

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 932**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/56** (2006.01)

**G01N 33/86** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2014 PCT/EP2014/053461**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14183886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2014 E 14705782 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2997156**

54 Título: **Métodos de determinación de actividades de los factores de coagulación**

30 Prioridad:

**14.05.2013 ES 201330983**

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

**11.09.2018**

73 Titular/es:

**STRUSZYM, S.L. (100.0%)**

**C/ Son Oliva 7**

**07009 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES**

72 Inventor/es:

**GALMÉS SUREDA, BERNAT;**

**CANARO HIRNYK, MARIANA ISABEL y**

**CORTINA GINER, VICENTE R.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 680 932 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**

Métodos de determinación de actividades de los factores de coagulación

5 La presente invención se refiere al campo del análisis de parámetros de la sangre y en particular a un método para determinar actividades de los factores de coagulación. Así, se refiere al campo de la medicina, diagnóstico, además de métodos adaptados para tomar medidas en muestras de sangre.

Las siguientes definiciones están incluidas en el presente documento simplemente para los fines de potenciar el entendimiento de la invención descrita en el presente documento.

10 El término "reactivo de coagulación de la sangre", como se define en el presente documento, se refiere a un compuesto o grupo de compuestos, además de a mezclas de composiciones que permiten la coagulación de una muestra de sangre sola o en combinación con otros reactivos, siendo dichos otros reactivos comúnmente fuente de calcio iónico (es decir, sales de calcio orgánicas e inorgánicas), además de plasmas artificialmente agotados en cualquiera de los factores de coagulación; activadores de la fase de contacto de la coagulación, mezclas de factor tisular y fosfolípidos, y muestras de control que incluyen ya sea sangre o plasma que comprenden cantidades conocidas de cualquiera de los factores de coagulación y que cubren actividades de los factores consideradas tanto 15 valores normales como patológicos, según intervalos de referencia comúnmente aceptados en la hematología.

20 El término "activador de la fase de contacto de la coagulación" o "activadores por contacto superficial" (usados en el presente documento indistintamente) se refiere a cualquier compuesto que promueve la activación de la vía de coagulación intrínseca por contacto superficial. Esta vía intrínseca también se denomina vía de activación por contacto. La vía de activación por contacto empieza con la formación del complejo primario sobre el colágeno por quininógeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína y FXII (factor de Hageman). La precalicreína se convierte en calicreína y FXII se convierte en FXIIa. FXIIa convierte FXI en FXIa. El factor XIa activa FIX, que con su cofactor FVIIIa forma el complejo de tenasa, que activa FX a FXa. La función secundaria que tiene la vía de activación por contacto de iniciar la formación de coágulos puede ilustrarse por el hecho de que pacientes con deficiencias graves de FXII, HMWK y precalicreína no tienen un trastorno hemorrágico. En su lugar, parece que el sistema de activación por contacto está más implicado en inflamaciones. Ejemplos de los activadores de la fase de contacto incluyen, así, 25 cualquiera de los compuestos naturales o complejos formados con colágeno, HMWK y precalicreína.

Otros ejemplos de activadores de la fase de contacto incluyen compuestos artificiales de naturaleza polianiónica, tales como caolín de fórmula general  $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ , y otros silicatos, o ácidos orgánicos, tales como ácido elálgico. Estos compuestos son de hecho miméticos de las superficies celulares o de superficies de tejido.

30 Un "plasma agotado en factor" se refiere a plasma normalmente de un origen artificial del que se han eliminado una o más proteínas diana, por ejemplo, por medio de tecnologías de inmunoadsorción por afinidad selectiva o, por ejemplo, químicamente. Generalmente, son plasmas citrados humanos y pueden ser plasmas deficientes en cualquiera de los siguientes factores: II, V, VII, X, VIII, IX, XI, XII.

35 La expresión "bajos niveles del factor de coagulación que va a medirse" debe entenderse como que la composición (es decir, plasma) tiene una cantidad de un factor de coagulación especificado más baja que la cantidad considerada como normal según intervalos de referencia de laboratorio comúnmente aceptados. La cantidad de un factor de coagulación particular en plasma puede determinarse tanto por medios no funcionales (antígeno) como funcionales (actividad de los factores); ambas medidas no deben coincidir necesariamente y pueden expresarse como un porcentaje al que se hace referencia por un norma internacional primaria establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Centrándose en las actividades de factores, el factor presente en una muestra particular puede medirse comparando el valor de alguna de las propiedades físicas específicas que variará a medida que se esté formando el coágulo (que a su vez dependerá del tipo particular de ensayo usado en el laboratorio para determinar la cantidad de factor, es decir, cromogénico, óptico, eléctrico, etc.) con los de un gráfico de calibración obtenido a partir de un calibrador con un porcentaje de actividad de los factores conocido referido por la norma primaria de la OMS apropiadamente diluido para varios puntos de calibración y que cubre un intervalo de porcentajes de actividades de los factores lo suficientemente ancho como para determinar ya sea valores normales y patológicos, de manera que una variación particular pueda convertirse en la propiedad física usada para trazar la curva de calibración en un porcentaje de factor actividad. Obviamente, las medidas de muestras deben basarse en la misma propiedad física, reactivos, equipo y procedimiento general seguido en el caso de la curva de calibración. Cantidades normales de factores de coagulación son aquellas definidas por un intervalo de valores que incluyen los valores normalmente encontrados en sujetos normales. Es ampliamente aceptado que las cantidades normales (actividades) puede variar dependiendo del ensayo específico, reactivos, equipo y procedimientos usados para determinar las actividades de factores, entre razas y poblaciones dentro de dichas razas, entre personas con diferentes grupos sanguíneos, y así hacen los valores de actividad de los factores de coagulación. Esto es por lo que podría considerarse normal el valor de cualquiera de la actividad de los factores de coagulación que varía normalmente del 70 % al 150 %. En la presente descripción, las expresiones "cantidad/nivel de un factor de coagulación" y "actividad de un factor de coagulación" se consideran sinónimas, debido a que independientemente de la determinación (no funcional frente a funcional) la una se correlaciona con la otra. Por otra parte, también es ampliamente aceptado que un valor de cualquiera de la actividad de los factores de coagulación que varía del 40 % al 70 % va a considerarse 55

como no normal, pero también no patológico; y que un valor de cualquiera de la actividad de los factores de coagulación que varía del 0 % al 40 % se considera no normal y patológico. Una "deficiencia de factor de coagulación patológico" se refiere a un grado de deficiencia de un factor particular que implica una enfermedad y/o con consecuencias graves para el mantenimiento de la vida.

- 5 Intervalos dados, tales como actividades de los factores de coagulación, temperaturas, tiempos, tamaños, y similares, deben considerarse aproximados, a menos que se establezca específicamente. La expresión "entre XX e YY" se considera equivalente a la expresión "de XX a YY".

#### TÉCNICA ANTERIOR

10 En el campo de la coagulación de la sangre, es conocido determinar los parámetros conocidos como tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) y/o tiempo de protrombina (PT). Ambos parámetros dan un valor que indica el tiempo requerido para la coagulación de la sangre. En principio, estas medidas no requieren personal especializado o equipo especial y pueden ser determinadas en hospitales o laboratorios no especializados. Además, existen dispositivos particulares, incluso dispositivos de asistencia sanitaria (POC), para determinar estos parámetros en los hospitales o en casa.

