

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 804**

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 13005493 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2733217**

54 Título: **Método de detección de tiras reactivas para análisis de orina comprometidas por la humedad ambiental**

30 Prioridad:

26.01.2009 US 147272 P

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

10.06.2016

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591-5098, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 573 804 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).

MÉTODO DE DETECCIÓN DE TIRAS REACTIVAS PARA ANÁLISIS DE ORINA COMPROMETIDAS POR LA HUMEDAD AMBIENTAL**DESCRIPCIÓN**

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 los usados para determinar la presencia de analitos en muestras de orina, tales como albúmina, proteína, creatinina, nitrato, uristatina, esterasa leucocitaria (glóbulos blancos), sangre oculta (glóbulos rojos), cetonas, glucosa, bilirrubina, urobilinógeno y otros que resultan familiares para los expertos en la técnica. La medición de proteasas e inhibidores de proteasa tales como esterasa leucocitaria (elastasa humana) o inhibidor de tripsina urinaria (bicunina, uristatina) son especialmente importantes porque pueden indicar infecciones del riñón o tracto urogenital. Estas tiras para detectar proteasas e inhibidores de proteasa se basan en la hidrólisis de sustratos proteolíticos mediante proteasas para generar señales detectables. Dado que las reacciones bioquímicas requieren agua para que se produzca hidrólisis enzimática, tienden a ser sensibles a la humedad y pueden interferir con las señales detectables a través de las reacciones de fondo.

La patente estadounidense 5.663.044 describe la técnica anterior en el campo de detectar leucocito, esterasa o proteasa y de enseñar de manera general el uso de una composición que incluye una sal de diazonio, uno de un grupo de ésteres propenso a hidrólisis en presencia de leucocito, esterasa o proteasa y un metal alcalinotérreo. La patente '044 enseña la medición de la reflectancia de 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 medición de patrón de 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 lo que puede provocar 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 guardarse en un entorno seco antes de su uso. El contenido en humedad de tiras reactivas debe mantenerse por debajo del 2% en peso para evitar degradar el rendimiento. Sin embargo, la medición de la humedad en tiras reactivas no es muy precisa. Existe una necesidad particular para 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 trata en las patentes estadounidenses 6.770.764; 6.955.921; y 7.001.737. En las reacciones descritas, se detecta la presencia de inhibidores de tripsina urinaria en una muestra de orina añadiendo una muestra a tiras reactivas que contienen una cantidad conocida de tripsina, un sustrato de tripsina, es decir ésteres de arginina hidrolizados mediante 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 mediante una sal de diazonio a partir de su reacción con el fenol producido cuando el sustrato de tripsina reacciona con la cantidad conocida de tripsina. Mediante la medición del color producido, puede determinarse la presencia de inhibidores de tripsina.

En la patente estadounidense 6.316.264 se añade un colorante infrarrojo (IR) a una ubicación predeterminada sobre las tiras reactivas con el fin de garantizar que las tiras están alineadas de manera apropiada en el instrumento usado para detectar y/o medir la presencia de analitos en una muestra aplicada a la tira. El rango de IR para los colorantes era ampliamente de entre 700 y 2500 nm, pero se dijo que se preferían colorantes que tienen una fuerte absorbancia en el intervalo de 825-855 nm, con absorbancia en el rango visible (400-700 nm) de menos del 20%. La publicación de solicitud de patente estadounidense 2005/0123441 A1 da a conocer un sistema de reactivos para el control integrado de elementos de análisis, en particular de tiras reactivas. El sistema de reactivos comprende un N-óxido orgánico o un compuesto nitroso y, opcionalmente, un agente reductor tal como glicina o glucosa. El estrés del elemento de análisis, por ejemplo provocado por la humedad ambiental, da como resultado un cambio (normalmente irreversible) en el sistema de reactivos del control integrado. El cambio puede detectarse por ejemplo mediante métodos electroquímicos u ópticos.

Como se sugirió anteriormente, sería ventajoso si las tiras reactivas para análisis de orina que están comprometidas por la humedad pudieran identificarse con mejor precisión para prevenir su uso inseguro 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 pudieran usarse los propios reactivos para indicar la presencia de humedad indeseable, se obtendría una mejora significativa. La presente invención proporciona un método de este tipo, que se describirá en detalle a continuación.

