



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 460**

51 Int. Cl.:
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04704993 .7**
86 Fecha de presentación : **24.01.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1588161**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **Sistema y método para medir el tiempo de coagulación sin control termostático.**

30 Prioridad: **01.02.2003 EP 03002254**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Hill, James, L.;**
Unkrig, Volker y
Rieger, Ewald

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Sistema y método para medir el tiempo de coagulación sin control termostático.

5 Hay muchos problemas médicos que guardan relación con la coagulación de la sangre. En particular durante el tratamiento con medicamentos anticoagulantes, los parámetros de coagulación de un paciente sufren variaciones constantes. Tales fluctuaciones pueden provocar problemas graves. Por ejemplo, si se trata un paciente con un fármaco anticoagulante, por ejemplo la heparina o el marcumar, es importante que sus parámetros de coagulación se mantengan dentro de un margen definido de valores para evitar complicaciones. Solamente así es posible reducir eficazmente las complicaciones de las hemorragias. Se necesita, por tanto, un método rápido y preciso para el seguimiento continuo de los parámetros de coagulación de la sangre que satisfaga todas las demandas terapéuticas.

15 Actualmente existen en concreto tres parámetros de coagulación que son de interés médico, a saber el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y el tiempo de coagulación activada (ACT). El PT sirve principalmente para el seguimiento del efecto de los antagonistas de la vitamina K en la coagulación (que incluye en los factores II, V, VII y X de la cascada de coagulación). En el ensayo PT se mide la activación del mecanismo extrínseco por adición de tromboplastina de tejido.

20 El APTT se emplea fundamentalmente para hacer el seguimiento de la terapia con heparina. En este ensayo se detectan los cambios de factor en la cascada de coagulación intrínseca (factores VIII, IX, XI, XII y otras enzimas y factores). Los reactivos para este tipo de ensayo todavía no se han estandarizado y, por lo tanto, hay diferencias considerables de sensibilidad a la heparina entre los reactivos de los diferentes fabricantes.

25 Se determina el ACT para efectuar el seguimiento de la heparinización en situaciones, en las que el ensayo APTT no puede aplicarse, porque el paciente ha recibido una dosis elevada de heparina.

30 Los parámetros de coagulación se han determinado tradicionalmente mediante ensayos llamados de “química húmeda”. Se mezcla una parte alícuota de una muestra de sangre con reactivos líquidos y se detecta el punto temporal, en el que la sangre coagula. Los resultados se indican directamente (en segundos) o en forma de cantidades derivadas, por ejemplo la proporción con respecto al valor normal correspondiente (en porcentaje). En lo que respecta al PT hay otras cantidades habituales para indicar los resultados del ensayo, como son el % rápido y la INR (International Normalized Ratio).

35 Desde hace algunos años se dispone de los ensayos llamados de “química seca” para determinar los parámetros de coagulación de la sangre. Se efectúa con sistemas que contiene elementos desechables que son vehículos de reactivos (denominados a menudo “elementos de ensayo”) y un instrumento de evaluación que generalmente se adapta a la evaluación de un tipo concreto de elemento de ensayo facilitado por un fabricante determinado. El elemento de ensayo contiene un sistema de reactivos necesario para el ensayo concreto y, con preferencia, la información adecuada para la evaluación del ensayo, como pueda ser el tipo de ensayo, el número de lote y la fecha de caducidad.

40 La invención se refiere a estos ensayos de química seca. Se diseña cada elemento de ensayo para permitir que una gota de sangre o una muestra de plasma (que en función del ensayo puede haberse tratado previamente, en particular por reacción con un anticoagulante preparatorio) aplicada para que entre en contacto con dicho elemento y para que se disuelva en un sistema de reactivo (que normalmente contiene un gran número de reactivos) presente en el elemento de ensayo y apropiado para iniciar la serie de reacciones del mecanismo de coagulación de la sangre. Después de mezclar la muestra con los reactivos, el líquido resultante de detección de la coagulación se halla presente en una zona de detección de coagulación del elemento de ensayo. Se hace el seguimiento del proceso de coagulación observando una propiedad medible del líquido de detección de la coagulación que cambie de una manera característica cuando tiene lugar un paso de reacción definido del mecanismo de coagulación. El sistema contiene medios para detectar dicho cambio y generar la señal correspondiente gracias a la electrónica de medición y evaluación del instrumento. 45 La electrónica de medición y evaluación incluye también una electrónica de medición del tiempo, que permite medir el tiempo de coagulación requerido para que se produzca tal cambio. Este tiempo se convierte en el parámetro de coagulación deseado (en las unidades apropiadas). A tal fin pueden utilizarse los datos de evaluación almacenados en el instrumento y/o en el elemento de ensayo. Los resultados se visualizan en la pantalla del instrumento y/o se guardan para su evaluación ulterior, por ejemplo en un sistema computerizado aparte.

50 Existe un sistema que es un producto comercial, que la empresa solicitante suministra con el nombre de CoaguChek®. Más detalles se encontrarán en la bibliografía adecuada, incluida la patente US-5 789 664 y el documento WO 01/11356. La muestra puede ser sangre total o plasma. A continuación, a título ilustrativo, se tomará como referencia la sangre. Sin embargo, esto no deberá considerarse como una limitación de la aplicabilidad general de la invención.

60 Los sistemas conocidos de ensayo de la coagulación difieren entre otros en lo que respecta a la propiedad medida del líquido de detección de la coagulación, que se emplea para medir el tiempo de coagulación y en lo que respecta al ordenamiento, mediante el cual se realiza la puesta en contacto de la muestra y los reactivos, así como por el diseño de la zona de detección:

- En algunos ensayos, la propiedad medida del líquido es la viscosidad, que puede detectarse p.ej. incluyendo partículas magnéticas en el sistema de reactivos. La movilidad de estas partículas puede detectarse mediante un campo

magnético alterno. En estos sistemas, el aumento de viscosidad provocado por el inicio de la coagulación es el cambio que marca el fin del tiempo de coagulación.

5 - Como alternativa puede utilizarse un constituyente químico, la concentración del cual cambia en un punto definido del mecanismo de coagulación, para marcar el fin del tiempo de coagulación. En particular puede hacerse el seguimiento de la enzima trombina, la proteasa final de los dos mecanismos de coagulación plasmática, por medios ya conocidos, incluido un reactivo presente en el sistema de reactivos del elemento de ensayo, que es idóneo para generar una señal eléctrica u óptica, que puede medirse con el instrumento de evaluación (véase p.ej. WO 01/63271).

10 - En lo que respecta al ordenamiento físico del elemento de ensayo, se ha propuesto el uso de una sola membrana porosa permeable, que se fija sobre un asa de plástico, similar al de las tiras de ensayo tradicionales (patente US-5 580 744). En tales elementos se aplica directamente la muestra sobre la membrana, que contiene al sistema de reactivos.

15 - En un ordenamiento alternativo se localiza el punto de aplicación de la muestra en el elemento de ensayo a una distancia de la zona de detección de la coagulación y el transporte del líquido de la muestra del primero a la última se realiza por un canal capilar (ver patente US-5 789 664).

Los ensayos de los parámetros de coagulación se han vuelto relativamente sencillos, en particular gracias a la introducción de ensayos químicos secos, pero continúa habiendo una tarea importante a realizar con vistas a simplificar el diseño y, de este modo, reducir los costes sin sacrificar la precisión. Por ejemplo, si a una persona se le coloca una válvula cardíaca de sustitución, su salud a largo plazo dependerá en gran manera del hecho de que el estado de coagulación se mantenga fiablemente dentro de ciertos límites. A tal fin debería disponerse de instrumentos pequeños, baratos, accionados con una batería, que los pacientes puedan utilizar por sí mismos, con el fin de hacer el seguimiento de su estado de coagulación de la sangre. Se aplican requisitos similares al ensayo del “punto de cuidado” (point of care, POC) de la profesión médica.

