

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 633**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014 PCT/US2014/022447**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159193**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 14712547 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2972275**

54 Título: **Sensor de hemólisis de sangre entera**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361782166 P

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

25.02.2020

73 Titular/es:

**INSTRUMENTATION LABORATORY COMPANY
(100.0%)
180 Hartwell Road
Bedford, MA 01730, US**

72 Inventor/es:

**BALASUBRAMANIAN, SHANKAR y
D'ORAZIO, PAUL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 744 633 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

Sensor de hemólisis de sangre entera

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un sensor de hemólisis, un sistema de sensor de hemólisis y métodos para utilizar el sensor de hemólisis o el sistema de sensor de hemólisis para controlar o detectar hemólisis en una muestra, tal como una muestra de sangre entera, una muestra de plasma, una muestra de suero o muestra de sangre hemolizada, y evaluar la contribución de la hemólisis a los niveles de electrólitos, p. ej., potasio, en la muestra.

Antecedentes

10 La concentración de analitos en la sangre entera, es decir, las fracciones celular y líquida de la sangre, combinadas, puede diferir cuantitativamente, de modo significativo, de la concentración de analitos que se encuentra dentro de los glóbulos rojos. Por ejemplo, en la sangre entera los niveles de potasio suelen ser aproximadamente 4,0 mM, mientras que la concentración de potasio en los glóbulos rojos suele ser aproximadamente 150 mM.

15 Durante la extracción y manipulación de sangre entera de un paciente pueden resultar dañadas físicamente algunas células, en particular glóbulos rojos, ocasionando la ruptura del glóbulo rojo. El fenómeno de la ruptura de los glóbulos rojos es conocido como "hemólisis". Cuando se produce hemólisis en una muestra de sangre entera, el contenido de los glóbulos rojos se entremezcla con el contenido de la fracción de la sangre entera sin células, a la que se denomina plasma o, en algunos casos, suero. La hemoglobina, un componente de la sangre entera que normalmente se encuentra dentro de los glóbulos rojos, pero no libre en la fracción líquida de la sangre, y otros elementos intracelulares, p. ej., el potasio, son liberados desde el compartimento intracelular de los glóbulos rojos hacia la fracción líquida de la sangre, es decir, el plasma o suero.

20 Dado que la concentración de potasio dentro de los glóbulos rojos es 25-75 veces superior a la concentración de potasio en el plasma normal, la medición del potasio en la fracción líquida de una muestra de sangre hemolizada de un paciente inducirá un artefacto, por ejemplo una elevación medida artificialmente del nivel plasmático real de potasio en el paciente. La concentración de potasio en la fracción líquida de la sangre no hemolizada es un importante indicador de numerosas afecciones. Una sobreestimación de la concentración de potasio en la sangre hemolizada puede dar lugar a que se trate al paciente por hipercalemia (potasio en sangre elevado) cuando puede ser que el paciente presente realmente una baja concentración de potasio en una muestra de sangre del paciente no hemolizada. Desafortunadamente, simplemente un número relativamente pequeño de glóbulos rojos rotos puede dar como resultado un nivel de potasio en sangre artificialmente elevado.

30 Cuando una muestra de sangre se ha hemolizado, además de un potasio plasmático elevado, también otros analitos, tales como la lactato deshidrogenasa, la fosfatasa ácida, la aspartato aminotransferasa y la alanina aminotransferasa, por ejemplo, están presentes en concentraciones más elevadas en los glóbulos rojos que en la fracción líquida de la sangre, y estos analitos pueden encontrarse artificialmente elevados en la sangre hemolizada.

35 Los métodos actuales para detectar la hemólisis en una muestra de sangre de un paciente incluyen centrifugar la muestra de sangre para eliminar las células sanguíneas y después, mediante métodos ópticos, determinar la presencia de hemoglobina en la fracción plasmática. La hemoglobina confiere un color rosado o rojo al plasma, mientras que el color de una muestra de sangre no hemolizada es, de ordinario, ligeramente amarillo. Ningún método actual trabaja sobre sangre entera, sin filtrar ni centrifugar, para determinar la hemólisis. El documento WO02097419 describe un sistema de este tipo, pero no para hemólisis.

Compendio de la invención

40 En un aspecto, la invención proporciona un sistema de sensor electroquímico para detectar hemólisis en una muestra de sangre entera, que comprende un sensor electroquímico de hemólisis que tiene una membrana externa que comprende un grosor en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 μm para intensificar el flujo saliente de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), otra membrana que comprende una enzima oxidoreductasa generadora de peróxido de hidrógeno y una cámara de flujo sin reactivo, dispuesta adyacente a la membrana externa para poner en contacto la muestra de sangre entera con la membrana externa del sensor. El grosor de la membrana externa está adaptado para intensificar el flujo saliente de peróxido de hidrógeno. En una realización, la membrana externa comprende un hidrogel que comprende un contenido de agua en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 100%. En una realización, la enzima oxidoreductasa comprende una glucosa oxidasa o una lactato oxidasa, o una mezcla de enzimas que comprende una creatininas y/o creatinasa y una sarcosina oxidasa.

55 En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar hemólisis en una muestra de sangre entera que comprende introducir la muestra de sangre entera en un sensor electroquímico. El sensor electroquímico comprende una pluralidad de membranas o capas. En la pluralidad de membranas del sensor electroquímico, una de la pluralidad de membranas comprende una capa intermedia que comprende una enzima oxidoreductasa o una mezcla de enzimas que funciona como una oxidoreductasa, capaz de generar peróxido de hidrógeno. Otra de la

5 pluralidad de membranas comprende una membrana externa que está en contacto con la muestra de sangre y que es permeable e intensifica el flujo saliente de peróxido de hidrógeno. Aún otra de la pluralidad de membranas comprende una membrana interna. La introducción de la muestra de sangre entera en el sensor electroquímico de hemólisis va seguida de la detección de una señal electroquímica generada por el peróxido de hidrógeno en presencia de Hb(Fe²⁺), siendo una disminución de la corriente eléctrica detectable en el intervalo de 4% a 50%, en comparación con una muestra de sangre entera no hemolizada, indicativa de hemólisis en la muestra de sangre entera. La enzima oxidoreductasa comprende una glucosa oxidasa o una lactato oxidasa, o una mezcla de enzimas que comprende una creatinasa y/o creatinasa y una sarcosina oxidasa.

10 Se describe un método para determinar si un nivel elevado de un analito en una muestra de sangre entera de un paciente es un artefacto relacionado con la hemólisis. El método comprende introducir la muestra de sangre entera del paciente en el sensor electroquímico de hemólisis descrito en la presente memoria. El sensor de hemólisis comprende una enzima oxidoreductasa capaz de generar peróxido de hidrógeno. El sensor de hemólisis también comprende una membrana externa que comprende un grosor en el intervalo de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 50 µm. El grosor de la membrana externa está adaptado para intensificar el flujo saliente de peróxido de hidrógeno. Una vez introducida la muestra de sangre entera en el sensor electroquímico, se detecta una señal electroquímica generada por el peróxido de hidrógeno en presencia de hemoglobina (Hb(Fe²⁺)). Una disminución de la corriente eléctrica detectable en el intervalo de aproximadamente 4% a aproximadamente 50%, en comparación con una muestra de sangre entera no hemolizada estándar, es indicativa de hemólisis como causa del nivel elevado del analito en la muestra de sangre entera del paciente.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra un sistema de sensor electroquímico ilustrativo que abarca una tarjeta para sensores ilustrativa y un banco de sensores en un conjunto de sensor, que incluye un sensor de hemólisis (mostrado en la Figura 2), según una realización de la invención.

25 La Figura 2 muestra una vista frontal del reverso de la tarjeta para sensores ilustrativa que incluye el sensor de hemólisis en el banco de sensores dentro del conjunto de sensor, tal como se muestra en la Figura 1, según una realización de la invención.

La Figura 3 muestra una vista en corte del sensor de hemólisis ilustrativo mostrado en la Figura 2, según una realización de la invención.

30 La Figura 4 muestra otra vista en corte del sensor de hemólisis ilustrativo mostrado en la Figura 2, según una realización de la invención.

La Figura 5 muestra una vista en corte de la capa compuesta del sensor de hemólisis ilustrativo mostrado en la Figura 2, según una realización de la invención.

La Figura 6 muestra otra realización del sensor de hemólisis con una capa enzimática ilustrativa de glucosa oxidasa.

35 La Figura 7 es un gráfico que muestra la actividad de tipo peroxidasa de la hemoglobina en un sensor de hemólisis que comprende una capa enzimática ilustrativa de glucosa oxidasa conforme a la invención. En la Figura 7, el eje x representa el tiempo en segundos y el eje y representa la intensidad de corriente en amperios.

La Figura 8A es un gráfico que muestra la respuesta de un sensor ilustrativo de hemólisis, que tiene una capa enzimática de glucosa oxidasa según una realización de la invención, frente a plasma de sangre lisada. En la Figura 8A, el eje x representa el tiempo en segundos y el eje y representa la intensidad de corriente en amperios.

40 La Figura 8B es un gráfico que muestra que la respuesta del sensor de hemólisis representado en la Figura 8A, frente a plasma de sangre lisada, es lineal. En la Figura 8B, el eje x representa la hemoglobina plasmática (g/dL) y el eje y representa la intensidad de corriente en nanoamperios.

45 La Figura 9A es un gráfico que muestra un perfil en tiempo real de la corriente generada por un sensor de hemólisis ilustrativo conforme a la invención, para muestras de sangre entera y hemolizada. En la Figura 9A, el eje x representa el tiempo en segundos y el eje y representa la intensidad de corriente en amperios.

La Figura 9B es un gráfico que muestra la respuesta del sensor de hemólisis ilustrativo, representado en la Figura 9A, frente a distintos porcentajes en volumen de sangre lisada. En la Figura 9B, el eje x representa la sangre lisada (% vol./vol.) y el eje y representa la intensidad de corriente en nanoamperios.

50 La Figura 9C es un gráfico que muestra la región lineal de la gráfica de calibración generada por el sensor de hemólisis de las Figuras 9A y 9B, que comprende una capa enzimática ilustrativa de glucosa oxidasa. En la Figura 9C, el eje x representa la sangre lisada (% vol./vol.) y el eje y representa la intensidad de corriente en nanoamperios.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la influencia esperada de la pO₂ sobre la respuesta del sensor de hemólisis que comprende una capa enzimática ilustrativa de glucosa oxidasa, conforme a la invención. En la Figura 10, el eje x

representa la presión parcial de oxígeno (pO_2) en mmHg y el eje y representa la intensidad de corriente en amperios.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un sensor de hemólisis, un sistema de sensor de hemólisis y métodos para utilizar el sensor de hemólisis o el sistema de sensor de hemólisis para controlar o detectar hemólisis en una muestra, tal como una muestra de sangre entera, una muestra de plasma, una muestra de suero, o sangre hemolizada, y evaluar la contribución de la hemólisis a los niveles de analitos, p. ej., potasio, en la muestra de sangre.

En pocas palabras, un sensor de hemólisis y un método para detectar hemólisis, descritos en la presente memoria, aprovechan la permeabilidad membranal a H_2O_2 . En la presente memoria, permeabilidad membranal se refiere a la cualidad, descrita con mayor detalle en lo que sigue, de una membrana (p. ej., una membrana externa del sensor de hemólisis) del sensor de hemólisis para permitir con facilidad que el peróxido de hidrógeno entre y salga a través de la membrana. En la presente memoria, la permeabilidad membranal se puede ajustar, por ejemplo, mediante el contenido de agua de la membrana externa del sensor de hemólisis. Una membrana con contenido de agua más elevado presenta mayor permeabilidad para el peróxido de hidrógeno, en comparación con una membrana con menor contenido de agua. Preferiblemente, el contenido de agua en la membrana para el sensor de hemólisis conforme a la invención se sitúa en el intervalo de aproximadamente 30 a 100%.

Tal como se usa en la presente memoria, la permeabilidad membranal incluye también la permeabilidad selectiva de la membrana. Por ejemplo, una membrana de rechazo de interferencia en el sensor de hemólisis permite selectivamente que el peróxido de hidrógeno pase fácilmente a través de la membrana, pero actúa como una barrera contra la permeabilidad de otras sustancias, p. ej., sustancias interferentes. Tal como se usa en la presente memoria, la permeabilidad membranal selectiva también incluye la capacidad de una o más membranas del sensor de hemólisis (p. ej., la membrana externa) de permitir que algunas partículas pasen libremente a través de la membrana (p. ej., el peróxido de hidrógeno), mientras que retardan o impiden por completo el paso de otras sustancias, por ejemplo, una molécula de proteína de la muestra de sangre entera.

Según una realización de la invención, el sensor de hemólisis aprovecha la actividad *de tipo peroxidasa* de la hemoglobina extracelular (en adelante denominada "hemoglobina", salvo que se describa específicamente otra cosa) en una muestra de sangre entera. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se genera a partir de un sustrato (p. ej., glucosa sanguínea) cuando el sustrato (p. ej., glucosa sanguínea) reacciona con una enzima oxidoreductasa (p. ej., glucosa oxidasa) en presencia de un gas (p. ej., oxígeno) y el H_2O es captado por la hemoglobina extracelular presente en la fracción líquida de la muestra de sangre entera.

En la presente memoria, "captado" se refiere a la descomposición o escisión del H_2O_2 por la hemoglobina, para dar componentes más pequeños, cuando el H_2O_2 entra en contacto con hemoglobina en el sensor de hemólisis.

La descomposición o escisión del peróxido de hidrógeno, inducida por hemoglobina, para dar componentes más pequeños genera un gradiente de difusión de peróxido de hidrógeno en el sensor de hemólisis, que hace que el peróxido de hidrógeno se difunda preferiblemente desde una membrana del sensor de hemólisis que genera peróxido de hidrógeno, p. ej. la membrana enzimática intermedia, descrita con mayor detalle en lo que sigue, a través y hacia la superficie externa de la membrana externa, que está en contacto con la hemoglobina extracelular de la muestra de sangre introducida en el sensor de hemólisis.

