

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 080**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/49** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2011** **E 11169337 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 2395353**

54 Título: **Dispositivo y método para medir el tiempo de protrombina y hematocrito mediante el análisis del cambio de reactancia en una muestra**

30 Prioridad:

**09.06.2010 US 353137 P**

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

**17.12.2018**

73 Titular/es:

**APEX BIOTECHNOLOGY CORP. (100.0%)  
No.7, Li-Hsin 5th Rd., Hsinchu Science-Based  
Industrial Park Taiwan  
Hsinchu City Taiwan 300, TW**

72 Inventor/es:

**CHEN, SZ-HAU;  
LIN, YUEH-HUI;  
CHU, CHING-YUAN;  
CHENG, CHU-MING;  
CHEN, GUAN-TING;  
LU, YI-CHEN y  
SHEN, THOMAS Y. S.**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 694 080 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

Dispositivo y método para medir el tiempo de protrombina y hematocrito mediante el análisis del cambio de reactancia en una muestra.

5

**Campo de la Invención**

[0001] La presente invención se refiere a dispositivos de diagnóstico bioquímicos, y más particularmente, a dispositivos y métodos para determinar el tiempo de protrombina (TP) y hematocrito (HCT) mediante el análisis de un cambio de reactancia en una muestra.

10

**Antecedentes de la Invención**

[0002] Dos vías o cascadas de coagulación, conocidas como las vías intrínseca y extrínseca, llevan a la formación de un coágulo en la sangre. Cuando un cuerpo humano se lesiona, la vía extrínseca se activa primero para controlar la coagulación sanguínea del cuerpo. Además de una muestra sanguínea, la reacción de coagulación necesita algunos factores tisulares adicionales. El factor X inactivo se cataliza en el factor Xa. La protrombina (factor II) se puede transformar del factor Xa a la trombina (factor IIa) por los efectos del factor Va, fosfolípidos ácidos e iones de calcio. La trombina luego transforma el fibrinógeno en fibrina, aumentando la plaqueta de las células endoteliales acumuladas en la herida. La trombina puede también mejorar la función del factor XIII, conectando cada molécula de proteína fibrosa a una fibrina estable. Por lo tanto, el análisis del tiempo de protrombina no solo permite determinar si la función de factores de activación externa del sistema de coagulación es normal, sino que también permite la evaluación y el control del tratamiento con anticoagulantes orales, la función hepática, la deficiencia de vitamina K, la deficiencia del factor de coagulación, y el síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID).

15

20

25

[0003] Los métodos convencionales de análisis para medir el tiempo de protrombina analizan el fenómeno de condensación de la transformación de la proteína soluble en el suero en una proteína insoluble durante la coagulación sanguínea. Estos métodos de análisis se pueden realizar mediante la detección de características ópticas, tales como cambios de color, reflectancia, refracción, luminiscencia y fluorescencia. Tales métodos de análisis, no obstante, requieren un número sustancial de muestras de pruebas de sangre y reactivos de alta pureza y requieren mucho tiempo, como se describe en la patente de EE. UU. nº 5,418,141. Además, estos métodos de análisis requieren largos tiempos de detección y una cantidad significativa de material, lo que resulta en inconvenientes y en costes más altos.

30

35

[0004] Otros métodos convencionales de análisis para la medición del tiempo de protrombina utilizan métodos de análisis electroquímico. Por ejemplo, la patente de EE. UU. nº 3,699,437, divulga la observación del índice de descenso comparativo de la resistencia del punto inicial al punto mínimo. El resultado calculado sirve como base para determinar el tiempo de coagulación, donde la medición de impedancia se refiere al mecanismo de coagulación sanguínea. Además, las patentes de EE. UU. Nº. 6,060,323; 6,338,821; 6,066,504; 7,673,622; y 6,046,051, revelan dispositivos de sensor electrónico y un ensamblaje de tarjeta de prueba para la medición del tiempo de coagulación de una muestra sanguínea. El ensamblaje de tarjeta de prueba está diseñado con un único electrodo o con una pluralidad de electrodos según los requisitos de medición del dispositivo. La muestra se pone en contacto con los electrodos, que miden el cambio de impedancia que corresponde con el cambio de viscosidad de la muestra sanguínea mientras se coagula. Esta técnica, no obstante, puede suponer errores de prueba debido a las diferencias de concentración de hematocrito y de electrolito entre muestras de pruebas sanguíneas en individuos. Además, en la tesis titulada "Application of electric impedance method for coagulation time measurement of human whole blood" (Aplicación de un método de impedancia eléctrica para la medición del tiempo de coagulación de la sangre humana"), Chia-Chern Chen, junio de 2005, se ha estudiado la medición de la coagulación de la sangre humana por método de impedancia en electrodos interdigitales pareados con un tamaño de muestra igual o menor que 10 µl. La patente de EE. UU. nº 7,005,857 divulga un dispositivo de análisis de coagulación con recogida automática de muestras de sangre. El dispositivo de análisis de coagulación determina el tiempo de coagulación mediante la medición de capacitancia o cambios de impedancia entre dos electrodos. Estas tecnologías pueden, por lo tanto, mejorar la simplicidad del dispositivo de detección, pero no pueden conseguir la precisión relativamente más alta y la exactitud que los métodos de detección ópticos mencionados anteriormente pueden conseguir. US 2008/0297169 A1 divulga un sistema analizador de muestras que comprende un dispositivo y métodos para realizar ensayos múltiples en muestras de fluidos, incluyendo sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo u otros líquidos biológicos, al igual que fluidos no corporales. Particularmente, el sistema analizador aplica un potencial eléctrico de corriente alterna o continua a la muestra de fluido y detecta la impedancia, resistencia, cambio de impedancia, cambio de resistencia, índice de cambio de impedancia o índice de cambio de resistencia de la muestra de fluido como un componente de los métodos de ensayo.

40

45

50

55

60

[0005] Por consiguiente, se necesita y se describe en el presente documento un nuevo dispositivo biosensor para medir el tiempo de protrombina (TP) y hematocrito (HCT), uno capaz de operar con tiempos de prueba cortos, procedimientos simples para el usuario y de conseguir resultados altamente precisos.

65

**Resumen de la invención**

5 [0006] Un aspecto de la presente invención es el uso de mediciones de reactancia (X) tomadas de una muestra para calcular el TP. Como se describe en este caso, el uso de mediciones de reactancia en lugar de mediciones de impedancia proporciona un análisis más preciso de las características de la sangre, reduce la probabilidad de error en las pruebas, y mejora la exactitud de la medición.

10 [0007] Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un sistema de detección y métodos de medición para determinar el tiempo de protrombina y hematocrito (HCT) de una muestra sanguínea utilizando un análisis de reactancia de la muestra. En una forma de realización, el sistema de detección incluye un dispositivo sensor y un ensamblaje de tarjeta de prueba. El ensamblaje de tarjeta de prueba incluye uno o varios pares de los electrodos de metal precioso, dispuestos en el mismo plano o en planos diferentes, respectivamente. La corriente alterna (CA) proporcionada por el dispositivo sensor se utiliza para medir y calcular el tiempo de protrombina y HCT de la muestra sanguínea utilizando el análisis de reactancia descrito aquí.

20 [0008] Otro aspecto de la invención es proporcionar un ensamblaje de tarjeta de prueba con una muestra de sangre mejorada y área de contacto reactiva. El ensamblaje de tarjeta de prueba según algunas formas de realización de la presente invención utiliza materiales porosos, tales como sustrato de fibra de vidrio (FR-4), para al menos una parte de un sustrato de la tarjeta de prueba. Ya que la superficie de al menos una parte del sustrato, preferiblemente toda la superficie del sustrato, es porosa, por ejemplo, puede tener una pluralidad de agujeros, huecos, o cavidades sobre la misma, la muestra (por ejemplo, de sangre) se dispersa de manera mejorable y uniforme en el sustrato, aumentando así el área de contacto de la muestra sanguínea y los reactivos, y mejorando eficazmente los inconvenientes de los materiales no porosos tradicionales usados para sustratos. Según la presente invención, se minimizan o se eliminan los problemas asociados a que haya relativamente poco contacto entre la muestra y el reactivo que se producen cuando se usan materiales no porosos para el sustrato, o una parte del mismo, por ejemplo, una cohesión de sangre relativamente alta.

30 [0009] Según un aspecto de la invención, se proporciona tal y como se define en la reivindicación 1 un dispositivo de diagnóstico para medir el tiempo de protrombina y HCT de un fluido.

35 [0010] En una forma de realización, el dispositivo sensor incluye: una unidad de recepción de la tarjeta de prueba para alojar el ensamblaje de tarjeta de prueba; una unidad de mantenimiento de temperatura para controlar y mantener la temperatura de la unidad de recepción de la tarjeta de prueba a una temperatura constante; una unidad de generación de CA para proporcionar una corriente alterna con frecuencia y voltaje predeterminados al ensamblaje de tarjeta de prueba; una unidad de recepción de señal para recibir una señal de respuesta del ensamblaje de tarjeta de prueba; un microprocesador para calcular la señal de respuesta y emitir los resultados del HCT y el tiempo de protrombina; y una unidad de visualización para visualizar los resultados analizados del HCT y el tiempo de protrombina del microprocesador.

40 [0011] Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para medir el tiempo de protrombina y HCT tal y como se define en la reivindicación 7.

