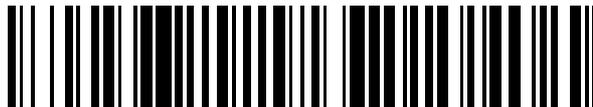


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 719**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86** (2006.01)

**G01N 33/96** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2008** **E 08862335 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 2201385**

54 Título: **Método de ajuste de calibración de ensayos de diagnóstico**

30 Prioridad:

**04.10.2007 FR 0706975**

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

**13.09.2013**

73 Titular/es:

**DIAGNOSTICA STAGO (100.0%)  
9, RUE DES FRERES CHAUSSON  
92600 ASNIÈRES, FR**

72 Inventor/es:

**ESTEVE, FRÉDÉRIC y  
NICOUD, LYDIE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 422 719 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de ajuste de calibración de ensayos de diagnóstico

- 5 La presente invención se refiere a un método directo o indirecto de ajuste de la calibración preestablecida sobre reactivos destinados para realizar ensayos de diagnóstico en el campo de biología médica y más particularmente en el de la hemostasia.
- 10 La hemostasia se considera como un conjunto de mecanismos fisiológicos que contribuyen a la prevención y a la detención de sangrado. La hemostasia se compara frecuentemente con una balanza, puesto que la fluidez de la sangre se mantiene gracias a un equilibrio entre activadores e inhibidores del proceso de coagulación.
- 15 Cualquier ruptura en este equilibrio hará inclinar la balanza hacia un proceso patológico: la trombosis, resultante de la formación de un coágulo que puede provenir de un déficit de inhibidores, o la hemorragia resultante de sangrado que puede deberse a un déficit de factores de coagulación.
- 20 El análisis y la dosificación de factores activadores o inhibidores de la coagulación permiten de este modo establecer diagnósticos de predisposición o de riesgos de trombosis o de hemorragia en diferentes situaciones clínicas.
- 25 La inmensa mayoría de estos ensayos se realizan de manera rutinaria en laboratorios de análisis o de hospitales, de manera semi-automática o automática. Generalmente, según los ensayos efectuados y los instrumentos utilizados, los resultados consisten en una señal medida por el instrumento o en una actividad biológica calculada por el instrumento.
- 30 Como para la mayoría de los ensayos biológicos realizados en aparatos de análisis, cuando se efectúa un ensayo automático de hemostasia, es necesario disponer de una calibración que permita calcular directamente el índice o la actividad del factor estudiado. Estos datos de calibración se obtienen generalmente utilizando calibradores cuya actividad o concentración del analito diana está bien caracterizada, y a partir de los cuales pueden establecerse curvas de calibración que permiten atribuir una concentración o una actividad a una intensidad de señal proporcionada.
- 35 Sin embargo, en la medida en que un mismo ensayo puede realizarse a menudo en aparatos automáticos de diferentes gamas, es frecuente observar una variabilidad entre instrumentos. Esta variabilidad no siempre permite comparar directamente, para un mismo ensayo, los resultados obtenidos en aparatos diferentes que siempre utilizarían el mismo estándar de calibración.
- 40 Por otro lado, como muchos de los reactivos se presentan en forma líquida, estos pueden ser más sensibles al fenómeno de envejecimiento que los reactivos en forma liofilizada. Debido a esto, incluso si estos reactivos permanecen funcionales durante un tiempo determinado, pueden no obstante ver disminuir su sensibilidad parcialmente o variar en función del tiempo.
- 45 Por tanto esto produce una dificultad para interpretar los resultados obtenidos a partir de un mismo reactivo pero que derivan de ensayos realizados en periodos diferentes.
- 50 La solicitud US 2007/0020765 describe un método para estandarizar los tiempos de coagulación de una muestra, en la que se utiliza al menos dos calibradores para los cuales se han predeterminado tiempos de coagulación estándar en el mismo sistema de ensayo que el aplicado a la muestra, y a partir de los cuales se establece una curva de calibración entre los tiempos estándar predeterminados y los tiempos reales medidos por esos mismos calibradores, en el ensayo utilizado.
- 55 El tiempo de coagulación medido en la muestra se convierte en tiempo de coagulación estandarizado usando la curva de calibración así establecida.
- Este método consiste por tanto en crear localmente una calibración cada vez que se utiliza un nuevo kit para medir un tiempo de coagulación en un ensayo de hemostasia.
- 60 El objeto de la presente invención es proporcionar un método de ajuste para instrumentos de análisis y los reactivos precalibrados asociados, permitiendo dicho método limitar o evitar fluctuaciones de los resultados obtenidos con el tiempo y/o según el tipo de instrumento utilizado para los ensayos.
- La presente invención también tiene como objeto un método de ajuste, de señal medida o de la actividad calculada por el instrumento o de una curva de calibración predefinida (curva de precalibración) para un ensayo de exploración de coagulación sanguínea, realizado en un instrumento con reactivos precalibrados, que comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) definir un valor de señal o de actividad, teniendo dicho valor estándar, para un solo ajustador, o para dos ajustadores de calibración, una concentración o una actividad predeterminada en un compuesto sometido a ensayo, y medir, para este ajustador o ajustadores, la diferencia entre el valor (o valores) estándar de señal o de actividad y el valor (o valores) de señal medida por el instrumento o el valor (o valores) de actividad calculado (s) a partir de la curva de precalibración y, si la diferencia medida tiene un valor aceptable,
- 10 (ii) ajustar la señal medida por el instrumento o el valor de la actividad calculada por el instrumento o ajustar el valor (o valores) de la curva de precalibración de manera que el valor de señal medida o de la actividad calculada en la curva de precalibración para un solo ajustador o para los dos ajustadores, se vuelva a llevar a un valor de señal o de actividad idéntico al valor de señal o de actividad estándar determinado en la etapa (i) para un solo ajustador o para cada uno de los dos ajustadores,
- (iii) aplicar el mismo ajuste que el descrito en (ii) a todas las muestras sometidas a ensayo cuya señal o actividad se mide con dichos reactivos precalibrados.