Sumario de la invención

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

En general, la invención es un método de detectar humedad en exceso en tiras reactivas que emplean reactivos sensibles a la humedad. Midiendo el color u otra respuesta desarrollada mediante 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 desecharse el resultado.

Específicamente, la invención proporciona el uso de un colorante infrarrojo como referencia en un método de detección de un reactivo sensible a la humedad comprometido por la humedad ambiental dispuesto sobre una tira reactiva, en el que el reactivo sensible a la humedad se basa en sustratos proteolíticos para detectar enzimas de proteasa o inhibidores de proteasa, incluyendo dicho reactivo sensible a la humedad una sal de diazonio y desarrollando color u otra respuesta justo después de aplicar una muestra, color u otra respuesta que se mide y se compara con el colorante infrarrojo. En una realización preferida, se combina el colorante infrarrojo con el reactivo sensible a la humedad. En otra realización preferida, el colorante infrarrojo se ubica de forma separada del reactivo sensible a la humedad. El colorante infrarrojo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ftalocianina, naftalocianina, colorantes de complejos metálicos, preferiblemente colorantes de complejos metálicos de ditioleno, colorantes de polimetino, colorantes de cianina, colorantes de difenilmetano, colorantes de trifenilmetano, colorantes de quinona, colorantes de tipo azo, colorantes de transferencia de carga y colorantes de resonancia de carga. Preferiblemente tiene una absorbancia característica en la región de infrarrojo de aproximadamente 700 a aproximadamente 2500 nm.

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 tras aplicar una muestra con el valor de la razón de reflectancia tomada poco tiempo después y se usa para determinar el efecto de humedad ambiental en exceso y para rechazar los reactivos si están comprometidos por la humedad ambiental. Puede medirse una segunda razón de reflectancia para determinar si la muestra se colorea de forma no habitual y puede afectar a los resultados.

Para detectar reactivos de leucocitos comprometidos por la humedad ambiental, 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 con la cantidad de leucocitos presente. En esta realización, se compara la reflectancia a longitud de onda luminosa de 520-570 nm con la reflectancia a aproximadamente 825 nm característica del colorante de referencia.

Breve descripción de los dibujos

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

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, los reactivos basados en sustratos proteolíticos pueden usarse para detectar cualquier proteasa. La secuencia de aminoácidos de los reactivos se adapta al tipo preferido por la proteasa que está detectándose y la secuencia de aminoácidos se fija un resto de generación 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 luz a la longitud de onda característica de los reactivos con referencia a la reflectancia de luz a una longitud de onda característica de un colorante infrarrojo de referencia. La comparación de 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 comprometerse por humedad ambiental en exceso, que puede reducir la actividad de reactivo y mostrar de forma 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 infrarrojo de referencia 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 comprometido por humedad ambiental en exceso.

También pueden usarse reactivos basados en sustratos proteolíticos para detectar un inhibidor de proteasa. De nuevo la secuencia de aminoácidos se adapta al tipo preferido por el inhibidor de proteasa, fijándose la secuencia a un resto de generación de señal que, tras la hidrólisis, forma la señal. La proteasa se añade al reactivo y por tanto genera una señal cuando no está presente el inhibidor 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 reacción en el corto plazo de tiempo de menos de unos pocos minutos necesario para tiras usadas en aplicaciones junto al paciente. Las reacciones de hidrólisis

siguen creando una señal con el tiempo y se miden normalmente de forma cinética para permitir lecturas que no dependen del control del tiempo por parte del operario. Por ejemplo, el color desarrollado mediante la reacción para detectar leucocitos en orina puede medirse a 20 y 60 segundos y usarse la razón de las señales a ambos tiempos como resultado cinético, es decir, mostrando la velocidad de cambio de color. Esto evita que el usuario tenga que esperar durante 3 minutos para obtener un resultado.

