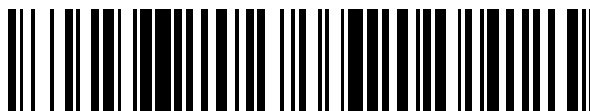


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 402**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86** (2006.01)

**A61B 5/15** (2006.01)

**A61B 5/153** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014 PCT/EP2014/053691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14131784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014 E 14706615 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2943796**

54 Título: **Método in vitro, uso de un agente y dispositivo de recolección para la inhibición de la coagulación en la sangre**

30 Prioridad:

**28.02.2013 EP 13157271**

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

**11.07.2018**

73 Titular/es:

**WESER-BISSÉ, PETRA (100.0%)  
Alemannenstrasse 19  
79211 Denzlingen, DE**

72 Inventor/es:

**BISSÉ, EMMANUEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 675 402 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 *in vitro*, uso de un agente y dispositivo de recolección para la inhibición de la coagulación en la sangre

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la inhibición *in vitro* de la coagulación en la sangre. En particular, la presente invención se refiere a un método y al uso un agente para inhibir la coagulación en la sangre *in vitro* y a un dispositivo para la recolección de sangre provisto para dichos método y uso.

**Antecedentes de la invención**

10 La toma de muestras de sangre y su análisis normalmente se llevan a cabo con diversos fines de diagnóstico. En ocasiones se requiere la determinación exacta y precisa de los constituyentes sanguíneos o de sus parámetros para poder sacar conclusiones confiables de diagnóstico y pronóstico. En este sentido, los resultados de las pruebas de diagnóstico de la sangre pueden verse seriamente afectados por las circunstancias y condiciones preanalíticas. En varios casos, después de la extracción, es conveniente mantener la sangre en un estado esencialmente nativo desde el punto de vista fisiológico. Dependiendo de la situación particular y del o de los tipos de componentes y constituyentes (extra)celulares a determinar, puede ser necesario usar sangre entera o también puede ser preferible  
15 usar muestras de plasma en lugar de suero.

20 Cuando la sangre se extrae pinchando un vaso sanguíneo y se recoge en los recipientes para las muestras y entra en contacto con ellos, pueden tener lugar la coagulación y la agregación plaquetaria en la sangre, que conduce a la formación de coágulos, debido a la activación de las plaquetas y a los factores de coagulación. Además, este proceso puede conducir, por ejemplo, a la lisis de las células y a cambios de concentraciones celulares y extracelulares de los constituyentes sanguíneos. Por otro lado, es imposible llevar a cabo pruebas de coagulación y hemogramas posteriores *in vitro*. Para preparar y proveer muestras de sangre entera y plasma para las investigaciones de diagnóstico *in vitro*, es común añadir a la sangre, inmediatamente después de su recolección, unos aditivos —generalmente denominados anticoagulantes— con los que se la mezcla, los cuales impiden que la sangre y/o el plasma se espesen y formen coágulos. De un modo más específico, el término anticoagulante se  
25 refiere a los inhibidores espesamiento o coagulación de la sangre plasmática, que puede distinguirse de los inhibidores de la agregación plaquetaria. Para el proceso de formación de coágulos, se requieren tanto iones de calcio como trombina. Por lo tanto, las sales de ácido etilendiamintetraacético (sales de EDTA) o las sales de citrato —que pueden quelar los iones de calcio— y las sales de heparina —que pueden inhibir la actividad de la trombina— por lo general se usan como anticoagulantes. Para ver una descripción general de los procesos y componentes implicados en la coagulación y en la hemostasia primaria y secundaria, que comprenden la cascada de coagulación y la vía intrínseca y extrínseca, remítase a "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations", 5.<sup>a</sup> edición, T. M. Devlin (ed.), Wiley, 2002.

30 En particular, por lo general, como anticoagulantes en las investigaciones de laboratorio de diagnóstico, se usan la sal sódica, de litio o amonio de la heparina, K<sub>2</sub>EDTA, K<sub>3</sub>EDTA, Na<sub>2</sub>EDTA y el citrato trisódico (véase, por ejemplo, el documento de la OMS "Uso de anticoagulantes en las investigaciones de laboratorio de diagnóstico" (WHO/DIL/LAB/99.1 Rev. 2, 2002)). De un modo opcional, pueden llevarse a cabo el tamponamiento y el ajuste del pH, por ejemplo, en el rango fisiológico, por ejemplo, para el citrato, añadiendo ácido cítrico. Asimismo, pueden incluirse agentes estabilizadores, además del anticoagulante. Los anticoagulantes antes citados se usan para obtener muestras de sangre entera para análisis hematológicos (por ejemplo, hemogramas completos y fórmula leucocitaria) o para obtener muestras de plasma para hemostasia y análisis de química clínica.

40 Sin embargo, para las aplicaciones de diagnóstico estos anticoagulantes típicamente usados tienen algunas desventajas y falencias, debido a la interferencia con ciertos métodos analíticos y al cambio de la concentración de ciertos constituyentes a medir. Por ejemplo, la contaminación de las muestra con los cationes clínicamente relevantes tales como Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de estos anticoagulantes, que se añaden en concentraciones comparativamente altas, puede ser problemática, en vista de la determinación de estos iones, así como también, de la hiperosmolaridad/del cambio en la osmolaridad. Esto último puede conllevar a la salida del agua de las células, a la pérdida de la integridad celular y a la fuga de iones y así, también a la interferencia en los posteriores análisis de los analitos. Del mismo modo, la quelación, por ejemplo, de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup> puede interferir con el análisis de estos cationes, y las enzimas —también en los ensayos subsiguientes cuya estructura/función depende de estos iones— también pueden verse afectadas, en especial, cuando los cationes divalentes se han agotado por una alta  
50 concentración de anticoagulante quelante. La heparina polianiónica puede inhibir las reacciones metabólicas o catalíticas. Además, usando una sola muestra, no es posible determinar varios parámetros de laboratorio mediante pruebas hematológicas, pruebas de coagulación, así como por análisis de química clínica. La necesidad de proveer varias muestras con diferentes anticoagulantes o diferentes concentraciones de anticoagulante implica tiempo extra, mayores costos y el potencial de que se produzcan errores en los procedimientos preanalíticos y analíticos.

55 Existe una necesidad en la técnica de simplificar la inhibición de coagulación en la sangre durante los trabajos preanalíticos y de hacerla más sólida y económica, posibilitando al mismo tiempo el posterior análisis de los constituyentes sanguíneos, ofreciendo así beneficios en términos de manipulación, almacenamiento, transporte y

rendimiento de las de las muestras y, en la medida de lo posible, precisión, sin afectar, no obstante ello, la eficacia de anticoagulación.

**Compendio de la invención**

5 El objeto se resuelve mediante el método *in vitro* según la reivindicación 1, el uso de un dispositivo para la recolección de sangre según la reivindicación 8, el uso de un agente según la reivindicación 10, el dispositivo para la recolección de sangre según la reivindicación 12 y el kit según la reivindicación 13, en tanto que las realizaciones preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes y se describirán más en detalle a continuación.

La presente descripción se refiere a los siguientes ítems:

10 (1) Un método *in vitro* para la inhibición de la coagulación en la sangre, en el que la sangre se mezcla después de su extracción con un agente que comprende, como único anticoagulante, una sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ .

(2) El método según el ítem (1), en el que la sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ , denota una sustancia provista como ácido carboxílico libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ .

15 (3) El método según el ítem (1) o (2), en el que dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  comprende al menos dos grupos carboxilo por molécula, con preferencia, comprende al menos tres grupos carboxilo por molécula.

(4) El método según uno cualquiera de los ítems precedentes, en el que dicho agente consiste en lo siguiente:

(i) dicha sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  o

(ii) dicha sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ , disuelta en un disolvente.

20 De un modo opcional, con la sangre extraída no se mezcla ninguna otra sustancia que no sea el agente especificado.

(5) El método según uno cualquiera de los ítems precedentes, en el que posteriormente se lleva a cabo al menos una prueba para la determinación de al menos un componente sanguíneo, con preferencia, se llevan a cabo al menos dos pruebas para la determinación de al menos dos componentes sanguíneos.

25 (6) El método según uno cualquiera de los ítems precedentes, en el que la concentración de dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  es de al menos 0,1 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, con preferencia se ubica en el intervalo variable entre 0,1 y 100 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, más preferiblemente en el intervalo variable entre 1 y 50 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, aun más preferiblemente, en el intervalo variable entre 2 y 32 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, y lo más preferiblemente en el intervalo variable entre 2 y 10 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella.

30 (7) El método según uno cualquiera de los ítems precedentes, en el que se evita esencialmente la lisis de células sanguíneas.

(8) El método según uno cualquiera de los ítems precedentes, en el que dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se provee como un polvo o en forma liofilizada.

35 (9) El método según uno cualquiera de los ítems (4) a (8), en el que en el caso (ii) el disolvente se selecciona del grupo que consiste en una solución acuosa, agua y alcohol y mezclas de agua y alcohol, con preferencia, es agua o etanol, y más preferiblemente, es agua.

(10) El método según uno cualquiera de los ítems precedentes, en el que la sangre extraída es sangre entera.