**Breve descripción de los dibujos**

45 [0012] Los aspectos anteriormente mencionados y muchas de las ventajas correspondientes de esta invención se apreciarán más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se considera conjuntamente con los dibujos de acompañamiento, donde:

50 La figura 1 es una vista esquemática de un dispositivo de diagnóstico ejemplar para medir el tiempo de protrombina y HCT conforme a formas de realización de la presente invención;

La figura 2 ilustra una vista explosión de una tarjeta de prueba sanguínea conforme a una forma de realización de la presente invención donde la línea discontinua indica las posiciones relativas entre varios elementos;

55 Las figuras 3A y 3B son fotografías que muestran una comparación lado a lado de modelos de placas base no porosas y porosas de sustratos de ensamblajes de tarjeta de prueba tomadas utilizando un microscopio electrónico de barrido;

La figura 4 es un organigrama que ilustra esquemáticamente una forma de realización del método de diagnóstico para determinar el tiempo de protrombina y HCT según la presente invención;

60 La figura 5 es un gráfico experimental que muestra el cambio de impedancia en comparación con el tiempo de coagulación en segundos, el cual ilustra un cambio en la pendiente mientras se coagula una muestra sanguínea por un método típico de medición de impedancia;

La figura 6 es un gráfico experimental que muestra el cambio de reactancia en comparación con el tiempo de coagulación en segundos, el cual ilustra un cambio en la pendiente mientras se coagula una muestra sanguínea por el método de medición de reactancia;

65 Las figuras 7 y 8 son la relación de HCT e impedancia (figura 7) y HCT y reactancia (figura 8) calculadas a

partir de los gráficos experimentales de las figuras 5 y 6, respectivamente.

Las figuras 9 y 10 representan valores ejemplares de impedancia y reactancia medidos por un medidor LCR cada 0,5 segundos durante 60 segundos.

Las figuras 11 y 12 representan un modelo de TP en comparación con la curva de calibración del índice de cambio de impedancia y TP en comparación con la curva de calibración del índice de cambio de reactancia, respectivamente.

Las figuras 13 y 14 representan gráficos ilustrativos de TP calibrado en comparación con TP real por impedancia y TP calibrado en comparación con TP real por reactancia, respectivamente.

Las figuras 15A y 15B son gráficos experimentales que muestran análisis de la coagulación sanguínea utilizando un sustrato poroso y un sustrato no poroso, respectivamente; y

Las figuras 16A-16C son gráficos experimentales que muestran análisis de la coagulación sanguínea a diferentes frecuencias utilizando los métodos de reactancia de medición según la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

[0013] Se hará ahora referencia en detalle a más formas de realización ejemplares de la invención, ejemplos de las cuales serán ilustrados en los dibujos y fotografías anexos. En lo posible, los mismos números de referencia se usan en los dibujos y en la descripción para referirse a partes iguales o similares. En los dibujos, la forma y el grosor de una forma de realización se puede exagerar para mayor claridad y conveniencia. Esta descripción se dirigirá en particular a elementos que forman parte, o que cooperan más directamente, con el equipo conforme a la presente invención. Debe entenderse que los elementos que no se muestran o describen específicamente pueden tener varias formas bien conocidas por los expertos en la técnica. Además, cuando se hace referencia a una capa que está sobre otra capa o "en" un sustrato, puede estar directamente en la otra capa o en el sustrato, o también pueden presentarse capas intervinientes.

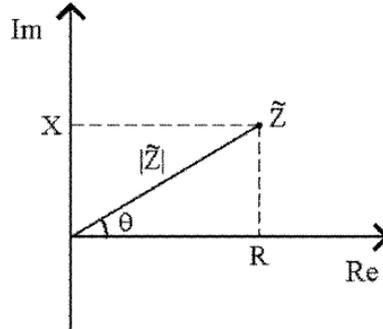
[0014] Algunas formas de realización ejemplares de la presente invención se describen en mayor detalle haciendo referencia a los dibujos y fotografías que acompañan la presente aplicación. Cabe señalar que las características ilustradas en los dibujos no están necesariamente dibujadas a escala. Se pueden omitir descripciones de componentes, materiales, y técnicas de proceso ampliamente conocidos para no ocultar innecesariamente las formas de realización de la invención. Cualquier dispositivo, componente, material, y paso descrito en las formas de realización son solo ilustrativos y no se destinan a limitar el alcance de la presente invención.

[0015] En vista a los problemas comprobados de las tecnologías convencionales mencionados anteriormente, las siguientes formas de realización proporcionan un sistema y métodos para determinar el tiempo de protrombina y hematocrito (HCT) de una muestra (por ejemplo, una muestra sanguínea) mediante la realización de un análisis de reactancia de la muestra, también conocido como un módulo de medición de reactancia. Las mediciones para la coagulación sanguínea, o HCT, mediante la realización de un análisis de reactancia como se describe aquí se pueden usar adecuadamente en el análisis cuantitativo del tiempo de protrombina (es decir, tiempo de coagulación). Como se utiliza en este caso, el término "hematocrito" se refiere al porcentaje de glóbulos rojos contenidos en un volumen de sangre.

[0016] Una forma de realización ejemplar de la invención proporciona un dispositivo sensor de tipo electrodo con una tarjeta de prueba de muestra que incluye uno o varios pares de electrodos. La placa base de la tarjeta de prueba está hecha de materiales porosos como se describe y se muestra aquí. Los electrodos pueden estar hechos de metales preciosos que incluyen, sin limitarse a estos, oro, plata, paladio, platino, níquel, aleaciones de los mismos y combinaciones de los mismos conocidas por los expertos en la técnica. En un aspecto de la invención, un módulo de corriente alterna (CA) o una fuente de energía de CA/CC proporciona una señal de prueba a la tarjeta de prueba sanguínea con una frecuencia oscilada en un rango entre aproximadamente 0,1 KHz y aproximadamente 50 KHz. La amplitud de voltaje aplicada a la tarjeta de prueba está en un rango de aproximadamente 0,05 V a aproximadamente 5 V. La señal se aplica a la tarjeta de prueba para medir la reactancia de la muestra. Como se utiliza en este caso en relación con una cantidad medida, el término "aproximadamente" se refiere a la variación en la cantidad medida como sería prevista por el experto en la materia que realiza la medición y que ejerce un nivel de cuidado correspondiente con el objetivo de la medición y la precisión del equipo de medición que se está utilizando.

[0017] En un aspecto preferido de la invención, mientras procede la coagulación sanguínea en una muestra provocada por unas reacciones enzimáticas, las señales de respuesta se reciben y se procesan por el dispositivo sensor según las diferencias en la pendiente dependiendo de los periodos del tiempo de protrombina analizados por la medición de reactancia. En una forma de realización, los electrodos pueden ser electrodos de oro. En un ejemplo, se adopta un módulo de CA para tomar una medición de reactancia de la muestra según la señal de prueba oscilada de respuesta detectada en la tarjeta de prueba sanguínea, en la cual, mientras procede la coagulación sanguínea provocada por las reacciones enzimáticas, se reciben y se procesan las señales resultantes por el dispositivo sensor según las diferencias en la pendiente dependiendo de los periodos del tiempo de protrombina analizados por la medición de reactancia.

[0018] A continuación se analizan los principios de la realización de un análisis de reactancia según las formas de realización de la presente invención. La impedancia de un circuito de CA es igual a la suma de resistencia (R) y el producto de reactancia (X) y el ángulo de fase  $\theta$ :



5

donde la reactancia (X) es la parte imaginaria de la cantidad compleja, la impedancia (Z), representa los obstáculos a la intensidad de corriente creados por una combinación de inductancias (L) y capacitancias (C). La resistencia (R) es la parte real de la cantidad compleja. Como es conocido por los expertos en la técnica, la reactancia cambia con cambios en la frecuencia, cambios en la capacitancia y/o cambios en la inductancia del circuito de CA. Cuando cambia la reactancia del circuito de CA, habrá un cambio de fase entre la forma de onda de la corriente y la forma de onda del voltaje del circuito. La impedancia (Z) se define como:

10

$$Z = R + jX, \quad y \quad |Z| = (R^2 + X^2)^{1/2} \quad (1)$$

15

donde Z es la impedancia, R es la resistencia, j es la fase, y X es la reactancia; y

$$X = X_C + X_L, \quad X_L = 2\pi fL, \quad y \quad X_C = 1/2\pi fC \quad (2)$$

20

donde  $X_C$  es la reactancia capacitiva,  $X_L$  la es reactancia inductiva,  $\pi$  es una proporción de la circunferencia de un círculo a su diámetro, f es la frecuencia, L es la inductancia, y C es la capacitancia.

25

[0019] En un aspecto de la invención, una unidad de generación de CA del sistema de detección proporciona una señal de prueba de CA a la tarjeta de prueba. Se aplica una muestra a la tarjeta de prueba en un área de prueba de muestra de la tarjeta de prueba. Cuando se carga la muestra entre los electrodos, se polarizan las cargas inducidas en el campo eléctrico para formar capacitancias y la muestra reacciona relativamente como un condensador. Cuando se coagula una muestra sanguínea, se forma un medio entre los electrodos durante la coagulación, impidiendo el movimiento de cargas en la muestra de manera que las cargas se acumulan en los electrodos. Las cargas acumuladas causan así que se desarrolle una capacitancia. En un aspecto preferido de la invención, ya que la frecuencia (f) de la unidad de generación de CA del sistema de detección permanece constante, la inductancia (L) y la reactancia inductiva ( $X_L$ ) también son constantes, y, por lo tanto, la variación en la reactancia capacitiva en la muestra es igual esencialmente a la variación en la reactancia total como se muestra por la siguiente ecuación:

30

35

$$X_{C2} - X_{C1} = X_2 - X_1 \quad (3)$$

donde  $X_{C2} - X_{C1}$  es la variación en la reactancia capacitiva, y  $X_2 - X_1$  es la variación en la reactancia.

40

[0020] Mediante la determinación de la variación de la reactancia de la muestra por unidad de tiempo, se puede determinar la variación de la reactancia capacitiva por unidad de tiempo y la variación de la capacitancia por unidad de tiempo durante la caracterización de la coagulación sanguínea en la muestra. Se puede determinar así el tiempo de protrombina (es decir, el tiempo de coagulación) con precisión mediante la realización de un cálculo de la pendiente con la ayuda del módulo de medición de reactancia de la invención.