La invención se refiere, por tanto, a la tarea de simplificar el diseño de los sistemas para determinar los parámetros de coagulación, al tiempo que se mantiene el grado requerido de precisión.

30 Esta tarea se lleva a cabo con un sistema de determinación de un parámetro de coagulación de muestras de sangre o plasma de pacientes, dicho sistema consiste en un elemento desechable de ensayo, que incluye un sistema de reactivos que se mezclarán con la muestra, formando de este modo un líquido de detección de la coagulación; una zona de detección de la coagulación, que contiene al líquido de detección de la coagulación, para hacer el seguimiento de una propiedad medible del líquido de detección de la coagulación, dicha propiedad medible cambia durante la coagulación; un instrumento que tiene un soporte para sujetar dicho elemento desechable de ensayo insertado en él y que tiene un sistema electrónico de medición y evaluación adaptado a la detección de una señal que corresponde a la propiedad medible del líquido de detección de la coagulación y que incluye un sistema electrónico de medición del tiempo de coagulación, requerido para que tenga lugar dicho cambio, con el fin de derivar del mismo los parámetros de coagulación deseados; el tiempo de coagulación se determina a una temperatura no estándar del líquido de detección de la coagulación, diferente de la temperatura estándar, para el correspondiente parámetro de coagulación; dicha temperatura no estándar se mide con un dispositivo de medición de temperatura, este instrumento tiene una memoria no volátil que contiene datos que definen una relación matemática entre el tiempo de coagulación y la temperatura; dicha relación es independiente del paciente individual, cuya sangre se examina, y el parámetro de coagulación para la temperatura estándar se calcula a partir del tiempo de coagulación a dicha temperatura no estándar, aplicando dicha relación matemática.

50 Los sistemas conocidos de determinación de los parámetros de coagulación contienen por lo general ciertos tipos de dispositivos termostatos, diseñados para mantener constante una temperatura estándar durante la medición de coagulación, normalmente a 37°C. Esto requiere un calentador eléctrico y un sistema electrónico de control de la temperatura. En base a la invención, este dispositivo termostato no es necesario. A diferencia de ello, la medición de la coagulación puede hacerse a una temperatura conveniente (p.ej. a temperatura ambiente). A pesar de ello pueden determinarse valores precisos de los parámetros de coagulación deseados, que pueden compararse directamente con los determinados a temperatura estándar. Esto conlleva un gran número de ventajas:

55 - Los instrumentos de coagulación pequeños, portátiles, accionados con batería, tienen un sistema calefactor caro y que consume más energía de la batería que los demás componentes juntos. El volumen, el peso y el coste de los instrumentos pueden reducirse sustancialmente si no se necesita sistema calefactor y se puede trabajar con una batería más pequeña.

60 - Con el fin de asegurar un control exacto de la temperatura estándar deseada, los elementos de ensayo de los sistemas conocidos de química seca tienen un capilar largo que guía el líquido de la muestra desde el punto de aplicación de la muestra (fuera del instrumento) hacia el interior del instrumento, donde se halla alojado el dispositivo termostato. Si no se necesita un capilar tan largo, entonces puede reducirse el volumen de muestra.

65 - Se elimina o se reduce el tiempo de calentamiento que necesitan los instrumentos conocidos antes del ensayo. Esto simplifica el uso del sistema, en particular cuando el mismo paciente hace su seguimiento o en el caso de las aplicaciones POC.

- Para el calibrado de la INR se emplea en general una técnica manual, lo cual causa dificultades para controlar la temperatura estándar (37°C). Pueden reducirse los errores debidos a las desviaciones de la temperatura si dicha técnica puede efectuarse a temperatura ambiente.

5 Durante el trabajo experimental, en el que se basa esta invención, se ha determinado que el cambio de los parámetros del tiempo de coagulación frente a la temperatura puede describirse mediante una relación funcional que es específica de un instrumento concreto y de un sistema concreto de reactivos, pero que, de modo sorprendente, es independiente de la muestra. Por lo tanto, la misma relación funcional $f(T)$ (que puede ser p.ej. una función lineal o polinómica) describe la dependencia de la temperatura con independencia de la sangre que se está analizando. Tomando
10 el PT como ejemplo, este puede expresarse matemáticamente:

$$PT^{37} = f(T) * PT^T \quad (1)$$

15 en la que

PT^{37} = valor del PT para la temperatura estándar de 37°C

PT^T = valor del PT para una temperatura (inferior) no estándar.

20

En general, en el ámbito de la química clínica, no es infrecuente realizar un cálculo de corrección de la temperatura si el ensayo es dependiente de la temperatura y la temperatura de ensayo actual es distinta de la temperatura de ensayo estándar deseada. Por ejemplo, los ensayos para determinar la concentración de glucosa en la sangre son dependientes de la temperatura y se ha propuesto eliminar los errores debido a las variaciones de temperatura mediante un cálculo apropiado de corrección (véase p.ej. las patentes US-5 405 511 y US-5 972 715).

25

Sin embargo, la detección de la coagulación es fundamentalmente diferente de la detección de la concentración de un analito como pueda ser la glucosa. La dependencia de la temperatura de los ensayos de glucosa es debida a factores influyentes, que son dependientes de la muestra individual que se está analizando. En concreto, la reacción
30 enzimática, en la que se basa el ensayo, depende de la temperatura. Un ensayo de coagulación es fundamentalmente diferente porque es esencialmente un modelo experimental del proceso de coagulación natural y, es bien sabido, que implica una reacción muy complicada, en la que intervienen más de diez factores y enzimas de la sangre del paciente en cuestión. El hecho de que el comportamiento de coagulación de la sangre sea muy diferente para cada individuo es también evidente por el hecho de que las dosis de la medicación correspondiente (p.ej. heparina o marcumar) tienen
35 que adaptarse a cada individuo.

Por lo tanto, en los ensayos de coagulación, la cantidad que se mide dependerá de la muestra individual concreta, es decir, del individuo, cuya sangre se está analizando y del estado en que se halla su sistema de coagulación. En lo que respecta a la dependencia de la temperatura se tiene que suponer lo mismo. Por consiguiente no se podía esperar que,
40 examinando la sangre de un número limitado de pacientes a temperaturas diferentes con el mismo sistema de ensayo (el mismo tipo de instrumento y el mismo sistema de reactivos, con preferencia del mismo lote de fabricación), se pudiera generar una curva universal $f(T)$ que permita el cálculo del PT^{37} a partir de los valores de PT^T determinados a una temperatura no estándar, que pudiera aplicarse a otros pacientes provistos de una sangre completamente diferente.

45 En la técnica anterior, los ensayos PT y APTT no se realizan por lo general a temperaturas situadas fuera del intervalo estándar entorno a 37°C. Una excepción se describe en: A. Uldall: "Prothrombin time standardization and temperature problems", Clinica Chimica Acta 39-44, 1980.

Esta publicación se refiere a ensayos del PT realizados en un tubo de vidrio, que se sumerge en un baño de agua
50 para conseguir un control exacto de la temperatura. El autor describe los problemas causados por las desviaciones con respecto a la temperatura estándar de 37°C, p.ej. en el caso de que el tubo no esté sumergido hasta una profundidad suficiente y por el hecho de que el tubo tiene que sacarse repetidamente del baño de agua para examinar su estado de coagulación. Con el fin de reducir estos problemas se toma en consideración una disminución de la temperatura estándar de 37°C, generalmente aceptada, a 30°C.

55

En la patente US-5 031 619 se describe un ensayo de tiempo de sangrado (bleeding time). En estos ensayos se practica una incisión de dimensiones predeterminadas en la piel de un paciente y se mide el tiempo desde el momento en el que se inicia la hemorragia a través de la incisión y el momento en que se produce la coagulación. Se utilizan estas mediciones del tiempo de sangrado como ensayos exploratorios de evaluación de la adecuación hemostática de
60 las plaquetas, que depende del número de plaquetas y de la función de las plaquetas. Es un ensayo cualitativo (o como máximo semi-cuantitativo) que permite explorar ciertos trastornos (p.ej. la trombostenia de Glanzmann). La patente describe el hecho, ya conocido anteriormente, de que en términos generales la velocidad, con la que tiene lugar la hemorragia externa, es inversamente proporcional a la temperatura de la piel del individuo y sugiere aplicar un factor fijo de 0,05 por grado con el fin de compensar las variaciones de la temperatura del sujeto.