15 Por diferencia medida que tiene un “valor aceptable” se entiende una diferencia que queda comprendida entre dos valores del intervalo de valores considerados como admisibles por el experto en la técnica, para el reactivo y el instrumento utilizados.

20 Esta diferencia puede ser más o menos importante en función de la sensibilidad del ensayo realizado y del orden de magnitud de las señales medidas.

Por esta razón, el límite por encima del cual el ajuste de la precalibración no será posteriormente aceptable, debe definirse con respecto al tipo de ensayo e instrumento utilizados.

25 El experto en la técnica, acostumbrado a analizar los resultados obtenidos por los aparatos de análisis automáticos, puede detectar fácilmente al realizar los ensayos, si los valores a partir de los cuales los resultados se consideran anómalos, serían debidos al reactivo utilizado o al instrumento.

30 También es capaz de definir las diferencias entre los valores de señal o de actividad estándar y los valores de señal medida por el instrumento o de actividad calculada en la curva de precalibración según la etapa (i) del método de la invención, que sean lo suficientemente pequeños como para no ocultar las anomalías de los reactivos o de los aparatos utilizados.

35 Preferentemente, la diferencia medida es, a lo sumo, del 20 al 30%.

Según una variante preferida, el método de la invención se realiza con un solo ajustador.

40 Según un modo de realización particular de la invención, el ajuste, mediante un solo ajustador, de una señal medida en el ámbito de un ensayo determinado, conforme con las etapas (i) y (ii) del procedimiento según la invención puede realizarse de la siguiente manera:

- para la etapa (i) de establecimiento del valor estándar se actúa de la siguiente manera:

45 El valor de la señal estándar asignado al ajustador se calcula a partir de los resultados establecidos en el momento de la etapa de determinación de la precalibración del producto en cuestión. La determinación de la precalibración consiste en pasar patrones a índices conocidos del analito a dosificar (compuesto sometido a ensayo) sobre un panel de varios instrumentos. Cada uno de los patrones se pasa por duplicado, por triplicado o por cuadruplicado en cada instrumento.

50 Al mismo tiempo, el ajustador que valora la señal también se pasa simultáneamente por duplicado, por triplicado o por cuadruplicado sobre esos mismos instrumentos.

A continuación se calcula la media aritmética, la media truncada o la mediana fuera del instrumento sobre todos los valores de señal así obtenidos, por separado para cada patrón y para el ajustador.