45

[0021] La figura 1 es una vista esquemática de un dispositivo de diagnóstico ejemplar para medir el tiempo de protrombina y HCT conforme a formas de realización de la presente invención. Como se ilustra en la figura 1, un dispositivo de diagnóstico 100 para medir el HCT y el tiempo de protrombina de un fluido incluye un dispositivo sensor de tipo electrodo relativo 120 y una muestra del ensamblaje de tarjeta de prueba 110 incluyendo uno o

50

5 varios pares de electrodos, donde se utiliza corriente alterna (CA) proporcionada por el dispositivo sensor para medir y calcular el tiempo de protrombina y HCT de una prueba de sangre utilizando el análisis de reactancia. En esta forma de realización, el dispositivo sensor 120 incluye una unidad de recepción de tarjeta de prueba 122 para alojar el ensamblaje de tarjeta de prueba 110. Una unidad de mantenimiento de temperatura 134 se usa para controlar y mantener la temperatura de la unidad de recepción de tarjeta de prueba a una temperatura constante. Una unidad de generación de CA 124 proporciona una corriente alterna con frecuencia y voltaje predeterminados al ensamblaje de tarjeta de prueba 110. Una unidad de recuperación de señal 128 se utiliza para recuperar una señal de respuesta del ensamblaje de tarjeta de prueba. Un microprocesador 130 se usa para analizar la señal de respuesta y emitir los resultados del HCT y el tiempo de protrombina. Una unidad de visualización 136 se usa para visualizar los resultados analizados del HCT y el tiempo de protrombina del microprocesador 130.

15 [0022] La figura 2 ilustra una vista explosionada de una tarjeta de prueba de muestra para una muestra conforme a una forma de realización de la presente invención donde la línea discontinua indica las posiciones relativas entre varios elementos. La tarjeta de prueba de muestra incluye un sustrato aislante 210, un sistema de electrodos 220, una capa de separación y reacción 230 y una cubierta 240. El sustrato aislante 210 es eléctricamente aislante, y su material puede incluir una placa base compuesta por materiales porosos, pero no se limita a esta. En formas de realización preferidas de la invención, la placa base del ensamblaje de tarjeta de prueba incluye poros con diámetros en un rango de aproximadamente 0,1 $\mu$ m a aproximadamente 10 $\mu$ m, aproximadamente 0,01 $\mu$ m a aproximadamente 100 $\mu$ m, aproximadamente 0,1 $\mu$ m a aproximadamente 50 $\mu$ m, aproximadamente 0,1 $\mu$ m a aproximadamente 20 $\mu$ m, aproximadamente 0,1 $\mu$ m a aproximadamente 5 $\mu$ m, o aproximadamente 5 $\mu$ m a aproximadamente 10 $\mu$ m. El sistema de electrodos 220 puede estar hecho de cualquier material conductor, incluyendo pero no limitado a carbono, oro-plata, cobre, plata de carbono, paladio, níquel, y otros materiales similares y combinaciones de los mismos según la invención. El sistema de electrodos 220 incluye uno o varios pares de los electrodos de metal noble, dispuestos en el mismo plano o en planos diferentes respectivamente. Por ejemplo, un conjunto de electrodos de prueba 225 incluye un par de electrodos 226 y 228. Según los principios de la invención, la estructura de los electrodos no está limitada a disposiciones específicas del conjunto de electrodos de prueba 225 como se muestra o el número exacto de electrodos como se muestra. Se pueden proporcionar electrodos adicionales según diferentes necesidades de aplicación. El sistema de electrodos, además, conecta eléctricamente el sistema de electrodos con un dispositivo de medición (no se muestra).

35 [0023] La capa de separación 230 se representa incluyendo espaciadores 232 dispuestos a lo largo del sistema de electrodos 220. La capa de separación 230 puede incluir además una zona de reacción 224 para exponer una parte del reactivo (no se muestra) y una zona de muestreo 222. Un canal 236 puede conectar la zona de muestreo 222 y zona de reacción 224. El tamaño de la zona de reacción 224 es preferiblemente suficiente para exponer parte de los electrodos 226 y 228. En este ejemplo, la zona de reacción 224 se usa para la medición del tiempo de protrombina, y la zona de muestreo 222 se puede utilizar para la medición del HCT.

40 [0024] La cubierta 240 está dispuesta en la capa de separación 230. En una forma de realización, la cubierta 240 incluye una entrada 242 y una salida de gas 244, que están respectivamente conectadas a la zona de muestreo 222 y a la zona reactiva 224. El tamaño del espacio de muestreo depende de los grosores de la capa de separación 230.

45 [0025] Las figuras 3A y 3B son fotografías que muestran una comparación lado a lado de placas base ejemplares no porosas y porosas de ensamblajes de tarjeta de prueba, tomadas utilizando un microscopio electrónico de barrido. En la figura 3B, el diámetro del tamaño de los poros de la placa base está en un rango de aproximadamente 0,1  $\mu$ m a aproximadamente 10  $\mu$ m con un diámetro medio de aproximadamente 3,39  $\mu$ m. La distribución de los poros en la placa base es de aproximadamente 5,04x10<sup>6</sup> agujeros/cm<sup>2</sup>.

50 [0026] La figura 4 es un organigrama que ilustra esquemáticamente una forma de realización de un método de diagnóstico para determinar el tiempo de protrombina y HCT según la presente invención. El método para medir el tiempo de protrombina y HCT en la figura 4 incluye estos pasos: proporcionar un ensamblaje de tarjeta de prueba para una unidad de recepción de tarjeta de prueba (S410); controlar y mantener la temperatura de la unidad de recepción de tarjeta de prueba a una temperatura constante (S420); proporcionar una muestra que se ha de analizar al ensamblaje de tarjeta de prueba (S430); proporcionar una corriente alterna con frecuencia y voltaje predeterminados al ensamblaje de tarjeta de prueba por una unidad de generación de CA (S430); detectar una señal de respuesta del ensamblaje de tarjeta de prueba y comparar la señal de respuesta con la señal de CA original, calcular un cambio en la fase de la señal de corriente (cambio de fase) y calcular la reactancia y el HCT utilizando un microprocesador (S450); corregir el tiempo de protrombina por referencia del HCT (S460); corregir el tiempo de protrombina con una relación normalizada internacional (S470); y proporcionar los resultados analizados a una unidad de visualización (S480).

65 [0027] Según una forma de realización de la presente invención, la señal de respuesta recuperada de la tarjeta de prueba se digitaliza y se convierte por la transformada de Fourier discreta (DFT) por un microprocesador. Así, como es conocido por los expertos en la técnica, el valor real y el valor imaginario se pueden dividir por el

método que se muestra a continuación:

$$X(k) = DFT [x(n)] = \sum_{n=0}^{N-1} x(n)W_N^{kn}, 0 \leq k \leq N-1, \quad (1)$$

$$W_N = e^{-j\frac{2\pi}{N}} \quad (2)$$

donde X(k) es el valor de Fourier de la señal digital, x(n) es el valor original de la señal digital, n es el punto de corriente de la señal digital, y N es número total de la señal digital. Además, la fase se puede calcular por el valor imaginario y el valor real según la siguiente fórmula:

$$\text{Fase} = \tan^{-1} (\text{Im/Re}) \quad (3)$$

donde Im es el valor imaginario (es decir, reactancia) y Re es el valor real (es decir, resistencia). Como se muestra en la fórmula (3), la fase se desviará por el cambio en la reactancia en la muestra.

[0028] En algunas formas de realización, el paso de comparar la señal de respuesta detectada de la muestra con la señal de CA original en S450 (es decir, fase) anteriormente incluye los pasos de: calcular la magnitud de impedancia de la señal de respuesta medida y el voltaje aplicado; calcular un cambio en la fase entre la forma de onda aplicada y la forma de onda medida; calcular la reactancia del cambio en el ángulo de fase. Como se podrá apreciar, debido a que la corriente alterna tiene una frecuencia constante, el cambio en el ángulo de fase se debe al cambio en la capacitancia en la muestra como se ha descrito anteriormente. Ya que el cambio en la capacitancia en la muestra crea un cambio en la reactancia, el cambio en la reactancia puede producir HCT y TP como se indica a continuación.

[0029] El HCT se puede calcular a partir de la reactancia medida por interpolación. A continuación se describe un ejemplo de cálculo de HCT. Se describe también como comparación un método tradicional de uso de la impedancia en el cálculo de HCT.

[0030] Las figuras 5 y 6 representan gráficos experimentales que muestran el aumento de la impedancia y la reactancia con porcentaje más alto de HCT, respectivamente. Como se muestra en el gráfico en la figura 6, en este ejemplo particular, en el undécimo segundo, la reactancia de diferentes HCT (29,39 y 47%) fue respectivamente 620,29, 652,17 y 676,59 ohmios. Entonces se calcularon la relación de HCT e impedancia (figura 7) o HCT y reactancia (figura 8). Como se muestra en la figura 5, en este particular ejemplo, el tiempo óptimo de muestreo de impedancia de HCT fue en alrededor de 20 seg o más, y la impedancia en comparación con la curva de calibración HCT tiene una ecuación de  $y = 90,253x + 2347,7$ . Además, como se muestra en la figura 6, el tiempo óptimo de muestreo de reactancia de HCT fue de alrededor de 11 seg o más, y la reactancia en comparación con la curva de calibración HCT tuvo una ecuación de  $y = 3,1304x + 529,68$ . Como se apreciará, x es el HCT, e y es la impedancia o reactancia.

[0031] Las figuras 9 y 10 representan la impedancia ilustrativa y los valores de reactancia medidos por un medidor LCR cada 0,5 segundos durante 60 segundos. En un ejemplo, se recogió la sangre de un sujeto, y se prepararon varias muestras añadiendo cantidades diferentes de fármaco anticoagulante (heparina) a la sangre recogida. En un ejemplo, la concentración de heparina usada para modular el tiempo de coagulación (TP) fue entre aproximadamente 1 U y aproximadamente 30 U por mililitro. Luego, las muestras de sangre con TP diferente se analizaron para medir la impedancia o reactancia por un medidor LCR (Hioki modelo nº 3532-50).

