

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 843**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/35** (2014.01)

**G01N 21/39** (2006.01)

**G01N 21/78** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2012 E 12180529 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2698627**

54 Título: **Procedimiento para la determinación óptica de al menos un analito en una muestra**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VITZTHUM, FRANK;  
HAUDE-BARTEN, ANJA y  
SCHWARZ, HERBERT**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 622 843 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 determinación óptica de al menos un analito en una muestra

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación óptica de al menos un analito en una muestra en el cual se evalúa una desviación de un valor de referencia o de la curva de referencia como indicio de que la determinación óptica del al menos un analito ha sido distorsionada por defectos de medición.

Antecedentes de la invención

10 Principalmente en el diagnóstico clínico se detectan analitos en una muestra, con frecuencia de manera óptica, con ayuda de colorantes indicadores, es decir colorantes que reaccionan con el analito que va a detectarse, por ejemplo formando un complejo y/o mediante una reacción en la cual el colorante se convierte de una forma en otra. En ambos casos, el colorante cambia sus propiedades espectrales, es decir, por ejemplo, su característica de absorción o de fluorescencia. Por lo tanto, el cambio de las propiedades espectrales puede usarse como una medida de la presencia de un analito.

15 Sin embargo, la interacción del colorante con el analito que va detectarse con frecuencia no es completamente específica. En tales casos, el colorante reacciona también con otras sustancias, o clases de sustancias, contenidas en la muestra, y en este caso también modifica sus propiedades espectrales. Además, el analito que va detectarse también puede interactuar con otras sustancias de modo que se perjudica el enlace o la reacción con el colorante.

Igualmente, una muestra puede contener sustancias que no reaccionan o interactúan con el analito o el colorante, pero sí absorben en los intervalos de longitud de onda relevantes y, por lo tanto, influyen en la reacción de detección.

20 Los materiales o sustancias que interfieren con las determinaciones también se denominan materiales de interferencia en lo sucesivo. La presencia de tales materiales de interferencia puede conducir a determinaciones erróneas del analito de modo que la concentración o la actividad del mismo en una muestra es subestimada o sobreestimada. Principalmente en el diagnóstico clínico, esto puede dar lugar a hallazgos incorrectos y, por lo tanto, a un diagnóstico incorrecto.

25 Esto es problemático, por ejemplo, en la determinación clínica de albúmina, principalmente en la orina. La determinación de albúmina en orina es uno de los parámetros más importantes y usados con más frecuencia en la química clínica. Esto aplica tanto para el laboratorio central como también para el diagnóstico en sitio (point of care o punto de cuidado). Pero las determinaciones de proteína total en la orina o en plasma también tienen relevancia clínica. Además, los procedimientos para determinar proteínas y las concentraciones de las mismas son de gran interés general. Por ejemplo, los procedimientos para la determinación de proteína durante el desarrollo y para control de procesos de purificación de proteína son esenciales, y también en la investigación fundamental la determinación del contenido de proteína en una muestra desempeña un gran papel.

30 La especificidad de la detección de analitos por medio de colorantes indicadores adecuados puede mejorarse desarrollando colorantes más específicos. De esta manera se minimizan las reacciones paralelas de los colorantes. Por ejemplo, para la detección de albúmina en la orina se usa preferiblemente verde de bromocresol o púrpura de bromocresol. Estos colorantes casi no reaccionan con otras proteínas. Esto reduce el riesgo de una determinación errónea por la presencia de otras proteínas diferentes de albúmina. A pesar del uso de colorantes más específicos, todavía se presentan, no obstante, determinaciones defectuosas debido a la influencia de materiales de interferencia.

35 Otro planteamiento para reducir eventuales defectos debido a materiales de interferencia consiste en medir simultáneamente en dos longitudes de onda diferentes. De esta manera, por ejemplo, por una parte puede seleccionarse una longitud de onda a la cual son máximos los cambios dependientes de analito de las propiedades ópticas del colorante indicador, y por otra parte puede seleccionarse una longitud de onda a la cual se realiza una medición de referencia. A manera de ejemplo, pueden interferir cromóforos como la hemoglobina y la bilirrubina, o las turbiedades provocadas por materiales de referencia. Por lo tanto, por ejemplo, se realizan mediciones comparativas en el intervalo de absorción de hemoglobina y bilirrubina a 540 nm o para determinar turbiedades en el intervalo de ondas largas, por ejemplo hace 300 o 750 nm. Si se sobrepasa un valor límite determinado, esto indica una turbidez o una influencia de un cromóforo. Si el valor límite se sobrepasa, la determinación puede clasificarse como posiblemente incorrecta.

