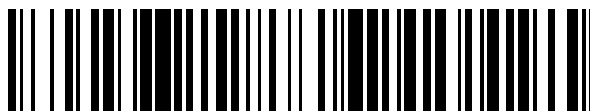


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 743**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/37** (2006.01)

**C12Q 1/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2010** **E 16154774 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 3050974**

54 Título: **Método para la detección de tiras para prueba de orina con compromiso por humedad**

30 Prioridad:

**26.01.2009 US 147272 P**

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

**04.04.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 707 743 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para la detección de tiras para prueba de orina con compromiso por humedad

Antecedentes de la Invención

5 Esta invención se refiere en general a la mejora del rendimiento y la fiabilidad de las tiras reactivas que emplean reactivos sensibles a la humedad, particularmente los utilizados para determinar la presencia de analitos en muestras de orina, como albúmina, proteína, creatinina, nitrato, uristatina, esterasa leucocitaria (glóbulos blancos), sangre oculta (glóbulos rojos), cetonas, glucosa, bilirrubina, urobilógeno y otros que son familiares para los expertos en la técnica. La medición de proteasas e inhibidores de proteasas, como la esterasa leucocítica (elastasa humana) o el inhibidor de la tripsina urinaria (Bikunina, Uristatina) son especialmente importantes porque pueden indicar infecciones del riñón o del tracto urogenital. Estas proteasas y tiras inhibidoras de proteasas dependen de la hidrólisis de sustratos proteolíticos mediante proteasas para generar señales detectables. Dado que las reacciones bioquímicas requieren agua para que se produzca la hidrólisis enzimática, tienden a ser sensibles a la humedad y pueden interferir con las señales detectables a través de reacciones de fondo.

15 En la técnica se conocen sistemas de reactivos de control para el denominado control a bordo de elementos analíticos, por ejemplo de tiras reactivas. El sistema de reactivos contiene al menos una sustancia que directa o indirectamente indica condiciones ambientales que podrían afectar la confiabilidad del elemento analítico. Esto permite una diferenciación entre elementos analíticos funcionales y elementos analíticos no funcionales (US 2005/0123441 A1). En el artículo de Schulman et al.: "Novel humidity Check with MULTISTIX® 10SG Urine Strips on the CLINITEK Status® analyzer from Siemens Healthcare Diagnostics", in: CLINICAL CHEMISTRY, vol. 55, no. 6, Suppl. S, June 2009 (2009-06), page A102, se describe un método para reducir los resultados falsos positivos en el analizador de estado CLINITEK debido al uso inadecuado o incorrecto de las tiras de orina MULTISTIX® 10SG.

25 La Patente de Estados Unidos 5,663,044 describe la técnica anterior en el campo de la detección de leucocitos, esterases o proteasas y para enseñar en general el uso de una composición que incluye una sal de diazonio, uno de un grupo de ésteres sujetos a hidrólisis en presencia de leucocitos, esterases o proteasas y un metal alcalinotérreo. La patente '044 enseña la medición de la reflectancia de la luz a aproximadamente 570 nm para determinar la cantidad de leucocitos en la muestra de orina. La reflectancia a 570 nm se compara con una medición estándar de reflectancia a 690 nm. La patente indica que la presencia de metal alcalinotérreo promueve la estabilidad de la sal de diazonio. También sugiere que el metal alcalinotérreo absorbe la humedad, lo que puede causar un cambio de color de fondo. La experiencia ha demostrado que este sistema de reactivos es sensible a la humedad y que las tiras de prueba deben mantenerse en un ambiente seco antes de usarlas. El contenido de humedad de las tiras reactivas debe mantenerse por debajo del 2% en peso para evitar el rendimiento degradante. Sin embargo, medir la humedad en las tiras de prueba no es muy preciso. Existe una necesidad particular de medir el contenido de humedad con mucha precisión para garantizar que las tiras reactivas se mantengan estables en un recipiente cerrado y seco durante varios años.