La acción captadora que realiza la hemoglobina en el sensor de hemólisis reduce la disponibilidad de H_2O_2 necesaria para la oxidación en el electrodo de trabajo, p. ej., un electrodo de platino, en comparación con la situación que se da cuando la hemoglobina está ausente del sensor de hemólisis. Por lo tanto, en presencia de hemoglobina en el sensor de hemólisis, el electrodo de trabajo genera menos corriente en comparación con una muestra de sangre que no está hemolizada.

Es importante señalar que solamente la hemoglobina extracelular (fuera de los glóbulos rojos) en el plasma o suero reacciona con peróxido de hidrógeno y produce señal de hemólisis. La hemoglobina dentro de los glóbulos rojos no tiene efecto sobre el sensor de hemólisis.

Se describe un sensor de hemólisis útil para evaluar si un aumento en la concentración de diversos analitos en una muestra de sangre de un paciente, por ejemplo, potasio, creatinina o magnesio, que presentan concentraciones intracelulares mayores que la concentración de los mismos analitos en la fracción líquida de la sangre entera, se debe a hemólisis en la muestra de sangre, es decir, pérdida de integridad de los glóbulos rojos, o bien se debe a alguna anomalía fisiológica en el paciente de quien se ha tomado la muestra de sangre. La Tabla 1 siguiente es ilustrativa del efecto de los glóbulos rojos lisados sobre la concentración extracelular de potasio, un analito que presenta una elevada concentración intracelular en glóbulos rojos intactos.

Tabla 1

Sangre lisada, % (v/v)	K ⁺ , mmol/L
0	3,9
1	4,7
2	5,3
3	6,1
4	6,8
5	7,5
7,5	9
10	10,8

El sensor de hemólisis conforme a la invención puede determinar si un aumento en los niveles de un analito, por ejemplo potasio, en la sangre entera se debe a la hemólisis de la muestra de sangre entera o a otras causas no especificadas, que pueden requerir otra terapia. Por tanto, se puede correlacionar la hemólisis de una muestra de sangre entera con alteraciones, típicamente un aumento en la concentración de analitos tales como potasio, creatinina o magnesio, en una muestra de sangre entera. Así pues, en un aspecto, la invención está dirigida a un sensor de hemólisis o sistema de sensor de hemólisis para detectar la presencia de hemoglobina extracelular en presencia de los elementos celulares de una muestra de sangre entera, y correlacionar niveles extracelulares incrementados de analitos en una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de sangre entera, con hemólisis en la muestra de sangre.

Generalmente, el sensor de hemólisis descrito en la presente memoria es un componente, por ejemplo un componente sustitutivo, de un sistema electroquímico 8 ilustrativo, representado en la Figura 1, que se describe con mayor detalle a continuación.

15 Sistema de sensor electroquímico

Haciendo referencia a la Figura 1, en una realización conforme a la invención un sistema 8 de sensor electroquímico utiliza un conjunto de sensor, señalado de modo general como 10, que incorpora una pluralidad de electrodos, entre ellos un sensor 110 de hemólisis, mostrado en la Figura 2, adaptados para realizar mediciones eléctricas en una muestra, tal como una muestra de sangre, p. ej. una muestra de sangre entera, introducida en el conjunto 10 de sensor. Otros electrodos de la pluralidad de electrodos pueden incluir uno o varios 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina, 93 de pCO₂, 94 de pH, 90 de K⁺, 86 de Ca⁺⁺, 78 de Na⁺ y 70 de pO₂. Las muestras de sangre entera a analizar por el sistema 8 son dirigidas hacia una superficie externa 200 de una membrana externa 51, que se describe a continuación con mayor detalle en lo que sigue, del sensor 110 de hemólisis. En una realización de la invención, se introducen muestras de sangre, p. ej. sangre entera a analizar por el sistema 8, a través de una entrada 13a para muestras. Las muestras de sangre se obtienen, por ejemplo, mediante una jeringa, un tubo, un sistema de tubo evacuado, por punción venosa, por flebotomía, o bien se obtienen periódicamente de un circuito de circulación sanguínea extracorpórea conectado a un paciente durante, por ejemplo, una cirugía a corazón abierto. Las muestras de sangre entera son introducidas en un canal 56 de sensor, en contacto con una superficie externa 200 de una membrana externa 51, a través de la entrada 13a para muestras o por otros medios automáticos, o bien de manera manual, por ejemplo mediante una jeringa. Como alternativa, las muestras de sangre completa pueden ser introducidas como muestras discretas, tal como se ilustra en la Figura 2. No se someten en absoluto a centrifugación las muestras de sangre entera, ni antes ni durante el análisis de la muestra de sangre entera en busca de hemólisis, en el sensor 110 de hemólisis.

Haciendo referencia a la Figura 2, en una realización de la invención el sensor 110 de hemólisis comprende una cámara libre de reactivos, por ejemplo, el canal 56 de sensor. La cámara 56 libre de reactivos resulta ventajosa por que el sensor 110 de hemólisis no requiere añadir ningún reactivo colorimétrico ni otro reactivo a la muestra de sangre entera para medir la hemoglobina, ni antes ni durante el análisis de la sangre entera, en busca de hemólisis, en el sensor 110 de hemólisis.

Continuando en referencia a las Figuras 1 y 2, en una realización de la invención el sistema electroquímico 8 incluye un cartucho desechable 37 (Figura 1). El cartucho 37 incorpora un conjunto 10 de sensor que incluye una pluralidad de sensores (ilustrados en la Figura 2), entre ellos un sensor 110 de hemólisis, adaptados para realizar mediciones eléctricas en una muestra, tal como una muestra de sangre, p. ej. una muestra de sangre entera, introducida en el

conjunto 10 de sensor. Otros electrodos de la pluralidad de sensores pueden incluir uno o varios 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina, 93 de pCO₂, 94 de pH, 90 de K⁺, 86 de Ca⁺⁺, 78 de Na⁺ y 70 de pO₂. En una realización, el cartucho 37 también incorpora una tarjeta 50 para sensores electroquímicos, que incluye el conjunto 10 de sensor.

5 Haciendo referencia a la Figura 1, el cartucho 37 contiene una tarjeta 50 para sensores (también denominada tarjeta de electrodos o tarjeta soporte), ilustrada por ejemplo en las Figuras 1-3, que incluye el conjunto 10 de sensor que proporciona una cámara estanca a los gases, de bajo volumen, en la cual la muestra, por ejemplo una muestra de sangre entera, solución de referencia interna o una solución que contiene monómero, es presentada a uno o varios sensores electroquímicos, p. ej. sensor 110 de hemólisis, 94 de pH, 93 de pCO₂, 70 de pO₂, 78 de Na⁺, 86 de Ca⁺⁺, 10 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina y sensores de hematocrito.

Continuando en referencia a la Figura 1, se describe un sistema 8 de sensor electroquímico que incorpora en el cartucho 37 al menos tres recipientes preenvasados 14, 16 y 17, cada uno de los cuales contiene una solución de referencia interna que contiene valores conocidos de los parámetros a medir por el sistema 8. Cada uno de los recipientes preenvasados 14, 16 y 17 contiene una cantidad de su solución de referencia interna suficiente para 15 permitir calibrar los sensores del conjunto de sensor del sistema 8 un número sustancial de veces antes de que los recipientes preenvasados 14, 16, 17 se vacíen. Cuando uno o varios de los recipientes 14, 16 y 17 que contienen las soluciones de referencia internas están vacíos, se reemplaza el cartucho que contiene los recipientes preenvasados 14, 16 y 17.

Haciendo referencia a la Figura 2, cuando una muestra de sangre, tal como una muestra de sangre entera o un volumen de la solución de referencia interna, introducidos en el canal 56 de sensor, pasan a través del canal 56 de sensor hacia la sección 34 de salida, atraviesan diversos sensores, por ejemplo el sensor 110 de hemólisis, tal como se ilustra en la Figura 2. Por ejemplo, se pueden hacer pasar la muestra y/o la solución de referencia interna sobre el sensor 110 de hemólisis, un sensor 70 de pO₂, un sensor 78 de Na⁺, un sensor 86 de Ca⁺⁺, un sensor 90 de K⁺, un sensor 91 de glucosa, un sensor 92 de lactato, un sensor 93 de pCO₂, un sensor 94 de pH, 20 sensores 98, 100, de hematocrito, un sensor 116 de creatinina y un sensor 118 de creatina.

Todavía en referencia a la Figura 1, el cartucho 37 incluye también un recipiente 28 para una solución que rodea a un electrodo de referencia. El recipiente 28 está conectado al conjunto 10 de sensor por una línea 30 de flujo. El sistema incluye además un recipiente 32 para desechos, que recibe las muestras de sangre, la solución de referencia interna y la solución para el electrodo 28 de referencia después de que hayan pasado a través del conjunto 10 de sensor. En una realización, el conjunto 10 de sensor envía estas muestras (p. ej., muestras de sangre) al recipiente 32 para desechos a través de un conducto flexible 34. Todavía en referencia a la Figura 1, el sistema 8 de sensor electroquímico se forma al insertar en el sistema 8 de sensor electroquímico el cartucho 37, que aloja el conjunto 10 de sensor que incluye el sensor 110 de hemólisis. Cuando se inserta, el conjunto 10 de sensor encaja en un conjunto 39 de bloque calentador.

35 El conjunto 10 de sensor también puede tener varios conectores 36 de borde formando un banco, que permiten enchufarlo en un correspondiente conector hembra de la interfaz eléctrica 38, de manera que los electrodos formados en el conjunto 10 puedan estar conectados a un microprocesador 40 a través de una placa analógica 45. El microprocesador 40 está conectado a la válvula multipuerto 18, a través de un controlador 43 de válvula, por una línea 42, y al motor de la bomba peristáltica 26, a través de un controlador 45 de bomba, por una línea 44.

40 A modo de ejemplo, haciendo referencia a la Figura 2, en una realización la tarjeta 50 para sensores del conjunto 10 de sensor consiste en una tarjeta rectangular estructuralmente rígida, por ejemplo de poli(cloruro de vinilo) que tiene, por ejemplo, una placa 52 de cubierta rectangular, de aluminio (u otro material adecuado), adherida a una de sus superficies. En una realización de la invención, la placa 52 de cubierta tapa los canales 56 de flujo de sensor que introducen la muestra de sangre en las membranas de los sensores formados en una superficie de la tarjeta 50, y también actúa como medio de transferencia térmica para hidratar los sensores a través de ciclos de calor, y para 45 mantener los fluidos que fluyen a través del conjunto 10 de sensor, y los propios electrodos, a una temperatura constante durante la calibración y durante la medición de parámetros relevantes en una muestra de sangre entera de un paciente. En una realización, el canal de flujo para muestra carece de reactivos introducidos en la muestra, es decir, la cámara carece de reactivos. Esto se puede conseguir midiendo la temperatura de la placa 52 y utilizando un elemento calefactor o refrigerante adecuado, p. ej. un dispositivo y termistor 41 de efecto Peltier (Figura 1) para 50 mantener la temperatura de la placa 52 a la temperatura deseada.

La Figura 3 muestra el sensor 110 de hemólisis ilustrativo representado en la Figura 2, según una realización de la invención. El sensor 110 de hemólisis representado incluye una membrana compuesta 60 que comprende tres capas (en la presente memoria se emplean indistintamente los términos capa (o capas) y membrana (o membranas) para referirse a una membrana), descritas aquí comenzando con la capa que está en contacto con la muestra de sangre, es decir, una capa externa 51 (también denominada membrana externa), seguida de una capa intermedia 53 (también denominada capa enzimática o membrana enzimática) en contacto con la capa externa 51 por un lado de la capa intermedia 53, y en contacto con una capa interna por el lado contrario de la capa intermedia, capa interna 55 (también denominada membrana interna o capa de rechazo de interferencia) que se describirá a continuación con mayor detalle, estando la capa interna en contacto con la capa intermedia por un lado de la capa interna y con 60

un electrodo 57 de trabajo por el otro lado de la capa interna, electrodo 57 que está hecho de un metal, por ejemplo platino.

El sensor de hemólisis está dispuesto en el suelo del canal 56 de sensor, que es un canal de la tarjeta 50 para sensores (Figura 2). La tarjeta 50 para sensores proporciona un flujo estanco a los gases, de pequeño volumen, a través de la cámara en la que se presenta la muestra del paciente, por ejemplo, sangre entera (p. ej., sangre hemolizada), plasma o suero, a uno o varios sensores de la tarjeta 50, entre ellos, pero sin limitación, un sensor 110 de hemólisis (hemoglobina extracelular), 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina, 93 de pCO₂, 94 de pH, 90 de K⁺, 86 de Ca⁺⁺, 78 de Na⁺, 70 de pO₂. En una realización, el sensor 110 de hemólisis incluye un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

Haciendo referencia ahora a las Figuras 3-6, la membrana compuesta 60 del sensor 110 de hemólisis incluye una capa 53 que genera H₂O₂ mediante una reacción química (p. ej., una reacción enzimática). La membrana compuesta 60 comprende dos, tres o más membranas (o capas), por ejemplo una membrana externa (o capa externa) 51 dispuesta en contacto con el canal 56 de sensor, una membrana enzimática (o capa enzimática) 53 que comprende una enzima oxidoreductasa, tal como glucosa oxidasa, y una membrana interna 55 de rechazo de interferencia (o capa interna de rechazo de interferencia, o capa interna) en contacto con un electrodo de trabajo (Figuras 4-6).

Capa externa o membrana externa de la membrana compuesta del sensor de hemólisis

Haciendo referencia a la Figura 3, está dispuesta generalmente una membrana externa 51 sobre la superficie del sensor 110 de hemólisis, en contacto con la muestra de sangre entera del paciente, de la cámara 56 de flujo para muestra. La membrana externa 51 está constituida por un componente de poliuretano, por ejemplo, pero sin limitación, un poliéter-poliuretano alifático con un contenido de agua de aproximadamente 45-100%, lo que permite una fácil difusión del H₂O₂ a través de la superficie externa de la membrana externa 51 desde el interior del sensor 110 de hemólisis hacia la cámara 56 de flujo de sangre, donde el H₂O₂ se mezcla con la muestra de sangre entera.

