

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 437**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06707077 .1**
- 96 Fecha de presentación: **17.02.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1853925**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Procedimiento para determinar la actividad de coagulación total de una muestra de sangre o plasma**

30 Prioridad:
22.02.2005 DE 102005008066

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.03.2012

73 Titular/es:
**JENAFFIN GMBH
WINZERLAER STRASSE 2
07745 JENA, DE**

72 Inventor/es:
**NOWAK, Götz;
BUCHA, Elke y
LANGE, Ute**

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 377 437 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

Procedimiento para determinar la actividad de coagulación total de una muestra de sangre o plasma

5 La invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la actividad de coagulación total de una muestra de sangre o plasma. La invención se refiere, además, a un kit para llevar a cabo este procedimiento, así como al kit para uso en un procedimiento para obtener información sobre el estado de coagulación de un paciente.

10 La coagulación sanguínea en un organismo humano o animal es un proceso complejo, que discurre en fases, el cual es desencadenado por procesos patológicos y fisiológicos y sirve in vivo para la hemostasis. En este caso, tiene lugar la transformación del fibrinógeno soluble, presente en el plasma, en la sustancia de coagulación fibrosa-gelatinosa, la fibrina, en un proceso de varias etapas (cascada de coagulación) en el que participan al menos 15 factores de coagulación sanguínea diferentes, de los que cada uno, cuando es activado, activa en cada caso al siguiente precursor inactivo.

15 La serina proteasa trombina es la enzima más importante durante la activación del sistema de coagulación plasmático en el que, mediante complejos de activación generados en varias etapas parciales, de precursores de serina proteasas, que son fijados a través de estructuras de unión especiales (grupos γ -carboxi) a fosfolípidos cargados negativamente mediante inducción de iones calcio y co-factores (FVa, FVIIIa), son activadas serina proteasas casi en forma de fase sólida (FXI, FIX, FX). El producto final de la compleja activación de la coagulación, la enzima trombina, abandona como única proteasa su complejo de activación y, por consiguiente, está disponible en forma libre en la circulación sanguínea. Allí, se encuentra con muy distintos sustratos de trombina, los cuales afectan tanto a la proteína de coagulación fibrinógeno como también a células. Con ello, la trombina tiene una función puente entre la coagulación plasmática y los elementos celulares, ante todo las plaquetas sanguíneas, para las que la trombina representa el factor desencadenante de la agregación más potente. Sobre la superficie de fosfolípidos de plaquetas agregadas se encuentran asimismo grandes cantidades de complejos de activación que luego pueden generar trombina. En la cantidad máxima posible de trombina en sangre y en el plasma se puede leer el estado actual de coagulación ("global coagulation state" – estado de coagulación global) de un paciente. Este denominado potencial de generación de trombina permite obtener indicios sobre una hipercoagulabilidad de la sangre (trombofilia), pero también puede permitir reconocer una sub-función de la formación de trombina (hemofilia, tendencia a la hemorragia).

20 En el estado conocido de la técnica se conocen métodos para la medición de la generación de trombina en plasma. Por lo general, esto se realizó con ayuda de ensayos de coagulación globales tales como, por ejemplo, aPTT, tiempo de protrombina, valor de Quick, tiempo de reptilasa, tiempo de batroxobina, etc. Con ensayos de este tipo se determina, sin embargo, sólo un fragmento de la activación de la coagulación. Básicamente, en este caso se añade in vitro, ante todo en acervados de plasma de pacientes, una determinada cantidad de un inductor de la coagulación. Con ello, se activa una cantidad determinada de la actividad de α -trombina, la cual es suficiente para determinar en el tiempo, a través de un sistema de reconocimiento, por norma general el fibrinógeno presente en la muestra, la aparición de la coagulación. En este caso, se activan en principio sólo 5-8 unidades NIH de trombina por cada ml de tanda de coagulación.

25 Un método para la medición de la generación de trombina en plasma es el procedimiento según Hemker et al. (documento EP 0 420 332). Con este método de Hemker, empleado en varias modificaciones en la práctica, se vigila con una medición continua la generación de trombina por medio de un sustrato cromógeno, después de la inducción de la coagulación (documentos WO 0052199, WO 03093831, WO 09621740). Con ello, a cortos intervalos de tiempo se añade como integral de superficie la disociación cromógena del sustrato. La velocidad de la disociación cromógena del sustrato así como la disociación cromógena del sustrato a lo largo del tiempo son tomadas como medida de la generación de trombina. Con este método pueden hacerse mensurables influencias de fármacos inhibidores de la coagulación así como trastornos de la coagulación mediante la generación simultánea de trombina. Sin embargo, el inconveniente de este procedimiento estriba en que, en virtud del principio de medición por medio de sustratos cromógenos o fluorógenos y de procedimientos fotométricos sólo se puede trabajar en materiales translúcidos (plasma o bien plasma rico en plaquetas). Al mismo tiempo, otro inconveniente estriba en que para la medición, los plasmas deben ser diluidos intensamente, lo cual falsifica las anotaciones de los inhibidores presentes de forma natural. Además, en el caso de estrategias de ensayo de este tipo se produce un enriquecimiento de trombina no fisiológico mediante la inducción permanente de la coagulación, de modo que