35 Otro ejemplo del uso de reactivos sensibles a la humedad se discute en las Patentes de Estados Unidos 6,770,764; 6,955,921; y 7,001,737. En las reacciones descritas, la presencia de inhibidores de tripsina en la orina en una muestra de orina se detecta agregando una muestra a las tiras reactivas que contienen una cantidad conocida de tripsina, un sustrato de tripsina, es decir, ésteres de arginina hidrolizados por tripsina para producir un alcohol y una sal de diazonio. Cuando los inhibidores de tripsina están presentes, inhiben la reacción entre la tripsina y el sustrato. Esto reduce el color producido por la sal de diazonio de su reacción con el fenol producido cuando el sustrato de tripsina reacciona con la cantidad conocida de tripsina. Midiendo el color producido, se puede determinar la presencia de inhibidores de tripsina.

45 En la Patente de Estados Unidos 6,316,264, se agrega un colorante infrarrojo (IR) a una ubicación predeterminada en las tiras reactivas para asegurar que las tiras estén alineadas correctamente en el instrumento utilizado para detectar y/o medir la presencia de analitos en una muestra aplicada a la tira. El rango de IR para los colorantes osciló entre 700 y 2500 nm, pero se dijo que se preferían a los colorantes con una absorbancia fuerte en el rango de 825-855 nm, con una absorbancia en el rango visible (400-700 nm) inferior al 20%.

50 Como se sugirió anteriormente, sería ventajoso si las tiras reactivas de orina que están comprometidas con la humedad pudieran identificarse con mayor precisión para evitar el uso inseguro y corregir los resultados afectados por la humedad. Dado que los reactivos que implican la hidrólisis de sustratos proteolíticos son especialmente sensibles a la humedad, si los propios reactivos pudieran usarse para indicar la presencia de humedad indeseable, se habría obtenido una mejora significativa. La presente invención proporciona un método de este tipo, que se describirá en detalle a continuación.

Resumen de la Invención

55 La invención tiene aplicación en tiras reactivas sensibles a la humedad que se usan para medir la hidrólisis de sustratos proteolíticos usados para detectar proteasas o inhibidores de proteasas. Un ejemplo se encuentra en la detección de leucocitos, esterases o proteasas, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,663,044. Otro ejemplo se encuentra en la detección de los inhibidores de la tripsina urinaria descritos en las Patentes de Estados Unidos 6,770,764; 6,955,921; y 7,001,737.

En general, la invención es un método para detectar humedad excesiva en tiras reactivas que emplean reactivos sensibles a la humedad e incluyen un colorante de referencia infrarrojo. El método comprende medir la reflectancia de la luz en una primera longitud de onda y en una segunda longitud de onda. La reflectancia de la luz en la primera longitud de onda de luz está en el rango de 520 a 570 nm. La reflectancia en la segunda longitud de onda está en el rango de 700 a 2500 nm. Es al menos 120 nm mayor que la primera longitud de onda y es una longitud de onda característica del colorante de referencia infrarrojo en un primer momento predeterminado. La reflectancia de la luz se mide dentro de los 20 segundos posteriores al contacto del reactivo sensible a la humedad con una muestra que contiene agua. Al medir el color u otra respuesta desarrollada por reactivos sensibles a la humedad justo después de aplicar una muestra y comparar el resultado con un colorante de referencia infrarrojo conocido, se identifican los reactivos comprometidos con la humedad y el resultado se puede marcar o descartar. La reflectancia de la luz en la primera longitud de onda y la segunda longitud de onda en un segundo tiempo predeterminado es al menos 40 segundos después de la primera medición de la reflectancia.

Cuando el color desarrollado se mide por la reflectancia de la luz, el valor de la relación de reflectancia (es decir, la relación de la reflectancia de los reactivos a la reflectancia del colorante de referencia) inmediatamente después de aplicar una muestra se compara con el valor de la relación de reflectancia tomada poco tiempo después, se utiliza para determinar el efecto de la humedad excesiva y rechazar los reactivos si están comprometidos con la humedad. Se mide una primera y una segunda relación de reflectancia para determinar si la muestra tiene un color inusual y puede estar afectando los resultados.