15 Ejemplos de estos dispositivos incluyen CoaguCheck Plus® (CCP®) comercialmente disponible de, por ejemplo, Boehringer Mannheim. Es un fotómetro de láser portátil alimentado por baterías con reactivos de APTT (para coagulación por la vía intrínseca) y reactivos de PT (para coagulación por la vía extrínseca). Los reactivos están dispuestos en un cartucho/tira de reactivos de plástico desechable de tipo oblea. Se aplica una muestra de sangre completa a un pocillo de aplicación en el cartucho y la sangre circula por acción capilar a la cámara de reactivo.

20 La coagulación empieza cuando la sangre de la muestra se pone en contacto con los reactivos y se considera que ha parado cuando el fotómetro detecta el cese del flujo de sangre. La detección se basa en detectar la variación en la dispersión de la luz de los glóbulos rojos. Se mide el tiempo entre la aplicación de la sangre y la coagulación de la sangre y se convierte en los equivalentes de plasma APTT o PT.

25 El documento WO9013034 desvela una tira reactiva que comprende un orificio o área adaptada para recibir una muestra de sangre completa, una pista capilar que conduce la muestra a una zona que comprende los reactivos para iniciar la coagulación y para las medidas *in situ* de APTT. La tira también está provista de un puerto de ventilación. El objetivo del dispositivo es la determinación del cese del flujo de sangre independientemente del hematocrito de sangre, que se ha informado como un inconveniente en tiras reactivas usando muestras de sangre como prueba de líquido.

30 La determinación de APTT o PT, además de otros parámetros de la sangre, es de gran relevancia para pacientes que reciben tratamientos anticoagulantes. De la misma forma, el tiempo de coagulación es un aspecto crítico en las unidades de cuidados intensivos para la monitorización del tratamiento con heparina y en la evaluación preoperatoria de la coagulación de la sangre. Como regla general, APTT o PT pueden ser fácilmente determinados en condiciones normales, que significa que el sujeto (paciente) no tiene ninguna deficiencia hereditaria o adquirida de los factores de coagulación. APTT y/o PT pueden alterarse cuando el sujeto tiene una deficiencia de los factores de coagulación, siendo necesarias pruebas de diagnóstico adicionales. En estos escenarios, los pacientes son redirigidos a hospitales o laboratorios analíticos más especializados, que alargan el tiempo de diagnóstico. Esto también supone un procedimiento molesto para el paciente. Otra desventaja es que puede requerirse cantidad relativamente alta de sangre (concretamente el plasma procesado adicional).

40 El modo normalizado para medir la deficiencia de uno o más factores de coagulación puede resumirse del siguiente modo. Se diluye en primer lugar una muestra de prueba de plasma con un tampón, y luego se mezcla con plasma agotado en el factor que es deficiente solo en el factor de coagulación que va a ser detectado en la muestra de prueba, y que comprende todos los otros factores de coagulación. A continuación, se añaden a la mezcla los reactivos ya sea de la vía de coagulación extrínseca o intrínseca necesarios para empezar la coagulación. Entonces, la coagulación solo es dependiente del factor de coagulación limitante, correspondiente al que se mide en la muestra de prueba. Una modificación de este método normalizado se desvela en particular para la actividad del factor V en el documento WO9720066. El documento WO9720066 desvela la forma para determinar si un paciente es susceptible a padecer una tromboembolia. El análisis se realiza usando plasma y determinando la relación entre el nivel de actividad del factor V sin proteína C activada (APC) y el nivel de actividad del factor V con APC. Se añade plasma agotado en el factor V para aumentar la especificidad de la prueba.

55 Entre las pruebas comerciales adaptadas para detectar deficiencias de los factores de coagulación, la prueba conocida como Actin FS® de Siemens Healthcare es uno de los múltiples ejemplos comúnmente usados en los laboratorios especializados para probar actividades de los factores de coagulación en muestras de plasma. La prueba incluye todos los reactivos para una determinación de APTT (fosfatidas de soja purificadas, activador de ácido elálgico y calcio) en forma líquida y lista para su uso. Permite analizar defectos de factores de los factores VIII, IX, XI y XII con alta sensibilidad y especificidad.

Como se ha expuesto anteriormente, todas estas pruebas se realizan en plasma y requieren muestras de sangre venosa.

Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos y dispositivos que resuelvan al menos parcialmente uno o más de los problemas anteriormente mencionados.

## SUMARIO

La presente invención se define según las reivindicaciones adjuntas.

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de medición de una actividad de un factor de coagulación de la vía intrínseca o extrínseca, en el que dicho factor de coagulación comprende uno cualquiera de factor II, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI y factor XII, comprendiendo dicho método:

10 (a) poner en contacto una muestra de sangre capilar de un sujeto de prueba que comprende sangre completa con plasma agotado de dicho factor de coagulación, una fuente de citrato iónico, una fuente de calcio iónico, fosfolípidos, y uno o más de un activador de la fase de contacto de la coagulación y factor tisular;

(b) determinar el tiempo requerido para la coagulación de la sangre de dicha muestra de sangre capilar; y

(c) correlacionar dicho tiempo con dicha actividad de dicho factor de coagulación.

15 Además, aunque no está de acuerdo según la invención como se reivindica, se desvela una tira reactiva para determinar la actividad de un factor de coagulación en una muestra de sangre proporcionada. La tira comprende un soporte, un puerto de entrada de muestra para la deposición de una muestra de sangre y un área de reacción que comprende un reactivo de coagulación de la sangre. El puerto de entrada de muestra está conectado al área de reacción, y el reactivo de coagulación comprende plasma deficiente en el factor de coagulación para el que va a medirse la actividad, una fuente de calcio iónico, una fuente de citrato iónico, y uno cualquiera o más de reactivos de activador de la fase de contacto de la coagulación y fosfolípidos o una mezcla de factor tisular y fosfolípidos.

20 En la presente invención, "plasma" se refiere a plasma sanguíneo, que es el componente líquido de color paja / amarillo pálido de la sangre que normalmente contiene los glóbulos sanguíneos en la sangre completa en suspensión. Puede ser principalmente agua (92 % en volumen), y puede contener proteínas disueltas (es decir, albúminas, globulinas y fibrinógeno), glucosa, factores de coagulación, electrolitos (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, etc.), hormonas y dióxido de carbono (siendo el plasma el principal medio para el transporte de productos excretorios). El plasma se prepara centrifugando un tubo de sangre fresca que contiene un anticoagulante en una centrifugadora hasta que los glóbulos sanguíneos caen al fondo del tubo.

25 Según esto, puede introducirse una muestra de sangre completa (obtenida, por ejemplo, por punción capilar de la punta del dedo de un paciente) en el puerto de entrada de muestra. La muestra llegará al área de reacción que contiene plasma deficiente en el factor de coagulación cuya actividad va a medirse. Proporcionando este plasma deficiente en un factor específico (y, lo que es más importante, cantidades normales de los otros), la cantidad de factor presente en la muestra de sangre del paciente se convertirá en el elemento limitante de la reacción y así el tiempo de coagulación solo será dependiente de esta variable. Midiendo el tiempo de coagulación, puede determinarse la actividad del factor de coagulación seleccionado.

30 Así, las tiras reactivas tratadas anteriormente proporcionan una forma de correlacionar el tiempo de coagulación con el porcentaje correspondiente de actividad del factor de coagulación que está en realidad siendo medido. Aunque no está de acuerdo con la invención como se reivindica, en el presente documento se trata una tira reactiva que puede combinarse con equipo conocido para determinar el tiempo de coagulación, tal como CoaguCheck Plus® mencionado antes (o versiones ligeramente modificadas del mismo) para medir actividades de los factores de coagulación. El equipo puede ser capaz de determinar un cambio en la fase basándose, por ejemplo, en la emisividad/reflectividad de IR o de otro modo.