La invención es aplicable 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 forma 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 se han mencionado anteriormente. De particular importancia para los presentes inventores fue la sensibilidad de humedad de reactivos usados para detectar leucocitos en muestras de orina mediante esterasa en los leucocitos, tal como se trata a continuación con referencia a una realización preferida. Sin embargo, será evidente que los métodos de la invención tienen aplicación a 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 de ensayo y cartuchos de flujo lateral.

Química de reactivo de leucocitos

En la patente estadounidense 5.663.044 mencionada anteriormente se tratan reactivos de leucocitos 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-hidroxilo-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 examinó a una longitud de onda luminosa de 520-570 nm (570 nm en la patente '044). Se relacionó la reflectancia a 520-570 nm con una longitud de onda convencional a 690 nm. Se usó esta comparación para compensar diferencias en el color de fondo blanco del sustrato de tira, que era celulosa blanca sobre un poliestireno blanco que tenía una reflectancia >60%, y que se aproximaba a un estado 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 orina y pequeñas cantidades pueden provocar grandes cambios en la razón de reflectancia. Como resultado, tal razón de reflectancia no puede usarse para medir de manera precisa la humedad tras la inmersión de la tira en orina.

En la presente invención, se añade un colorante infrarrojo de referencia que tiene una respuesta característica a la luz a una longitud de onda al menos 120 nm mayor que el 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 mediciones reduciendo la interferencia de fondo. La adición de un colorante IR a los reactivos de leucocitos proporciona un color de fondo menor de $\leq 60\%$ de reflectancia a ≥ 700 y 2500 nm. Este fondo menor reduce el efecto del color de orina sobre la razón de reflectancia, pero no el efecto de la humedad. Por tanto, la razón de reflectancia puede usarse para medir de manera precisa la humedad tras la inmersión de una muestra en orina.

Sin embargo, este color de fondo menor de $\leq 60\%$ de reflectancia 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 reduce 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 la señal de los sustratos, la sensibilidad del sustrato a la humedad, y la sensibilidad del sustrato a la hidrólisis de proteasa 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 interferencia de fondo con relación al color en la muestra se produce a más de 0,2 mg/dl, o aproximadamente al 0,5% en peso con relación al colorante de referencia. Sin embargo, cuando se aumenta la cantidad de colorante hasta 20 mg/dl, la razón de reflectancia se aumenta hasta 1,6 y la señal se reduce desde la señal de ~1,0 esperada. Por tanto la cantidad de colorante usada debe limitarse a la que se necesita para minimizar la interferencia de fondo.

Tabla 1		
Colorante (1) mg/dl	Razón de reflectancia 570/690 nm (2)	Interferencia de 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 el 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]etilideno)-2-(n-hexiltio)-1-ciclohexen-1-il]etenil]-1,1-dimetil-1H-benzo[e]indolio, sal interna.

- (2) Reacción con respecto a leucocitos 42 células/ μ l en orina, en orina de densidad relativa media y medida usando el instrumento CLINITEK Status® (Siemens Healthcare Diagnostics).
- (3) Diferencia entre una orina clínica marrón muy coloreada y una orina amarilla coloreada de forma normal. Ambas orinas carecían de leucocitos y se midieron usando el instrumento CLINITEK Status®

En el experimento anterior, se preparó el reactivo de leucocitos 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 resistencia 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 siguiente se facilitan las funciones de cada componente, la concentración preferida y el intervalo permitido. Se usaron las disoluciones de la mezcla para saturar el papel de filtro, en este caso papel de filtro Ahlstrom de calidad 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 de reactivos que se sometieron a prueba usando el instrumento CLINITEK Status®.