[0032] Las figuras 11 y 12 representan una curva de calibración de TP ejemplar en comparación con un índice de cambio de impedancia y una curva de calibración de TP ejemplar en comparación con un índice de cambio de reactancia, respectivamente. En este ejemplo particular, la impedancia o índice de cambio de reactancia fue computado cada 10 seg por el medidor LCR. Por ejemplo, se computó el índice de cambio entre 30 a 40 segundos por la siguiente fórmula: índice de cambio de impedancia 30 a 40 =  $(Z_{40} - Z_{30}) / (\text{Tiempo}_{40} - \text{Tiempo}_{30})$ , donde Z es impedancia, e índice de cambio de reactancia 30 a 40 =  $(X_{40} - X_{30}) / (\text{Tiempo}_{40} - \text{Tiempo}_{30})$ , donde X es reactancia. Se repitió el paso de computación para computar la impedancia o índice de cambio de reactancia de la sangre para muestras con TP diferentes, y así determinar la curva de calibración del TP en comparación con el índice de cambio de impedancia (figura 7) y la curva de calibración del TP en comparación con el índice de cambio de reactancia (figura 8). La curva de calibración del TP en comparación con el índice de cambio de impedancia tuvo una ecuación de  $y = -0,1849x + 4,562$ , y la curva de calibración del TP en comparación con el índice de cambio de reactancia tuvo una ecuación de  $y = -0,0256x + 0,3604$ . Como se apreciará, x es el TP real, e y es el índice de cambio de impedancia o reactancia.

[0033] Como se muestra en las figuras 11 y 12, los resultados del diagnóstico del método de medición de

reactancia (figura 12) mostraron una desviación típica superior (valor SD) en comparación con los resultados del método típico de medición de impedancia (figura 11). Específicamente, la adopción de la medición de reactancia según la presente invención es ventajosa en comparación con el método típico de medición de impedancia en cuanto a que se reduce significativamente la desviación típica en la medición de reactancia y el valor de

5 regresión lineal (R<sup>2</sup>) en este ejemplo es aproximadamente 0,9986. Por consiguiente, el método de medición de reactancia según la presente invención produce un resultado más preciso que el método de medición de impedancia tradicional, y la desviación de pendiente es aceptable incluso cuando se extiende el proceso de coagulación sanguínea, ajustando así fácilmente los valores.

10 [0034] Por otro lado, en este ejemplo particular, la regresión lineal (R<sup>2</sup>) para la curva de calibración del TP en comparación con el índice de cambio de impedancia fue de aproximadamente 0,939, como se muestra en la figura 11. Por consiguiente, es más posible que el método de impedancia cause una medición imprecisa.

15 [0035] En el ejemplo anterior, se midieron la impedancia y la reactancia de una muestra sanguínea por el medidor LCR, y se calculó su índice de cambio de impedancia e índice de cambio de reactancia. Específicamente, el HCT fue calculado usando la curva de calibración HCT con la fórmula,  $HCT = (impedancia - 2347,7) / 90,253$  o  $HCT = (reactancia - 529,68) / 3,1304$ . Luego, el TP real se calcula por la curva de calibración de TP. Un HCT diferente puede corresponder con una curva de calibración de TP diferente. En este ejemplo particular, el TP fue calculado usando la curva de calibración de TP con la fórmula,  $TP = (índice de cambio de impedancia - 4,562) / -0,1849$  o  $TP = (índice de cambio de reactancia - 0,3604) / -0,0256$ .

20 [0036] Las figuras 13 y 14 representan gráficos ilustrativos de TP calibrado en comparación con TP real por impedancia y TP calibrado en comparación con TP real por reactancia, respectivamente. Se compararon los valores de TP computados por la curva de calibración y los valores de TP real medidos por el analizador de coagulación sanguínea automatizado (Sysmex CA-500 serie).

25 [0037] El aumento o la reducción en el HCT influencia el tiempo de coagulación de la sangre (TP) y el valor de índice de cambio de impedancia o reactancia. Específicamente, un HCT más alto causa el aumento del valor de índice de cambio de impedancia o reactancia. Por lo tanto, el proceso de medición de TP en algunas formas de realización puede incluir un paso de corrección de HCT. Por consiguiente, el dispositivo según algunas formas de realización de la presente invención incluye una memoria interna para almacenar datos de interpolación entre el HCT y el cambio de impedancia.

30 [0038] En un aspecto de la invención, los valores de TP calculados como el ejemplo anterior se pueden corregir con un relación normalizada internacional que se muestra en la fórmula a continuación:

$$RNI = \left( \frac{TP \text{ paciente}}{TP \text{ medio}} \right)^{ISI} \quad (4)$$

35 donde RNI es la relación normalizada internacional, TP es el tiempo de protrombina, e ISI es un índice de sensibilidad internacional.

40 [0039] Las figuras 15A y 15B son gráficos experimentales que muestran los análisis de coagulación sanguínea utilizando un sustrato poroso y un sustrato no poroso para la tarjeta de prueba, respectivamente. Como se ilustra en las figuras, los análisis que utilizan un sustrato poroso proporcionaron resultados superiores.

45 [0040] Las figuras 16A-16C representan gráficos experimentales que muestran los análisis de coagulación sanguínea a diferentes frecuencias por la medición de reactancia según la presente invención. Se midieron tiempos de coagulación entre 15-50 segundos para las muestras de sangre a frecuencias de 0,1kHz, 10kHz y 50kHz, y se obtuvieron resultados de la prueba R<sup>2</sup> por el cálculo de análisis de regresión de 0,9636, 0,9923, y 0,9858 respectivamente. En este caso, el análisis de regresión indica que el uso de frecuencias de 10KHz y 50KHz proporcionan mayor exactitud en comparación con una frecuencia de 0,1 KHz.

50 [0041] Mientras la invención se ha descrito por medio de ejemplos y en cuanto a formas de realización preferidas, sería evidente para los expertos en la técnica hacer varios reemplazos equivalentes, enmiendas y modificaciones en vista de la especificación de la invención. Por lo tanto, el alcance de las reivindicaciones anexas debería acordarse a la interpretación más amplia para abarcar tales reemplazos, enmiendas y modificaciones sin apartarse del ámbito de la invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Dispositivo de diagnóstico para medir el hematocrito (HCT) y/o el tiempo de protrombina de un fluido, que comprende:
- 10 un dispositivo sensor (120); y  
 un ensamblaje de tarjeta de prueba (110) que incluye uno o varios pares de electrodos (226, 228), donde el ensamblaje de tarjeta de prueba de sangre (110) comprende una placa base (210) que comprende un material poroso  
 donde el dispositivo sensor (120) está configurado para proporcionar una corriente alterna y para medir y calcular el tiempo de protrombina y/o HCT de una prueba de sangre utilizando análisis de reactancia.
- 15 2. Dispositivo de diagnóstico según la reivindicación 1, donde el ensamblaje de tarjeta de prueba (110) comprende uno o varios pares de los electrodos de metal noble (226, 228), dispuestos en el mismo plano o en planos diferentes respectivamente.
- 20 3. Dispositivo de diagnóstico según la reivindicación 2, donde la placa base (210) del ensamblaje de tarjeta de prueba (110) comprende poros con diámetros aproximadamente en un rango de aproximadamente 0,1µm a aproximadamente 10µm.
- 25 4. Dispositivo de diagnóstico según la reivindicación 1, donde el dispositivo sensor (120) comprende:  
 una unidad de recepción de la tarjeta de prueba (122) para alojar el ensamblaje de tarjeta de prueba;  
 una unidad de mantenimiento de temperatura (134) para controlar y mantener la temperatura de la unidad de recepción de la tarjeta de prueba a una temperatura constante;  
 una unidad de generación de CA (124) para suministrar una corriente alterna con frecuencia y voltaje predeterminados al ensamblaje de tarjeta de prueba;  
 una unidad de recepción de señal (128) para recuperar una señal de respuesta del ensamblaje de tarjeta de prueba;  
 un microprocesador (130) para calcular la señal de respuesta y emitir los resultados del HCT y el tiempo de protrombina; y  
 una unidad de visualización (136) para visualizar los resultados analizados del HCT y el tiempo de protrombina del microprocesador.
- 30  
 35 5. Dispositivo de diagnóstico según la reivindicación 4, donde el microprocesador (130) está configurado para comparar la señal de respuesta con una señal de CA original, calcula un cambio en la fase de la señal de CA, y calcula la reactancia y el HCT.
- 40 6. Dispositivo de diagnóstico según la reivindicación 5, donde el microprocesador (130) está configurado para transformar además la capacitancia con algoritmos, corrige al tiempo de protrombina por referencia del HCT; y calcula el tiempo de protrombina con una relación normalizada internacional.
- 45 7. Método para medición del HCT y/o tiempo de protrombina, que comprende:  
 proporcionar un ensamblaje de tarjeta de prueba (110) según la reivindicación 1 a una unidad de recepción de tarjeta de prueba (122);  
 controlar y mantener la temperatura de la unidad de recepción de la tarjeta de prueba (122) a una temperatura constante;  
 proporcionar al ensamblaje de tarjeta de prueba una muestra para ser analizada;  
 proporcionar una corriente alterna con frecuencia y voltaje predeterminados al ensamblaje de tarjeta de prueba por una unidad de generación de CA (124);  
 recibir una señal de respuesta del ensamblaje de tarjeta de prueba (110), comparando la señal de respuesta respecto a una señal de CA originalmente de la unidad de generación de CA, calcular un cambio en la fase de la señal de CA, y calcular el tiempo de protrombina y el HCT de la prueba sanguínea utilizando análisis de reactancia por un microprocesador (130); y  
 proporcionar un resultado analizado a una unidad de visualización (136).
- 50  
 55 8. Método según la reivindicación 7, donde el paso de recepción de una señal de respuesta del ensamblaje de tarjeta de prueba y el cálculo del tiempo de protrombina comprende además: calcular una capacitancia, y transformar la capacitancia con algoritmos y corregir el tiempo de protrombina por referencia del HCT.
- 60 9. Método según la reivindicación 8, donde el paso de recepción de una señal de respuesta del ensamblaje de tarjeta de prueba y el cálculo del tiempo de protrombina por un microprocesador comprende además:  
 corregir el tiempo de protrombina con una relación normalizada internacional.
- 65

10. Método para medir el tiempo de protrombina y el HCT según la reivindicación 7, donde el ensamblaje de tarjeta de prueba sanguínea (110) comprende uno o varios pares de los electrodos de metal noble (226, 228), dispuestos en el mismo plano o en planos diferentes respectivamente.
- 5 11. Método para medir el tiempo de protrombina y el HCT según la reivindicación 7, donde el ensamblaje de tarjeta de prueba sanguínea (110) comprende una placa base (210) compuesta por materiales porosos.
- 10 12. Método para medir el tiempo de protrombina y el HCT según la reivindicación 7, donde la placa base (210) del ensamblaje de tarjeta de prueba (110) incluye poros con diámetros alrededor de un rango de aproximadamente 0,1 $\mu$ m a aproximadamente 10 $\mu$ m.