35 En caso de factores de coagulación asociados a la vía extrínseca de coagulación de la sangre, el reactivo de coagulación puede comprender una mezcla de factor tisular, calcio y fosfolípidos. En caso de factores de coagulación asociados a la vía intrínseca de coagulación de la sangre, el reactivo de coagulación puede comprender activador de la fase de contacto de la coagulación, calcio y fosfolípidos. El reactivo de coagulación puede proporcionarse en, por ejemplo, forma seca o liofilizada. Aunque no está de acuerdo con la invención como se reivindica, la descripción trata una tira reactiva que permite medir cualquier deficiencia de factores de coagulación usando bajas cantidades de sangre completa, incluso de sangre capilar.

40 Las tiras reactivas tratadas anteriormente pueden ser fácilmente usadas como dispositivos de POC en hospitales o incluso por un paciente en su casa. Las tiras pueden incluso funcionar bien con bajos volúmenes de muestra. Pueden ser portátiles y de pequeño tamaño. Además, las tiras pueden fabricarse usando procedimientos conocidos y relativamente simples, implicando así bajos costes de producción.

45 Así, representan la provisión de una necesidad que se sentía desde hace tiempo y pueden mejorar no solo la calidad de vida de un paciente, sino que también pueden mejorar el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la alteración de las vías de coagulación, tales como hemofilia, por el personal hospitalario. Por tanto y de gran interés,

cualquier decisión terapéutica de administrar o no un fármaco particular o factor de coagulación puede tomarse en el tiempo más corto posible.

5 En algunas realizaciones, en el área de reacción, uno o más de los ingredientes está separado de otro ingrediente. La separación entre ingredientes puede incluir una barrera física (por ejemplo, una pared de un compartimento) o los ingredientes (secados o liofilizados) pueden inmovilizarse en el área de reacción a una distancia entre sí. Pueden proporcionarse una o más pistas capilares entre compartimentos o ingredientes para garantizar la adecuada mezcla de ingredientes, y en un orden predeterminado.

10 En algunos ejemplos, el área de reacción puede comprender una primera porción, una segunda porción y tercera porción, estando las porciones sustancialmente separadas entre sí, y la primera porción comprende el plasma deficiente en el factor de coagulación para el que va a medirse la actividad y una fuente de citrato iónico, la segunda porción comprende uno o más reactivos de activador de la fase de contacto y fosfolípidos, y la tercera porción comprende una fuente de calcio iónico. Una separación de los ingredientes garantiza que la mezcla pueda tener lugar en un orden predeterminado. El orden descrito en el presente documento es particularmente adecuado para los factores implicados en la vía intrínseca. En otro ejemplo, incluso la fuente de citrato iónico puede estar en una porción separada, así una porción adicional puede comprender la fuente de citrato iónico separada del plasma deficiente en el factor de coagulación para el que va a medirse la actividad.

20 En algunos otros ejemplos, el área de reacción puede comprender una primera porción y una segunda porción separadas entre sí, y la primera porción comprende el plasma deficiente en el factor de coagulación para el que va a medirse la actividad y una fuente de citrato iónico, y la segunda porción comprende una mezcla de una fuente de calcio iónico, factor tisular y fosfolípidos. Una tira reactiva tal puede ser particularmente adecuada para los factores implicados en la vía extrínseca. Como antes, en otro ejemplo, la fuente de citrato iónico puede estar en una porción separada, así una porción adicional puede comprender la fuente de citrato separada del plasma deficiente en la coagulación para el que va a medirse la actividad.

25 En algunas realizaciones, el puerto de entrada de muestra puede estar conectado con el área de reacción por una pista capilar. Son conocidas las pistas capilares en el campo de las tiras reactivas. La separación del puerto de entrada de muestra del área de reacción garantiza que el tiempo de coagulación pueda ser medido de forma fiable determinando un primer cambio de fase de sólido a líquido (es decir, cuando la sangre de la muestra de sangre del paciente llega al área de reacción) y luego de líquido a sólido (es decir, cuando ha tenido lugar la coagulación).

30 En algunas realizaciones, una tira reactiva puede comprender además un puerto de entrada de líquido de control y un área de reacción de sangre normal que comprende sangre o plasma que contiene cantidades estándar (normales) conocidas de cualquiera de los factores de coagulación (es decir, cantidades que se correlacionan con o que dan lugar a una actividad del 70 % al 150 %), en las que la segunda área de reacción está conectada al puerto de entrada de líquido de control, opcionalmente mediante una pista capilar.

35 Opcionalmente, la tira reactiva tratada anteriormente puede comprender además o alternativamente un puerto de entrada de líquido de control y un área de reacción de sangre agotada que comprende sangre o plasma que contiene bajos niveles (cantidades) del factor de coagulación que va a medirse, siendo dichos niveles conocidos de factor de coagulación inferiores a un valor de referencia y/o estando fuera de un intervalo de referencia, incluyendo dicho valor de referencia cantidades estándar (normales) o intervalos de actividades (es decir, del 70 % al 150 %) y actividades no normales pero al mismo tiempo no patológicas (es decir, del 40 % al 70 %). Por fuera de cualquier valor de referencia o intervalo debe entenderse que según dichos intervalos de referencia el valor es uno patológico. En este caso específico, es un valor más bajo que el límite más bajo del intervalo de referencia.

40 En una realización particular, el área de reacción de sangre agotada comprende niveles conocidos de factor de coagulación que se correlacionan con una actividad que es más baja del 40 %.

45 La provisión de una o más áreas de reacción adicionales que comprenden cualquiera de sangre/plasma con cantidades normales de factor de coagulación y sangre/plasma con una cantidad relativamente baja del factor de coagulación que va a medirse puede ayudar a mejorar la fiabilidad de las mediciones. La sangre en estas áreas puede proporcionarse en forma seca o liofilizada. El líquido de control puede ser, por ejemplo, un suero o tampón fisiológico, o incluso agua destilada en caso de que las áreas de reacción comprendan disolución ya tamponada. Cuando el líquido de control llega al área de reacción, puede registrarse un cambio de fase de sólido a líquido. 50 Cuando se produce la coagulación, entonces puede otra vez medirse un cambio de fase de líquido a sólido. Puesto que se conoce la "cantidad" de factor de coagulación en estas áreas de control, también se conoce su tiempo de coagulación. Así, puede comprobarse si el tiempo de coagulación registrado para las áreas de control coincide o no con el tiempo de coagulación teórico. Si coincide, así se es capaz de llegar a la conclusión de que el equipo usado para medir la coagulación está funcionando apropiadamente. En una realización particular, las áreas de reacción 55 pueden estar en forma de pocillos.

Aunque no está de acuerdo con la invención como se reivindica, en algunas realizaciones, las tiras reactivas tratadas anteriormente pueden comprender una memoria legible por ordenador que comprende datos que enlazan los tiempos de coagulación que pueden ser medidos con las actividades del factor de coagulación que va a medirse.

Los datos pueden estar, por ejemplo, en forma de una curva de coagulación o una tabla de consulta que indica el nivel de actividad de un factor de coagulación en función de un tiempo de coagulación. Equipo adecuado puede leer la memoria y ser capaz de indicar directamente el nivel de actividad del factor de coagulación en investigación. Pueden usarse coagulómetros adaptados para la lectura de memoria legible por ordenador integrados en una tira reactiva.