En una realización de la invención, el grosor de la membrana externa 51 controla la velocidad de difusión del H₂O₂ desde la capa intermedia (p. ej., la capa enzimática 53, y la capa interna (p. ej., la capa 55 de interferencia), o el electrodo 57 de trabajo a través de la membrana externa 51, y por tanto, en una realización, el grosor de la membrana externa 51 del sensor 110 de hemólisis se elige basándose en la transferencia neta de H₂O₂ a través de la membrana externa 51, desde las regiones con alta concentración de H₂O₂ (p. ej., la capa enzimática 53, otras capas internas (p. ej., la capa 55 de interferencia) o el electrodo 57 de trabajo, hacia las de baja concentración de H₂O₂ (p. ej., la membrana externa 51).

En un sensor convencional 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO₂, el grosor de la membrana externa utilizada en estos sensores resulta desventajoso e inoperante para medir la hemólisis, ya que en estos sensores la permeabilidad al H₂O₂ de la membrana externa es baja, en comparación con la permeabilidad al H₂O₂ de la membrana externa del sensor 110 de hemólisis conforme a la invención descrito en la presente memoria. En consecuencia, la membrana externa del sensor convencional 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO₂ no permite la difusión del H₂O₂ a través de las membranas (es decir, desde las membranas internas hacia la membrana externa o a través de la membrana externa hacia la superficie de la membrana) y, por lo tanto, no funcionaría en el sensor de hemólisis descrito en la presente memoria. Como se difunde poco o nada de H₂O₂ desde las membranas internas hacia la membrana externa de los sensores convencionales 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO₂, no se produce disminución en la disponibilidad de H₂O₂, necesaria para la oxidación en el electrodo de trabajo, p. ej., un electrodo de platino, en comparación con el sensor 110 de hemólisis, en el cual se produce una disminución en la disponibilidad de H₂O₂, necesaria para la oxidación en el electrodo de trabajo, debido al aumento de la permeabilidad frente al peróxido de hidrógeno que caracteriza a la permeabilidad de la membrana externa del sensor de hemólisis según la invención. Por lo tanto, los sensores convencionales 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO₂ no proporcionan una disminución suficiente en la amplitud de la corriente, con independencia de que esté o no presente hemoglobina extracelular procedente de la sangre entera, en comparación con el sensor 110 de hemólisis, que proporciona una disminución suficiente en la amplitud de la corriente en presencia de hemoglobina extracelular procedente de la sangre entera.

Además, en el sensor convencional 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO₂, el grosor de la membrana externa utilizada en estos sensores también resulta desventajoso e inoperante en el sensor 110 de hemólisis por que la membrana externa convencional (en el sensor 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO₂) es menos permeable, en comparación con la membrana externa del sensor 110 de hemólisis, frente a sustratos (p. ej., glucosa) necesarios para generar peróxido de hidrógeno en el sensor 110 de hemólisis. En el sensor 110 de hemólisis es necesaria una generación suficientemente mayor de peróxido de hidrógeno, en comparación con la generación de peróxido de hidrógeno en el sensor convencional 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO₂, para que el sensor 110 de hemólisis detecte hemólisis.

Además, el sensor 110 de hemólisis que tenga una membrana externa del sensor convencional 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO₂, resulta inoperante para medir la hemólisis, ya que el grosor de la membrana externa proporcionada por el sensor convencional 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de

creatina, 116 de creatinina o 70 de pO_2 , si se utiliza en el sensor 110 de hemólisis, genera resultados erróneos con respecto a la disminución de la amplitud de la corriente en presencia de hemoglobina extracelular en la muestra de sangre entera, posiblemente debido a la baja permeabilidad de la membrana externa del sensor convencional 91 de glucosa, 92 de lactato, 118 de creatina, 116 de creatinina o 70 de pO_2 , respecto al H_2O_2 .

- 5 Se describe que el grosor de la membrana externa 51 del sensor 110 de hemoglobina se sitúa en el intervalo de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 100 μm , de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 90 μm , de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 80 μm , de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 70 μm , de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 60 μm , de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 50 μm , de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 40 μm , de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 30 μm , de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 20 μm , con preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 μm , con mayor preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 μm .

Se contempla que no se necesita la membrana externa 51, y la hemoglobina extracelular de la muestra de sangre entera hemolizada de un paciente permea la capa intermedia enzimática 53 e interactúa directamente con el H_2O_2 de la capa intermedia enzimática 53 del sensor 110 de hemólisis, en ausencia de la membrana externa 51.

- 15 En una realización, la membrana externa 51 comprende un hidrogel que tiene un contenido de agua en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 75%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 60%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, con preferencia de aproximadamente 40% a aproximadamente 70%, con mayor preferencia de aproximadamente 60% a aproximadamente 70%. También se contempla una membrana externa 5 que tiene un contenido de agua en el intervalo de 0-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% o 90-100%.

- 25 En una realización, la expansión lineal, definida como la expansión de un hidrogel cuando se empapa en agua, de la membrana externa 51 del sensor 110 de hemólisis se sitúa en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, o aproximadamente 100%, con preferencia de aproximadamente 15% a aproximadamente 65%, con mayor preferencia de aproximadamente 20% a aproximadamente 45%.

- 35 En una realización conforme a la invención, la capa 51 de membrana externa comprende un hidrogel constituido por un componente de poliuretano. Por ejemplo, la composición de la membrana externa es poliéter-poliuretano alifático con un contenido de agua de 45-100%.

- 40 En otra realización del sensor 110 de hemólisis, conforme a la invención, la viscosidad de la membrana externa 51 regula el grosor de la membrana externa 51. El grosor de la membrana controla la velocidad de difusión del H_2O_2 a través de la membrana externa 51. Por ejemplo, la viscosidad de la membrana externa 51 se sitúa en el intervalo de aproximadamente 0 a aproximadamente 10 Pa·s (10.000 centipoises (cP)), de aproximadamente 0 a aproximadamente 9 Pa·s (9.000 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 8 Pa·s (8.000 cP), de 0 a aproximadamente 7 Pa·s (7.000 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 6 Pa·s (6.000 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 5 Pa·s (5.000 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 4 Pa·s (4.000 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 3 Pa·s (3.000 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 2 Pa·s (2.000 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 1 Pa·s (1.000 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,9 Pa·s (900 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,8 Pa·s (800 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,7 Pa·s (700 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,6 Pa·s (600 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,5 Pa·s (500 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,4 Pa·s (400 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,3 Pa·s (300 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,2 Pa·s (200 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,1 Pa·s (100 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,09 Pa·s (90 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,08 Pa·s (80 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,07 Pa·s (70 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,06 Pa·s (60 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,05 Pa·s (50 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,04 Pa·s (40 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,03 Pa·s (30 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,02 Pa·s (20 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,01 Pa·s (10 cP), de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,001 Pa·s (1 cP), con preferencia de aproximadamente 0,01 Pa·s (10 cP) a aproximadamente 5 Pa·s (5.000 cP), con mayor preferencia de aproximadamente 0,01 Pa·s (10 cP) a aproximadamente 2,5 Pa·s (2.500 cP).

- 60 En otro ejemplo más, y haciendo referencia a las Figuras 4 y 5, la permeabilidad de la membrana externa 51 permite la difusión del H_2O_2 por el movimiento aleatorio de moléculas a través de distintas capas de membrana del sensor 110 de hemólisis, o permite el movimiento neto de H_2O_2 desde regiones de alta concentración, tales como la

membrana interna (p. ej., la membrana enzimática 53) hasta la membrana externa 51 o, como alternativa, desde la membrana externa 51 hacia la superficie 200 de la membrana externa 51 del sensor 110 de hemólisis. Por ejemplo, se produce difusión de peróxido de hidrógeno desde la capa enzimática 53 o la capa 55 de rechazo de interferencia, o desde el electrodo 57 de trabajo y su entorno, es decir, lo situado en estrecha proximidad al mismo, hacia la muestra de sangre entera en el canal 56. En otra realización, la permeabilidad de la membrana externa 51 no está saturada, ya que la concentración o gradiente de H₂O₂ cambia, es decir, la membrana externa 51 no está saturada con H₂O₂ ya que la concentración o gradiente de H₂O₂ cambia (es decir, aumenta o disminuye) desde la capa enzimática 53 o la capa 55 de rechazo de interferencia o desde el electrodo 57 de trabajo y su entorno, es decir, lo situado en estrecha proximidad al mismo, hacia la superficie externa 200 de la capa externa 51. En otra realización, la membrana externa 51 está constituida por materiales (p. ej., poliéter-poliuretano alifático) tales que la difusión de distintos componentes de la sangre entera o del plasma, tales como, sin limitación, electrólitos, oxígeno, hemoglobina, dióxido de carbono, bicarbonato, metano, proteínas, etc., no interfiere con la difusión de H₂O₂ desde la membrana interna (p. ej., la membrana enzimática 53) hacia la membrana externa 51.

Influyen en la salida de señal eléctrica del sensor de hemólisis para controlar o detectar hemólisis en sangre entera las variaciones en la presión parcial de oxígeno (pO₂) que pueden ocurrir en una muestra de sangre entera, por ejemplo una muestra de sangre entera hemolizada, de un paciente individual. Ello se debe a que este sensor utiliza una membrana externa de hidrogel permeable al oxígeno, y la formación de peróxido depende del nivel de pO₂. La presión parcial de oxígeno indica cuánto oxígeno de la sangre entera del paciente está disponible para una reacción enzimática en la capa intermedia enzimática 53 del sensor 110 de hemólisis.

En un estudio ilustrativo para determinar la influencia de la pO₂ en la respuesta del sensor de hemólisis, se encontró que una pO₂ mayor asegura una respuesta superior para el mismo nivel de sustrato, es decir, glucosa, en comparación con una pO₂ menor. Por ejemplo, en la Figura 10 una presión pO₂ de 203 mmHg en sangre lisada al 1% indica una mayor disponibilidad de oxígeno, si se compara con una presión pO₂ de 19,8 mmHg en sangre lisada al 1%. Por lo tanto, la sensibilidad del sensor 110 de hemólisis para detectar hemólisis en sangre entera aumenta cuando la pO₂ en la sangre entera del paciente es mayor. Por lo tanto, según un ejemplo, la respuesta del sensor de hemólisis a la hemólisis en sangre entera puede hacerse variar alterando el flujo entrante de oxígeno a través de la membrana externa 51 del sensor 110 de hemólisis.

Siendo la Figura 10 ilustrativa de la influencia de la pO₂ de la sangre entera sobre la sensibilidad de la respuesta del sensor 110 de hemólisis, debe señalarse que, con una presión parcial de oxígeno constante, la corriente generada en el electrodo 57 de trabajo del sensor 110 de hemólisis siempre es menor en presencia de hemoglobina, si se compara con la corriente generada en el electrodo 57 de trabajo en ausencia de hemoglobina (compárese en la Figura 9A la salida de corriente para sangre lisada al 1% y para sangre entera, con una pO₂ de 200 mmHg).

En otro ejemplo no limitante, la membrana externa 51 se produce dispensando una solución de 20,0 mL de tetrahidrofurano disolvente y 0,2 g de poliuretano con absorción de agua de 59%, sobre la capa enzimática 53 de la membrana compuesta 60.

En otra realización, se utilizan como membrana externa 51 una o más membranas comercialmente disponibles, tales como D1, D2, D3, D4, D6, D640, D7 e HYDROSLIP, disponibles de AdvanSource Biomaterials (Wilmington, MA), lo que está de acuerdo con las realizaciones de la invención. En la siguiente Tabla 2 se exponen propiedades de membranas externas comercialmente disponibles.

Tabla 2

Propiedades de membranas externas comercialmente disponibles

Serie HM D	D1	D2	D3	D4	D6	D640	D7	HydroSlip C
% de expansión lineal	45	25	40	50	60	100	10	180
% de contenido de agua	70	55	60	50	80	90	30	95
Viscosidad	2,24 Pa·s (2.240 cP)	0,0102 Pa·s (10,2 cP)	-	0,0651 Pa·s (65,1 cP)	-	-	-	-

La membrana externa 51, que está dispuesta como capa directamente sobre la capa enzimática 53, y en contacto con la misma, también puede funcionar para proteger a la capa enzimática 53, al evitar la exposición de una enzima 49, por ejemplo, glucosa oxidasa, integrada en la capa enzimática 53, y de la matriz estabilizante en la cual está integrada la enzima 49, a proteínas o compuestos degradantes procedentes de la muestra en el canal 56.

Análogamente, la membrana externa 51 puede evitar la difusión de la enzima 49 fuera de la capa enzimática 53. La membrana externa 51 también puede funcionar para controlar la velocidad de difusión del sustrato (p. ej. glucosa, lactato, creatina y creatinina) y oxígeno desde la muestra hacia la capa enzimática 53, como se ha tratado más arriba. Todavía en referencia a las Figuras 3 y 4, en una realización la membrana externa 51 del sensor 110 de hemólisis funciona generalmente para controlar o regular la difusión del H₂O₂ desde la capa enzimática 53. La membrana externa 51 también puede proteger a los demás componentes del sensor 110 de hemólisis frente al contacto directo con constituyentes de la muestra en el canal 56. En una realización, la membrana externa 51 es una membrana polimérica que comprende uno o varios compuestos a base de poliuretano. La hidrofilia o la hidrofobia de la membrana queda determinada por la mezcla de especies de compuestos poliméricos. Por ejemplo, si se incrementa la hidrofilia de la membrana, ello puede facilitar o promover la capacidad del H₂O₂ para difundirse más rápidamente a través de la membrana. La composición óptima de la membrana externa 51 es la concentración con la cual se da, en condiciones típicas, un equilibrio óptimo de las velocidades de difusión del H₂O₂.

Haciendo referencia a la Figura 4, la membrana externa 51 proporciona un medio para que una muestra hemolizada (p. ej., sangre entera) entre en contacto con H₂O₂, que generalmente se difunde desde la capa enzimática. En una realización ilustrativa, cuando se dispone una muestra hemolizada sobre la superficie externa 200 de la capa externa 51, el contenido de hemoglobina liberado desde la muestra hemolizada capta H₂O₂ que se difunde desde la capa enzimática 53 hacia la capa externa 51.