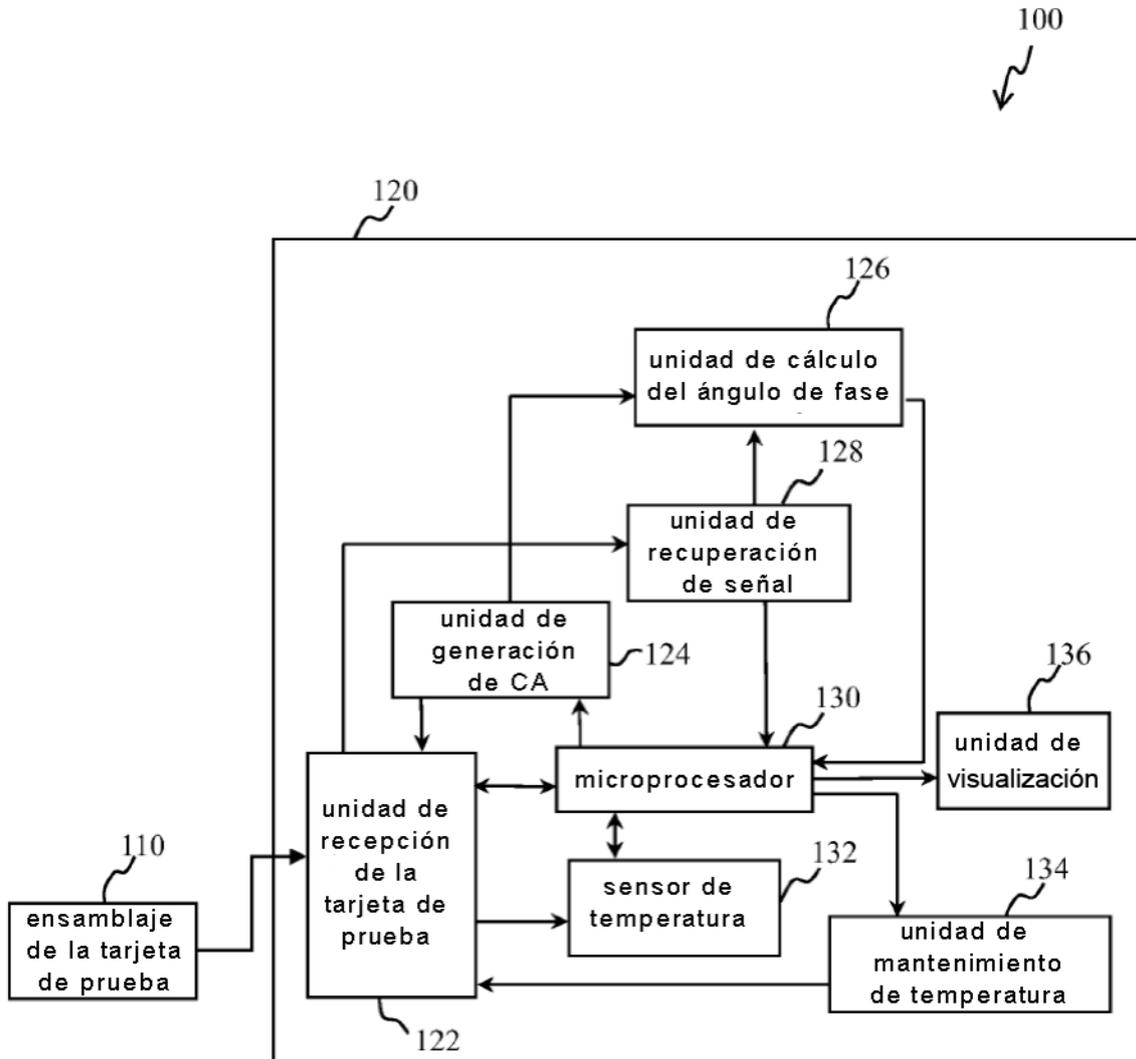


FIG. 1

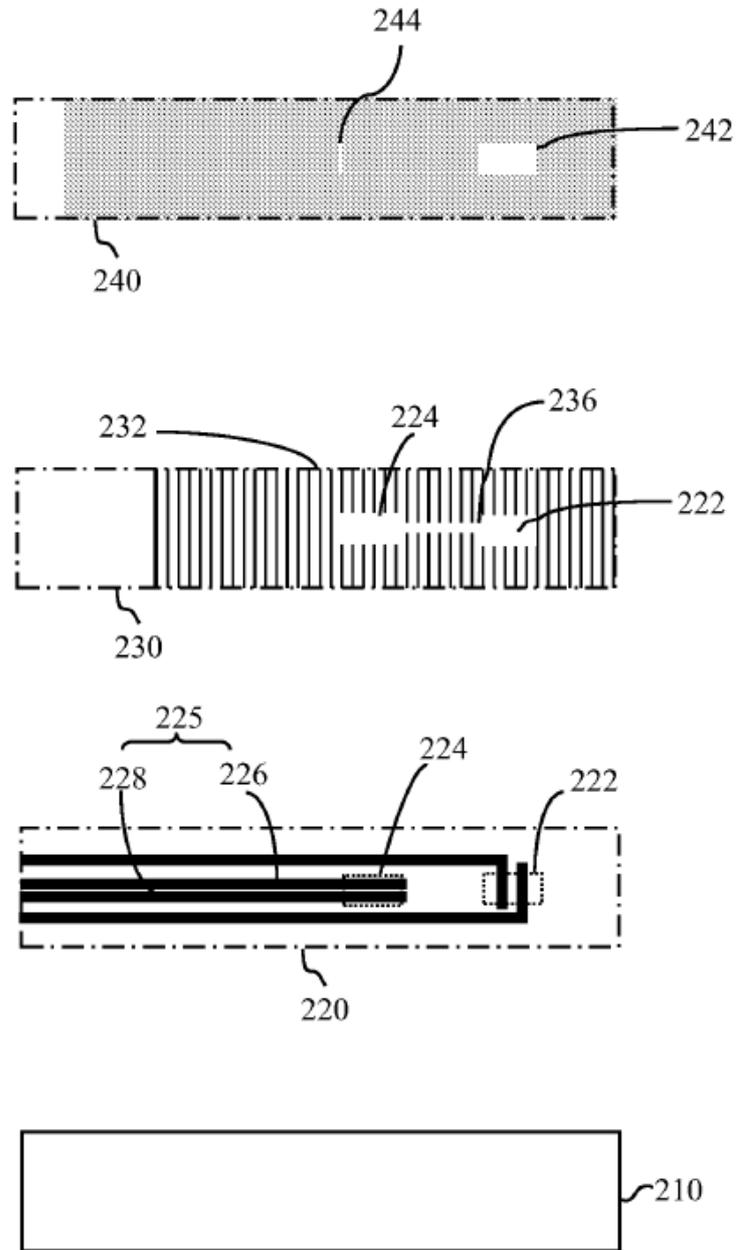


FIG. 2

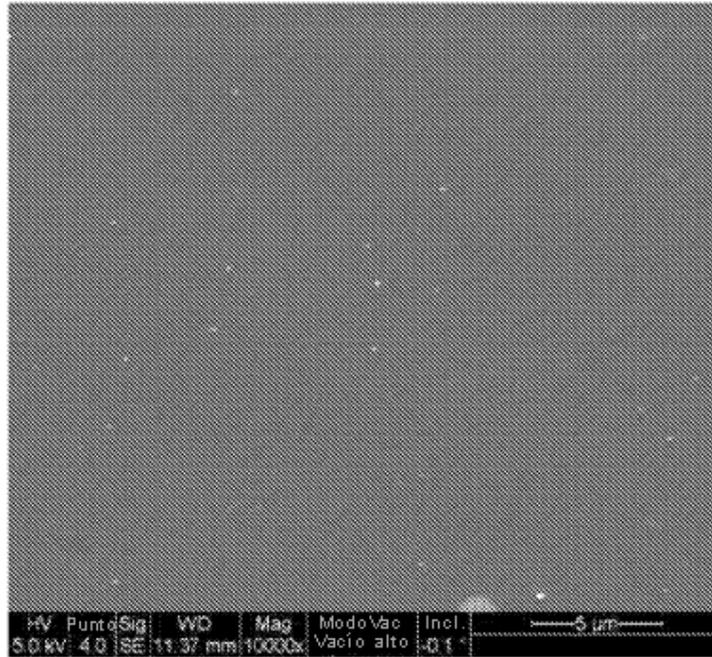


FIG. 3A

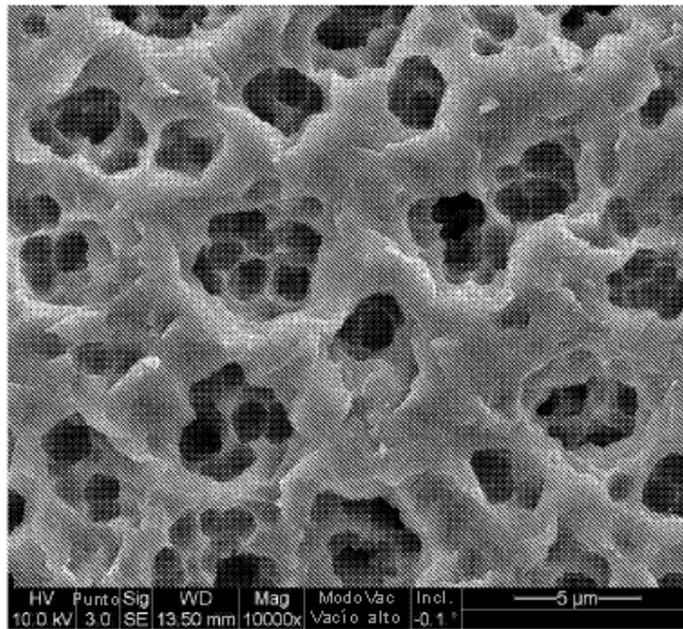


FIG. 3B