entonces tiene lugar una autolimitación no fisiológica de la acción por parte de inhibidores presentes en la sangre que reaccionan lentamente (p. ej.: α_2 -macroglobulina). En el caso de situaciones in vivo, estas grandes cantidades de trombina libre no están disponibles, dado que en sangre no diluida está presente un gran número de sustratos de trombina (fibrinógeno, factores V, VIII y XI, protrombina), pero también antitrombinas (antitrombina II, co-factor de heparina II, entre otros), los cuales, en función de la cantidad disponible, bloquean a la trombina de manera eficaz. Además, en el caso de este procedimiento del estado conocido de la técnica, únicamente se mide la activación dinámica de trombina, pero no se produce ninguna medición del punto final de la actividad de coagulación. Por consiguiente, existe la necesidad de un procedimiento fiable para la medición de la capacidad de activación máxima de trombina, es decir, de una medición del punto final de la actividad de coagulación.

La revista Arch. exper. Path. u. Pharmakol, tomo 232, págs. 487-498 (1958), "La determinación cuantitativa de la protrombina mediante titulación con hirudina", Franz Markwardt, describe un método para la determinación cuantitativa de la protrombina sobre la base entre hirudina y trombina.

El documento EP 1 367 135 describe un procedimiento para evaluar la formación de trombina en sangre o plasma que afecta a la fase inicial de la generación de trombina. En el caso de este procedimiento, la sangre o muestra de plasma se mezcla con al menos un activador del sistema de coagulación y un sustrato de trombina en una concentración relativamente baja y se determina la liberación del producto de transformación del sustrato de trombina.

El documento US 6.051.390 describe el uso de un inhibidor de trombina que está unido a un soporte de elevado peso molecular, en calidad de marcador molecular para la determinación de la activación de la coagulación en el diagnóstico de la coagulación y la vigilancia de la terapia.

Por consiguiente, la invención se propone proporcionar un procedimiento para medir la capacidad de activación máxima de trombina en sangre o plasma. El procedimiento de acuerdo con la invención debe ser independiente de influencias externas variables tales como, por ejemplo, la temperatura de reacción o el tiempo de reacción, y debe permitir que la activación de trombina hasta el punto final discurra con una seguridad suficiente. Además, el procedimiento debe poderse llevar a cabo también en sangre entera y con muestras de sangre casi no diluidas. Además, el procedimiento debe ser aplicable de manera sencilla y debe permitir obtener una información fiable sobre el estado de coagulación de una muestra de sangre.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que este problema se resuelve disponiendo una sustancia inhibidora de trombina muy específica y no irreversible, elegida de dipetalogastina I, dipetalogastina II, rodniina e hirudina, en una cantidad determinada en la muestra de sangre, y luego, después de la inducción de la coagulación, determinando la cantidad consumida de la sustancia inhibidora de trombina añadida.

Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la actividad de coagulación total de una muestra de sangre o plasma, con el fin de decidir sobre "enfermo respecto a la coagulación" o "sano respecto a la coagulación", caracterizado porque a una muestra de sangre o plasma se añade, en una cantidad definida, una sustancia inhibidora de trombina muy específica y no irreversible, elegida de dipetalogastina I, dipetalogastina II, rodniina e hirudina, se induce la coagulación en la muestra de sangre o plasma mediante la adición de factores extrínsecos e intrínsecos y, después de un tiempo definido, se determina de manera en sí conocida la cantidad consumida de la sustancia inhibidora de trombina añadida. Además, la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento para determinar la actividad de coagulación total, así como al uso del kit para obtener información sobre el estado de coagulación de una muestra de sangre.

Se encontró que con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede cuantificar como cantidad global en sangre y/o plasma anti-coagulado y no diluido la generación máxima posible de trombina. La sustancia inhibidora de trombina muy específica y no irreversible debe disponerse en una concentración relativamente elevada, con el fin de que pueda competir también con los sustratos y receptores de trombina altamente afines o bien presentes en una concentración relativamente elevada. Por norma general, es suficiente disponer 10 a 30 μg de sustancia inhibidora de trombina muy específica por cada ml de sangre o plasma. La relación exacta de sustancia inhibidora a sangre se puede determinar fácilmente de manera experimental, sin embargo, con ayuda de ensayos rutinarios sencillos.

