera es posible un control de calidad para el recubrimiento aplicado sobre las paredes interiores, que debido a la adición de colorante resulta visible y de esta manera puede comprobarse su uniformidad. La aplicación uniforme del recubrimiento - al menos en la zona de medición de la cubeta - es precisamente un criterio esencial relativo a la exactitud de la medición y es de importancia decisiva para lograr una absorción de la gota de sangre libre de pequeñas burbujas de aire.

40 Mediante la utilización de los citados aditivos es posible así crear una microcubeta que absorbe una gota de sangre rápidamente y sin perturbaciones (libre de pequeñas burbujas de aire), que posibilita una medición más rápida que hasta ahora.

45 El cuerpo de la microcubeta se fabrica preferiblemente en una sola pieza mediante el procedimiento de moldeado por inyección. En este caso se fabrica el recubrimiento del lado interior de la microcubeta introduciendo el agente hemolizante y con él el aditivo, de los que al menos hay uno, como solución en la cavidad, pudiendo evaporarse a continuación el disolvente. En consecuencia debe ser soluble el agente hemolizante mediante un disolvente adecuado, muy volátil, por ejemplo en alcohol. Los agentes hemolizantes son conocidos y se relacionan por ejemplo en el documento WO02/01195A1. Se prefiere utilizar desoxicolatos, como desoxicolato sódico, potásico, cálcico, de morfina y amónico. Se prefiere el desoxicolato sódico. La proporción de agente hemolizante en el recubrimiento es preferiblemente del 70 al 99,9% en peso. En la utilización preferente de varios aditivos, la proporción preferente del agente hemolizante es del 70 al 85% en peso.

55 La sal inerte añadida según la invención, que también puede estar constituida por una mezcla de varias sales, es por ejemplo cloruro sódico o cloruro potásico. La proporción de sal inerte en el recubrimiento es de 0,1 a 20% en peso, preferentemente de 0,2 a 10% en peso y más preferentemente de 0,5 a 2% en peso.

60 Ejemplos de polímeros solubles en agua no reactivos previstos como aditivo en el marco de la invención son glicol de polietileno, glicol de polipropileno, copolímeros de bloque de etileno y óxido de propileno, siliconas funcionalizadas, polivinilpirrolidonas, alcoholes polivinílicos, acetatos de polivinilo, polialquilenglicoléter (nombre comercial Brij), polietilensorbitanmonolaurato, polietilenglicolsorbitanmonolaurato, polietilenglicolsorbitanmonoestearato, polietilenglicolsorbitanoleato (nombre comercial Tween), octilglicósido, dietilenglicol, etilenglicol-diglicidiléter, glicerol. La proporción del polímero soluble en agua no reactivo en el recubrimiento es preferiblemente de 0,5 a 25% en peso, con preferencia de 12 a 24% en peso y más preferentemente de 15 a 20% en peso.