40 (11) El método según uno cualquiera de los ítems (1) to (9), en el que se determina la cantidad del único componente sanguíneo como mínimo, con preferencia, se determinan las cantidades de al menos dos componentes sanguíneos, lo cual comprende las siguientes etapas:

45 (a) proveer un dispositivo para la recolección de sangre que contiene, colocado en el dispositivo, el agente tal como se establece en uno cualquiera de los ítems (1)-(4), (6), (8) y (9), de un modo opcional, que contiene, además, un agente modificador del pH y/o una sal de amonio  $NR_4X$ , en donde cada R, independientemente, es hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$  lineal, alquilo  $C_3-C_6$  ramificado, fenilo sustituido o no sustituido, y X es haluro y, con preferencia, es cloruro;

(b) colocar la sangre en el dispositivo para la recolección de sangre;

(c) mezclar dicho agente con la sangre en el dispositivo para la recolección de sangre;

de un modo opcional, (d) almacenar la sangre en el dispositivo para la recolección de sangre durante un período deseado y

(e) determinar la cantidad del único componente sanguíneo como mínimo, con preferencia, de los únicos dos componentes sanguíneos como mínimo, en la muestra de sangre.

5 (12) El método según el ítem (11), en el que las etapas (b) a (d) se llevan a cabo a una temperatura variable entre 0 y 37 °C, y en el que las etapas (b) y (c) se llevan a cabo, preferiblemente, a temperatura ambiente.

(13) El método según el ítem (11) o (12), en el que, en lugar de las etapas (a) y (b), se lleva a cabo una etapa que comprende colocar sangre en un dispositivo para la recolección de sangre y posteriormente colocar el agente en el dispositivo para la recolección de sangre.

10 (14) El método según uno cualquiera de los ítems (11) a (13), en el que la sangre en la etapa (b) es sangre entera.

(15) El método según uno cualquiera de los ítems (11) a (14), en el que en la etapa (e) la determinación de la cantidad del único componente sanguíneo como mínimo se lleva a cabo usando métodos físicos, químicos, enzimáticos y/o inmunológicos convencionales, incluidas sus combinaciones.

15 (16) El método según uno cualquiera de los ítems precedentes, en el que dicha sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tricarbálico, ácido etilendiamintetraacético, ácido dietilentriaminpentacético, ácido bencenpentacarboxílico, ácido melítico y ácido tetrahidrofuran-2,3,4,5-tetracarboxílico o mezclas de los mismos, con preferencia, es ácido cítrico, ácido tricarbálico o ácido etilendiamintetraacético y, más preferiblemente, es ácido cítrico.

20 (17) El método según el ítem (16), en el que el ácido cítrico es ácido cítrico anhidro y/o monohidrato de ácido cítrico, preferiblemente, es monohidrato de ácido cítrico.

(18) El método según uno cualquiera de los ítems (11) a (17), en el que en la etapa (a) la concentración de dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  es tal como se establece en el ítem (6).

25 (19) El uso de un dispositivo para la recolección de sangre para recoger y, de un modo opcional, almacenar sangre *in vitro*, en el que en el dispositivo, la sangre se mezcla después de su extracción con el agente tal como se establece en uno cualquiera de los ítems (1)-(4), (6), (8), (9), (16) y (17), y en el que por ello se inhibe la coagulación en la sangre.

30 (20) El uso según el ítem (19), en el que la sangre recogida en un único dispositivo y mezclada con dicho agente se somete posteriormente a una prueba como mínimo, para la determinación de al menos un componente sanguíneo, con preferencia, a múltiples pruebas que comprenden al menos una prueba hematológica, al menos una prueba de coagulación y al menos otro análisis de química clínica.

(21) El uso de un agente que comprende, como único anticoagulante, una sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ , para efectuar la inhibición de la coagulación de sangre *in vitro*.

(22) El uso según el ítem (21), en el que el agente es tal como se establece en uno cualquiera de los ítems (2)-(4), (6), (8), (9), (16) y (17).

35 (23) Un dispositivo para la recolección de sangre, en el que el agente tal como se establece en uno cualquiera de los ítems (1)-(4), (6), (8), (9), (16) y (17), se provee en el dispositivo, y en el que la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  es el único anticoagulante provisto a mezclar con la sangre.

(24) El dispositivo para la recolección de sangre según el ítem (23), que comprende un dispositivo que puede conectarse con un dispositivo convencional para la extracción de sangre.

40 (25) Un kit que comprende lo siguiente:

el dispositivo para la recolección de sangre según el ítem (23) o (24) y

una o más sustancias de prueba para la determinación de al menos un componente sanguíneo en la sangre recogida.

#### **Descripción detallada de la invención**

45 En cuanto se expone a continuación, la presente invención se describe de una manera más detallada, haciendo referencia a las realizaciones preferidas y a los ejemplos que, no obstante ello, se presentan con fines ilustrativos y que no deben interpretarse como limitativos de la invención de ninguna manera.

Tal como se ha especificado, la sangre se mezcla después de su extracción con un agente que comprende, como único anticoagulante, una sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ .

La constante logarítmica  $pK_a$  es igual a  $-\log_{10}K_a$ , en donde  $K_a$  es la constante de disociación del ácido. Para los ácidos polipróticos,  $pK_a$  denota aquí la constante logarítmica para la disociación del primer protón, es decir  $pK_{a1}$ . Con preferencia, la sustancia provista como ácido libre tiene una  $pK_a \geq 1,4$ , más preferiblemente, tiene una  $pK_a \geq 2$ , aun más preferiblemente, tiene una  $pK_a \geq 2,5$  y, lo más preferiblemente, tiene una  $pK_a \geq 3$ .

5 Asombrosamente se halló que era posible inhibir la coagulación *in vitro* en la sangre de una manera eficaz cuando se la mezclaba con la sustancia especificada de ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  y que preferiblemente la mezcla debía tener lugar en forma simultánea o inmediata con la toma de la muestra o expeditivamente posterior a ella, donde con preferencia, la muestra se extrae o recoge como sangre entera. En particular, de acuerdo con la presente invención, se provee un método eficiente cuando el ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se provee como único  
10 anticoagulante, es decir como la única sustancia proporcionada a los efectos de inhibir la coagulación de una manera eficaz.

De un modo opcional, puede omitirse el uso de cualquier sustancia diferente del agente anticoagulante especificado a mezclar con la sangre extraída. Una sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  de acuerdo con la invención es un ácido de Brønsted orgánico, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ . La sustancia provista como ácido libre que  
15 tiene una  $pK_a \geq 0,9$  es un ácido de Brønsted orgánico, que comprende al menos tres grupos carboxilo por molécula, en el que en el ácido tal como se provee, todos los grupos carboxilo en la molécula están protonados, es decir, los grupos carboxilo no están disociados. Se entiende que en la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ , la base del conjugado solo puede estar presente como impurezas menores. En consecuencia, en una realización en la que dicha sustancia se provee como ácido carboxílico libre, los grupos carboxilato solo pueden  
20 estar presentes como impurezas menores, con preferencia, la sustancia está sustancialmente libre de carboxilato, más preferiblemente, la sustancia está libre de carboxilato. Además de tales impurezas posibles, de acuerdo con la presente invención, no se usará una sal de carboxilato, mucho menos, la sal del ácido carboxílico dado respectivamente, como anticoagulante y, con preferencia, se la excluye totalmente del agente y, en especial quedan excluidas las sales de EDTA y citrato. Por otro lado, no se provee sal de heparina como anticoagulante, ni está  
25 comprendida dentro del agente. Considerando que convencionalmente como anticoagulante se usan las sales de EDTA y de citrato así como también las sales de heparina, no estaba previsto que la sustancia provista como ácido carboxílico libre con una  $pK_a \geq 0,9$ , cuando se la mezclaba de ese modo *in vitro* con la sangre después de su extracción, exhibiera un efecto inhibitorio contra la coagulación. La inhibición de la coagulación de acuerdo con la presente invención significa que, en lugar se coagularse, la sangre después de su extracción y mezcla cuidadosa con el agente de la invención permanece fluida. Por otro lado, puede evitarse ventajosamente la formación tardía o demorada de coágulos. Con preferencia, la inhibición de la coagulación de acuerdo con la presente invención significa que en un sistema de análisis automático convencional, un sistema de detección de coágulos detecta los mismos eventos positivos —es decir, coágulos— o menos, en comparación con el muestreo anticoagulación  
30 convencional. Más preferiblemente, en un sistema de análisis automático convencional, un sistema de detección de coágulos detecta considerablemente menos eventos —es decir, coágulos— en comparación con el muestreo anticoagulación convencional.

Lejos de aceptar las imposiciones de la teoría, se cree que en la sangre, los protones ácidos del ácido libre provisto, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  específicamente y/o no específicamente (por ejemplo, mediante electrostática, unión de hidrógeno, reacción de ácido-base y transferencia de protones, etc.), aunque de una manera distinta al menos en  
40 parte de los otros cationes, interactúan con los componentes sanguíneos, tales como las proteínas (por ejemplo, las enzimas) y los constituyentes de la membrana (por ejemplo, los fosfolípidos), y de una manera reversible o irreversible interfieren con la adecuada estructura biomolecular y función de dichos componentes sanguíneos. Considerando el tamaño específico y la carga, los protones pueden interactuar convenientemente con las proteínas para efectuar los cambios estructurales y fisicoquímicos particulares y de este modo, afectar específicamente la  
45 función de las proteínas, por ejemplo de las serina proteasas y también en términos de las interacciones entre los complejos proteicos. Cuando se usa preferiblemente el ácido carboxílico libre, los protones y los carboxilatos aniónicos formados en la sangre pueden interferir con la asociación dependiente del  $Ca^{2+}$  de los factores de coagulación y fosfolípidos. Se observa el efecto inhibitorio general en la cascada de coagulación enzimática. El término anticoagulante, tal como se usa aquí, con preferencia denota inhibidores de formación de coágulos o coagulación de la sangre plasmática. En la presente invención, se cree que la formación de complejos vía quelación del  $Ca^{2+}$  desempeña, como mucho, un rol menor, si es que lo tiene. Se ha descubierto que cuando se usa el ácido carboxílico libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  como el único anticoagulante, la concentración plasmática medida de  $Ca^{2+}$  libre puede ser similar y levemente superior a la del suero correspondiente, en tanto que  $Ca^{2+}$  está casi agotado por completo en el plasma con las sales de EDTA y citrato (véase también el ejemplo 18).