Es esencial que en el caso de la sustancia inhibidora de trombina muy específica y no irreversible se trate de una sustancia inhibidora cuya afinidad esté dirigida tanto contra el centro activo de trombina como también, adicionalmente, contra la importante estructura de reconocimiento del "exosito de fijación de anión" (ABE 1). Además, el inhibidor de trombina muy específico debe dejar sin afectar a otras serina proteasas de la activación de las fases previas o fases principales (factor VIIa, IXa, Xa, XIa) que participan en el sistema de coagulación. De acuerdo con la invención, como sustancias inhibidoras de trombina se utilizan hirudina, dipetalogastina I y II y rodniina de *Rhodius prolixus* (chipo).

Ventajosamente, el consumo de la sustancia inhibidora dispuesta debería ser medible con gran precisión. Básicamente, las sustancias inhibidoras de trombina directas, precedentemente mencionadas, en particular sustancias inhibidoras con una calidad de unión estrecha pueden determinarse de manera muy precisa con el Tiempo de Coagulación de Ecarina o, derivado del mismo, con el Ensayo Cromogénico de Ecarina (documento WO 0046602) y pueden determinarse linealmente con precisión a lo largo de un amplio intervalo. La sustancia inhibidora de trombina preferiblemente utilizada es hirudina. Preferiblemente, hirudina se utiliza en una cantidad de 15 µg/ml de sangre/plasma.

La muestra de sangre/muestra de plasma a examinar puede utilizarse diluida o no diluida. La muestra de sangre o la muestra de plasma se obtiene de manera en sí conocida. Habitualmente, muestras de sangre se obtienen en disposiciones acabadas adquiribles en el comercio. Para el procedimiento de acuerdo con la invención se utilizan preferiblemente Sarstedt-Monovetten® de 2,7 ml que contienen 0,3 ml de sodio cítrico, obteniéndose la sangre mediante punción en las venas de la V. cubitalis. La sangre citrada se reparte en 2 mitades alícuotas y luego, a continuación, 1 muestra se trata a 3800 rpm durante 10 min en una centrifuga de laboratorio. El plasma exento de plaquetas sobrenadante se retira mediante pipeta y luego se utiliza según la prescripción. Es ventajoso que el examen de la sangre citrada y del plasma citrado tenga lugar en el espacio de 2-3 horas después de la extracción de sangre. Por otra parte, la sangre o el plasma puede almacenarse en el refrigerador hasta durante 24 h.

En el procedimiento de acuerdo con la invención se dispone una cantidad definida de sustancia inhibidora de trombina en una muestra de sangre o de plasma, tras lo cual se induce máximamente en esta muestra la coagulación por medio de activadores intrínsecos y/o extrínsecos y la concentración óptima de iones calcio. Todo el potencial de coagulación generable e inducido a través del tramo de coagulación plasmático extrínseco y/o intrínseco convierte en última instancia a la serina proteasa trombina final a partir del precursor inactivo protrombina. La trombina generada en el complejo de protrombinasa y liberada a partir del mismo es captada inmediatamente por la sustancia inhibidora muy específica y es inactivada. Después de un tiempo de activación definido, se detiene el proceso de activación por medio de EDTA. Luego, la sustancia inhibidora libre no consumida en la muestra puede ser medida por medio de un método de determinación preciso y eficaz. Cuanta mayor cantidad de trombina fuese generada tanto mayor será el consumo de inhibidor en la muestra. Con ello, es posible determinar de forma muy precisa el potencial máximo de activación de trombina de una muestra de sangre o plasma. La sustancia inhibidora dispuesta liga exclusivamente a la trombina permanentemente activada, es decir, sólo al producto final de la coagulación, y no influye de modo alguno en los procesos de coagulación que discurren con antelación. Es sabido que las co-enzimas FVa, FVIIIa, activadas en el suceso de coagulación normal por parte de trombina, son activadas también por el FXa, de modo que se reproduce el fenómeno de coagulación fisiológico o bien patológico real en el procedimiento de acuerdo con la invención.