Un nivel de actividad del reactivo entre el primer y el segundo tiempo predeterminado se determina comparando la primera relación y la segunda relación calculada anteriormente. Cuando el nivel de actividad del reactivo está en o por encima del nivel esperado, se puede determinar la concentración de un analito en la muestra. Cuando el nivel de actividad del reactivo es menor que el nivel esperado, se mide la reflectancia de la luz en una tercera y una cuarta longitud de onda. La reflectancia de la luz en la tercera longitud de onda está en la región azul del espectro de luz visible a aproximadamente 470 nm y la cuarta longitud de onda está en una región roja del espectro de luz visible a aproximadamente 625 nm.

Se calcula una tercera proporción de las mediciones de reflectancia en el paso anterior. Sobre la base de este cálculo, se determina si una causa principal de la actividad inferior a la esperada se debe a un color de la muestra o una sensibilidad reducida de la humedad del reactivo sensible a la humedad. Cuando se determina que la causa principal es el color de la muestra, se puede determinar la concentración de un analito en la muestra. Cuando la causa principal es la sensibilidad a la humedad reducida del reactivo sensible a la humedad, el reactivo sensible a la humedad se rechaza por estar comprometido con la humedad.

En una realización preferida, para detectar reactivos de leucocitos comprometidos con la humedad, los reactivos incluyen una sal de diazonio, por ejemplo DNSA (ácido 1-diazo-2-naftol-4-sulfónico), que reacciona con un éster hidrolizable, por ejemplo PPTA (éster 2-hidroxi-5-fenil-pirrol-N-tosil-L-alanina). Cuando la esterasa leucocitaria está presente en la muestra de orina, se produce un color en proporción a la cantidad de leucocitos presentes. En esta realización, la reflectancia en la longitud de onda de la luz de 520-570 nm se compara con la reflectancia de aproximadamente 825 nm característica del colorante de referencia.

#### Breve descripción de los dibujos

La única figura es un diagrama de flujo para determinar el contenido de leucocitos de una muestra o rechazar el resultado como comprometido por humedad.

#### Descripción de realizaciones preferidas

La invención incluye un método mejorado para medir la hidrólisis de sustratos proteolíticos en muestras de orina aplicadas a tiras reactivas. En general, los reactivos basados en sustratos proteolíticos se pueden usar para detectar cualquier proteasa. La secuencia de aminoácidos de los reactivos se empareja con el tipo preferido por la proteasa que se detecta y la secuencia de aminoácidos se une a una unidad estructural generadora de señal que, tras la hidrólisis, forma la señal. Un ejemplo de este principio es la detección de la leucocito esterasa, que se usa para detectar la presencia de leucocitos en una muestra, como se describe en la patente de Estados Unidos 5,663,044. La presencia de leucocitos se correlaciona con la reflectancia de la luz en la longitud de onda característica de los reactivos con referencia a la reflectancia de la luz en una longitud de onda característica de un colorante de referencia infrarrojo. La comparación de reflectancia medida se correlaciona con la presencia de leucocitos después de un tiempo de incubación de aproximadamente 20 segundos a 3 minutos después de la aplicación de una muestra de orina a los reactivos. Dichas tiras reactivas pueden verse comprometidas por el exceso de humedad, lo que puede reducir la actividad del reactivo y mostrar falsamente el desarrollo del color, lo que indica la presencia de leucocitos en una muestra de orina. Al medir la relación de reflectancia de los reactivos al colorante de referencia infrarrojo durante el primer minuto después de que se haya aplicado una muestra de orina a los reactivos, el método de la invención determina si los reactivos se han visto comprometidos por el exceso de humedad.

Los reactivos basados en sustratos proteolíticos también se pueden usar para detectar un inhibidor de la proteasa. De nuevo, la secuencia de aminoácidos se empareja con el tipo preferido por el inhibidor de proteasa, la secuencia está unida a un resto generador de señal que, tras la hidrólisis, forma la señal. La proteasa se agrega al reactivo y, por lo tanto, genera una señal cuando el inhibidor no está presente en la muestra. La ausencia de una señal se utiliza para determinar la presencia de inhibidor de proteasa en una muestra. Un ejemplo de este principio es la detección de un inhibidor de la tripsina en orina como se describe en las Patentes de Estados Unidos 6,770,764; 6,955,921; y 7,001,737.