En una realización, la membrana externa 51, que está dispuesta como capa directamente sobre la capa enzimática 53, y en contacto con la misma, también puede funcionar para proteger a la capa enzimática 53, al evitar la exposición de una enzima 49 integrada en la capa enzimática 53, y de la matriz estabilizante en la cual está integrada la enzima 49, a proteínas o compuestos degradantes presentes en la muestra de sangre del paciente, del canal 56. Análogamente, la membrana externa 51 puede evitar la difusión de la enzima 49 fuera de la capa enzimática 53. La membrana externa 51 también funciona para controlar la velocidad de difusión del sustrato (p. ej. glucosa, lactato, creatina y creatinina) y oxígeno desde la muestra hacia la capa enzimática 53.

En una realización, cuando no existe membrana externa, la capa enzimática 51, que se tratará con mayor detalle en lo que sigue, entra en contacto con la muestra a medida que la muestra fluye a lo largo del canal 56 de sensor y sobre el sensor 110 de hemólisis. La señal eléctrica generada por la oxidación del peróxido de hidrógeno en el electrodo 57 de trabajo es conducida por un hilo de platino del electrodo 57 de trabajo y transferida al conductor 61, que está comunicado eléctricamente con la interfaz eléctrica 38 y los contactos 36 mostrados en la Figura 1.

30 Capa intermedia o membrana intermedia (capa enzimática) del sensor de hemólisis

Todavía en referencia a la Figura 4, la capa enzimática 53 del sensor 110 de hemólisis incluye al menos una enzima 49 que está estabilizada en la matriz de la capa enzimática 53. La enzima 49 es necesaria para la reacción enzimática en la que participa un sustrato específico. En una realización, la enzima 49 incluye al menos una proteína con actividad enzimática. En otras realizaciones, la enzima 49 incluye una mezcla de varias enzimas, proteínas y estabilizantes, por ejemplo.

En una realización ilustrativa de la invención, la enzima proteica 49 es glucosa oxidasa, lactato oxidasa o una mezcla de enzimas (p. ej., creatininasa y/o creatinasa y sarcosina oxidasa) que están integradas en la capa enzimática 53 del sensor 110 de hemólisis. El sensor 110 de hemólisis es un generador de H₂O₂, es decir, el sensor 110 de hemólisis genera H₂O₂ cuando la enzima 49 de la capa enzimática 53 entra en contacto con el sustrato enzimático. En una realización ilustrativa, el sensor 110 de hemólisis incluye glutaraldehído y glucosa oxidasa en la capa enzimática 53. En una realización, el sensor 110 de hemólisis incluye 0,10 g de glutaraldehído por gramo de glucosa oxidasa. En otra realización ilustrativa, el sensor 110 de hemólisis incluye al menos glutaraldehído, albúmina sérica de bovino y un estabilizante de enzima tal como, por ejemplo, polietilenimina y lactato oxidasa, en la capa enzimática 53. En una realización, el sensor 110 de hemólisis incluye 45% en peso de lactato oxidasa, 45% en peso de albúmina sérica de bovino, 5% en peso de polietilenimina (un estabilizante de enzima) y 5% en peso de glutaraldehído, por ejemplo. Las fracciones en peso de lactato oxidasa y albúmina sérica de bovino pueden variar. El porcentaje en peso de polietilenimina en la capa enzimática puede variar, y el porcentaje en peso de glutaraldehído puede variar. Otros estabilizantes de enzima incluyen, pero sin limitación, compuestos poliiónicos tales como polipropilenimina, poli(N-vinilimidazol), polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados.

En otra realización más de la invención, la capa enzimática 53 del sensor 110 de hemólisis incluye una mezcla de varias enzimas, proteínas y estabilizantes embebidos en la matriz de la capa enzimática 53 para producir específicamente H₂O₂ utilizando una glucosa oxidasa o una lactato oxidasa, en el sensor 110 de hemólisis.

En el sensor 110 de hemólisis se utilizan mezclas de enzimas para generar H₂O₂, que es captado por la hemoglobina de la sangre entera hemolizada. En una realización ilustrativa de la invención, el sensor 110 de hemólisis incluye una mezcla de 5% en peso de creatininasa, 55% en peso de creatinasa, 30% en peso de sarcosina oxidasa, 5% en peso de poli(N-vinilimidazol) (un estabilizante de enzima) y 5% en peso de glutaraldehído, por ejemplo.

Las fracciones en peso de creatininas, creatinasa y sarcosina oxidasa en el sensor 110 de hemólisis y las fracciones en peso de creatinasa y sarcosina oxidasa en el sensor 110 de hemólisis pueden variar. El porcentaje en peso de poli(N-vinilimidazol) en el sensor 110 de hemólisis puede variar, por ejemplo, del 1% al 20%, y el porcentaje en peso de glutaraldehído en los electrodos de creatinina y creatina también puede variar, por ejemplo, del 1% al 10%. También se pueden emplear para estabilizar la mezcla enzimática estabilizantes poliónicos distintos del poli(N-vinilimidazol). Los ejemplos de compuestos poliónicos incluyen, sin limitación, polietilenimina, polipropilenimina, polialilamina, polivinilpiridina, polivinilpirrolidona, polilisina, protamina y sus derivados.

En una realización, la capa enzimática 53 del sensor de hemólisis que comprende una glucosa oxidasa, una lactato oxidasa, una mezcla de enzimas (p. ej., creatininas y/o creatinasa y sarcosina oxidasa) consiste en una matriz reticulada de enzimas, estabilizantes tales como polietilenimina o poli(N-vinilimidazol) y otras proteínas tales como albúmina sérica de bovino. La reticulación de las enzimas, estabilizantes y otras moléculas proteicas se logra con, por ejemplo, glutaraldehído y un dialdehído. También se pueden emplear otros reactivos reticulantes, tales como 1,4-diisocianatobutano, un diisocianato, 1,2,7,8-diepoxiocetano y 1,2,9,10-diepoxi-decano, ambos diepóxidos. La reticulación de las moléculas de enzima y el uso de estabilizantes poliónicos y proteínas inertes en la matriz enzimática pueden prolongar significativamente la duración de almacenamiento y la vida útil de los electrodos enzimáticos.

Capa interna o membrana interna (membrana de rechazo de interferencia)

Haciendo referencia a las Figuras 3 y 4, el sensor 110 de hemólisis incluye también una membrana o capa interna 55 de rechazo de interferencia, que es una membrana polimérica restaurable en estrecho contacto con el electrodo 57 de trabajo que tiene un cable conductor de platino. La membrana interna 55 de rechazo de interferencia se forma mediante la polimerización de monómeros electropolimerizables para dar una membrana polimérica interna en el sensor 110 de hemólisis. Los monómeros electropolimerizables adecuados incluyen benzotiofeno, fenilendiaminas (p. ej., m-fenilendiamina (PDA, por sus siglas en inglés) y fenoles, por ejemplo). La membrana interna 55 de rechazo de interferencia aísla o protege el hilo del electrodo 57 de trabajo frente a compuestos de la muestra, específicamente compuestos oxidables, que interfieren con el funcionamiento adecuado del sensor 110 de hemólisis. En una realización, la membrana de rechazo de interferencia es permeable solamente al H₂O₂, e impide que moléculas de mayor tamaño experimenten oxidación en el electrodo 57 de trabajo, asegurando así que la respuesta de corriente provenga únicamente del H₂O₂.

Otros metales tales como el oro, carbono, plata, cobre, paladio e iridio pueden reemplazar al platino en el electrodo 57 de trabajo.

En un ejemplo, la membrana polimérica que comprende la membrana interna 55 de rechazo de interferencia se forma mediante la aplicación de un potencial eléctrico al electrodo 57 de trabajo que comprende un cable conductor (p. ej., un hilo de platino), en presencia de monómeros electropolimerizables. En presencia de un potencial eléctrico, los monómeros se polimerizan sobre el electrodo 57 de trabajo para formar una membrana polimérica 55 de rechazo de interferencia, eléctricamente aislante, sobre el electrodo 57 de trabajo representado en las Figuras 3 y 4. El peróxido de hidrógeno, que se genera por la actividad de la enzima en la capa enzimática 53 del sensor 110 de hemólisis sobre un sustrato específico, pasa a través de los poros de la membrana interna 55 de rechazo de interferencia y entra en contacto con el electrodo 57 de trabajo, provocando la generación de una señal eléctrica en el electrodo 57 de trabajo. El menor tamaño de los poros en la membrana interna 55 de rechazo de interferencia impide que compuestos de tamaño mayor que el peróxido de hidrógeno que se encuentren en la muestra, tales como paracetamol, ácido ascórbico, ácido úrico, cisteína y otros compuestos electroactivos (denominados en general sustancias interfirientes), que tienen un tamaño mayor que el H₂O₂, generen una señal falsa y reduzcan la precisión del sensor de hemólisis.

Ejemplificación

El sensor 110 de hemólisis descrito en lo que antecede puede adaptarse para el uso en sistemas de sensor electroquímico comercialmente disponibles, tales como el GEM 4000 (Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA). A modo de ejemplo, se preparó un sensor de hemólisis de la manera siguiente: se preparó una solución de enzima, glucosa oxidasa (GOx), en tampón de fosfato 50 mM, pH 7,2, con una concentración de GOx en el intervalo de 0,1 a 50 mg/mL. Con solución de glutaraldehído (de 0,06 a 6%) se provocó la reticulación de la GOx. Se vertió gota a gota sobre una superficie de electrodo de platino la solución de enzima reticulada, y se secó al aire durante 30 minutos. De manera similar, se vertió gota a gota sobre la capa enzimática un hidrogel D2 (AdvanSource Biomaterials, Wilmington, MA) para membrana externa (al 1%) en tetrahidrofurano (THF), y se secó al aire durante 30 minutos. Después de secar, se hidrató en solución tampón GEM 4000 Cal B (Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA), solución a pH 7,4, el electrodo de platino modificado, durante 90 minutos a temperatura ambiente, para utilizarlo en un analizador clínico GEM 4000 (Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA).

En otro aspecto, la invención está dirigida a métodos para detectar o controlar la hemólisis de sangre entera. En una realización del método, se introduce una muestra de sangre entera en el sensor 110 de hemólisis según la invención que tiene al menos una enzima oxidorreductasa en la capa enzimática 53 y una membrana externa 51 que es sumamente permeable al peróxido de hidrógeno, seguido de la detección de un señal electroquímica generada por

el peróxido de hidrógeno en presencia de $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$. Una disminución de la corriente detectable en el intervalo de 4% a 50% con respecto a la línea de base de sangre entera en un electrodo 57 de trabajo, es indicativa de la presencia de hemólisis en la muestra de sangre entera.

5 Como se ha tratado más arriba, la hemólisis en la sangre entera origina una elevación de analitos intracelulares (p. ej., potasio, magnesio o creatinina) en la fracción líquida no celular (por ejemplo, el plasma) de la muestra de sangre entera, ya que estos analitos (potasio, magnesio o creatinina) son liberados desde el contenido intracelular de glóbulos rojos rotos o anormalmente permeables. La hemólisis producida por la ruptura de los glóbulos rojos durante la extracción y manipulación de muestras es una causa común de hemólisis en la práctica clínica. Por ejemplo, la hemólisis en la sangre entera es particularmente problemática para el análisis del potasio, debido a los niveles de K^+ ~20 veces más altos en el interior de los glóbulos rojos en comparación con la concentración de potasio en el plasma (K^+ - 105 mmol/L en glóbulos rojos frente a 4,0 mmol/L en plasma).

10 Por ejemplo, una hemólisis de aproximadamente 1% en comparación con una muestra de sangre entera no hemolizada elevará de manera espúrea el K^+ de la sangre entera en aproximadamente 0,5 mmol/L, lo que sería suficiente para ser considerado clínicamente relevante en ausencia de hemólisis. Así pues, en un aspecto, la invención está dirigida a un método para evaluar si la fuente de un analito elevado, tal como el potasio, en una muestra de sangre entera de un paciente se debe a un artefacto introducido por hemólisis artificial de la muestra de sangre entera o bien es debida a una anomalía fisiológica del paciente.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para detectar o controlar los niveles de al menos un componente en una muestra de sangre entera que experimenta hemólisis, utilizando el sensor 110 de hemólisis de la presente invención. El al menos uno de dichos componentes de la sangre entera que se puede controlar para detectar la hemólisis en la sangre entera es la hemoglobina. No obstante, también podrían detectarse o controlarse junto con la hemoglobina, o podrían detectarse o controlarse de manera independiente de la hemoglobina, utilizando los métodos de esta invención, otros componentes sanguíneos de la sangre entera, tales como electrólitos, minerales, gases y similares. En un aspecto determinado, al menos un componente sanguíneo es la hemoglobina, que químicamente se comporta como una peroxidasa en virtud del grupo hemo. Así pues, en un aspecto, los métodos de la presente invención aprovechan los peróxidos o la actividad de tipo peroxidasa de un componente sanguíneo de la sangre completa para detectar o controlar la hemólisis.

20 En un aspecto, el sistema electroquímico 8 (Figura 1) está configurado para detectar o controlar la hemólisis en sangre entera midiendo los cambios en la salida eléctrica del sensor 110 de hemólisis. En este aspecto, el sensor 110 de hemólisis del sistema 8 de sensor electroquímico detecta hemólisis en la muestra (p. ej. sangre entera) midiendo la fluctuación de corriente en el sensor 110 de hemólisis inducida por la hemoglobina cuando la hemoglobina (una peroxidasa) reacciona con peróxido de hidrógeno en el sensor 110 de hemólisis. Debido a la interacción entre la hemoglobina y el peróxido de hidrógeno en el sensor 110 de hemólisis, el peróxido de hidrógeno se descompone dando radicales hidroxilo o bien dando agua y oxígeno. En consecuencia, hay menos peróxido de hidrógeno disponible para la oxidación en el electrodo 57 de trabajo (p. ej., un electrodo de platino) del sensor 110 de hemólisis, si se compara con la disponibilidad de peróxido de hidrógeno en ausencia de hemoglobina en el sensor 110 de hemólisis. La oxidación del peróxido de hidrógeno en el electrodo 57 de trabajo del sensor 110 de hemólisis genera corriente eléctrica en el sensor 110 de hemólisis. Es importante señalar que únicamente la hemoglobina extracelular (fuera de los glóbulos rojos) presente en el plasma o en el suero reacciona con el peróxido de hidrógeno y produce señal de hemólisis. La hemoglobina intracelular no tiene efecto sobre el sensor de hemólisis.

