

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 205**

51 Int. Cl.:

G01N 33/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2015** E 17189658 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020** EP 3282261

54 Título: **Método de análisis para componente de muestra biológica diluida**

30 Prioridad:

25.07.2014 WO PCT/JP2014/069718

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

04.02.2021

73 Titular/es:

**LEISURE, INC. (100.0%)
Access Building 2F, 2-33-8 Nihonbashi-Ningyo-
cho, Chuo-ku
Tokyo 103-0013, JP**

72 Inventor/es:

**OSAWA, SUSUMU;
SUGIMOTO, SHINYA y
YONEKUBO, ISAO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 804 205 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 de análisis para componente de muestra biológica diluida

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para medir un componente a analizar en una muestra biológica tal como sangre, en donde la muestra biológica se diluye con un tampón que tiene una composición específica, y se analiza un componente de muestra de plasma o actividad enzimática a partir de la solución mezclada en la muestra diluida.

10 La presente invención también se refiere a un método de análisis de una cantidad mínima de un componente de muestra biológica y al recuento de células sanguíneas, en donde una muestra biológica, tal como una cantidad mínima de sangre no cuantificada, se diluye con un tampón predeterminado, y se cuantifica un componente de muestra de plasma y se analiza la actividad enzimática a partir de la solución mezclada en la muestra diluida.

15 Antecedentes de la técnica

Para el diagnóstico de diversas enfermedades, la determinación de efectos terapéuticos y atención sanitaria, los pacientes o sujetos tienen que ir a una institución médica o lugar de examen médico para que se extraiga su sangre de la vena y se analice. Los pacientes o sujetos, sin embargo, tienen que esperar mucho tiempo hasta que se les informe de los resultados de la prueba. Los pacientes o sujetos también tienen que tomarse un permiso del trabajo para la prueba y requieren medio día o más.

25 Se ha informado de un método que permite analizar la sangre en cualquier momento y en cualquier lugar en el que se diluye una cantidad mínima de sangre con un tampón que contiene una sustancia patrón interna, y se cuantifica una cantidad desconocida de un componente presente en el plasma diluido a partir del factor de dilución de la sustancia patrón interna (véase la Referencia de patente 1, por ejemplo).

30 Específicamente, como un método en el que se diluye una cantidad mínima de sangre con un tampón predeterminado, y se cuantifica un componente de muestra de plasma y se analiza la actividad enzimática de la solución mezclada en la muestra diluida, se conoce un método que usa glicerol-3-fosfato o glicerol como sustancia patrón interna (véase la Referencia de patente 2, por ejemplo).

35 Para contar el número de un componente de células sanguíneas, se conoce un método que usa tiramina como la sustancia patrón interna para ser diluida (véase la Referencia de patente 3, por ejemplo).

Por otro lado, se ha informado de un método de prueba a partir de una cantidad mínima de sangre, que utiliza papel de filtro para recolectar la sangre (véase la Referencia de patente 4, por ejemplo).

40 La Referencia de patente 5 divulga un método para analizar un componente de muestra biológica en una cantidad menor de sangre y la Referencia de patente 6 divulga un análisis cuantitativo para determinar las cantidades de componentes presentes en una cantidad desconocida de muestra.

45 El uso de una cantidad mínima de sangre permite realizar una prueba independientemente del momento y el lugar, lo que se espera que contribuya al hallazgo de una etapa presintomática o al mantenimiento de la salud.

Listado de citas bibliográficas

Referencias de patentes

- 50 Referencia de patente 1: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2003--161729 A
 Referencia de patente 2: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2006--322829 A
 Referencia de patente 3: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2011--112451 A
 Referencia de patente 4: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 10-104226 A (1998)
 55 Referencia de patente 5: Documento WO 2011/065212 A1
 Referencia de patente 6: Documento EP 1 156335 A2

Sumario de la invención

60 Problema técnico

65 En el método convencional descrito anteriormente para calcular una relación de dilución, sin embargo, el glicerol-3-fosfato se usa como la sustancia patrón interna en la solución de plasma diluida, y el glicerol-3-fosfato se hidroliza mediante fosfatasa alcalina, que es una enzima presente *in vivo*, para producir glicerol. Por lo tanto, si la solución diluida se almacena durante mucho tiempo después de la adición de sangre, o si la temperatura se eleva, no se puede obtener una relación de dilución precisa de la sangre. Esto reduce la fiabilidad del valor medido del componente

biológico o actividad enzimática en el plasma inicial. Para superar esta situación, los métodos convencionales requieren la adición de EDTA como inhibidor enzimático. La adición de este inhibidor, sin embargo, no permite la inhibición enzimática completa. Por lo tanto, es necesario añadir además ácido fosfórico como inhibidor de la formación del producto. La adición de estas dos sustancias conduce a una disminución en la actividad de la aspartato aminotransferasa o alanina aminotransferasa. Como resultado, es necesario añadir un exceso de fosfato de piridoxal, que es un activador de estas enzimas.

Como sustancia patrón interna que resuelve estos problemas, se puede usar una sustancia cargada positivamente tal como colina. Dicha sustancia patrón interna, sin embargo, no es adecuada para el almacenamiento a largo plazo, ya que se adsorbe en un recipiente de plástico. Estas sustancias, que se reivindican en [Referencia de Patente 2], son altamente hidrófobas debido a la presencia de un anillo aromático en la molécula, y se adsorben en un recipiente de plástico después del almacenamiento a largo plazo, lo que impide una determinación precisa del factor de dilución de la sangre. Se ha encontrado que un compuesto, tal como etanolamina, es eficaz como una sustancia que no tiene un anillo aromático en la molécula y penetra a través de las células sanguíneas. Dicha sustancia rara vez está presente en la sangre y es un compuesto estable. Dicha sustancia también es soluble en un tampón para una solución patrón interna, y no se adsorbe en un recipiente de plástico después de un almacenamiento a largo plazo.

La presente invención se ha realizado para resolver los problemas descritos anteriormente. Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para calcular una relación de dilución que permita la cuantificación fácil y precisa de un componente en una cantidad pequeña y desconocida de una muestra de sangre completa diluida recolectada de la superficie del cuerpo de un sujeto, tal como un dedo.

Además, en el método descrito en la Referencia de patente 3, aunque el compuesto estable, glicerol-3-fosfato, se usa como una sustancia patrón interna, si la cantidad de la muestra es pequeña, la relación de dilución de la sustancia patrón interna será pequeña, lo que reduce la fiabilidad del factor de dilución.

Asimismo, como se describe en la referencia de patente 4, en el método en el que la sangre se absorbe en papel de filtro o un material poroso y posteriormente se seca y se envía por correo, y luego se extrae un componente de sangre, el componente puede desnaturalizarse durante el proceso de secado o durante el envío por correo. Adicionalmente, es necesario usar, como tampón para extraer un componente biológico de la muestra seca, un tampón que contenga NaOH, NaCl o HCl, para ajustar el pH o estabilizar el componente biológico. Por este motivo, la concentración de sodio o cloruro, que es el más hemostático de todos los componentes de la muestra y no varía significativamente entre individuos, no puede usarse como una sustancia patrón externa para corregir las concentraciones de otros componentes biológicos iniciales diluidos.

Por otro lado, en el método de dilución con un tampón, un componente biológico en una muestra biológica se almacena en un tampón en condiciones fisiológicas a pH 7,4, lo que conduce a una excelente estabilidad durante el transporte. En este método, sin embargo, la relación de dilución de la sustancia patrón interna en la muestra diluida con el tampón que contiene la sustancia patrón interna es pequeña y, por lo tanto, tiende a ocurrir un error de medición si la cantidad de la muestra añadida es pequeña.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método en el que una muestra biológica se diluye con un tampón para analizar cuantitativamente un componente a analizar en la muestra biológica, comprendiendo el método determinar una concentración del componente biológico en la muestra que contiene el componente biológico diluido con el tampón, mediante la determinación con precisión del factor de dilución de la muestra biológica a partir de la relación de dilución de un componente hemostático como patrón externo en la muestra, para analizar cuantitativamente el componente a analizar en la muestra biológica.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método en el que una muestra biológica se diluye con un tampón para analizar cuantitativamente un componente a analizar en la muestra biológica, comprendiendo el método determinar con precisión el factor de dilución de la muestra biológica para analizar cuantitativamente el componente a analizar en la muestra biológica, mediante la compensación de los inconvenientes tanto del método de determinación del factor de dilución de la muestra biológica utilizando una sustancia patrón interna como del método de determinación del factor de dilución de la muestra biológica utilizando una sustancia patrón externa.

Solución al problema

Para lograr el objeto descrito anteriormente, de acuerdo con la presente divulgación, el análisis de un componente biológico en una muestra biológica tal como sangre se realiza mediante: 1. La utilización de una sustancia patrón interna; o 2. La utilización de una sustancia patrón externa. De acuerdo con la presente invención, el análisis de un componente biológico en una muestra biológica tal como sangre se realiza mediante 3. La utilización de una sustancia patrón interna y una sustancia patrón externa.

1. Método de análisis utilizando una sustancia patrón interna (Método de patrón interno)

La presente divulgación proporciona un método de análisis de un componente biológico en una muestra biológica, tal

como sangre, que comprende analizar un tampón diluyente que contiene la muestra biológica, tal como sangre, y una sustancia patrón interna contenida en el tampón diluyente, calcular una relación de dilución, calcular una relación de dilución del componente biológico, tal como plasma, suero o células sanguíneas, y analizar el plasma o suero en la muestra biológica, tal como sangre, o el componente biológico en la muestra biológica.

5 En el método de análisis de un componente de muestra biológica en una muestra de plasma de acuerdo con la presente divulgación, la sustancia patrón interna en el tampón es preferentemente un componente que es estable durante un largo período de tiempo, y que no se adsorbe en un recipiente que contiene el tampón, es una sustancia que rara vez está contenida en la muestra biológica, tal como sangre, y es una sustancia que se puede analizar de manera fácil y precisa usando un analizador bioquímico automatizado, por ejemplo.

15 En el método de análisis de un componente de muestra biológica en una muestra de plasma de acuerdo con la presente divulgación, la sustancia patrón interna en el tampón es preferentemente un componente que no penetra a través de las células sanguíneas, y es una sustancia que puede reflejar con precisión la relación de dilución del plasma o suero. De manera similar, en el método de recuento de células sanguíneas, la sustancia patrón interna en el tampón es preferentemente un componente que penetra a través de las células sanguíneas, y es una sustancia que puede reflejar con precisión la relación de dilución de la sangre completa (plasma y células sanguíneas).

20 En el método de análisis de un componente de muestra biológica de acuerdo con la presente divulgación, el tampón preferentemente tiene una osmolalidad de 250 a 500 mOsm/kg con respecto a la membrana de las células sanguíneas, y tiene una composición de reactivos que no causa hemólisis de las células sanguíneas al mezclar la sangre.

25 En el método de análisis de un componente de muestra biológica de acuerdo con la presente divulgación, el tampón preferentemente tiene una composición que permite que el componente de muestra biológica en la sangre se mantenga estable sin desnaturalización.

En el método de análisis de un componente de muestra biológica de acuerdo con la presente divulgación, la sustancia patrón interna en el plasma contiene preferentemente litio o maltosa.

30 A partir de la relación de dilución del plasma, se puede determinar la concentración plasmática; sin embargo, no se puede determinar el volumen de las células sanguíneas. Si se puede determinar el volumen de sangre completa (plasma y células sanguíneas) en la sangre, será posible analizar la anemia.

35 Por lo tanto, la etanolamina está contenida preferentemente como la sustancia patrón interna que penetra en las células sanguíneas, que es hidrófoba y no se adsorbe en un plástico. La relación de dilución de la cantidad total de sangre se puede determinar mediante la medición de esta sustancia patrón interna.

La relación de volumen de células sanguíneas (valor de hematocrito) se puede determinar a partir de la relación de dilución del plasma en la sangre y la relación de dilución de la cantidad total de sangre.

40 2. Método de análisis utilizando una sustancia patrón externa (Método de patrón externo)

45 Se sabe que el sodio o el cloruro en la sangre tienen una homeostasis muy alta y no varían significativamente entre individuos. El sodio también tiene una concentración media de 142 mmol/l, que es alta para una concentración *in vivo* y, por lo tanto, permite la medición precisa de una concentración de muestra con un factor de dilución alto incluso cuando se diluye con un tampón. Cuando se usa sodio o cloruro como patrón externo, sin embargo, ha sido imposible usar un tampón que contenga sodio o cloruro como tampón diluyente.

50 Los presentes inventores consideraron inicialmente el uso de sodio, cloruro o proteína, que tiene una alta homeostasis *in vivo*, como sustancia patrón externa.

Para utilizar estas sustancias patrón externas, ha sido necesario evitar la presencia de sodio o cloruro en un tampón para la dilución de una muestra biológica. No ha existido previamente un tampón que tenga una capacidad tamponadora cercana al pH 7,4 y libre de álcalis (tal como NaOH). Los presentes inventores intentaron desarrollar un nuevo tampón y utilizaron un compuesto de aminoalcohol tal como 2-amino-2-metil-1-propanol, 2-etilaminoetanol, N-metil-D-glucamina, dietanolamina o trietanolamina, como compuesto alcalino que no contenía un metal alcalino (tal como NaOH) o iones de cloruro. Los inventores han hecho el nuevo hallazgo de que cuando estos compuestos se mezclan con un tampón de Good que tiene un excelente rendimiento para la investigación bioquímica y que tiene un pKa cercano a pH 7,4, que es HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico) o BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), como ácido, los tampones resultantes se pueden ajustar a pH 7,4. Los inventores también han descubierto que estos tampones están libres de sodio o cloruro, que es un ejemplo de una sustancia patrón externa, y no interfieren con un sistema de medición para medir el sodio o el cloruro. Además, los inventores han descubierto que los componentes diluidos con estos tampones no interfieren con varios métodos de medición que utilizan analizadores automatizados bioquímicos e inmunológicos, y que las células sanguíneas no están hemolizadas, y los componentes biológicos se pueden almacenar de manera estable a 37 °C. Además, para medir componentes

biológicos en plasma diluidos con un tampón, los componentes del tampón no deberían causar desnaturalización de estos componentes biológicos, ni afectar la estabilidad. Como ejemplo de esto, los inventores han descubierto que un tampón ajustado a pH 7,4 mediante la mezcla de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) con HEPES es estable sin causar desnaturalización de los componentes biológicos, y tampoco interfiere con reactivos para medir estos componentes biológicos.

Los inventores también han encontrado un método para cuantificar con precisión el sodio a baja concentración en una muestra biológica diluida con un tampón diluyente.

En la presente divulgación, el sodio y similares en plasma, que mantienen una determinada concentración en la muestra biológica, se usan como sustancias patrón externas. Estas sustancias son elementos y, por lo tanto, son componentes biológicos estables. Mediante la determinación del factor de dilución de plasma midiendo con precisión el sodio o similares como una sustancia patrón externa diluida con un tampón, es posible cuantificar un componente de muestra biológica con una concentración desconocida en el plasma diluido en la sangre recolectada y analizar la actividad enzimática de manera eficaz utilizando un analizador automatizado bioquímico o inmunológico comercial, para varias muestras.

3. Método de análisis utilizando una sustancia patrón interna y una sustancia patrón externa (Método híbrido)

Tal como se ha descrito anteriormente, el método de análisis utilizando solo una sustancia patrón interna y el método de análisis utilizando solo una sustancia patrón externa han permitido una medición precisa del componente a analizar en una cantidad mínima de la muestra biológica.

Los presentes inventores tenían como objetivo lograr una medición más precisa, y realizaron una extensa investigación sobre un método que tiene las ventajas del método que utiliza una sustancia patrón interna y el método que utiliza una sustancia patrón externa, mediante la compensación de los inconvenientes del método que utiliza una sustancia patrón interna y el método que utiliza una sustancia patrón externa.

Tal como se ha descrito anteriormente, se ha permitido una medición precisa mediante el uso de sodio, cloruro o proteína, que tiene una alta homeostasis *in vivo*, como sustancia patrón externa, y mediante el uso de un tampón libre de la sustancia utilizada como sustancia patrón externa. Sin embargo, a pesar de que estas sustancias tienen una alta homeostasis en individuos sanos, en algunos sujetos, el intervalo de concentraciones de estas sustancias puede estar fuera del de las personas sanas, lo que puede dar como resultado que no se proporcione una medición precisa.

Por otro lado, la concentración de la sustancia patrón interna en el tampón diluyente se puede establecer alta y, por lo tanto, se puede medir con precisión. Si la cantidad de la muestra biológica es pequeña, sin embargo, la dilución de la sustancia patrón interna será pequeña, lo que reduce la fiabilidad del factor de dilución. Como sustancia patrón interna de un compuesto orgánico, se puede usar glicerol-3-fosfato como una sustancia estable, y como una sustancia patrón interna de una sustancia inorgánica, se puede usar litio adecuadamente.

Los presentes inventores llevaron a cabo una extensa investigación sobre el desarrollo de un método que puede superar los inconvenientes del método que utiliza solo una sustancia patrón externa y el método que utiliza solo una sustancia patrón interna.

Los presentes inventores consideraron usar un elemento que perteneciera a metales alcalinos o metales alcalinotérreos que tuvieran una alta estabilidad para superar los inconvenientes de las sustancias patrón internas convencionales, y usar sodio, cloruro o proteína con alta homeostasis *in vivo* como sustancia patrón externa.

El uso de la sustancia patrón interna en combinación con la sustancia patrón externa, que es un componente con alta homeostasis en la muestra biológica, proporciona un método de cuantificación con alta precisión de medición, que permite cuantificar un componente diluido con alta fiabilidad, mediante la compensación de los inconvenientes de los dos métodos de cuantificación utilizando una sustancia patrón interna y una sustancia patrón externa. Por lo tanto, los presentes inventores completaron la presente invención.

La presente invención tiene las siguientes características. El sodio o similares en plasma, que mantiene una determinada concentración en una muestra biológica, se usa como sustancia patrón externa, y un elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tal como el litio, o glicerol-3-fosfato estable, se usa como una sustancia patrón interna que no está toda contenida o rara vez está contenida en el plasma y no pasa a través de la membrana de las células sanguíneas, y estas sustancias se añaden a un tampón. El problema con la estabilidad durante el almacenamiento se ha mantenido durante el uso de compuestos orgánicos utilizados convencionalmente como sustancias patrón internas, que son susceptibles a la acción enzimática. La sustancia patrón interna descrita anteriormente es estable durante un largo período de tiempo en el tampón y se puede cuantificar fácilmente. Además, el sodio utilizado como sustancia patrón externa en la muestra biológica a medir es un elemento y, por lo tanto, también es estable. Como resultado, es posible cuantificar un componente de muestra biológica con una concentración desconocida en el plasma diluido en la sangre recolectada y analizar la actividad enzimática de manera eficaz utilizando un analizador automatizado bioquímico o inmunológico comercial, para varias muestras.

En resumen, la presente invención es tal como se expone a continuación.

[3-1] Un método para cuantificar un componente a analizar en una muestra de sangre usando una sustancia patrón interna y una sustancia patrón externa que está comprendido homeostáticamente a una concentración predeterminada en la muestra de sangre, en donde la sustancia patrón interna es litio o glicerol-3-fosfato, y la sustancia patrón externa se selecciona del grupo que consiste en sodio, cloruro, albúmina y proteína total, comprendiendo el método

diluir la muestra con un tampón diluyente, en donde se añade una concentración predeterminada de la sustancia patrón interna al tampón diluyente y el tampón diluyente está libre de un componente que interfiere con la cuantificación de la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa,

eliminar las células sanguíneas de la muestra después de la dilución,

medir una concentración de la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa en la muestra de plasma diluida con el tampón diluyente,

calcular un factor de dilución de la muestra de sangre utilizando la concentración de la sustancia patrón interna y la concentración de la sustancia patrón externa y corregir el factor de dilución de la muestra de sangre determinado en función del valor medido de la concentración de la sustancia patrón interna, utilizando el valor medido de la concentración de la sustancia patrón externa,

medir el componente en la muestra de plasma diluida, y

cuantificar el componente mediante la multiplicación del valor medido del componente en la muestra diluida por el factor de dilución calculado.

[3-2] El método para cuantificar el componente de acuerdo con [3-1], en donde

el tampón diluyente comprende, como componentes del agente tamponador, un compuesto de aminoalcohol seleccionado del grupo que consiste en 2-amino-2-metil-1-propanol, 2-etilaminoetanol, N-metil-D-glucamina, dietanolamina y trietanolamina, y un agente tamponador seleccionado del grupo que consiste en HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]etanosulfónico), TES (ácido N-tris(hidroxi-metil)metil-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico) y BES (ácido N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-aminoetanosulfónico), y el tampón diluyente tiene una acción tamponadora entre pH 6,5 y 8,0.

[3-3] El método para cuantificar el componente de acuerdo con [3-1] o [3-2], en donde

el tampón diluyente está sustancialmente libre de la sustancia patrón externa.

[3-4] El método para cuantificar el componente de acuerdo con cualquiera de [3-1] a [3-3], en donde

el factor de dilución de una cantidad mínima de la muestra de sangre se calcula utilizando cualquiera de las fórmulas (1) a (4) que se muestran a continuación, se cuantifica el componente a analizar en plasma diluido y el valor de cuantificación se multiplica por el factor de dilución determinado utilizando cualquiera de las fórmulas (1) a (4) para cuantificar el componente a analizar en el plasma inicial:

Fórmula (1):

$$X = \frac{A+C}{B+D} \quad (1)$$

;

Fórmula (2):

$$X = \frac{\sqrt{A^2+C^2}}{\sqrt{B^2+D^2}} \quad (2)$$

;

Fórmula (3):

$$X = a \times (B + D) \pm b \quad (3)$$

en donde a y b son coeficientes; y los datos de B + D y el factor de dilución se adquieren por adelantado para preparar una curva patrón representada por $X = a \times (B + D) \pm b$; y

Fórmula (4):

$$X = A/B' \quad (4)$$

en donde $B' = (Ax D)/C$,

en donde A, B, C, D, B' y X en las fórmulas que se muestran arriba se definen de la siguiente manera:

A: absorbencia de la sustancia patrón interna en el tampón que comprende la sustancia patrón interna;

B: absorbencia de la sustancia patrón interna en el plasma diluido;

C: absorbencia de una mediana normal de la concentración de la sustancia patrón externa en plasma;

D: absorbencia de la sustancia patrón externa en el plasma diluido;

B': un valor de corrección para corregir la absorbencia de la sustancia patrón interna en el plasma diluido, obtenido mediante la utilización del factor de dilución calculado a partir de la absorbencia de la sustancia patrón externa; y

5 X: un factor de dilución de plasma,

en donde el plasma diluido se refiere al plasma obtenido mediante la dilución de la muestra de sangre con el tampón diluyente y la eliminación de las células sanguíneas de la misma.