55 En una realización del método, el agente consiste en la sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ , o la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  disuelta en un disolvente. En una relación preferida del método, el agente consiste en una sustancia provista como ácido carboxílico libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ , o una sustancia provista como ácido carboxílico libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  disuelta en un disolvente. Se prefiere que el agente contenga el ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ , con preferencia, el ácido carboxílico libre, como el único  
60 ácido. Con preferencia, el disolvente se selecciona del grupo que consiste en una solución acuosa, agua y alcohol y mezclas de agua y alcohol, más preferiblemente, es agua o etanol, y aun más preferiblemente, es agua. El aditivo adicional comúnmente utilizado para preservar la sangre, en el que dicho aditivo adicional no es un anticoagulante y

no comprende ácido, puede estar comprendido de un modo opcional, por ejemplo, por un agente antiglicolítico.

De acuerdo con un aspecto de la invención, con preferencia, se lleva a cabo al menos una prueba para la determinación de al menos un componente sanguíneo después de mezclar la sangre con el agente de acuerdo con la presente invención. Más preferiblemente, se llevan a cabo al menos dos pruebas para la determinación de al menos dos componentes sanguíneos después de mezclar la sangre con el agente de acuerdo con la presente invención. Ventajosamente, la presente invención permite determinar varios parámetros de laboratorio, mediante pruebas hematológicas, pruebas de coagulación y/o análisis de química clínica a partir de una sola muestra. De esta manera, la presente método provee una anticoagulación eficaz mientras que al mismo tiempo, hace que la sangre sea viable para continuar con los análisis de diagnóstico de una manera útil, de aplicación generalizada y amplia, en particular, los análisis de diagnóstico adecuados para evaluar implicancias patológicas y/o terapéuticas. La determinación de la cantidad del único componente sanguíneo como mínimo se lleva a cabo, con preferencia, usando métodos físicos, químicos, enzimáticos y/o inmunológicos convencionales, incluidas sus combinaciones. En una relación preferida, además de las impurezas menores, sustancialmente no se añaden cationes, con preferencia, directamente no se añaden cationes que no sean los protones del ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ ; con preferencia, el ácido carboxílico libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  a la sangre. Por lo tanto, en este caso, se evita la contaminación con otros cationes y la interferencia proveniente de estos, incluso los cationes clínicamente relevantes, de un modo favorable. Por otra parte, en dicha realización preferida, además de las impurezas menores, no se proveen sustancialmente aniones inorgánicos, con preferencia, directamente no se proveen aniones inorgánicos de ácidos minerales. Asimismo, con preferencia la hiperosmolaridad y la lisis de las células sanguíneas se evitan esencialmente, más preferiblemente se las evita directamente. Por lo tanto, la determinación de una multitud de parámetros de laboratorio por análisis hematológico, de coagulación, así como también, análisis de química clínica a partir de una sola muestra se torna ventajosamente posible, evitando los efectos nocivos de los iones interferentes.

Los cambios en las concentraciones iónicas intracelulares y extracelulares generalmente pueden conducir a la hiperosmolaridad y hemólisis. En principio, cuando se usa el ácido libre como anticoagulante, una alteración en el equilibrio electroquímico entre el interior y el exterior de las células, por ejemplo, puede derivar en un cambio de la concentración plasmática del cloruro o la concentración del ácido úrico. En el caso del ácido carboxílico libre, el alcance de este cambio probable depende de la cantidad de grupos carboxilo. Lejos de aceptar las imposiciones de la teoría, esto puede ser consecuencia de un incremento en los iones hidrógeno en el fluido extracelular de la sangre junto con la presencia de los iones carboxilato generados. En particular, los iones hidrógeno pueden reaccionar con los aniones bicarbonato extracelulares y el flujo de iones del exterior al interior de las células y viceversa, pueden verse afectados, dando como resultado, por ejemplo, un desplazamiento de los iones cloruro. Considerando que los iones carboxilato apenas penetran, si es que lo hacen, en los glóbulos rojos, los iones cloruro pueden mantenerse en las células, funcionando como contraiones para los cationes intracelulares. En dichas situaciones, puede inducirse la hemólisis de los glóbulos rojos, que a su vez podrían influir negativamente en la determinación no solo de los iones cloruro sino también de la hemoglobina. Por otro lado, los cambios en la osmolaridad y el flujo saliente de agua desde las células sanguíneas podrían conducir a un posible efecto de dilución y a un posible deterioro de la integridad celular debido al disecado de las células sanguíneas.

En la presente invención, de un modo opcional, además pueden proveerse una sal de amonio  $NR_4X$  y/o un agente modificador del pH junto con el anticoagulante, con preferencia, de manera concomitante pero alternativamente, también con un leve desfase en el tiempo. Esto puede aportar otros beneficios significativos en términos de estabilización y preservación de una muestra de sangre y de facilitar aún más la determinación confiable de los componentes sanguíneos.

Se halló con asombro que era posible inhibir de un modo favorable un posible deterioro de la integridad celular e incluso, la lisis de las células sanguíneas, si además se añadía una sal de amonio  $NR_4X$ , en la que cada R fuera, de un modo independiente, hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$  lineal, alquilo  $C_3-C_6$  ramificado, fenilo sustituido o no sustituido y X, con preferencia, fuera haluro y, más preferiblemente, fuera cloruro. Se prefieren aún más el cloruro de tetrametilamonio y/o el cloruro de tetraetilamonio, prefiriéndose particularmente el cloruro de tetrametilamonio. Con preferencia, cuando se añade la sal de amonio  $NR_4X$ , la concentración de la sal de amonio  $NR_4X$  varía de 0,01 a 100  $\mu\text{mol/ml}$  de sangre, con preferencia, varía de 5 a 25  $\mu\text{mol/ml}$  de sangre, y más preferiblemente, varía de 15 a 20  $\mu\text{mol/ml}$  de sangre. Se prefiere particularmente al cloruro de tetrametilamonio en una concentración de 15 a 20  $\mu\text{mol/ml}$  de sangre.

Además, se halló con asombro que también se podía inhibir de un modo favorable un posible deterioro de la integridad celular e incluso de la lisis de las células sanguíneas, añadiendo un agente modificador del pH. Dicho agente modificador del pH favorablemente no interfiere con los parámetros de laboratorio a probar. Como agente modificador del pH, se usa preferiblemente la amina orgánica, más preferiblemente, se emplean trietanolamina, etanolamina y/o 2-amino-2-metilpropanol. Por ejemplo, cuando se añade un agente modificador del pH y el ácido libre se provee en solución, con preferencia, se establece un valor de pH de entre 2,2 y 3,0. Se evitan de un modo conveniente las bases tales como hidróxido de sodio.

En particular se descubrió con asombro, podía inhibirse de un modo especialmente favorable un posible deterioro de la integridad celular e incluso de la lisis de las células sanguíneas añadiendo una combinación de sal de amonio

NR<sub>4</sub>X y agente modificador del pH. De este modo, la correcta determinación tanto de la hemoglobina como de los iones cloruro es incluso más seguramente posible (véanse los ejemplos 29 y 30 y las figuras 1 y 2). Esto es también una indicación para una condición todavía más favorable en el equilibrio electroquímico entre el interior y el exterior de las células. De este modo, se puede inhibir la hemólisis de un modo particularmente eficiente y eficaz. Este efecto ventajoso es especialmente relevante en los casos en los que debe reducirse significativamente la aparición de hemólisis o incluso, se la debe evitar de un modo seguro. La hemólisis, por ejemplo, puede desestabilizar una muestra y evitar el almacenamiento prolongado. Asimismo, la hemólisis puede ser perjudicial para los análisis de sangre y de diagnósticos porque, por ejemplo, la mezcla de los componentes del plasma con los componentes celulares provenientes de las células lisadas puede conducir a resultados espurios tanto para los análisis de plasma como de células o incluso puede impedir directamente que se hagan tales análisis. Por consiguiente, inhibir la hemólisis es ventajoso para la determinación confiable de los componentes sanguíneos. Esta estabilización y preservación aun mejoradas de una muestra de sangre puede ofrecer un almacenamiento más prolongado y una determinación más confiable de los componentes sanguíneos y así, un mejor diagnóstico.