25 En los métodos de control o detección de hemólisis por un sensor 110 de hemólisis en un sistema electroquímico 8, el sensor 110 de hemólisis de la presente invención comprende una o más enzimas oxidorreductasas, que producen peróxido de hidrógeno en presencia de una muestra y un agente oxidante.

Sensor de hemólisis con una glucosa oxidasa

30 Haciendo referencia a las Figuras 2 y 6, el sensor 110 de hemólisis, con una glucosa oxidasa en la capa enzimática 53, funciona captando el peróxido de hidrógeno producido por una reacción enzimática en la capa enzimática 53. La enzima, glucosa oxidasa, oxida específicamente glucosa en presencia de un agente oxidante, oxígeno, y produce peróxido de hidrógeno, un compuesto que es captado por la hemoglobina. En el sensor 110 de hemólisis, la señal electroquímica generada por el peróxido de hidrógeno disminuye en presencia de $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$.

35 Sensor de hemólisis con creatininasa y/o creatinasa y sarcosina oxidasa.

Haciendo referencia a la Figura 2, un sensor de hemólisis con creatininasa y/o creatinasa con sarcosina oxidasa en la capa enzimática funciona mediante la detección del peróxido de hidrógeno producido por reacción enzimática en sus respectivas capas enzimáticas. En la realización que tiene creatininasa, la capa enzimática 53 del sensor 110 de hemólisis incluye una mezcla de tres enzimas: creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa. Esta mezcla de enzimas oxida específicamente la creatinina y la creatina y, en presencia de sarcosina oxidasa, produce peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es captado por la hemoglobina. En el sensor 110 de hemólisis, la señal electroquímica generada por el peróxido de hidrógeno disminuye en presencia de $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$.

40 En la realización que tiene creatinasa, la capa enzimática 53 del sensor 110 de hemólisis incluye una mezcla de dos

enzimas: creatinasa y sarcosina oxidasa. Esta mezcla de enzimas oxida específicamente solamente la creatina, y produce peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es captado por la hemoglobina. En el sensor 110 de hemólisis, la señal electroquímica generada por el peróxido de hidrógeno disminuye en presencia de Hb(Fe²⁺).

Sensor de hemólisis con lactato oxidasa

5 Haciendo referencia a la Figura 2, un sensor de hemólisis con lactato oxidasa en la capa enzimática 53 funciona captando el peróxido de hidrógeno producido por una reacción enzimática de la lactato oxidasa sobre el lactato en la capa enzimática 53. La lactato oxidasa presente en la capa enzimática 53 oxida el lactato para producir peróxido de hidrógeno, que es captado por la hemoglobina. En el sensor 110 de hemólisis, la señal electroquímica es generada por el peróxido de hidrógeno en presencia de Hb(Fe²⁺).

10 Captura de H₂O₂ por la hemoglobina

La Figura 7 muestra los resultados de un estudio dirigido hacia el principio de la captura del H₂O₂ por la hemoglobina. En pocas palabras, se sumergió en una solución tampón (pH 7,4) una celda electroquímica de 3 electrodos, consistente en un electrodo de trabajo de platino, un contraelectrodo de oro y un electrodo de referencia de Ag/AgCl, KCl 1 M. Se polarizó a +500 mV (frente a Ag/AgCl, KCl 1 M) el electrodo de trabajo, y se controló de manera continua su respuesta de corriente, en condiciones de agitación. Transcurridos cerca de 15 180 segundos, se inyectó en la celda H₂O₂ (concentración final - 90 µM), lo que produjo un aumento de la respuesta de corriente, que luego se estabilizó inmediatamente (nota: el pico observado a 180 segundos era un artefacto debido a la inyección de la solución). Esta respuesta de corriente provino de la oxidación directa del H₂O₂ en el electrodo de platino.

20 Continuando en referencia a la Figura 7, cuando a los 320 segundos se añadió hemoglobina (concentración final - 7,35 µM) a la solución anterior, se observó una disminución rápida seguida de una disminución gradual hasta la corriente de base inicial. Esto demuestra que la hemoglobina añadida a la solución provocó una disminución inmediata de la corriente, probablemente causada por la descomposición del peróxido de hidrógeno en la solución. A medida que la concentración de H₂O₂ en la solución disminuye, también disminuye la correspondiente respuesta de corriente en el electrodo de platino. Una segunda adición de H₂O₂ (concentración final - 81 µM) a los 25 550 segundos muestra un pico de corriente seguido por una bajada similar en el perfil de corriente. Este comportamiento demuestra que la interacción entre la hemoglobina y H₂O₂ en la solución es detectable utilizando la oxidación electroquímica en el electrodo de platino.

Respuesta de GOx/D2 (al 1%) frente a plasma de sangre hemolizada

30 Las Figuras 8A y B muestran los resultados de un estudio dirigido hacia la respuesta de GOx/D2 (al 1%) frente a plasma de sangre hemolizada. En este estudio, se construyó un sensor de hemólisis de la manera siguiente. En pocas palabras, se preparó una solución de enzima GOx en tampón de fosfato 50 mM, pH 7,2. La concentración de GOx puede estar en el intervalo de 0,1 a 50 mg/mL. Se añadió solución de glutaraldehído (del 0,06 al 6%) a la anterior solución enzimática y se dejó reticular durante 30 minutos. Se vertió gota a gota sobre la superficie del 35 electrodo de platino la solución enzimática reticulada y se secó al aire durante 30 minutos. De manera similar, se vertió gota a gota sobre la capa enzimática hidrogel D2 (AdvanSource Biomaterials) para membrana externa (al 1%) en THF, y se secó al aire durante 30 minutos. Después de secar, se hidrató en solución tampón GEM 4000 Cal B (Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA), solución de pH 7,4, el electrodo de platino modificado, durante 90 minutos a temperatura ambiente.

40 Haciendo referencia a las Figuras 8A y B, se prepararon muestras de analito hemolizado de la manera siguiente. Se combinaron cuatro muestras de 5 mL de sangre procedente de donantes y se prepararon, en un tubo de plástico, seis partes alícuotas de 3 mL. Se centrifugó la primera parte alícuota y se separó el plasma. Se provocó hemólisis en las otras cinco partes alícuotas forzando la sangre entera a través de una aguja de calibre 21, para imitar estrechamente un proceso real de extracción en el entorno clínico. Cada embolada de ida y vuelta constituye una 45 aspiración mediante jeringa. En cada parte alícuota subsiguiente se aumentó el número de veces que se hizo pasar la muestra a través de la aguja, con el fin de generar cantidades crecientes de hemólisis. Tras la hemólisis, se centrifugaron las cinco partes alícuotas y se separó el plasma. Se ajustaron a 500 mg/dL las concentraciones de glucosa en plasma (1,2 mL).

50 Continuando en referencia a las Figuras 8A y 8B, se realizaron las mediciones en una configuración de celda de 3 electrodos tal como se describe en la Figura 7. En este caso, actuaron como electrodo de trabajo un electrodo de platino modificado con enzima GOx y una membrana de hidrogel. Se agitó de manera continua la celda que contenía 2.400 µL de solución tampón Cal B, y se inyectaron partes alícuotas individuales de muestras de plasma (600 µL) a los 120 segundos. La Figura 8A muestra las correspondientes respuestas de corriente en tiempo real para cada parte alícuota. Inmediatamente después de cada inyección se obtuvieron los valores de hemoglobina y de K⁺ de la 55 parte alícuota del plasma, que se exponen en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

Extracciones con jeringa	tHb, g/dL	K ⁺ , mmol/L
0	0,03	4,2
1	0,04	4,2
2	0,09	4,3
3	0,15	4,5
4	0,26	4,9
5	0,28	5,0

Se construyó un gráfico de calibración de respuesta de hemólisis, Figura 8B, restando la respuesta de corriente de las muestras hemolizadas (de la 1 a la 5) de la respuesta plasmática sin hemólisis (es decir, 0 extracciones con jeringa, véase la Tabla 3 arriba). Para ello, se utilizó la respuesta de corriente a los 30 segundos después de la inyección para calcular la diferencia entre muestras hemolizadas y no hemolizadas. Las Figuras 8A y B demuestran claramente que el sensor al que se ha hecho antes referencia responde inmediatamente a la hemoglobina extracelular en el plasma y la respuesta es lineal con respecto a la concentración de hemoglobina.

Respuesta de GOx/D2 (al 1%) a sangre hemolizada

El diseño experimental para los resultados del estudio que se muestran en las Figuras 9A, 9B y 9C fue el mismo que se ha descrito más arriba para el estudio reflejado en la Figura 8, salvo que la muestra analizada era sangre entera y hemolizada, en lugar de muestras de plasma. En este caso, se preparó la sangre parcialmente hemolizada como una solución en porcentaje (v/v), a partir de una parte alícuota de sangre enteramente hemolizada. Por ejemplo, se preparó sangre lisada (LB, por sus siglas en inglés) al 1% de añadiendo 10 μ L de sangre lisada a 990 μ L de sangre entera. Como antes, se ajustaron los niveles de glucosa en todas las muestras a un valor constante de 500 mg/dL.

La Figura 9A muestra el perfil de corriente en tiempo real para las muestras de sangre entera y hemolizada, mientras que la 9B corresponde al gráfico de calibración calculado. La Figura 9C muestra la región lineal del gráfico de calibración. Estos resultados muestran que el sensor de hemólisis según la invención es sensible y responde a sangre con 1% de lisis o incluso a una concentración menor de sangre lisada. Es importante señalar que la matriz era sangre entera y que el sensor de hemólisis responde únicamente a la hemoglobina extracelular. Estas respuestas rápidas (en un plazo de 30 s) y sensibles son necesarias, ya que uno de los propósitos de este sensor de hemólisis es llamar la atención sobre cualquier valor de K⁺ espuriamente elevado en analizadores clínicos.

Efecto de la presión parcial de oxígeno (pO₂) sobre la detección de sangre lisada al 1%

Haciendo referencia a la Figura 10, se realizó el estudio para pO₂ con el objetivo de entender el impacto de la presión parcial de oxígeno (pO₂) en la respuesta del sensor de hemólisis. Dado que esta tecnología se enfoca en medir la hemólisis en la sangre entera del paciente, la pO₂ de la muestra puede variar ampliamente dependiendo del historial del paciente. Por otro lado, el sensor de hemólisis trabaja principalmente produciendo H₂O₂ a partir de glucosa y oxígeno, en presencia de glucosa oxidasa. La presión parcial de oxígeno representa la cantidad de oxígeno que está disponible para esta reacción. Una pO₂ más alta asegura una mayor respuesta para el mismo nivel de glucosa, si se compara con una pO₂ menor.

La Figura 10 ilustra gráficamente la influencia esperada de la pO₂ sobre la respuesta del sensor de hemólisis. La influencia de la pO₂ sobre la respuesta del sensor de hemólisis se debe a que el sensor utiliza una membrana externa de hidrogel permeable al oxígeno y la formación de peróxido depende del nivel de pO₂. El sensor de hemólisis es susceptible a las variaciones de pO₂ en las muestras de sangre del paciente, debidas a la permeabilidad de la membrana a este gas. Como queda demostrado en este estudio, el sensor de hemólisis según la invención tiene un sesgo negativo lineal con respecto a la pO₂. Por ejemplo, una pO₂ de 200 a 20 mmHg tiene un sesgo negativo lineal para la sangre lisada al 1% y, por lo tanto, se requiere una corrección para tener en cuenta dicho comportamiento. La corrección se realiza mediante un algoritmo de respuesta para tener en cuenta las variaciones de pO₂.

40

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de sensor electroquímico para detectar hemólisis en una muestra de sangre entera, que comprende:
 un sensor electroquímico que comprende una membrana externa hidrófila que comprende un grosor en el intervalo de 0,1 a 50 μm , estando dicho grosor de membrana adaptado para intensificar el flujo saliente de peróxido de hidrógeno a través de la membrana externa, comprendiendo otra membrana una enzima oxidorreductasa, siendo dicha enzima oxidorreductasa capaz de generar dicho peróxido de hidrógeno, y
 una cámara de flujo sin reactivo dispuesta adyacente a dicha membrana externa para poner en contacto dicha sangre entera con dicha membrana externa.
2. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 1, en donde la enzima oxidorreductasa comprende glucosa oxidasa.
3. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 1, en donde la enzima oxidorreductasa comprende lactato oxidasa.
4. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 1, en donde la enzima oxidorreductasa comprende una mezcla de enzimas, comprendiendo dicha mezcla al menos una creatininasa y/o creatinasa y una sarcosina oxidasa.
5. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 4, en donde dicha mezcla de enzimas comprende dicha creatininasa y dicha sarcosina oxidasa.
6. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 4, en donde dicha mezcla de enzimas comprende dicha creatinasa y dicha sarcosina oxidasa.
7. Un método para detectar hemólisis en una muestra de sangre entera mediante el sensor electroquímico según la reivindicación 1, que comprende:
 (i) introducir dicha muestra de sangre entera en el sensor electroquímico, seguido de;
 (ii) detectar una señal electroquímica generada por dicho peróxido de hidrógeno en presencia de $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$, en donde una disminución de la corriente eléctrica detectable en el intervalo de 4% a 50% en comparación con una muestra de sangre entera no hemolizada estándar, es indicativa de hemólisis en la muestra de sangre entera.
8. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 1, en donde dicha membrana externa hidrófila es un hidrogel.
9. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 8, en donde dicho hidrogel comprende un contenido de agua en el intervalo de 0,1% a 100%.
10. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 8, en donde dicho hidrogel comprende un contenido de agua en el intervalo de 0,5% a 100%.
11. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 8, en donde dicho hidrogel comprende un contenido de agua seleccionado del grupo consistente en 70-80%, 80-90% y 90-100%.
12. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 1, en donde dicha membrana externa hidrófila está dispuesta como capa directamente sobre una capa enzimática y en contacto con la misma.
13. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 12, en donde dicha capa enzimática comprende al menos una enzima que está estabilizada en una matriz de la capa enzimática.
14. El sistema de sensor electroquímico según la reivindicación 1, que comprende además una membrana interna que comprende monómeros electropolimerizables seleccionados del grupo consistente en benzotiofeno y fenilendiaminas.
15. El método según la reivindicación 7, en donde la señal electroquímica es una corriente eléctrica detectable.
16. El método según la reivindicación 7, en donde la corriente generada en el electrodo de trabajo es menor en presencia de dicha hemoglobina ($\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$), si se compara con la corriente generada en ausencia de dicha hemoglobina $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$.