En el procedimiento de acuerdo con la invención se tienen en cuenta conjuntamente las dos vías de activación, hasta ahora conocidas, de la trombina, la denominada vía extrínseca y la vía intrínseca. Es posible una activación aislada de la vía extrínseca o intrínseca, pero sólo tiene importancia en aquellas células en las que existen indicios de una deficiencia aislada de factor (p. ej. por enfermedades de la coagulación congénitas). Por lo demás, el ensayo es un "ensayo global" para decidir sobre "enfermo respecto a la coagulación" o "sano respecto a la coagulación". De manera correspondiente, tanto en la sangre como también en el plasma están presentes valores de la norma del procedimiento de acuerdo con la invención. Valores que se desvían de éstos en el caso de pacientes individuales proporcionan indicios sobre una enfermedad de la coagulación. Con ello, se encontró, sorprendentemente, que en este caso debe emplearse una relación óptima de mezcla de las dos sustancias activadoras en una receta de activación óptima. Sólo con ello puede medirse la capacidad de generación de trombina máxima posible. Aquí pueden utilizarse sustancias en principio conocidas y adquiribles en el comercio para la inducción de la coagulación. Activadores extrínsecos son habitualmente factores tisulares que se preparan a partir de los componentes de células/órganos más diversos de animales y del hombre. Las denominadas

“tromboplastinas” o “tromboquinasas” se preparan a partir de cerebro de conejo, a partir del pulmón o el hígado y, por norma general, son difíciles de estandarizar. Por lo tanto, se ha manifestado como ventajoso utilizar un producto recombinante en el que las cargas no presenten oscilaciones de actividad mayores. Lo correspondiente se cumple también para los activadores intrínsecos. En este caso, se pueden utilizar fosfolípidos tanto animales como también vegetales que contienen entonces adicionalmente todavía iniciadores tales como ácido eláxico. Productos correspondientes se pueden adquirir en el comercio y son bien conocidos por un experto en la materia. De acuerdo con la invención, se comprobó que una combinación de los productos Innovin y Actin FS (ambos productos de la razón social Dade Behring) tienen en cuenta de manera óptima las dos vías de activación de la trombina. Innovin es un preparado de factor tisular recombinante y tiende a la vía de activación exógena. El Actin FS, requerido para la vía de activación endógena, es un denominado reactivo PTT activado en el que tanto los fosfolípidos como también el ácido eláxico procuran la activación de la coagulación endógena necesaria. La tanda de ensayo debería contener también una determinada cantidad óptima de iones calcio, con el fin de neutralizar de nuevo la sangre anticoagulada primeramente con citrato y que los factores de coagulación, que requieren in vivo al calcio propio de la sangre para su activación, estén presentes bajo condiciones iónicas óptimas. Además, en la tanda de ensayo debería estar presente albúmina (preferiblemente albúmina bovina) que sirve para una mejor homogeneización de las sustancias a modo de lípido, ante todo de la vía de activación endógena. Para el procedimiento de acuerdo con la invención se eligió la denominación trivial THROGA (thrombin generation assay – ensayo de generación de trombina).

La invención se refiere, por consiguiente, también a un kit para la determinación de la actividad de la coagulación total de una muestra de sangre. Este kit comprende la sustancia inhibidora trombina, factores para la activación extrínseca e intrínseca de la trombina así como reactivos auxiliares adecuados. El kit se proporciona en unidades de envase producibles de manera en sí conocida y habitual.

Con el procedimiento de acuerdo con la invención o bien con el kit de acuerdo con la invención puede medirse de manera preestablecida y fiable la cantidad máxima activable de trombina de una muestra de sangre o plasma. Además, con este método puede también medirse una cantidad basal de trombina en la sangre. En el plasma siempre se encuentra una cantidad pequeña constante de trombina. Sin embargo, en la sangre se detectan concentraciones diferentes de trombina tanto reducidas como también incrementadas (“trombina ciega”).

El procedimiento de acuerdo con la invención proporciona, por lo tanto, información sobre una capacidad de coagulación normal, supranormal o subnormal de la sangre (trombofilia o hemofilia, hemostasis). Además, con el procedimiento de acuerdo con la invención puede medirse un control del curso de una terapia con anticoagulantes orales del tipo cumarina o dicumarol. Frente al valor de Quick, utilizado hasta ahora para ello, el procedimiento de acuerdo con la invención (el procedimiento THROGA) tiene la ventaja de que puedan detectarse anticoagulantes orales en su potencia inhibidora de la coagulación en la sangre entera. Mediante el procedimiento puede reconocerse en una fase temprana en el paciente, por consiguiente, una hemostasis. En exploraciones pudieron obtenerse buenos resultados de medición para los pacientes que fueron tratados con anticoagulantes orales. Dado que en el caso de la terapia de anticoagulación oral los precursores de la serina proteasas esenciales del sistema de coagulación se presentan en forma inactiva, ante todo el precursor de la enzima clave trombina, la protrombina, es posible determinar el potencial de coagulación todavía presente en pacientes de este tipo y, mediante la detección de la generación de trombina en la sangre, obtener también información de si está presente una hemostasis. Además, con el procedimiento de acuerdo con la invención puede realizarse también una vigilancia a largo plazo de una terapia con otros fármacos inhibidores de la coagulación. En ensayos se demostró que pacientes que habían sido tratados con sustancias antitrombina directas tales como Refludan o Melagatran o Argatroban, pueden ser vigilados en cuanto a su estado trombófilo. En el caso del procedimiento de acuerdo con la invención se trata, por consiguiente, de un procedimiento agudo que permite obtener información inmediata en cuanto al estado de coagulación complejo de un paciente. Con el procedimiento de acuerdo con la invención pueden reconocerse inmediatamente irregularidades en el estado de coagulación de la sangre, lo cual permite la rápida iniciación de etapas terapéuticas correspondientes.