40 Este planteamiento tampoco puede suprimir completamente defectos debido a materiales de interferencia y, además, los valores de medición distorsionados por defectos que no han sido suprimidos con frecuencia no son reconocibles para el usuario y, por lo tanto, él tiene que percibir los resultados incorrectos de medición como correctos. Además, los cromóforos, por ejemplo, pueden provocar turbidez y de esta manera distorsionar el resultado de la medición.

45 Descripción breve de la invención

Un objeto de la presente invención es reducir la cantidad de determinaciones incorrectas de los analitos. Otro objeto de la presente invención es incrementar la reproducibilidad de determinaciones ópticas de los analitos. Otro objeto de la presente invención es hacer accesibles para el análisis aquellas muestras, que están contaminadas con una probabilidad específica.

- 5 Estos objetos se logran gracias a las características del presente conjunto de reivindicaciones. Las reivindicaciones dependientes indican formas preferidas de realización. En este caso puede notarse que las especificaciones de intervalos pueden entenderse en su totalidad como inclusivas de los valores límites respectivos.

#### Descripción detallada de la invención

- 10 De acuerdo con la invención se proporciona un procedimiento para determinar ópticamente al menos un analito en una muestra; en dicho procedimiento se usa al menos un colorante indicador que cambia sus propiedades ópticas en al menos una longitud de onda de luz determinada ("longitud de onda de medición") dependiendo de la concentración de un analito determinado.

- 15 En este caso, en un paso a) se determina al menos una propiedad óptica de la muestra al menos una longitud de onda de medición, y en un paso b) se determina al menos una propiedad óptica de la muestra adicionalmente al menos otra longitud de onda de luz ("longitud de onda de referencia"). Opcionalmente puede preverse que en un paso c) se determine un valor calculado aritméticamente a partir de los dos valores de medición determinados en los pasos a) y b).

- 20 Además se prevé comparar en un paso d) el valor de medición obtenido en el paso b) por determinación de la propiedad óptica, al menos una, de la muestra para longitud de onda de referencia o, cuando se presenta, el valor aritméticamente calculado en el paso c), con un valor de referencia o una curva de referencia que haya sido determinada por medio de valores de medición ("valores de medición de calibración") los cuales hayan sido determinados durante la medición de al menos una propiedad óptica de las muestras de referencia a la longitud de onda de medición, al menos una, y a la longitud de onda de referencia, al menos una. En tal caso, las muestras de referencia contienen o contenían, igual que la muestra, al menos un colorante indicador así como concentraciones conocidas del analito.

- 25 En un paso e), una desviación mínima del valor de medición obtenido en el paso b) determinando la propiedad óptica, al menos una, a la longitud de onda de referencia, o cuando está presente, del valor calculado aritméticamente en el paso c), del valor de referencia o de la curva de referencia se evalúa como indicio de que se ha distorsionado la determinación óptica del al menos un analito por defectos de medición. En el procedimiento mencionado es importante que los pasos procedimentales denominados con los signos de referencia a) - e) no tienen que transcurrir en absoluto en la secuencia mencionada. También están comprendidos por la protección de la presente solicitud aquellos procedimientos en los cuales es intercambiable la secuencia de los pasos procedimentales.

La longitud de onda de medición se selecciona preferiblemente de tal manera que los cambios de las propiedades ópticas del colorante indicador, que dependen del analito, a la misma longitud de onda, estén en su punto máximo.

- 35 Para diferenciar entre valor de referencia y curva de referencia, adviértase que un valor de referencia puede usarse cuando se usa una longitud de onda isobéctica como longitud de onda de referencia. Una curva de referencia se requiere cuando se usa una longitud de onda no isobéctica como longitud de onda de referencia.

Fundamentalmente son concebibles dos variantes del procedimiento los cuales están enlazados por la misma idea de acuerdo con la invención. Estas variantes de la invención se definen en las reivindicaciones independientes 1 y 2.

