

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 602**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/86** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2013 E 13156499 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2634578**

54 Título: **Procedimiento para la detección de interferencias en ensayos de diagnóstico in vitro**

30 Prioridad:

**29.02.2012 EP 12157414**

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

**26.05.2015**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS  
PRODUCTS GMBH (100.0%)  
Emil-von-Behring-Strasse 76  
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**PATZKE, JUERGEN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 536 602 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 la detección de interferencias en ensayos de diagnóstico *in vitro*

La presente invención se basa en el campo del diagnóstico *in vitro* y se refiere a un procedimiento para la detección de interferencias en una muestra.

5 Se conoce que el material de muestra humano (entre otros, plasma o suero) puede contener anticuerpos anti-inmunoglobulina contra inmunoglobulinas animales (anticuerpos heterófilos) y/o contra inmunoglobulinas humanas (factor reumatoide, RF). Estos anticuerpos contenidos en el material de muestra pueden influir negativamente en procedimientos de detección de diagnóstico *in vitro*, en particular inmunoensayos, reaccionando de manera no específica con uno o varios componentes funcionales, que se usan en el procedimiento de detección (por ejemplo anticuerpos). De esta manera se producen erróneamente resultados de ensayo demasiado altos o, con menor frecuencia, se producen erróneamente resultados de ensayo demasiado bajos.

El primer indicio de que una muestra pudiera contener anticuerpos de interferencia u otros factores perturbadores, consiste habitualmente en un resultado de ensayo inesperado, que dado el caso está en contradicción con otros hallazgos clínicos del paciente.

15 Para evitar interferencias mediante anticuerpos intrínsecos de la muestra se usan con frecuencias las denominadas sustancias de bloqueo, que neutralizarán el efecto de los anticuerpos intrínsecos de la muestra en la preparación de ensayo. Como sustancias de bloqueo se usan por ejemplo mezclas de distintas inmunoglobulinas IgG policlonales, inmunoglobulinas IgG polimerizadas, mezclas de anticuerpos monoclonales, inmunoglobulinas IgM anti-ser humano monoclonales y similares (para una visión general véase Kricka, L. J., Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin. Chem. 1999, 45(7): 942-956). Las sustancias de bloqueo pueden estar contenidas en un reactivo que se usa para llevar a cabo el procedimiento de detección. Tampoco cuando se encuentra disponible una serie de sustancias de bloqueo comercialmente disponibles, queda claro no obstante si el uso de una sustancia de bloqueo determinada garantiza la neutralización de todos los anticuerpos de interferencia posibles.

25 Una posibilidad de probar si una muestra, para la que se midió un resultado de ensayo inesperadamente alto en un primer procedimiento de detección, contiene sustancias de interferencia, consiste en la repetición de la medición con distintas diluciones de la muestra. Se conoce que el efecto perturbador de anticuerpos de interferencia habitualmente no disminuye linealmente al aumentar la dilución. En esto es desventajoso que deben medirse varias diluciones y que no se detectan anticuerpos de interferencia, cuyo efecto perturbador en cambio disminuye excepcionalmente de forma lineal al aumentar la dilución.

30 Otra posibilidad de probar si una muestra, para la que se midió un resultado de ensayo inesperadamente alto en un primer inmunoensayo de tipo sándwich, contiene sustancias de interferencia, consiste en usar sólo uno de los dos anticuerpos específicos de analito usados en el inmunoensayo de tipo sándwich como anticuerpo de captura y de detección (Boscato, L. M. y Stuart, M C., Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. Clin. Chem. 1986, 32(8): 1491-1495). En esto es desventajoso que debe llevarse a cabo la prueba para cada uno de los anticuerpos usados en el inmunoensayo y que para ello deben prepararse reactivos especiales.

La presente invención se basaba en el objetivo de proporcionar un procedimiento para la identificación de una muestra que contiene factores perturbadores de interferencia, que es menos costoso que los procedimientos del estado de la técnica.

40 El objetivo se resuelve por que una muestra, que en un primer procedimiento de ensayo, en el que la muestra para la detección de un analito en la muestra se pone en contacto con uno o varios componentes funcionales, proporciona un primer resultado de ensayo, en un segundo procedimiento de ensayo se somete a ensayo, diferenciándose el segundo procedimiento de ensayo del primer procedimiento de ensayo únicamente por que un componente funcional para la detección del analito en la muestra no se pone en contacto con la muestra.

45 Si en el segundo procedimiento de ensayo se obtiene un resultado de ensayo cuantitativamente significativo, esto indica la existencia de un factor perturbador, que interfiere con el primer procedimiento de ensayo.