10 [3-5] El método para cuantificar el componente de acuerdo con una cualquiera de [3-1] a [3-4], en donde el sodio, que es uno de los patrones externos en la muestra de sangre diluida con el tampón diluyente, se mide utilizando un método que se muestra a continuación, mediante la utilización de un fenómeno en el que la β -galactosidasa sufre un cambio en la actividad enzimática de acuerdo con la concentración de iones de sodio, y la concentración de iones de sodio se puede cuantificar a partir de la variación en la absorbencia de los mismos:

15 una muestra biológica se diluye con el tampón diluyente y se diluye adicionalmente con agua purificada; se añade un primer reactivo de un tampón que comprende β -galactosidasa en una cantidad de 10 a 30 veces la cantidad en volumen de la muestra diluida; la mezcla se calienta de 30 a 45 °C durante 2 a 20 minutos; se añade un segundo reactivo de una solución de sustrato que comprende o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido en la mitad de la cantidad del primer reactivo; y se mide la absorbencia del o-nitrofenol producido a una longitud de onda primaria de 410 nm y una longitud de onda secundaria de 658 nm.

20 [3-6] Uso de un tampón diluyente para diluir una cantidad mínima de la muestra de sangre en el método para cuantificar el componente de acuerdo con una cualquiera de [3-1] a [3-5], en donde el tampón diluyente comprende, como componentes del agente tamponador, un compuesto de aminoalcohol seleccionado del grupo que consiste en 2-amino-2-metil-1-propanol, 2-etilaminoetanol, N-metil-D-glucamina, dietanolamina y trietanolamina, y un agente tamponador seleccionado del grupo que consiste en HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]etanosulfónico), TES (ácido N-tris(hidroxi-metil)metil-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico) y BES (ácido N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-aminoetanosulfónico), y

25 el tampón tiene una acción tamponadora entre pH 6,5 y 8,0, y el tampón está sustancialmente libre de la sustancia patrón externa.

30 [3-7] El uso de acuerdo con [3-6], en donde el tampón se usa para un método de cuantificación del componente usando una sustancia patrón externa.

[3-8] El uso de acuerdo con [3-6], en donde el tampón se usa para un método de cuantificación del componente usando una sustancia patrón interna.

35 Efectos ventajosos de la invención

En el análisis de un componente de muestra biológica para analizar en una muestra biológica, el componente se analiza cuantitativamente mediante la determinación del factor de dilución de la muestra biológica utilizando la sustancia patrón interna o la sustancia patrón externa, lo que permite que el componente de muestra biológica sea analizado y medido de manera precisa, sin medir la cantidad de analito de muestra biológica de una cantidad mínima del componente de muestra biológica.

40

Además, de acuerdo con la presente invención, se puede realizar una cuantificación fácil y precisa, utilizando un recipiente de plástico, para plasma en la muestra biológica, tal como una cantidad mínima y desconocida de una muestra de sangre completa recogida del interior del cuerpo a través de un dedo o similar, así como cualquier componente de la muestra biológica. Asimismo, la relación de volumen de células sanguíneas (valor de hematocrito), que indica el grado de anemia, se puede determinar mediante el cálculo a partir de la relación de dilución del plasma y la relación de dilución de la sangre completa. Los componentes de las células sanguíneas (recuento de leucocitos: WBC, recuento de eritrocitos: RBC, cantidad de hemoglobina: Hgb, hematocrito: Hct) también se pueden contar mediante la utilización de la sustancia patrón interna en la sangre completa.

50

Asimismo, el uso de una sustancia patrón interna sola o una sustancia patrón externa sola a veces da como resultado una precisión o exactitud de cuantificación insuficiente. En la presente invención, tanto la sustancia patrón interna como la sustancia patrón externa se usan en combinación para determinar el factor de dilución de la muestra biológica, de modo que el factor de dilución determinado con la sustancia patrón interna se corrige en función del factor de dilución determinado con la sustancia patrón externa para proporcionar un valor más preciso, lo que permite que la cuantificación del componente se analice con mayor precisión.

55

Asimismo, debido a que no ha existido previamente un tampón que tenga una capacidad tamponadora a un pH casi neutro de 7,4 y esté libre de sodio o cloruro, ha sido imposible usar sodio o cloruro, que es una sustancia que tiene una alta homeostasis *in vivo*, como sustancia patrón externa. En el método de la presente invención, el uso del tampón recientemente desarrollado que tiene una capacidad tamponadora a un pH casi neutro de 7,4 y que está libre de sodio o cloruro ha permitido el uso de sodio o cloruro, que tiene una alta homeostasis, como sustancia patrón externa, lo que permite un análisis con mayor precisión y exactitud.

60

65 Con el método de la presente invención, se pueden realizar muchas pruebas usando una cantidad mínima de sangre (65 μ l), tal como para 13 elementos de pruebas bioquímicas, marcadores tumorales y pruebas de hepatitis. Este

método de prueba se puede realizar independientemente de la hora y el lugar y, por lo tanto, puede encontrar una etapa presintomática que no puede recibir un examen médico. Asimismo, la facilidad de las pruebas facilita la atención sanitaria, lo que permite reconocer un cambio dentro del cuerpo antes de que la enfermedad se vuelva grave. Esto también contribuirá al ahorro en los costes nacionales de atención sanitaria.

5

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra la composición de la sangre utilizada en el método de análisis de un componente de muestra biológica de la presente divulgación.

10 [Figura 2] La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra el estado en el que la sangre se ha diluido con un tampón predeterminado en el método de análisis de un componente de muestra biológica de la presente divulgación, cuyo diagrama ilustra el caso en donde se utiliza una sustancia patrón interna que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas y penetra solo en el plasma.

15 [Figura 3] La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra el estado en el que la sangre se ha diluido con un tampón predeterminado en el método de análisis de un componente de muestra biológica de la presente divulgación, cuyo diagrama ilustra el caso en donde se utiliza una sustancia patrón interna que tiene la propiedad de penetrar tanto en el plasma como en las células sanguíneas de la sangre.

[Figura 4] La Figura 4 muestra diagramas de correlación de pruebas bioquímicas entre plasma sanguíneo venoso y plasma diluido en la sangre recolectada de un dedo.

20 [Figura 5] La Figura 5 muestra diagramas de correlación obtenidos mediante el recuento de leucocitos (WBC), eritrocitos (RBC), la concentración de hemoglobina (Hgb), el valor del hematocrito (Hct) y el recuento de plaquetas (Plt), usando, como muestras, sangre completa que contiene EDTA-2Na en la sangre recolectada de la vena y sangre completa diluida obtenida mediante la dilución de esta sangre completa con una tampón de dilución de sangre.

25 [Figura 6] La Figura 6 muestra un diagrama de correlación entre el valor del hematocrito que representa el volumen de células sanguíneas en la sangre, determinado en base a una fórmula, mediante la utilización de la relación de dilución plasmática determinada con maltosa como patrón interno y la relación de dilución de sangre completa determinada con etanolamina, y el valor del hematocrito determinado para sangre completa usando un contador de células sanguíneas.

30 [Figura 7] La Figura 7 es un diagrama que muestra la linealidad del método de medición enzimática para el sodio.

[Figura 8] La Figura 8 es un diagrama que muestra la linealidad del método de medición de cloruro. [Figura 9] La Figura 9 es un diagrama que muestra la linealidad entre la concentración de litio y la absorbencia.

[Figura 10-1] La Figura 10-1 muestra diagramas de correlación entre los valores medidos de plasma diluido y los valores medidos de plasma inicial determinados usando el método híbrido (proteína total y albúmina).

35 [Figura 10-2] La Figura 10-2 muestra diagramas de correlación entre los valores medidos de plasma diluido y los valores medidos de plasma inicial determinados usando el método híbrido (AST y ALT).

[Figura 10-3] La Figura 10-3 muestra diagramas de correlación entre los valores medidos de plasma diluido y los valores medidos de plasma inicial determinados usando el método híbrido (colesterol HDL y γ GTP).

[Figura 10-4] La Figura 10-4 muestra diagramas de correlación entre los valores medidos de plasma diluido y los valores medidos de plasma inicial determinados usando el método híbrido (colesterol total y triglicérido).

40 [Figura 10-5] La Figura 10-5 muestra diagramas de correlación entre los valores medidos de plasma diluido y los valores medidos de plasma inicial determinados usando el método híbrido (nitrógeno ureico y creatinina).

[Figura 10-6] La Figura 10-6 muestra diagramas de correlación entre los valores medidos de plasma diluido y los valores medidos de plasma inicial determinados usando el método híbrido (ácido úrico y glucosa en sangre).

45

Descripción de aspectos y realizaciones

1. Método de análisis utilizando una sustancia patrón interna (Método de patrón interno)

50 La presente divulgación tiene las siguientes características. Específicamente, de acuerdo con una característica de la presente divulgación, se proporciona un método para cuantificar un componente en una concentración desconocida de una muestra biológica recolectada que contiene células sanguíneas y analizar la actividad enzimática, en el que se prepara una sustancia patrón interna que es un componente no contenido en absoluto o raramente contenido en la muestra biológica y que no pasa a través de la membrana de las células sanguíneas, y esta sustancia patrón interna se añade a un tampón. La concentración de la sustancia patrón interna en el tampón antes de la adición de sangre se analiza para obtener la absorbencia, y la concentración de la sustancia patrón interna en el tampón diluido después de la adición de sangre se mide para obtener la absorbencia, y la relación de dilución plasmática en la sangre se determina a partir de la relación de estas absorbencias, para determinar la cantidad del componente biológico o de la actividad enzimática en la sangre inicial. En este caso, el tampón se prepara preferentemente para tener una osmolalidad sustancialmente igual a la osmolalidad de la sangre.

60

Con el método de la presente divulgación, es innecesario determinar la cantidad de analito de la muestra biológica para determinar el factor de dilución del plasma.

65 Un método que utiliza la sustancia patrón interna se denominará "método de patrón interno". Por ejemplo, un método que utiliza litio como la sustancia patrón interna se denominará "método de patrón interno de litio (Li)".

La muestra descrita anteriormente con una concentración desconocida puede ser una muestra biológica que no contiene células sanguíneas (tal como saliva u orina). La sustancia patrón interna utilizada en este caso puede ser una sustancia que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas.

5 Un método representativo para medir la concentración de una sustancia patrón interna en el tampón puede ser un método de medición enzimática en el que se produce peróxido de hidrógeno mediante la adición de una oxidasa que utiliza como sustrato la sustancia patrón interna o una sustancia procedente de la sustancia patrón interna, y se mide y cuantifica la coloración de un pigmento de quinona, NAD(P)H, o una sal de tetrazonio obtenida mediante condensación oxidativa de un reactivo de Trinder y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa como la absorbencia.

10 Otros métodos para cuantificar la sustancia patrón interna incluyen un método en el que se mide directamente la absorbencia de la sustancia patrón interna; un método en el que se mide la absorbencia o quimioluminiscencia mediante el uso de un anticuerpo y un anticuerpo marcado para la sustancia patrón interna; y cromatografía. Se puede emplear cualquier método de cuantificación adecuado para la sustancia patrón interna utilizada.

15 Para determinar con precisión la relación de dilución de un componente de plasma en sangre diluido con un tampón, la sustancia patrón interna que se mezclará con el tampón debe ser una sustancia que esté ausente *in vivo* o presente solo en una cantidad extremadamente pequeña *in vivo*, que no penetre a través de la membrana de las células sanguíneas, que sea estable en el tampón y que no se adsorba en un recipiente. La sustancia patrón interna también debe ser una sustancia que no interfiera con otros componentes biológicos.

20 Tal como se muestra en la Figura 1, se sabe que la sangre 1 está compuesta de plasma o suero 2, que es un componente líquido, y de células sanguíneas 3, que son un componente sólido, y que las células sanguíneas 3 tienen un componente sólido tal como la membrana de las células sanguíneas y un componente líquido dentro de la membrana de las células sanguíneas. La adición de EDTA-2Na como anticoagulante a la sangre 1 puede inhibir la coagulación de las células sanguíneas 3. Cuando esta sangre completa se centrifuga, las células sanguíneas 3, que tienen una gravedad específica mayor, se sedimentan en la capa inferior, y el plasma se separa en el sobrenadante.

25 Tal como se muestra en la Figura 2, una sustancia patrón interna 5 que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas se coloca de antemano en un tampón 4 en un recipiente (Figura 2(a)), y la sangre 1 recolectada se introduce desde arriba del recipiente en el lado superior de la capa mixta del tampón 4 y la sustancia patrón interna 5 (Figura 2(b)). Cuando la sangre 1 se diluye luego con el tampón 4 predeterminado, el componente, que está originalmente presente en el plasma o suero 2 y que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, se distribuye por todo el tampón 4 y el plasma o suero 2, y se diluye, formando así una solución 6 de sangre diluida (Figura 2(c)).

30 En este caso, cuando una cantidad prescrita de la sustancia patrón interna 5 que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas se disuelve en el tampón 4, la sustancia patrón interna 5 originalmente presente en el tampón se distribuye por todo el tampón 4 y el plasma o suero 2, y se diluye. La maltosa que penetra solo en el plasma 2, por ejemplo, está contenida como la sustancia patrón interna 5. Debido a que la maltosa se disuelve como aniones en el tampón 4, se disuelve en el plasma 2, pero no penetra en las células sanguíneas 3.

35 La sustancia patrón interna que se añadirá al tampón para la determinación de la relación de dilución del componente plasmático es un compuesto con un peso molecular de 500 o menos y que tiene un sustituyente en la molécula seleccionado del grupo que consiste en un ion sulfato ($-\text{SO}_3^-$), un ion carboxilo ($-\text{COO}^-$), un grupo tiol ($-\text{SH}$) y una amina cuaternaria ($-\text{NH}_3^+$), cuyo compuesto se selecciona del grupo que consiste en disacáridos tales como maltosa, ácido glutámico, leucina, valina, isoleucina, 4-hidroxibenceno, ácido hidroxibutírico, creatina, ácido málico, metales (litio, sodio, potasio y cloruro), y reactivos de Trinder que tienen un grupo sulfato en la molécula, tales como (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metoxianilina), ADPS (N-etil-N-sulfopropil-3-metoxianilina), ALPS (N-etil-N-sulfopropil-anilina), DAOS (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina), HDAOS (N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina), MAOS (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina), TOOS (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metoxianilina) y TOPS (N-etil-N-sulfopropil-3-metil-anilina). Entre los anteriores, se prefiere el litio.

40 La Figura 3 es un diagrama que ilustra la distribución de la sustancia patrón interna 5 en toda la sangre (el plasma 2 + las células sanguíneas 3). La sustancia patrón interna 5 (por ejemplo, etanolamina), utilizada en el caso que se muestra en la Figura 3, penetra tanto en el plasma 2 como en las células sanguíneas 3. La sustancia patrón interna 5 que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas se coloca de antemano en un tampón 4 en un recipiente (Figura 3(a)), y la sangre 1 recolectada se introduce desde arriba del recipiente en el lado superior de la capa mixta del tampón 4 y la sustancia patrón interna 5 (Figura 3(b)). Cuando la sangre 1 se diluye luego con el tampón 4 predeterminado, la sustancia patrón interna, que está originalmente presente en el plasma o suero 2 y que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, está presente tanto en las células sanguíneas 3 como en el plasma o suero 2 y de manera uniforme dispersa en el plasma o suero 2, formando así una solución 6 de sangre diluida (Figura 3(c)). Específicamente, debido a que la sustancia patrón interna 5, utilizada en el caso que se muestra en la Figura 3, se distribuye tanto en el plasma 2 como en las células sanguíneas 3, se puede determinar el factor de dilución diluido con el tampón 4.

La sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas puede ser un compuesto que tenga un peso molecular de 500 o menos y que tenga un sustituyente hidrófobo tal como un grupo amino (-NH₂), un grupo alquilo (-CH₃ o -C₆H₆), un grupo éster (-COOR), un grupo alcoxi (-OR) o halógeno (-Cl, -Br o -I), tal como, por ejemplo, etanolamina, hexilamina, feniletilamina, amilamina, histamina, putrescina, hipoxantina, triptófano, pregnenolona o β-sitosterol. El análisis se puede realizar con el método de medición enzimática utilizando una oxidasa correspondiente a cualquiera de estos patrones internos.

Estas sustancias patrón internas se distribuyen en las células sanguíneas y el plasma y, por lo tanto, se pueden usar para determinar el factor de dilución de la sangre completa (el plasma + las células sanguíneas).

El tampón 4 para diluir un componente biológico debe ser miscible en cualquier cantidad con la muestra biológica, y ser capaz de mantener de manera estable el componente a medir en la muestra biológica. Los ejemplos de componentes del tampón 4 incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen una capacidad tamponadora tal como tampón HEPES {ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico}, tampón ACES [ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico], tampón ADA [ácido N-(2-acetamido)iminodiacético], tampón BES [ácido N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminosulfónico], tampón Bicina [N,N-bis(2-hidroxietil)glicina], tampón Bis-Tris [bis(2-hidroxietil)iminotris(hidroximetil)metano], tampón CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico), tampón CAPSO (ácido N-ciclohexil-2-hidroxi-3-aminopropanosulfónico), tampón CHES (ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico), tampón DIPSO {ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropanosulfónico}, tampón EPPS {ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico}, tampón HEPPSO {ácido 2-hidroxi-3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico monohidrato}, tampón MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato), tampón MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico), tampón MOPSO (ácido 2-hidroxi-3-morfolinopropanosulfónico), tampón TUBOS [piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico)], tampón POSO [piperazina-1,4-bis(ácido 2-hidroxi-3-propanosulfónico) dihidrato], tampón TAPS [ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico], tampón TAPSO [ácido 2-hidroxi-N-tris(hidroximetil)metil-3-aminosulfónico], tampón TES [ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico], tampón Tricina {N-[tris(hidroximetil)metil]glicina}, tampón acetato, tampón fosfato, tampón citrato, tampón borato, tampón tartrato y solución salina tamponada con fosfato. Aunque la concentración del tampón no está particularmente limitada, es preferentemente de 0,1 a 1000 mmol/l, y, de manera particular, es preferentemente de 10 a 500 mmol/l. Aunque el pH del tampón no está particularmente limitado, deseablemente está cerca del pH inicial de la muestra biológica en vista de la estabilidad de la muestra biológica a diluir, y el pH es preferentemente de 6 a 8 en el caso de sangre, plasma o suero.

Con el fin de mantener estable el componente a medir, el tampón diluyente puede contener un agente quelante, un agente antimicrobiano, un conservante, una coenzima, un sacárido, un inhibidor y similares.

Ejemplos de agentes quelantes incluyen etilendiaminatetraacetato, citrato y oxalato. Ejemplos de agentes antimicrobianos o conservantes incluyen sulfato de amikacina, sulfato de canamicina, tiabendazol y azida de sodio. Ejemplos de coenzimas incluyen fosfato de piridoxal, magnesio y zinc. Ejemplos de sacáridos incluyen manitol, dextrosa y oligosacáridos. Ejemplos de inhibidores incluyen dodecil sulfato de sodio, mercurio y heparina.

Se puede añadir una combinación de una pluralidad de tipos de estabilizadores dependiendo del componente a medir. Cuando la sangre, el plasma o el suero se diluye con el tampón, y los componentes a medir son AST (aspartato aminotransferasa) y ALT (alanina aminotransferasa), el tampón contiene preferentemente etilendiaminotetraacetato y fosfato de piridoxal. En este caso, el tampón deseablemente contiene de 0,1 a 5,0 mmol/l de etilendiaminotetraacetato y de 0,01 a 0,20 mmol/l de fosfato de piridoxal, y, de manera particular, preferentemente contiene de 0,5 a 3,0 mmol/l de etilendiaminotetraacetato y de 0,02 a 0,10 mmol/l de fosfato de piridoxal.

Es necesario que la sustancia patrón interna que se añade al tampón esté ausente *in vivo* o esté presente solo en una cantidad extremadamente pequeña *in vivo*, que no interfiera con el componente biológico, que sea estable en el tampón, que no se adsorba a un recipiente de almacenamiento, y que permita el uso de un sistema de detección que permita una medición precisa. Además, para la dilución de la sangre, la sustancia patrón interna necesita tener una osmolalidad que no disuelva las células sanguíneas, y preferentemente tiene una osmolalidad de 250 a 500 mOsm/kg.

La Tabla 1 muestra la composición de un ejemplo del tampón que contiene sarcosina, que es una de las sustancias patrón internas que no penetran a través de la membrana de las células sanguíneas, y etanolamina, que es una de las sustancias patrón internas que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas.

[Tabla 1]

Composición de un tampón que contiene maltosa y etanolamina	
Nombre de la sustancia	Concentración
HEPES	100 mM
Maltosa	3,87 mM
Etanolamina	4,37 mM

ES 2 804 205 T3

Cloruro de Sodio	154 mM
EDTA-2Na	1,34 mM
Fosfato de piridoxal	0,03 mM
Amikacina	0,0012 %
pH	7,4

En la tabla 1, HEPES se refiere al ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico.

5 La Tabla 2 muestra los reactivos para medir la sarcosina, que es una de las sustancias patrón internas que no pasan a través de la membrana de las células sanguíneas.

[Tabla 2]

Reactivos para medir maltosa			
R-1		R-2	
Nombre de la sustancia	Concentración	Nombre de la sustancia	Concentración
Tampón MES-NaOH	0,1 mol/l	Tampón MES-NaOH	0,1 mol/l
Glucosa oxidasa	50 U/ml	Glucosidasa	15 U/ml
Glucosa oxidasa	U/ml	4-Aminoantipirina	4,0 mM
Mutarotasa	1,3 U/ml	Peroxidasa	16 U/ml
TOOS	1,5 mM	pH	6,5
pH	6,5		

En la tabla 2, TOOS se refiere a sal de sodio de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina dihidrato.