55 La determinación de la ecuación de precalibración se calcula fuera del instrumento por regresión mínimos cuadrados en diferentes pares (señal media o mediana; concentración del patrón).

60 El valor de señal estándar del ajustador corresponde respectivamente a la media aritmética, a la media truncada o a la mediana de todos los valores de señal medidos en este ajustador en el ámbito de esta determinación de precalibración según el modo de cálculo aceptado. El valor de la señal estándar así calculado para este ajustador solo es válido para el lote particular de producto precalibrado.

La determinación del valor de la señal o de la actividad estándar (véase más adelante) del ajustador, o ajustadores, puede realizarse por tanto antes e independientemente del ensayo de diagnóstico. El valor de la señal (o de la actividad) estándar del ajustador o ajustadores puede por tanto suministrarse al usuario del ensayo de diagnóstico con el lote de reactivos a utilizar y el ajustador (ajustadores).

- para etapas (ii) y (iii) de ajuste de los valores medidos del ajustador y de las muestras ensayadas, se procede de la siguiente manera:

El valor de la señal estándar asignado al ajustador para su lote de producto precalibrado se indica como S. Cuando este ajustador se pasa por duplicado, por triplicado o por cuadruplicado sobre un instrumento con este lote de producto precalibrado, el instrumento calcula la señal T que corresponde, según el modo de cálculo seleccionado para determinar S, a la media aritmética, a la media truncada o a la mediana de estas diferentes señales medidas. Si la diferencia entre S y T es conforme a los criterios de aceptación conocidos por el instrumento, el instrumento calcula un coeficiente de ajuste C que es igual a la proporción de S con respecto a T ( $C = S/T$ ). De este modo, multiplicando la señal T, medida por el instrumento para el ajustador, por ese coeficiente de ajuste C igual a  $S/T$ , el valor ajustado de la señal del ajustador es igual a S. De la misma manera, cuando las muestras a dosificar se pasan sobre ese mismo instrumento, las mediciones de señal obtenidas se ajustan multiplicando esas mediciones por ese coeficiente de ajuste C. Después, se realiza el cálculo de la concentración o de la actividad del analito a dosificar aplicando la precalibración a este valor de señal ajustado.

Según otro modo de realización particular de la invención, el ajuste mediante un solo ajustador se realiza sobre la actividad calculada por el instrumento de análisis, conforme con las etapas (i) y (ii) del procedimiento según la invención, de la siguiente manera:

-para la etapa (i) de establecimiento del valor estándar.

El valor de actividad estándar se asigna al ajustador para una valoración. Para este propósito, se realizan diversos ensayos con un lote o con diferentes lotes de reactivos precalibrados en diferentes aparatos automáticos. El número de determinaciones puede variar según el parámetro considerado pero es siempre mayor o igual a 3. Esta valoración es distinta de la determinación de la precalibración.

El ajustador (que es, por ejemplo, un reactivo liofilizado basado en plasma con excipiente de tipo control/calibrador) se ensaya por duplicado, por triplicado o por cuadruplicado durante cada determinación. Su actividad estándar se deduce por lectura de señales medidas en la precalibración.

La media aritmética, la media truncada o la mediana se calculan después fuera de los instrumentos en todas las actividades obtenidas con cada lote de reactivo precalibrado en cada aparato automático para cada ajustador. El valor de actividad estándar o titulación del ajustador corresponde, según el modo de cálculo adoptado, a la media aritmética, media truncada o mediana de todos los valores de actividades medidos en este ajustador en el ámbito de esta valoración. El valor de actividad estándar así calculado para este ajustador puede ser válido para uno o más lotes de producto precalibrado.