- 40 En la variante 1 se realizan mediciones a la(s) longitud(es) de medición y de referencia. Por medio de la longitud de onda de medición resulta un valor de referencia determinado de la curva de referencia. Al usar un punto isobéctico, no se necesita una curva de referencia. El valor de medición a una longitud de onda de referencia no puede desviarse de este valor de referencia más allá de una cantidad específica, de otra manera esto es un indicio de un defecto de medición. De acuerdo con la variante 2, las mediciones se realizan a longitud(es) de onda de medición y longitud(es) de onda de referencia. A partir de los valores de medición de la(s) longitud(es) de onda de medición y de las longitudes de onda de referencia se calculan (aritméticamente) valores. De manera análoga se hace con un procedimiento de curva de calibración o de referencia. Los valores calculados de las mediciones se comparan con aquellos de la curva de referencia. Una desviación mínima del valor calculado aritméticamente, determinado, del valor de referencia se evalúa como un indicio de un defecto. De manera preferible en este caso se prevé que en la determinación óptica se determina la concentración de al menos un analito en la muestra.

El analito es de manera particularmente preferida una biomolécula, preferiblemente seleccionada del grupo que contiene proteínas, péptidos, aminoácidos, poli-, oligo- o monosacáridos, ácidos poli-, oligo- o mononucleicos, o lípidos.

- 55 Aquí se prefieren particularmente proteínas. Principalmente se prefiere la proteína albúmina la cual se usa, entre otras, para diagnosticar una proteinuria, a partir de la cual puede concluirse una insuficiencia renal. De esta manera, una

concentración de albúmina > 20 mg/l de orina indica el desarrollo inicial de una nefropatía y es un marcador temprano de daños glomerulares.

Además, preferiblemente se prevé que las propiedades ópticas del colorante indicador y/o de la muestra que van a determinarse sean la absorción y/o la extinción.

5 De manera particularmente preferida se prevé que el colorante indicador sea un colorante seleccionado del grupo que contiene

- azul brillante de Coomassie (CBB por Coomassie brilliant blue)
- DIDNTB
- HABA

10

- verde de bromocresol (BCG)
- púrpura de bromocresol (BCP)
- azul de bromofenol (BPB)
- azul de tetrabromofenol, (TBPB)
- sulfonaftaleína de pirogalol.

15 DIDNTB es bis-(3c,32-diyodo-4c42-dihidroxi-5c5'-dinitrofenil)-3,4,5,6-tetrabromosulfonftaleína (DIDNTB). HABA es ácido 2-(4c-hidroxiazobenceno) benzoico (HABA).

Otros colorantes que se toman en cuenta son difenilamina, DABA (ácido 3,5-diaminobenzoico diclorhidrato), orcinol y antibióticos de antraciclina tales como adriamicina o mitramicina

20 De modo particularmente preferido se prevé además que el defecto de medición sea causado al menos otro material de interferencia. Tal material de interferencia también reacciona con el colorante indicador el cual cambia, como consecuencia, sus propiedades espectrales, interactúa con el analito o absorbe en los intervalos de longitud de onda relevantes, e influye con esto la reacción de detección.

25 Los materiales de interferencia pueden ser clases de sustancias completamente diferentes, por ejemplo compuestos orgánicos de bajo peso molecular, detergentes, heterociclos o proteínas. A manera de ejemplos, los detergentes tales como SDS y Triton X-100, los heterociclos tales como NAD, o los compuestos orgánicos como glicina y HEPES distorsionan las determinaciones de proteína mediante azul brillante de Coomassie Brilliant Blau (CBB). El método de la determinación de albúmina por medio de púrpura de bromocresol (BCP) puede interferirse por la presencia de materiales de interferencia con bajo peso molecular tales como la toxina urémica endógena ácido 3-carboxi-4-metil-5-propil-2-furanopropanoico (CMPF). Además, los cromóforos contenidos en la muestra, tales como por ejemplo hemoglobina o sus productos de descomposición como la bilirrubina, también pueden actuar materiales de interferencia.

30

De manera particularmente preferida se prevé que la longitud de onda de referencia sea una longitud de onda isobéctica con respecto del colorante indicador.

35 Una longitud de onda isobéctica es una longitud de onda a la cual no cambian, o casi no cambian, las propiedades ópticas de un colorante indicador frente a la luz incidente dependiendo del analito específico - de manera diferente que la longitud de onda de medición, a la cual el cambio de las propiedades ópticas del colorante indicador cambia de la manera máxima posible (y de manera ideal incluso proporcionalmente) dependiendo del analito específico. A una longitud de onda isobéctica, por ejemplo en mediciones de absorción en muestras que contienen solamente diferentes concentraciones del analito específico además del colorante indicador, no se obtiene modificación de la absorción dependiente de la concentración, sino siempre una absorción más o menos constante que se orienta de manera predominante por la concentración del colorante indicador. Suponiendo una concentración dada del colorante indicador, de esta manera puede medirse un valor de referencia con el cual se compara más tarde los valores de medición obtenidos concretamente. Específicamente, si se mide una absorción que se desvía de este valor, ésta se debe a un defecto a causa de un material de interferencia.