La omisión de un componente funcional de un sistema de ensayo provoca normalmente que no tenga lugar la reacción necesaria para la generación de señales entre analito y componente(s) de unión. No obstante, si se produce una reacción, que genera una señal medible, ésta ha de valorarse como no específica e indica la existencia de factores perturbadores intrínsecos de la muestra. Por lo tanto, ha de cuestionarse el verdadero resultado de ensayo de la muestra, y el analito que va a someterse a ensayo ha de examinarse preferentemente con ayuda de un procedimiento alternativo.

- 5 Por la expresión “factores perturbadores de interferencia” se entienden todos los factores intrínsecos de la muestra que perturban la detección cualitativa o cuantitativa de un analito en una muestra, interaccionando con uno o varios componentes del sistema de detección, mediante lo cual se miden erróneamente resultados demasiado altos. Ejemplos de tales factores perturbadores son anticuerpos anti-inmunoglobulina contra inmunoglobulinas animales (anticuerpos heterófilos), en particular anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), y anticuerpos contra inmunoglobulinas humanas (factor reumatoide, RF).
- 10 Por un “primer procedimiento de ensayo, en el que la muestra para la detección de un analito en la muestra se pone en contacto con uno o varios componentes funcionales” ha de entenderse cada procedimiento para la detección cualitativa o cuantitativa de un analito en una muestra. En particular se entienden por ello procedimientos en los que la muestra se pone en contacto con al menos un componente de unión específico de analito y se detecta la reacción de unión. Son ejemplos en particular inmunoensayos en los que se detecta la unión antígeno-anticuerpo.
- 15 Por un “segundo procedimiento de ensayo, que se diferencia del primer procedimiento de ensayo únicamente por que un componente funcional para la detección del analito en la muestra no se pone en contacto con la muestra” ha de entenderse un procedimiento que, a excepción de un único componente funcional, presenta todos los componentes funcionales y condiciones de ensayo del primer procedimiento de ensayo.
- 20 Por un “componente funcional para la detección del analito” se entienden todos los componentes del primer procedimiento de ensayo que son indispensables para la detección específica del analito en el sistema de ensayo, tal como por ejemplo un componente de unión de unión a analito, por ejemplo un anticuerpo, o un componente de unión secundario, que une el componente de unión de unión a analito.
- 25 En una forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, en el caso del primer procedimiento de ensayo, en el que la muestra para la detección de un analito en la muestra se pone en contacto con uno o varios componentes funcionales, se trata de un ensayo de aglutinación de partículas para la determinación de la actividad de VWF. En este ensayo de actividad de VWF, se pone en contacto la muestra con proteína GPIIb $\alpha$  aislada, que en ausencia de ristocetina se une a VWF, y con micropartículas, que están recubiertas con un anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$  monoclonal, como componentes funcionales y se mide la reacción de aglutinación (documento WO 2009/007051 A2).
- 30 Para la identificación de factores perturbadores de interferencia en una muestra, que se sometió a ensayo con el ensayo de actividad de VWF descrito anteriormente, se somete a ensayo la muestra en un segundo procedimiento de ensayo, diferenciándose el segundo procedimiento de ensayo del primer procedimiento de ensayo únicamente por que no se pone en contacto ninguna proteína GPIIb $\alpha$  aislada con la muestra. Esto tiene la ventaja de que únicamente en un reactivo se prescinde de un componente funcional. Todos los demás componentes permanecen, incluso la disolución tampón, en la que se encuentra el componente funcional proteína GPIIb $\alpha$  del primer procedimiento de ensayo.
- 35 Como alternativa, la muestra puede someterse a ensayo en un segundo procedimiento de ensayo, diferenciándose el segundo procedimiento de ensayo del primer procedimiento de ensayo únicamente por que las micropartículas, que se ponen en contacto con la muestra, no están recubiertas con anticuerpos anti-GPIIb $\alpha$ .
- 40 En otra forma de realización preferida, en el caso del primer procedimiento de ensayo, en el que la muestra para la detección de un analito en la muestra se pone en contacto con uno o varios componentes funcionales, se trata de un ensayo para la determinación del factor XIII.
- 45 En un ensayo de factor XIII a modo de ejemplo se pone en contacto la muestra con trombina, iones Ca<sup>2+</sup>, un péptido que contiene glutamina y éster glicinetílico, con NADH (amida de ácido nicotínico-adenina-dinucleótido-hidruro) y con componentes de una reacción de indicador dependiente de NADH, en concreto con glutamato deshidrogenasa (GLDH) y  $\alpha$ -cetogluturato como componentes funcionales y se mide la variación de la absorción de la preparación de ensayo (documento EP-A2-336353).
- 50 Para la identificación de factores perturbadores de interferencia en una muestra, que se sometió a ensayo con el ensayo de factor XIII descrito anteriormente, se somete a ensayo la muestra en un segundo procedimiento de ensayo, diferenciándose el segundo procedimiento de ensayo del primer procedimiento de ensayo únicamente por que no se pone en contacto con la muestra ninguna trombina o ningún ión Ca<sup>2+</sup> o ningún péptido que contiene glutamina o ningún éster glicinetílico o ningún NADH o ninguna glutamato deshidrogenasa (GLDH) o ningún  $\alpha$ -cetogluturato.
- En otra forma de realización preferida, en el caso del primer procedimiento de ensayo, en el que la muestra para la detección de un analito en la muestra se pone en contacto con uno o varios componentes funcionales, se trata de un ensayo para la determinación del fragmento de protrombina F1+2.