La concentración de la sustancia especificada provista como ácido carboxílico libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  en el método *in vitro* para la inhibición de la coagulación en la sangre se ubica en el intervalo variable entre 0,1 y 100 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, con preferencia, en el intervalo variable entre 1 y 50 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, todavía más preferiblemente, en el intervalo variable entre 2 y 32 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, y lo más preferiblemente, en el intervalo variable entre 2 y 10 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella. En una realización, la concentración de la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se establece de modo tal que después de mezclar dicha sustancia con la sangre, la muestra de sangre exhiba un pH en el intervalo variable entre 6,0 y 7,4. De acuerdo con una realización de la presente invención, la cantidad de la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se establece de tal manera que si se disuelve en una cantidad deseada de agua, la solución acuosa obtenida exhiba un pH de  $> 1,5$ . En una relación preferida, la cantidad de la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se establece de modo tal que si se disuelve en una cantidad deseada de agua, la solución acuosa obtenida exhiba un pH de  $> 1,5$  y que cuando se mezcla con la sangre, la muestra de sangre exhiba un pH en el intervalo variable entre 6,0 y 7,4. En una relación preferida, el ácido libre se provee de modo tal que su concentración se ajuste a menos de 20 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, con preferencia, menos de 15 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella. Se prefiere particularmente una concentración en el intervalo variable entre 2 y 10 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella. Esto permite regular de un modo adecuado el valor del pH en la muestra de sangre.

Con preferencia, la sustancia provista como ácido carboxílico libre se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tricarbálico, ácido etilendiamintetraacético, ácido dietilentriaminpentacético, ácido bencenpentacarboxílico, ácido melítico y ácido tetrahidrofuran-2,3,4,5-tetracarboxílico o mezclas de los mismos, más preferiblemente, es ácido cítrico, ácido tricarbálico o ácido etilendiamintetraacético y, más preferiblemente, es ácido cítrico. En una realización, el ácido cítrico es ácido cítrico anhidro y/o monohidrato de ácido cítrico, y el más preferido de todos es el monohidrato de ácido cítrico. De acuerdo con la invención, la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se provee, con preferencia, como un polvo o en forma liofilizada.

En una realización de acuerdo con el aspecto anterior de la invención, la cantidad del único componente sanguíneo como mínimo se determina mediante las siguientes etapas: se provee un dispositivo para la recolección de sangre que contiene, ubicado en el dispositivo, el agente especificado anterior y, de un modo opcional, contiene también una sal de amonio NR<sub>4</sub>X y/o un agente modificador del pH; la sangre, con preferencia, sangre entera, se coloca en dicho dispositivo para la recolección de sangre; dicho agente se mezcla con la sangre en el dispositivo para la recolección de sangre; de un modo opcional, la sangre se almacena en el dispositivo para la recolección de sangre durante un período deseado, por ejemplo, hasta que se llevan a cabo las pruebas asignadas; y se determina la cantidad del único componente sanguíneo como mínimo en la muestra de sangre. Con preferencia, la colocación de la sangre en el dispositivo para la recolección de la sangre, la mezcla y el almacenamiento opcional se llevan a cabo a una temperatura variable entre 0 y 37 °C, y la colocación de la sangre en el dispositivo para la recolección de sangre y la mezcla se llevan a cabo más preferiblemente a temperatura ambiente. En lugar de proveer un dispositivo para la recolección de sangre que contenga el agente antes especificado y colocar sangre en dicho dispositivo para la recolección de sangre, es posible llevar cabo alternativamente una etapa que comprende colocar la sangre en un dispositivo para la recolección de sangre y posteriormente colocar el agente en el dispositivo para la recolección de sangre. De un modo opcional, es posible añadir una sal de amonio NR<sub>4</sub>X y/o un agente modificador del pH. En una relación preferida, se determinan las cantidades de al menos dos componentes sanguíneos.

Otro aspecto de la invención consiste en el uso de un dispositivo para la recolección de sangre para recoger y, de un modo opcional, almacenar sangre *in vitro*, en el que, en el dispositivo, la sangre se mezcla después de su extracción con el agente especificado con anterioridad, y en el que de este modo se inhibe la coagulación en la sangre. Inesperadamente se descubrió en la presente invención que se obtiene un efecto inhibitor eficiente contra la coagulación y la formación de coágulos cuando la sangre se mezcla en el dispositivo con el agente que comprende como el único anticoagulante la sustancia especificada con anterioridad provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ . En una realización, la sangre se recoge en un solo dispositivo y se mezcla con el agente especificado y posteriormente se somete a al menos una prueba para la determinación de al menos un componente sanguíneo, con preferencia a múltiples pruebas, que comprenden al menos una prueba hematológica, al menos una prueba de

coagulación y al menos otro análisis de química clínica. De acuerdo con este aspecto de la invención, la cantidad de tubos de recolección requeridos para los diferentes campos de la medicina de laboratorio se puede reducir considerablemente, lo cual a su vez permite optimizar y hacer más eficiente la actividad de laboratorio y el flujo de trabajo, así como reducir el volumen de la muestra y los tiempos de entrega. Asimismo, el uso de solo un anticoagulante eficaz para los diferentes campos en los laboratorios clínicos, es decir, hematología, química clínica y hemostaseología, puede agilizar el proceso en situaciones de emergencia. Sin embargo, el uso de una sola muestra proveniente de un solo tubo de recolección de sangre no solo es de utilidad en situaciones de emergencia sino que también lo es para pacientes pediátricos y para pacientes de los que es difícil obtener más de una muestra de sangre. Además, otros análisis bioquímicos que en un principio no se habían previsto o requerido para el examen inicial pueden llevarse a cabo ventajosamente gracias a la amplia compatibilidad de la prueba del anticoagulante de acuerdo con la invención (véanse también los ejemplos 1-28). La amplia aplicabilidad para la analítica de diagnóstico *in vitro* es beneficiosa para el cuidado del paciente y por razones de conveniencia.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del agente especificado con anterioridad, que comprende, como único anticoagulante, una sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  para inhibir de un modo eficiente la coagulación de sangre *in vitro*.

Otro aspecto de la invención consiste en un dispositivo para la recolección de sangre, en el que el agente especificado con anterioridad se provee en el dispositivo, y en el que la sustancia especificada provista como ácido libre que tienen una  $pK_a \geq 0,9$  es el único anticoagulante provisto a mezclar con la sangre. El dispositivo puede conectarse con un dispositivo convencional para la extracción de sangre. Los tubos convencionales para la recolección de sangre, incluidos los tubos para la recolección de sangre al vacío, tales como el Vacutainer y los sistemas de aspiración, tales como Monovette son conocidos en la técnica. Además de las ventajas antes mencionadas en términos de uso, la presente invención puede ofrecer otras ventajas económicas con respecto a la fabricación de los tubos para la recolección de sangre, así como logística de inventario de tubos de recolección en las plantas de fabricación y en los laboratorios clínicos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende el dispositivo para la recolección de sangre de la presente invención y una o más sustancia de prueba, para la determinación de al menos un componente sanguíneo en la sangre recogida.

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y no deben considerarse como limitativos del alcance de la invención de ninguna manera. Los ejemplos y las modificaciones u otros de sus equivalentes resultarán evidentes para los expertos en la técnica, a la luz de la presente descripción completa.

### Ejemplos y ejemplos comparativos

#### Materiales empleados y método

##### Materiales

El monohidrato de ácido cítrico (CA), el ácido tricarbálico (TCA), el ácido etilendiamintetraacético (EDTA), el ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), el ácido melítico (MELA) y el ácido bencenpentacarboxílico (BPCA) [por sus siglas en inglés] eran de Sigma-Aldrich, Alemania. El ácido tetrahidrofuran-2,3,4,5-tetracarboxílico (THTCA) era de TCI, Alemania. Los tubos prístinos para la recolección de sangre —es decir, los tubos originalmente provistos sin contenidos, ni llenos, ni recubiertos de aditivos respectivamente— eran de KABE Labortechnik GmbH, Alemania, denominados KABEVETTE (GR). En dichos tubos prístinos provistos se colocaron, respectivamente: 5,4 mmol de CA por litro de la sangre a mezclar con él, 31,2 mmol de TCA por litro de la sangre a mezclar con él, 2,3 mmol de EDTA por litro de la sangre a mezclar con él, 2,2 mmol de DTPA por litro de la sangre a mezclar con él, 3,1 mmol de MELA por litro de la sangre a mezclar con él, 4,6 mmol de THTCA por litro de la sangre a mezclar con él y 8,0 mmol de BPCA por litro de la sangre a mezclar con él. Para establecer una comparación, los tubos para la recolección de sangre con EDTA tripotásico ( $K_3EDTA$ ), los tubos separadores de suero con activador de coágulos (SST) y los tubos con citrato de sodio al 3,2 % que se usaron eran de Becton Dickinson (BD).

##### Protocolo para la recolección y muestreo de la sangre

La sangre se extrajo de la vena antecubital de voluntarios que previamente habían otorgado su consentimiento informado. Para cada sujeto se recogió sangre recientemente extraída en los tubos correspondientes, de modo tal que respectivamente se obtuvieran: una muestra de sangre usada de acuerdo con la presente invención, una muestra de suero (SST (BD)), una muestra de sangre con citrato (citrato (BD)) y una muestra de sangre con EDTA potásico ( $K_3EDTA$  (BD)). Los tubos se llenaron con sangre completamente hasta la marca (4,9 ml) y, para los tubos que contenían anticoagulante, la sangre se mezcló bien con el respectivo anticoagulante invirtiendo los tubos 4 veces inmediatamente después de la recolección de la sangre. Las muestras de suero se trataron de acuerdo con el protocolo del fabricante y se usaron para análisis bioquímicos. Las muestras de sangre entera con EDTA potásico ( $K_3EDTA$  (BD)) y las muestras de la invención se usaron primero para las determinaciones hematológicas y luego se centrifugaron. Las muestras procesadas de acuerdo con la invención y las muestras de plasma con citrato (citrato (BD)) se usaron tanto para la hemostasia como para las determinaciones bioquímicas. El plasma con EDTA potásico también se usó para las determinaciones bioquímicas.