65

La patente US-5 580 744, ya mencionada antes, describe un gran número de ensayos, todos ellos realizados a una temperatura estándar constante. Como alternativa teórica se menciona la posibilidad de realizar las reacciones de detección de la coagulación a una temperatura diferente, por ejemplo a temperatura ambiente. Se describe una ecuación

para un posible cálculo de corrección, pero en la patente no se explica cómo puede llevarse a cabo en la práctica. Nada se menciona acerca de los problemas provocados por el hecho que el mecanismo de coagulación es diferente en cada individuo. Al parecer el autor no aborda esta cuestión, dado que su sistema está diseñado específicamente para aplicarse a una sola persona.

La invención se describe a continuación con referencia a las figuras anexas.

En la figura 1 se representa la sección transversal de un sistema de ensayo de coagulación, en el que el elemento de ensayo está insertado dentro del instrumento de evaluación;

en la figura 2 se representa un diagrama esquemático del diseño de un sistema preferido según la invención;

en la figura 3 se representa una vista ampliada del elemento sensor de la temperatura representado en la figura 2;

en la figura 4 se representa gráficamente la relación PT^{37}/PT^T frente a la $T[^\circ\text{C}]/37$ para una serie de ensayos realizados en el contexto de la invención;

en la figura 5 se representan gráficamente los resultados de la comparación de la invención con una determinación convencional de los valores de la INR;

en las figuras de 6 a 10 se representan los resultados correspondientes a la figura 4, obtenido en ensayos con diferentes parámetros de coagulación.

La figura 1 es una representación esquemática de la sección de un sistema de ensayo de coagulación que consta de un instrumento de evaluación 1 y de un elemento desechable de ensayo 2. El elemento de ensayo tiene una abertura 3, en la que se aplica la muestra, un canal capilar 4 y un espacio 5, que sirve de cámara de reacción, y una zona de detección de la coagulación 6. El canal 4 es muy corto y puede incluso omitirse, porque en un sistema de detección de coagulación según la invención, la zona 6 no necesita estar termostata y, cuando el elemento de ensayo 2 está insertado en el soporte 8 del instrumento 1, está situada con preferencia fuera de la carcasa del instrumento 1, pegando a la abertura 3 de aplicación de la muestra.

En los dispositivos de la técnica anterior, la facilidad de aplicación de la muestra requería que la abertura de aplicación de la muestra estuviera fuera del instrumento, mientras que el termostato requerido para la zona de detección de la coagulación del elemento de ensayo estaba dentro de la carcasa del instrumento. La muestra se transportaba de la primera a la última a través de un largo conducto capilar. Esto a su vez requería un gran volumen de muestra, no solo porque el conducto era largo, sino también porque la sección transversal del conducto capilar tenía que ser lo suficientemente grande para conseguir una velocidad adecuada del líquido transportado. A diferencia de ello, la invención permite una distancia de transporte muy corta (con preferencia inferior a 1 cm o incluso inferior a 0,5 cm) y un volumen de muestra extraordinariamente pequeño (con preferencia inferior a 5 μl , con preferencia especial inferior a 2 μl).

El espacio 5 contiene el líquido de detección de la coagulación, que se forma por mezclado de una muestra aplicada en el campo de aplicación de muestra 3 y un sistema de reactivos (no representado). La detección de la coagulación se realiza en la zona de detección 6, mediante la detección de un cambio de una cantidad de medición relacionada con la coagulación del líquido contenido en ella. Las señales resultantes se transmiten a través de los conductores 9 a una unidad de medición y evaluación 13, que controla el funcionamiento del instrumento. La detección de la coagulación puede realizarse por cualquier método conocido de la técnica anterior, en particular por medios ópticos o electroquímicos, véase p.ej. la patente US-5 789 664 y el documento WO 01/11356. Los detalles de una forma preferida de ejecución se describen a continuación.

El sistema de la invención contiene un dispositivo 7 de medición de la temperatura, que es idóneo para medir la temperatura en la zona de detección de la coagulación 6. Como elemento sensor de la temperatura 14 se integra un sensor de medición de la temperatura, en especial un termistor, en el elemento de ensayo 2 y se conecta en los contactos enchufados al sistema electrónico del instrumento. Puede proporcionarse además un sensor de temperatura del instrumento 15 y utilizarse del modo descrito a continuación con mayor detalle.

El elemento de ensayo 2 lleva la información relativa del tipo de ensayo y al lote de reactivos a un campo de información 10, que se evalúa mediante un lector de información del elemento 11. Se transmite la señal de información detectada a través de conductores (no representados) hacia la unidad de medición y evaluación 13. El campo de información 10 y el lector de información 11 se representan solo esquemáticamente. Como ejemplo preferido puede utilizarse un código de barras y un detector adecuado de códigos de barras.

Una tarjeta (llave) ROM 16 se aloja de modo intercambiable en la ranura de tarjetas ROM 17 y está conectada con la unidad central de medición y evaluación 13 para intercambiar datos con ella. Incluye una memoria 18, en la que se almacenan los datos requeridos para la evaluación del ensayo. Estos datos dependen del lote de fabricación del elemento de ensayo. El campo de información 10 contiene con preferencia los datos de identificación, que son específicos del lote de fabricación de un elemento de ensayo concreto 2. Esta información se lee con el lector de información 11 y se compara con los datos de identificación de lote almacenados en la tarjeta ROM 16 con el fin de

asegurar que la tarjeta ROM insertada en la ranura del instrumento corresponde el lote de fabricación del elemento de ensayo 2.

La memoria 18 de la tarjeta ROM 16 incluye además datos que describen la relación entre el tiempo de coagulación y la temperatura que se emplea para el cálculo de los parámetros de coagulación deseados para una temperatura estándar a partir del tiempo de coagulación medido a una temperatura no estándar. Como alternativa, estos datos pueden hallarse también alojados en una memoria permanente del instrumento 1.

La unidad central de medición y evaluación 13 puede constar de circuitos electrónicos convencionales, incluidos un ASIC 20 y una placa de circuitos 21. Consta de un microprocesador programable para controlar las funciones del instrumento y realizar los cálculos requeridos. Combina en concreto la información de señales recibida del dispositivo de detección de la coagulación 6, del dispositivo de información del elemento 11, de la memoria no volátil 18 y del dispositivo de medición de la temperatura 7 para derivar el parámetro de coagulación deseado. Este resultado se transmite a un visualizador o pantalla (no representado) del instrumento 1. La alimentación eléctrica para que el instrumento funcione se aporta con una pila o batería 22.

La mayor parte de componentes del sistema representado en la figura 1 son convencionales y no es necesario dar más detalles para describirlos. Sin embargo, a diferencia de la técnica anterior, el instrumento 1 no tiene que equiparse con un sistema de termostato que incluya un calentador y un control de calentamiento eléctrico. En su lugar emplea un dispositivo de medición de la temperatura 7 que mide (directa o indirectamente) la temperatura del líquido de detección de la coagulación en la zona de detección de la coagulación y la relación matemática almacenada en la memoria 18 para calcular el parámetro de coagulación para la temperatura estándar.

Durante la evaluación experimental de la invención se ha demostrado de forma adecuada que la medición de la temperatura contigua al espacio, en el que se halla el líquido de detección de la coagulación, es suficiente para permitir un cálculo preciso de un parámetro deseado de coagulación estándar (que se obtendría a una temperatura controlada de aproximadamente 37°C) a partir de las mediciones realizadas a una temperatura diferente (por lo general mucho más baja) empleando la relación matemática, que se independiente de la muestra en cuestión y puede, por tanto, almacenarse en la memoria no volátil del instrumento y emplearse repetidamente para un gran número de individuos diferentes (pacientes). La unidad de medición y evaluación 13 está adaptada a la realización de los cálculos requeridos.