La Figura 1 muestra el procedimiento de acuerdo con la invención en una panorámica.

La invención se explica con mayor detalle con ayuda de los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Prescripción general para la realización del ensayo

5 Para la generación máxima de trombina se utiliza una pequeña cantidad de sangre o plasma anticoagulado. Para
 ello se puede utilizar citrato, pero también cualquier otro anticoagulante. En cada caso se añaden 0,1 ml de sangre
 o plasma citrado a unos tubitos de referencia (NaCl) y de activador (factor tisular + mezcla a base de ácido elálgico
 y fosfolípidos) en los que se encuentra una cantidad definida de hirudina. Después de cerrar los recipientes de
 10 reacción, los dos recipientes se mezclan en un mini-agitador a 550 rpm a la temperatura ambiente durante 25 min.
 La activación de la coagulación se finaliza a continuación con una solución de interrupción con contenido en EDTA,
 y la hirudina libre restante, no consumida, se determina con un método de detección preciso. Para la medición
 exacta del contenido en hirudina en los recipientes de reacción se emplea un método de determinación de hirudina
 cromógeno, disponible en el comercio, mediante sustrato cromógeno (ECA, Ensayo Cromogénico de Ecarina,
 documento WO 0046602).

15 **Ejemplo 2**

Ejemplo de un kit THROGA

20 Seguidamente se indica la composición a modo de ejemplo de un kit THROGA:

- 25 x tubitos de activador con reactivo liofilizado, identificación: marca roja
- 25 x tubitos de referencia con reactivo liofilizado
- 25 1 x tubito de referencia con reactivo liofilizado para la curva de referencia, identificación: cierre con un punto rojo
- 1 x reactivo de interrupción, 10 veces concentrado, 6 ml
- 30 2 x control THROGA, liofilizado, para 1,5 ml
- 2 x tampón de ECA-protrombina, liofilizado, para 6 ml
- 1 x sustrato ECA-H, disolución lista para el uso, 3 ml
- 35 2 x reactivo de ECA-ecarina, liofilizado, para 3 ml.

40 Tampón de ECA-protrombina, sustrato ECA-H, reactivo ECA-ecarina: 7 días de uso.
 (testado mediante regulación diaria de la temperatura a 37°C durante 3 h, almacenamiento entre las mediciones a 2-8°C)

Tampón de ECA-protrombina, sustrato ECA-H, reactivo ECA-ecarina: almacenado en porciones y cerrado a 2-8°C: 28 días.

45 En el caso de conservar los reactivos a 37°C en el aparato de medición, los viales se han de cerrar para la
 protección frente a la evaporación después de cada toma de reactivo. Después de finalizados los trabajos, los
 reactivos se han de conservar cerrados a 2-8°C.

50 **Ejemplo 3**

Realización de la determinación de la generación máxima de trombina en sangre citratada y/o plasma

Preparación de los reactivos

55 El agitador preajustado debe conectarse al menos 30 minutos antes de introducir los tubitos de muestras. El
 reactivo de interrupción concentrado 10 veces ha de diluirse, en función de la cantidad requerida, en la relación

1:10 con agua destilada. El sustrato ECA-H está listo para ser utilizado. Reactivo ECA-ecarina, tampón ECA-protombina y control THROGA se disuelven con la cantidad de agua destilada indicada en la etiqueta y se mezclan bien pero con cuidado girándolo mediante inversión. Los reactivos y el control deben reconstituirse durante 45 min a TA. Al menos 1 vez durante y después de este tiempo de reconstitución, los reactivos se mezclan cuidadosamente girándolos mediante inversión.