10 El procedimiento para medir maltosa se da a continuación.

R1 y R2 mostrados arriba se usan para medir maltosa.

- 15
1. Mezclar 7,0 µl de la mezcla de muestra biológica con 90 µl de R1, y permitir que la mezcla repose a 37 °C durante 5 minutos.
 2. Medir la absorbencia a 545/658 nm -- A1 (absorbencia).
 3. Mezclar 30 µl de R2 y permitir que la mezcla repose a 37 °C durante 5 minutos.
 4. Medir la absorbencia a 545/658 nm -- A2 (absorbencia).
- 20

La absorbencia se puede expresar como la diferencia entre los valores medidos. Por lo tanto, la absorbencia se obtiene generalmente como $\Delta A = A2 - A1$.

25 La Tabla 3 muestra los reactivos para medir la etanolamina, que es una de las sustancias patrón internas que pasa a través de la membrana de las células sanguíneas.

[Tabla 3]

Reactivos para medir etanolamina			
R-1		R-2	
Nombre de la sustancia	Concentración	Nombre de la sustancia	Concentración
Tampón HEPES-NaOH	0,1 mol/l	Tampón HEPES-NaOH	0,1 mol/l
DAOS	1,6 mmol/l	4-Aminoantipirina	0,4 mmol/l
Peroxidasa	5 U/ml	Tiramina oxidasa	20 U/ml
Ascorbato Oxidasa	7,4 U/ml		
pH	7,9	pH	7,9

En la tabla 3, DAOS se refiere a la sal de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetilanilina.

30 El procedimiento para medir etanolamina se da a continuación.

R1 y R2 mostrados arriba se usan para medir etanolamina.

- 35
1. Mezclar 11 µl de la mezcla de muestra biológica con 90 µl de R1, y permitir que la mezcla repose a 37 °C durante 5 minutos.
 2. Medir la absorbencia a 596/805 nm -- A3 (absorbencia).

ES 2 804 205 T3

3. Mezclar 45 µl de R2 y permitir que la mezcla repose a 37 °C durante 5 minutos.
4. Medir la absorbencia a 546/884 nm -- A4 (absorbencia).

5 La absorbencia se puede expresar como la diferencia entre los valores medidos. Por lo tanto, la absorbencia se obtiene generalmente como $\Delta A = A4 - A3$.

10 Se sabe que la relación entre la absorbencia y la concentración es $A = \epsilon X c x 1$ de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, en donde A (absorbencia), ϵ (coeficiente de extinción molar), c (concentración molar del soluto) y 1 (longitud óptica de la trayectoria). La absorbencia (A) y la concentración molar (c) del soluto están en relación proporcional, y en general, la concentración del soluto en una muestra desconocida se puede calcular utilizando una curva de calibración obtenida mediante la medición de soluciones en las que se disuelven las concentraciones conocidas del soluto.

15 Tal como se muestra en la Figura 1, se sabe que la sangre 1 está compuesta de plasma 2 o suero, que es un componente líquido, y de células sanguíneas 3, que son un componente sólido, y que las células sanguíneas 3 tienen un componente sólido tal como la membrana de las células sanguíneas y un componente líquido dentro de la membrana de las células sanguíneas. La adición de EDTA-2Na como anticoagulante a la sangre puede inhibir la coagulación de las células sanguíneas. Cuando esta sangre completa se centrifuga, las células sanguíneas, que tienen una gravedad específica mayor, se sedimentan en la capa inferior, y el plasma se separa en el sobrenadante.

20 Tal como se muestra en la Figura 2, cuando la sangre 1 se diluye con el tampón 4 predeterminado, el componente, que está originalmente presente en el plasma 2 o suero y que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, se distribuye por todo el tampón 4 y el plasma 2 o suero, y se diluye.

25 En este caso, cuando una cantidad prescrita de la sustancia patrón interna 5 que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas se disuelve en el tampón 4, la sustancia patrón interna originalmente presente en el tampón se distribuye por todo el tampón y el plasma o suero, y se diluye. Este patrón interno representa un patrón interno que penetra solo en el plasma, tal como la maltosa. Debido a que la maltosa se disuelve como aniones en el tampón, se disuelve en el plasma, pero no penetra en las células sanguíneas.

30 Específicamente, una concentración inicial (C0) de la sustancia patrón interna 5, que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas en el tampón 4, cambia a una concentración (C1) tras la adición de la sangre. Una relación de dilución del plasma o suero, $(r1) = C0/(C0 - C1)$, se calcula a partir de C0 y C1. La cantidad de tampón se supone como V0, y la cantidad total del tampón al que se ha añadido el plasma o suero se asume como V1. En el presente documento, la relación de dilución del componente que está presente originalmente en el plasma o suero y que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas es igual a la relación de dilución del plasma 2 o suero y, por lo tanto, se calcula en función de $r1 = (V0 + V1)/V1 = C0/(C0 - C1)$.

40 Cuando la sangre 1 se diluye con el tampón 4 predeterminado, el componente, que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, se distribuye por todo el tampón y el plasma o suero y las células sanguíneas, y se diluye. En este caso, cuando una cantidad prescrita de la sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas se disuelve en el tampón, la sustancia patrón interna originalmente presente en el tampón se distribuye por todo el tampón y el plasma o suero y las células sanguíneas, y se diluye. Cuando el volumen de la membrana de las células sanguíneas se asume como (V3), una concentración inicial (C2) de la sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas en el tampón cambia a una concentración (C3) tras la adición de la sangre. Una relación de dilución de la sangre completa, $(r2) = (V0 + V1 + V2 + V3)/(V1 + V2 + V3) = C2/(C2 - C3)$, se calcula a partir de C2 y C3. En el presente documento, la relación de dilución del componente que está presente originalmente en el plasma o suero y el líquido de las células sanguíneas y que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas es igual a la relación de dilución de la sangre completa y, por lo tanto, se calcula en función de $r2 = (V0 + V1 + V2 + V3)/(V1 + V2 + V3) = C2/(C2 - C3)$.

Estas fórmulas son aplicables a todos los casos que se muestran en la Tabla 4 a continuación.

[Tabla 4]

	Sustancia patrón interna en la solución	Elementos que se pueden calcular
1	La sustancia patrón interna que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas	La relación de dilución (r1) del componente de muestra biológica que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas
2	La sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas	La relación de dilución (R2) de la sangre completa
3	La sustancia patrón interna que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas y la sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas	La relación de dilución (r1) del componente de la muestra biológica que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas y la relación de dilución (r2) de la sangre completa

Además, cuando la muestra biológica se diluye con una solución que contiene la sustancia patrón interna que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, si el volumen (V0) de la solución que contiene la sustancia patrón interna es una cantidad prescrita, el volumen (V1) de la muestra biológica, que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, se puede calcular a partir de la relación de dilución (r1) del componente de la muestra biológica que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas calculada en función de la sustancia patrón interna que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas.

5

10 Específicamente, se puede calcular $V1 = V0/(r1 - 1)$.

Asimismo, cuando la muestra biológica se diluye con una solución que contiene la sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, si el volumen (V0) de la solución que contiene la sustancia patrón interna es una cantidad prescrita, el volumen de la sangre (V1 + V2 + V3) se puede calcular a partir de la relación de dilución (r2) de la sangre calculada en función de la sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas.

15

Específicamente, se puede calcular $V1 + V2 + V3 = V0/(r2 - 1)$.

20 Cuando la muestra biológica se diluye con una solución que contiene la sustancia patrón interna que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas y la sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, $V2 + V3 = (V1 + V2 + V3) - V1 = V0/(r2 - 1) - V0/(r1 - 1)$ se puede calcular a partir de las fórmulas, V1, determinada a partir de V0 y r1, y V1 + V2 + V3, determinada a partir de V0 y r2.

25 También se sabe que las células sanguíneas están compuestas por un 65 % del líquido y un 35 % del sólido.

$$V2/(V2 + V3) = 0,65,$$

de este modo,

30

$$V2 = 0,65 \times \{V0/(r2 - 1) - V0/(r1 - 1)\}$$

$$V3 = 0,35 \times V2/0,65$$

35

$$V3 = 0,35 \times \{V0/(r2 - 1) - V0/(r1 - 1)\}.$$

Por lo tanto, cuando la muestra biológica se diluye con la solución que contiene la sustancia patrón interna que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, la solución que contiene la sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, o la solución que contiene la sustancia patrón interna que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas y la sustancia patrón interna que penetra a través de la membrana de las células sanguíneas, V1, V2 y V3 se pueden calcular a partir de V0, r1 y r2.

40

Asimismo, las combinaciones de V0, r1, r2, V1, V2 y V3 permiten, por ejemplo, calcular los siguientes elementos:

- 45 la cantidad de plasma o suero (V1);
 la relación de dilución de plasma o suero (r1);
 la cantidad de plasma o suero y el líquido de las células sanguíneas (V1 + V2);
 la relación de dilución de la sangre completa (r2);
 la cantidad de sangre (V1 + V2 + V3);
 50 la relación de dilución de la sangre $\{(V0 + V1 + V2 + V3)/(V1 + V2 + V3)\}$;
 la cantidad de células sanguíneas (V2 + V3);
 la relación de dilución de las células sanguíneas $\{(V0 + V2 + V3)/(V2 + V3)\}$;
 la cantidad del líquido de las células sanguíneas (V2);
 la relación de dilución del líquido de las células sanguíneas $\{(V0 + V2)/V2\}$;

- la cantidad del sólido de células sanguíneas (V_3);
 la relación de dilución del sólido de células sanguíneas $\{(V_0 + V_3)/V_3\}$;
 el valor del hematocrito (%) $\{(V_2 + V_3)/(V_1 + V_2 + V_3) \times 100 (\%)\}$ o $1 - (\text{relación de dilución de sangre} - 1)/(\text{relación de dilución de plasma} - 1)$;
- 5 la cantidad del tampón (V_0);
 la relación de dilución del tampón con respecto al plasma o suero $\{(V_0 + V_1)/N_0\}$;
 la relación de dilución del tampón con respecto al plasma o suero y el líquido de las células sanguíneas $\{(V_0 + V_1 + V_2)/V_0\}$;
- 10 la relación de dilución del tampón con respecto a la sangre $\{(V_0 + V_1 + V_2 + V_3)/V_0\}$;
 la relación de dilución del tampón con respecto al líquido de las células sanguíneas $\{(V_0 + V_2)/V_0\}$;
 la relación de dilución del tampón con respecto al sólido de células sanguíneas $\{(V_0 + V_3)/V_0\}$; y
 la relación de dilución del tampón con respecto a las células sanguíneas $\{(V_0 + V_2 + V_3)/V_0\}$.

15 Los elementos que se pueden calcular usando V_0 , r_1 , r_2 , V_1 , V_2 y V_3 solos o en combinación no se limitan a los ejemplos dados anteriormente.

2. Método de análisis utilizando una sustancia patrón externa (Método de patrón externo)

20 La presente divulgación proporciona un método para cuantificar un componente a analizar que se cuantificará en una muestra biológica después de que la muestra biológica, tal como sangre, se diluya con un tampón, en donde se determina una relación de dilución de la muestra biológica usando una sustancia patrón externa, que es un componente de la muestra biológica, y el componente a analizar en la muestra biológica se cuantifica en función del factor de dilución.

25 Con el método de la presente divulgación, es innecesario determinar la cantidad de analito de la muestra biológica para determinar el factor de dilución de la muestra biológica.

30 Un método que utiliza la sustancia patrón externa se denominará "método de patrón externo". Por ejemplo, un método que utiliza sodio como la sustancia patrón externa se denominará "método de patrón externo de sodio (Na)".

El factor de dilución se determina utilizando la sustancia patrón externa, que es un componente hemostático contenido en el componente biológico.

35 Ejemplos de la muestra biológica a analizar en la presente divulgación incluyen muestras biológicas tales como sangre, suero, plasma, orina, saliva, linfa, líquido espinal, líquido intercelular y sudor, siendo particularmente preferidos la sangre, el suero y el plasma. En particular, en un aspecto preferido de la presente divulgación, se recoge una cantidad mínima de sangre de un sujeto y se diluye con un tampón, las células sanguíneas se separan posteriormente mediante filtración o centrifugación, y el componente a analizar se mide usando el plasma o suero obtenido. Además, en la presente divulgación, una cantidad mínima de la muestra biológica será suficiente porque la muestra biológica se diluye con el tampón diluyente. En particular, cuando la muestra biológica es sangre, el componente a analizar se puede medir usando una cantidad mínima, es decir, 200 μl o menos, de una muestra de sangre.

40

La muestra biológica puede proceder de fuentes tales como animales, peces y pájaros, sin limitarse a seres humanos. Ejemplos de animales incluyen un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato, un ratón, un oso y un oso panda.

45

El componente de la muestra biológica a analizar no está limitado, y pueden analizarse diversas sustancias contenidas en la muestra biológica. Ejemplos de dichas sustancias incluyen elementos de pruebas bioquímicas en sangre utilizadas para el diagnóstico clínico y marcadores para diversas enfermedades, tales como marcadores tumorales o marcadores de hepatitis, por ejemplo, proteínas, azúcar, lípidos y compuestos de bajo peso molecular. Además, no solo se puede medir la concentración de una sustancia sino también la actividad de una sustancia con actividad tal como una enzima. La medición de cada uno de los componentes a analizar se puede realizar utilizando un método conocido.

50

La sustancia patrón externa es preferentemente una sustancia contenida en la muestra biológica y que tiene una alta homeostasis, es decir, una sustancia cuya concentración en la muestra biológica no muestra variaciones fisiológicas significativas, y también es preferentemente una sustancia cuya concentración en la muestra biológica no varía significativamente entre individuos humanos. Ejemplos de tales sustancias incluyen sodio (Na^+), cloruro (Cl^-) y proteínas. Ejemplos de proteínas incluyen albúmina y proteína total en suero, que están contenidas en la sangre y tienen una alta homeostasis. En particular, se prefiere el sodio porque tiene una alta homeostasis y no varía significativamente entre individuos.

55

60

El valor normal de la concentración de sodio en plasma humano, es decir, la concentración de sodio en plasma de individuos sanos, es de aproximadamente 135 a 145 mmol/l (mEq/l), y la mediana es de aproximadamente 142 mmol/l . En el 95 % de los sujetos, la concentración de sodio en plasma cae dentro del intervalo normal de concentraciones. En el 2,5 % de los sujetos, la concentración de sodio en plasma es más baja que el intervalo normal de

65

concentraciones, y en el 2,5 % de los sujetos, la concentración de sodio en plasma es más alta que el intervalo normal de concentraciones. El factor de dilución de la muestra biológica utilizada como analito se puede determinar en función de la concentración de la sustancia patrón externa después de la dilución con el tampón y el valor promedio de la concentración de sodio en plasma de individuos sanos. Cuando se usa una muestra biológica que no sea sangre, suero o plasma como muestra biológica, el factor de dilución se puede determinar en función de la mediana de la concentración de sodio en la muestra biológica.

Debido a que una sustancia contenida en la muestra biológica se usa como sustancia patrón externa, es necesario usar, como tampón para diluir la muestra biológica, un tampón que esté libre de la sustancia patrón externa o que contenga solo la sustancia patrón externa a una concentración extremadamente baja que no afecte la medición de la sustancia patrón externa en la mezcla después de diluir la muestra biológica. También es necesario usar un tampón que esté libre de una sustancia que interfiera con la medición de la sustancia patrón externa, o que contenga dicha sustancia solo a una concentración extremadamente baja que no afecte la medición de la sustancia patrón externa en la solución diluida después de diluir la muestra biológica. Dicho tampón que está libre de estas sustancias o que contiene estas sustancias solo a una concentración extremadamente baja que no afecta la medición de la sustancia patrón externa en la mezcla después de diluir la muestra biológica, se denominará tampón sustancialmente libre de las sustancias. La concentración de sodio en el tampón diluyente usado en el método de la presente divulgación es de 100 nmol/l o menos, por ejemplo.

Por ejemplo, cuando se usa sodio o cloruro como sustancia patrón externa, el tampón diluyente para la muestra biológica debe estar libre de sodio o cloruro, o contener sodio o cloruro solo en una cantidad extremadamente pequeña. El tampón diluyente para la muestra biológica también debe estar libre de sodio o solo contener una cantidad extremadamente pequeña de sodio, porque el sodio afecta la cuantificación de un elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos. Asimismo, para medir la sustancia diana a analizar en la muestra biológica, con el fin de evitar la degradación o desnaturalización de la sustancia diana a analizar, el tampón diluyente para la muestra biológica debe ser un tampón que tenga un pH cercano al de la muestra biológica, es decir, pH 6,5 a 8,0, preferentemente pH 7,0 a 7,5, y más preferentemente pH 7,4. Asimismo, en la presente divulgación, para medir el componente biológico en la sangre diluida con el tampón, los componentes del tampón no deberían causar desnaturalización ni afectar la estabilidad del componente biológico a medir. Debido a que no ha existido previamente un tampón que tenga una capacidad tamponadora de pH 7,4 y esté libre de sodio o cloruro, ha sido imposible usar sodio o cloruro como sustancia patrón externa. La presente divulgación ha desarrollado un nuevo tampón que tiene una capacidad tamponadora alrededor del pH 7,4 y está libre de sodio o cloruro para permitir el uso de sodio o cloruro como la sustancia patrón externa.

Un ejemplo del tampón puede ser un tampón obtenido mediante la mezcla de una combinación de un compuesto de aminoalcohol tal como 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), 2-etilaminoetanol, N-metil-D-glucamina, dietanolamina o trietanolamina, como una sustancia alcalina libre de sodio, cloruro o un elemento perteneciente a metales alcalinos o metales alcalinotérreos, con un tampón de Good, que es un tampón que tiene un pKa cercano a pH 7,4, tal como HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico) (pKa = 7,55), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico) (pKa = 7,50), MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico) (pKa = 7,20), o BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico) (pKa = 7,15), como un compuesto ácido. En particular, se prefiere la combinación de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) con HEPES, TES, MOPS o BES, y la combinación de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) con HEPES es más preferida.

Para preparar el tampón descrito anteriormente, el aminoalcohol y el tampón de Good se pueden mezclar en una relación de concentración de 1:2 a 2:1, preferentemente 1:1,5 a 1,5:1, y más preferentemente 1:1. Si bien la concentración del tampón no está limitada, la concentración del aminoalcohol o el tampón de Good es de 0,1 a 1000 mM/l, preferentemente de 1 a 500 mM/l, y más preferentemente de 10 a 100 mM/l.

Con el fin de mantener de manera estable el componente a analizar, el tampón puede contener un agente quelante, un tensioactivo, un agente antimicrobiano, un conservante, una coenzima, un sacárido, un inhibidor y similares. Ejemplos de agentes quelantes incluyen etilendiaminatetraacetato (EDTA), citrato y oxalato. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos catiónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos anfólicos y tensioactivos no iónicos. Ejemplos de conservantes incluyen azida de sodio y antibióticos. Ejemplos de coenzimas incluyen fosfato de piridoxal, magnesio y zinc. Ejemplos de sacáridos incluyen manitol, dextrosa y oligosacáridos. Ejemplos de inhibidores incluyen dodecil sulfato de sodio, mercurio y heparina. En particular, la adición de manitol y fosfato de piridoxal puede estabilizar la membrana y las enzimas de las células sanguíneas, y la adición de tres a cuatro tipos de antibióticos o agentes antimicrobianos puede suprimir el crecimiento de bacterias parcialmente incluidas en la superficie de un dedo durante la recolección de sangre del dedo, estabilizando así la degradación del componente biológico debido a las bacterias.

Cuando se usa sangre completa como muestra biológica, debido a la necesidad de filtrar el componente de las células sanguíneas en la sangre diluida, se puede evitar la hemólisis de las células sanguíneas usando, como la osmolalidad del tampón, una osmolalidad igual o superior a la osmolalidad de la sangre (285 mOsm/kg). La osmolalidad se puede ajustar para que sea isotónica mediante el uso de una sal, un sacárido, un tampón o similar que no afecte la cuantificación del componente biológico a medir.

La presente divulgación también abarca el tampón descrito anteriormente utilizado por el método de la presente divulgación para usar el factor de dilución de la muestra biológica.

5 El cloruro (Cl⁻) o proteína, que es una sustancia patrón externa, también se puede medir utilizando un método conocido. Por ejemplo, el cloruro se puede medir utilizando un método para medir la absorbencia. Debido a que la amilasa es activada mediante iones cloruro, la absorbencia se puede medir en función de la velocidad de reacción. La proteína se puede medir usando el método Biuret, el método Bradford o el método Lowry, por ejemplo. La albúmina se puede medir usando el método verde de bromocresol, que es un método de pigmento.

10 Los ejemplos de métodos para medir el sodio en la muestra biológica utilizada como patrón externo diluido con el tampón incluyen el uso de un fotómetro de llama, el método de absorción atómica y el método de electrodo selectivo de iones. Cuando se usa sangre como muestra biológica en la presente divulgación, la cantidad de muestra preparada mediante la recolección de una cantidad mínima de sangre de un dedo y la dilución de la sangre con el tampón es tan pequeña como aproximadamente 150 µl. Para la medición de componentes bioquímicos o 10 o más elementos de pruebas inmunológicas, es necesario medir el sodio utilizado como sustancia patrón externa, utilizando una cantidad mínima, es decir, varios microlitros, de la muestra. Además, debido a la necesidad de analizar una gran cantidad de muestra, el método de la presente divulgación debe ser adaptable a un analizador automatizado bioquímico o inmunológico comercial.

20 En la medición de sodio, la actividad enzimática de la enzima galactosidasa es activada mediante iones de sodio. Por lo tanto, la presente divulgación ha desarrollado un método de medición enzimática para medir el sodio usando varios microlitros de una muestra con una concentración muy baja de sodio (24 mmol/l o menos) diluida con el tampón. En este método de medición enzimática, se mide una cantidad mínima de sodio en la muestra biológica diluida mediante el uso del fenómeno en el que el sodio activa la β-galactosidasa, y mediante el uso de la relación proporcional entre la concentración de sodio en la muestra diluida con el tampón y el actividad de la galactosidasa. Este método es eficaz y altamente económico, ya que es adaptable a un analizador automatizado bioquímico o inmunológico, y no requiere un equipo separado para medir el sodio.