Se descubrió que la coagulación se inhibía de un modo eficiente en los tubos de acuerdo con la presente invención. Posteriormente, fue posible determinar y evaluar una multitud de parámetros de laboratorio en una muestra respectivamente de un solo dispositivo para la recolección de sangre, de acuerdo con la presente invención, y dependiendo de la prueba en particular, se pudo comparar con las muestras de K<sub>3</sub>EDTA (BD), de citrato (BD) o SST (BD). En los ejemplos 1-27, se muestran los resultados que usan CA (indicados como GR 15). El ejemplo 28 muestra los resultados para diversos ácidos carboxílicos libres que tienen una pK<sub>a</sub> ≥ 0,9, usados según la invención.

#### Mediciones

Los análisis de los metabolitos, minerales y enzimas se llevaron a cabo usando los analizadores automáticos cobas 6000 C y 6000 E. Las pruebas de hemostasia y los parámetros hematológicos se midieron por el analizador STA-R (Diagnostica Stago) y con el analizador LH 780 (Beckman Coulter), respectivamente. Para los resultados y los resultados comparativos, véanse los ejemplos 1-28.

Abreviaturas [por sus siglas en inglés]:

WBC: glóbulos blancos; RBC: glóbulos rojos; Hb: hemoglobina; Plt: plaquetas; Lympho: linfocitos; Neutro: neutrófilos; Mono: monocitos; Eos: eosinófilos; Baso: basófilos.

15 Alb: albúmina; ALP: fosfatasa alcalina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; APTT: tiempo de tromboplastina parcial activada; Ca: calcio; Chol: colesterol; CREA: creatinina; CRP: proteína C-reactiva; Fe: hierro; Fer: ferritina; Fib: fibrinógeno; FT<sub>3</sub>: triyodotironina, libre; FT<sub>4</sub>: tiroxina, libre; GGT: γ-glutamilttransferasa; Gluc: glucosa; K: potasio; Mg: magnesio; Na: sodio; PT: tiempo de protrombina; TG: triglicéridos; TP: proteína total; TSH: tirotopina.

#### 20 Ejemplo 1

El ejemplo 1 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando tubos con citrato (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y del tiempo de protrombina (PT).

#### 25 Ejemplo 2

El ejemplo 2 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de los glóbulos blancos (WBC).

#### Ejemplo 3

30 El ejemplo 3 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de los linfocitos (LYMPHO).

#### Ejemplo 4

35 El ejemplo 4 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de los basófilos (Baso Etude) y de los monocitos (MONO).

#### Ejemplo 5

40 El ejemplo 5 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de los eosinófilos (EOS).

#### Ejemplo 6

El ejemplo 6 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de los neutrófilos (NEUTRO).

#### 45 Ejemplo 7

El ejemplo 7 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de la hemoglobina (Hb).

#### Ejemplo 8

## ES 2 675 402 T3

El ejemplo 8 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando  $K_3EDTA$  (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de los glóbulos rojos (RBC).

### Ejemplo 9

- 5 El ejemplo 9 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando citrato (en tubos Becton Dickinson) para la determinación del fibrinógeno (FIB ETUDE) y una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando  $K_3EDTA$  (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de las plaquetas (Ptl).

### Ejemplo 10

El ejemplo 10 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación del colesterol (CHOL).

- 15 Ejemplo 11

El ejemplo 11 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de la creatinina (CREA).

### Ejemplo 12

- 20 El ejemplo 12 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación del hierro (Fe).

### Ejemplo 13

- 25 El ejemplo 13 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de la ferritina (Fer).

### Ejemplo 14

- 30 El ejemplo 14 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de la triyodotironina, libre ( $FT_3$ ).

### Ejemplo 15

El ejemplo 15 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de la glucosa (Gluc).

- 35 Ejemplo 16

El ejemplo 16 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de aspartato aminotransferasa (AST).

### Ejemplo 17

- 40 El ejemplo 17 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de alanina aminotransferasa (ALT).

### Ejemplo 18

- 45 El ejemplo 18 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando tubos BD para la determinación del magnesio (Mg ETUDE) y del calcio (Ca ETUDE).

### Ejemplo 19

El ejemplo 19 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en

tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de la fosfatasa alcalina (ALP).

Ejemplo 20

5 El ejemplo 20 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de los triglicéridos (TG).

Ejemplo 21

10 El ejemplo 21 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando tubos BD para la determinación de la tirotopina (TSH) y la tiroxina, libre (FT4 ETUDE).

Ejemplo 22

El ejemplo 22 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando tubos BD para la determinación de proteína C-reactiva (CRP ETUDE).

15 Ejemplo 23

El ejemplo 23 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando tubos BD para la determinación de la  $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT ETUDE).

Ejemplo 24

20 El ejemplo 24 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando tubos BD para la determinación del potasio (K ETUDE).

Ejemplo 25

25 El ejemplo 25 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando tubos BD para la determinación del sodio (Na ETUDE).

Ejemplo 26

30 El ejemplo 26 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo convencional usando tubos BD para la determinación de la albúmina (Alb ETUDE).

Ejemplo 27

El ejemplo 27 muestra una comparación entre el muestreo de la invención usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR 15)) y el muestreo usando muestras de suero convencionales (SST (BD)) para la determinación de la proteína total (TP).

35 Los resultados y las concentraciones de los respectivos parámetros según se determinan en las muestras de la invención y de referencia en los ejemplos 1 a 27 se presentan a continuación. Los resultados de las muestras de la invención son estadística y médicamente comparables por completo con los resultados y las concentraciones obtenidas mediante el uso del muestreo convencional.

Ejemplo 1

40 Método de comparación: APTT

Métodos: <APTT GR 15> vs. <APTT citrato (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<31,92 s	1,93 s	0,64 s
31,92 a 50,18 s	1,93 s	0,64 s
> 50,18 s	3,62 s	1,19 s

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>APTT citrato (BD)</i>	29,71	3,111	25,4	39,1	S	48
<i>APTT GR 15</i>	29,94	3,873	23,4	40,9		

Método de comparación: PT

5 Métodos: <PT GR 15> vs. <PT citrato (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<38,17 %	4,48 %	1,48 %
38,17 a 88,50 %	6,67 %	2,20 %
> 88,50 %	8,85 %	2,92 %

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>TP citrato</i>	95,1	13,91	29	100	%	50
<i>TP GR 15</i>	89,3	13,72	32	100		

Ejemplo 2

10 Método de comparación: WBC

Métodos: <WBC GR 15> vs. <WBC K3EDTA>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<3,60/mm <sup>3</sup>	0,44/mm <sup>3</sup>	0,14/mm <sup>3</sup>
3,60 a 20,70/mm <sup>3</sup>	0,48/mm <sup>3</sup>	0,16/mm <sup>3</sup>
> 20,70/mm <sup>3</sup>	0,68/mm <sup>3</sup>	0,22/mm <sup>3</sup>

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>WBC K3EDTA</i>	9,44	15,68	3,8	117,7	/mm <sup>3</sup>	51
<i>WBC GR 15</i>	9,50	15,51	3,7	116,5		

15 Ejemplo 3

Método de comparación: LYMPHO

Métodos: <LYMPHO GR 15> vs. <LYMPHO K3EDTA (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<14,70 %	2,09 %	0,69 %
14,70 a 47,80 %	2,09 %	0,69 %
> 47,80 %	2,59 %	0,85 %

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>LYMPHO K3EDTA (BD)</i>	32,000	12,29	7,10	88,50	%	48
<i>LYMPHO GR 15</i>	32,05	11,65	7,6	80,6		

Ejemplo 4

5 Método de comparación: Baso Etude

Métodos: <Tubo GR 15> vs. <Tubo EDTA>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<0,10 %	0,22 %	0,07 %
0,10 a 0,20 %	0,22 %	0,07 %
>0,20 %	0,38 %	0,12 %

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>Tubo EDTA</i>	0,48	0,1869	0,0	1,0	%	50
<i>Tubo GR 15</i>	0,47	0,1708	0,1	0,9		

10 Método de comparación: MONO

Métodos: <MONO GR 15> vs. <MONO K3EDTA (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<5,60 %	0,99 %	0,33 %
5,60 a 15,10 %	1,89 %	0,62 %
>15,10 %	2,31 %	0,76 %

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>MONO K3EDTA (BD)</i>	7,80	2,245	3,9	13,5	%	48
<i>MONO GR 15</i>	7,85	2,081	3,8	13,7		

15 Ejemplo 5

## ES 2 675 402 T3

Método de comparación: EOS

Métodos: <EOS GR 15> vs. <EOS K3EDTA (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<4,30 %	1,34 %	0,44 %
4,30 a 7,50 %	1,48 %	0,49 %
>7,50 %	1,82 %	0,60 %

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>EOS K3EDTA (BD)</i>	2,97	2,341	0,1	12,6	%	48
<i>EOS GR 15</i>	3,01	2,279	0,0	12,2		

5

Ejemplo 6

Método de comparación: NEUTRO

Métodos: <NEUTRO GR 15> vs. <NEUTRO K3EDTA (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<42,10 %	2,43 %	0,80 %
42,10 a 64,70 %	2,90 %	0,96 %
>64,70 %	3,54 %	1,17 %