5  
10  
15  
Como se indicó anteriormente en "Sumario", la invención como se reivindica se refiere a un método *in vitro* de medición de una actividad de un factor de coagulación de la vía intrínseca o extrínseca, en la que dicho factor de coagulación comprende uno cualquiera de factor II, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI y factor XII. El método comprende poner en contacto una muestra de sangre capilar aislada de un sujeto de prueba con una composición que comprende un activador de la fase de contacto de la coagulación, un plasma agotado en factor de coagulación, una fuente de citrato iónico y una fuente de calcio iónico, o alternativamente, poner en contacto la muestra con una mezcla de factor tisular y fosfolípidos, un plasma agotado en factor de coagulación, una fuente de citrato iónico y una fuente de calcio iónico; determinar el tiempo requerido para la coagulación de dicha muestra; y correlacionar dicho tiempo de coagulación con una actividad particular comparando con una función de coagulación, representando dicha función de coagulación la relación entre el tiempo de coagulación y la actividad de un factor de coagulación.

20  
En algunas realizaciones, el método puede usarse para dar un diagnóstico en el que, si el tiempo requerido para la coagulación es superior a un valor de referencia o intervalo de sujetos sin deficiencia de factores de coagulación, es indicativo de deficiencia de factor de coagulación patológico. El valor de referencia o intervalo de referencia es en particular el tiempo o intervalo de tiempos que se correlacionan con actividades no patológicas. Una referencia tal puede incluir valores normales y también valores no normales, pero considerados no patológicos para un factor de coagulación particular. Así, si el tiempo requerido para la coagulación es superior a un valor de referencia o intervalo, esto significa que la actividad del factor es inferior al valor de referencia y, es indicativo de deficiencia de factor de coagulación patológico.

25  
En una realización particular, la actividad del factor de coagulación es inferior al 40 % en caso de una deficiencia de cualquiera de los factores de coagulación probados.

30  
El método también puede usarse para diagnosticar actividades no normales y al mismo tiempo no patológicas de un factor de coagulación particular. Este es el caso particular cuando la actividad detectada está en el intervalo de valores del 40 % al 70 %. Aunque depende del factor probado, para la mayoría de ellos, este intervalo de actividades es indicativo de deficiencia de factores de coagulación (cantidades no normales; 70 % - 150 %), sino de tipo no patológico. La determinación de actividades no normales pero no patológicas de un factor permite decidir sobre un tratamiento médico particular que incluye el seguimiento del paciente sin tratamiento.

35  
En un ejemplo particular del método de diagnóstico *in vitro* de la invención, la deficiencia de factores de coagulación está seleccionada del grupo que consiste en deficiencias del factor de coagulación II (FII), deficiencias del factor de coagulación V (FV), deficiencias del factor de coagulación VII (FVII), deficiencias del factor de coagulación VIII (FVIII), cuyo déficit o deficiencia causa hemofilia A, deficiencias del factor de coagulación IX (FIX), cuyo déficit o deficiencia causa hemofilia B, deficiencias del factor de coagulación X (FX), deficiencias del factor de coagulación XI (FXI) y deficiencias del factor de coagulación XII (FXII).

40  
45  
50  
Estas deficiencias pueden ser coagulopatías (deficiencias) congénitas o ser adquiridas de diferentes orígenes. Ejemplos ilustrativos incluyen deficiencias o inhibición de la síntesis de factor de coagulación tal como en terapia anticoagulante (heparina, heparinas de bajo peso molecular, warfarina, derivados de cumarina, dicumarinas, etc.), o en insuficiencia hepática grave o presencia de inhibidores adquiridos. Coagulopatías adquiridas que conducen a deficiencias de factores de coagulación pueden ser debidas a un consumo exagerado de factores de coagulación, haciendo así que no estén disponibles para formar el coágulo en una lesión hemorrágica. Este mecanismo se produce, por ejemplo, en el síndrome de coagulación intravascular diseminada debido al consumo que ocurre en múltiples enfermedades tales como en septicemia grave, en la que la formación de múltiples microtrombos disminuye los niveles de factores de coagulación. Otro ejemplo es en la invasión de la sangre por factor tisular tal como liberación placentaria; en la retención de un feto muerto; en múltiples traumatismos con el aplastamiento de tejidos; en picaduras de serpientes venenosas, etc. En todas estas enfermedades o afecciones, el consumo de factores de coagulación es empeorado por la lisis de la fibrina de numerosos microtrombos debido a la acción de la plasmina, que son antiplaquetarios y anticoagulantes.

55  
En un ejemplo particular del método, la etapa (a) se lleva a cabo poniendo en contacto una muestra de sangre capilar aislada de un sujeto de prueba que comprende sangre completa con una composición que comprende un activador de la fase de contacto de la coagulación, un plasma agotado en factor de coagulación, una fuente de citrato iónico y una fuente de calcio iónico.

Esta realización permite la determinación de la actividad de un factor de coagulación de la vía intrínseca. En otro ejemplo particular del método de medición de la actividad de una coagulación de la vía intrínseca, la etapa (a) puede llevarse a cabo:

(i) poniendo primero en contacto una muestra de sangre capilar aislada de un sujeto de prueba con una composición que comprende un plasma agotado en factor de coagulación y una fuente de citrato iónico para obtener una mezcla primaria;

5 (ii) poner además en contacto la mezcla primaria de la etapa (i) con un activador de la fase de contacto de la coagulación, una fuente de calcio iónico y fosfolípidos.

En algunas realizaciones, la etapa (ii) puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 35 °C a 39 °C y durante un tiempo de 15 segundos a 5 minutos. Es en la etapa (b) que la mezcla se pone en contacto con los reactivos conocidos como reactivos de APTT. Ejemplos particulares de factores de coagulación de la vía intrínseca cuya actividad puede ser determinada por este método incluyen factor VIII, IX, XI y XII.

10 Todas estas etapas (i) a (ii) pueden realizarse en una tira reactiva provista de un área de reacción con múltiples compartimentos. En cada compartimento pueden proporcionarse los compuestos o composiciones en forma liofilizada o líquida. La mezcla de la muestra con los compuestos o composiciones puede lograrse por capilaridad.

15 En un ejemplo particular del método, la etapa (a) puede llevarse a cabo poniendo en contacto una muestra de sangre capilar aislada de un sujeto de prueba con una composición que comprende una mezcla de factor tisular y fosfolípidos, un plasma deficiente en el factor de coagulación para el que va a medirse la actividad, una fuente de citrato iónico y una fuente de calcio iónico.

Esta realización permite la determinación de la actividad de un factor de coagulación de la vía extrínseca. En otro ejemplo particular del método para medir la actividad de una coagulación de la vía extrínseca, la etapa (a) puede llevarse a cabo:

20 (i) poniendo primero en contacto una muestra de sangre capilar aislada de un sujeto de prueba con una composición que comprende un plasma agotado en factor de coagulación y una fuente de citrato iónico para obtener una mezcla primaria; y

(ii) poner además en contacto la mezcla primaria de la etapa (i) con una mezcla de factor tisular y fosfolípidos, una fuente de calcio iónico y fosfolípidos.

25 En una realización, la etapa (ii) puede realizarse a una temperatura de 35 °C a 39 °C. Esta etapa (ii) es la etapa en la que la mezcla de la etapa (i) se pone en contacto con los reactivos de PT conocidos. Ejemplos particulares de factores de coagulación de la vía extrínseca cuya actividad puede ser determinada por este método incluyen factor II, V, VII y X.

30 Todas estas etapas (i) a (ii) pueden realizarse en una tira reactiva provista de un área de reacción con múltiples compartimentos. En cada compartimento, los compuestos o composiciones pueden proporcionarse en forma liofilizada o líquida. La mezcla de la muestra con los compuestos o composiciones puede lograrse por capilaridad.

35 En cualquiera de los ejemplos del método, la etapa (b) de determinar el tiempo requerido para la coagulación de la sangre puede empezar cuando en cualquiera de las opciones la muestra (o mezclas) se ponen en contacto con la fuente de calcio. Después, el método puede incluir la etapa (c) de correlacionar la coagulación del tiempo de sangre con una actividad particular.

