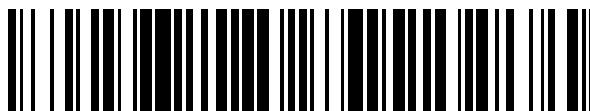


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 356 390**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/03** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2001 E 07123140 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **30.04.2014 EP 1903327**

54 Título: **Cubeta**

30 Prioridad:

**28.06.2000 SE 0002443**

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

**20.05.2014**

73 Titular/es:

**MIGRATA U.K. LIMITED (100.0%)  
P.O. BOX 4425  
LIMASSOL, CY**

72 Inventor/es:

**LILJA, JAN;  
SVENSSON, JOHNNY;  
NILSSON, SVEN-ERIK y  
ERIKSSON, ANNIKA**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia**

## DESCRIPCIÓN

Cubeta

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una cubeta desechable para su uso en un método para la determinación de hemoglobina en sangre entera sin diluir.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Una cubeta desechable para tomar muestras de un fluido, mezclar la muestra con un reactivo y efectuar directamente un análisis óptico de la muestra mezclada con el reactivo es conocida anteriormente a partir de la patente U.S. Nº 4.088.448. Esta cubeta conocida tiene varias ventajas ya que entre otras cosas simplifica el procedimiento de muestreo, reduce el número de utensilios y mejora considerablemente la precisión del análisis haciendo el procedimiento del análisis independiente de la técnica de operación del operario que realiza el análisis. Una estructura de cubeta basada en el mismo principio y con unas características de flujo mejoradas se describe en la patente US 5.674.457.

20 Una cubeta desechable desarrollada de acuerdo con estas patentes se utiliza ampliamente en la actualidad para la medición de la hemoglobina (determinación de Hb) de sangre entera sin diluir. Con este fin la cavidad de cubeta ha sido tratada previamente con un reactivo, de manera que cuando una muestra de sangre es aspirada a la cubeta, las paredes de los glóbulos rojos se desintegran y se inicia una reacción química. El resultado de la reacción permite la determinación de Hb mediante la medición de la absorción directamente a través de las paredes transparentes de la cubeta que, en la zona de medición, también denominada ventana óptica, tiene una distancia predeterminada y definida con precisión entre las superficies interiores de las paredes planas opuestas. El método de medición se basa en un método de la azidametahemoglobina modificado de acuerdo con Vanzetti, G., Am. J. Lab. & Clin. Med. 67, 116 (1966).

30 Las mediciones espectrofotométricas se llevan a cabo a 570 y 880 nm. Este método de medición cuantitativa basado en la química seca ha tenido un éxito considerable como puede verse, p. ej., en el artículo de von Schenck *et al.* en Clinical Chemistry, vol. 32, nº 3, 1986 ya que el método da resultados iguales o incluso superiores en comparación con los resultados obtenidos con los métodos húmedos estandarizados para la determinación de Hb. El reactivo utilizado se compone de desoxicolato de sodio que hemoliza los glóbulos rojos, azida sódica y nitrito de sodio, que convierte la hemoglobina en azidametahemoglobina.

35 Debido a las propiedades higroscópicas de los reactivos utilizados, la durabilidad es limitada y se requiere el almacenamiento de las cubetas en paquetes sellados que incluyan a un agente secante. Aún más problemático es el hecho de que, en climas con alta humedad, la cubeta debe utilizarse a los pocos minutos de la extracción del paquete, ya que de lo contrario los reactivos serán destruidos y la medición será poco precisa y por lo tanto inútil.

40 La patente US Nº 5.300.779 describe la determinación de hemoglobina en base a la absorbancia de un hemolisado que resulta de tratar una muestra de sangre con desoxicolato de sodio. La muestra de sangre se hemoliza y se filtra antes de ser introducida en un dispositivo de cubeta donde se llevan a cabo las mediciones.