30 En el método de medición de sodio descrito anteriormente, una muestra biológica tal como sangre se diluye con el tampón diluyente y se diluye adicionalmente con agua purificada; se añade un primer reactivo de un tampón que comprende β-galactosidasa en una cantidad de 10 a 30 veces la cantidad en volumen de la muestra diluida; la mezcla se calienta de 30 a 45 °C durante 2 a 20 minutos; se añade un segundo reactivo de una solución de sustrato que comprende o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido en la mitad de la cantidad del primer reactivo; y se mide la absorbencia a una longitud de onda primaria de 410 nm y una longitud de onda secundaria de 658 nm. Más específicamente, la muestra biológica tal como sangre se diluye con el tampón diluyente y se diluye además aproximadamente 5 veces con agua purificada. A 1 a 10 µl, preferentemente 3 µl, de la mezcla diluida de la muestra biológica y el tampón, se añade de 30 a 100 µl, preferentemente 52 µl, del tampón que comprende β-galactosidasa como el primer reactivo de tal manera que la relación de volumen del tampón que comprende β-galactosidasa en relación con la mezcla diluida de la muestra biológica y el tampón se convierte en 10 a 30, preferentemente de 15 a 25. La mezcla luego se calienta de 30 a 45 °C, preferentemente a 37 °C, durante 2 a 20 minutos, preferentemente 5 minutos, y luego se añaden 25 µl de la solución de sustrato que comprende o-nitrofenil-β-D-galacto-piranosido como el segundo reactivo. Posteriormente se mide la absorbencia a una longitud de onda primaria de 410 nm y una longitud de onda secundaria de 658 nm, midiendo así la concentración de sodio.

45 El método para determinar el factor de dilución de la muestra biológica de la presente divulgación se realiza deseablemente como sigue.

50 A 50 a 500 µl del tampón, se añaden y mezclan de 10 a 200 µl de la muestra biológica. En este caso, el volumen del tampón es preferentemente no menos de 3 a 4 veces el volumen de la muestra biológica. Por ejemplo, cuando la muestra biológica es sangre, se añade una cantidad mínima, es decir, 65 µl, de la muestra de sangre y se mezcla con 280 µl del tampón. Cuando la muestra biológica es sangre, las células sanguíneas, tales como eritrocitos y leucocitos, se eliminan después de la dilución. Las células sanguíneas pueden eliminarse a través de un filtro, o pueden eliminarse sometiendo la muestra de sangre diluida a centrifugación. El componente a analizar se mide utilizando la muestra de plasma diluida de la que se extrajeron las células sanguíneas. Cuando se añade una cantidad mínima, es decir, 65 µl, de la muestra de sangre a 280 µl del tampón, aproximadamente 30 µl de plasma están contenidos en 65 µl de la muestra de sangre, y por lo tanto, el plasma se diluye aproximadamente 10 veces. Cuando se usa sangre como muestra biológica, la sangre y el tampón diluyente se pueden mezclar de modo que, cuando se calcula como plasma, el plasma se diluye de 5 a 20 veces, preferentemente de 5 a 16 veces, más preferentemente de 5 a 10 veces, y de manera particularmente preferible aproximadamente de 8 a 10 veces.

65 La concentración de la sustancia patrón externa en la muestra de plasma diluida también se mide simultáneamente. La concentración del componente a analizar en la sangre se puede calcular mediante la determinación de un factor de dilución de la sangre en función de la concentración de la sustancia patrón externa y mediante la multiplicación del valor medido del componente a analizar en la muestra de plasma diluida por el factor de dilución.

Quando se usa sangre como muestra biológica, la sangre se diluye con el tampón diluyente, y las células sanguíneas se eliminan posteriormente del mismo. Por lo tanto, la muestra restante es plasma, que se denominará plasma diluido. En este caso, por lo tanto, se determina el factor de dilución del plasma.

- 5 El factor de dilución del plasma se puede determinar de acuerdo con el siguiente método de cálculo utilizando la fórmula (I), con el uso de la sustancia patrón externa.

El método descrito a continuación usa una muestra de plasma obtenida mediante la dilución de sangre con el tampón diluyente y la filtración de la sangre diluida a través de un filtro.

- 10 Método de cálculo 1

$$X = \frac{A}{B} \quad (I)$$

- 15 en donde

A: absorbencia de una mediana normal de la concentración de la sustancia patrón externa en plasma;
 B: absorbencia de la sustancia patrón externa en el plasma diluido; y
 X: un factor de dilución de plasma.

- 20 Cuando se usa sodio como sustancia patrón externa, se puede determinar la absorbencia de sodio. La absorbencia de 142 mmol/l de sodio puede usarse como la absorbencia de la mediana normal de la concentración de sodio en plasma.

- 25 3. Método de medición utilizando una sustancia patrón interna y una sustancia patrón externa (Método híbrido)

La presente invención proporciona un método para cuantificar un componente a analizar en una muestra de sangre usando una sustancia patrón interna y una sustancia patrón externa que está comprendido homeostáticamente a una concentración predeterminada en la muestra de sangre. El componente se cuantifica después de que la muestra se diluya con un tampón, en donde se determina una relación de dilución de la muestra utilizando la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa, y el componente a analizar en la muestra se cuantifica en función del factor de dilución.

35 Con el método de la presente invención, es innecesario determinar la cantidad de analito de la muestra biológica para determinar el factor de dilución de la muestra biológica.

40 Al determinar el factor de dilución mediante el uso de la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa en combinación, la sustancia patrón externa se usa para corregir el factor de dilución obtenido con la sustancia patrón interna para determinar con precisión el factor de dilución. El método para determinar el factor de dilución de la muestra biológica de la presente invención, que usa tanto la sustancia patrón interna como la sustancia patrón externa, puede denominarse el "método híbrido".

45 Cuando el factor de dilución de la muestra biológica se determina utilizando solo la sustancia patrón interna, la muestra biológica se diluye con el tampón diluyente que contiene la sustancia patrón interna. Por lo tanto, si la cantidad de la muestra biológica es pequeña, el factor de dilución será excesivamente alto, lo que reduce la fiabilidad del factor de dilución determinado en función de la concentración de la sustancia patrón interna. El método híbrido de la presente invención puede compensar este inconveniente del método que usa la sustancia patrón interna, mediante el uso de la sustancia patrón externa. Asimismo, tal como se describe continuación, la muestra biológica puede contener una sustancia utilizada como sustancia patrón interna, o la concentración de la sustancia patrón externa presente originalmente en la muestra biológica puede estar fuera del intervalo de valores normales. Incluso en estos casos, el método híbrido permite determinar un factor de dilución preciso compensando el inconveniente de cada uno de los métodos.

55 Como la muestra biológica a analizar como se divulga en el presente documento, se pueden usar las muestras biológicas descritas en "2. Método de análisis usando una sustancia patrón externa (Método de patrón externo)" anterior, y las fuentes de la muestra biológica también se describen en la sección 2. (Método de patrón externo) anterior.

60 El componente de la muestra biológica a analizar también se describe en la sección 2. (Método de patrón externo) anterior.

65 La sustancia patrón interna se añade al tampón utilizado para diluir la muestra biológica para dar una concentración predeterminada. Las siguientes sustancias se utilizan como sustancia patrón interna: una sustancia que no está en absoluto contenida, o está contenida solo en una cantidad extremadamente pequeña, en la muestra biológica; una sustancia que no interfiere con la medición del componente a analizar en la muestra biológica; una sustancia que no

se degrada por la acción de enzimas *in vivo* en la muestra biológica; una sustancia estable en el tampón; una sustancia que no penetra a través de la membrana de las células sanguíneas y no está contenida en las células sanguíneas; una sustancia que no se adsorbe a un recipiente de almacenamiento para el tampón; y una sustancia que permite el uso de un sistema de detección que permite una medición precisa. Ejemplos de dichas sustancias son litio y glicerol-3-fosfato. .

El Li (litio) es particularmente preferido para la sustancia patrón interna.

El glicerol-3-fosfato descrito en la publicación de patente Japonesa (Kokai) N.º 2003-161729 A también se puede usar como sustancia patrón interna.

La concentración a la que se añade la sustancia patrón interna en el tampón utilizado para diluir la muestra biológica no está limitada siempre que se pueda medir la concentración de la sustancia patrón interna después de la dilución. La sustancia patrón interna puede añadirse a una concentración de 0,1 a 1000 mM/l, por ejemplo, preferentemente de 0,1 a 100 mM/l, y más preferentemente de 0,5 a 10 mM/l. Por ejemplo, cuando se utiliza litio como sustancia patrón interna, se puede añadir litio a la concentración descrita anteriormente en el tampón usado para diluir la muestra biológica.

El factor de dilución de la muestra biológica utilizada como analito se puede determinar en función de la concentración de la sustancia patrón interna en la solución diluida de la muestra biológica después de la dilución con el tampón y la concentración de la sustancia patrón interna añadida en el tampón utilizado para dilución.

El intervalo de factores de dilución de la muestra cuando la muestra se añade al tampón que contiene la sustancia patrón interna es de 5 a 20 veces, y preferentemente de 5 a 15 veces, aunque no se limita a los mismos.

La sustancia patrón externa es preferentemente una sustancia contenida en la muestra biológica y que tiene una alta homeostasis, es decir, una sustancia cuya concentración en la muestra biológica no muestra variaciones fisiológicas significativas, y también es preferentemente una sustancia cuya concentración en la muestra biológica no varía significativamente entre individuos humanos. Ejemplos de dichas sustancias incluyen sodio (Na⁺), cloruro (Cl⁻), , albúmina y proteína total. En particular, se prefiere el sodio porque tiene una alta homeostasis y no varía significativamente entre individuos.

El valor normal de la concentración de sodio en plasma humano, es decir, la concentración de sodio en plasma de individuos sanos, es de aproximadamente 135 a 145 mmol/l (mEq/l), y la mediana normal es de aproximadamente 142 mmol/l. En el 95 % de los sujetos, la concentración de sodio en plasma cae dentro del intervalo normal de concentraciones. En el 2,5 % de los sujetos, la concentración de sodio en plasma es más baja que el intervalo normal de concentraciones, y en el 2,5 % de los sujetos, la concentración de sodio en plasma es más alta que el intervalo normal de concentraciones. El factor de dilución de la muestra biológica utilizada como analito se puede determinar en función de la concentración de la sustancia patrón externa después de la dilución con el tampón y el valor promedio de la concentración de sodio en plasma de individuos sanos. Cuando se usa una muestra biológica que no sea sangre, suero o plasma como muestra biológica, el factor de dilución se puede determinar en función de la mediana de la concentración de sodio en la muestra biológica.

Se puede determinar un factor de dilución más preciso mediante la determinación del factor de dilución de la muestra biológica utilizada como analito en función de la concentración de la sustancia patrón interna en la muestra biológica después de la dilución con el tampón y la concentración de la sustancia patrón interna añadida al tampón utilizado para la dilución, y mediante la corrección del factor de dilución calculado en función de las concentraciones de la sustancia patrón interna, utilizando la concentración de la sustancia patrón externa en la muestra biológica después de la dilución y la concentración de la sustancia patrón externa contenida en la muestra biológica.

Debido a que una sustancia contenida en la muestra biológica se usa como sustancia patrón externa, es necesario usar, como tampón para diluir la muestra biológica, un tampón que esté libre de la sustancia patrón externa o que contenga solo la sustancia patrón externa a una concentración extremadamente baja que no afecte la medición de la sustancia patrón externa en la mezcla después de diluir la muestra biológica. También es necesario usar un tampón que esté libre de una sustancia que interfiera con la medición de la sustancia patrón externa y las sustancia patrón interna, o que contenga dicha sustancia solo a una concentración extremadamente baja que no afecte la medición de la sustancia patrón interna o la sustancia patrón externa en la solución diluida después de diluir la muestra biológica. Dicho tampón que está libre de estas sustancias o que contiene estas sustancias solo a una concentración extremadamente baja que no afecta la medición de la sustancia patrón interna o la sustancia patrón externa en la mezcla después de diluir la muestra biológica, se denominará tampón sustancialmente libre de las sustancias. La concentración de sodio en el tampón diluyente usado en el método de la presente invención es de 100 nmol/l o menos, por ejemplo.

Por ejemplo, cuando se usa sodio o cloruro como sustancia patrón externa, el tampón diluyente para la muestra biológica debe estar libre de sodio o cloruro, o contener sodio o cloruro solo en una cantidad extremadamente pequeña. Como sustancia patrón interna, se utiliza un elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos y,

por lo tanto, el tampón diluyente para la muestra biológica debe estar libre del elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos utilizados como la sustancia patrón interna o una sustancia análoga a estos elementos, o contener dicha sustancia solo en una cantidad extremadamente pequeña. El tampón diluyente para la muestra biológica también debe estar libre de sodio o solo contener una cantidad extremadamente pequeña de sodio, porque el sodio afecta la cuantificación del elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos. Asimismo, para medir la sustancia diana a analizar en la muestra biológica, con el fin de evitar la degradación o desnaturalización de la sustancia diana a analizar, el tampón diluyente para la muestra biológica debe ser un tampón que tenga un pH cercano al de la muestra biológica, es decir, pH 6,5 a 8,0, preferentemente pH 7,0 a 7,5, y más preferentemente pH 7,4. Asimismo, en la presente invención, para medir el componente biológico en la sangre diluida con el tampón, los componentes del tampón no deberían causar desnaturalización o afectar la estabilidad del componente biológico a medir. Debido a que no ha existido previamente un tampón que tenga una capacidad tamponadora de pH 7,4 y esté libre de sodio o cloruro, ha sido imposible usar sodio o cloruro como sustancia patrón externa. La presente invención ha desarrollado un nuevo tampón que tiene una capacidad tamponadora alrededor del pH 7,4 y está libre de sodio o cloruro para permitir el uso de sodio o cloruro como la sustancia patrón externa.

Un ejemplo del tampón puede ser un tampón obtenido mediante la mezcla de una combinación de un compuesto de aminoalcohol tal como 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), 2-etilaminoetanol, N-metil-D-glucamina, dietanolamina o trietanolamina, como un compuesto alcalino libre de sodio, cloruro o un elemento perteneciente a metales alcalinos o metales alcalinotérreos, con un tampón ácido de Good, que es un tampón que tiene un pKa cercano a pH 7,4, tal como HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico) (pKa = 7,55), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico) (pKa = 7,50), MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico) (pKa = 7,20), o BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico) (pKa = 7,15). En particular, se prefiere la combinación de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) con HEPES, TES, MOPS o BES, y la combinación de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) con HEPES es más preferida.

Para preparar el tampón descrito anteriormente, el aminoalcohol y el tampón de Good se pueden mezclar en una relación de concentración de 1:2 a 2:1, preferentemente 1:1,5 a 1,5:1, y más preferentemente 1:1. Si bien la concentración del tampón no está limitada, la concentración del aminoalcohol o el tampón de Good es de 0,1 a 1000 mM/l, preferentemente de 1 a 500 mM/l, y más preferentemente de 10 a 100 mM/l.

Con el fin de mantener de manera estable el componente a analizar, el tampón puede contener un agente quelante, un tensioactivo, un agente antimicrobiano, un conservante, una coenzima, un sacárido, un inhibidor y similares. Ejemplos de agentes quelantes incluyen etilendiaminetetraacetato (EDTA), citrato y oxalato. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos catiónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos anfólicos y tensioactivos no iónicos. Ejemplos de conservantes incluyen azida de sodio y antibióticos. Ejemplos de coenzimas incluyen fosfato de piridoxal, magnesio y zinc. Ejemplos de sacáridos incluyen manitol, dextrosa y oligosacáridos. Ejemplos de inhibidores incluyen dodecil sulfato de sodio, mercurio y heparina. En particular, la adición de manitol y fosfato de piridoxal puede estabilizar la membrana y las enzimas de las células sanguíneas, y la adición de tres a cuatro tipos de antibióticos o agentes antimicrobianos puede suprimir el crecimiento de bacterias parcialmente incluidas en la superficie de un dedo durante la recolección de sangre del dedo, estabilizando así la degradación del componente biológico debido a las bacterias.

Cuando se usa sangre completa como muestra biológica, debido a la necesidad de filtrar el componente de las células sanguíneas en la sangre diluida, se puede evitar la hemólisis de las células sanguíneas usando, como la osmolalidad del tampón, una osmolalidad igual o superior a la osmolalidad de la sangre (285 mOsm/kg). La osmolalidad se puede ajustar para que sea isotónica mediante el uso de una sal, un sacárido, un tampón o similar que no afecte la cuantificación del componente biológico a medir.

La presente invención también abarca el uso del tampón descrito anteriormente para el método híbrido de la presente invención para usar el factor de dilución de la muestra biológica. El tampón se puede usar no solo para el método híbrido de la presente invención, sino también para el método de análisis cuantitativo que usa un patrón externo (método de patrón externo) y el método de análisis cuantitativo que usa un patrón interno (método de patrón interno).

El elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos utilizado como sustancia patrón interna se puede medir utilizando un método conocido. Por ejemplo, se puede añadir una sustancia que forma un complejo de quelato con el elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos, y se puede medir la absorbancia del complejo de quelatos formado. Ejemplos de sustancias que forman complejos de quelatos con el elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos incluyen derivados de porfirina tales como compuestos de porfirina halogenados polivalentes (tales como polifluoroporfirina), por ejemplo. Como alternativa, la absorbancia del elemento en sí puede medirse usando espectroscopía de absorción atómica. Específicamente, el litio añadido como sustancia patrón interna en el tampón se puede medir con un analizador bioquímico automatizado, mediante la utilización de un método colorimétrico de quelatos (método de quelato de porfirina halogenada: perfluoro-5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina). Este método permite una medición fácil para varios analitos usando una cantidad mínima de muestra.

El cloruro (Cl⁻) o proteína, que es una sustancia patrón externa, también se puede medir utilizando un método conocido

descrito en la sección 2. (Método de patrón externo) anterior.

5 En el método de la presente invención, se puede determinar un factor de dilución preciso mediante la determinación del factor de dilución usando el método híbrido, que usa las dos sustancias patrón, es decir, un elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tal como litio, como la sustancia patrón interna, y una sustancia contenida en la muestra biológica, tal como sodio (Na^+), cloruro (Cl^-) o proteína, como la sustancia patrón externa, y mediante la corrección del factor de dilución determinado usando la sustancia patrón interna, mediante el uso de la sustancia patrón externa.

10 El carbonato de litio se usa como un producto farmacéutico para mejorar el estado maníaco de la manía y la enfermedad maníaco-depresiva. El carbonato de litio se administra a un sujeto que necesita tratamiento en una dosis de varios cientos de miligramos a mil y varios cientos de miligramos por día. Por lo tanto, el litio está contenido en la muestra biológica del sujeto que recibe la administración de carbonato de litio y, por lo tanto, no se puede determinar un factor de dilución preciso si solo se utiliza litio como patrón interno.

15 Por otro lado, como se describió anteriormente, el intervalo normal de concentraciones de sodio en sangre de individuos sanos es de aproximadamente 135 a 145 mmol/l (mEq/l). En aproximadamente un 5% de los sujetos, incluso si son individuos sanos, la concentración de sodio en sangre cae fuera del intervalo de valores normales. En aproximadamente un 2,5 % de los sujetos, incluso si son individuos sanos, la concentración de sodio en sangre es inferior que el intervalo de valores normales descritos anteriormente. En aproximadamente un 2,5 % de los sujetos, incluso si son individuos sanos, la concentración de sodio en sangre es más alta que el intervalo de valores normales descrito anteriormente. En estos sujetos, cuando solo se usa sodio como patrón externo, no se puede determinar de manera precisa el factor de dilución.

20 Tal como se ha descrito anteriormente, incluso cuando el sujeto recibe la administración de un elemento que pertenece a metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tal como litio, como el producto farmacéutico, o cuando la concentración de sodio (Na^+), cloruro (Cl^-) o proteína en sangre cae fuera del intervalo de valores normales, el factor de dilución determinado usando la sustancia patrón interna se corrige mediante el uso de la sustancia patrón externa, lo que permite compensar los inconvenientes de ambos métodos, lo que lleva a una determinación precisa del factor de dilución de la muestra biológica.

El método para determinar el factor de dilución de la muestra biológica en el método de la presente invención se realiza deseablemente como sigue.

35 Se añaden 10 a 200 μl de la muestra biológica y se mezclan en 50 a 500 μl de un tampón al que se ha añadido previamente la sustancia patrón interna a una concentración predeterminada. En este caso, el volumen del tampón es preferentemente no menos de 3 a 4 veces el volumen de la muestra biológica. Por ejemplo, cuando la muestra biológica es sangre, se añade una cantidad mínima, es decir, 65 μl , de la muestra de sangre y se mezcla con 280 μl del tampón que contiene el patrón interno. Cuando la muestra biológica es sangre, las células sanguíneas, tales como eritrocitos y leucocitos, se eliminan después de la dilución. Las células sanguíneas pueden eliminarse a través de un filtro, o pueden eliminarse sometiendo la muestra de sangre diluida a centrifugación. El componente a analizar se mide utilizando la muestra de plasma diluida de la que se extrajeron las células sanguíneas. Cuando se añade una cantidad mínima, es decir, 65 μl , de la muestra de sangre en 280 μl del tampón que contiene el patrón interno, aproximadamente 30 μl de plasma están contenidos en 65 μl de la muestra de sangre, y por lo tanto, el plasma se diluye aproximadamente 10 veces. Cuando se usa sangre como muestra biológica, la sangre y el tampón diluyente se pueden mezclar de modo que, cuando se calcula como plasma, el plasma se diluye de 5 a 20 veces, preferentemente de 5 a 16 veces, más preferentemente de 5 a 10 veces, y de manera particularmente preferible aproximadamente de 8 a 10 veces.

50 La concentración de la sustancia patrón interna y la concentración de la sustancia patrón externa en la muestra de plasma diluida también se miden simultáneamente. La concentración del componente a analizar en la sangre se puede calcular mediante la determinación de un factor de dilución de la sangre en función de la concentración de la sustancia patrón interna y la concentración de la sustancia patrón externa y mediante la multiplicación del valor medido del componente a analizar en la muestra de plasma diluida por el factor de dilución.

55 Cuando se usa sangre como muestra biológica, la sangre se diluye con el tampón diluyente, y las células sanguíneas se eliminan posteriormente del mismo. Por lo tanto, la muestra restante es plasma, que se denominará plasma diluido. En este caso, por lo tanto, se determina el factor de dilución del plasma.