Cualquiera de los métodos anteriores descritos en este documento permite detectar si un sujeto está padeciendo alguna deficiencia de factores de coagulación usando muestras de bajo volumen (sangre capilar) a diferencia de las pruebas del estado de la técnica.

40 Objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden ser aprendidos por la práctica de la invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Ejemplos particulares de las tiras para llevar a cabo el método de la presente invención se describirán a continuación a modo de ejemplos no limitantes, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Las Figuras 1a y 1b ilustran esquemáticamente vistas desde arriba de diferentes ejemplos de tiras reactivas;

45 la Figura 1c ilustra esquemáticamente una curva de coagulación que puede usarse en combinación con el ejemplo de la Figura 1b;

la Figura 2a ilustra esquemáticamente una vista desde arriba de otro ejemplo de una tira reactiva;

la Figura 2b ilustra esquemáticamente una curva de coagulación que puede usarse en combinación con el ejemplo de la Figura 2a; y

50 la Figura 3 es una vista en perspectiva esquemática de la tira según otro ejemplo más.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

La Figura 1a ilustra esquemáticamente una vista desde arriba de una tira reactiva según un primer ejemplo. Una tira 10 puede comprender un soporte en el que se proporciona un puerto de entrada de muestra 12. También se indica un área de reacción 14. Una pista 13 puede conectar el puerto de entrada de muestra con el área de reacción 14.

- 5 La pista 13 puede ser una pista capilar. En ejemplos alternativos, el transporte de la muestra de sangre desde el área de deposición 12 hasta el área de reacción 14 puede basarse en un principio diferente, tal como, por ejemplo, bombeo o succión.

10 El soporte puede comprender una o más capas de plástico semirrígido. Puede proporcionarse una capa superior que cierra el área de reacción y/o el área de deposición desde arriba. Un paciente, doctor o personal de laboratorio puede depositar una gota o algunas gotas de sangre completa en el área de deposición 12 (por ejemplo, después de destapar). En una posible implementación, la sangre puede haber sido extraída a través de una punción capilar en la punta del dedo.

15 Las capas pueden hacerse adecuadas para el método de medición empleado. Por ejemplo, pueden ser sustancialmente transparentes o translúcidas si el método para determinar la coagulación se basa en, por ejemplo, absorción/reflexión de luz. Si el método de medición se basa en, por ejemplo, una característica eléctrica (tal como, por ejemplo, la impedancia), pueden elegirse materiales adecuados y puede proporcionarse un circuito eléctrico adecuado en el soporte.

20 El área de reacción puede comprender reactivo de coagulación de la sangre que puede variar dependiendo del factor de coagulación que va a investigarse. El factor de coagulación (o "factor de coagulación de la sangre") para el que se mide la actividad puede seleccionarse del grupo que consiste en factor II, V, VII, X, VIII, IX, XI y XII.

Dependiendo del factor que va a investigarse, el reactivo de coagulación de la sangre puede comprender plasma deficiente en el factor de coagulación seleccionado, una fuente de calcio iónico y uno cualquiera o más de reactivos de activador de la fase de contacto de la coagulación y fosfolípidos (para los factores relacionados con la vía intrínseca) o una mezcla de factor tisular y fosfolípidos (para los factores relacionados con la vía extrínseca).

25 Los activadores de la fase de contacto de la coagulación pueden seleccionarse del grupo que consiste en compuestos polianiónicos, ácidos orgánicos y mezclas de los mismos. La fuente de calcio puede ser una sal de calcio seleccionada del grupo que consiste en cloruro de calcio, acetato de calcio, carbonato cálcico, gluconato de calcio, gluconato de calcio, hidróxido de calcio, nitrato de calcio, sulfonato de calcio, fosfato de calcio, y mezclas de estas sales. La fuente de citrato iónico puede ser citrato de sodio y/o ácido-citrato-dextrosa. En una realización preferida, la fuente de citrato iónico es citrato de sodio.

30 El reactivo de coagulación puede estar en forma líquida, semisólida o sólida. El reactivo de coagulación puede estar liofilizado. Alternativamente, el reactivo de coagulación puede ser de otro modo inmovilizado en el área de reacción. Una vez la muestra de sangre completa del paciente llega al área de reacción, puede medirse un cambio local, en particular en el caso de un reactivo liofilizado, puede medirse un cambio de fase de sólido a líquido. Cuando se registra un cambio de fase de líquido a sólido ha tenido lugar la coagulación. El tiempo de coagulación puede así derivarse del tiempo transcurrido entre el primer cambio y el segundo cambio. También pueden usarse otros métodos conocidos para determinar los tiempos de coagulación.

35 Puede usarse cualquier equipo adecuado tal como un coagulómetro para este tipo de determinación y puede basarse, por ejemplo, en principios ópticos (reflexividad/emisividad), mecánica, inductancia, resistencia eléctrica o impedancia y otros (o combinaciones de los mismos). En algunos ejemplos, pueden usarse coagulómetros portátiles. La tira reactiva puede introducirse en el coagulómetro ya sea antes o después de la deposición de la muestra de sangre completa. Las dimensiones de la tira reactiva pueden determinarse según el equipo usado para el análisis.

40 La Figura 1a ilustra además un ejemplo de cómo los ingredientes de los reactivos de coagulación pueden separarse en una área de reacción. En el ejemplo esquemáticamente ilustrado, el área de reacción puede comprender una primera porción 14a, una segunda porción 14b y una tercera porción 14c.

Las porciones 14a, 14b y 14c puede estar sustancialmente separadas entre sí: esto puede lograrse, por ejemplo, creando compartimentos separados. Los compartimentos separados pueden ser particularmente útiles cuando los ingredientes se proporcionan en forma líquida. En otro ejemplo, los ingredientes pueden proporcionarse en forma seca o liofilizada. Si se inmovilizan apropiadamente, pueden no ser necesarios compartimentos separados.

45 En este ejemplo particular, la primera porción puede comprender el plasma deficiente en el factor de coagulación para el que va a medirse la actividad y una fuente de citrato iónico. La segunda porción puede comprender uno o más reactivos de activador de la fase de contacto y fosfolípidos, y la tercera porción puede comprender una fuente de calcio iónico,

50 Una separación de los ingredientes garantiza que la mezcla pueda tener lugar en un orden predeterminado. Las pistas capilares 15a y 15b conectan las porciones separadas. La longitud de la pista capilar puede determinar el



tiempo que se necesita para que la mezcla llegue a la siguiente porción. En este sentido, el dimensionamiento apropiado de la pista capilar puede garantizar que la mezcla de ingredientes tenga lugar antes de que llegue el siguiente ingrediente. En otros ejemplos, pueden usarse otros mecanismos tales como succión o bombeo para conectar los ingredientes separados. El orden descrito en este ejemplo es particularmente adecuado para los factores implicados en la vía intrínseca.

En un ejemplo no ilustrado alternativo, podrían proporcionarse dos porciones separadas para los factores de la vía extrínseca. La primera porción en un ejemplo tal puede comprender el plasma deficiente en el factor de coagulación para el que va a medirse la actividad y una fuente de citrato iónico, y la segunda porción puede comprender una fuente de calcio iónico y una mezcla de factor tisular y fosfolípidos.

La Figura 1b ilustra otro ejemplo de una tira reactiva 10. La tira reactiva comprende un área de deposición de muestra 12, pista 13 y área de reacción 14 similar a la mostrada en el ejemplo de la Figura 1a. Además, la tira en este ejemplo puede comprender un área de deposición de líquido de control 16 y una pista 17 que conecta el área de deposición 16 con un área de reacción de control 18.