Tabla 2

Componente	Función	Concentración pref. usada	Intervalo permitido
1ª aplicación			
Agua	Disolvente	1000 ml	---
NaCl	Agente de resistencia 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 de enzima	0,422 g	0,10-0,8 g/l
Decanol	Activador de enzima	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			

Pueden usarse diversos colorantes, incluyendo los descritos en la patente estadounidense 6.316.264 incorporada en el presente documento como referencia y que tienen absorbancia característica en la región de infrarrojo de aproximadamente 700 a aproximadamente 2500 nm. Los ejemplos incluyen compuestos de ftalocianina y naftalocianina, colorantes de complejos metálicos (por ejemplo colorantes de complejos metálicos de ditioleno) y colorantes de polimetino, incluyendo colorantes de cianina. Otros colorantes incluyen colorantes de di y trifenilmetano, colorantes de quinona, colorantes de tipo azo, y colorantes de transferencia de carga y de resonancia de carga. Siendo su característica común que la reflectancia de luz a una única longitud de onda se mide al menos 120 nm por encima que de la longitud de onda de reactivo. En relación con los reactivos de leucocitos tratados anteriormente, el colorante debe tener una reflectancia característica de al menos 700 nm, preferiblemente por encima de 700 y de menos de 2500 nm.

Aunque incluir el colorante de referencia con los reactivos de leucocitos es una realización preferida, también es posible colocar el colorante de referencia en otra ubicación, como se hizo para fines de alinear 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 diferenciarse de los que se producen cuando el colorante está dentro de los reactivos. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden adaptarse a tales diferencias.

Detección de contaminación por humedad en una tira reactiva de leucocito

Tal como se trató anteriormente, la humedad provoca que los reactivos de leucocitos degraden y produzcan un cambio de color falso. Las enzimas en los leucocitos no se necesitan 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 una almohadilla de reactivo de leucocitos. La velocidad de cambio de color es de manera esencial directamente proporcional a la cantidad de agua presente. La importancia del control de humedad ambiental resulta evidente cuando, tras 10 minutos de exposición a >60% de humedad relativa, la prueba proporciona resultados falsos positivos.

Esta sensibilidad a la humedad se usa en la invención para determinar si una almohadilla de reactivo se ha contaminado con humedad. El cambio de color se determina primero a aproximadamente 20 segundos después de aplicarse una muestra de orina. Si se detecta color tras 20 segundos, entonces se sospecha 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 al 80% de humedad ambiental durante 10 minutos, condiciones que se sabe que provocan el fallo de los reactivos. Se encontró que veintitrés de 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 relación a 42 mg/dl de PPTA de los reactivos de leucocitos. 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 fue verdad cuando se usó una razón de reflectancia de 520 nm/870 nm, pero sin colorante presente.

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 muestra mediante la absorbancia de luz a aproximadamente 460 nm (dentro del rango visible). Con el fin de afectar a la medición de color desarrollado mediante los reactivos de leucocitos, se determina una nueva razón, es decir se divide la reflectancia a aproximadamente 460 nm (por color de muestra) entre la reflectancia a aproximadamente 625 nm. Esta razón evita que se considere que muestras de orina oscuras están comprometidas por la humedad ambiental. Si la razón (multiplicada por 1000) está por encima de 600, el color de muestra es claro y la reflectancia es alta. Si es así, entonces se confirmará que la tira que está sometiendo a prueba está comprometida por la humedad ambiental si las razones de reflectancia a 20 y 60 segundos han indicado que la tira está respondiendo de una 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 20 y 60 segundos han sido satisfactorios.

La diferencia entre la razón de reflectancia a 525 nm con respecto a la reflectancia a 825 nm tomadas a 20 y 60 segundos tras aplicar una muestra, se usa para determinar si los reactivos se han degradado por la humedad. En general, si la primera lectura (20 s) da una razón de menos de aproximadamente 700 (razón x 1000), entonces se indica humedad ambiental en exceso ya que la reflectancia a 525 indica que ya se había desarrollado un color significativo. Si la segunda lectura se toma a 60 segundos y se compara con la primera lectura y la diferencia en las lecturas es de menos de aproximadamente 50 (razón x 1000), entonces se confirma la presencia de humedad ambiental en exceso 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	Tiempo	Razón de valor crítico x 1000	significado
L ₂₀	525/845	20 s	< 700	Humedad ambiental de en exceso absorción alta probable
L ₆₀	525/845	60 s	L ₂₀ - L ₆₀ <50	Humedad ambiental que reduce actividad de reactivo
H	470/625	40 y 60 segundos	> 600	Muestra de alta reflectancia de color claro

Aplicar estos valores a las lecturas según el procedimiento mostrado en la figura 1 proporciona el rechazo de resultados por estar comprometidos por la humedad ambiental o la notificación de 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. En una tira absorbente (por ejemplo papel de filtro) saturada con disoluciones de reactivo tal como se describió anteriormente en la tabla 2 se aplica una muestra de orina y se miden los cambios de color resultantes mediante reflectancia luminosa en el instrumento CLINITEK Status® según el procedimiento de la invención.