40

45 En este caso se prevé que para determinar la cuestión de si se presenta una desviación mínima del valor medido obtenido en el paso b) mediante determinación de la propiedad óptica, al menos una, de la muestra a la longitud de onda de referencia o, si está presente, del valor calculado aritméticamente en el paso c) del valor de referencia, se verifica si

50 • el valor de medición o el valor calculado aritméticamente se encuentra por fuera de la desviación estándar sencilla o múltiple del valor de referencia del estándar de la serie de calibración y/o

• la sensibilidad y/o especificidad del valor medido o del valor calculado aritméticamente se encuentran por fuera de los valores límites dados.

Además, preferiblemente se prevé que la longitud de onda de referencia con respecto al colorante indicador sea una longitud de onda a la cual el colorante indicador no tenga un máximo de absorción ni un mínimo de absorción.

En este caso se prevé preferiblemente que la curva de referencia se haya determinado mediante

- inter- y/o extrapolación
- regresión lineal, y/o
- un polinomio de segundo orden o de un orden superior

5 de los valores de medición de calibración obtenidos de acuerdo con el paso d).

De manera particularmente preferida se prevé en este caso que para determinar la cuestión si existe una desviación mínima del valor de medición obtenido en el paso b) mediante determinación de la propiedad óptica, al menos una, de la muestra a la longitud de onda de referencia o, cuando está presente, del valor de referencia calculado aritméticamente en el paso c) del valor de referencia o de la curva de referencia, se verifica si

10 • el valor de medición o el valor calculado aritméticamente se encuentra por fuera de un intervalo de confianza dado del valor de referencia o de la curva de referencia,

• el valor de medición o el valor calculado aritméticamente se encuentran por fuera de un intervalo formado por interpolación o regresión de la desviación estándar sencilla o múltiple de los valores de medición de calibración individuales del estándar de la serie de calibración, y/o

15 • la sensibilidad y/o especificidad del valor de medición o del valor calculado aritméticamente se encuentran por fuera de valores límites dados.

En la práctica puede procederse en este caso tal como sigue: primero se prepara una curva de calibración en la cual se ha medido la absorción a la longitud de onda de referencia y la longitud de onda de medición para muestras de concentración conocida libres de materiales de interferencia. Los valores obtenidos se han puesto enfrentados en un sistema de coordenadas y, a continuación, se realiza una regresión lineal y se calculan intervalos de confianza. Las muestras obtenidas en la práctica se mezclan ahora de manera similar con el colorante indicador y se miden. Las muestras que contienen materiales de interferencia que influyen esencialmente las mediciones y conducen a defectos de medición se encuentran por fuera de los intervalos de confianza y por lo tanto pueden considerarse como erróneas. La figura 4 muestra la implementación de este método.

20 Además, las desviaciones estándar, sencilla, doble o triple, de los valores de medición de calibración pueden usarse con el fin de establecer un intervalo de referencia. Para este propósito, se miden múltiples veces los valores de medición de calibración y se determinan el valor medio y la desviación estándar. El valor correspondiente se adiciona al valor medio o se sustrae del mismo. La dependencia de los valores por encima de los valores medios y la de los valores por debajo de los valores medios de la absorción, por ejemplo, a 594 nm, o un parámetro correspondiente se describe por medio de una función, por ejemplo una regresión polinómica o una lineal. Esta función proporciona entonces las referencias superiores o inferiores o valores límite. La implementación se efectúa de manera similar a como se muestra en la figura 4, con la diferencia de que ahora se usa la desviación estándar multiplicada por n, en lugar del intervalo de confianza.

25 Otra posibilidad de establecer los valores límite consiste en establecer la sensibilidad que especificidad deseadas del procedimiento. Tal como en casi todos los procedimientos analíticos o diagnósticos, también pueden ocurrir estimaciones en el método de acuerdo con la invención. Puede ocurrir que en el caso de muestras que no contienen materiales de interferencia se concluya que hay un defecto de medición debido a material de interferencia ("falso positivo"), y/o que en caso de muestras que contienen materiales de interferencia, estos no sean reconocidos ("falsos negativos").