La hidrólisis de un sustrato proteolítico no alcanza el punto final de la reacción en el corto período de tiempo de menos de unos pocos minutos necesarios para las tiras utilizadas en aplicaciones en el punto de atención. Las reacciones de hidrólisis continúan creando una señal con el tiempo y, por lo general, se miden cinéticamente para permitir lecturas que no dependen de la sincronización por parte del operador. Por ejemplo, el color desarrollado por la reacción de los leucocitos en la orina se puede medir a los 20 y 60 segundos y la proporción de señales en ambos momentos se usa como resultado cinético, es decir, que muestra la tasa de cambio de color. Esto evita que el usuario tenga que esperar 3 minutos completos para obtener un resultado.

La invención es aplicable a muchos formatos en los que los reactivos son sensibles a la humedad. Es decir, los reactivos pueden reaccionar en presencia de humedad e indicar falsamente la presencia de un analito, que en realidad no está presente en la muestra que se mide. A

Anteriormente se han mencionado ejemplos de tales reactivos sensibles a la humedad. De particular importancia para los presentes inventores fue la sensibilidad de la humedad de los reactivos utilizados para detectar leucocitos en muestras de orina por esterasa en los leucocitos, como se describe a continuación con referencia a una realización preferida. Sin embargo, será evidente que los métodos de la invención tienen aplicación a otros reactivos sensibles a la humedad, incluidos, entre otros, otros reactivos que se pueden usar para medir la presencia de leucocitos. Se entiende que las tiras reactivas pueden tener muchos formatos, incluidos, entre otras, tiras reactivas y cartuchos de flujo lateral.

#### 25 Reactividad leucocitaria química

Los reactivos de leucocitos útiles en la invención que pueden proporcionar un método para medir el contenido de leucocitos en muestras de orina se analizan en la Patente de Estados Unidos 5,663,044 mencionada anteriormente. Una composición preferida de la invención se describió en la Tabla 4 de la patente '044. Un compuesto de alanina (PPTA; 2-hidroxi -5-fenil-pirrol-N-tosil -L- alanina éster) sirvió como un sustrato para la esterasa leucocítica, que hidroliza PPTA, después de lo cual el producto hidrolizado reacciona con el indicador de diazonio (DNSA; Ácido 1-diazo-2-naftol-4-sulfónico) para producir color. El color se midió por el grado de reflectancia cuando se examinó a una longitud de onda de luz de 520-570 nm (570 nm en la patente '044). La reflectancia a 520-570 nm se relacionó con una longitud de onda estándar a 690 nm. Esta comparación se usó para compensar las diferencias en el color de fondo blanco del sustrato de la tira, que era celulosa blanca sobre un poliestireno blanco con una reflectancia > 60%, y se aproxima incoloro a longitudes de onda  $\gt \sim 690$  nm. El color de fondo blanco es particularmente sensible a la humedad y una pequeña cantidad puede causar un gran cambio en la relación de reflectancia. El fondo blanco también es sensible al color de la orina y pequeñas cantidades pueden causar grandes cambios en la relación de reflectancia. Como resultado, tal relación de reflectancia no se puede usar para medir con precisión la humedad después de sumergir la tira en la orina.

En la presente invención, se agrega un colorante de referencia infrarrojo que tiene una respuesta característica a la luz a una longitud de onda al menos 120 nm mayor que el rango de 520-570 nm. Se ha encontrado que la longitud de onda del colorante IR y la cantidad utilizada afectan la precisión de las mediciones al reducir la interferencia de fondo. La adición de un colorante IR a los reactivos de leucocitos proporciona un color de fondo inferior de  $\leq 60\%$  de reflectancia a  $\geq 700$  y 2500 nm. Este fondo inferior reduce el efecto del color de la orina en la relación de reflectancia, pero no el efecto de la humedad. Por lo tanto, la relación de reflectancia se puede usar para medir con precisión la humedad después de sumergir una muestra en orina.