45 La patente US Nº 5.686.316 describe un método para la determinación de la cantidad de hemoglobina glicosilada presente en los eritrocitos de una muestra de sangre entera. La cantidad de hemoglobina glicosilada es la determinación de acuerdo con un método de unión por afinidad e implica hemolizar la muestra de sangre. La muestra hemolizada se trata posteriormente con un agente de afinidad o ligante específico para la hemoglobina glicosilada para separar las diferentes variantes de hemoglobina. La muestra se diluye y se llevan a cabo las mediciones de absorción en una cubeta a la que se traslada la muestra después de la reacción con el agente de afinidad y la dilución. Se llevan a cabo las mediciones de absorción en el intervalo de 340 a 633 nm y a las longitudes de onda específicas de 553 y 628 nm. El método determina la cantidad relativa de hemoglobina glicosilada en la muestra de sangre y no el contenido de hemoglobina cuantitativo.

55 La publicación internacional WO 99/18433 (PCT/US98/20551) describe una cámara de lisis que comprende un componente de lisis en una superficie de la cámara de lisis. El material de lisis en la superficie puede ser saponina o un detergente. El material de lisis también puede unirse a una malla dentro de la cámara de lisis.

**Objetos de la invención**

60 Un objeto de la presente invención es proporcionar una microcubeta desechable para la determinación de hemoglobina en sangre entera sin diluir en la que se eliminan los problemas que se originan a partir de las propiedades higroscópicas de los reactivos.

65 Otros objetos se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones adjuntas.

**Resumen de la invención**

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una microcubeta desechable con por lo menos una cavidad para la determinación espectrofotométrica de hemoglobina en sangre entera sin diluir, caracterizada porque la cavidad incluye un agente hemolizante no higroscópico seco, recubierto en la superficie de la cavidad, siendo dicho agente hemolizante seleccionado de entre el grupo que consiste en desoxicolato de sodio, desoxicolato de potasio, desoxicolato de calcio, desoxicolato de morfolina, desoxicolato de ciclohexilamonio, y desoxicolato de amonio o mezclas de los mismos, en la que la cavidad está libre de azida y de nitrato y de cualquier otro aditivo.

La cubeta es útil en un método para proporcionar una determinación de hemoglobina de este tipo comprende las etapas de introducir una muestra de sangre entera sin diluir por capilaridad en una microcubeta desechable con por lo menos una cavidad para recibir la muestra. La cavidad incluye un agente hemolizante básicamente no higroscópico seco, tal como se define en la reivindicación 1, que es disuelto por la sangre, hemoliza los glóbulos rojos y libera la hemoglobina contenida en las células sanguíneas. A continuación se lleva a cabo una primera medición de la absorción en un intervalo de longitudes de onda de 490-520 nm directamente en la muestra en la microcubeta, y se lleva a cabo una segunda medición de la absorción para compensar la interferencia de fondo.

De esta manera se ha descubierto inesperadamente que las determinaciones cuantitativas de hemoglobina pueden llevarse a cabo sin los reactivos químicos azida de sodio y nitrato de sodio anteriormente mencionados. Más concretamente, se ha descubierto que las determinaciones cuantitativas pueden llevarse a cabo directamente en la sangre hemolizada siempre que se seleccione un agente hemolizante apropiado o una mezcla de los mismos.

De acuerdo con la presente invención se ha descubierto por tanto que pueden eliminarse los reactivos higroscópicos. Además, se ha descubierto que puede reducirse el tiempo para obtener la determinación analítica. Como los análisis se llevan a cabo en grandes cantidades, p. ej. en hospitales y bancos de sangre, la característica de la duración es importante.

**Descripción detallada de la invención**

La microcubeta desechable de acuerdo con la presente invención puede ser del tipo descrito en la patente US 4 088 448 o preferentemente en la patente US 5 674 457. Puede definirse como un elemento de cuerpo unitario que incluye por lo menos una cavidad con una ventana óptica (zona de medición) en la que dos superficies, planas o curvadas, de cara a la cavidad se colocan a una distancia predeterminada entre sí y por tanto definen una longitud de camino óptico predeterminada. Esta distancia entre las superficies que definen la zona de medición es un parámetro crítico en proporcionar la longitud de camino óptico adecuada para la medición de hemoglobina y en una forma de realización preferente esta distancia es de entre 0,05 y 0,2 mm. La distancia entre las superficies interiores del resto de la cavidad es preferentemente del orden de 0,1-2 mm que es eficaz para permitir que la muestra entre a la cavidad por capilaridad a través de la entrada de la cavidad, que está en comunicación con el exterior del elemento de cuerpo. Además, la cavidad tiene un volumen fijo predeterminado inferior a aproximadamente 25  $\mu$ l. Un agente hemolizante seco como se define en la reivindicación 1 está recubierto en la superficie de la cavidad. El agente hemolizante está preferentemente presente por encima de la cantidad requerida para la reacción de hemólisis. No son necesarios otros aditivos para la determinación cuando se utiliza la microcubeta de la invención.