10 Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>NEUTRO K3EDTA (BD)</i>	56,94	13,37	4,3	81,9	%	49
<i>NEUTRO GR 15</i>	56,68	13,21	4,0	81,8		

Ejemplo 7

Método de comparación: Hb

Métodos: <Hb GR 15> vs. <Hb K3EDTA (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<5,1 g/l	0,2 g/l	0,1 g/l
5,1 a 16,1 g/l	0,3 g/l	0,1 g/l
>16,1 g/l	0,3 g/l	0,1 g/l

15 Distribución de las concentraciones

ES 2 675 402 T3

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>Hb K3EDTA (BD)</i>	14,88	1,231	12,1	17,5	g/l	48
<i>Hb GR 15</i>	14,42	1,237	11,5	17,0		

Ejemplo 8

Método de comparación: RBC

Métodos: <RBC GR 15> vs. <RBC K3EDTA (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<1,87/mm <sup>3</sup>	0,05/mm <sup>3</sup>	0,02/mm <sup>3</sup>
1,87 a 5,32/mm <sup>3</sup>	0,12/mm <sup>3</sup>	0,04/mm <sup>3</sup>
>5,32/mm <sup>3</sup>	0,13/mm <sup>3</sup>	0,04/mm <sup>3</sup>

5 Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>RBC K3EDTA (BD)</i>	4,732	0,5232	3,56	6,36	/mm <sup>3</sup>	471
<i>RBC GR 15</i>	4,580	0,5223	3,45	6,18		

Ejemplo 9

Método de comparación: FIB ETUDE

Métodos: <FIB GR 15> vs. <FIB Tubo de citrato>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<1,13 g/l	0,11 g/l	0,04 g/l
1,13 a 2,44 g/l	0,11 g/l	0,04 g/l
>2,44 g/l	0,25 g/l	0,08 g/l

10

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>FIB Tubo de citrato</i>	3,707	1,161	1,54	8,25	g/l	50
<i>FIB GR 15</i>	4,445	1,344	2,06	9,75		

Método de comparación: Ptl

Métodos: <Ptl GR 15> vs. <Ptl K3EDTA (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<69,00/mm <sup>3</sup>	8,13/mm <sup>3</sup>	2,68/mm <sup>3</sup>
69,00 a 429,00/mm <sup>3</sup>	19,16/mm <sup>3</sup>	6,32/mm <sup>3</sup>
> 429,00/mm <sup>3</sup>	33,75/mm <sup>3</sup>	11,14/mm <sup>3</sup>

15

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>Ptl K3EDTA (BD)</i>	238,0	55,41	127	352	/mm <sup>3</sup>	46
<i>Ptl GR 15</i>	233,4	56,65	124	358		

Ejemplo 10

Método de comparación: CHOL

5 Métodos: <CHOL GR 15> vs. <CHOL SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<1,16 g/l	0,20 g/l	0,07 g/l
1,16 a 3,10 g/l	0,33 g/l	0,11 g/l
>3,10 g/l	0,53 g/l	0,17 g/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>CHOL SST (BD)&gt;</i>	2,106	0,3692	1,36	2,86	g/l	45
<i>CHOL GR 15</i>	2,154	0,379	1,39	3,02		

Ejemplo 11

10 Método de comparación: CREA

Métodos: <CREA GR 15> vs. <CREA SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<5,65 mg/l	1,47 mg/l	0,48 mg/l
5,65 a 66,67 mg/l	3,05 mg/l	1,01 mg/l
>66,67 mg/l	6,78 mg/l	2,24 mg/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>CREA SST (BD)</i>	10,07	5,175	5,8	40,7	mg/l	45
<i>CREA GR 15</i>	10,29	4,92	5,9	39,0		

15 Ejemplo 12

Método de comparación: Fe

Métodos: <Fe GR 15> vs. <Fe SST (BD)>



ES 2 675 402 T3

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<27,93 µg/dl	9,50 µg/dl	3,13 µg/dl
27,93 a 223,46 µg/dl	23,46 µg/dl	7,74 µg/dl
>223,46 µg/dl	37,99 µg/dl	12,54 µg/dl

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>Fe SST (BD)</i>	108,18	36,47	20,5	208,4	µg/dl	45
<i>Fe GR 15</i>	110,80	37,44	18,7	217,6		

Ejemplo 13

5 Método de comparación: Fer, ferritina

Métodos: <Fer GR 15> vs. <Fer SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<20,00 ng/ml	8,50 ng/ml	2,81 ng/ml
20,00 a 800,00 ng/ml	68,00 ng/ml	22,44 ng/ml
>800,00 ng/ml	272,00 ng/ml	89,76 ng/ml

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>Fer SST (BD)</i>	248,854	205,5	1,12	815,00	ng/ml	45
<i>Fer GR 15</i>	254,266	214,1	1,19	840,10		

10 Ejemplo 14

Método de comparación: FT3

Métodos: <Glu GR 15> vs. <Glu SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<1,95 ng/l	0,91 ng/l	0,30 ng/l
1,95 a 9,77 ng/l	1,56 ng/l	0,52 ng/l
>9,77 ng/l	3,32 ng/l	1,10 ng/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>FT3 SST (BD)</i>	3,115	0,4417	2,12	4,17	ng/l	45
<i>FT3 GR 15</i>	3,159	0,4371	2,29	4,24		

Ejemplo 15

Método de comparación: Gluc

Métodos: <Glu GR 15> vs. <Glu SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<0,36 g/l	0,05 g/l	0,02 g/l
0,36 a 2,88 g/l	0,11 g/l	0,04 g/l
>2,88 g/l	0,20 g/l	0,07 g/l

5 Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>Glu SST (BD)</i>	1,076	0,3619	0,78	2,90	g/l	44
<i>Glu GR 15</i>	1,074	0,3427	0,78	2,79		

Ejemplo 16

Método de comparación: AST

Métodos: <AST GR 15> vs. <AST SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<20,00 UI/l	5,00 UI/l	1,65 UI/l
20,00 a 200,00 UI/l	13,00 UI/l	4,29 UI/l
>200,00 UI/l	42,00 UI/l	13,86 UI/l

10

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
<i>AST SST (BD)</i>	26,7	14,09	14	94	UI/l	44
<i>AST GR 15</i>	26,4	14,1	13	94		

Ejemplo 17

Método de comparación: ALT

15 Métodos: <ALT GR 15> vs. <ALT SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<20,00 UI/l	5,00 UI/l	1,65 UI/l
20,00 a 200,00 UI/l	13,00 UI/l	4,29 UI/l
>200,00 UI/l	42,00 UI/l	13,86 UI/l

Distribución de las concentraciones

ES 2 675 402 T3

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
ALT SST (BD)	30,2	20,24	8	115	U/l	45
ALT GR 15	30,1	20,22	10	116		

Ejemplo 18

Método de comparación: Mg ETUDE

Métodos: <TUBO GR 15> vs. <TUBO BD>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<12,1 mg/l	1,9 mg/l	0,6 mg/l
12,1 a 38,8 mg/l	2,9 mg/l	1,0 mg/l
>38,8 mg/l	5,3 mg/l	1,8 mg/l

5

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TUBO BD	22,07	7,905	16,0	55,0	mg/l	44
TUBO GR 15	22,10	7,662	15,9	52,0		

Método de comparación: Ca ETUDE

Métodos: <TUBO GR 15> vs. <TUBO BD>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<72,00 mg/l	4,80 mg/l	1,68 mg/l
72,00 a 136,00 mg/l	6,40 mg/l	2,11 mg/l
>136,00 mg/l	9,20 mg/l	3,04 mg/l

10

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TUBO BD	93,44	4,272	80,7	110,0	mg/l	45
TUBO GR 15	104,69	4,211	92,3	112,9		

Ejemplo 19

Método de comparación: ALP

15 Métodos: <ALP GR 15> vs. <ALP SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<20,0 U/l	5,0 U/l	1,7 U/l
20,0 a 390,0 U/l	12,0 U/l	4,0 U/l

ES 2 675 402 T3

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
>390,0 U/l	83,0 U/l	27,4 U/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
ALP SST (BD)	74,10	28,99	26	221	U/l	45
ALP GR 15	66,0	25,82	21	195		

Ejemplo 20

5 Método de comparación: TG

Métodos: <TG GR 15> vs. <TG SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<0,44 g/l	0,11 g/l	0,03 g/l
0,44 a 2,65 g/l	0,27 g/l	0,09 g/l
>2,65 g/l	0,54 g/l	0,18 g/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TG SST (BD)	1,693	1,096	0,68	5,85	g/l	45
TG GR 15	1,726	1,121	0,69	5,94		

10 Ejemplo 21

Método de comparación: TSH

Métodos: <TSH GR 15> vs. <TSH SST (BD)>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<0,10 mUI/l	0,10 mUI/l	0,03 mUI/l
0,10 a 30,00 mUI/l	0,30 mUI/l	0,10 mUI/l
>30,00 mUI/l	6,40 mUI/l	2,11 mUI/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TSH SST (BD)	2,3579	1,618	0,661	8,160	mUI/l	45
TSH GR 15	2,4636	1,72	0,715	9,100		

15

Método de comparación: FT4 ETUDE

Métodos: <TUBO GR 15> vs. <TUBO BD>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<7,77 pg/ml	3,26 pg/ml	1,08 pg/ml
7,77 a 19,43 pg/ml	4,51 pg/ml	1,49 pg/ml
>19,43 pg/ml	6,61 pg/ml	2,18 pg/ml