Sin embargo, este color de fondo inferior de  $\leq 60\%$  de reflectancia a  $\geq 700$  y 2500 nm puede reducir la capacidad de los reactivos para detectar la hidrólisis de sustratos proteolíticos. Este efecto se muestra en la siguiente tabla, donde el efecto del color de fondo del sustrato reactivo se reduce a medida que aumenta la cantidad de colorante IR. La cantidad de colorante IR que un reactivo puede tolerar depende de la longitud de onda de referencia utilizada para medir el fondo, la longitud de onda de la señal de los sustratos, la sensibilidad del sustrato para la humedad y la sensibilidad del sustrato para la hidrólisis de la proteasa y la cantidad de señal de colorante de fondo  $< 700$  nm. La tolerancia de cualquier sustrato de hidrólisis dado se puede determinar como se muestra en la Tabla 1, donde la reducción deseada de la interferencia de fondo con respecto al color en la muestra ocurre a más de 0.2 mg/dL, o aproximadamente 0.5% en peso con relación al colorante de referencia. Sin embargo, cuando la cantidad de colorante se eleva tan alto como 20 mg/dL, la relación de reflectancia aumenta a 1.6 y la señal se reduce de la señal de -1.0 esperada. Por lo tanto, la cantidad de colorante utilizada debe limitarse a la necesaria para minimizar la interferencia de fondo.

## ES 2 707 743 T3

Tabla 1		
Colorante (1) mg/dL	Relación de reflectancia 570/690 nm (2)	Interferencia de Fondo (3)
20	1.649	3%
2	1.042	4%
0.2	0.976	5%
0.02	0.967	22%
0	0.964	45%

1) DTO 141, que es el colorante 3 en la Tabla 2 del documento US 6,316,264 y tiene el nombre químico 3-(5-carboxipentil)-2-[2-[3-[[3-(5-carboxipentil)-1,3-dihidro-1,1-dimetil-2H-benz[e]indol-2-ilideno]etiliden)-2-(n-hexiltio)-1-ciclohexen-1-il] etenil]-1, 1-dimetil-1H-benz[e]indolio, sal interna.

(2) Reacción a 42 células/uL de leucocitos en la orina en orina de gravedad específica media y se mide con el instrumento CLINITEK Status® (Siemens Healthcare Diagnostics).

(3) Diferencia entre la orina clínica marrón altamente coloreada y una orina amarilla típicamente coloreada. Ambas orinas carecían de leucocitos y se midieron con el instrumento CLINITEK Status®.

En el experimento anterior, el reactivo de leucocitos se preparó a partir de dos saturaciones secuenciales de papel de filtro. La primera saturación fue con una mezcla acuosa que contenía ácido bórico, Bio-Terge AS40, polímero de PVP y NaCl para controlar la fuerza iónica. El pH de la mezcla se ajustó a 8.8 a 9.3 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico.

5 La segunda saturación fue una mezcla de disolvente acetona/DMSO que contenía DNSA, PPTA, decanol y ácido bórico. Las funciones de cada ingrediente, la concentración preferida y el rango permitido se dan en la Tabla a continuación. Las soluciones de la mezcla se utilizaron para saturar el papel de filtro, en este caso el papel de filtro Ahlstrom de grado 205C, y el papel se secó a 121°C durante 9 minutos después de la primera saturación, y a 100°C durante 7 minutos después de la segunda saturación. El reactivo seco resultante se procesó en tiras de reactivo que

10 se probaron con el instrumento CLINITEK Status®.

Tabla 2

Ingrediente	Función	Concentración preferida usada	Rango Permitido
1ª Aplicación			
Agua	Solvente	1000 mL	---
NaCl	Agente de fuerza iónica	14.6 g	1-30 g/L
Bio-Terge AS40	Tensioactivo	2g	0-4 g/L
Ácido bórico	Regulador	24.7g	5-35 g/L
PVP	Polímero	20.0g	5-50 g/L
2ª Aplicación			
Acetona	Solvente	955 mL	---

## ES 2 707 743 T3

Ingrediente	Función	Concentración preferida usada	Rango Permitido
1ª Aplicación			
DMSO	Solvente	30 mL	10-60 mL
DNSA	Indicador de diazonio	0.174g	0.050-0.5 g/L
PPTA	Sustrato de enzima	0.422g	0.10-0.8 g/L
Decanol	Activador de enzimas	15 mL	5-40 ml/L
Ácido Bórico	Regulador	0.5 g	0-3.0 g/L
DNSA = ácido 1-diazo-2-naftol-4-sulfónico			
PPTA = éster 2-hidroxi-5-fenil-pirrol-N-tosil-L-alanina			