En un ensayo de F1+2 a modo de ejemplo se detecta la muestra con un primer anticuerpo, que detecta de forma específica F1+2, y se pone en contacto con un segundo anticuerpo, que detecta el inmunocomplejo de F1+2 y el primer anticuerpo, y con un primer componente de un sistema de formación de señales (por ejemplo Chemibead), que está asociado con el segundo anticuerpo, y con un segundo componente de un sistema de formación de señales (por ejemplo Sensibead), que puede asociarse con el primer anticuerpo, como componentes funcionales y se mide la generación de quimioluminiscencia en la preparación de ensayo (documento EP-A1-2168985).

Para la identificación de factores perturbadores de interferencia en una muestra, que se sometió a ensayo con el ensayo de F1+2 descrito previamente, se somete a ensayo la muestra en un segundo procedimiento de ensayo, diferenciándose el segundo procedimiento de ensayo del primer procedimiento de ensayo únicamente por que no se pone en contacto con la muestra ningún anticuerpo primario específico de F1+2 o ningún anticuerpo secundario específico de inmunocomplejo o ningún primer o ningún segundo componente del sistema de formación de señales.

## Ejemplos

### **Ejemplo 1: Procedimiento para la identificación de factores perturbadores de interferencia en un ensayo de actividad de VWF**

En el caso del ensayo INNOVANCE® VWF Ac (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania) se trata de un ensayo para la determinación de la actividad de VWF en muestras de plasma. Para la determinación de la actividad de VWF se incubó la muestra en primer lugar con proteína GPIIb $\alpha$  aislada, que se une a VWF en ausencia de ristocetina. A continuación se añaden a la preparación de ensayo partículas de látex, que están recubiertas con un anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$  monoclonal. Las partículas de látex se aglutinan en función de la reacción de unión de la proteína GPIIb $\alpha$  al VWF de la muestra. La proteína GPIIb $\alpha$  aislada es un componente funcional esencial del procedimiento de detección. Sin adición de proteína GPIIb $\alpha$  no tiene lugar ninguna aglutinación específica de partículas.

Se sometieron a ensayo dos muestras de plasma que contenían anticuerpos humanos anti-ratón de manera de conocida (muestra 1 de HAMA y muestra 2 de HAMA). Como muestra normal sin factores de interferencia se usó un conjunto de plasma de plasmas de varios donantes normales (plasma control N, Siemens Healthcare Diagnostics). Así mismo se sometió a ensayo una dilución 1:3 de plasma control P (un conjunto de plasma diluido de plasmas de varios donantes normales, Siemens Healthcare Diagnostics).

#### **Determinación de la actividad de VWF en presencia de GPIIb $\alpha$ (ensayo INNOVANCE® VWF Ac)**

Para la determinación de la actividad de VWF en muestras con actividades de VWF en el intervalo normal (muestra 1 de HAMA y plasma control N) se mezclaron 15  $\mu$ l de muestra, 30  $\mu$ l de tampón Owren's Veronal, 70  $\mu$ l de tampón de reacción, 13  $\mu$ l de reactivo GPIIb $\alpha$  (disolución tampón que contiene proteína GPIIb $\alpha$  aislada, que se une a VWF en ausencia de ristocetina) y 40  $\mu$ l de reactivo de látex (disolución tampón que contiene partículas de látex, que están recubiertas con un anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$  monoclonal), y se determinó la aglutinación de partículas por turbidimetría. Con esta configuración de ensayo pueden determinarse actividades de VWF en el intervalo del 15-150 % del valor normal.

Para la determinación de la actividad de VWF en muestras con baja actividad de VWF (< 15 % de VWF; véase muestra 2 de HAMA y plasma control P diluido en la Tabla 1) se mezclaron 60  $\mu$ l de muestra, 70  $\mu$ l de tampón de reacción, 13  $\mu$ l de reactivo de GPIIb $\alpha$  y 40  $\mu$ l de reactivo de látex. Con esta configuración de ensayo pueden determinarse actividades de VWF en el intervalo del 4-20 % del valor normal.