En las figuras 2 y 3 se representan importantes rasgos de diseño de una forma de ejecución preferida de un sistema de ensayo de coagulación, en parte como vista superior que representa una forma preferida de ejecución de las capas del elemento de ensayo y en parte como diagrama de bloques del sistema electrónico. Esta forma preferida de ejecución está caracterizada en particular por dos aspectos:

- la detección de la coagulación se realiza por el ordenamiento de reactivos y electrodos que se representa en la parte superior de la figura 2;

- la medición precisa requerida de la temperatura en la zona de detección de la coagulación se realiza mediante el uso combinado de un sensor de temperatura del elemento 14, integrado en el elemento de ensayo, y un sensor de temperatura del instrumento 15, alojado en el instrumento (relativamente alejado de la zona de detección de la coagulación 6).

Pueden combinarse estos dos aspectos. En este caso, el elemento de ensayo tiene con preferencia dos capas de conductores eléctricos, por ejemplo las capas A y B representadas en la figura 2. Estas capas pueden alojarse de manera ya conocida en una lámina soporte no conductora (plástica) y separarse mediante una capa aislante. El contacto eléctrico entre el conjunto del electrodo, efectuado mediante los conductores de las capas, y el instrumento se realiza por las pistas de contacto del elemento 25 y 26, respectivamente, que proporcionan la conexión eléctrica con los correspondientes contactos del instrumento 27 (figura 1). Con el fin de proporcionar el transporte del líquido de la muestra desde la abertura 3 de introducción de la muestra hasta la zona de detección de la coagulación 6 se coloca un canal capilar 4 en la parte superior de la capa A. Todos los elementos mencionados del diseño pueden realizarse por medios ya conocidos, por lo tanto no requieren una descripción más detallada.

El conjunto del electrodo A de la figura 2 consta de cinco electrodos, que incluyen un primer contra-electrodo 30, un electrodo de detección de gota 31, un electrodo de trabajo 32, un segundo contra-electrodo 33 que tiene dos dedos 34 que envuelven al electrodo de trabajo 32 y un electrodo de detección de llenado 35 en forma de remolino. La estructura del electrodo puede producirse p.ej. por técnicas de ablación láser de capas de oro de un grosor aprox. de 50 μm .

El contra-electrodo 30 está situado pegando a la abertura de llenado 3 y está cubierto con una capa de reactivo de referencia 37, que contiene p.ej. Ag/AgCl. El electrodo de trabajo 32 y el segundo contra-electrodo 33 están cubiertos con un reactivo de detección de coagulación 38, que incluye un sistema de reactivos requerido para iniciar las reacciones del mecanismo de coagulación. La capa de reactivos 38 contiene además todos los reactivos requeridos para la detección de la propiedad medible adecuada, en concreto, en el caso preferido de la detección enzimática de la coagulación, un sustrato de la enzima correspondiente, por ejemplo el sustrato electrozima TH de la enzima trombina.

ES 2 294 460 T3

Un protocolo de ensayo realizado con el sistema representado en la figura 2 puede incluir los pasos siguientes:

- Se pone en marcha el instrumento automáticamente insertando un elemento de ensayo y se efectúa el chequeo habitual de funcionamiento.

- Cuando se introduce una gota de muestra en la abertura de muestras 3 del canal capilar 4 y el líquido crea un puente entre el primer contra-electrodo 30 y electrodo de detección de gotas 31, esto puede detectarse aplicando un potencial AC adecuado a estos electrodos y detectando una caída abrupta de la impedancia entre los dos electrodos, cuando estos se ponen en contacto gracias al líquido.

- Cuando la muestra de sangre sigue avanzando en el interior del canal capilar 4 (por acción capilar), su llegada al electrodo de trabajo 32 y al segundo contra-electrodo 33 puede detectarse de nuevo aplicando un potencial AC adecuado a estos electrodos. La humectación del electrodo de trabajo 32 es también un punto de partida apropiado para la medición del tiempo de coagulación, ya que coincide con la disolución de la capa de reactivos 38 y, por tanto, con el inicio de la secuencia de reacciones de coagulación.

- El llenado completo del capilar 4 se detecta por una corriente que fluye entre el electrodo de detección de llenado 34 y un segundo contra-electrodo 33.

- Como propiedad medible del líquido de detección de la coagulación, la actividad enzimática se detecta por medios electroquímicos. A tal fin, después de llenarse por completo el capilar 4, se aplica un potencial DC constante apropiado al electrodo de trabajo 32 con respecto al primer contra-electrodo 30. A continuación se realizan mediciones de corriente a intervalos apropiados (p.ej. 0,1 segundos). Cuando al término del curso de la coagulación se forma la enzima trombina, esta descompone el grupo electroquímicamente activo del sustrato alojado en la capa de reactivos 38, con lo cual produce un aumento de la corriente, que es característico de la formación de la enzima. Este cambio define el fin del tiempo de coagulación, que se emplea para derivar el parámetro deseado de coagulación de una manera ya conocida.

La capa B de la figura 2 es un ejemplo de conductores eléctricos idóneos como sensor de temperatura del elemento 14. Su rango de sensibilidad de temperatura 40 se define como el área en la que se introduce un conductor termistor eléctrico, muy fino y estrecho, por ejemplo formando meandros del modo que se representa con mayor detalle en la figura 3. El conductor 41 puede fabricarse con cualquier material típico de termistores, que presentan una gran dependencia de la resistencia frente a la temperatura. Sin embargo, se ha constatado que también pueden utilizarse materiales más habituales para la fabricación de elementos de ensayo, incluida una capa de oro de un grosor suficientemente pequeño (menos de 100 μm).

Se mide la resistencia del conductor termistor 41 con un ordenamiento de cuatro terminales, en el que dos terminales, el 42 y el 43, se emplean para alimentar con una corriente constante al conductor termistor 41 y dos terminales separados, el 44 y el 45, se emplean para medir la resistencia de una manera independiente de la corriente.

Durante el funcionamiento del sistema, la señal de temperatura generada por el sensor de temperatura del elemento 14 se emplea en combinación con la señal generada por el sensor del instrumento 15 para determinar un valor fiable de temperatura que tenga una precisión elevada para poder utilizar para el cálculo del parámetro de coagulación para la temperatura estándar a partir de una medición realizada previamente a una temperatura (inferior) no estándar:

- El sensor de temperatura del elemento 14 se emplea únicamente para proporcionar información acerca de los cambios de temperatura en la proximidad inmediata de la zona de detección de la coagulación 6. Por ello no es necesario que este sensor ni el sistema electrónico de medición de la temperatura 46 (que forma parte del sistema electrónico de medición y evaluación 13) efectúen mediciones de temperatura en cantidades absolutas.

- Se emplea el sensor de temperatura del instrumento 15 para proporcionar información de temperatura referida a una temperatura estándar. Esta información de temperatura no tiene que ser absoluta en el sentido de que la diferencia medida con respecto a la temperatura estándar es (con alto grado de precisión) el mismo para todos los instrumentos, lo cual es un requisito necesario para utilizar la misma relación matemática del tiempo de coagulación frente a la temperatura para la conversión de la temperatura de todos los instrumentos.

En el uso práctico, después de la inserción del elemento de ensayo 2 en el instrumento 1 se hace el seguimiento de la temperatura del sensor de temperatura del elemento 14 para derivar una información acerca del cambio de la temperatura del elemento frente al tiempo o, en otras palabras, la velocidad con que cambia la temperatura del elemento. Solamente cuando esta velocidad de cambio se sitúa por debajo de un valor aceptable (en otras palabras, solamente cuando la temperatura del elemento 2 es suficientemente constante) se genera una señal que indica que una gota de una muestra se ha introducido en el elemento de ensayo para efectuar la determinación del parámetro de coagulación. Cuando se cumple esta condición, el valor de temperatura del sensor de temperatura del instrumento 15 se emplea como temperatura "verdadera" para la conversión.