La microcubeta de acuerdo con la presente invención puede estar formada por cualquier material adecuado, lo que permite la formación de los niveles de tolerancia restringida necesarios. Preferentemente la cubeta se fabrica mediante moldeo por inyección de un material polimérico transparente.

Una característica crítica de la presente invención es el agente hemolizante. Concretamente, este agente debe ser básicamente no higroscópico y fácilmente soluble en agua o más exactamente en sangre entera sin diluir. Además, dado que es importante que el método en el que se utiliza la cubeta de la presente invención, de resultados reproducibles, este agente debería tener preferentemente una estructura química bien definida. Como el agente hemolizante se introduce preferentemente en la cavidad de cubeta como una solución, que posteriormente se seca cuidadosamente preferentemente mediante el uso de calor, también es adecuado que el agente hemolizante sea fácilmente soluble en disolventes orgánicos que no destruyan el agente hemolizante y que puedan evaporarse fácilmente a bajas temperaturas. Por lo tanto es preferente que el agente hemolizante sea fácilmente soluble en alcoholes, como el metanol.

Otro aspecto importante cuando se selecciona el agente hemolizante según se define en la reivindicación 1 es que este agente en forma seca, que está presente en la microcubeta lista para utilizar, permita una introducción rápida y uniforme de sangre entera en la cubeta. Concretamente, el período de tiempo para la introducción de la sangre entera en la microcubeta debería ser menor que el período de tiempo requerido por esta sangre para disolver el agente hemolizante en la microcubeta.

Los agentes hemolizantes que se utilizarán de acuerdo con la invención son desoxicolato de sodio, desoxicolato de potasio, desoxicolato de calcio, desoxicolato de morfolina, desoxicolato de ciclohexilamonio y desoxicolato de amonio o mezclas de los mismos. El agente hemolizante más preferente en la actualidad que cumple el requisito de proporcionar

una determinación rápida y cuantitativa de hemoglobina es una combinación de desoxicolato de sodio y desoxicolato de amonio. La cantidad de desoxicolato de amonio es preferentemente el 20-80% en peso de esta combinación.

5 Durante los experimentos que resultan en la presente invención se descubrió que el grupo de agentes para hemolizar sangre tal vez más utilizado, es decir, las saponinas que son productos naturales ampliamente distribuidos en las plantas y que son mezclas de diferentes estructuras químicas, no dan resultados reproducibles. Las saponinas son potentes agentes hemolizantes incluso a concentraciones muy bajas.

10 Una característica crítica de la determinación de Hb en la microcubeta de la presente invención es también que la medición de la absorción deberá llevarse a cabo en otra longitud de onda. De esta manera se ha descubierto que la determinación de la absorción debería llevarse a cabo en un intervalo de 490-520, preferentemente 500-510 nm. La medición de la adsorción compensatoria secundaria se lleva a cabo preferentemente en el intervalo de 850-910, preferentemente de 860-90 nm.

15 Las mediciones para la determinación de sangre a estas longitudes de onda se describen en la patente US 5.064.282. De acuerdo con esta patente la medición se realiza en una cubeta reutilizable, que contiene sangre que ha sido previamente hemolizada con saponina. Concretamente este método implica colocar una gota de sangre en un portaobjetos, agitar la sangre con un palillo con saponina en el mismo hasta que esté transparente e introducir la sangre hemolizada en la cubeta.