60 El factor de dilución del plasma se puede determinar utilizando los siguientes tres métodos de cálculo, que utilizan la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa.

Los métodos descritos a continuación utilizan una muestra de plasma obtenida mediante la dilución de sangre con el tampón diluyente que contiene la sustancia patrón interna y mediante el filtrado de la sangre diluida a través de un filtro. El litio se usa como sustancia patrón interna y el sodio se usa como sustancia patrón externa.

65

Método de cálculo 1

A: absorbencia de la sustancia patrón interna en el tampón que contiene la sustancia patrón interna;
 B: absorbencia de la sustancia patrón interna en el plasma diluido;
 C: absorbencia de una mediana normal de la concentración de la sustancia patrón externa en plasma;
 D: absorbencia de la sustancia patrón externa en el plasma diluido; y
 X: un factor de dilución de plasma.

El plasma diluido en el presente documento se refiere al plasma obtenido mediante la dilución de la muestra de sangre con el tampón diluyente y la eliminación de las células sanguíneas de la misma. Cuando el litio se usa como sustancia patrón interna y el sodio se usa como sustancia patrón externa, la concentración de litio se puede representar por la absorbencia obtenida mediante la medición de la concentración de litio usando el método colorimétrico de quelatos, por ejemplo. La concentración de sodio se puede representar por la absorbencia medida usando el método de medición enzimática, por ejemplo. La mediana normal de la concentración de sodio en plasma corresponde a la mediana de individuos sanos, y la absorbencia de 142 mmol/l de sodio puede usarse como la absorbencia de la mediana normal de la concentración de sodio en plasma. Este valor es un valor conocido. Este es también el caso en los métodos de cálculo 2 y 3 descritos a continuación.

El factor de dilución X del plasma diluido con el tampón se puede determinar en función del siguiente método de cálculo (1) o (2):

$$X = \frac{A+C}{B+D} \quad (1)$$

$$X = \frac{\sqrt{(A^2+C^2)}}{\sqrt{(B^2+D^2)}} \quad (2)$$

La concentración del componente biológico, que es el componente a analizar, en el plasma diluido, o la actividad enzimática se cuantifica, y el valor de cuantificación se multiplica por el factor de dilución determinado usando la fórmula (1) o (2). De esta manera, el componente a analizar en el plasma inicial se puede cuantificar.

Método de cálculo 2

B: absorbencia de la sustancia patrón interna en el plasma diluido;
 D: absorbencia de la sustancia patrón externa en el plasma diluido; y
 X: un factor de dilución de plasma.

El factor de dilución del plasma se puede determinar utilizando la siguiente fórmula (3):

$$X = a \times (B + D) \pm b \quad (3)$$

(a y b son coeficientes).

En el método de cálculo 2, los datos de B + D y el factor de dilución se obtienen por adelantado para preparar una línea de regresión representada por $X = a \times (B + D) \pm b$.

La concentración del componente biológico, que es el componente a analizar, en el plasma diluido, o la actividad enzimática se cuantifica, y el valor de cuantificación se multiplica por el factor de dilución determinado usando la fórmula (3). De esta manera, el componente a analizar en el plasma inicial se puede cuantificar.

Método de cálculo 3

A: absorbencia de la sustancia patrón interna en el tampón que contiene la sustancia patrón interna;
 B: absorbencia de la sustancia patrón interna en el plasma diluido;
 C: absorbencia de una mediana normal de la concentración de la sustancia patrón externa en plasma;
 D: absorbencia de la sustancia patrón externa en el plasma diluido;
 B': un valor de corrección para corregir la absorbencia de la sustancia patrón interna en el plasma diluido, obtenido mediante la utilización del factor de dilución calculado a partir de la absorbencia de la sustancia patrón externa; y
 X: un factor de dilución de plasma.

Cuando se supone que el factor de dilución X de la sustancia patrón interna (litio, por ejemplo) y la sustancia patrón externa (sodio, por ejemplo) es el mismo, se puede obtener la siguiente fórmula:

$$X = A/B = C/D.$$

El valor de corrección B' para corregir la variación de absorbencia de la sustancia patrón interna (litio, por ejemplo) mediante el uso del factor de dilución de la sustancia patrón externa (sodio, por ejemplo) se determina usando la siguiente fórmula:

$$5 \quad (B') = (A \times D)/C.$$

A se divide por el valor de corrección B' para corregir la variación de absorbencia de la sustancia patrón interna (litio, por ejemplo) para determinar el factor de dilución de la sustancia patrón interna (litio, por ejemplo) corregido mediante el uso de la sustancia patrón externa (sodio, por ejemplo):

$$10 \quad X = A/B' (4).$$

La concentración del componente biológico, que es el componente a analizar, en el plasma diluido, o la actividad enzimática se cuantifica, y el valor de cuantificación se multiplica por el factor de dilución determinado usando la fórmula (4). De esta manera, el componente a analizar en el plasma inicial se puede cuantificar.

Ejemplos

20 A continuación se describirán ejemplos de la presente invención y la divulgación. Ejemplo de referencia 1. Método de análisis utilizando un patrón interno (Método de patrón interno)

[Ejemplo de Referencia 1-1]

25 Se examinaron cincuenta muestras de sangre venosa mediante la adición de 60 µl de una muestra de sangre completa que contenía EDTA-2Na en 200 µl de un tampón de dilución de sangre obtenido mediante la adición de maltosa como sustancia patrón interna en un tampón diluyente. Se examinaron las correlaciones entre los valores medidos de plasma obtenidos mediante centrifugación de sangre completa sin diluir y los valores medidos de plasma diluido, determinados mediante la multiplicación de los valores medidos de plasma diluido por un factor de dilución determinado con el patrón interno. Como resultado, como se muestra en la Figura 1, se obtuvieron correlaciones satisfactorias en las pruebas de actividad enzimática (transaminasa; ALT, γ-glutamil transferasa; GGT) y las pruebas de lípidos (triglicérido; TG, colesterol de LDL, glucosa, hemoglobina A1c).

[Ejemplo de Referencia 1-2]

35 Se examinaron cincuenta muestras de sangre venosa mediante la adición de 60 µl de una muestra de sangre completa que contenía EDTA-2Na en 200 µl de un tampón de dilución de sangre, obtenido mediante la adición, en un tampón diluyente de sangre, de etanolamina como patrón interno para distribuir en las células sanguíneas y plasma.

40 La Figura 5 muestra diagramas de correlación obtenidos mediante el recuento de leucocitos (WBC), eritrocitos (RBC), la concentración de hemoglobina (Hgb), el valor del hematocrito (Hct) y el recuento de plaquetas (Plt), usando, como muestras, sangre completa que contiene EDTA-2Na en la sangre recolectada de la vena y sangre completa diluida obtenida mediante la dilución de esta sangre completa con un tampón de dilución de sangre. A partir de estos diagramas, se observan correlaciones satisfactorias, excepto el recuento de plaquetas.

45 [Ejemplo de Referencia 1-3]

50 Se examinó una correlación entre el valor del hematocrito que representa el volumen de células sanguíneas en la sangre, determinado en base a una fórmula, usando el índice de dilución plasmática determinado con maltosa como patrón interno y el índice de dilución de sangre completa determinado con etanolamina, y el valor del hematocrito determinado para sangre completa usando un contador de células sanguíneas. Los resultados se muestran en la Figura 6. La correlación fue satisfactoria y práctica.

Ejemplo de referencia 2. Método de análisis utilizando una sustancia patrón externa (Método de patrón externo)

55 [Ejemplo de referencia 2-1] Análisis cuantitativo utilizando una cantidad mínima de una muestra de sangre

(1) Medición de la sustancia patrón externa (sodio) y cálculo del factor de dilución

60 Se añadieron 65 µl de una cantidad mínima de una muestra de sangre y se mezclaron en 280 µl de un tampón, se filtraron las células sanguíneas y se midió la concentración de cada una de las sustancias patrón externas y un componente biológico para plasma diluido como muestra, utilizando un analizador bioquímico automatizado.

Como tampón diluyente para diluir la muestra de sangre, se usó un tampón a pH 7,4 obtenido mediante la mezcla de una combinación de 2-amino-2-metil-1-propanol y HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico).

65 La Tabla 5 muestra la composición del tampón.

[Tabla 5]

Composición del tampón diluyente que contiene sodio como patrón externo	
Nombre de la sustancia	Concentración
HEPES	50 mM/l
2-Amino-2-metil-1-propanol(AMP)	50 mM/l
D-manitol	284 mM/l
EDTA-2K	0,8 mM/l
PALP: Fosfato de piridoxal	0,05 mM/l
Tiabendazol	0,0001 % (p/v)
Piperacilina Sódica	0,0003 % (p/v)
Sulfato de amikacina	0,0003 % (p/v)
Sulfato de canamicina	0,0005 % (p/v)
Trihidrato de meropenem	0,0005 % (p/v)
Osmolalidad	355 mOsm/kg
pH 7,4	

El sodio contenido en la muestra de sangre se utilizó como sustancia patrón externa.

- 5 Para la medición de una cantidad mínima de sodio en el plasma diluido, se desarrolló un método de medición enzimática que utiliza el fenómeno en el cual la β -galactosidasa se activa por el sodio, y utiliza la relación proporcional entre la concentración de sodio en la muestra diluida con el tampón y la actividad galactosidasa.

- 10 La Tabla 6 muestra las composiciones de reactivos para medir sodio.

[Tabla 6]

Composiciones de reactivos para medir sodio		
Primer reactivo	Reactivo	Concentración
	pH 8,0, HEPESLiOH	100 mmol/l
	D-manitol	60 mmol/l
	N-acetilcisteína	30 mmol/l
	Sulfato de magnesio	1,52 mmol/l
	β -galactosidasa	1,1 kU/l
	Triton X-100	0,05 %
	Segundo reactivo	pH 8,0, HEPES LiOH
	o-Nitrofenil- β -D-Galactopiranosido	15 mmol/l

- 15 La medición se realizó de la siguiente manera, utilizando los reactivos para medir el sodio que se muestran en la Tabla 6.

Se añadieron 65 μ l de sangre completa a 280 μ l del tampón diluyente para diluir plasma (aproximadamente 30 μ l) en la sangre completa aproximadamente 10 veces. Este plasma diluido se diluyó 4,5 veces con agua purificada, y se añadieron 52 μ l de un tampón de β -galactosidasa (primer reactivo) a 3 μ l del plasma diluido. La mezcla se calentó a 37 °C durante 5 minutos. A esta mezcla, se añadieron 26 μ l de una solución de sustrato de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (segundo reactivo). A continuación, se determinó un cambio en la relación de absorbencia durante 1 minuto mediante la medición de la absorbencia a una longitud de onda primaria de 410 nm y una longitud de onda secundaria de 658 nm, utilizando el analizador bioquímico automatizado modelo JCA-BM 6050 de JEOL Ltd. La Figura 1 muestra una curva de calibración que representa la concentración de sodio frente a la variación en la absorbencia.

20 La curva de calibración mostró linealidad que pasaba por el punto de origen hasta 24 mmol/l, lo que indicaba que se podía cuantificar el sodio.

(2) Medición de la sustancia patrón externa (cloruro)

- 30 Se usaron los siguientes reactivos.

1) Primer reactivo:

Una solución obtenida mediante la adición de 2 U/ml de amilasa pancreática y 10 mmol/l de EDTA en tampón de

NaOH MES 0,1 mol/l a pH 6,0.

2) Segundo reactivo:

5 Solución de 5 mmol/l de 2-cloro-4-nitrofenil maltosa.

El método para medir el cloruro fue el siguiente.

10 Se añadieron 150 µl del primer reactivo a 5 µl de la muestra, la mezcla se calentó a 37 °C durante 5 minutos y, posteriormente, se añadieron 50 µl del segundo reactivo. Un minuto después, se determinó una variación en la absorbencia a 405 nm durante 2 minutos.

15 La figura 8 muestra una curva de calibración que representa la concentración de cloruro frente a la variación en la absorbencia.

(3) Correlaciones entre una cantidad mínima de una muestra de sangre y plasma venoso

20 La Tabla 7 muestra los valores estadísticos de las correlaciones entre los valores medidos de plasma y los valores medidos de plasma diluido determinados en función del factor de dilución de la sustancia patrón externa (sodio). La medición se realizó utilizando el analizador bioquímico automatizado modelo JCA-BM 6050 de JEOL Ltd. La Tabla 7 muestra las correlaciones entre los datos de plasma (valores medidos de plasma) y los datos de prueba bioquímica de plasma diluido (valores medidos de plasma diluido) determinados usando el factor de dilución (X: dilución 8 veces) determinado en función de la siguiente fórmula (I) usando la absorbencia (A) medida para 142 mmol/l de sodio y la absorbencia (B) de sodio en el plasma diluido. La medición de plasma para cada uno de los elementos de prueba se realizó utilizando un método convencional.

30 La medición del plasma diluido se realizó en condiciones optimizadas, mediante el aumento del volumen de la muestra más de un volumen usado convencionalmente. Tal como se muestra en la Tabla 7, las correlaciones para los 13 elementos de las pruebas bioquímicas son satisfactorias, y los datos de las pruebas bioquímicas en el plasma inicial pueden proceder de la cantidad mínima de sangre.

$$X = \frac{A}{B} \quad (I)$$

[Tabla 7]

Correlaciones entre plasma y plasma diluido obtenidas con el método de patrón externo de sodio			
	Método de patrón externo de Na		
	Ecuación de regresión para las correlaciones entre el plasma diluido y el plasma		
	Pendiente	Intersección	Coefficiente de correlación
Proteína total	0,82	1,40	0,751
Albúmina	0,85	0,64	0,822
AST	0,98	0,45	0,990
ALT	1,00	-0,06	0,998
γGT	1,02	-0,59	0,998
Colesterol total	0,97	5,58	0,973
Colesterol HDL	0,97	1,52	0,987
colesterol LDL	0,98	3,30	0,990
Triglicérido	1,05	-3,83	0,999
Nitrógeno ureico	0,99	0,10	0,993
Creatinina	0,98	0,02	0,966
Ácido úrico	1,01	-0,03	0,994
Glucosa	0,97	2,00	0,994

35 **Ejemplo 3.** Método de análisis utilizando una sustancia patrón interna y una sustancia patrón externa (Método híbrido)

[Ejemplo 3-1] Análisis cuantitativo utilizando una cantidad mínima de una muestra de sangre

40 (1) Medición de la sustancia patrón interna (litio o glicerol-3-fosfato) y la sustancia patrón externa (sodio) y cálculo del factor de dilución

5 Se añadieron 65 µl de una cantidad mínima de una muestra de sangre y se mezclaron en 280 µl de un tampón que contenía la sustancia patrón interna, se filtraron las células sanguíneas y la concentración de cada una de la sustancia patrón interna, la sustancia patrón externa y un componente biológico se midió para plasma diluido como muestra, utilizando un analizador bioquímico automatizado.

Como tampón diluyente para diluir la muestra de sangre, se usó un tampón a pH 7,4 obtenido mediante la mezcla de una combinación de 2-amino-2-metil-1-propanol y HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico).

10 La Tabla 8 muestra la composición del tampón que contiene la sustancia patrón interna.

[Tabla 8]

Composición del tampón diluyente que contiene litio como sustancia patrón interna	
Nombre de la sustancia	Concentración
Nombre de la sustancia	50 mM/l
2-amino-2-metil-1-propanol(AMP)	50 mM/l
D-manitol	284 mM/l
Cloruro de litio	1 mM/l
EDTA-2K	0,8 mM/l
PALP: Fosfato de piridoxal	0,05 mM/l
Tiabendazol	0,0001 % (p/v)
Piperacilina Sódica	0,0003 % (p/v)
Sulfato de amikacina	0,0003 % (p/v)
Sulfato de canamicina	0,0005 % (p/v)
Trihidrato de meropenem	0,0005 % (p/v)
Osmolalidad	355 mOsm/kg
pH 7,4	

15 Se usó litio como sustancia patrón interna, y se añadió 1 mM/l de cloruro de litio al tampón diluyente. El sodio contenido en la muestra de sangre se utilizó como sustancia patrón externa.

El litio contenido en el tampón como sustancia patrón interna se midió utilizando un método colorimétrico de quelato (método de quelato de porfirina halogenada: perfluoro-5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina).

20 Para la medición de una cantidad mínima de sodio en el plasma diluido, se desarrolló un método de medición enzimática que utiliza el fenómeno en el cual la β-galactosidasa se activa por el sodio, y utiliza la relación proporcional entre la concentración de sodio en la muestra diluida con el tampón y la actividad galactosidasa.

La Tabla 9 muestra las composiciones de reactivos para medir sodio.

25

[Tabla 9]

Composiciones de reactivos para medir sodio		
Primer reactivo	Reactivo	Concentración
	pH 8,0, HEPESLiOH	100 mmol/l
	D-manitol	60 mmol/l
	N-acetilcisteína	30 mmol/l
	Sulfato de magnesio	1,52 mmol/l
	β-galactosidasa	1,1 kU/l
	Triton X-100	0,05 %
Segundo reactivo	pH 8,0, HEPES LiOH	100 mmol/l
	o-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosido	15 mmol/l

La medición se realizó de la siguiente manera, utilizando los reactivos para medir el sodio que se muestran en la Tabla 9.

30

Se añadieron 65 µl de sangre completa a 280 µl del tampón diluyente para diluir plasma (aproximadamente 30 µl) en la sangre completa aproximadamente 10 veces. Este plasma diluido se diluyó 4,5 veces con agua purificada, y se añadieron 52 µl de un tampón de β-galactosidasa (primer reactivo) a 3 µl del plasma diluido. La mezcla se calentó a

37 °C durante 5 minutos. A esta mezcla, se añadieron 26 µl de una solución de sustrato de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (segundo reactivo). A continuación, se determinó un cambio en la relación de absorbencia durante 1 minuto mediante la medición de la absorbencia a una longitud de onda primaria de 410 nm y una longitud de onda secundaria de 658 nm, utilizando el analizador bioquímico automatizado modelo JCA-BM 6050 de JEOL Ltd. La Figura 7 muestra una curva de calibración que representa la concentración de sodio frente a la variación en la absorbencia. La curva de calibración mostró linealidad que pasaba por el punto de origen hasta 24 mmol/l, lo que indicaba que se podía cuantificar el sodio.

[Tabla 10]

Método de medición de litio		
Primer reactivo (Reactivo de quelato)	Reactivo	Concentración
	perfluoro-5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina	0,05 % (P/V)
	Dimetilsulfóxido	5 % (P/V)
	Trietanolamina	2 % (P/V)
	Polietilenglicol-t-octilfenil éter	2 % (P/V)
	Dodecil sulfato de sodio	2 % (P/V)

El litio se midió de acuerdo con el siguiente método, utilizando el reactivo de medición que se muestra en la Tabla 10.

Se añadieron 65 µl de sangre completa a 280 µl del tampón diluyente para diluir plasma (aproximadamente 30 µl) en la sangre completa aproximadamente 10 veces. Este plasma diluido se diluyó 4,5 veces con agua purificada, y se añadieron 55 µl del reactivo de quelato (primer reactivo) a 5 µl del plasma diluido. La mezcla se calentó a 37 °C durante 10 minutos, y se midió la absorbencia a una longitud de onda primaria de 545 nm y una longitud de onda secundaria de 596 nm, utilizando el analizador bioquímico automatizado modelo JCA-BM 6050 de JEOL Ltd.

La Figura 9 muestra una curva de calibración que representa la concentración de litio frente a la absorbencia. La curva de calibración mostró linealidad que pasaba por el punto de origen hasta 1 mmol/l, lo que indicaba el litio que se podía cuantificar.

Quando se utiliza glicerol-3-fosfato como sustancia patrón interna, la medición se realizó de acuerdo con el siguiente método. Se añadieron 65 µl de sangre completa a 280 µl del tampón diluyente para diluir plasma (aproximadamente 30 µl) en la sangre completa aproximadamente 10 veces. Este plasma diluido se diluyó 4,5 veces con agua purificada, y se añadieron 50 µl del primer reactivo (peroxidasa) a 9 µl del plasma diluido. La mezcla se calentó a 37 °C durante 5 minutos. Cinco minutos después de la adición de 25 µl del segundo reactivo (glicerol-3-fosfato oxidasa), se midió la absorbencia a una longitud de onda primaria de 596 nm y una longitud de onda secundaria de 884 nm, utilizando el analizador bioquímico automatizado modelo JCA-BM 6050 de JEOL Ltd. La curva de calibración mostró linealidad que pasaba por el punto de origen hasta 4 mmol/l, lo que indicaba que el glicerol-3-fosfato podía cuantificarse.

Las composiciones de reactivos que se muestran en la Tabla 11 se usaron en el método de medición de glicerol-3-fosfato.

[Tabla 11]

Método de medición de glicerol-3-fosfato	
Primer reactivo	pH 7,0, 50 mmol/l de tampón HEPES NaOH
	7,7 mmol/l de azida de sodio
	20 mmol/l de cloruro de potasio
	0,6 mmol/l de ADPS
	5 kU/l de peroxidasa

(continuación)

Método de medición de glicerol-3-fosfato	
Segundo reactivo	pH 7,0, 50 mmol/l de tampón HEPES NaOH
	8 mmol/l de azida de sodio
	20 mmol/l de cloruro de potasio
	2 mmol/l de 4-aminoantipirina
	16 kU/l de glicerol-3-fosfato oxidasa

(2) Correlaciones entre cantidades mínima de muestras de sangre y plasma venoso

Las Figuras 10-1 a 10-6 muestran diagramas de correlación entre valores medidos de plasma y plasma diluido medidos para elementos de pruebas bioquímicas utilizando el analizador bioquímico automatizado modelo JCA-BM 6050 de JEOL Ltd. El eje x representa los datos plasmáticos (valores medidos de plasma), y el eje y representa datos de pruebas bioquímicas de plasma diluido (valores medidos de plasma diluido) determinados usando la relación de dilución (X: dilución 8 veces) determinada con el método híbrido basado en la siguiente fórmula (1), usando la absorbencia

(A) medida para la sustancia patrón interna (litio) en el tampón diluyente, la absorbencia
 (B) medida para la sustancia patrón interna después de la adición de plasma, la absorbencia
 (C) medida para 142 mmol/l de sodio, y la absorbencia (D) de sodio en el plasma diluido. La medición de plasma para cada uno de los elementos de prueba se realizó utilizando un método convencional. La medición del plasma diluido se realizó en condiciones optimizadas, mediante el aumento del volumen de la muestra más de un volumen usado convencionalmente. Como se muestra en las Figuras 10-1 a 10-6, las correlaciones para los 13 elementos de las pruebas bioquímicas son satisfactorias, y los datos de las pruebas bioquímicas en el plasma inicial pueden proceder de la cantidad mínima de sangre.

$$X = \frac{A+C}{B+D} \quad (1)$$

La Tabla 12 muestra los valores estadísticos de las correlaciones entre los valores medidos de plasma y los valores medidos de plasma diluido determinados con el método híbrido, que utiliza la sustancia patrón interna (litio) y la sustancia patrón externa (sodio) en combinación.