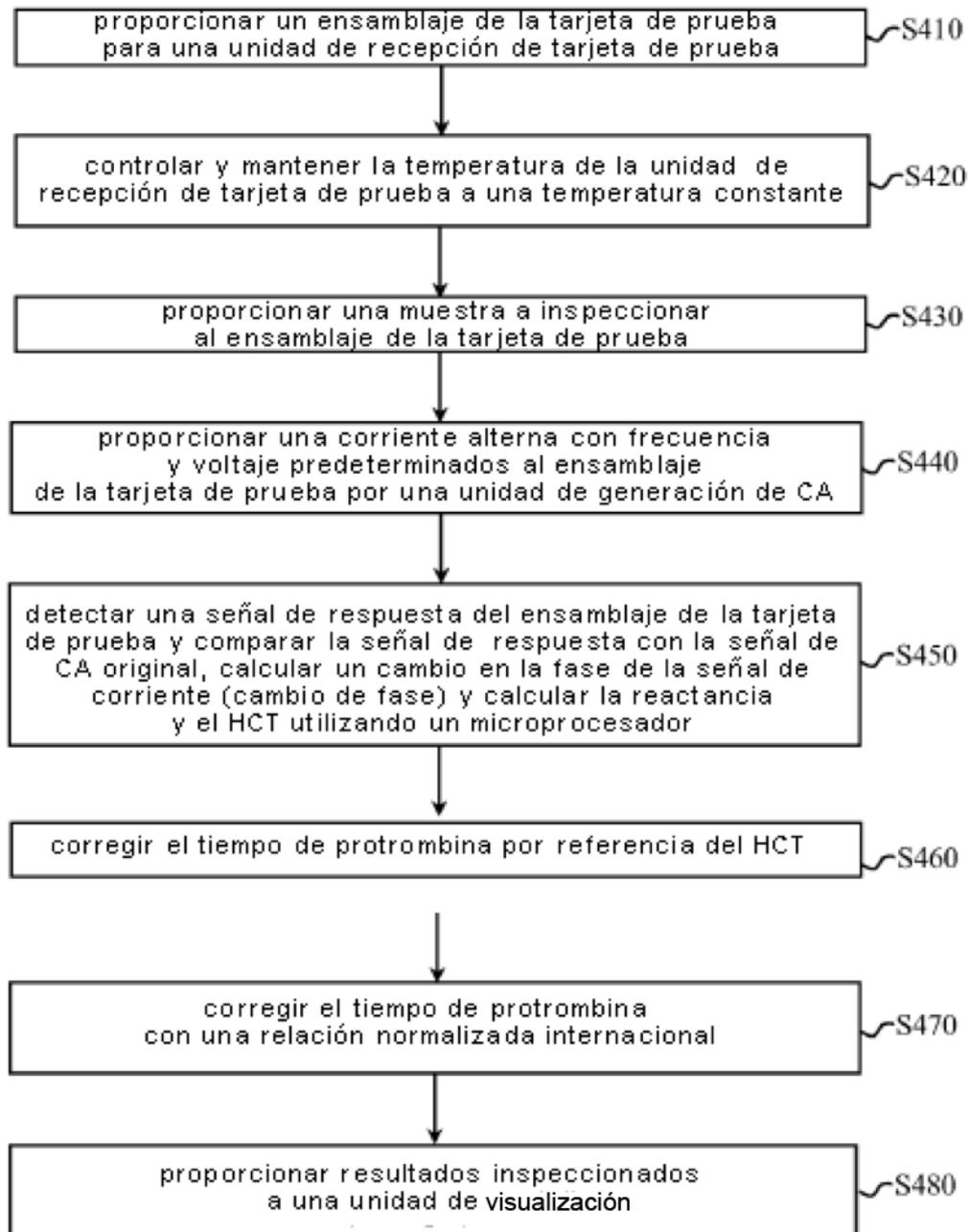


FIG. 4

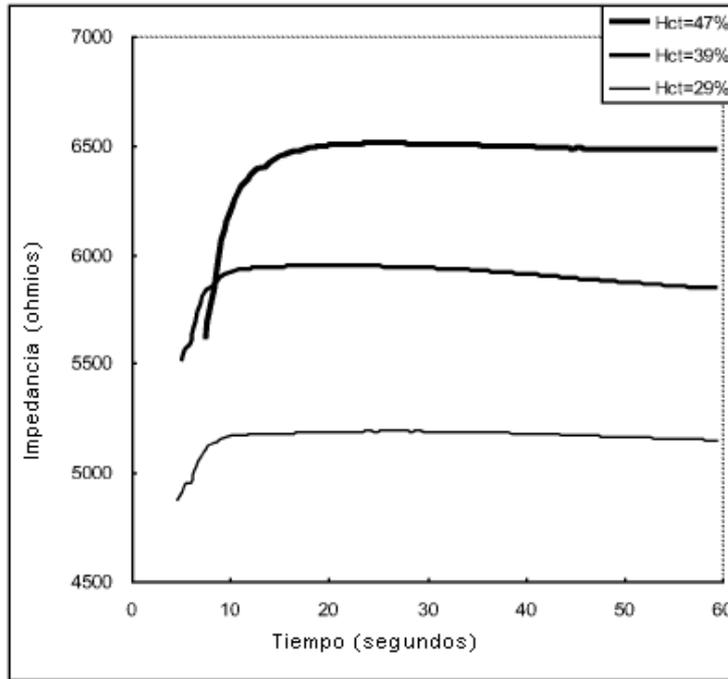


FIG. 5

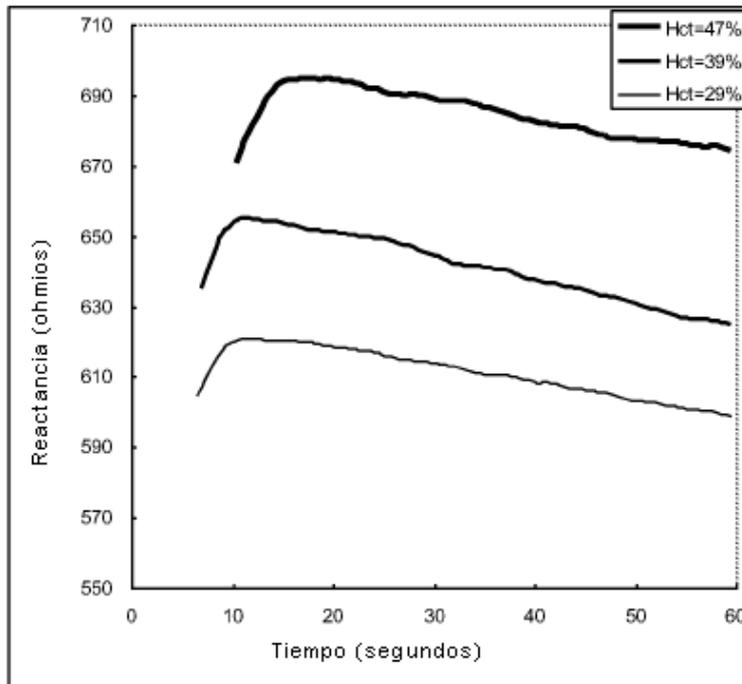
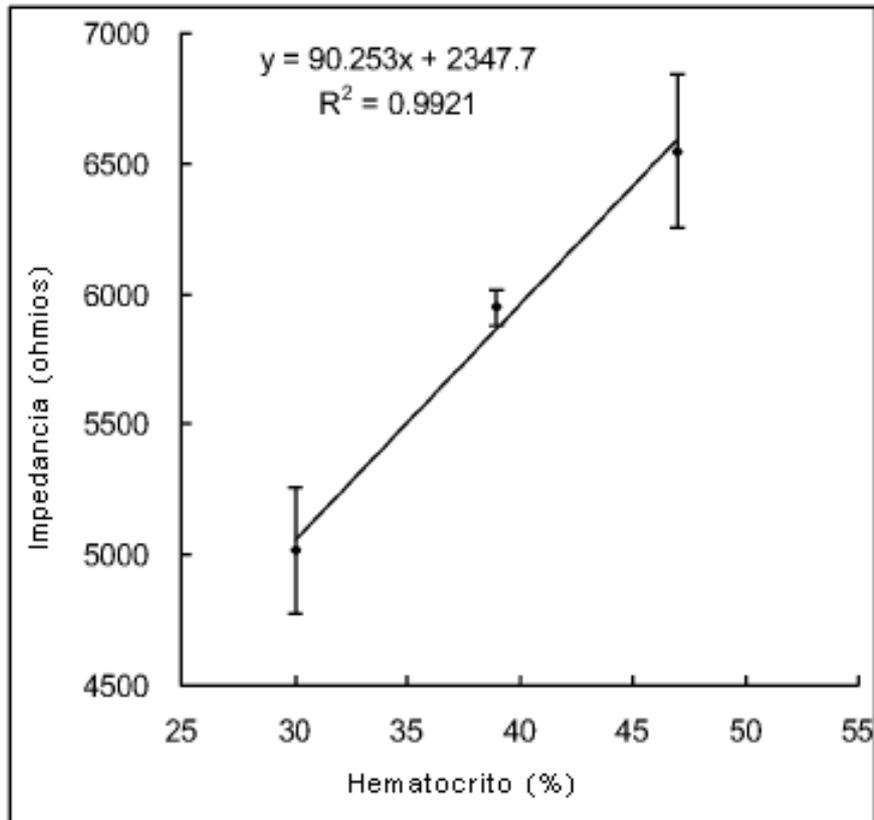
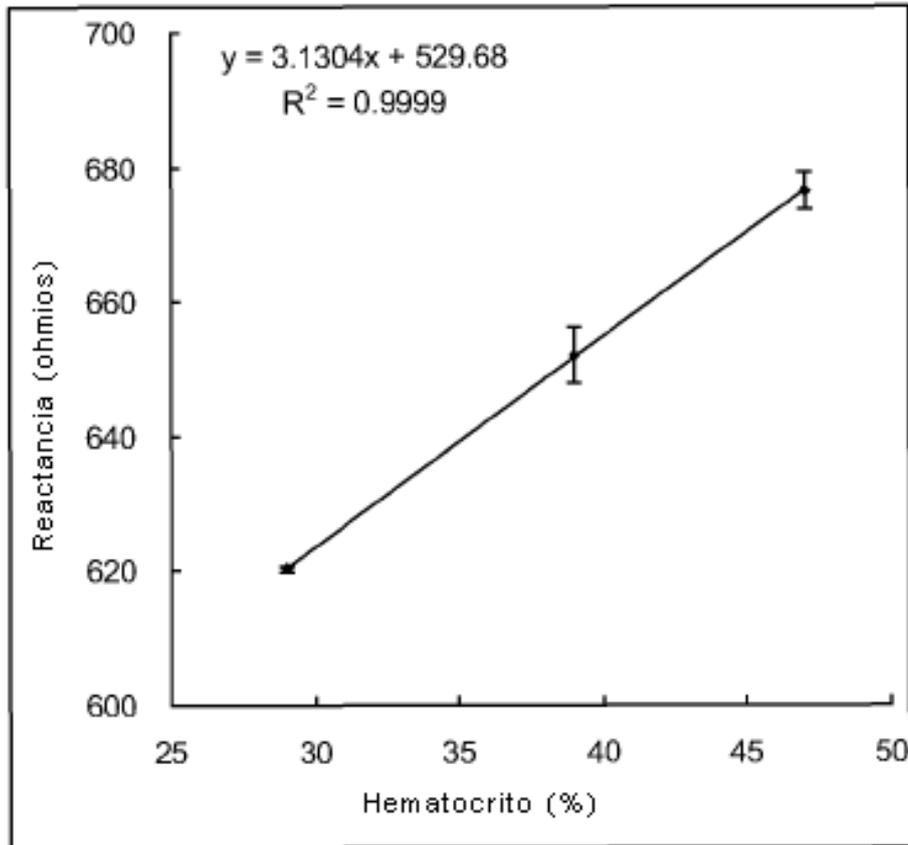