Cada vez que esto sea posible, la valoración del ajustador se correlaciona con el estándar internacional del parámetro. Esto permite garantizar, además de la homogeneidad en el sistema de cuestión, la coherencia con el sistema internacional.

para las etapas (ii) y (iii) de ajuste de la actividad medida:

El título asignado al ajustador se indica como S. Cuando este ajustador se pasa por duplicado, por triplicado o por cuadruplicado en un instrumento con el lote o los lotes de productos precalibrados que le corresponden, el instrumento calcula, a partir de la señal medida, la actividad T que corresponde según el modo de cálculo aceptado para determinar S, a la media aritmética, a la media truncada o a la mediana de estas diferentes señales medidas. Si la diferencia entre S y T es conforme con los criterios de aceptación conocidos por el instrumento, el instrumento calcula un coeficiente de ajuste C, que es igual a la proporción de S con respecto a T ( $C = S/T$ ). De esta manera, multiplicando la señal T, medida por el instrumento para el ajustador, por el coeficiente de ajuste C igual a  $S/T$ , el valor ajustado de la actividad del ajustador es igual a S. De la misma manera, cuando las muestras a dosificar se pasan sobre ese mismo instrumento, las señales medidas se convierten en actividades gracias a la ecuación de precalibración del reactivo. Las actividades obtenidas se ajustan después multiplicándolas por el coeficiente de ajuste C.

Un ajustador utilizado en el ámbito del método de la invención es una composición que permite:

- ajustar, durante el uso de un nuevo lote de reactivos, los resultados obtenidos del análisis, al instrumento utilizado para realizar el ensayo utilizando al mismo tiempo la precalibración. El propósito de esto es recentrar los controles cuando se separan sistemáticamente.
- en función del tiempo, compensar una pérdida de sensibilidad del reactivo debida, por ejemplo, a su envejecimiento. Como se ha indicado anteriormente, este punto concierne particularmente a los reactivos líquidos que son menos estables con el tiempo que los reactivos liofilizados.

La composición del ajustador con relación a los factores de coagulación u otros componentes se define en función del ensayo realizado.

El ajustador debe contener al menos el compuesto estudiado en el ensayo utilizado, cuya concentración o actividad están predeterminadas.

En el caso de un ensayo de exploración de coagulación sanguínea, el ajustador está preferentemente constituido por plasma liofilizado estabilizado o por un conjunto de plasmas liofilizados estabilizados.

También puede estar constituido por proteínas plasmáticas purificadas o semi-purificadas, constituyendo dichas proteínas el suministro de factores necesarios para realizar la reacción producida en el ámbito del ensayo realizado y que adicionalmente comprende el compuesto estudiado (también denominado factor estudiado), cuya concentración o actividad está predeterminada.

La concentración (o índice de actividad) del factor estudiado, utilizado en el ajustador, debe seleccionarse para reducir al máximo la influencia de un posible ruido de fondo sobre la corrección de la precalibración.

Con esta finalidad, la concentración o la actividad del compuesto sometido a ensayo del ajustador se fija de tal manera que la proporción señal /ruido de fondo sea elevada.

Según el tipo de ensayo utilizado, la relación entre la señal medida y la actividad o la concentración del compuesto estudiado del ajustador es diferente. Por ello, se obtienen curvas con diferentes perfiles según los ensayos.

Por ejemplo, en el caso de una dosificación de antitrombina (AT), tal como la propuesta por el kit STA-Stachrom ATIII, comercializado por Diagnostica Stago, la DOD (DO delta) disminuye cuando aumenta la concentración de ATIII.

Sin embargo, puesto que la concentración de ATIII es más baja en una situación patológica que en una situación normal, la concentración de AT del ajustador para realizar el método de ajuste según la invención, se seleccionará para que el ajustador se coloque en un intervalo que incluya un valor patológico (es decir baja cantidad de ATIII).

A la inversa, en el caso de una dosificación de proteína C, tal como la propuesta por el kit STA-Stachrom Protein C (Diagnostica Stago), el ajustador se colocará en un intervalo que corresponda a la concentración de proteína C normal, puesto que la señal medida aumenta proporcionalmente con la cantidad de proteína C y el intervalo normal está delimitado por valores superiores el índice de proteína C.

En el caso de dosificación del Dímero D, como por ejemplo el realizado por el kit STA-Liatest D-Di (Diagnostica Stago), se observa que la señal aumenta con la cantidad de Di-D. Sin embargo, en situaciones normales, el índice de Dímero-D es más bajo que en situaciones patológicas. El ajustador según la invención se seleccionará por tanto de manera que la señal observada se coloque en un intervalo patológico. En el caso de la dosificación mediante el kit STA-Liatest, el ajuste puede tener la composición de un reactivo STA Liatest Control P o STA Liatest Control N.