Se hace el seguimiento con preferencia no solo del intervalo de temperaturas del sensor de temperatura del elemento 14, sino también el cambio de temperaturas del sensor de temperaturas del instrumento 15. Se logran resultados incluso mejores si la determinación de la coagulación se efectúa solamente cuando la velocidad de cambio de ambos sensores

ES 2 294 460 T3

de temperatura se sitúa por debajo de un límite adecuado (que puede ser diferente para ambos sensores), lo cual indica un entorno de temperatura muy constante.

Durante la evaluación experimental de la invención se ha encontrado que con estos medios es posible una medición de la temperatura que satisface incluso los requisitos extremadamente altos de los ensayos de coagulación. Al mismo tiempo, dado que el sensor de temperatura del elemento de ensayo no es necesario que proporcione valores absolutos de temperatura, dicho sensor podrá incorporarse de forma barata a los elementos de ensayo desechables. El sensor de temperatura del instrumento 15 no es necesario que esté alojado dentro del instrumento. Puede ser incluso ventajoso alojar el sensor 15 en el exterior del instrumento, en una posición en la que pueda medir la temperatura ambiental.

En la figura 4 se representan los resultados experimentales, que se generan del modo siguiente:

- Se extraen muestras líquidas de 27 pacientes diferentes y cuatro personas estándar ("normales"), cada una de ellas se divide en múltiples partes alícuotas.

- De cada muestra se realizan cuatro mediciones de los valores del PT^T a cuatro temperaturas no estándar, situadas entre 16 y 32°C (empleando cuatro partes alícuotas). Estas mediciones se realizan con un instrumento CoaguCheck® S, fabricado por la empresa solicitante, que se modifica para desactivar su sistema de termostato. Se genera la variación de temperatura colocando el instrumento en una cámara de temperatura constante.

- Con el fin de mejorar la precisión y aumentar la base de datos, cada una de estas mediciones se realizan con cuatro instrumentos diferentes.

- De modo simultáneo para cada muestra se determina el PT^{37} empleando el sistema convencional CoaguCheck® S con termostato.

Con los resultados obtenidos se calculan las relaciones $Y = PT^{37}/PT^T$. Estas relaciones de PT se representan en la figura 2 con respecto a la relación de temperaturas X calculada dividiendo la correspondiente temperatura de medición T (en °C) por 37.

En la figura 4 se observa que todos los datos están muy próximos a la curva $Y = f(X)$ determinada por análisis de regresión de los mismos. En este caso, la curva es un polinomio de segundo orden representado en la figura 4. Esto demuestra el hecho sorprendente de que la dependencia de la temperatura puede describirse mediante una sola relación funcional, independiente de la fuente de muestras que se emplee.

Con respecto a la temperatura, es conveniente durante los ensayos prácticos utilizar relaciones de temperatura (tal como se ha indicado en lugar de las temperaturas absolutas). Evidentemente, $Y = f(X)$ puede transformarse fácilmente en $Y = PT^{37}/PT^T = f(T)$. Además, la ecuación para calcular PT^{37} se encuentra fácilmente resolviendo esta ecuación para PT^{37} :

$$PT^{37} = f(T) * PT^T$$

En la figura 5 se representa gráficamente una comparación de los valores de la INR determinada con arreglo a la invención (indicada con INR_{INV}) con los datos correspondientes determinados por un método de referencia (INR_{CKS}). Se calculan los valores INR formando una relación entre PT y una PT normal mediana (MNPT), del modo que ya es bien conocido en la técnica. En la figura se observa que los resultados generados por ambos métodos guardan una coincidencia excelente con una desviación relativa media (MRD) del 3,74%. Hay que notar que los valores de la INR_{INV} se determinan con mediciones a temperatura ambiente entre 16 y 32°C, mientras que los valores de referencia INR_{CKS} se determina a la temperatura estándar de 37°C.

En las figuras de 6 a 10 se recogen los resultados de los ensayos realizados con un menor número de muestras, pero con una pluralidad de métodos diferentes. En cada caso se representa gráficamente la relación de un parámetro de coagulación a temperatura estándar y el mismo parámetro a la correspondiente temperatura no estándar (denominado Y para las relaciones PT, Z para las relaciones INR y V para las relaciones APTT) frente a la relación de temperatura X. Las figuras siguientes se basan en ensayos realizados empleando los siguientes sistemas experimentales de coagulación:

Figura 6

Tiras CoaguCheck® S Low ISI PT. En estos ensayos se emplea la tromboplastina Low ISI seca, derivada de factor de tejido recombinante humano, que requiere sangre venosa o capilar fresca no anticoagulada. Las muestras se toman de pacientes sometidos a tratamiento anticoagulante por vía oral.

Figura 7

Tiras CoaguCheck® S Low Volume PT. En estos ensayos se emplea la tromboplastina High ISI, derivada de cerebros de conejo, que requiere sangre venosa o capilar fresca no anticoagulada.

ES 2 294 460 T3

Figura 8

Analizador del tipo Amelung 4 Channel Lab con reactivo Low ISI Lab. Este reactivo contiene orto-recombiplasti-
na-PT derivada de factor de tejido recombinante humano, que requiere plasma citratado.

Figura 9

Analizador del tipo Amelung 4 Channel Lab con reactivo High ISI Lab. Este reactivo incluye Dade C Plus PT
derivado de cerebros de conejo, que requiere plasma citratado.

Figura 10

Analizador del tipo Amelung 4 Channel Lab con reactivo Ortho Auto APTT Lab, que requiere plasma citratado.

En todos los casos, los datos resultantes pueden describirse para todas las muestras mediante una sola relación
funcional, como se muestra en las figuras. La invención es aplicable, pues, a diferentes tipos de ensayos de coagulación,
incluido el ensayo de “química seca” y el ensayo de “química húmeda”.

REIVINDICACIONES

1. Sistema para la determinación de un parámetro de coagulación de muestras de sangre o de plasma de pacientes, dicho sistema consta de:

un elemento desechable de ensayo (2), que incluye un sistema de reactivo (38) que se tiene que mezclar con la muestra, con lo cual se forma un líquido de detección de la coagulación, y una zona de detección de la coagulación (5), en la que se aloja el líquido de detección de la coagulación, para el seguimiento de una propiedad medible del líquido de detección de la coagulación, dicha propiedad medible cambia durante la coagulación y

un instrumento (1) provisto de un soporte (8) para sujetar dicha elemento desechable de ensayo (2) insertado en el mismo y provisto de un sistema electrónico de medición y evaluación (13), adaptado para detectar una señal que corresponde a la propiedad medible del líquido de detección de la coagulación y que incluye un sistema electrónico de medición del tiempo, para medir un tiempo de coagulación requerido para efectuarse dicho cambio y poder derivar el parámetro deseado de coagulación del mismo,

caracterizado porque

el sistema está adaptado para determinar el tiempo de coagulación a una temperatura no estándar del líquido de detección de la coagulación, diferente de la temperatura estándar, para el correspondiente parámetro de coagulación y consta de un dispositivo de medición de la temperatura (7) para medir dicha temperatura no estándar,

el instrumento (1) tiene una memoria no volátil (18), que contiene datos que definen una relación matemática del tiempo de coagulación frente a la temperatura, dicha relación es independiente del paciente individual, cuya sangre se está examinando, y

el sistema está adaptado para calcular el parámetro de coagulación a temperatura estándar partiendo del tiempo de coagulación medido a dicha temperatura no estándar aplicando dicha relación matemática.