FIG. 6



<b>Hematocrito (%)</b>	<b>Impedancia (ohmios)</b>	<b>variación</b>
29	5018.1	242.4
39	5946.6	68.9
47	6547.8	293.7

**FIG. 7**



Hematocrito (%)	Reactancia (ohmios)	variación
29	620.29	0.37
39	652.17	4.21
47	676.59	2.80

FIG. 8

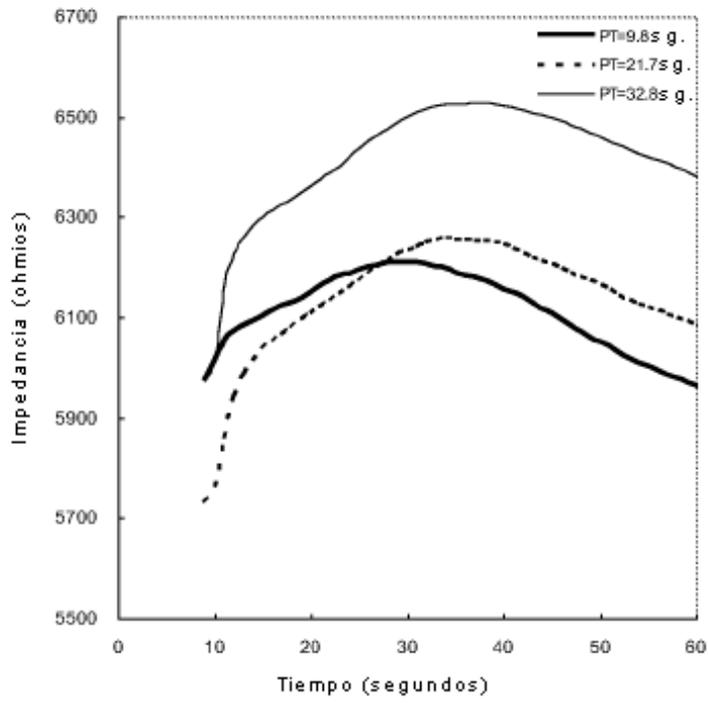


FIG. 9

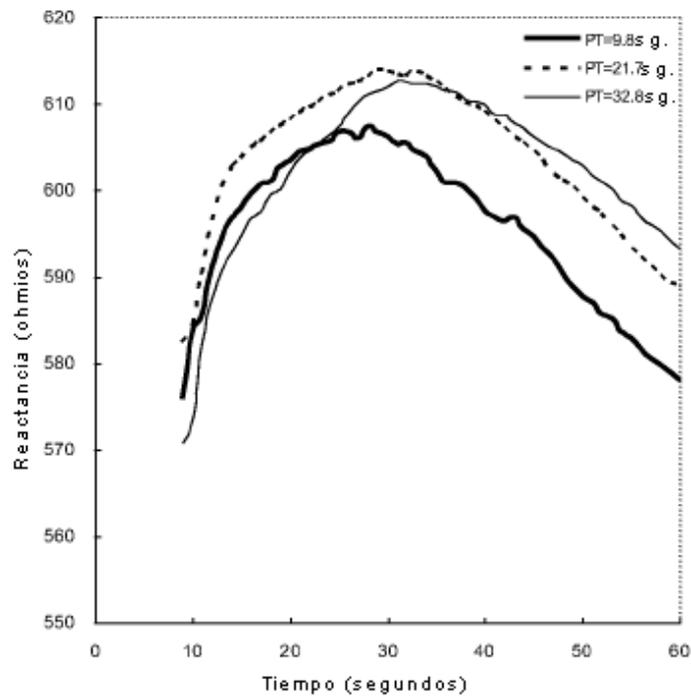
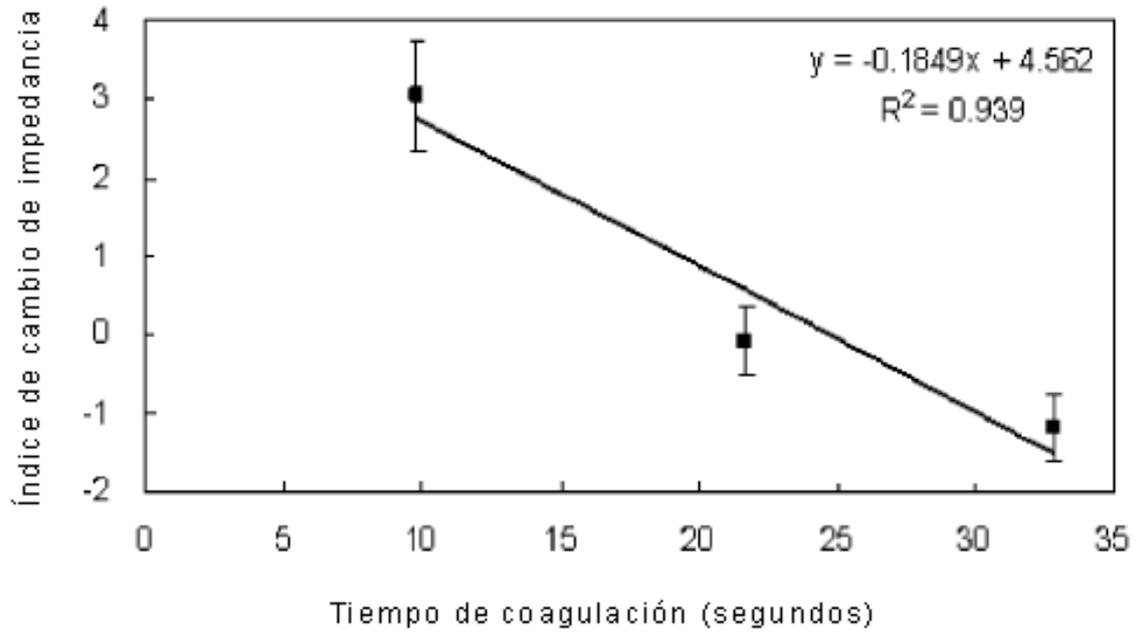
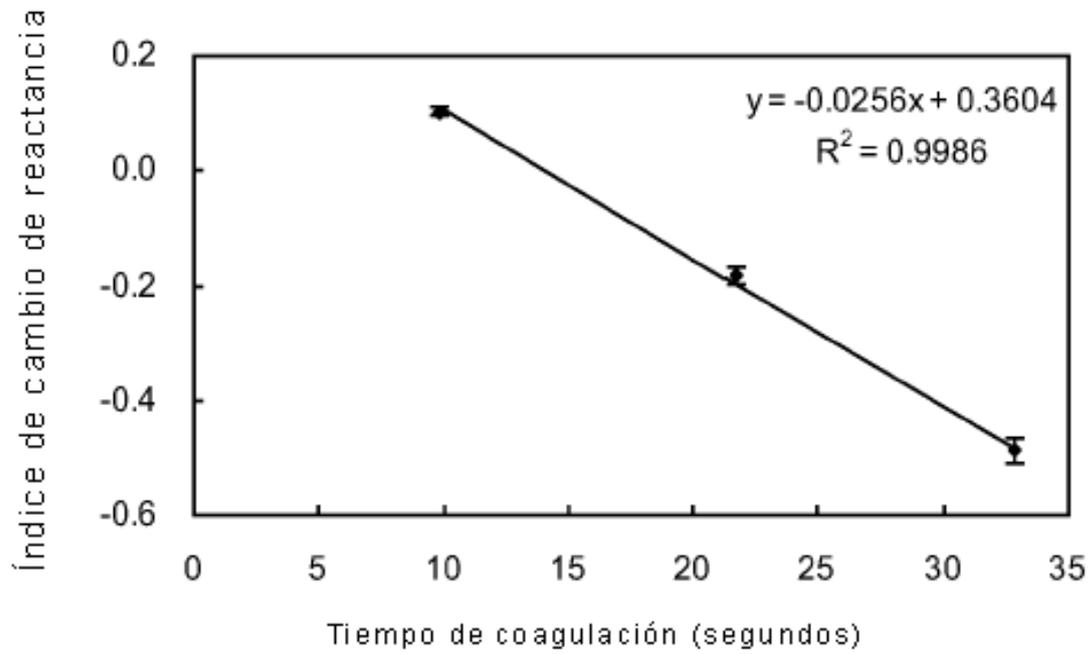