El área de reacción de control 18 puede comprender una muestra liofilizada de sangre o plasma de composición conocida. En un ejemplo, la muestra de sangre o plasma puede comprender cantidades normales de los factores de coagulación (es decir, con actividades del 70 % al 150 %) o alternativamente la muestra de sangre o plasma puede tener una cantidad conocida relativamente baja del factor de coagulación que va a investigarse, siendo dicha cantidad conocida relativamente baja una cantidad (o nivel de factor de coagulación) más baja que y estando fuera de cualquier cantidad o intervalo normal de cantidades normales (es decir, con actividades del 70 % - 150 %), o más baja que y fuera de una cantidad o intervalo no normal y no patológico (es decir, con actividades del 40 % al 70 %). Así, en otro ejemplo, la muestra de sangre o plasma puede tener una cantidad de actividad de los factores de coagulación más baja del 40 %. Esto significa que la actividad de los factores de la muestra de control de sangre es inferior al 40 %, que refleja un valor patológico.

En algunos ejemplos, el (las) área(s) de reacción de control pueden comprender una mezcla de sangre o plasma con una cantidad conocida de factor de coagulación, una fuente de citrato, uno o más reactivos de activador de la fase de contacto y fosfolípidos, y una fuente de calcio iónico. Un ejemplo tal puede ser adecuado para los factores implicados en la vía intrínseca. En algunos otros ejemplos más adecuados para los factores de la vía extrínseca, el (las) área(s) de reacción de control pueden comprender una mezcla de sangre o plasma con una cantidad conocida de factor de coagulación, una fuente de citrato, una fuente de calcio iónico y una mezcla de factor tisular y fosfolípidos.

En cualquier caso, el área de reacción de control puede servir para comprobar o confirmar los resultados obtenidos en el área de reacción. Puede hacerse referencia a la Figura 1c que ilustra esquemáticamente una curva de coagulación 30 que muestra la relación entre el tiempo de coagulación y un nivel de actividad de un factor de coagulación específico.

En algunos ejemplos, puede usarse una separación similar de ingredientes como se ilustra en la Figura 1a para el área de reacción en un área de reacción de control tal. Una primera porción tal podría comprender la sangre o plasma con cantidades normales de factor de coagulación y la fuente de citrato; o sangre o plasma con una cantidad relativamente baja del factor de coagulación y la fuente de citrato. Si el factor de coagulación que va a medirse es de la vía intrínseca, la segunda porción puede comprender uno o más reactivos de activador de la fase de contacto y fosfolípidos, y la tercera porción puede comprender una fuente de calcio iónico. Si el factor de coagulación que va a medirse es de la vía extrínseca, puede ser suficiente con dos porciones y dicha segunda porción puede comprender una fuente de calcio iónico y una mezcla de factor tisular y fosfolípidos. Como se ha explicado anteriormente para el área de reacción, pueden ser particularmente útiles compartimentos separados cuando los ingredientes del área de control se proporcionan en forma líquida. En otro ejemplo, los ingredientes pueden proporcionarse en forma seca o liofilizada. Si están apropiadamente inmovilizados, pueden no ser necesarios compartimentos separados, mientras que todavía se mantiene la separación entre diferentes ingredientes.

Con este tipo o patrón de distribución de ingredientes en las áreas de reacción de control, el método de la invención puede llevarse a cabo en las mismas condiciones experimentales que en el área de reacción, en el que la muestra del paciente va a probarse. Es decir, en el mismo orden, y los mismos tiempos de incubación con los ingredientes particulares. Si los ingredientes en las áreas de reacción de control están en forma seca o liofilizada, se rehidratan o se deja que evolucionen a una forma líquida con el líquido de control (suero o tampón fisiológico, o incluso agua destilada en caso de que las áreas de reacción ya comprendan disoluciones tamponadas).

En un ejemplo, el líquido de control puede ser un suero fisiológico, o un tampón fisiológico de algún tipo. Mediante, por ejemplo, acción capilar, el líquido de control puede llegar al área de reacción de control 18 y puede provocar un cambio de fase de sólido a líquido. Después de la coagulación, puede producirse un cambio de fase de líquido a sólido. Como se conoce la cantidad de factor de coagulación en la muestra de control, también se conoce su tiempo de coagulación teórico que debe encontrarse en la curva de coagulación 30. Si en una prueba se encuentra que la actividad de los factores de la muestra de control está de hecho dentro de algunos límites previamente establecidos considerados aceptables, entonces esto es una indicación de que el equipo de prueba está funcionando

adecuadamente. Si por otra parte, se encuentra una desviación de aquellos límites, esto puede indicar un mal funcionamiento de algún tipo.

5 Alternativamente a una curva de coagulación tal como la ilustrada en la Figura 1c, la relación entre el tiempo de coagulación y el nivel de actividad del factor de coagulación puede almacenarse de maneras alternativas, por ejemplo, en forma de una tabla de búsqueda o en forma de una ecuación matemática.

10 La Figura 2a ilustra esquemáticamente un ejemplo adicional de una tira reactiva 10. En este ejemplo, pueden disponerse tres pistas capilares. Puede conectarse un puerto de entrada de muestra 12 a un área de reacción 14 mediante una pista capilar 13. Puede conectarse un primer puerto de entrada de líquido de control 16 a una primera área de reacción de control 18 mediante una pista capilar 17. Puede conectarse un segundo puerto de entrada de líquido de control 21 a una segunda área de reacción de control 23 mediante una pista capilar 22.

La primera área de reacción de control 18 puede ser un área de reacción de sangre estándar que comprende sangre que contiene una cantidad normal conocida del factor de coagulación cuya actividad va a medirse, y que también incluye cantidades normales de cualquiera de los otros factores de coagulación.

15 La segunda área de reacción de control 23 puede ser un área de reacción de sangre agotada que comprende sangre con una cantidad relativamente baja (pero conocida) del factor de coagulación que va a medirse y cantidades sustancialmente normales de los otros factores de coagulación. La cantidad relativamente baja conocida es una cantidad (o nivel de factor de coagulación) más baja que y que está fuera de cualquier cantidad o intervalo normal de cantidades estándar. Así, en otro ejemplo, el área de reacción de sangre agotada puede comprender sangre con una cantidad de factor de coagulación con una actividad más baja que el 70 %. Esto significa que la actividad de la muestra de control de sangre es más baja que el 70 %.

Se ilustra esquemáticamente un chip 25 que comprende una memoria legible por ordenador. La memoria puede ser leída por equipo adecuado, por ejemplo, el mismo equipo usado para determinar el tiempo de coagulación.

25 Puede depositarse un líquido de control en los puertos de entrada de líquido de control o áreas 16 y 21. Sustancialmente al mismo tiempo puede depositarse una muestra de sangre en el puerto de entrada de muestra 12. La tira de reacción puede entonces insertarse en equipo de laboratorio adecuado capaz de determinar la coagulación y capaz de leer el chip 25. Alternativamente y dependiendo del equipo usado, la tira puede haber sido insertada en el equipo antes de la deposición de la muestra y líquido de control.

30 Una vez la muestra de sangre llega al área de reacción, la coagulación puede empezar. Una vez el líquido de control llega a las áreas de reacción de control, las muestras liofilizadas pueden cambiar de un estado sólido a un estado líquido y entonces puede empezar la coagulación en las áreas de reacción. También pueden usarse otros métodos conocidos para determinar los tiempos de coagulación.