Se podrían usar diversos colorantes, incluidos los descritos en la Patente de Estados Unidos 6,316,264 y que tienen una absorbancia característica en la región infrarroja de aproximadamente 700 a aproximadamente 2500 nm. Los ejemplos incluyen compuestos de ftalocianina y naftalocianina, colorantes complejos metálicos (por ejemplo, colorantes complejos de ditoleno metal) y colorantes de polimetina, incluyendo colorantes de cianina. Otros colorantes incluyen los colorantes di y trifenilmetano, los colorantes de quinona, los colorantes azoicos y los colorantes de transferencia de carga y de resonancia de carga. Su característica común es que la reflectancia de la luz en una longitud de onda única se mide al menos 120 nm por encima de la longitud de onda del reactivo. En relación con los reactivos de leucocitos discutidos anteriormente, el colorante debe tener una reflectancia característica de al menos 700 nm, preferiblemente por encima de 700 y menos de 2500 nm.

Aunque la inclusión del colorante de referencia con los reactivos de leucocitos es una realización preferida, también es posible colocar el colorante de referencia en otra ubicación, como se hizo con el propósito de alinear una tira reactiva (Estados Unidos 6,316,264). Los cambios debidos a la humedad que se producen cuando el colorante entra en contacto con la muestra pueden diferir de los que se producen cuando el colorante está dentro de los reactivos. Sin embargo, estas diferencias pueden ser acomodadas por aquellos familiarizados con el arte.

### Detección de contaminación por humedad en una tira de prueba de leucocitos

Como se mencionó anteriormente, la humedad hace que los reactivos de los leucocitos se degraden y produzcan un falso cambio de color. Las enzimas en los leucocitos no son necesarias para hidrolizar el sustrato proteolítico, por ejemplo PPTA. Se ha encontrado que los reactivos son sensibles a tan solo 0.1% de humedad en una almohadilla de reactivo de leucocitos. La tasa de cambio de color es esencialmente directamente proporcional a la cantidad de agua presente. La importancia del control de la humedad es evidente cuando, después de 10 minutos de exposición a >60 Humedad Relativa, la prueba proporciona resultados positivos falsos.

Esta sensibilidad a la humedad se usa en la invención para determinar si una almohadilla de reactivo ha sido contaminada con humedad. El cambio de color se determina primero unos 20 segundos después de que se haya aplicado una muestra de orina. Si se detecta color después de 20 segundos, se sospecha que hay contaminación por humedad. Esto se confirma si el color no ha aumentado significativamente después de 60 segundos, es decir, la actividad de los reactivos se ha reducido. Este método se confirmó en un experimento en donde las tiras reactivas se expusieron a 30°C a 80% de humedad durante 10 minutos, condiciones que se sabe causan la falla de los reactivos. Se encontró que veintitrés de veinticuatro tiras fallaron cuando se usó la relación de la reflectancia a 520 nm a la

reflectancia a 820 nm. La cantidad de colorante DTO 141 aplicada fue de 0.2 mg/dL, en relación con 42 mg/dL de PPTA de los reactivos de leucocitos. Un experimento paralelo en donde solo se midió la reflectancia a 520 nm, es decir, sin colorante presente, no detectó tiras contaminadas con humedad en el 42% de las tiras, esto también fue cierto cuando se usó una relación de reflectancia de 520 nm/870 nm, pero sin colorante presente.