El método según la invención puede realizarse para cualquier tipo de ensayo de exploración de coagulación sanguínea, tal como TCA (Tiempo de Cefalina Activada), TP (Tiempo de Protrombina o tiempo de rapidez) o TT (Tiempo de Trombina) o cualquier otro ensayo enzimológico clásico sobre mediciones de densidad óptica (DO) o de tiempo.

También puede aplicarse a ensayos de tipo análisis inmunológico en fase sólida dispersa, basado en la medición fotométrica del aumento de turbidez de una suspensión de micro esferas.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

#### **Ejemplo nº 1:**

60

**Estudio del ajuste de la precalibración del STA-Liatest D-Di: Viabilidad de corrección de las DOD en un punto sobre la pérdida de reactividad relacionada con el envejecimiento del reactivo.**

El método de la invención se aplica a un ensayo comercializado con el nombre STA-Liatest D-Di por Diagnostica Stago.

Se trata de un kit de dosificación de Dímeros-D (Di-D) plasmáticos por inmunoturbidimetría utilizando micro esferas de látex revestidas con dos anticuerpos monoclonales anti-Dímeros-D.

En presencia del analito (Dímero-D), la reacción de tipo antígeno/anticuerpo provoca una aglutinación de las partículas de látex, que induce a un aumento de la turbidez de la mezcla de reacción.

Esto se mide en un analizador de la gama STA (Diagnostica Stago) en modo cinético a 540 nm durante 140 segundos, de acuerdo con las instrucciones del prospecto del kit.

El aumento de la absorbancia es proporcional a la concentración de Dímeros-D de la muestra ensayada.

Los reactivos de kit son líquidos listos para emplear.

Para cada lote de reactivos, se proporciona una precalibración por un código de barras. Los coeficientes de la precalibración del lote utilizado se transmiten directamente al instrumento simplemente escaneando el código de barras.

Plasmas de control (Control Positivo y control negativo) permiten la validación del calibrado y de las series de dosificación.

La medición de la concentración de Di-D se realizó una primera vez a T=0 (Tabla 1) en 4 muestras de plasma con un lote específico de STA Liatest D-Di, a continuación, una segunda vez en las mismas muestras y con el mismo lote, 20 meses después (con T=20 meses) (Tabla 2).

Los plasmas utilizados son plasmas de nivel cuyos valores diana para el parámetro medido (Di-D) se determinan de la siguiente manera: (valor diana=valor medio determinado en un gran número de ensayos experimentales)

- RIN2 es un plasma con un valor diana Di-D de 0,58 µg/ml
- PN2 es un plasma con un valor diana Di-D de 0,83 µg/ml
- LCP es un plasma de control patológico (STA Liatest Control P) con un valor diana de 2,40 µg/ml Di-D.
- P2 es otro plasma patológico.

El punto de ajuste utilizado en este ejemplo es el "STA Liatest Control P" (LCP).

Las DOD se miden en 10 instrumentos de la gama STA.

Las DOD medidas por cada instrumento se corrigieron por un coeficiente que se calcula por la proporción de la DOD estándar de este reactivo, igual a 0,129, sobre la DOD media de un cuádruplete (X4) obtenido en cada instrumento.

Esta DOD estándar de 0,129 corresponde a la media de las DOD obtenidas en un lote de STA Liatest Control P (LCP en este ejemplo), durante la determinación de la precalibración del lote del STA Liatest D-Di utilizado.

Se ensayaron cuatro niveles de concentración en un lote de STA Liatest D-Di específico pre-calibrado a T=0.

Las tablas 1 a 2 muestran resultados obtenidos a T=0 (tabla 1) y T=20 meses (tabla 2), respectivamente.

Los resultados de la Tabla 3, que son los obtenidos a T=20 meses después del ajuste por LCP, son muy similares a los obtenidos inicialmente a T=0 (tabla 1).

Como conclusión: el ajuste de un punto de las DOD permite recuperar, 20 meses después con el reactivo precalibrado a T=0 (Tabla 3), concentraciones medias equivalentes a las obtenidas a T=0 (Tabla 1).

Por tanto, el ajuste en un punto de las DOD medidas es eficaz para compensar la pérdida de sensibilidad del STA Liatest D-Di.