[Tabla 12]

Correlaciones obtenidas con el método híbrido utilizando la sustancia patrón interna (litio) y la sustancia patrón externa (sodio)		
Correlaciones entre los valores medidos de plasma y los valores medidos de plasma diluido obtenidos con el método híbrido utilizando la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa		
Elemento	Coefficiente de correlación	Ecuación de regresión
Proteína total	0,751	y = 0,98 + 1,4
Albumina	0,822	y = 0,97 + 0,6
AST	0,990	y = 0,98 + 0,5
ALT	0,998	y = 1,00 - 0,1
γGTP	0,998	y = 1,02 - 0,6
Colesterol total	0,973	y = 0,97 + 5,6
Colesterol HDL	0,987	y = 0,97 + 1,5
colesterol LDL	0,990	y = 0,98 + 3,3
Triglicérido	0,999	y = 1,05 - 3,8
Nitrógeno ureico	0,993	y = 0,99 + 0,1
Creatinina	0,966	y = 0,98 + 0,0
Ácido úrico	0,994	y = 1,01 + 0,0
Glucosa	0,994	y = 0,97 + 2,0

[Ejemplo 3-2] Correlaciones entre valores medidos de plasma y plasma diluido para elementos de pruebas bioquímicas

La Tabla 13 muestra las correlaciones entre los valores medidos de plasma y el plasma diluido medidos para los elementos de pruebas bioquímicas usando el analizador bioquímico automatizado modelo JCA-BM 6050 de JEOL Ltd.

El eje x representa los datos plasmáticos (valores medidos de plasma), y el eje y representa los datos de pruebas bioquímicas de plasma diluido (valores medidos de plasma diluido) determinados usando la relación de dilución (X: dilución 8 veces) determinada con el método híbrido basado en la fórmula (1) mostrada en el Ejemplo 3-1, usando la absorbencia (A) medida para la sustancia patrón interna (glicerol-3-fosfato) en el tampón diluyente, la absorbencia (B) medida para la sustancia patrón interna después de la adición de plasma, la absorbencia (C) medida para 142 mmol/l de sodio, y la absorbencia (D) de sodio en el plasma diluido. La medición de plasma para cada uno de los elementos de prueba se realizó utilizando un método convencional. La medición del plasma diluido se realizó en condiciones optimizadas, mediante el aumento del volumen de la muestra más de un volumen usado convencionalmente. Tal como se muestra en la Tabla 13, las correlaciones para los 13 elementos de las pruebas bioquímicas son satisfactorias, y los datos de las pruebas bioquímicas en el plasma inicial pueden proceder de la cantidad mínima de sangre.

La Tabla 13 muestra los valores estadísticos de las correlaciones entre los valores medidos de plasma y los valores medidos de plasma diluido determinados con el método híbrido, que utiliza la sustancia patrón interna (glicerol-3-fosfato) y la sustancia patrón externa (sodio) en combinación.

[Tabla 13]

Correlaciones entre el método de medición de plasma y el método híbrido usando glicerol-3-fosfato y sodio		
Correlaciones entre los valores medidos de plasma y los valores medidos de plasma diluido obtenidos con el método híbrido utilizando la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa		
Elemento	Coefficiente de correlación	Ecuación de regresión
Proteína total	0,834	$y = 1,08 - 0,6$
Albumina	0,789	$y = 1,04 - 0,2$
AST	0,977	$y = 0,98 + 3,5$
ALT	0,983	$y = 1,00 + 2,9$
γ GTP	0,996	$y = 1,01 + 1,4$
Colesterol total	0,975	$y = 1,02 - 8,0$
Colesterol HDL	0,973	$y = 0,96 + 3,9$
colesterol LDL	0,989	$y = 1,02 - 3,5$
Triglicérido	0,998	$y = 1,04 + 2,0$
Nitrógeno ureico	0,982	$y = 0,96 + 0,4$
Creatinina	0,970	$y = 0,99 - 0,1$
Ácido úrico	0,975	$y = 0,99 + 0,1$
Glucosa	0,979	$y = 0,97 + 2,0$

[Ejemplo 3-3] Efectos del uso combinado de la sustancia patrón interna (Li) y la sustancia patrón externa (Na) sobre el error de medición y la precisión de los datos de prueba

(1) Efectos del uso de sodio en plasma como sustancia patrón externa sobre el factor de dilución

La concentración de sodio en plasma de individuos sanos muestra variaciones fisiológicas muy pequeñas en los individuos y entre individuos, y el intervalo referencial (intervalo normal) de las concentraciones de sodio en plasma es de 135 a 145 mmol/l. Cuando la concentración de sodio en plasma diluido, obtenida mediante la dilución de una muestra de sangre con un tampón diluyente y la eliminación de las células sanguíneas de la misma, se mide usando un método enzimático con alta sensibilidad mediante el uso de la mediana, es decir, 142 mmol/l, de la concentración de sodio de individuos sanos, la concentración de sodio se puede medir con precisión hasta 0 a 30 mmol/l. Asimismo, para muestras que tienen un límite superior de 135 mmol/l o un límite inferior de 145 mmol/l del intervalo referencial, la medición se puede realizar dentro de un error de ± 2 , mediante la corrección del factor de dilución basado en 142 mmol/l como referencia.

Tal como se muestra en la Tabla 14, sin embargo, en un 2,5 % de los individuos sanos de todos los individuos sanos, la concentración de sodio en plasma cae fuera del límite superior o inferior del intervalo referencial y, por lo tanto, se produce un error de ± 4 % o más para plasma que tiene una concentración de sodio de 136 mmol/l o 148 mmol/l. Con el método híbrido que usa la combinación del método para determinar el factor de dilución usando litio como sustancia patrón interna y el método para determinar el factor de dilución usando sodio como sustancia patrón externa, se puede reducir un error de ± 4 % o más a la mitad, como se muestra en la Tabla 14. En la tabla 14, la sección "Patrón externo de Na" en la columna del factor de dilución muestra los factores de dilución determinados basados únicamente en la concentración de sodio como sustancia patrón externa, y la sección "Corrección de Na-Li: Corrección con el método híbrido" muestra los factores de dilución determinados basados tanto en la concentración de sodio como sustancia patrón externa como en la concentración de litio como sustancia patrón interna. Los factores de dilución en la "Corrección con el método híbrido" se calcularon utilizando la fórmula (1) que se muestra en el Ejemplo 3-1. La Tabla 14 muestra los errores producidos en los valores medidos de colesterol en plasma determinados con los dos métodos,

es decir, el método para determinar el factor de dilución usando solo sodio y el método para determinar el factor de dilución usando el método híbrido. Se encontró que el uso del método híbrido reduce los errores a la mitad.

[Tabla 14]

Efectos del uso de sodio en plasma como sustancia patrón externa sobre el factor de dilución							
Concentración de Na	Concentración de Na en plasma (mmol/l)	Factor de dilución		Concentración de colesterol total (mg/dl) y error de medición			
		Método de patrón externo de Na	Correlación con el híbrido	Patrón externo de Na	% de error para Na	Correlación con el método híbrido	% de error en el método híbrido
Límite inferior o menos	136	9,11	9,31	191,5	-4,2	195,8	-2,1
Mediana	142	9,51	9,51	200,0	0,0	200,0	0,0
Límite superior o más	148	9,91	9,71	208,5	4,2	204,2	2,1

5

(2) Efectos del uso de litio como sustancia patrón interna sobre el factor de dilución

Quando se añade litio como la sustancia patrón interna en un tampón para diluir la sangre, la concentración de litio se diluye de acuerdo con la cantidad de plasma en la sangre. En el método para determinar el factor de dilución del plasma en este caso, la cantidad de plasma añadido es grande en un factor de dilución de hasta aproximadamente 8 a 10 veces, y por lo tanto, la diferencia entre las concentraciones antes y después de la adición del plasma es grande. Por lo tanto, el coeficiente de variación para la reproducibilidad del factor de dilución es de un 2 % o menos. Con un factor de dilución de 12 a 16 veces, sin embargo, la cantidad de plasma añadido es menor y, por lo tanto, el coeficiente de variación para el factor de dilución aumenta de un 4 a un 5 %.

10

15

Tal como se muestra en la Tabla 15, la reproducibilidad fue aproximadamente de un 3 % con un factor de dilución de 12 a 16 veces, según se determinó utilizando la corrección con el método híbrido, y también se obtuvieron datos precisos para sujetos de los que no se pudo recolectar sangre fácilmente. A una relación de dilución de 16 veces para un sujeto que tiene una concentración de colesterol en plasma de 210 mg/dl, cuando el factor de dilución se calcula utilizando litio solo como sustancia patrón interna y se corrige el valor medido, se produce una variación de 199 a 221 mg/dl y, por lo tanto, el sujeto se determina como hiperlipidemia (220 mg/dl o más). En la tabla 15, la sección "Patrón interno de Li" muestra los factores de dilución determinados basados únicamente en la concentración de litio como sustancia patrón interna, la sección "Patrón externo de Na" muestra los factores de dilución determinados únicamente en base a la concentración de sodio como sustancia patrón externa, y la sección "Corrección con el método híbrido" muestra los factores de dilución determinados en base a la concentración de sodio como sustancia patrón externa y la concentración de litio como sustancia patrón interna. Los factores de dilución en la "Corrección con el método híbrido" se calcularon utilizando la fórmula (1) que se muestra en el Ejemplo 3-1.

20

25

Por otro lado, cuando se realiza la corrección utilizando un valor medido determinado en base al factor de dilución calculado utilizando la combinación de litio como sustancia patrón interna y sodio como sustancia patrón externa, se produce una variación de 204 a 216 mg/dl y, por lo tanto, el sujeto se determina como un individuo sano.

30

Por lo tanto, se puede obtener un valor medido altamente preciso utilizando la corrección con el método híbrido.

35

[Tabla 15]

Efectos del método que utiliza litio como sustancia patrón interna, del método que utiliza sodio como sustancia patrón externa y del método híbrido sobre la reproducibilidad (% de CV) del factor de dilución				
Factor de dilución	Reproducibilidad	Patrón interno de Li	Patrón externo de Na	Correlación con el método híbrido
6 veces	Promedio	5,91	6,01	5,96
	CV (%)	1,49	1,83	1,57
8 veces	Promedio	7,85	7,97	7,91
	CV (%)	2,71	1,21	1,98

(continuación)

Efectos del método que utiliza litio como sustancia patrón interna, del método que utiliza sodio como sustancia patrón externa y del método híbrido sobre la reproducibilidad (% de CV) del factor de dilución				
10 veces	Promedio	9,61	10,00	9,81
	CV (%)	1,59	2,14	1,78
12 veces	Promedio	11,53	11,86	11,69
	CV (%)	3,34	2,34	3,24
14 veces	Promedio	13,43	14,09	14,09
	CV (%)	4,07	2,71	3,26
16 veces	Promedio	15,75	15,35	15,35
	CV (%)	5,13	2,12	3,49

La Tabla 15 muestra los efectos del método que usa litio como sustancia patrón interna, del método que utiliza sodio como sustancia patrón externa y del método híbrido sobre la reproducibilidad (% de CV) del factor de dilución, con factores de dilución en plasma de 6 a 16 veces.

- 5 El método híbrido proporcionó una reproducibilidad superior a la obtenida utilizando solo el método de patrón interno.

Aplicabilidad industrial

- 10 De acuerdo con la presente invención, como se describió anteriormente, se puede realizar una cuantificación fácil y precisa para plasma en una muestra biológica tal como una cantidad mínima y desconocida de una muestra de sangre completa recolectada del interior del cuerpo a través de un dedo o similar de un sujeto, así como cualquier componente de la muestra biológica. La relación de volumen de células sanguíneas (valor de hematocrito), que indica el grado de anemia, también se puede determinar. Esto permite que el análisis de la muestra biológica recolectada del sujeto, tal como sangre, se realice con precisión, a pesar de que se puede recolectar una cantidad mínima de la muestra, tal como sangre, que el sujeto puede hacer por sí mismo e incluso después de haber transcurrido un largo período de tiempo desde la recolección. Por lo tanto, la presente invención se puede usar eficazmente para el examen médico del sujeto, y es altamente aplicable de manera industrial.
- 15
- 20 Asimismo, el método de la presente invención en el que se recolecta una cantidad mínima de sangre no tiene restricciones sobre el tiempo o el lugar para recolectar sangre, y por lo tanto, es aplicable a casos en donde el sujeto no puede encontrar tiempo para ir a una institución médica, acontecimientos de accidentes, telemedicina, atención sanitaria y similares. El método de la presente invención también puede encontrar a un individuo con una etapa presintomática en una etapa temprana, por ejemplo, y por lo tanto, puede contribuir al ahorro en los costes de atención sanitaria. Asimismo, el método permite la medición eficaz de un gran volumen de muestras con un analizador bioquímico comercial automatizado. Los datos de prueba medidos se pueden transmitir a un teléfono inteligente y usarse a diario para un sistema de atención sanitaria o para encontrar una enfermedad en una etapa temprana.
- 25

Lista de signos de referencia

- 30
- 1: sangre
 - 2: plasma (suero)
 - 3: células sanguíneas
 - 4: tampón
 - 5: sustancia patrón interna
 - 6: solución diluida de sangre

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar un componente a analizar en una muestra de sangre usando una sustancia patrón interna y una sustancia patrón externa que está comprendido homeostáticamente a una concentración predeterminada en la muestra de sangre, en donde la sustancia patrón interna es litio o glicerol-3-fosfato, y la sustancia patrón externa se selecciona del grupo que consiste en sodio, cloruro, albúmina y proteína total, comprendiendo el método diluir la muestra con un tampón diluyente, en donde se añade una concentración predeterminada de la sustancia patrón interna al tampón diluyente y el tampón diluyente está libre de un componente que interfiere con la cuantificación de la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa, eliminar las células sanguíneas de la muestra después de la dilución, medir una concentración de la sustancia patrón interna y la sustancia patrón externa en la muestra de plasma diluida con el tampón diluyente, calcular un factor de dilución de la muestra de sangre utilizando la concentración de la sustancia patrón interna y la concentración de la sustancia patrón externa y corregir el factor de dilución de la muestra de sangre determinado en función del valor medido de la concentración de la sustancia patrón interna, utilizando el valor medido de la concentración de la sustancia patrón externa, medir el componente en la muestra de plasma diluida, y cuantificar el componente mediante la multiplicación del valor medido del componente en la muestra diluida por el factor de dilución calculado.

2. El método para cuantificar el componente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tampón diluyente comprende, como componentes del agente tamponador, un compuesto de aminoalcohol seleccionado del grupo que consiste en 2-amino-2-metil-1-propanol, 2-etilaminoetanol, N-metil-D-glucamina, dietanolamina y trietanolamina, y un agente tamponador seleccionado del grupo que consiste en HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]etanosulfónico), TES (ácido N-tris(hidroxi-metil)metil-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico) y BES (ácido N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-aminoetanosulfónico), y el tampón diluyente tiene una acción tamponadora entre pH 6,5 y 8,0.

3. El método para cuantificar el componente de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el tampón diluyente está sustancialmente libre de la sustancia patrón externa.

4. El método para cuantificar el componente de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 3, en donde el factor de dilución de una cantidad mínima de la muestra de sangre se calcula utilizando cualquiera de las fórmulas (1) a (4) que se muestran a continuación, se cuantifica el componente a analizar en plasma diluido y el valor de cuantificación se multiplica por el factor de dilución determinado utilizando cualquiera de las fórmulas (1) a (4) para cuantificar el componente a analizar en el plasma inicial:
Fórmula (1):

$$X = \frac{A+C}{B+D} \quad (1)$$

40 ;

Fórmula (2):

$$X = \frac{\sqrt{(A^2+C^2)}}{\sqrt{(B^2+D^2)}} \quad (2)$$

45 ;

Fórmula (3):

$$X = a \times (B + D) + b \quad (3)$$

50 en donde a y b son coeficientes; y los datos de B + D y el factor de dilución se adquieren por adelantado para preparar una curva patrón representada por $X = a \times (B + D) \pm b$; y
Fórmula (4):

$$X = A/B' \quad (4)$$

55

en donde $B' = (A \times D)/C$,
en donde A, B, C, D, B' y X en las fórmulas que se muestran arriba se definen de la siguiente manera:
A: absorbencia de la sustancia patrón interna en el tampón que comprende la sustancia patrón interna;
B: absorbencia de la sustancia patrón interna en el plasma diluido;

C: absorbencia de una mediana normal de la concentración de la sustancia patrón externa en plasma;

D: absorbencia de la sustancia patrón externa en el plasma diluido;

B': un valor de corrección para corregir la absorbencia de la sustancia patrón interna en el plasma diluido, obtenido mediante la utilización del factor de dilución calculado a partir de la absorbencia de la sustancia patrón externa; y

5 X: un factor de dilución de plasma,

en donde el plasma diluido se refiere al plasma obtenido mediante la dilución de la muestra de sangre con el tampón diluyente y la eliminación de las células sanguíneas de la misma.

10 5. El método para cuantificar el componente de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 4, en donde el sodio, que es uno de los patrones externos en la muestra de sangre diluida con el tampón diluyente, se mide utilizando un método que se muestra a continuación, mediante la utilización de un fenómeno en el que la β -galactosidasa sufre un cambio en la actividad enzimática de acuerdo con la concentración de iones de sodio, y la concentración de iones de sodio se puede cuantificar a partir de la variación en la absorbencia de los mismos:

15 una muestra biológica se diluye con el tampón diluyente y se diluye adicionalmente con agua purificada; se añade un primer reactivo de un tampón que comprende β -galactosidasa en una cantidad de 10 a 30 veces la cantidad en volumen de la muestra diluida; la mezcla se calienta de 30 a 45 °C durante 2 a 20 minutos; se añade un segundo reactivo de una solución de sustrato que comprende o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido en la mitad de la cantidad del primer reactivo; y se mide la absorbencia del o-nitrofenol producido a una longitud de onda primaria de 410 nm y una longitud de onda secundaria de 658 nm.

20 6. Uso de un tampón diluyente para diluir una cantidad mínima de la muestra de sangre en el método para cuantificar el componente de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 5, en donde el tampón diluyente comprende, como componentes del agente tamponador, un compuesto de aminoalcohol seleccionado del grupo que consiste en 2-amino-2-metil-1-propanol, 2-etilaminoetanol, N-metil-D-glucamina, dietanolamina y trietanolamina, y un agente tamponador seleccionado del grupo que consiste en HEPES (ácido 2-[4-

25 (2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-morfolino-propanosulfónico) y BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), y el tampón tiene una acción tamponadora entre pH 6,5 y 8,0, y el tampón está sustancialmente libre de la sustancia patrón externa.