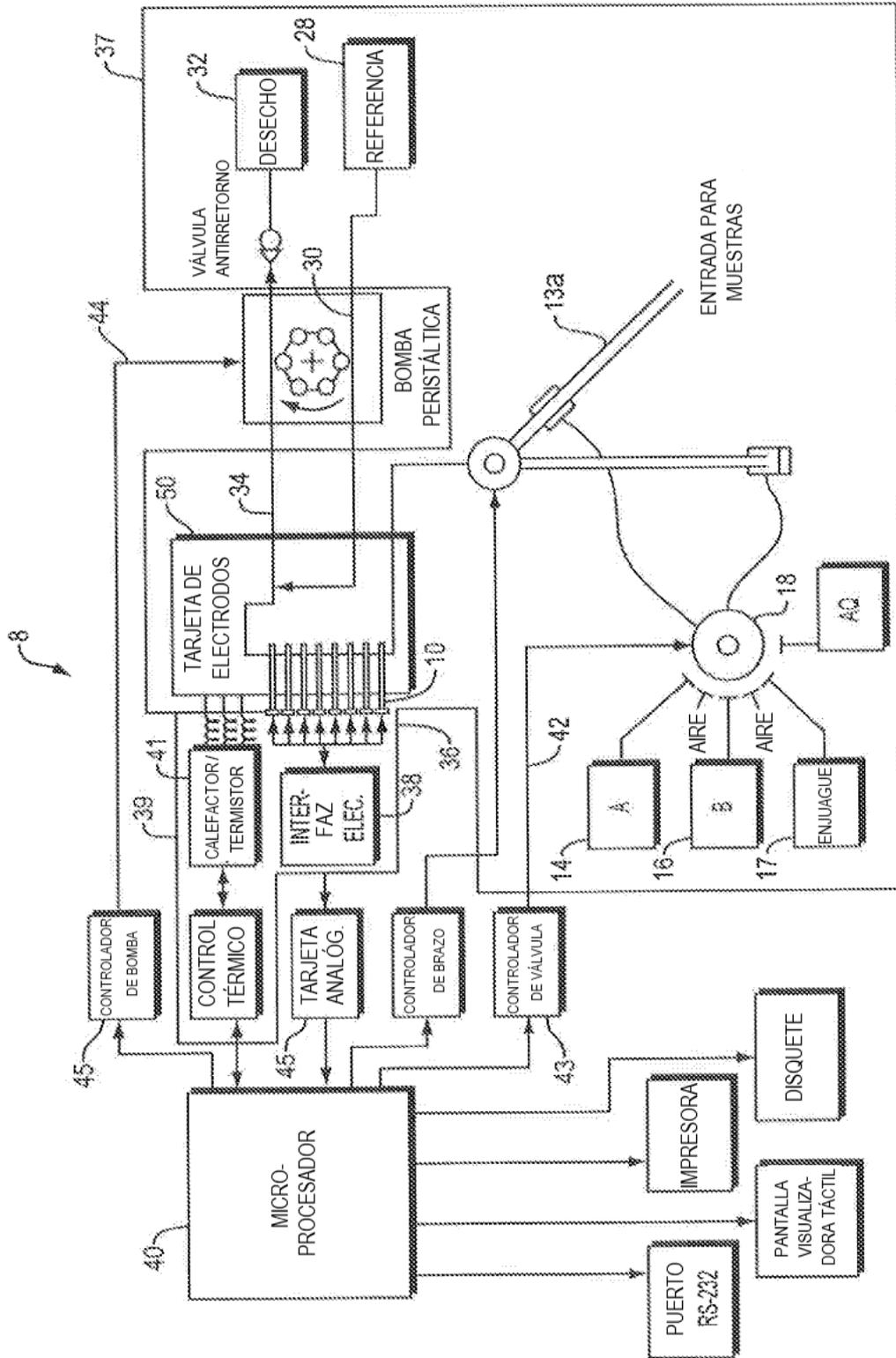


FIG. 1

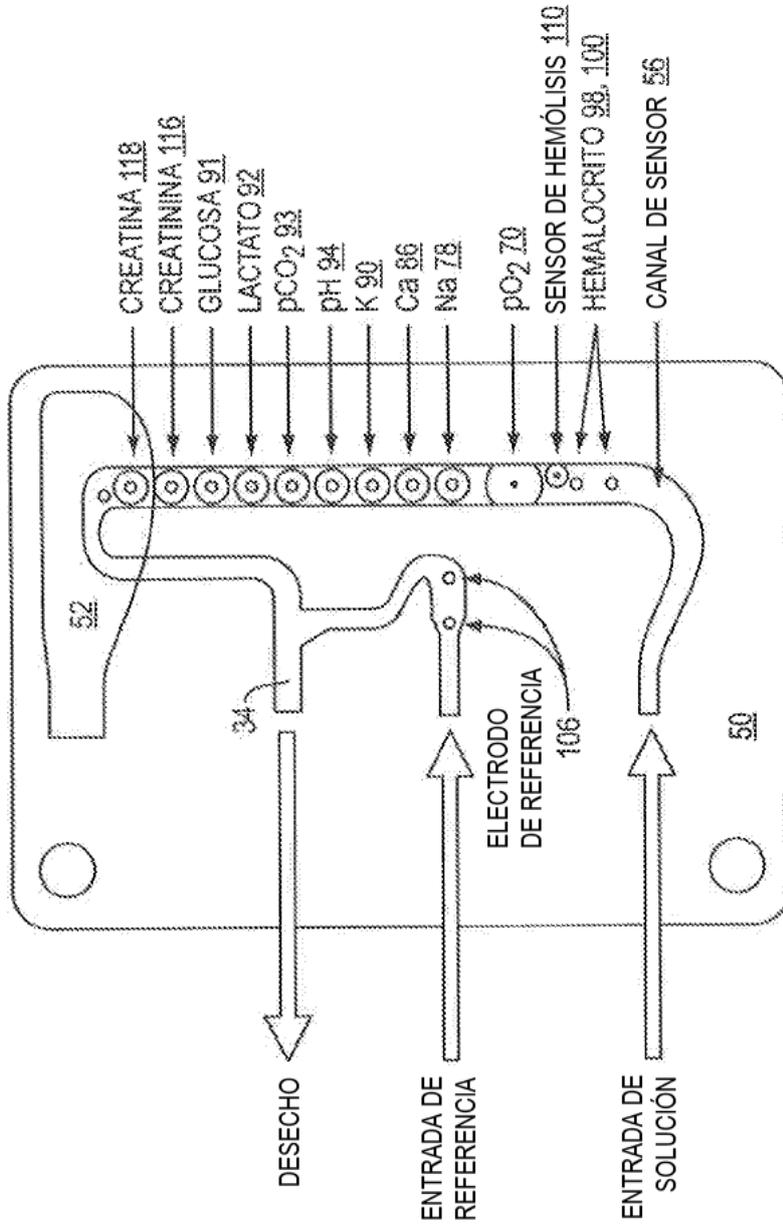


FIG. 2

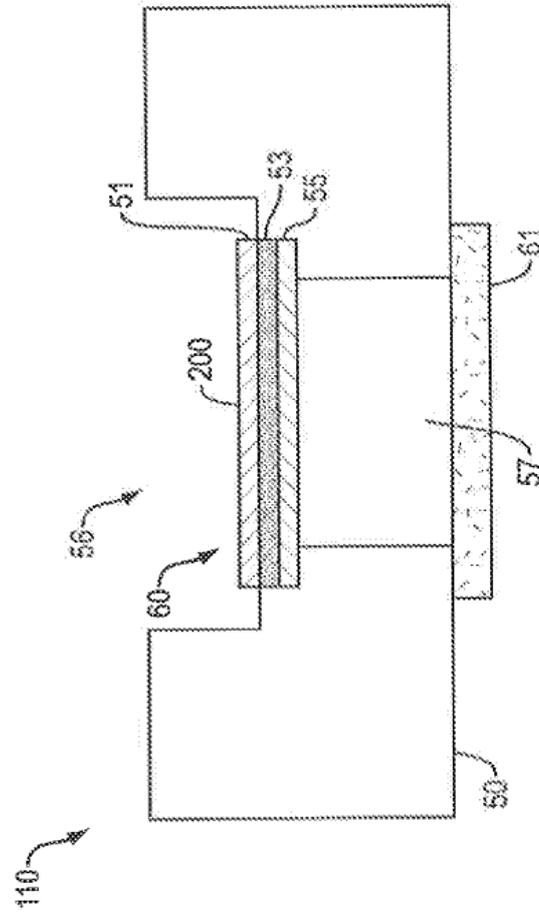


FIG. 3

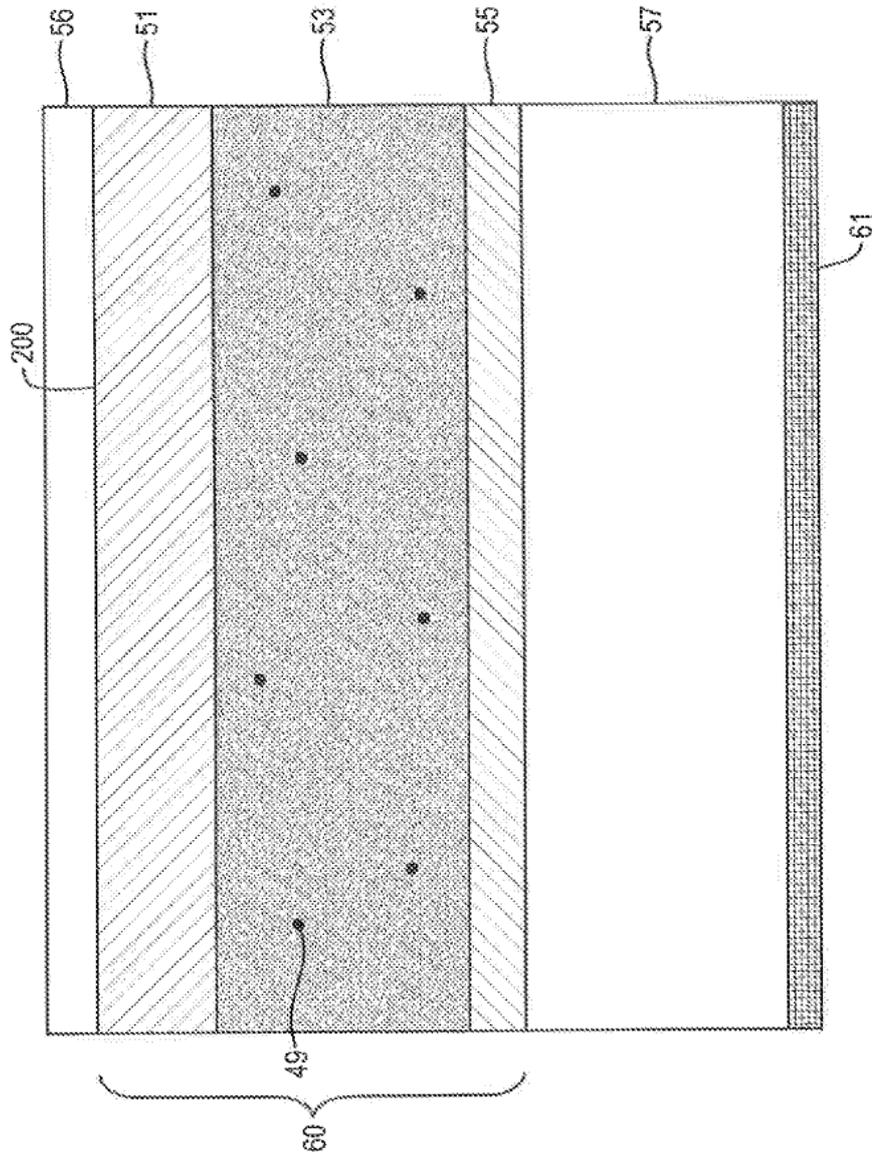


FIG. 4

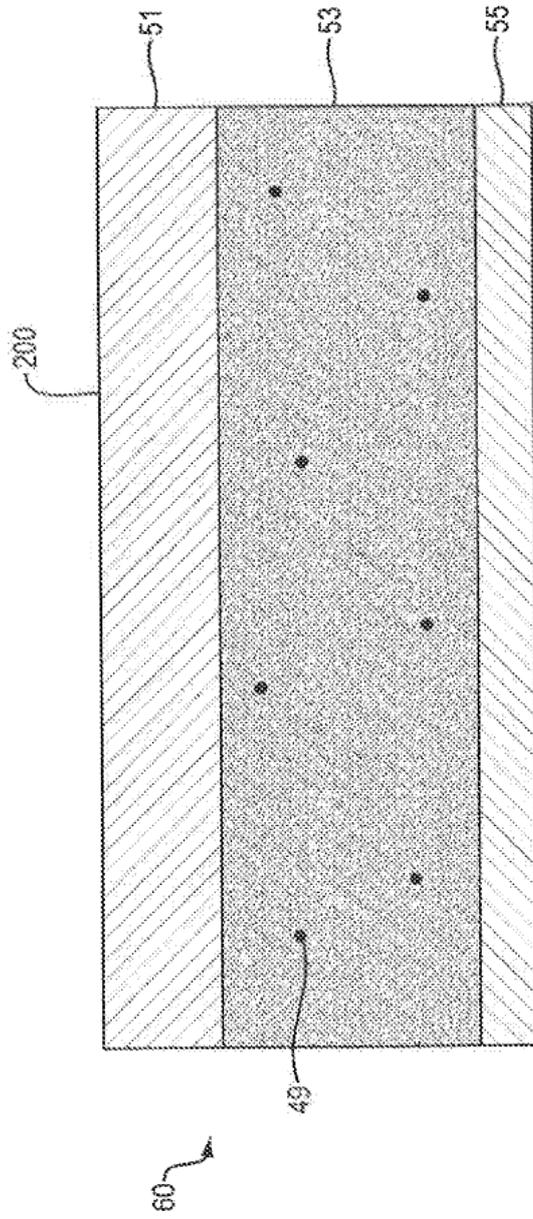


FIG. 5