## ES 2 537 967 T3

- 5 Ejemplos de anticoagulantes adecuados como aditivo adicional son heparina y sales de heparina, como la heparina sódica, heparina potásica, heparina amónica y heparina de litio, citrato, fluoruro de sodio, ACD (ácido citrato dextrosa), yodoacetato, hirudina, oxalato, ácido acetilsalicílico y sales de los mismos, warfarina, cumarina y sus derivados, indano -1,3-diona, feprocumaron, dicumarol, marcumar, estreptoquinasa, uroquinasa, EDTA (ácido acético de etilendiamina o bien tetraacetato de etilendiamina).
- La proporción del anticoagulante como aditivo es preferiblemente de 0,05 a 5% en peso, preferiblemente de 1 a 3% en peso).
- 10 El colorante previsto como aditivo adicional puede elegirse a voluntad, siempre que el mismo no perjudique la reacción de hemólisis. La proporción de colorante en el recubrimiento es preferiblemente de 0,2 a 0,5% en peso.
- 15 La cavidad utilizada en la microcubeta tiene en la zona de medida preferiblemente una distancia entre las caras interiores de las paredes de la cubeta de 100 a 200  $\mu\text{m}$ . Fuera de la zona de medida, en particular en la zona de un intersticio de absorción para la gota de sangre, la distancia entre las paredes de la cubeta se encuentra preferiblemente entre 200 y 400  $\mu\text{m}$ . Así se facilita la absorción de la gota de agua en la cavidad con forma de intersticio. Dentro de la cavidad se forma así una transición con forma de escalón en la zona de medida que presenta una altura inferior de la cubeta, es decir, una distancia inferior
- 20 entre las caras interiores de las paredes de la cubeta. La zona de medida se caracteriza usualmente por las caras exteriores pulidas de las paredes de la cubeta, que favorecen que las paredes de la cubeta sean translúcidas sin perturbación alguna con la muestra de sangre contenida en la cavidad.
- 25 Como material para el cuerpo de la cubeta procede cualquier material de plástico transparente. Naturalmente para la fabricación del cuerpo de la cubeta en una sola pieza mediante el procedimiento de moldeo por inyección, debe poder someterse el plástico a moldeo por inyección.
- 30 Es posible también fabricar la microcubeta correspondiente a la invención como cubeta en al menos dos partes, cuyas dos partes pueden unirse entre sí de manera adecuada, por ejemplo mediante pegado. En este caso se facilita la aplicación del recubrimiento, ya que el recubrimiento sobre la cara interior de al menos una pared de la cubeta puede aplicarse mediante cualquier procedimiento. Al respecto es posible también prever el recubrimiento sólo sobre una pared interior. Desde luego se prefiere el recubrimiento de ambas paredes de la cubeta enfrentadas, al menos en la gama de medida de la microcubeta. En la forma constructiva de la microcubeta en dos partes puede estar compuesta la misma también por vidrio u otros
- 35 materiales transparentes.

**REIVINDICACIONES**

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
1. Microcubeta desechable para determinar el contenido en hemoglobina de la sangre entera sin transformación química de la hemoglobina, con una cavidad con forma de intersticio, configurada para aspirar la sangre entera hacia el interior de la cavidad de la cubeta mediante una fuerza capilar y que al menos en una zona está limitada por dos paredes de la cubeta esencialmente paralelas, que en su superficie orientada hacia la cavidad están recubiertas al menos parcialmente por un agente hemolizante seco, pudiendo disolverse el agente hemolizante mediante la sangre entera y siendo adecuado para la hemólisis de células de sangre y siendo translúcidas las paredes de la cubeta al menos en algunas zonas para fines de medida,  
**caracterizada porque** con el agente hemolizante para la absorción acelerada de la gota de sangre hacia dentro de la cavidad con forma de intersticio está depositado sobre las paredes al menos un aditivo y porque al menos un aditivo presenta la forma de una sal inerte o de una mezcla de sales inertes.
  2. Microcubeta desechable según la reivindicación 1,  
**caracterizada porque** la sal inerte o la mezcla de sales inertes significa una proporción de entre 0,1 y 20% de todo el recubrimiento, formada por el agente hemolizante y el aditivo, de los que al menos hay uno.
  3. Microcubeta desechable según la reivindicación 1 ó 2,  
**caracterizada porque** como aditivo adicional está depositado sobre las superficies de las paredes de la cubeta un polímero no reactivo soluble en agua.
  4. Microcubeta desechable según la reivindicación 3,  
**caracterizada porque** el polímero significa una proporción de 0,5 a 25% en peso del recubrimiento.
  5. Microcubeta desechable según una de las reivindicaciones 1 a 4,  
**caracterizada porque** como aditivo adicional está depositado sobre las superficies de las paredes de la cubeta un anticoagulante.
  6. Microcubeta desechable según la reivindicación 5,  
**caracterizada porque** el anticoagulante significa una proporción de 0,05 a 5% en peso del recubrimiento.
  7. Microcubeta desechable según una de las reivindicaciones 1 a 6,  
**caracterizada porque** como aditivo adicional está depositado sobre la superficie de las paredes de la cubeta un colorante.
  8. Microcubeta desechable según la reivindicación 7,  
**caracterizada porque** el colorante significa una proporción de 0,2 a 0,5% en peso del recubrimiento.
  9. Microcubeta desechable según una de las reivindicaciones 1 a 8,  
**caracterizada porque** el recubrimiento está realizado introduciendo una solución en la cavidad y secando mediante evaporación del disolvente.