#### **Determinación de reacciones no específicas en ausencia de GPIIb $\alpha$**

Para la determinación de reacciones no específicas en muestra 1 de HAMA y en la muestra normal (plasma control N) se mezclaron 15  $\mu$ l de muestra, 30  $\mu$ l de tampón Owren's Veronal, 70  $\mu$ l de tampón de reacción, 13  $\mu$ l de disolución tampón (sin proteína GPIIb $\alpha$  aislada, que se une a VWF en ausencia de ristocetina) y 40  $\mu$ l de reactivo de látex (disolución tampón que contiene partículas de látex, que están recubiertas con un anticuerpo anti-GPIIb $\alpha$  monoclonal), y se determinó la aglutinación de partículas por turbidimetría.

Para la determinación de reacciones no específicas en muestras con baja actividad de VWF (< 15 % de VWF; véase muestra 2 de HAMA y plasma control P diluido) se mezclaron 60  $\mu$ l de muestra, 70  $\mu$ l de tampón de reacción, 13  $\mu$ l de reactivo de GPIIb $\alpha$  y 40  $\mu$ l de reactivo de látex.

Los resultados están representados en las Tablas 1 y 2.

50

**Tabla 1: Aglutinación de partículas [mE/min]**

Muestra	Ensayo de VWF con GPIb	Ensayo de VWF sin GPIb
Plasma control N	1244	0,2
Plasma control P	251	1,9
Muestra 1 de HAMA	1524	930
Muestra 2 de HAMA	402	124

5 La Tabla 1 muestra las tasas de aglutinación de partículas. Mientras que las muestras normales sin factores de interferencia (plasma control N y plasma control P) en el ensayo de VWF sin proteína GPIb tal como se esperaba no muestran ninguna reacción significativa, las muestras de HAMA en el ensayo de VWF sin adición de GPIb, presentan altas tasas de aglutinación de partículas, no específicas.

**Tabla 2: Actividad de VWF [% del valor normal]**

Muestra	Ensayo de VWF con GPIb	Ensayo de VWF sin GPIb	Diferencia	Ensayo de VWF alternativo
Plasma control N	93,3	< 15	n.a.	n.a.
Plasma control P	10,8	< 4	n.a.	n.a.
Muestra 1 de HAMA	117,8	71,9	45,9	29,3
Muestra 2 de HAMA	14,1	7,1	7,0	10, 6

10 La Tabla 2 muestra las actividades de VWF determinadas por medio de las tasas de aglutinación de partículas medidas. Mientras que las muestras normales sin factores de interferencia (plasma control N y plasma control P) en el ensayo de VWF sin proteína GPIb no presentan ninguna actividad de VWF medible, las muestras de HAMA en el ensayo de VWF sin adición de GPIb presentan actividades de VWF no específicas. La comparación con la actividad de VWF real de las muestras de HAMA, que se determinó con un ensayo de VWF alternativo, muestra que la actividad de VWF medida en el ensayo de VWF con adición de GPIb representa un resultado erróneamente demasiado alto.

15

Las tasas de aglutinación de partículas “sin GPIb” pueden usarse también para calcular una actividad de VWF con ayuda de la curva de calibración. En el caso de las muestras de HAMA puede determinarse el contenido en VWF correcto de las muestras restando el valor “sin GPIb” del valor de VWF “con GPIb” (véase la columna “diferencia”).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la identificación de factores perturbadores de interferencia en una muestra, que en un primer procedimiento de ensayo, en el que se pone en contacto la muestra para la detección de un analito en la muestra con uno o varios componentes funcionales para la detección del analito, proporciona un primer resultado de ensayo, **caracterizado porque** la muestra en un segundo procedimiento de ensayo se somete a ensayo, diferenciándose el segundo procedimiento de ensayo del primer procedimiento de ensayo únicamente por que un componente funcional para la detección del analito en la muestra no se pone en contacto con la muestra.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra en un primer procedimiento de ensayo para la detección de la actividad de VWF en la muestra se pone en contacto con proteína GPIIb $\alpha$  aislada y con micropartículas, que están recubiertas con anticuerpos anti-GPIIb $\alpha$  y en el que la muestra en un segundo procedimiento de ensayo se somete a ensayo, diferenciándose el segundo procedimiento de ensayo del primer procedimiento de ensayo únicamente por que proteína GPIIb $\alpha$  aislada no se pone en contacto con la muestra.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra en un primer procedimiento de ensayo para la detección del factor de von Willebrand en la muestra se pone en contacto con proteína GPIIb $\alpha$  aislada y con micropartículas, que están recubiertas con anticuerpos anti-GPIIb $\alpha$  y en el que la muestra en un segundo procedimiento de ensayo se somete a ensayo, diferenciándose el segundo procedimiento de ensayo del primer procedimiento de ensayo únicamente por que las micropartículas, que se ponen en contacto con la muestra, no están recubiertas con anticuerpos anti-GPIIb $\alpha$ .