Tabla 1: Concentraciones de Dímero-D (µg/ml) obtenidas a T=0 con el reactivo precalibrado

	RIN2	PN2	P2	LCP
MIN	0,55	0,79	2,30	2,33
MAX	0,66	0,88	2,56	2,53
MEDIA	0,59	0,84	2,46	2,45
DT	0,032	0,032	0,079	0,067
CV (%)	5,47	3,86	3,20	2,73

Tabla 2: Concentraciones de Dímero-D (µg/ml) obtenidas a T=20 meses con el reactivo precalibrado

	RIN2	PN2	P2	LCP
MIN	0,50	0,71	1,98	2,00
MAX	0,60	0,79	2,19	2,17
PROMEDIO	0,54	0,75	2,11	2,10
DT	0,029	0,028	0,064	0,054
CV (%)	5,43	3,77	3,04	2,59

Tabla 3: Concentraciones de Dímero-D (µg/ml) obtenidas a T=20 meses con el reactivo precalibrado y después del ajuste de las DOD en cada instrumento con LCP

	RIN2	PN2	P2	LCP
MIN	0,57	0,82	2,40	REF
MAX	0,66	0,90	2,61	
MEDIA	0,60	0,85	2,49	
DT	0,028	0,038	0,070	
CV (%)	4,67	3,29	2,82	

## Ejemplo nº 2

### Estudio de ajuste de la precalibración para STA Liatest Free PS.

El estudio se realizó utilizando otro kit comercializado por Diagnostica Stago, el STA Liatest Free PS.

Se trata de un kit del mismo tipo que el anterior, que permite una dosificación cuantitativa de la proteína S libre por el método inmunoturbidimétrico.

La medición se efectúa en 10 instrumentos STA.

Se realiza en diferentes lotes de plasma, es decir:

- Un plasma de control normal y un plasma de control patológico (LCN y LCP: STA Liatest Control N+P-).
- Un plasma al 53%: se trata de un plasma patológico liofilizado.
- Un grupo de plasmas unitarios congelados (grupo Stago).
- Un plasma unitario congelado.

La Tabla 4 indica las concentraciones de proteína S libre (%) obtenidas con la calibración de cada aparato con un calibrador interno.

La tabla 5 indica las concentraciones de proteína S libre obtenidas con la precalibración comercial aplicada sin ajuste: precalibración no ajustada.

La tabla 6 indica las concentraciones de proteína S libre (%) obtenidas con la precalibración comercial después del ajuste de las DOD en un punto en el grupo Stago: precalibración ajustada.

Tabla 4: Concentraciones de proteína S libre (%) obtenidas con la calibración de cada instrumento con un calibrador interno

Resultados	LCP	Plasma al 53%	LCN	Grupo Stago	Plasma unitario
MIN	25,07	50,07	78,20	88,24	86,71
MAX	27,09	55,82	84,85	97,89	113,21
MEDIA	25,75	53,00	80,88	93,96	103,54
DT	0,63	1,80	2,32	2,81	7,63

Resultados	LCP	Plasma al 53%	LCN	Grupo Stago	Plasma unitario
CV	2,45	3,40	2,87	2,99	7,36

Tabla 5: Concentraciones de proteína S libre (%) obtenidas con la pre-calibración comercial aplicada sin ningún ajuste

Resultados	LCP	Plasma al 53%	LCN	Grupo Stago	Plasma unitario
MIN	24,35	46,77	70,57	81,89	77,84
MAX	27,51	57,79	94,48	104,71	125,35
MEDIA	26,05	52,72	80,58	93,79	103,82
DT	0,92	3,49	7,39	7,29	12,18
CV	3,55	6,62	9,16	7,77	11,74

Tabla 6: Concentraciones de proteína S libre (%) obtenidas con la precalibración comercial después del ajuste de las DOD en un punto en el grupo Stago

Resultados	LCP	Plasma al 53%	LCN	Grupo Stago	Plasma unitario
MIN	24,11	51,03	77,05	REF	88,86
MAX	26,78	54,08	84,78		113,03
MEDIA	26,07	52,68	80,24		103,47
DT	0,58	1,04	2,45		6,87
CV	2,22	1,97	3,06		6,64

La variabilidad entre instrumentos medida en 10 STA para concentraciones superiores al 50% es muy acentuada con el STA Liatest Free PS precalibrado (precalibración no ajustada). De esta manera, el CV entre instrumentos en LCN es del 9,16% en la precalibración no ajustada en comparación con 2,87% en la calibración de cada instrumento y 2,45% en la precalibración ajustada.