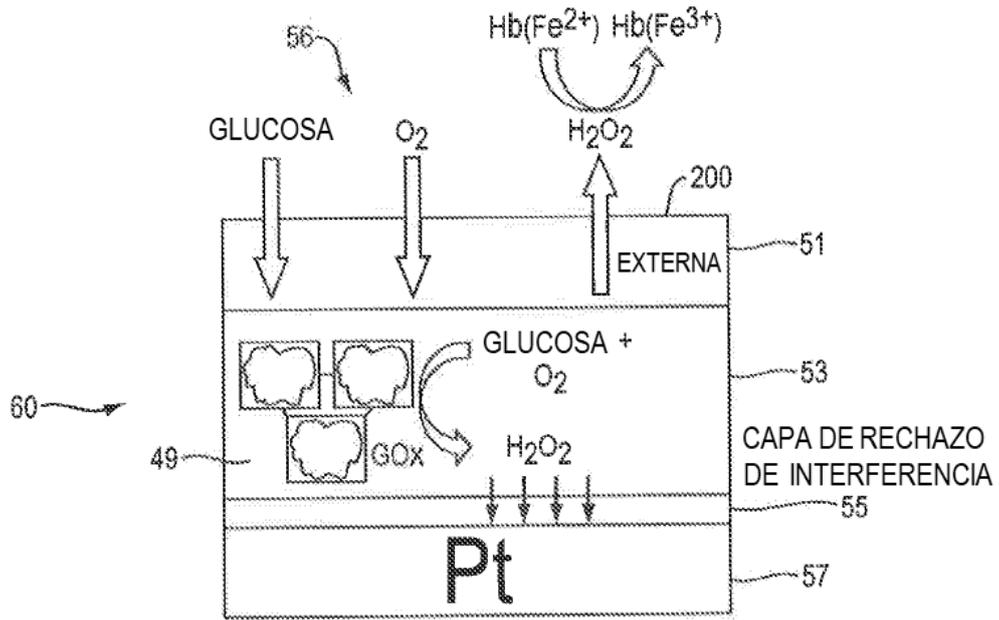


FIG. 6

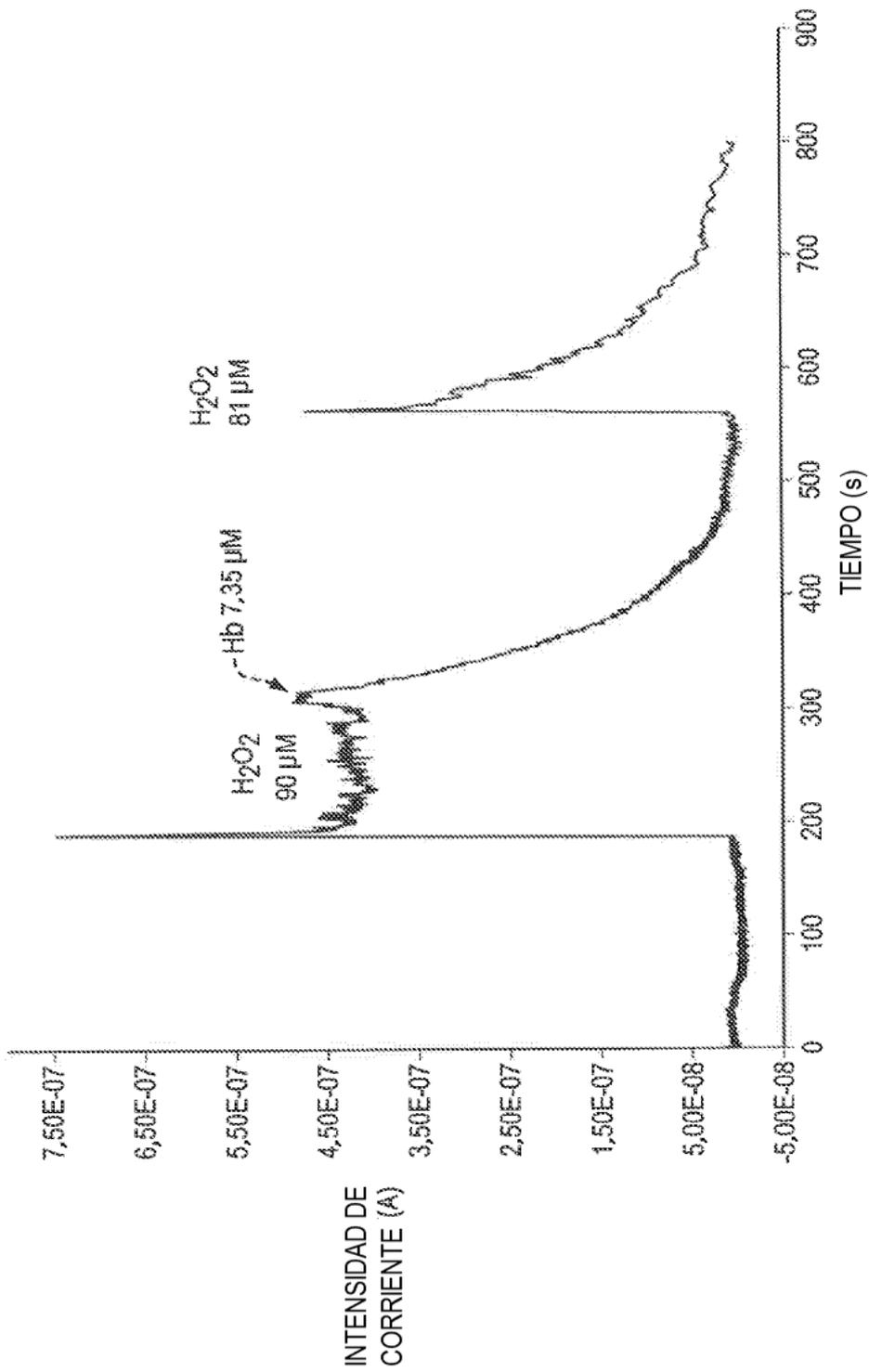


FIG. 7

RESPUESTA DEL SENSOR DE HEMÓLISIS A PLASMA DE SANGRE LISADA

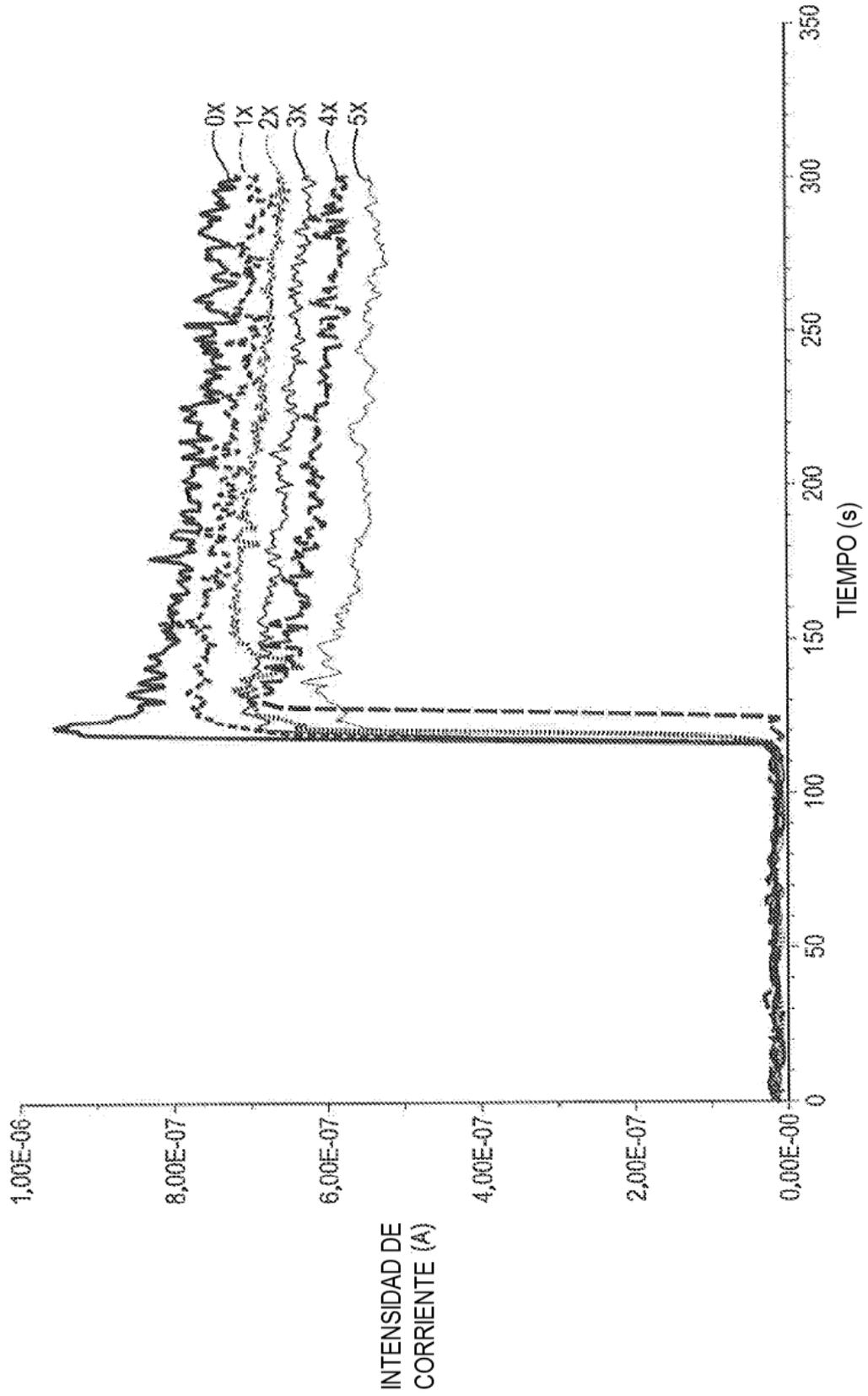


FIG. 8A

RESPUESTA DEL SENSOR DE HEMÓLISIS A PLASMA DE SANGRE LISADA