Materiales y aparatos necesarios, pero no contenidos

- coagulómetro manual con opción para la medición de reacciones cromógenas Coatron M2 adaptado a ECA-H, incluidos materiales de consumo y manual de instrucciones (informaciones a obtener de HaemoSys GmbH)
- agitador preajustado (aprox. 500 rpm)
- cronómetro
- agua desionizada o destilada
- pipetas con puntas calibradas adecuadas
- materiales para la extracción de muestras de sangre

Muestra/material de investigación

- Plasma citrado procedente de sangre citrada, a ser posible centrifugar rápidamente al menos durante 10 min a 1500 x g y separar plasma.
- Evitando la formación de espuma, mezclar cuidadosamente sangre citrada con una relación de 1 parte de disolución de citrato de sodio (0,11 mol/l) con 9 partes de sangre de las venas.
- estabilidad de la muestra a 15-25°C: 4 h

Metodología

Generación de trombina

Para la determinación, en cada caso en un tubito de activador y en un tubito de referencia se añaden 100 µl de sangre citrada o bien plasma citrado. Con el fin de evitar la evaporación, los tubitos deberían ser cerrados después de la disolución. A continuación, los tubitos se disponen en el agitador durante 30-60 minutos. Con el fin de finalizar la reacción después del sacudimiento, en cada uno de los tubitos se añaden 1000 µl de reactivo de interrupción y se mezclan a fondo cuidadosamente con la pipeta.

Tubito de referencia	Tubito de activador
100 µl de plasma	100 µl de plasma
sacudir durante 30 min	
1000 µl de reactivo de interrupción	1000 µl de reactivo de interrupción

Determinación de las unidades anti-trombina (A-T-E) mediante ECA-H

En las dos muestras de THROGA (tubitos de referencia y de activador) se determinan entonces las unidades anti-trombina (A-T-E) mediante ECA-H.

ECA-H puede ser utilizado con una pluralidad de coagulómetros automáticos y manuales que están equipados con una opción para la medición óptica.

Realización del ensayo del método utilizando el coagulómetro adaptado a ECA-H Coatron M2

Se han de tener en cuenta las instrucciones de uso del Coatron M2. En la determinación del THROGA en muestras de sangre, la opción "Inicio automático" debe ser inactivada en el aparato.

5 El aparato de medición se precalienta hasta 37°C. Las cubetas se precalientan en el bloque de cubetas del aparato de medición. Tampón de ECA-protrombina, reactivo ECA-ecarina y, si es posible, el sustrato ECA-H se precalientan en el aparato al menos durante 15 min.

10 Para evitar la evaporación, los reactivos deberían cerrarse o cubrirse durante la medición.

Informaciones detalladas para la realización del ensayo en el Coatron M2 se pueden tomar del anejo a las instrucciones de uso (aplicación ECA-H).

15 Reactivos y la muestra THROGA se pipetea en las cubetas de manera correspondiente al esquema de pipeteado.

Esquema de pipeteado: ECA-H

Pipetear en cubetas precalentadas a 37°C	
Tampón de ECA-protrombina	100 µl
Muestra THROGA	25 µl
Sustrato ECA-H	25 µl
mezclar, incubación durante 1 min a 37°C	
Reactivo de ECA-ecarina	50 µl
Si la adición del reactivo de ECA-ecarina no tiene lugar con una pipeta iniciadora, la medición del tiempo se inicia automáticamente 15 s después de la adición del reactivo	

20 Evaluación

El resultado de la medición se indica como tiempo de medición en segundos y como U (unidades de anti-trombina, A-T-E). La evaluación tiene lugar a través de una curva de referencia almacenada en el aparato de medición.

25 A partir de las A-T-E determinadas en los tubitos de referencia o de activador se calculan las unidades de trombina formadas en la muestra de plasma o de sangre con la siguiente fórmula:

$$ETP = R - A$$

30 ETP potencial de trombina endógeno máximo, unidades de trombina formadas en 1 ml de sangre o plasma

R unidades de anti-trombina en el tubito de referencia (A-T-E/ml de sangre o plasma)

A unidades de anti-trombina en el tubito de activador (A-T-E/ml de sangre o plasma)

35 Creación de una curva de referencia

40 Con el fin de obtener resultados correctos, debe crearse para cada nueva carga de reactivo una curva de referencia. Para la creación de la curva de referencia se emplean, en lugar de la muestra THROGA, en cada caso 25 µl de patrón de THROGA. Se lleva a cabo una medición en 4 puntos:

Preparación de las diluciones del patrón de THROGA:

Patrón THROGA (concentración en unidades de anti-trombina / ml de plasma)	Preparación
224	Tubito de referencia disuelto en 1100 µl de reactivo de interrupción

112	500 µl de patrón 225 A-T-E + 500 µl de reactivo de interrupción
56	500 µl de patrón 112,5 A-T-E + 500 µl de reactivo de interrupción
0	Reactivo de interrupción

5 Se aconseja llevar a cabo la medición del patrón THROGA como determinación doble. Se forman los valores medios de los tiempos de reacción ECA-H obtenidos a partir de las mediciones y se incorporan en el aparato de medición con las correspondientes concentraciones estándares. En este caso, se ha de tener en cuenta que U corresponde a la unidad de concentración **A-T-E/ml** de sangre o plasma. La curva de referencia se almacena en el aparato de medición.