De la misma manera, la variabilidad entre instrumentos se mejora en el plasma al 53% (en el intervalo decisivo) y en LCP al 26% cuando se ajusta la precalibración:

Plasma al 53%: CVcal.instrumento=3,40%, CVprecal.no ajustada = 6,62%, CV precal.ajustada= 1,97%  
 Plasma LCP al 26%: CVcal.instrumento=2,45%, CVprecal.no ajustada = 3,45%, CVprecal. ajustada = 2,22 %.

Como consecuencia, el ajuste en un punto de la precalibración permite recuperar, en todos los niveles de concentración, valores de CV entre instrumentos:

- mejores que los obtenidos con la pre-calibración no ajustada
- al menos equivalentes a los obtenidos con una calibración de cada instrumento con un calibrador interno.

Como conclusión, la variabilidad entre instrumentos se mejora netamente en STA Liatest Free PS con el método de ajuste en un punto de las DOD según la invención.

### Ejemplo nº 3

Estudio del ajuste de precalibración del STA-Fib 2; viabilidad de la corrección de índices (g/l) sobre el centrado de los controles (valor obtenido más próximo al valor diana = centro de la horquilla proporcionado para un sistema establecido).

El método de la invención se ha aplicado a un ensayo comercializado con el nombre STA-Fib 2 por la compañía Diagnostica Stago.

Se trata de un kit de dosificación de fibrinógeno plasmático según el método de Clauss.

En presencia de trombina en exceso, el tiempo de coagulado de un plasma, diluido en proporciones apropiadas, es inversamente proporcional al índice de fibrinógeno plasmático.

El reactivo del kit está liofilizado. Para cada lote de reactivo, se proporciona una precalibración por un código de barras.

Los coeficientes de precalibración del lote utilizado se transmiten de este modo directamente al instrumento simplemente escaneando el código de barras.

Los plasmas de control (normal e hipofibrinogénico) permiten la validación del calibrado y de series de dosificación

La medición del índice de fibrinógeno plasmático se realizó en diferentes plasmas de controles en un conjunto de 71 aparatos automáticos incluyendo unos cuarenta STA\_R, unos doce STAc y unos doce SAT-Stellite.

5

Los controles utilizados son plasmas nivel con los siguientes valores diana para el parámetro medido:

- CCN es un plasma con un valor diana de 2,95 g/l
- CCP es un plasma con un valor diana de 1,30 g/l
- HYPER es un plasma con un valor diana de 5,27 g/l.

10

El plasma que actuaba como ajustador era el plasma AJP con un valor diana de 3,20 g/l.

Para este estudio, los índices se midieron en n=5 en cada instrumento sometido a ensayo. Los índices se ajustaron a partir de valores obtenidos por el plasma AJP en cada aparato (según el procedimiento descrito en la presente solicitud, para el ajuste de la actividad calculada).

15

Las siguientes tablas muestran los índices medios obtenidos con y sin ajuste (índices obtenidos gracias a la precalibración del lote en cuestión) con respecto al valor diana de los controles sometidos a ensayo así como la desviación típica global observada.

20

<b>Con ajuste</b>	<b>diana CCN: 2,95 g/l</b>	<b>diana CCP: 1,30 g/l</b>	<b>diana HYPER: 5,27 g/l</b>
Media	2,91	1,28	5,23
DT	0,11	0,05	0,19

<b>Sin ajuste</b>	<b>diana CCN: 2,95 g/l</b>	<b>diana CCP: 1,30 g/l</b>	<b>diana HYPER: 5,27 g/l</b>
Media	2,82	1,24	5,06
DT	0,11	0,04	0,19

Como conclusión, el ajuste realizado ha permitido recentrarlos índices obtenidos en los diferentes plasmas hacia su valor diana conservando al mismo tiempo una desviación típica homogénea en el conjunto sometido a ensayo.