20 Respecto a la alteración potencial de la determinación debida a la presencia de metahemoglobina de acuerdo con la presente invención se entiende que una alteración de este tipo se produzca en pacientes con una anomalía congénita de la enzima muy rara, en algunas variantes raras de la hemoglobina normal y después de la exposición a determinados fármacos y productos químicos, como la fenacetina, nitratos, quinonas, clorato. Tal vez esté presente en sangre hasta un 10-20% de metahemoglobina en estos casos, pero cuando se produzcan resultará suficientemente obvio clínicamente para indicar la necesidad de utilizar el método de la azida, es decir, el método actualmente utilizado en microcubetas, o el método del hemoglobincianuro (un método ICSH de referencia) en su lugar. En este contexto debe añadirse que este problema, si lo hubiere, también está presente con el método de la oxihemoglobina tan tradicional y universalmente aceptado. Además las altas concentraciones de carboxihemoglobina en grandes fumadores y de sulfahemoglobina pueden causar alteraciones.

35 Pueden obtenerse fotómetros adecuados para llevar a cabo estas mediciones modificando los fotómetros existentes con diodos emisores de luz y filtros adecuados. De acuerdo con una forma de realización preferente un fotómetro mide la absorbancia en las dos longitudes de onda y un micro procesador incorporado calcula, de acuerdo con un algoritmo programado, la concentración total de hemoglobina en sangre.

El siguiente ejemplo no limitativo ilustra un método para utilizar una forma de realización preferente de la microcubeta de la invención definida en la reivindicación 1.

40 Un agente hemolizante que consiste en partes iguales de desoxicolato de sodio y de amonio se disolvió en metanol y se introdujo en una microcubeta desechable con la estructura anteriormente indicada. A continuación se evaporó el metanol.

45 En una comparación entre el método llevado a cabo en una forma de realización preferente de las microcubetas de la invención que contienen sólo la mezcla de desoxicolato de amonio y de sodio y el método para determinar la hemoglobina en las microcubetas HemoCue® conocidas actualmente utilizadas que contienen el reactivo de azida de sodio/nitrito de sodio así como el desoxicolato de sodio, se descubrió que el período de tiempo para hemolizar la sangre era aproximadamente 15 segundos menor con el agente hemolizante preferente de acuerdo con la presente invención. Concretamente el período para hemolizar la muestra mediante el agente hemolizante seco presente en la microcubeta debería ser inferior a 40 segundos. Esto permite una reducción adicional de hasta un 25% del tiempo total de la determinación de hemoglobina que puede ser ventajoso en hospitales concurridos y en otras situaciones donde se realizan muchas determinaciones.

55 En una comparación correspondiente concerniente a la estabilidad con respecto a la humedad se descubrió que la estabilidad de las microcubetas que incluían la mezcla de desoxicolato mencionada anteriormente era de 24 horas con aire a 45°C y una humedad relativa del 80% lo que debe compararse con aproximadamente 2 minutos para las microcubetas HemoCue® disponibles en el mercado bajo las mismas condiciones.

60 Una evaluación del nuevo método con esta mezcla de hemólisis (y sin ningún otro producto químico) en comparación con el método ICSH estándar se describe en la figura 1. La evaluación se realizó en condiciones de laboratorio. Como puede verse la concordancia entre los métodos es muy buena.

65 Se hicieron las mediciones de absorción espectrofotométrica a aproximadamente 570 nm para el método conocido y a aproximadamente 505 nm para el nuevo método. Para ambos métodos se hicieron mediciones compensatorias a 880 nm.

Lo anteriormente indicado ha sido una descripción de una forma de realización preferente determinada de la presente invención, pero no pretende limitar la invención en modo alguno. Más bien, pueden realizarse muchas modificaciones, variaciones, y cambios en los detalles dentro del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Microcubeta desechable con por lo menos una cavidad para la determinación espectrofotométrica de hemoglobina en sangre entera sin diluir, **caracterizada porque** la cavidad incluye un agente hemolizante no higroscópico seco, recubierto en la superficie de la cavidad, siendo agente hemolizante seleccionado de entre el grupo que consiste en desoxicolato de sodio, desoxicolato de potasio, desoxicolato de calcio, desoxicolato de morfolina, desoxicolato de ciclohexilamonio, y desoxicolato de amonio o mezclas de los mismos, en la que la cavidad está libre de azida y nitrito y cualquier otro aditivo.
- 10 2. La microcubeta según la reivindicación 1 en la que el agente hemolizante comprende una mezcla de desoxicolato de sodio y desoxicolato de amonio.
3. La microcubeta según la reivindicación 2, en la que la cantidad de desoxicolato de amonio es de entre el 20 y el 80 por ciento en peso.

FIGURA 1