- 5 La influencia del color en la muestra de orina también se explica en el método de la invención. El color de la muestra se mide por la absorbancia de la luz a aproximadamente 460 nm (dentro del rango visible). Con el fin de afectar la medición del color desarrollado por los reactivos de leucocitos, se determina una nueva proporción, es decir, la reflectancia a aproximadamente 460 nm (para el color de la muestra) dividida por la reflectancia a aproximadamente 625 nm. Esta proporción evita que se considere que las muestras de orina oscura están comprometidas con la
- 10 humedad. Si la relación (por 1000) es superior a 600, el color de la muestra es claro y la reflectancia es alta. Si es así, entonces se confirmará que la tira que se está probando está comprometida por la humedad si las relaciones de reflectancia a los 20 y 60 segundos indican que la tira responde de una manera anormal. Si la relación es inferior a 600, la muestra tiene un color oscuro que puede haber afectado los resultados y la tira no se rechazará si los resultados a los 20 y 60 segundos han sido satisfactorios.
- 15 La diferencia entre la relación de reflectancia a 525 nm y la reflectancia a 825 nm tomada a los 20 y 60 segundos después de aplicar una muestra se usa para determinar si los reactivos han sido degradados por la humedad. En general, si la primera lectura (20 segundos) proporciona una relación de menos de aproximadamente 700 (relación x 1000), entonces se indica el exceso de humedad ya que la reflectancia a 525 indica que ya se ha desarrollado un color significativo. Si la segunda lectura se toma a los 60 segundos y se compara con la primera lectura y la diferencia en
- 20 las lecturas es menor que aproximadamente 50 (relación x 1000), entonces se confirma la presencia de exceso de humedad, ya que los reactivos han perdido su actividad normal.

Por ejemplo, se miden tres valores cuando los reactivos incluyen PPTA y DNSA y el colorante de referencia es DTO 141.

Tabla 3

	Relación, nm	Tiempo	Relación de valor crítico x 1000	Significado
L <sub>20</sub>	525/845	20 segundos	< 700	Alta absorción. Probable exceso de humedad
L <sub>60</sub>	525/845	60 segundos	L <sub>20</sub> - L <sub>60</sub> < 50	Humedad que reduce actividad del reactivo.
H	470/625	40 y 60 segundos	> 600	Muestra de alta reflectancia de color claro

- 25 La aplicación de esos valores a las lecturas de acuerdo con el procedimiento que se muestra en la Figura 1 permite el rechazo de los resultados como humedad comprometida o para informar leucocitos medidos en la muestra. En un ejemplo, se utiliza un instrumento CLINITEK Status® para analizar la muestra de orina en busca de la presencia de leucocitos. Una tira absorbente (por ejemplo, papel de filtro) saturada con soluciones de reactivos como se describe
- 30 anteriormente en la Tabla 2 tiene una muestra de orina aplicada y los cambios de color resultantes se miden mediante la reflectancia de la luz en el instrumento CLINITEK Status® de acuerdo con el procedimiento de la invención.
- Si el valor medido de L<sub>20</sub>-L<sub>60</sub> es menor que 50, es posible que la humedad excesiva reduzca la actividad del reactivo leucocitario. Si está por encima de 50, entonces el valor de L<sub>20</sub>-L<sub>60</sub> se puede usar para calcular la concentración de leucocitos en la muestra. Sin embargo, incluso si está por debajo de 50, la relación de 525/845 nm todavía puede ser
- 35 capaz de proporcionar una concentración de leucocitos. Se considera el valor inicial de la relación 525/845 nm (L<sub>20</sub>). Si el valor es inferior a 700 (relación x 1000), se indica una alta absorción de luz a 525 nm, lo que sugiere que puede haber un exceso de humedad en la almohadilla de prueba. Combinado con el resultado de L<sub>20</sub>-L<sub>60</sub>, es probable que los reactivos de los leucocitos se hayan visto comprometidos por el exceso de humedad. Pero, dado que los resultados pueden haber sido influenciados por una muestra inusualmente oscura, se mide la relación H, 470/625 nm. Si el
- 40 resultado es superior a 600 (relación x 1000), se indica una alta reflectancia, lo que significa que la muestra no tiene un color alto. Si es así, entonces se considera que los reactivos de leucocitos han sido comprometidos por la alta humedad. Si la muestra es oscura, es decir, la proporción crítica H es inferior a 600, pero los valores determinados previamente de L<sub>20</sub>-L<sub>60</sub> y L<sub>20</sub> eran aceptables, entonces se considera que la muestra no está comprometida y se calcula el contenido de leucocitos.
- 45 Debe entenderse que las longitudes de onda de luz específicas y los tiempos de medición que se acaban de describir son útiles para determinar la presencia de leucocitos en muestras de orina con las cantidades de los reactivos descritos. Sin embargo, el método tiene una aplicación más general a muchos otros reactivos que son sensibles a la

humedad y aún se utilizan para detectar muestras que contienen agua. Los expertos en la técnica deberían establecer fácilmente protocolos de detección apropiados después de haber revisado la invención descrita por los presentes inventores.