10 Informaciones detalladas para la creación de curvas de referencia en el Coatron M2 se pueden tomar del anejo de las instrucciones de uso de los aparatos de medición (aplicación ECA-H).

Control de calidad interno

15 Para el control de calidad interno se emplea se emplea el control THROGA preparado en lugar de sangre o plasma en el THROGA.

Si el valor de control medido se encuentra fuera del intervalo de control indicado en la etiqueta del control THROGA, no se garantizan determinaciones fiables. Los reactivos deberían verificarse y, eventualmente, renovarse. Si el valor control medido sigue encontrándose fuera del intervalo de control, se ha de verificar la capacidad funcional del aparato de medición.

20

Ejemplo 4

Examen de pacientes mediante THROGA:

25 a) Voluntarios: I.N., hembra, 37 años

	Concentración de r-hirudina (µg/ml)	1 µg = 15,8 ATE
	Sangre	Plasma
Control (A)	14,9	14,6
Muestra activada (B)	9,3	7,5
Diferencia (µg/ml)	5,6	7,1
ATE/ml; TE/ml	88,5	112,2

Evaluación: I.N. tiene en el plasma una cantidad de activación "normal" de 112,2 (N: 122 ± 19 TE/ml).

30 En la sangre de la persona voluntaria se han medido 88,5 TE/ml de trombina generada. El valor de la norma se encuentra en 78 ± 13 TE/ml. Con ello, se encuentra asimismo dentro del intervalo de la norma.

35 b) Pacientes: C.R., hembra, 55 años, estado tras insulto cerebral

40

1. antes del comienzo de una terapia específica de plaquetas sanguíneas con clopidogrel (7.1.04)

	Concentración de r-hirudina (µg/ml)	1 µg = 15,8 ATE
	Sangre	Plasma
Control (A)	13,2	14,2

Muestra activada (B)	6,9	6,7
Diferencia (µg/ml)	6,3	7,5
ATE/ml; TE/ml	99,5	118,5

2. después de 8 semanas de tratamiento con clopidogrel, diariamente 1,5 comprimidos (112,5 mg), (4.3.04)

	Concentración de r-hirudina (µg/ml)	1 µg = 15,8 ATE
	Sangre	Plasma
Control (A)	14,1	14,3
Muestra activada (B)	8,9	6,9
Diferencia (µg/ml)	5,2	7,4
ATE/ml; TE/ml	82,2	116,9

5 Evaluación: la paciente C.R. tenía, en la primera exploración, un valor THROGA patológico en la sangre de 99,5 (norma: 78 ± 13 TE/ml), el cual se ha normalizado después de 8 semanas de terapia específica de plaquetas (82,2). Los valores de plasma THROGA se encontraban en ambas exploraciones en el intervalo normal. En todos los otros controles bajo terapia con clopidogrel, los valores THROGA eran normales.