Fig. 1

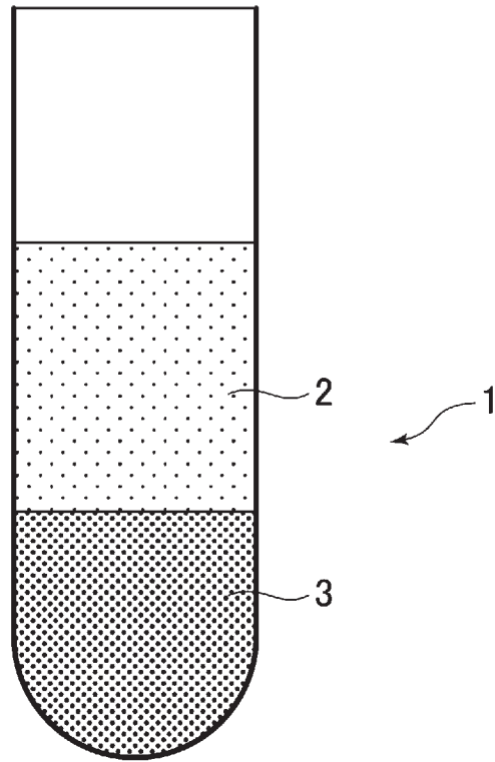


Fig. 2

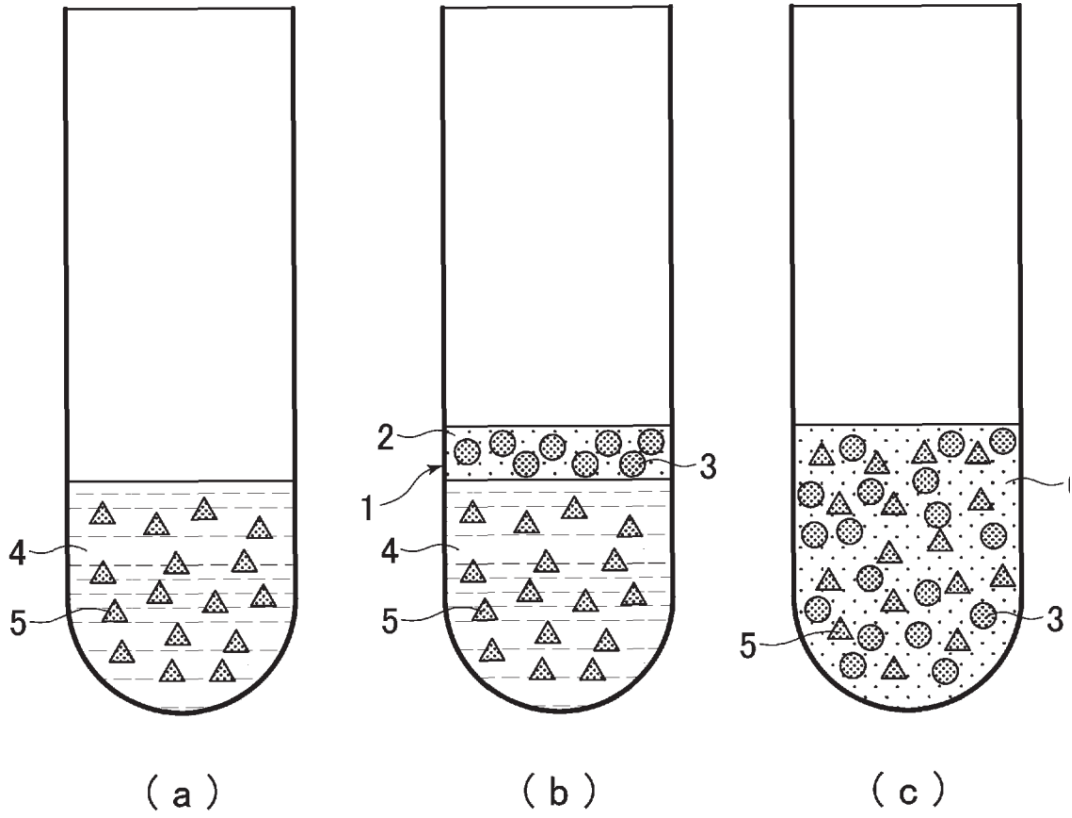


Fig. 3

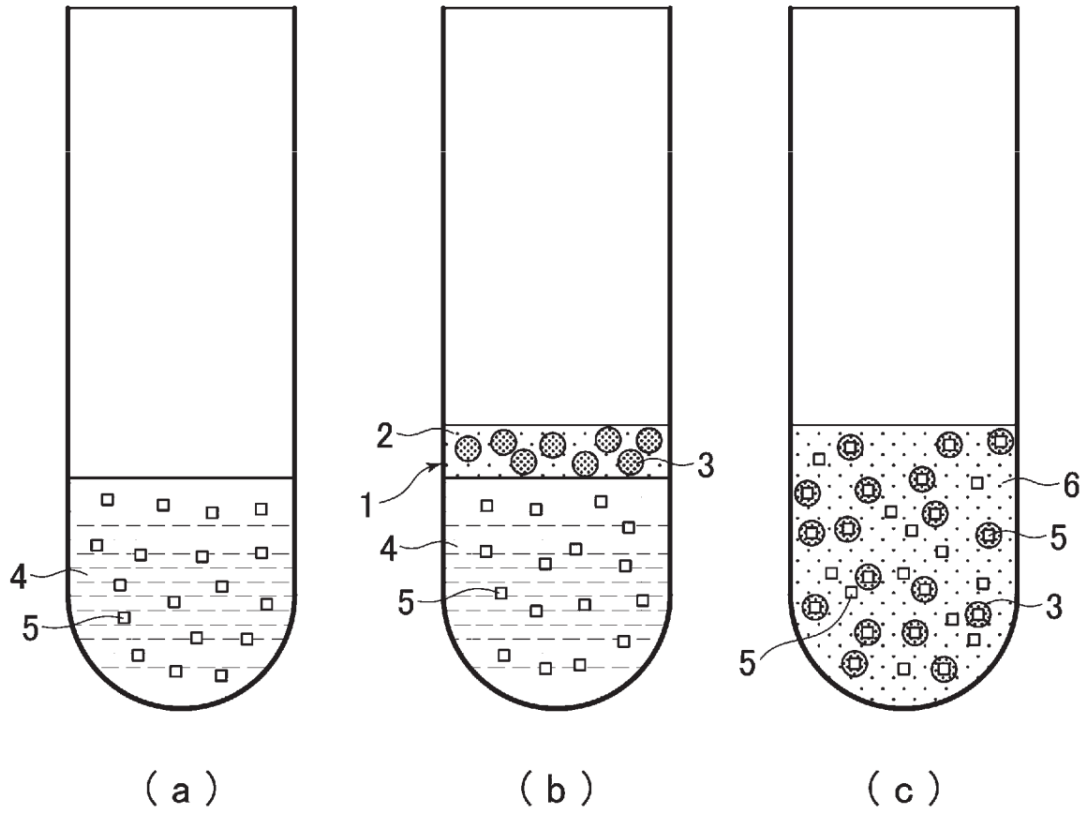
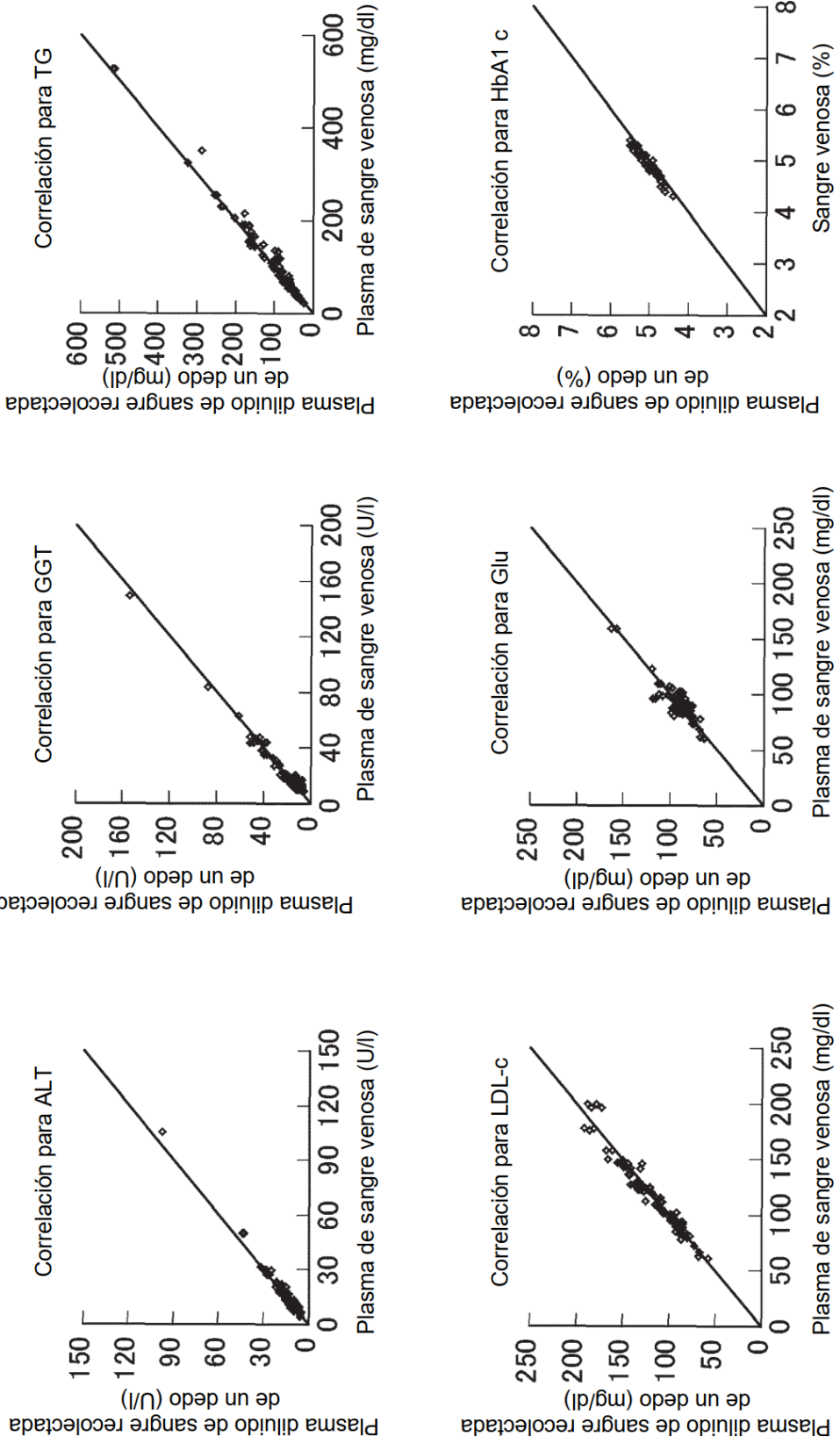


Fig. 4



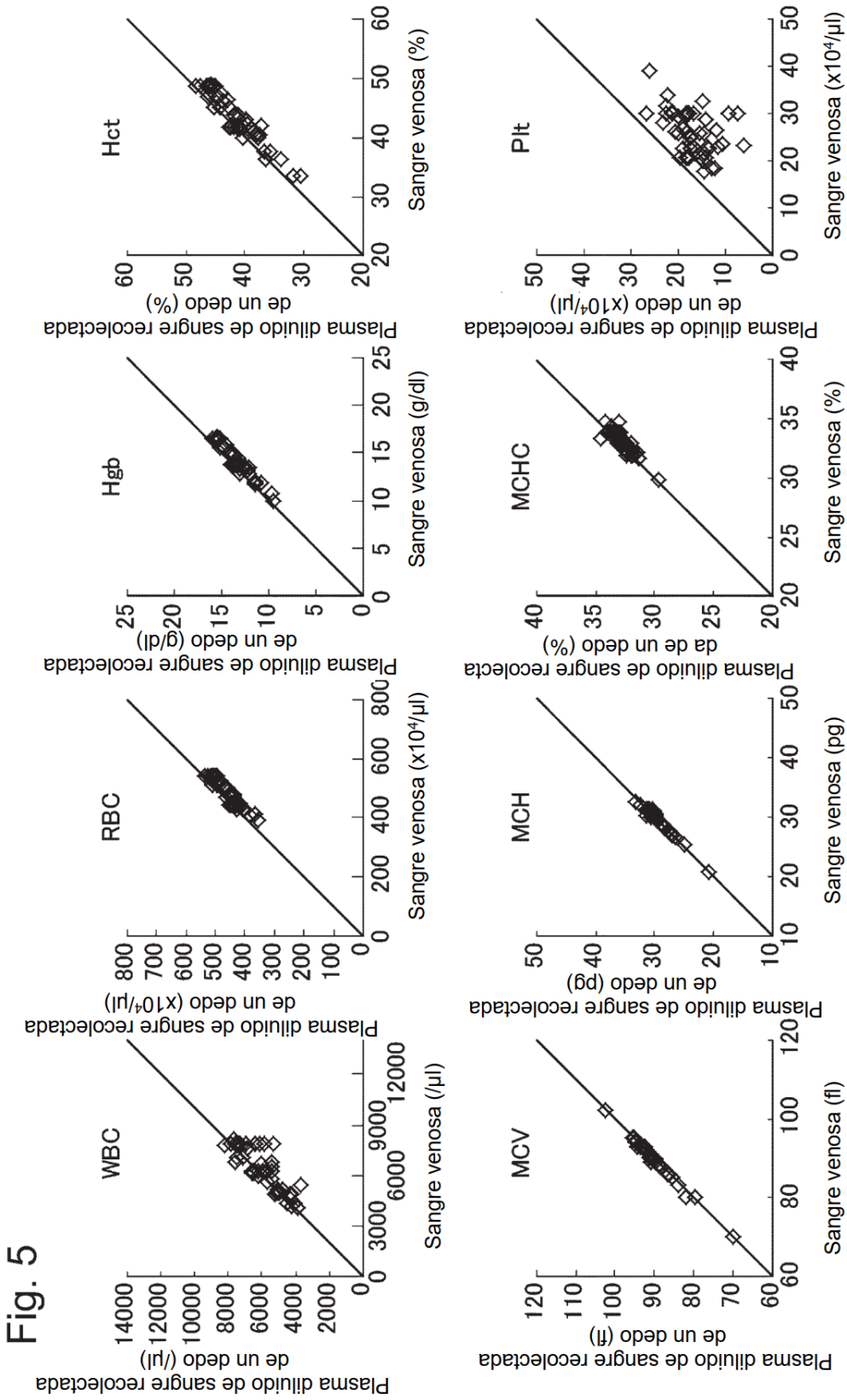


Fig. 5

Fig. 6

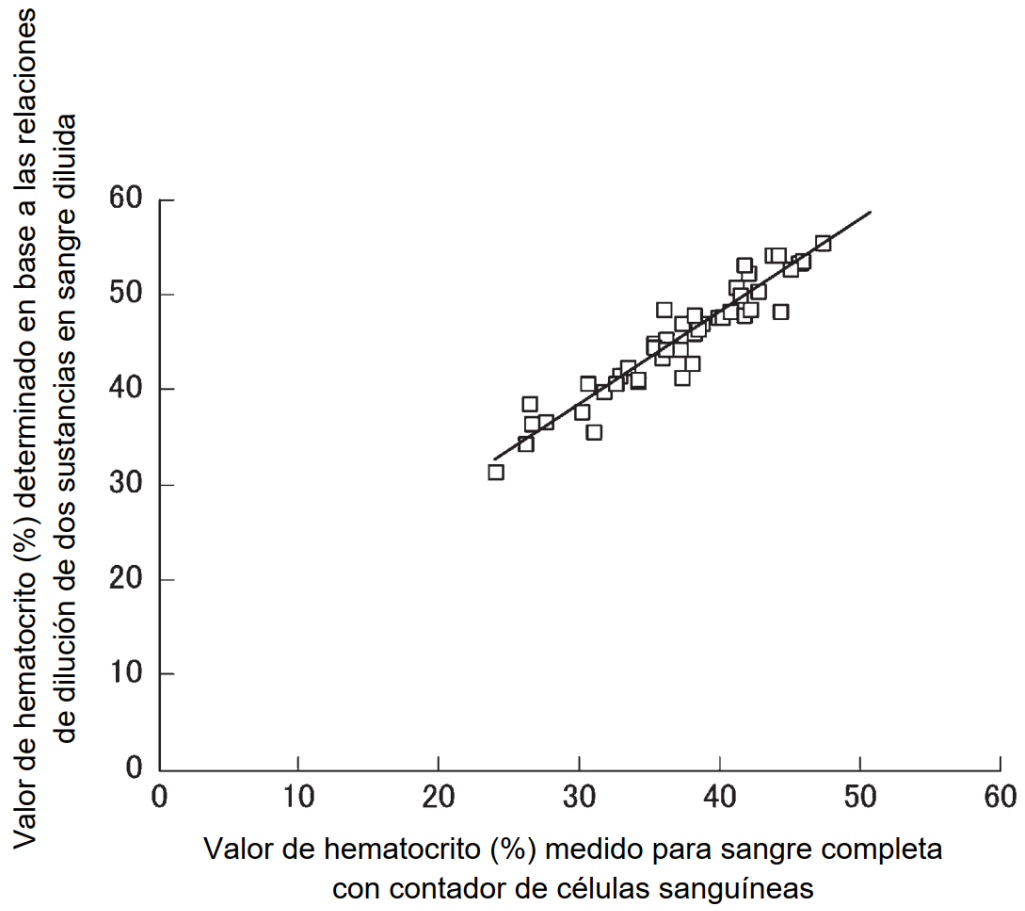


Fig. 7

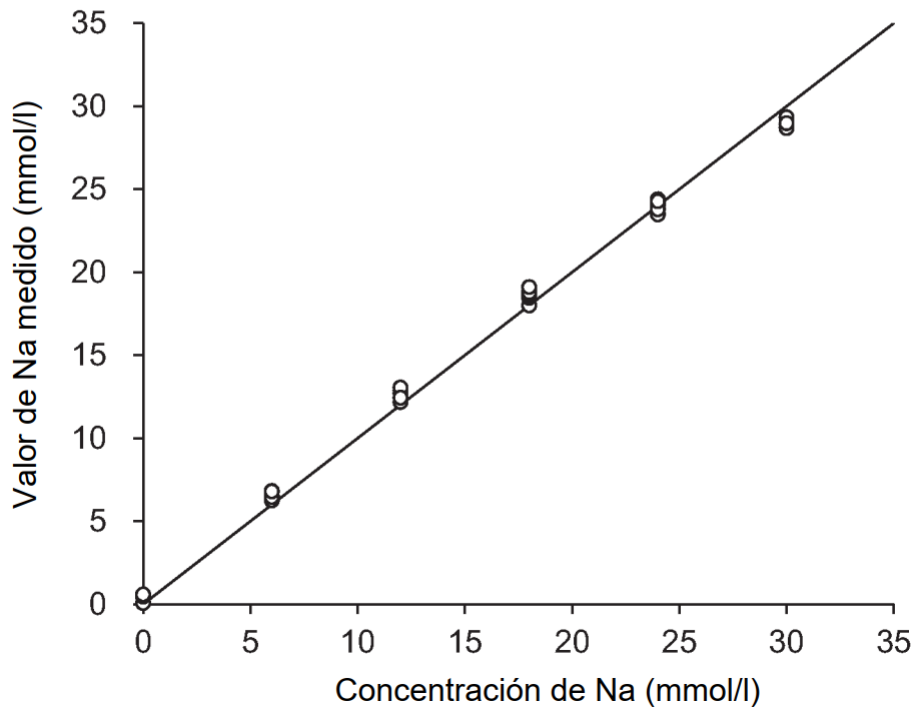


Fig. 8

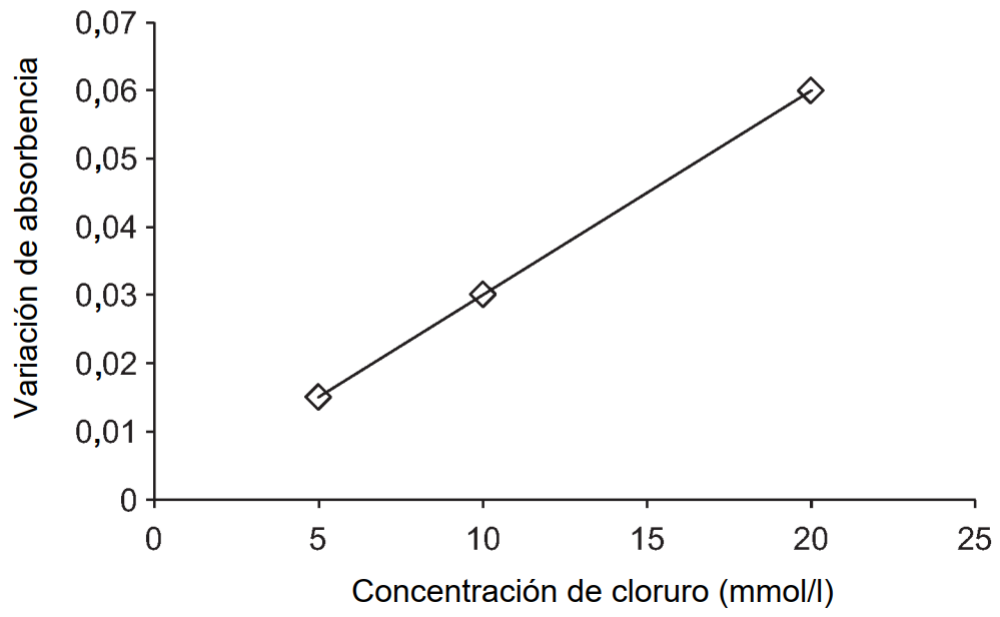


Fig. 9

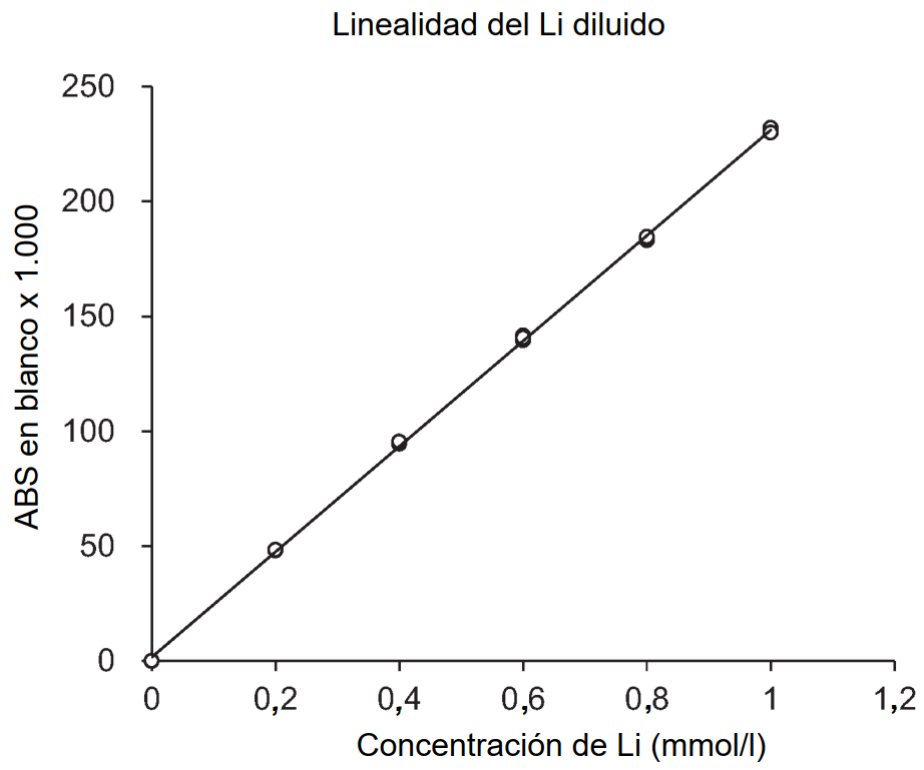
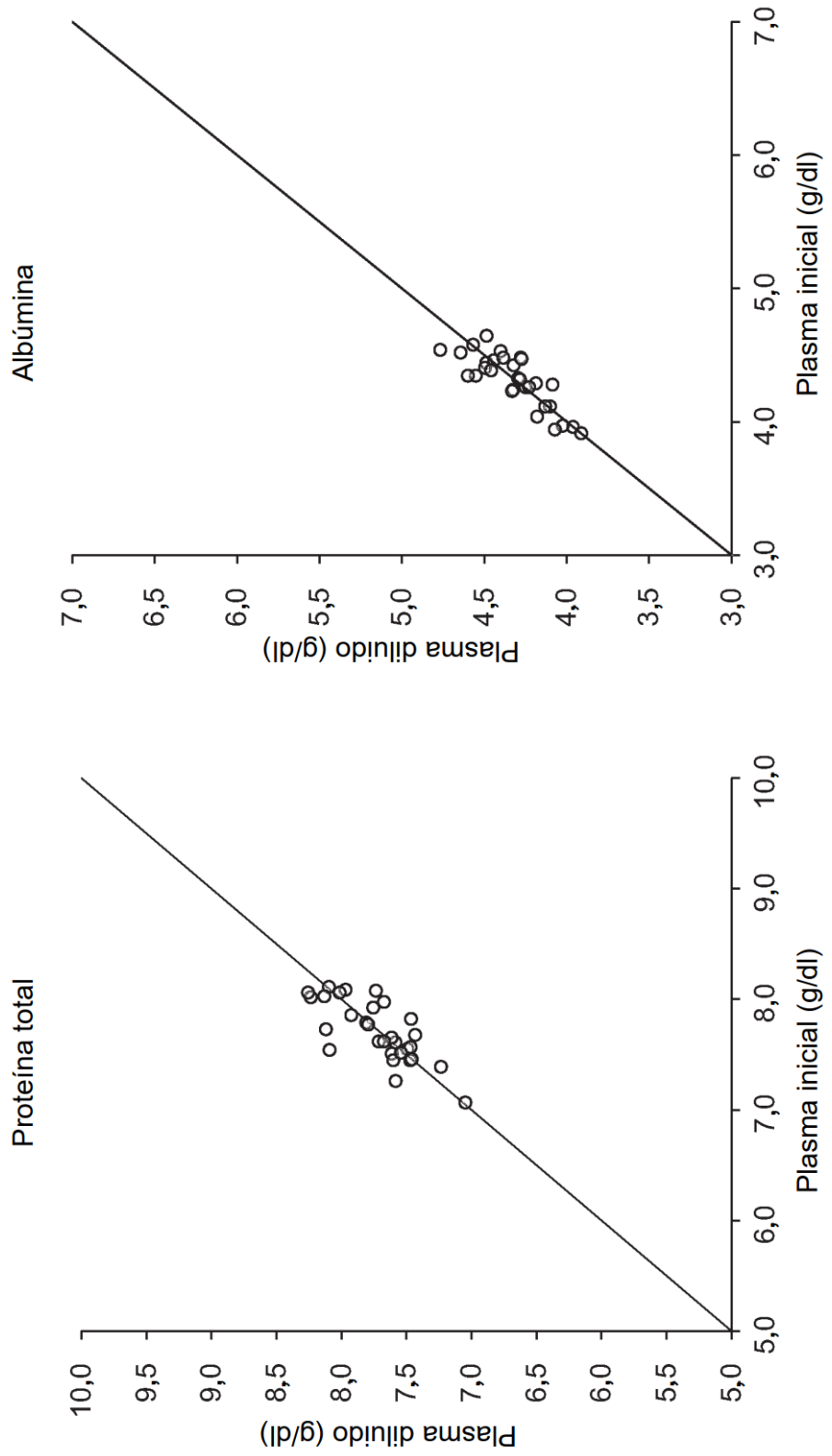