2. Sistema según la reivindicación 1, en el que el instrumento no contiene ningún dispositivo para el termostato del elemento de ensayo que aloje en su interior el líquido de detección de la coagulación, en el que la temperatura del elemento de ensayo y la del líquido de detección de la coagulación dependen de la temperatura del ambiente, en el que se realiza la medición.

3. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el instrumento es accionado por una batería (o pila).

4. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

el elemento desechable de ensayo contiene un sensor de temperatura del elemento (14) integrado en el mismo,

el instrumento incluye un sensor de temperatura del instrumento (15),

el sistema electrónico de medición y evaluación (13) está adaptado para derivar

- a partir de la señal del sensor de temperatura del instrumento (15): un valor de temperatura referido a la temperatura estándar y

- a partir de la señal del sensor de temperatura del elemento (14): una información acerca de la velocidad de cambio de la temperatura del elemento frente al tiempo y

el sistema electrónico de medición y evaluación (13) utiliza el valor de temperatura derivado del sensor de temperatura del instrumento para calcular el parámetro de coagulación para dicha temperatura estándar a partir del tiempo de coagulación medido en dicha temperatura no estándar solamente cuando la velocidad de cambio de la temperatura del elemento frente al tiempo es menor que un valor límite de la misma.

5. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la zona de detección de la coagulación (6) se halla fuera de la carcasa del instrumento cuando el elemento de ensayo (2) está insertado en el soporte.

6. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el instrumento (1) contiene un elemento intercambiable de almacenaje de datos, que puede leerse en la máquina, en especial una tarjeta ROM (16), dicho elemento intercambiable de almacenaje de datos tiene una memoria (18) que contiene los datos que definen la relación matemática del tiempo de coagulación frente a la temperatura.

7. Sistema según la reivindicación 6, en el que elemento de ensayo contiene un código legible por la máquina (10), que contiene datos de identificación específicos del lote de fabricación del elemento de ensayo (2) y el instrumento tiene un lector (11) para leer dicho código de identificación legible por la máquina (10) para comprobar mediante el

sistema electrónico de medición y evaluación (13) que la tarjeta ROM (16) que se ha insertado en el instrumento corresponde al lote de fabricación del elemento de ensayo (2).

8. El sistema según la reivindicación 1, en el que la propiedad medible es la actividad de una enzima, que participa en el mecanismo de coagulación del líquido de detección de la coagulación.

9. Sistema según la reivindicación 8, dicho sistema contiene medios electroquímicos para detectar la actividad de la enzima.

10. Sistema según la reivindicación 1, en el que se emplea la misma relación matemática para todas las determinaciones de un parámetro de coagulación determinado realizadas con el instrumento, con independencia del lote del reactivo.

11. Sistema según la reivindicación 1, en el que la relación matemática se determina midiendo el tiempo de coagulación de una pluralidad de muestras diferentes a temperaturas diferentes empleando el mismo tipo de instrumento y de reactivos.

12. Elemento desechable de ensayo, adaptado para un sistema según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11,

dicho elemento de ensayo contiene un sistema de reactivos (38) que se mezcla con una muestra, formando de este modo un líquido de detección de la coagulación, y una zona de detección de la coagulación (5), que contiene al líquido de detección de la coagulación para hacer el seguimiento de una propiedad medible del líquido de detección de la coagulación, dicha propiedad medible cambia durante la coagulación,

caracterizado porque tiene un sensor de medición de la temperatura (14), en particular un termistor, y contactos enchufables que permiten la transferencia de señales de temperatura del sensor de temperatura a un instrumento, en el que están insertados.

13. Método para la determinación de un parámetro de coagulación de una muestra de sangre o de plasma de un paciente, en el que

se mezcla un sistema de reactivos (38) en un elemento desechable de ensayo (2) con una muestra para formar un líquido de detección de la coagulación en una zona de detección de reacción (6) del elemento (2) y se hace el seguimiento de una propiedad medible del líquido de detección de la coagulación, dicha propiedad medible sufre un cambio durante la coagulación,

se detecta una señal que corresponde a la propiedad medible del líquido de detección de la coagulación y se mide el tiempo requerido para que se produzca dicho cambio, para derivar del mismo el parámetro deseado de la coagulación,

caracterizado porque

se determina el tiempo de coagulación a una temperatura no estándar del líquido de detección de la coagulación, diferente de la temperatura estándar, para el correspondiente parámetro de coagulación, se mide también dicha temperatura no estándar,

se toman datos, que definen una relación matemática del tiempo de coagulación frente a la temperatura, de una memoria no volátil (18) del instrumento (1), dicha relación es independiente del paciente individual, cuya sangre se está examinando, y

se calcula el parámetro de coagulación para la temperatura estándar a partir del tiempo de coagulación medido en dicha temperatura no estándar, aplicando una relación matemática del tiempo de coagulación frente a la temperatura, dicha relación es independiente del paciente individual, cuya sangre se está analizando.

14. Un método según la reivindicación 13, en el que la propiedad medible es la actividad de una enzima que participa en el mecanismo de coagulación del líquido de detección de la coagulación.

15. Un método según la reivindicación 14, en el que se detecta la actividad de la enzima por medios electroquímicos.

16. Un método según la reivindicación 13, en el que se aplica la misma relación matemática para todas las determinaciones de un parámetro de coagulación determinado, realizadas con un instrumento, con independencia del lote del reactivo.

17. Un método según la reivindicación 13, en el que se determina la relación matemática midiendo el tiempo de coagulación para una pluralidad de muestras diferentes a temperaturas diferentes empleando el mismo tipo de instrumento y de reactivos.