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TUBO BD	12,691	1,865	8,78	18,63	pg/ml	45
TUBO GR 15	13,119	1,878	9,08	18,77		

Ejemplo 22

5 Método de comparación: CRP ETUDE

Métodos: <TUBO GR 15> vs. <TUBO BD>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<15,00 mg/l	7,60 mg/l	2,51 mg/l
15,00 a 100,00 mg/l	12,70 mg/l	4,19 mg/l
>100,00 mg/l	21,20 mg/l	7,00 mg/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TUBO BD	8,26	26,47	0,1	168,0	mg/ml	45
TUBO GR 15	7,94	25,04	0,0	158,1		

10 Ejemplo 23

Método de comparación: GGT ETUDE

Métodos: <TUBO GR 15> vs. <TUBO BD>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<20,00 UI/l	5,00 UI/l	1,65 UI/l
20,00 a 390,00 UI/l	13,00 UI/l	4,29 UI/l
>390,00 UI/l	83,00 UI/l	27,39 UI/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TUBO BD	57,6	155,2	6	1055	UI/l	45
TUBO GR 15	58,7	160	6	1088		

Ejemplo 24

Método de comparación: K ETUDE

Métodos: <Tubo GR 15> vs. <Tubo BD>

Concentraciones	Tolerancia médica
<2,00 mmol/l	0,17 mmol/l
2,00 a 6,00 mmol/l	0,27 mmol/l
>6,00 mmol/l	0,41 mmol/l

5 Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TUBO BD	4,61	0,4717	3,5	5,6	mmol/l	45
TUBO GR 15	4,73	0,4611	3,5	5,8		

Ejemplo 25

Método de comparación: Na ETUDE

Métodos: <Tubo GR 15> vs. <Tubo BD>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<120,00 mmol/l	6,50 mmol/l	2,18 mmol/l
120,00 a 160,00 mmol/l	6,50 mmol/l	2,15 mmol/l
>160,00 mmol/l	6,10 mmol/l	2,01 mmol/l

10

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
Tubo BD	142,0	2,121	138	149	mmol/ml	45
Tubo GR 15	146,3	2,31	142	151		

Ejemplo 26

Método de comparación: Alb ETUDE

15 Métodos: <TUBO GR 15> vs. <TUBO BD>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<20,0 g/l	5,1 g/l	1,7 g/l
20,0 a 50,0 g/l	6,4 g/l	2,1 g/l
>50,0 g/l	8,5 g/l	2,8 g/l

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TUBO BD	46,58	2,871	40,9	53,0	gl/l	45
TUBO GR 15	48,53	2,71	42,4	55,4		

Ejemplo 27

Método de comparación: TP

Métodos: <TP GR 15> vs. <TP SST BD>

Concentraciones	Tolerancia médica	Error máximo por falta de equivalencia
<40,0 g/l	5,4 g/l	1,8 g/l
40,0 a 90,0 g/l	6,6 g/l	2,2 g/l
>90,0 g/l	9,2 g/l	3,0 g/l

5

Distribución de las concentraciones

Método	Media	SD	Mín.	Máx.	Unidad	N
TP SST BD	70,7	3,219	65	80	gl/l	41
TP GR 15	76,1	3,58	70	85		

Ejemplo 28

10 Se llevaron a cabo hemogramas completos y fórmulas leucocitarias para las muestras provenientes de los tubos para la recolección de sangre de acuerdo con la presente invención, usando como anticoagulantes, respectivamente: CA, TCA, EDTA, DTPA, MELA, THTCA y BPCA. Para hacer una comparación, se indican los resultados para las muestras con EDTA potásico (K<sub>3</sub>EDTA(BD)). Los resultados para las muestras de la invención son estadística y médicamente comparables por completo con los obtenidos con el K<sub>3</sub>EDTA convencional como anticoagulante (véase la tabla 1), que muestra que los anticoagulantes usados de acuerdo con la presente invención  
15 inhiben de un modo eficaz la coagulación.

Tabla 1

	K <sub>3</sub> EDTA (BD)	CA	TCA	EDTA	DTPA	MELA	THTCA	BPCA
WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	6,56	6,54	6,6	6,23	6,53	6,3	6,42	5.9
RBC (10 <sup>9</sup> /μl)	4,58	4,53	4,49	4,44	4,52	4,53	4,49	4.55
Hb (g/dl)	14,3	14,2	14,2	13,8	14,1	14,2	14,2	14.2
HCT (%)	42,2	42,0	43,4	41,9	42,3	42,8	43,1	46.1
MCV (fl)	92,1	93,0	96,7	94,4	93,6	94,5	96,0	101
MCH (pg)	31,2	31,3	31,6	31,1	31,2	31,3	31,6	31.2
MCHC(g/dl)	33,9	33,8	32,7	32,9	33,3	33,2	32,9	30.8
PLT(10 <sup>3</sup> /μl)	283	270	287	266	210	270	255	250
NEUTRO (%)	68,4	68,5	69,0	70,8	70,3	68,3	68,6	68.9
LYMPHO (%)	22,0	22,0	22,0	19,9	20,5	22,4	22,3	21.7
MONO (%)	7,6	8,0	7,6	7,9	7,7	7,8	7,6	7.5
EOS (%)	0,9	0,7	0,7	0,6	0,8	0,8	0,8	0.7

	<i>K<sub>3</sub>EDTA (BD)</i>	<i>CA</i>	<i>TCA</i>	<i>EDTA</i>	<i>DTPA</i>	<i>MELA</i>	<i>THTCA</i>	<i>BPCA</i>
BASO	1,1	0,8	0,7	0,8	0,8	0,7	0,8	1.2
<b><i>n = 10</i></b>								
Abreviaturas [por sus siglas en inglés]: HCT: hematocrito, MCV: volumen corpuscular medio, MCH: hemoglobina corpuscular media, MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media								

Ejemplo 29

Se llevaron a cabo unas pruebas para determinar la hemoglobina (Hb).

5 El ejemplo 29A muestra una comparación entre el muestreo usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR15)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de la hemoglobina (Hb). La solución de ácido cítrico no contenía compuesto de alquilamonio y el pH 1,8 no se ajustó. Remítase a la figura 1 para ver los resultados.

10 El ejemplo 29B muestra una comparación entre el muestreo usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (HCT)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de la hemoglobina (Hb). La solución de ácido cítrico contenía sal de alquilamonio, en particular, cloruro de tetrametilamonio en una concentración de 16 µmol/ml de sangre, y el pH se ajustó a 2,4. Remítase a la figura 1 para ver los resultados.

Ejemplo 30

Se llevaron a cabo unas pruebas para determinar los iones cloruro (Cl).

15 El ejemplo 30A muestra una comparación entre el muestreo usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (GR15)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de iones cloruro (Cl).

La solución de ácido cítrico no contenía compuesto de alquilamonio y el pH 1,8 no se ajustó. Remítase a la figura 2 para ver los resultados.

20 El ejemplo 30B muestra una comparación entre el muestre usando monohidrato de ácido cítrico (en tubos prístinos para la recolección de sangre KABEVETTE (HCT)) y el muestreo convencional usando K<sub>3</sub>EDTA (en tubos Becton Dickinson (BD)) para la determinación de iones cloruro (Cl). La solución de ácido cítrico contenía sal de alquilamonio, en particular cloruro de tetrametilamonio, en una concentración de 16 µmol/ml de sangre, y el pH se ajustó a 2,4. Remítase a la figura 2 para ver los resultados.

25



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para la inhibición de la coagulación en la sangre, en el que la sangre se mezcla después de su extracción con un agente que comprende, como único anticoagulante, una sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$ , en el que dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  comprende al menos tres grupos carboxilo por molécula, en donde, en el ácido tal como se provee, todos los grupos carboxilo en la molécula están protonados,
- y en el que la concentración de dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se ubica en el intervalo variable entre 0,1 y 100 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella.
- 10 2. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho agente consiste en lo siguiente:
- (i) dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  o
- (ii) dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  disuelta en un disolvente.
- 15 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que posteriormente se lleva a cabo al menos una prueba para la determinación de al menos un componente sanguíneo, con preferencia, se llevan a cabo al menos dos pruebas para la determinación de al menos dos componentes sanguíneos.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se ubica en el intervalo variable entre 1 y 50 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, con preferencia, en el intervalo variable entre 2 y 32 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella, y aun más preferiblemente, en el intervalo variable entre 2 y 10 mmol/l de la sangre que ha de mezclarse con ella.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que en el caso de (ii) el disolvente se selecciona del grupo que consiste en una solución acuosa, agua, y alcohol y mezclas de agua y alcohol, con preferencia es agua o etanol y, más preferiblemente, es agua.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se determina la cantidad del único componente sanguíneo como mínimo, con preferencia, se determinan las cantidades de al menos dos componentes sanguíneos, mediante las siguientes etapas:
- (a) se provee un dispositivo para la recolección de sangre que contiene, situado en el dispositivo, el agente tal como se establece en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 4 y 5, de un modo opcional que contiene, además, un agente modificador del pH y/o una sal de amonio  $NR_4X$ , en donde cada R, independientemente, es hidrógeno, alquilo  $C_1-C_6$  lineal, alquilo  $C_3-C_6$  ramificado, fenilo sustituido o no sustituido y X es haluro y, con preferencia, es cloruro;
- 30 (b) se coloca la sangre en el dispositivo para la recolección de sangre;
- (c) se mezcla dicho agente con sangre en el dispositivo para la recolección de sangre;
- de un modo opcional, (d) se almacena la sangre en el dispositivo para la recolección de sangre durante un período deseado y
- 35 (e) se determina la cantidad del único componente sanguíneo como mínimo, con preferencia, de los únicos dos componentes sanguíneos como mínimo, en la muestra de sangre.
- 40 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tricarbálico, ácido etilendiamintetraacético, ácido dietilentriaminepentaacético, ácido bencenpentacarboxílico, ácido melítico y ácido tetrahidrofuran-2,3,4,5-tetracarboxílico o mezclas de los mismos, con preferencia, es ácido cítrico, ácido tricarbálico o ácido etilendiamintetraacético y, más preferiblemente, es ácido cítrico.
- 45 8. El uso de un dispositivo para la recolección de sangre para recoger y, de un modo opcional, almacenar sangre *in vitro*, en el que dicho dispositivo puede conectarse con un dispositivo convencional para la extracción de sangre y en el que, en el dispositivo, la sangre se mezcla después de su extracción con el agente tal como se establece en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 4, 5 y 7, y en el que de este modo se inhibe la coagulación en la sangre, en el que el agente tal como se establece en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 4, 5 y 7 se provee en el dispositivo, y en el que la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  es el único anticoagulante provisto a mezclar con la sangre.
- 50 9. El uso según la reivindicación 8, en el que la sangre recogida en un único dispositivo y mezclada con dicho agente se somete posteriormente por lo menos a una prueba para la determinación de al menos un componente sanguíneo, con preferencia, a múltiples pruebas que comprenden al menos una prueba hematológica, al menos una prueba de