Fig. 10-1



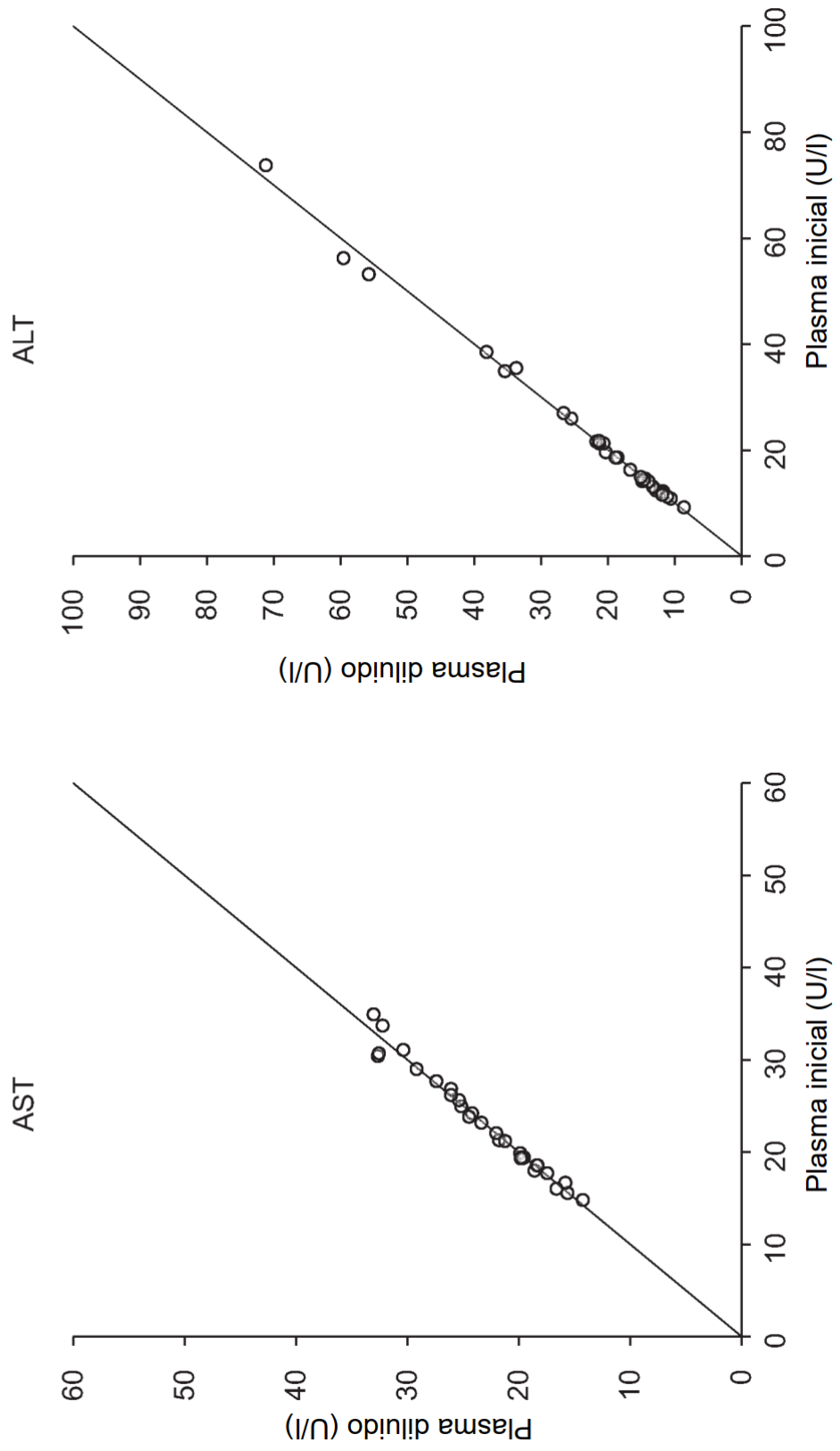


Fig. 10-2

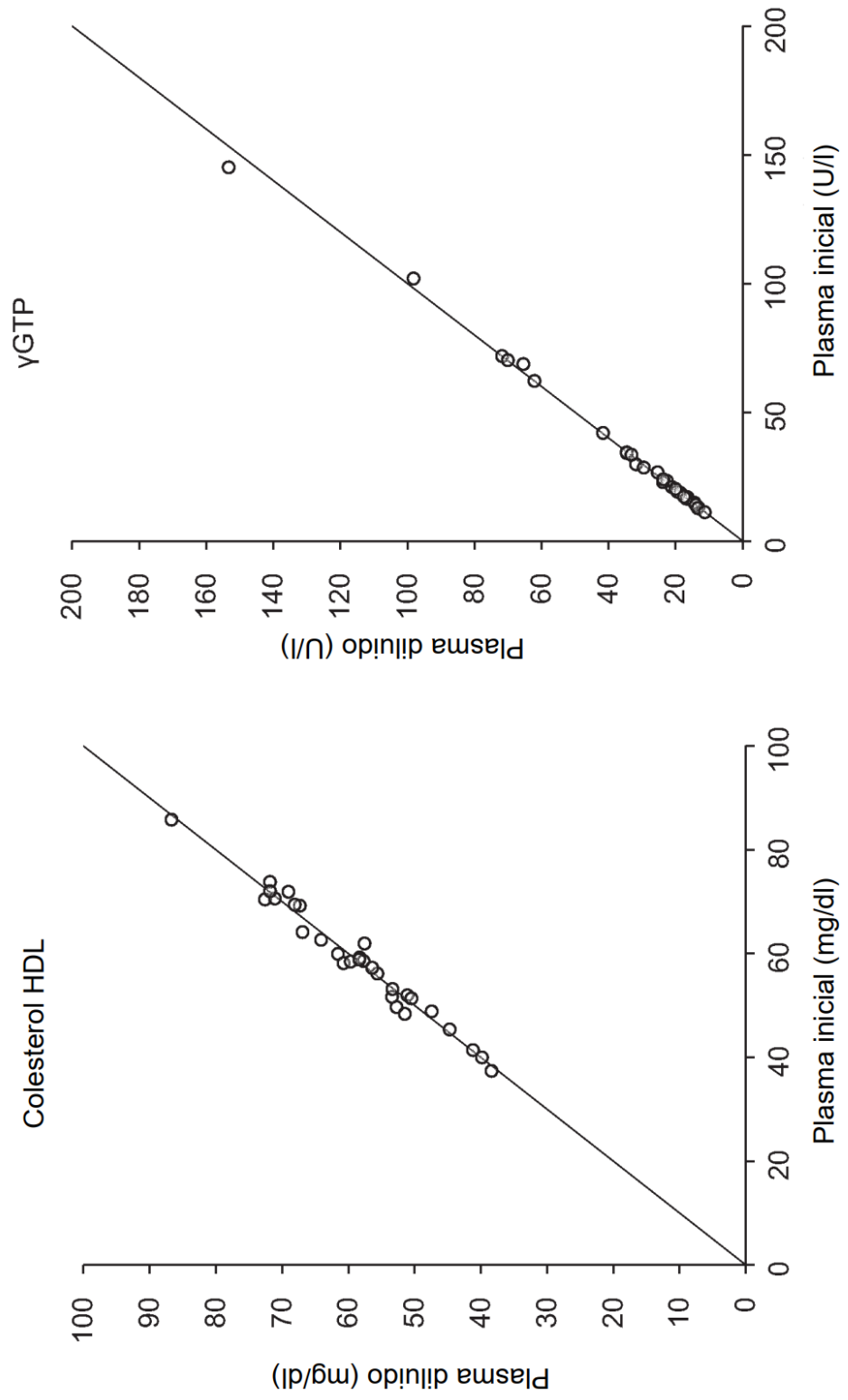


Fig. 10-3

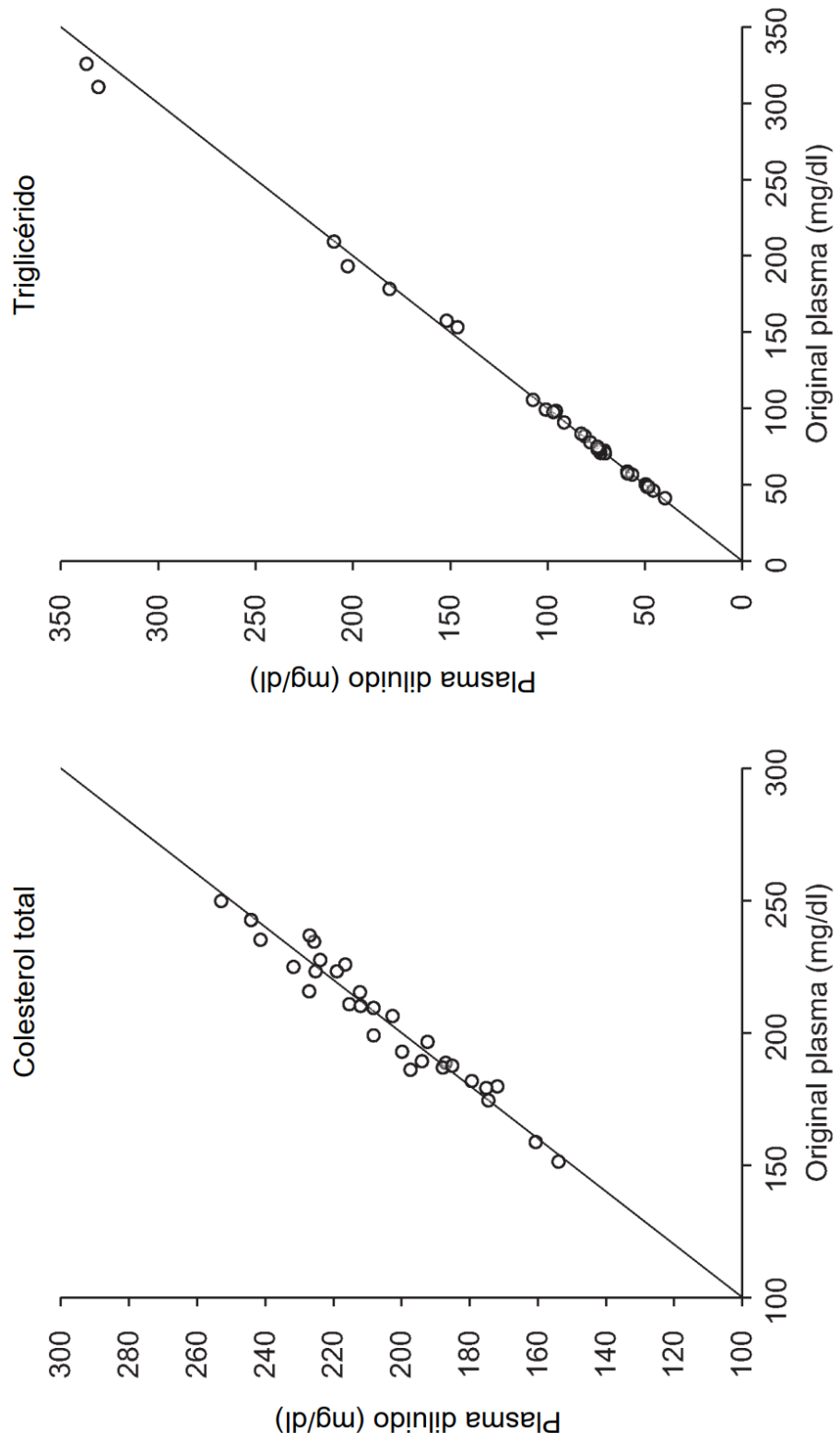


Fig. 10-4

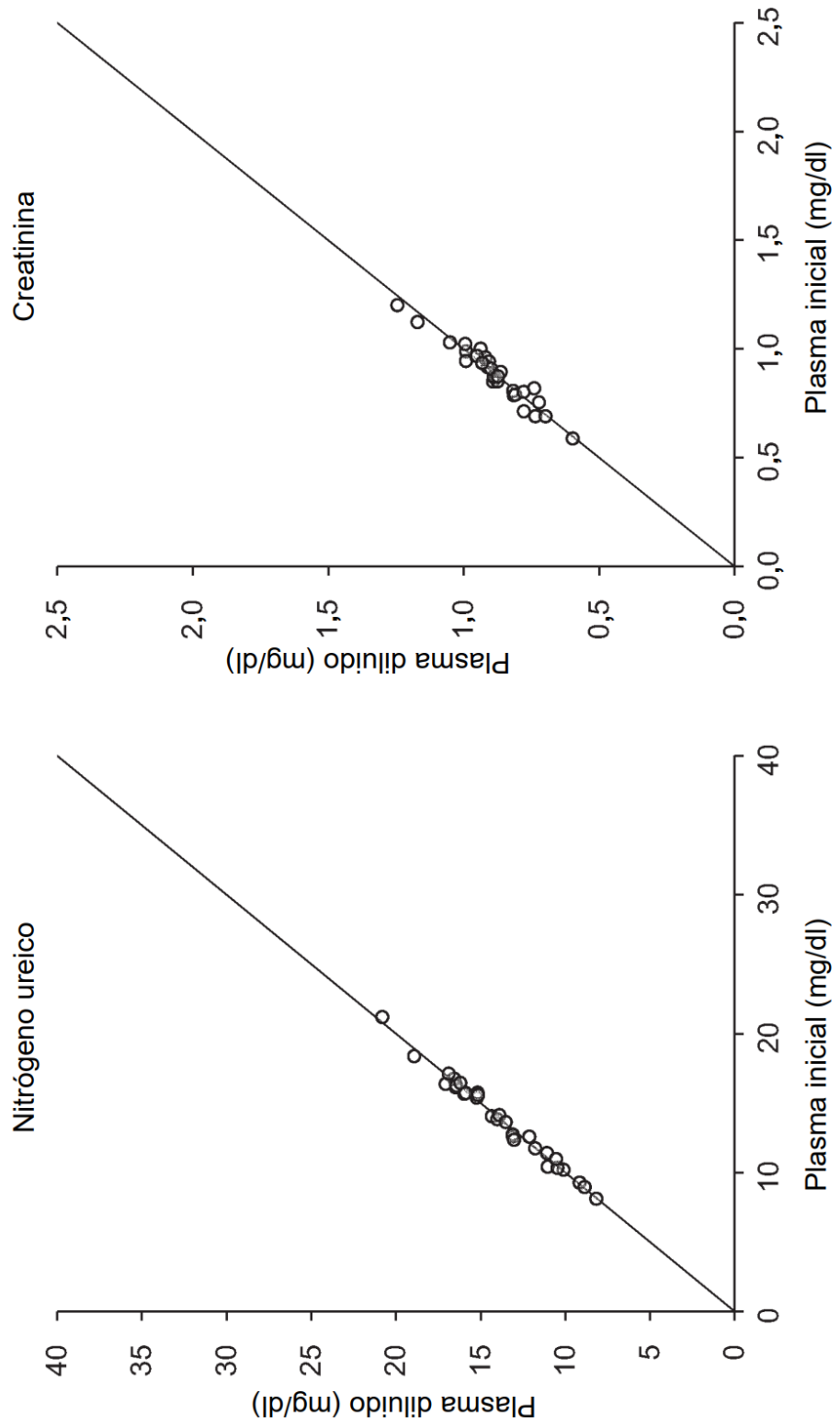


Fig. 10-5

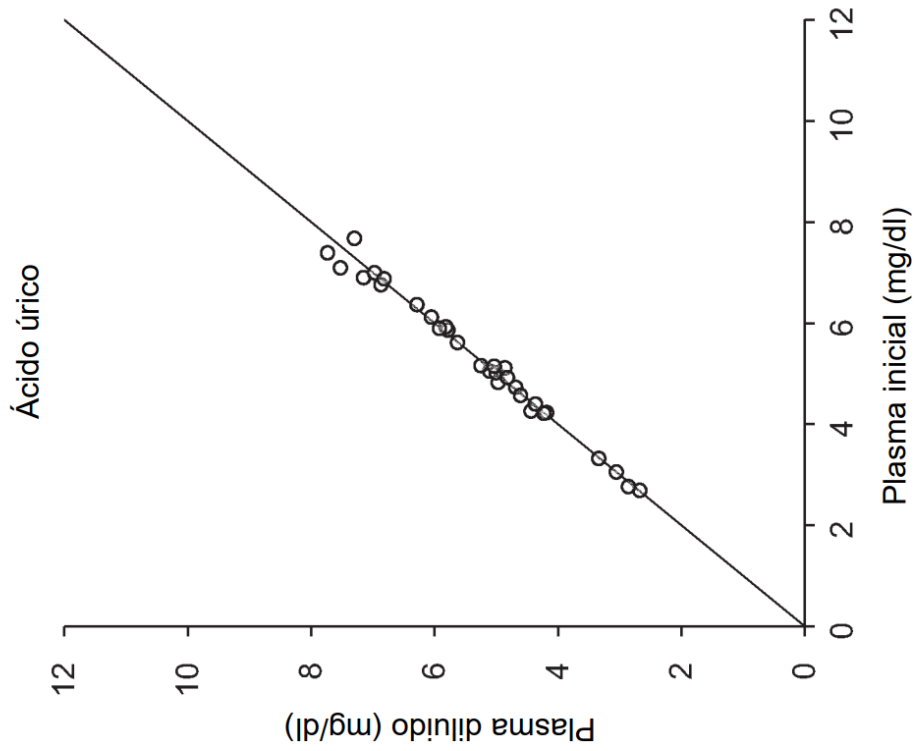
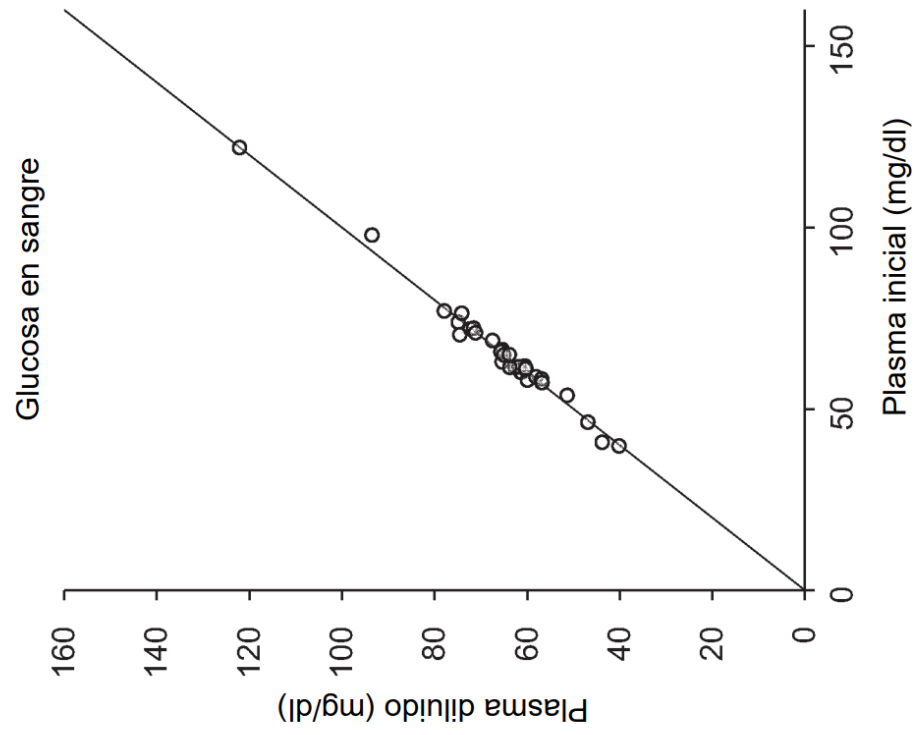


Fig. 10-6