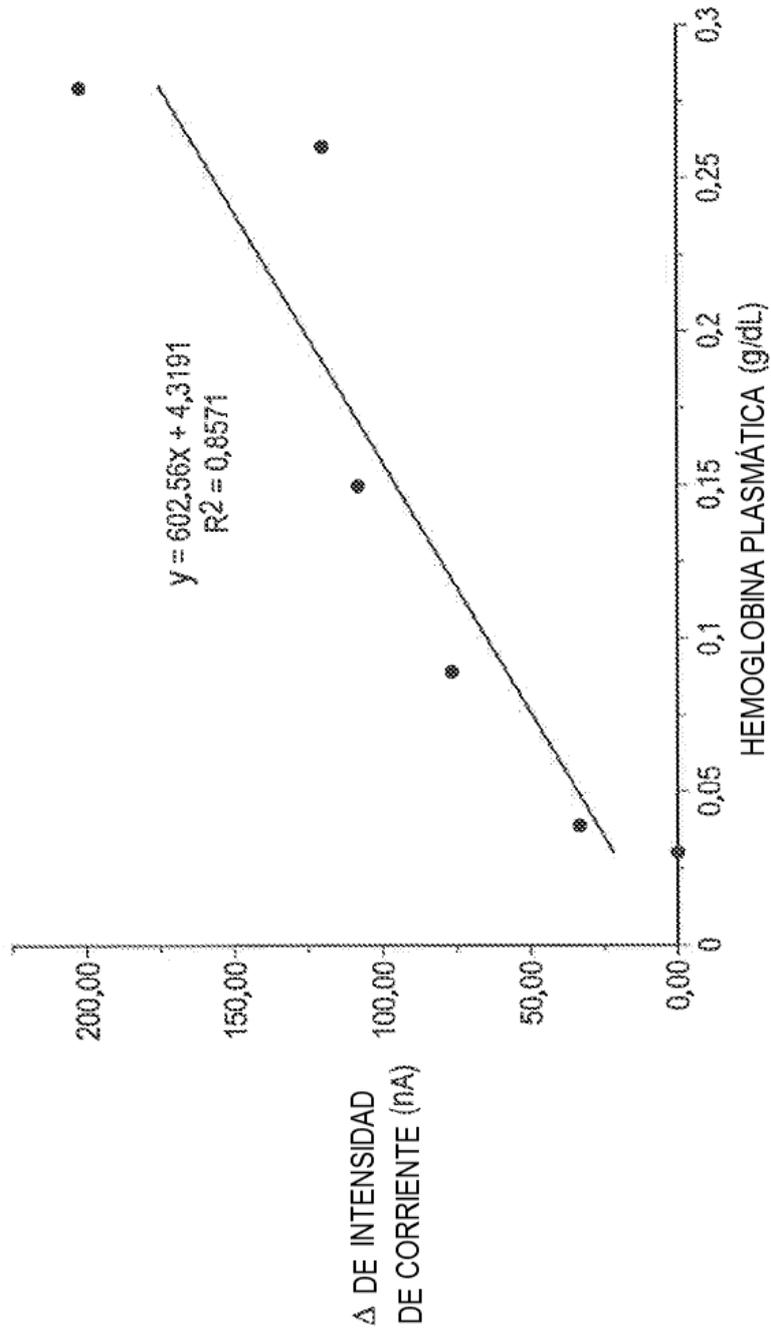


FIG. 8B

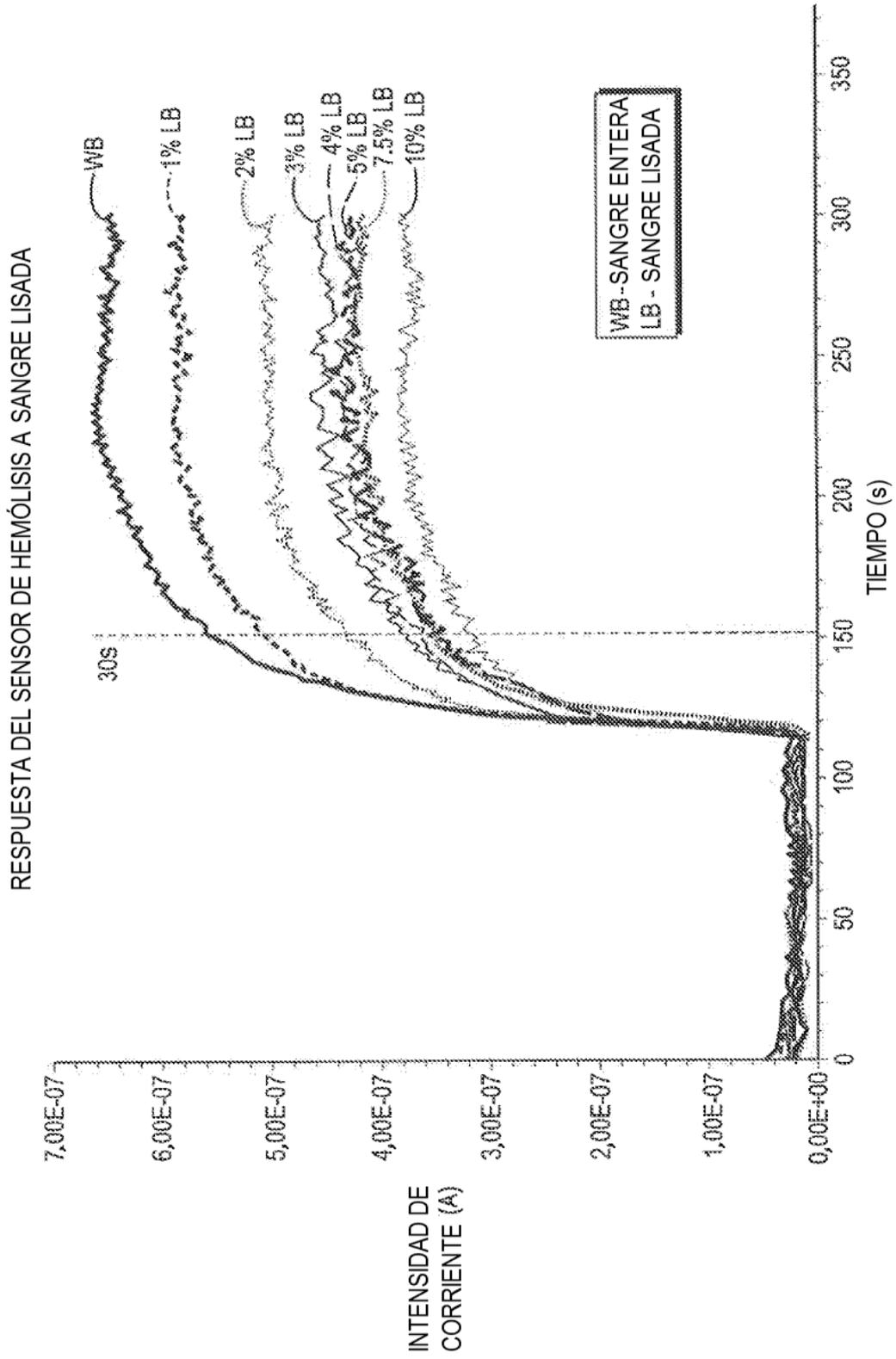


FIG. 9A

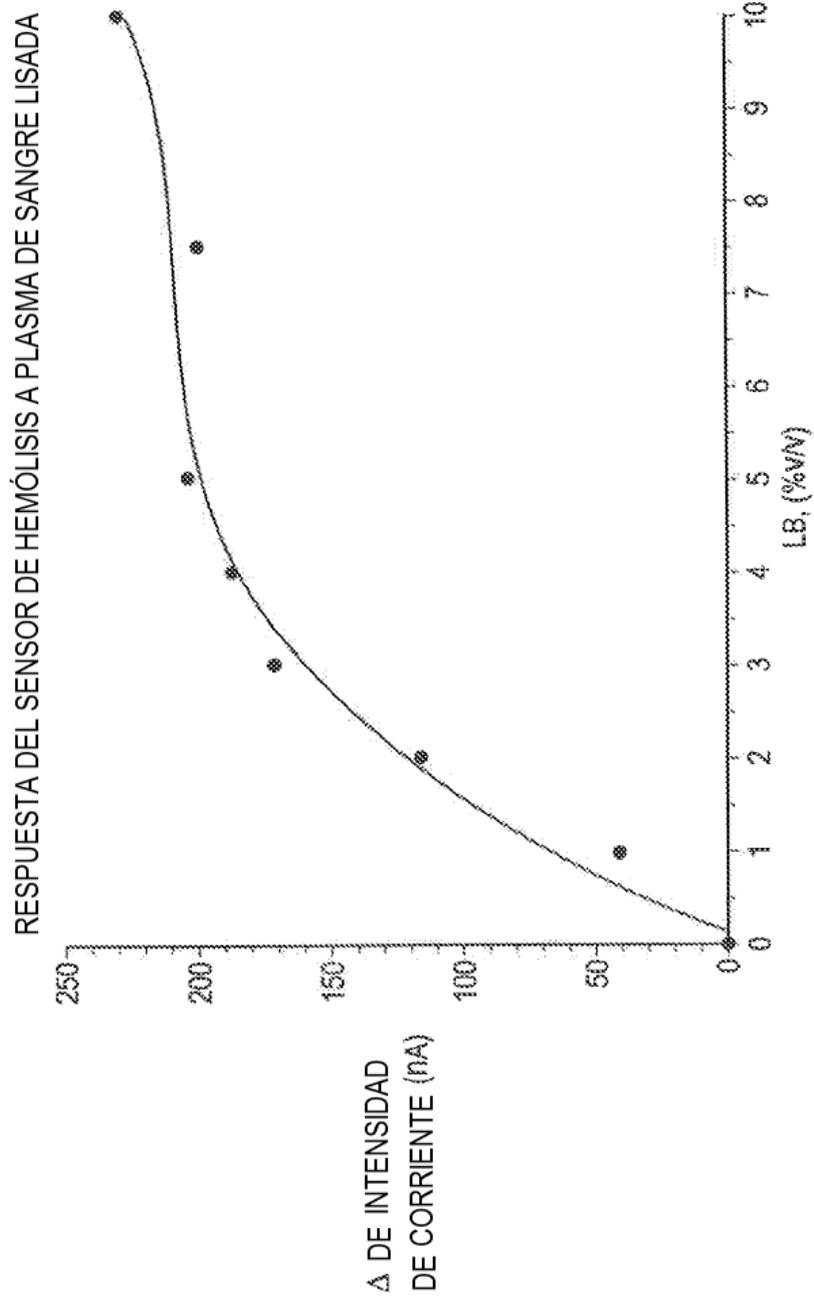


FIG. 9B

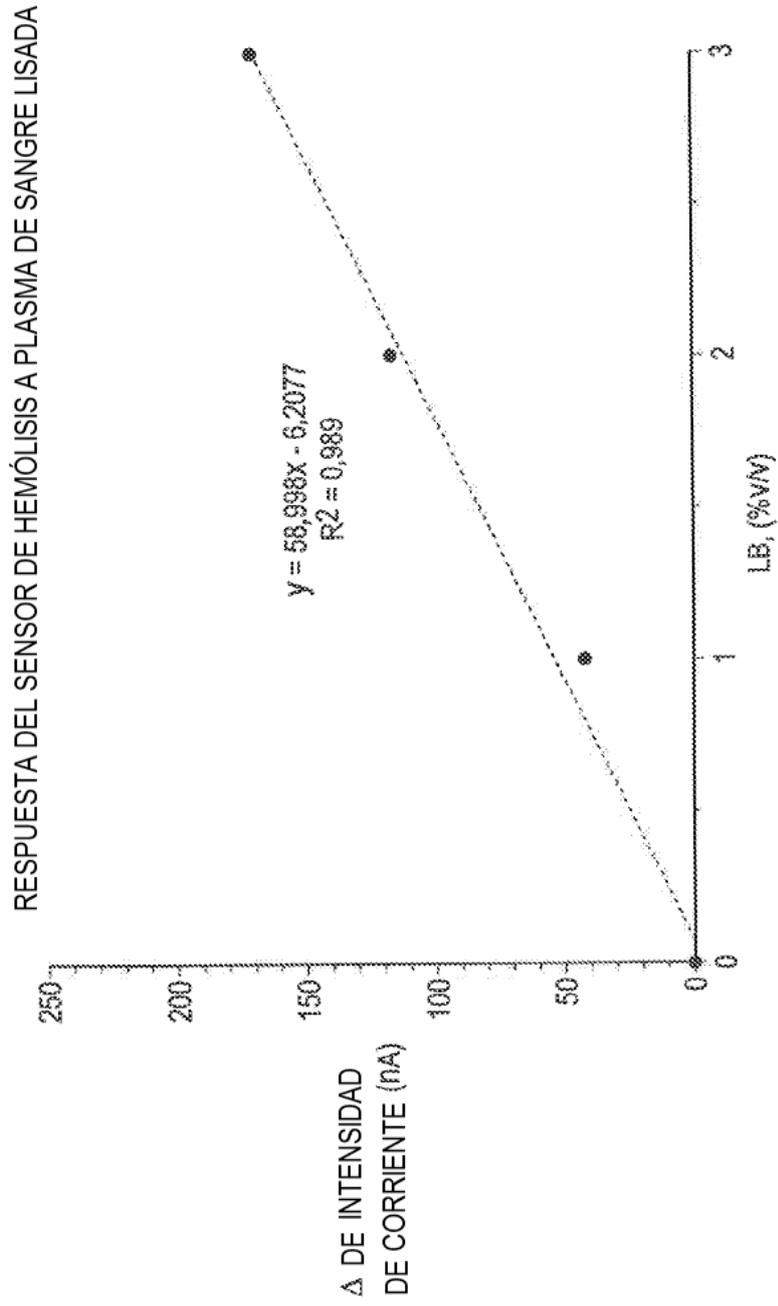


FIG. 9C

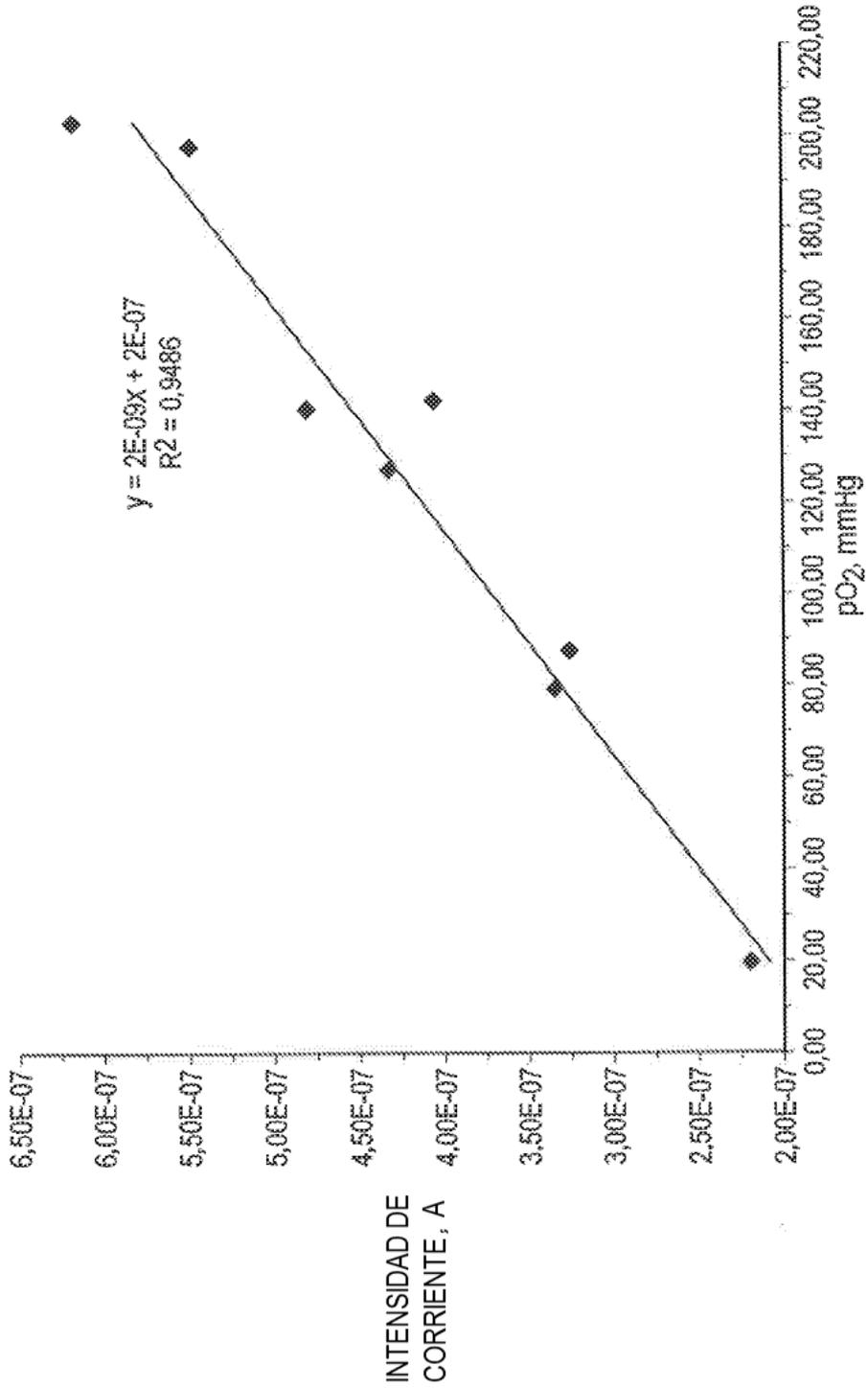


FIG. 10