Si el valor medido de L₂₀-L₆₀ es de menos de 50, es posible que la humedad ambiental en exceso haya reducido la actividad de reactivo de leucocitos. 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, todavía es posible que la razón 525/845 nm pueda proporcionar una concentración de leucocitos. Se considera el valor inicial de la razón 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 ambiental en exceso en la almohadilla de prueba. Entonces, en combinación con el resultado de L₂₀-L₆₀, es probable que los reactivos de leucocitos se hayan visto comprometidos por humedad ambiental en exceso. Pero, ya que los resultados pueden haberse visto influidos por una muestra inusualmente oscura, se mide la razón H, 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 se ha coloreado mucho. Si es así, entonces se considera que los reactivos de leucocitos se han visto comprometidos por alta humedad ambiental. 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 se ha visto comprometida y se calcula el contenido en leucocitos.

5 Debe entenderse que las longitudes de onda luminosas específicas y los tiempos de medición que acaban de describirse son útiles para determinar la presencia de leucocitos en muestras de orina con las cantidades de los reactivos descritas. Sin embargo, el método tiene aplicación más generalmente a muchos otros reactivos que son sensibles a la humedad y aún así se usan para detectar muestras que contienen agua. Los expertos en la técnica deben establecer fácilmente protocolos de detección apropiados tras haber revisado la invención dada a conocer por los presentes inventores.

10 Tal como se ilustró anteriormente, el instrumento Clinitek Status® aparato es útil para llevar a cabo el método de la invención. Se describen aspectos de este instrumento en las patentes estadounidenses 6.239.445; 5.877.863; 5.477.326; y 5.408.535, que se incorporan en el presente documento como referencia. El instrumento Clinitek Status® es un espectroscopio de reflectancia en el que se ilumina una tira reactiva que porta una muestra mediante una fuente de luz y se detecta y se usa la luz reflejada a partir de la tira reactiva para determinar la presencia y cantidad del analito en la muestra. El funcionamiento de espectrofotómetros también se trata en la patente estadounidense 6.316.264, citada anteriormente. Tal como se indica en ese documento, también puede usarse un aparato de tipo cámara, que crea una imagen de multipíxeles para llevar a cabo el método de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un colorante infrarrojo como referencia en un método de detección de un reactivo sensible a la humedad comprometido por la humedad ambiental dispuesto en una tira reactiva, en el que el reactivo sensible a la humedad se basa en sustratos proteolíticos para detectar enzimas de proteasa o inhibidores de proteasa, incluyendo dicho reactivo sensible a la humedad una sal de diazonio y desarrollando color u otra respuesta justo después de aplicar una muestra, color u otra respuesta que se mide y se compara con el colorante infrarrojo de referencia.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el colorante infrarrojo se combina con dicho reactivo sensible a la humedad.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1, en el que el colorante infrarrojo se ubica de forma separada de dicho reactivo sensible a la humedad.
- 20 4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el colorante infrarrojo se selecciona del grupo que consiste en ftalocianina, naftalocianina, colorantes de complejos metálicos, preferiblemente colorantes de complejos metálicos de ditioleno, colorantes de polimetino, colorantes de cianina, colorantes de difenilmetano, colorantes de trifenilmetano, colorantes de quinona, colorantes de tipo azo, colorantes de transferencia de carga y colorantes de resonancia de carga.
- 25 5. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el colorante infrarrojo tiene una absorbancia característica en la región de infrarrojo de aproximadamente 700 a aproximadamente 2500 nm.
6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el reactivo sensible a la humedad es un reactivo para detectar leucocitos en muestras de orina.
7. Uso según la reivindicación 6 en el que la sal de diazonio es ácido 1-diazo-2-naftol-4-sulfónico.