25

**REVINDICACIONES**

- 5 1. Método de ajuste, de señal medida o de la actividad calculada por el instrumento, o de una curva de calibración predefinida (curva de precalibración) para un ensayo de exploración de coagulación sanguínea, realizado en un instrumento con reactivos precalibrados, que comprende las siguientes etapas:
- 10 (i) definir un valor de señal o de actividad estándar para un solo ajustador o para dos ajustadores de calibración que tiene una concentración o una actividad predeterminada de un compuesto sometido a ensayo, medir para este ajustador (o justadores) la diferencia entre el valor (o valores) de señal o de actividad estándar y el valor (o valores) de la señal medida por el instrumento o del valor (o valores) de actividad calculado a partir de la curva de precalibración y, si la diferencia medida tiene un valor aceptable,
- 15 (ii) ajustar la señal medida por el instrumento o el valor de la actividad calculada por el instrumento o ajustar los valores de la curva de precalibración de tal manera que el valor de señal medida o de la actividad calculada sobre la curva de precalibración para un solo ajustador o los dos ajustadores se vuelva a llevar a un valor de señal o de actividad idéntico al valor de señal o de actividad estándar determinado en la etapa (i) para un solo ajustador o para cada uno de los dos ajustadores,
- (iii) aplicar el mismo ajuste que el descrito en (ii) a todas las muestras cuya señal o actividad se mide con dichos reactivos precalibrados.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, donde la concentración o la actividad del compuesto de ensayo del ajustador se fija de tal manera que la proporción señal/fondo sea elevada en el ensayo en cuestión.
3. Método de ajuste según la reivindicación 1 caracterizado por que se usa un solo ajustador.
- 25 4. Método de ajuste según la reivindicación 2 caracterizado por que la diferencia medida de acuerdo con la etapa (i) es, a lo sumo, del 20 al 30%.
- 30 5. Método de ajuste según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la composición del ajustador con respecto a factores de coagulación se define en función de dicho ensayo de exploración de coagulación, conteniendo dicho ajustador al menos el compuesto estudiado en el ensayo usado, cuya concentración o actividad se ha predeterminado.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el ajustador consiste en:
- plasma liofilizado estabilizado o un grupo de plasmas liofilizados estabilizados.
  - proteínas plasmáticas purificadas o semipurificadas, constituyendo dichas proteínas el suministro de factores necesarios para realizar la reacción producida en el ámbito del ensayo realizado y que adicionalmente comprenden el compuesto estudiado, cuya concentración o actividad está predeterminada.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el ensayo de exploración de coagulación sanguínea es un ensayo de tipo análisis inmunológico en fase sólida dispersa.
- 45 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el ensayo de exploración funcional es un ensayo de análisis de Dímeros-D.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el ensayo de exploración de coagulación es un ensayo TCA, TP, TT o cualquier otro ensayo enzimológico clásico.
- 50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el ajustador no se utiliza para preparar la curva de precalibración.
11. El uso del método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para corregir:
- la influencia de los cambios de los reactivos, particularmente reactivos líquidos, utilizados en un aparato automático para realizar un ensayo de diagnóstico de biología médica, particularmente debido a la vida útil de dichos reactivos, o
  - la influencia del instrumento utilizado para un ensayo de diagnóstico de biología médica.
- 55
- 60 12. El uso de un ajustador de calibración en un método para ajustar la señal medida o una actividad calculada o una curva de calibración predefinida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en un ensayo de exploración de coagulación sanguínea, caracterizado por que el ajustador se selecciona entre:

- un plasma liofilizado estabilizado o de un grupo de plasmas liofilizados estabilizados, cuya concentración o actividad de un compuesto sometido a ensayo en un ensayo de exploración de coagulación sanguínea se predetermina, o
- 5 - proteínas plasmáticas purificadas o semipurificadas, proporcionando dichas proteínas el suministro de factores necesarios para realizar la reacción producida en el ámbito del ensayo realizado y que adicionalmente comprende el compuesto estudiado, cuya concentración o actividad está predeterminada, y
- siendo dicho ajustador de tal manera que la concentración o actividad del compuesto sometido a ensayo se seleccione en un intervalo correspondiente a una proporción señal/ruido elevada para dicho ensayo de
- 10 exploración.