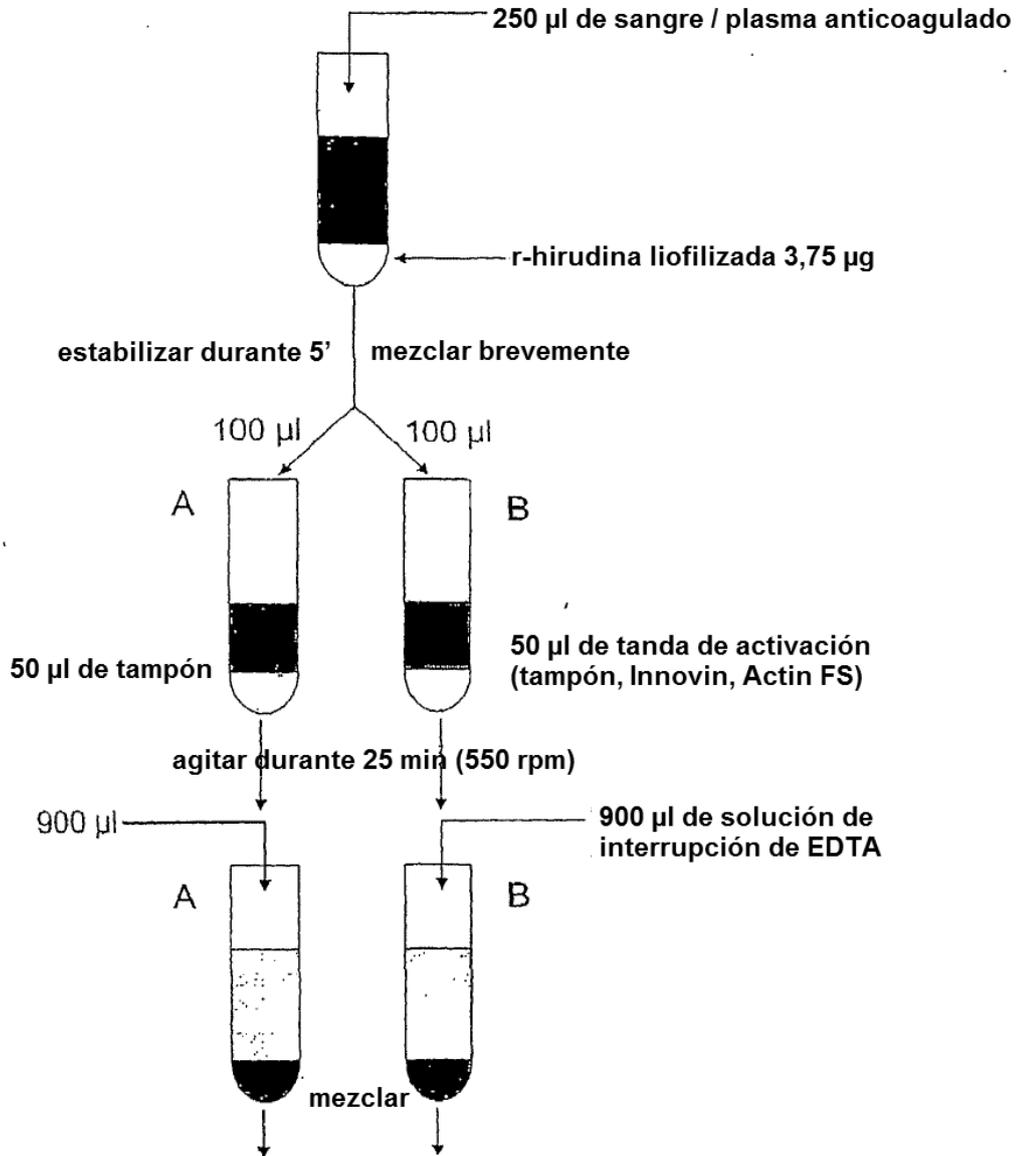
10 c) Paciente M.F., varón, 64 años, diagnóstico: trombofilia en el caso de gammopatía; el paciente recibe una profilaxis de trombosis con falithrom (anticoagulante oral), 12.2.05

	Sangre (ATE/ml)	Plasma (ATE/ml)
Control (A)	265,4	275,5
Muestra activada (B)	219,1	218,2
Diferencia (µg/ml)	46,3	39,3

15 Evaluación: el paciente M.F. tiene, con 39,3 TE/ml en el plasma, un 32% del valor normal en el plasma y, por consiguiente, se encuentra en una "ventana terapéutica" suficiente. En la sangre se detectó, en el caso de 46,3 TE/ml, todavía un 60% de la cantidad de trombina generable normal. Con ello, no se puede establecer ninguna hemostasis, y este paciente es cuidado de forma óptima.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la determinación de la actividad de coagulación total de una muestra de sangre o plasma, con el fin de decidir sobre “enfermo respecto a la coagulación” o “sano respecto a la coagulación”, caracterizado porque a una muestra de sangre o plasma se añade, en una cantidad definida, una sustancia inhibidora de trombina muy específica y no irreversible, elegida de dipetalogastina I, dipetalogastina II, rodniina e hirudina, se induce la coagulación en la muestra de sangre o plasma mediante la adición de factores extrínsecos e intrínsecos y, después de un tiempo definido, se determina de manera en sí conocida la cantidad consumida de la sustancia inhibidora de trombina añadida.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la inducción de la coagulación se genera mediante un factor tisular y una mezcla a base de ácido elágico y fosfolípidos.
- 15 3.- Kit para uso para la determinación de la actividad de coagulación total de una muestra de sangre con el fin de decidir sobre “enfermo respecto a la coagulación” o “sano respecto a la coagulación”, caracterizado porque comprende
- 20 i) una sustancia inhibidora de trombina muy específica y no irreversible, elegida de dipetalogastina I, dipetalogastina II, rodniina e hirudina,
 - ii) factores para la activación extrínseca e intrínseca de la trombina,
 - iii) reactivos y coadyuvantes necesarios.
- 25 4.- Uso de un kit según la reivindicación 3, para obtener información sobre el estado de coagulación de una muestra de sangre.



Medición de la cantidad libre de hirudina mediante ECA-H (HaemoSys GmbH, Jena)

Evaluación: a) $hirudinaA - hirudinaB =$ cantidad generada de trombina en TE/ml
(1 ATE de hirudina = 1 TE de α -trombina)

b) $hirudina - hirudinaA =$ trombina "ciega" en la sangre o plasma