- 5 Como se ilustra arriba, el instrumento Clinitek Status® es útil para llevar a cabo el método de la invención. Los aspectos de ese instrumento se describen en las Patentes de Estados Unidos 6,239,445; 5,877,863; 5,477,326; y 5,408,535. El instrumento Clinitek Status® es un espectroscopio de reflectancia en donde una tira de prueba que lleva una muestra es iluminada por una fuente de luz y la luz reflejada en la tira de prueba se detecta y se usa para determinar la presencia y la cantidad de analito en la muestra. El funcionamiento de los espectrofotómetros también se discute en la Patente de Estados Unidos 6,316,264, mencionada anteriormente. Como se indica en el mismo, un instrumento de
- 10 tipo cámara, que crea una imagen multipíxeles también puede usarse para llevar a cabo el método de la invención.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar el exceso de humedad en una tira reactiva que emplea reactivos sensibles a la humedad e incluye un colorante de referencia infrarrojo, comprendiendo el método:
  - 5 (a) medir la reflectancia de la luz en una primera longitud de onda que está en el rango de 520 a 570 nm y en una segunda longitud de onda que está en el rango de 700 nm a 2500 nm y al menos 120 nm mayor que la primera longitud de onda y es una longitud de onda característica del colorante de referencia infrarrojo en un primer tiempo predeterminado que está dentro de los 20 segundos posteriores al contacto del reactivo sensible a la humedad con una muestra que contiene agua;
  - 10 (b) medir la reflectancia de la luz en la primera longitud de onda y la segunda longitud de onda en un segundo tiempo predeterminado que es al menos 40 segundos después de la primera medición de la reflectancia;
  - (c) calcular una primera relación de las mediciones de reflectancia en (a) y una segunda relación de las mediciones de reflectancia en (b);
  - (d) determinar un nivel de actividad del reactivo entre el primer y el segundo tiempo predeterminado comparando la primera relación y la segunda relación calculada en (c);
  - 15 (e) cuando el nivel de actividad del reactivo determinado en (d) está en o por encima del nivel esperado, determinar una concentración de un analito en la muestra; y
  - (f) cuando el nivel de actividad del reactivo determinado en (d) es menor que el nivel esperado:
    - 20 (1) medir la reflectancia de la luz en una tercera longitud de onda que está en la región azul del espectro de luz visible a aproximadamente 470 nm y una cuarta longitud de onda que está en una región roja del espectro de luz visible a aproximadamente 625 nm;
    - (2) calcular una tercera proporción de las mediciones de reflectancia en (f)(1);
    - (3) basándose en la tercera proporción, determinar si una causa principal de la actividad inferior a la esperada se debe a un color de la muestra o una humedad reducida sensiblemente del reactivo sensible a la humedad;
    - 25 (4) cuando se determina en (f)(3) que la causa principal es el color de la muestra, que determina la concentración de un analito en la muestra; y
    - (5) cuando se determina en (f)(3) que la causa principal es la humedad reducida sensiblemente del reactivo sensible a la humedad, rechazando el reactivo sensible a la humedad por estar comprometido con la humedad.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho reactivo sensible a la humedad se basa en esterasas que hidrolizan los ésteres derivados.
- 30 3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha muestra es orina y dicho analito son leucocitos.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho reactivo sensible a la humedad se basa en sustratos proteolíticos utilizados para detectar inhibidores de proteasa.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la muestra es orina y dicho analito son inhibidores de tripsina en orina.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en donde cada uno de (a) a (f)(5) se realiza mediante un aparato de inspección óptica, preferiblemente mediante un espectroscopio de reflectancia o un instrumento tipo cámara que crea una imagen de múltiples píxeles.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el primer tiempo predeterminado es inmediatamente después de que el reactivo sensible a la humedad se haya puesto en contacto con la muestra.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la segunda longitud de onda es de aproximadamente 825 nm.