coagulación y al menos un análisis más de química clínica.

5 10. El uso de un agente que comprende, como único anticoagulante, una sustancia provista como ácido libre, que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  para efectuar la inhibición de la coagulación de sangre *in vitro* en un método de diagnóstico, en el que dicha sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  comprende al menos tres grupos carboxilo por molécula, y en donde, en el ácido tal como se provee, todos los grupos carboxilo en la molécula están protonados.

11. El uso según la reivindicación 10, en el que el agente es tal como se establece en una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5 y 7.

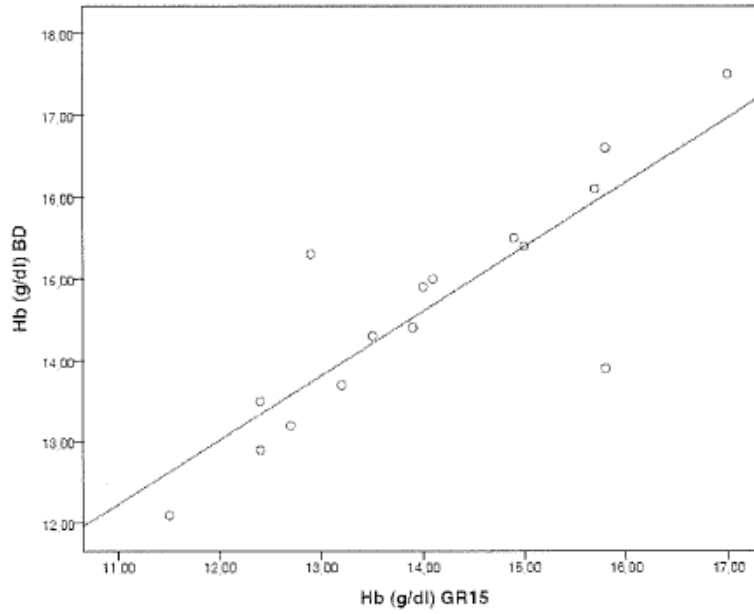
10 12. Un dispositivo para la recolección de sangre, en el que el agente, tal como se establece en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, 4, 5 y 7, se provee en el dispositivo, y en el que la sustancia provista como ácido libre que tiene una  $pK_a \geq 0,9$  es el único anticoagulante provisto a mezclar con la sangre, y en el que dicho dispositivo puede conectarse con un dispositivo convencional para la extracción de sangre.

13. Un kit que comprende:

el dispositivo para la recolección de sangre según la reivindicación 12, y una o más sustancias de prueba para la determinación de al menos un componente sanguíneo en la sangre recogida.

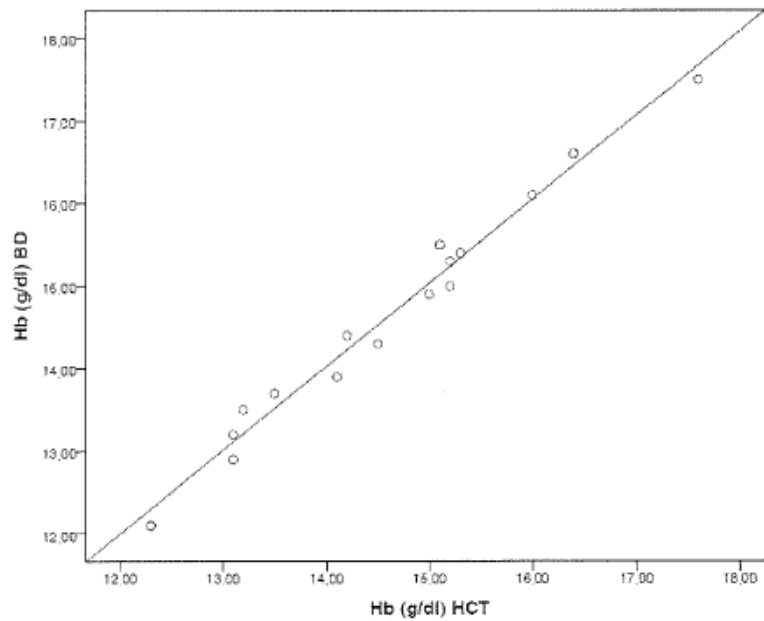
Figura 1

Resultados del ejemplo 29A



$$y = 0,789x + 3,555, R^2 = 0,72$$

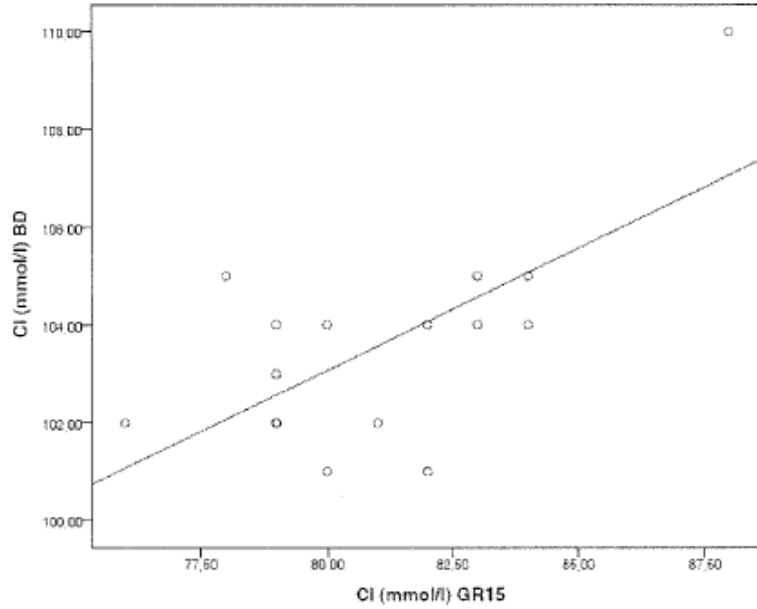
Resultados del ejemplo 29B



$$y = 1,013x - 0,156, R^2 = 0,98$$

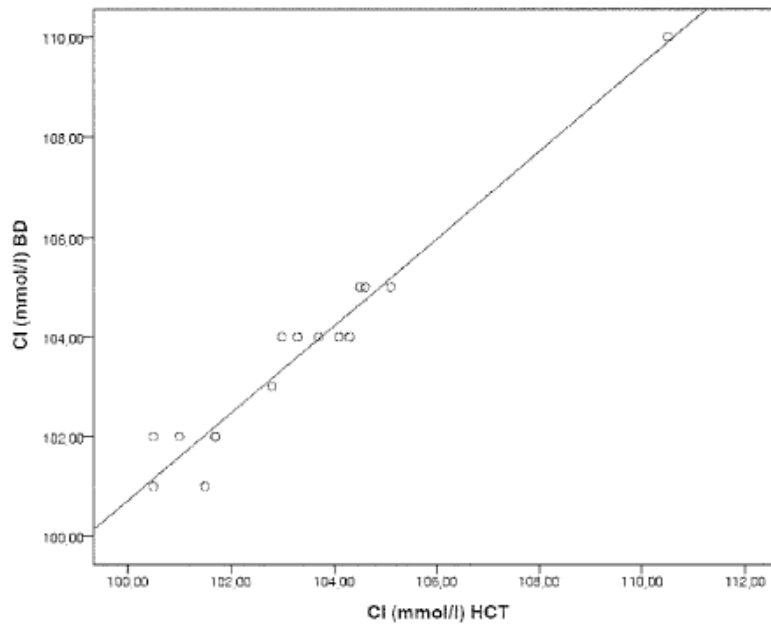
Figura 2

Resultados del ejemplo 30A



$$y = 0,499x + 63,15, R^2 = 0,448$$

Resultados del ejemplo 30B



$$y = 0,874x + 13,318, R^2 = 0,955$$