35 Según la Figura 2b, en una única tira puede encontrarse una indicación fiable del nivel de actividad del factor de coagulación. Se espera que los tiempos de coagulación encontrados en las dos áreas de reacción de control se encuentren entre los límites de aceptabilidad previamente establecidos. Esta curva e información sobre la composición de las muestras en las áreas 18 y 23 pueden almacenarse en la memoria del chip 25. Si los tiempos de coagulación encontrados en las áreas de control se encuentran ambos dentro de los límites, puede confirmarse que el equipo de laboratorio y los reactivos usados funcionan correctamente y que la tira reactiva no es defectuosa.

El tiempo de coagulación encontrado en el área de reacción 14 puede así de forma fiable indicar el nivel de actividad del factor de coagulación que se investiga.

40 Alternativamente a guardar la curva de coagulación (o datos similares) en un chip incorporado en la tira reactiva, la información puede ser previamente guardada en el equipo de laboratorio usado. En aún una alternativa adicional, para cada lote de fabricación de tiras reactivas, puede proporcionarse una única tira reactiva con un chip tal o memoria legible por ordenador. Puede considerarse que las lecturas de este chip son representativas para el lote completo, ya que puede suponerse que un lote de fabricación generalmente comprenderá las mismas muestras de sangre liofilizadas y/o reactivos o muy similares en cada tira.

50 La Figura 3 ilustra un ejemplo alternativo adicional de una tira reactiva. Los principios en los que se basa este ejemplo son en gran medida los mismos que aquellos ilustrados y explicados con referencia a las Figuras 2a y 2b. Sin embargo, un único puerto de entrada de líquido de control 16 está conectado por una pista o canal bifurcado 17 que conduce a dos áreas de reacción de control a través de canales parciales 17a y 17b. Como en el ejemplo previamente ilustrado, la primera área de reacción de control 18 puede comprender sangre que contiene una cantidad normal del factor de coagulación para el que va a medirse la actividad y la segunda área de reacción de control 23 puede ser un área de reacción de sangre agotada que comprende sangre con una cantidad relativamente baja del factor de coagulación que va a medirse.

55 En toda la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprender", y variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra "comprender" engloba el caso de "que consiste en". La presente invención se define según las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* de medición de una actividad de un factor de coagulación de la vía intrínseca o extrínseca, en el que dicho factor de coagulación comprende uno cualquiera de factor II, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI y factor XII, comprendiendo dicho método:
  - 5 (a) poner en contacto una muestra de sangre capilar de un sujeto de prueba que comprende sangre completa con plasma agotado de dicho factor de coagulación, una fuente de citrato iónico, una fuente de calcio iónico, fosfolípidos, y uno o más de un activador de la fase de contacto de la coagulación y factor tisular;
  - (b) determinar el tiempo requerido para la coagulación de la sangre de dicha muestra de sangre capilar; y
  - (c) correlacionar dicho tiempo con dicha actividad de dicho factor de coagulación.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que se usa una curva de coagulación en correlacionar dicho tiempo requerido para la coagulación de la sangre con dicha actividad de dicho factor de coagulación.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende:
  - (i) poner en contacto, en una primera etapa, dicha muestra de sangre capilar con dicho plasma agotado de dicho factor de coagulación y dicha fuente de citrato iónico para obtener una mezcla primaria;
  - 15 (ii) poner en contacto, en una segunda etapa, dicha mezcla primaria con dicho activador de la fase de contacto de la coagulación, dicha fuente de calcio iónico y dichos fosfolípidos.
4. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende:
  - (i) poner en contacto, en una primera etapa, dicha muestra de sangre capilar con dicho plasma agotado de dicho factor de coagulación y dicha fuente de citrato iónico para obtener una mezcla primaria; y
  - 20 (ii) poner en contacto, en una segunda etapa, dicha mezcla primaria con una mezcla de dicho factor tisular, dicha fuente de calcio iónico y dichos fosfolípidos.
5. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) tiene lugar sobre una superficie de una tira reactiva.
6. El método según la reivindicación 5, en el que dicha superficie de dicha tira reactiva comprende un área de reacción que comprende una pluralidad de compartimentos de comunicación.
- 25 7. El método según la reivindicación 6, en el que un primer compartimento de dicha pluralidad de compartimentos contiene dicho plasma agotado de dicho factor de coagulación y dicha fuente de citrato iónico, y un segundo compartimento de dicha pluralidad de compartimentos contiene uno o más de dicho activador de la fase de contacto de la coagulación y dicho factor tisular.
8. El método según la reivindicación 7, en el que una pista capilar conecta dicho primer compartimento y dicho segundo compartimento.
- 30 9. El método según la reivindicación 1, en el que dicho activador de la fase de contacto de la coagulación está seleccionado de dicho grupo que consiste en compuestos polianiónicos, ácidos orgánicos, y mezclas de los mismos.
10. El método según la reivindicación 9, en el que dichos compuestos activadores polianiónicos son silicatos.
11. El método según la reivindicación 1, en el que dicho activador de la fase de contacto de la coagulación es caolín.
- 35 12. El método según la reivindicación 1, en el que dicho activador de la fase de contacto de la coagulación es ácido elágico.
13. El método según la reivindicación 1, en el que dicha fuente de calcio es una sal de calcio seleccionada de dicho grupo que consiste en cloruro de calcio, acetato de calcio, carbonato cálcico, gluconato de calcio, gluconato de calcio, hidróxido de calcio, nitrato de calcio, sulfonato de calcio, calcio o fosfato, y mezclas de estas sales.