FIG. 10



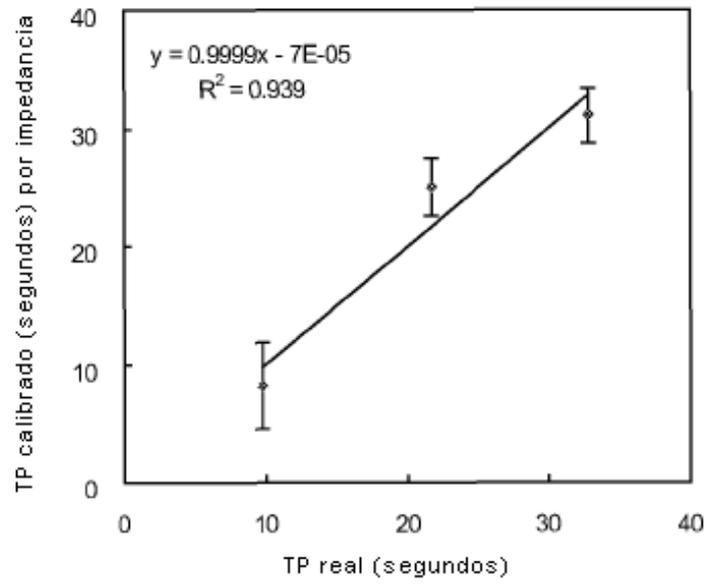
tiempo de coagulación (segundos)	índice de cambio de impedancia	variación
9.8	3.05	0.69
21.7	-0.08	0.44
32.8	-1.18	0.44

FIG. 11



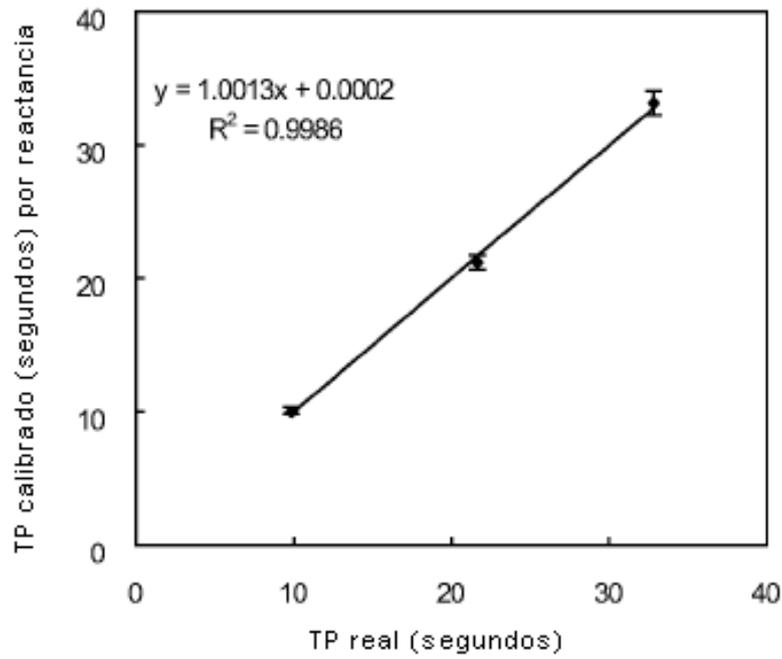
<b>tiempo de coagulación (segundos)</b>	<b>índice de cambio de reactivancia</b>	<b>variación</b>
9.8	0.10	0.01
21.7	-0.18	0.01
32.8	-0.49	0.02

FIG. 12



<b>tiempo de coagulación (segundos)</b>	<b>TP calculado por impedancia (segundos)</b>	<b>variación</b>
9.8	8.2	3.7
21.7	25.1	2.4
32.8	31.0	2.4

FIG. 13



<b>tiempo de coagulación (segundos)</b>	<b>TP calculado (segundos) por reactancia</b>	<b>variación</b>
9.8	10.1	0.2
21.7	21.2	0.5
32.8	33.1	0.9

FIG. 14

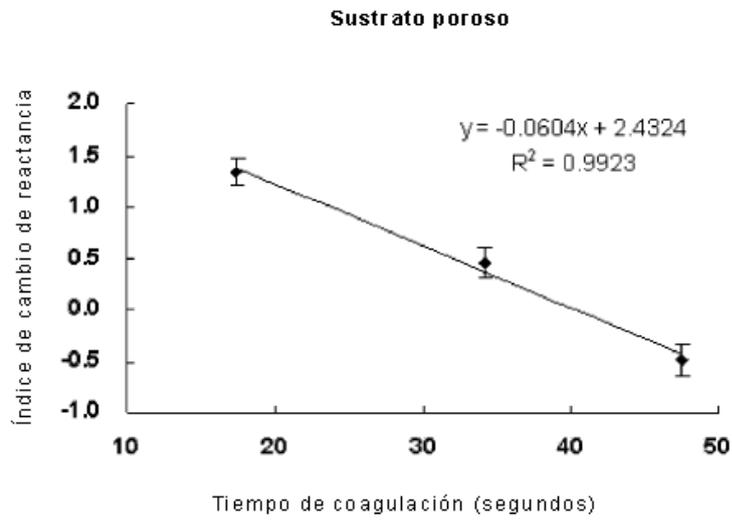


FIG. 15A

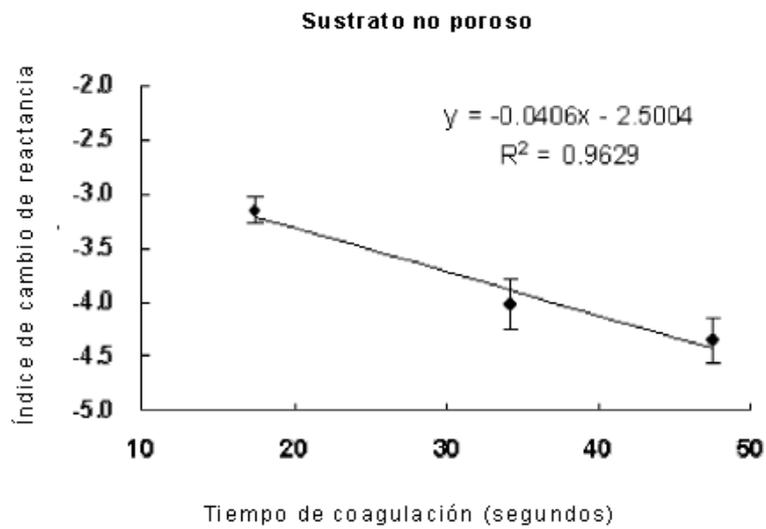


FIG. 15B

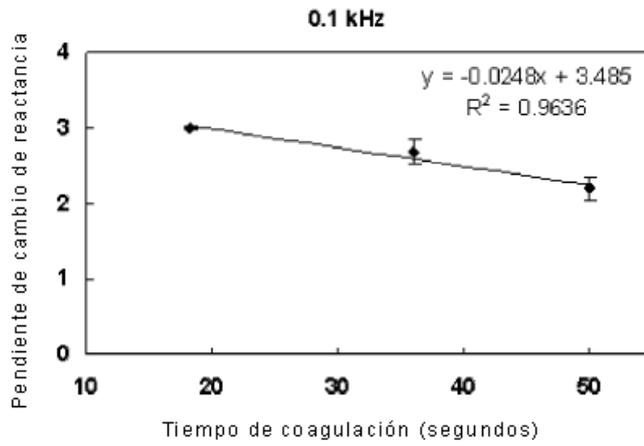


FIG. 16A

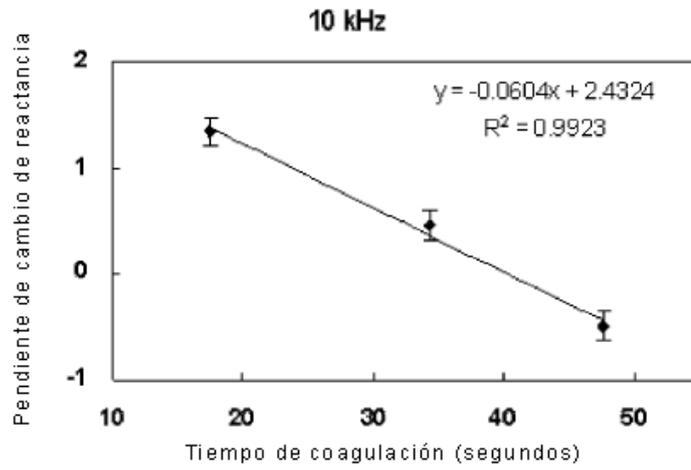


FIG. 16B

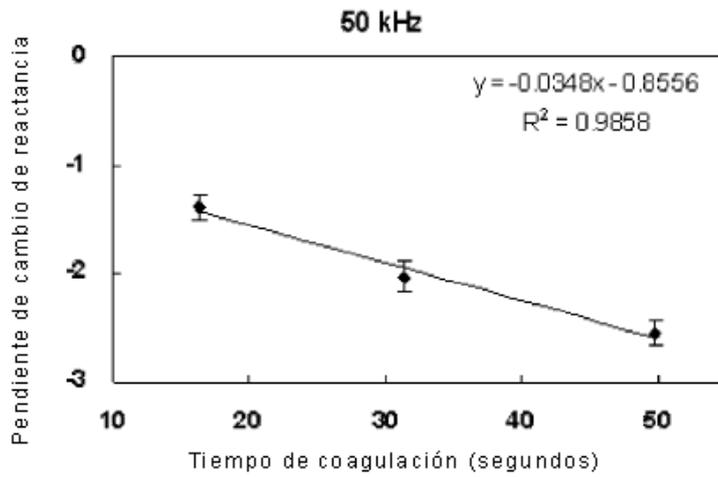


FIG. 16C