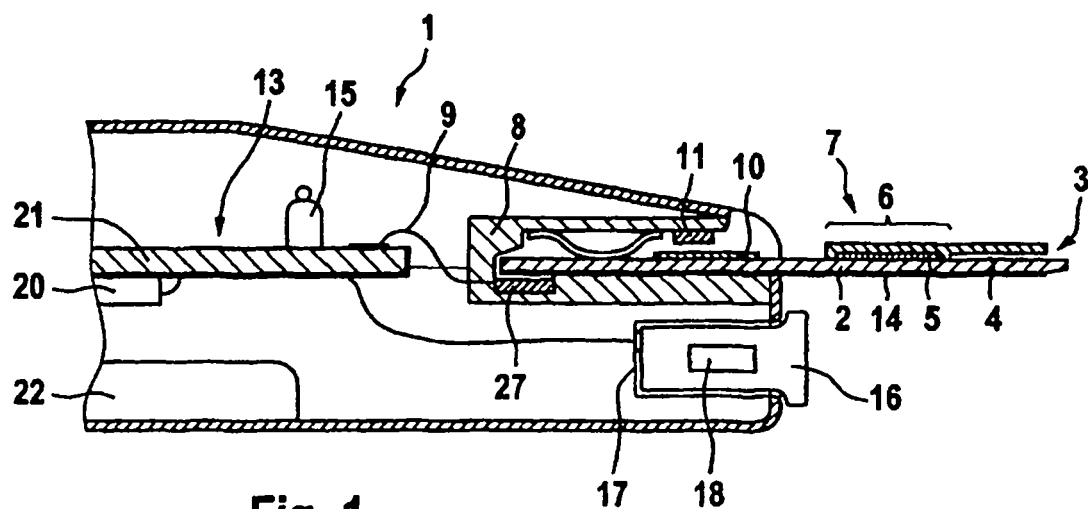


Fig. 1

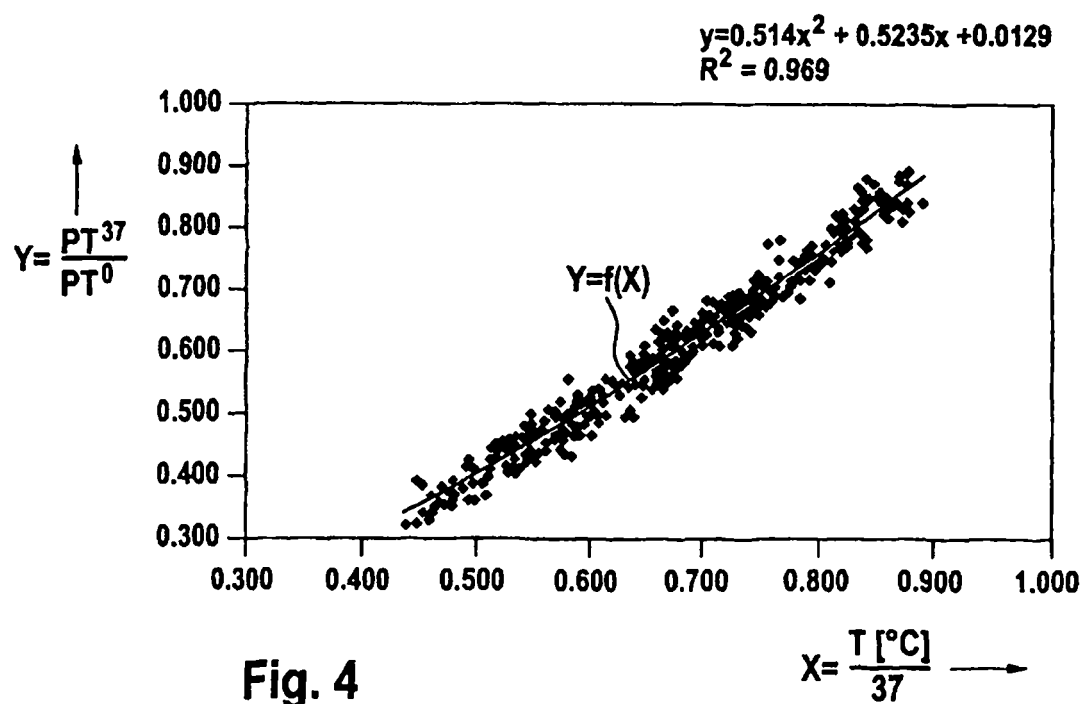
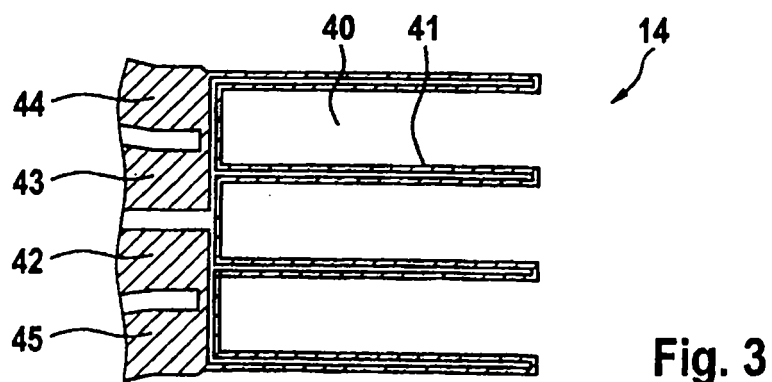
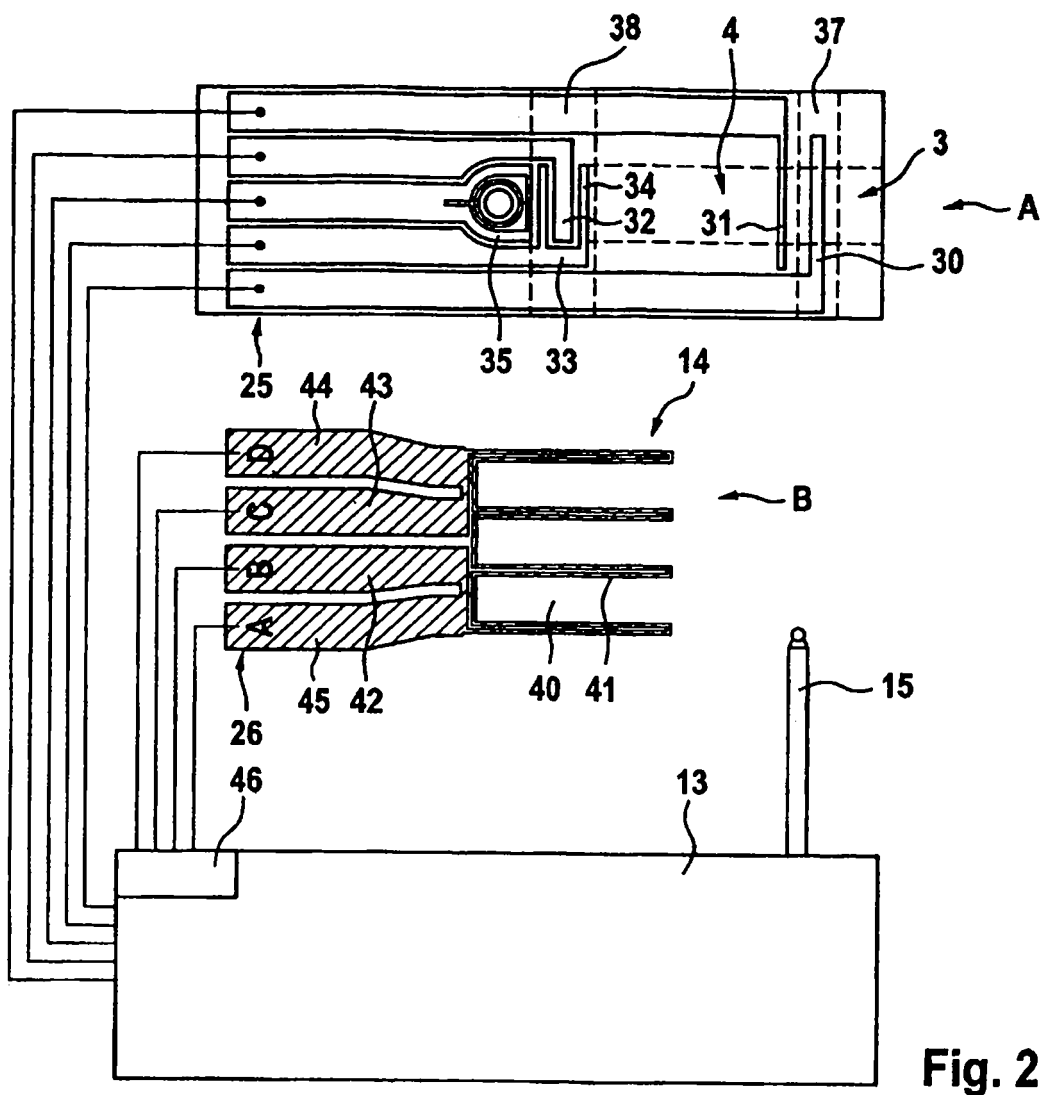
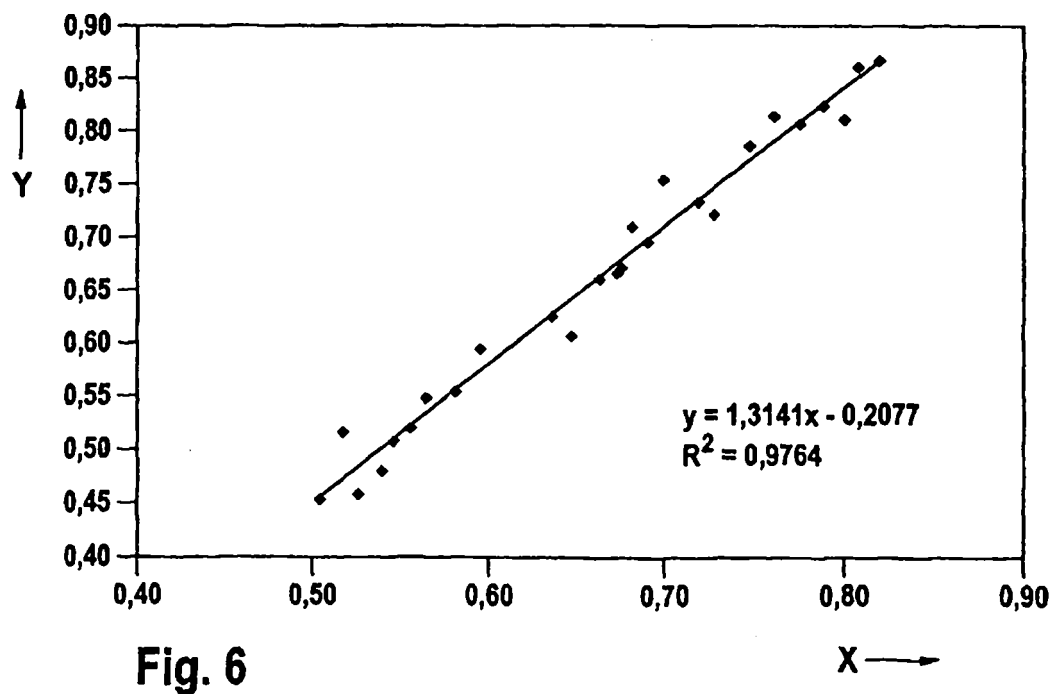
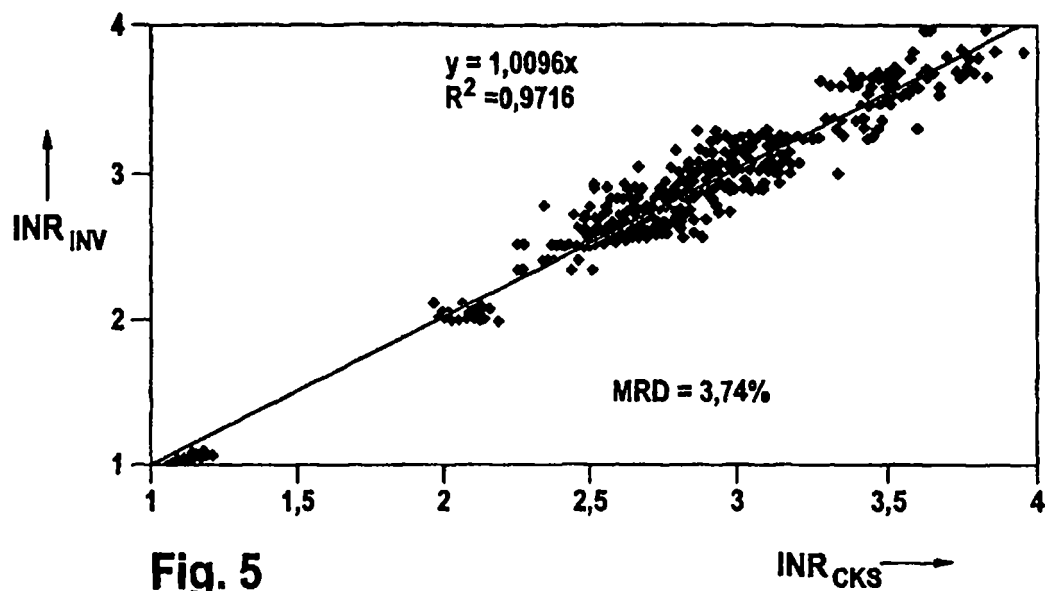