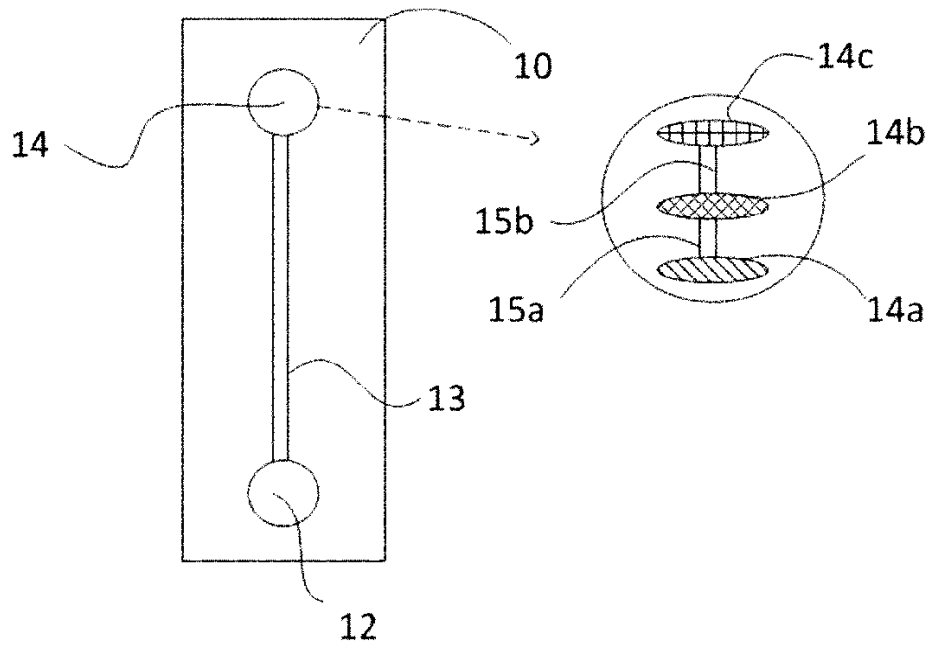


Fig. 1a

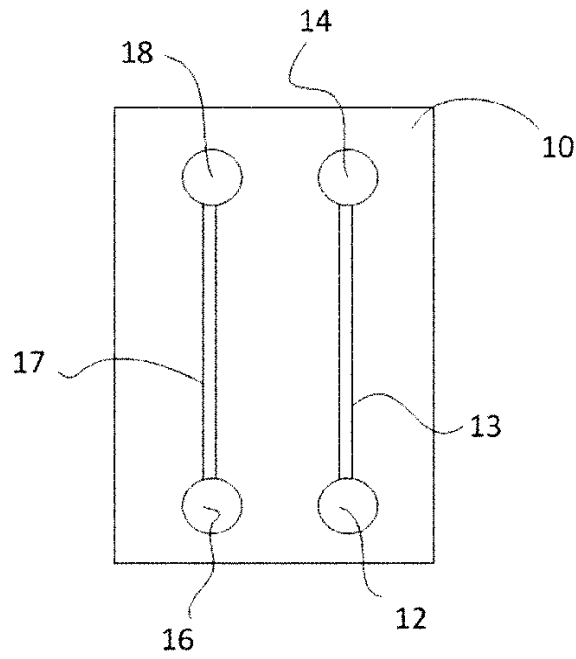


Fig. 1b

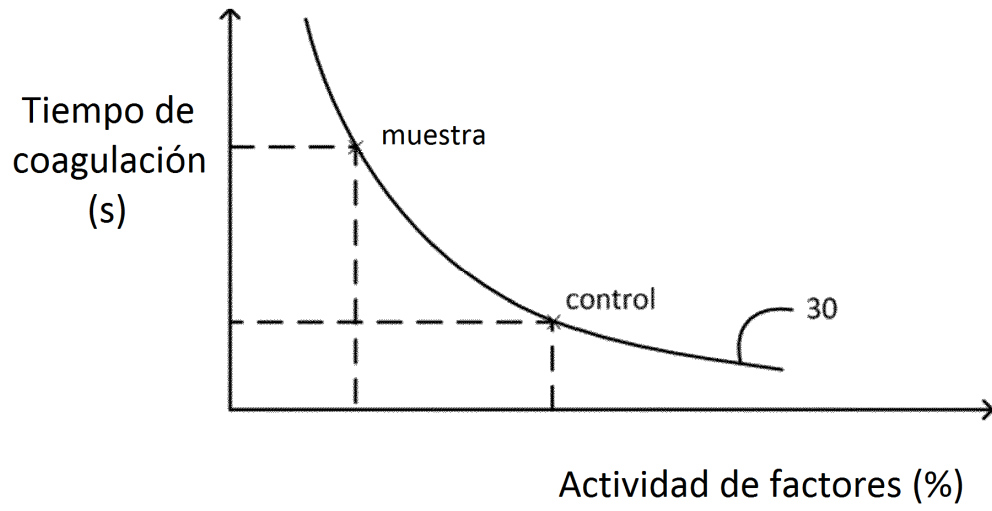


Fig. 1c

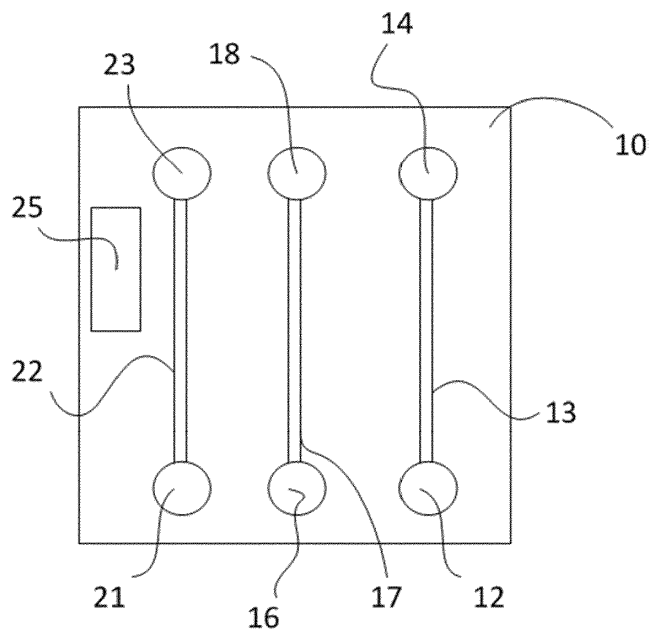


Fig. 2a

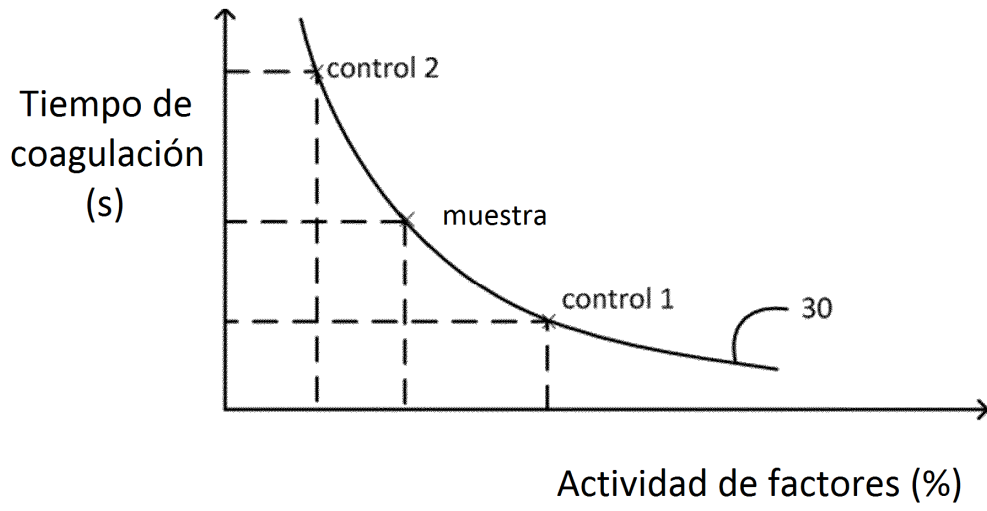


Fig. 2b

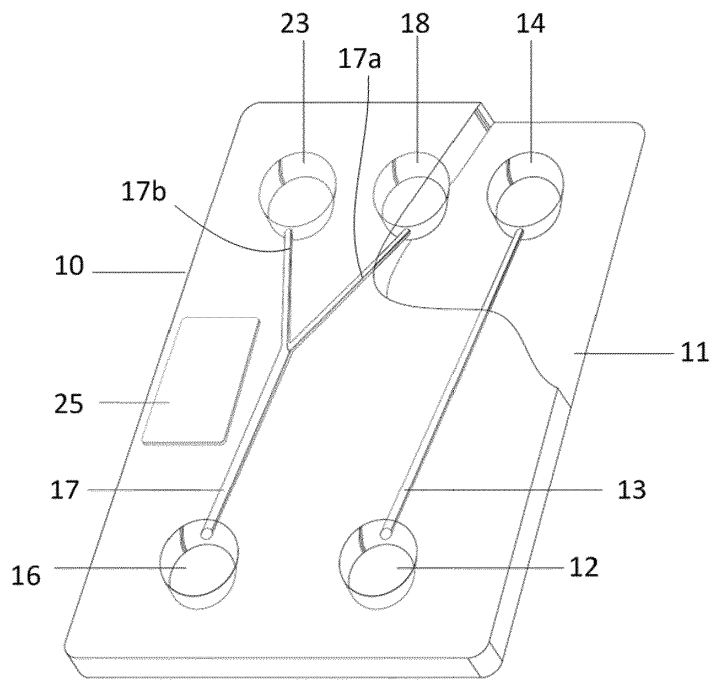


Fig. 3