Fig. 4





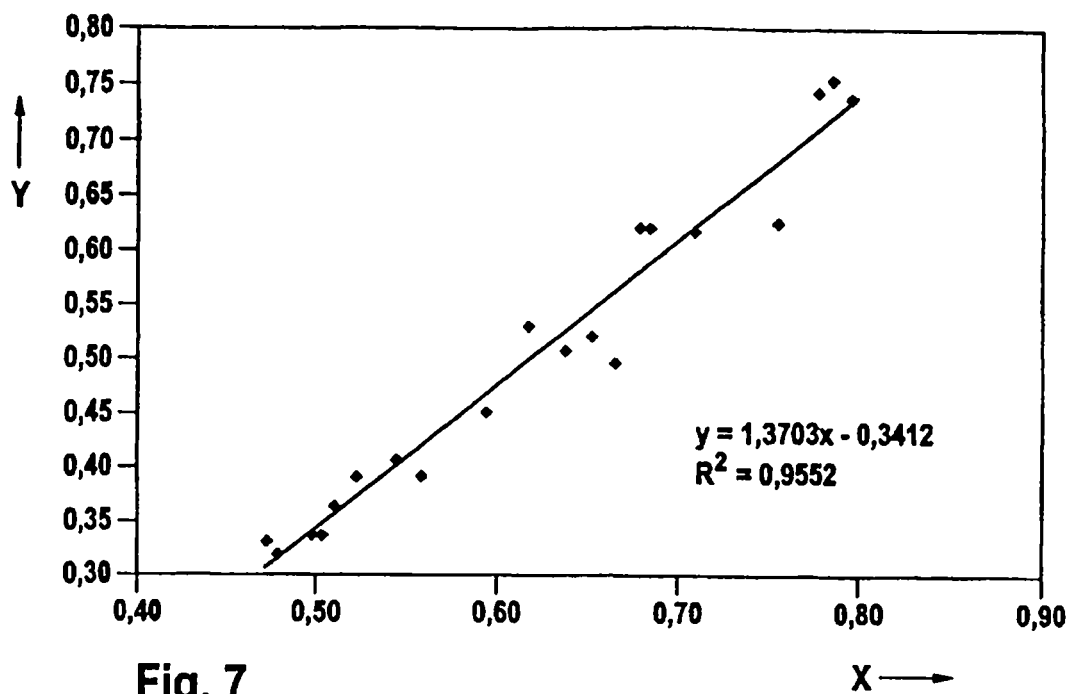


Fig. 7

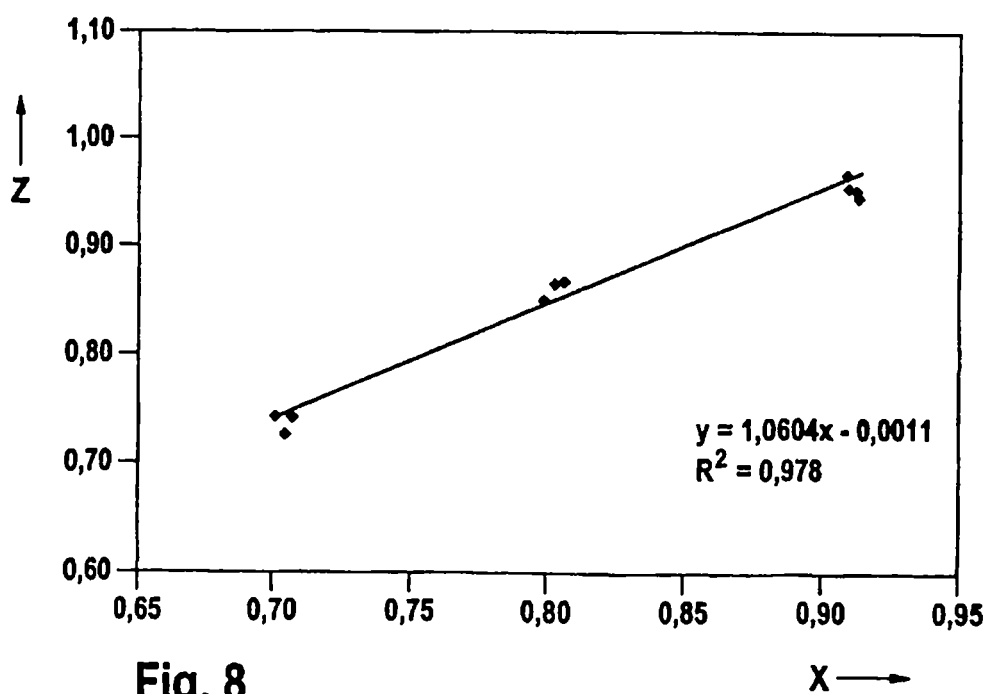


Fig. 8