30 La sensibilidad de un procedimiento proporciona la información sobre cuantas muestras positivas (es decir muestras que contienen material de interferencia o muestras todavía más especiales, que contienen material de interferencia que distorsionar la determinación del propio analito más allá de una cantidad aceptable) se reconocen como tales. En este caso, la sensibilidad del método designaría la fracción de las muestras que tienen material de interferencia o defecto de medición relacionado con materiales de interferencia, la cual se reconoce correctamente entre todas las muestras medidas con material de interferencia correspondiente. Esto se expresa mediante la ecuación

35 
$$\text{Sensibilidad} = (\text{muestras detectadas con material de interferencia} / \text{cantidad total de las muestras medidas con material de interferencia}) (\%)$$

40 La especificidad de un método proporciona un parámetro de cuantos falsos positivos pueden esperarse. En este caso esto significa cuantas muestras se clasifican incorrectamente como afectadas por material de interferencia, aunque no se perjudiquen por materiales de interferencia. Esto se expresa mediante la ecuación

45 
$$\text{Especificidad} = (\text{muestras en las que no ha sido detectado un material de interferencia} / \text{cantidad total de las muestras medidas sin material de interferencia}) (\%)$$

La sensibilidad y la especificidad del método pueden establecerse seleccionando valores límite. Éstos pueden adaptarse dependiendo de los requisitos para la sensibilidad y especificidad y a partir de valores experimentales de

los materiales de interferencia que pueden esperarse en un colectivo de muestras. Por ejemplo, los valores de medición de calibración para muestras de diferente concentración, que no están contaminadas con material de interferencia, pueden generarse y compararse con valores de medición de calibración para muestras que contienen materiales de interferencia. Los valores límite para la especificidad y sensibilidad se establecen luego de tal manera que se vuelve posible una discriminación limpia entre muestras distorsionadas y no distorsionadas.

Además se prevé preferiblemente que la determinación óptica del analito, al menos uno, y/o la medición de las propiedades ópticas de la muestra de referencia se realice en un recipiente seleccionado del grupo que incluye cubeta, placas de microtitulación, tubo de ensayo, portaobjetos, chip de detección, etc.

### Ejemplos de realización

Para los estudios fueron usados los siguientes materiales de las compañías indicadas. Albúmina de suero bovino (BSA; A7030-50G; lote 124K0597) y nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD), número de producto 43410; lote 42606158) eran de Sigma (Taufkirchen, Alemania). Hepes (número de catálogo 441475K; lote K35477084 647) era de BDH Chemical (Poole, Reino Unido). Triton X 100 (número de catálogo 1.08603.1000), glicina (número de catálogo 1.04201.1000; lote K34245201515)) eran de Merck (Darmstadt, Alemania). El concentrado del reactivo CBB (ensayo de proteínas; concentrado de tinte reactivo) (Cat. No. 500-0006; lote no 105341) era de Bio-Rad (Múnich, Alemania). PS microplacas de 96 pozos (catálogo No. 655 101; lote 03 26 01 03; F-Form) eran de Greiner Bio-one (Frickenhausen, Alemania). Se usó el espectrofotómetro Spectra Max Plus de Molecular Devices. Se realizaron experimentos tal como se describen a continuación:

Se preparó una solución madre acuosa con una concentración de 100 µg/ml. Se prepararon calibradores de BSA de 100, 80, 60, 40, 20 y 10 µg/ml por medio de diluciones correspondientes con agua. El calibrador sin BSA era agua. Se preparó solución de CBB mediante una dilución 1:4 del concentrado de CBB con agua. Se cargaron inicialmente 60 µl de muestra a un pozo de un MTP y a continuación se adicionaron 240 µl de solución de CBB. Después de aproximadamente 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se realizaron determinaciones espectrofotométricas. Por lo regular los espectros se registraron entre 400 - 650 nm en pasos de 2 µm. En una variante especial de la solución de CBB se encuentra Triton X-100. Este reactivo es para incrementar la sensibilidad de determinaciones de proteína y ha sido preparado mezclando solución de CBB con Triton X-100 de tal manera que la concentración de Triton X-100 fue de 0,008 % (v/v).

Cantidades correspondientes de sustancias de interferencia fueron adicionadas a la BSA o al agua cargadas previamente en la cavidad y a continuación fueron mezcladas con solución de CBB. Por medio de la figura 1 se hace claro que los máximos de absorción o los hombros de absorción de la fórmula protonizada doblemente y de la forma desprotonizada una vez se encuentran a aproximadamente 650, 470, 310 y 270 nm. Los puntos isobéuticos en la transición de la forma doblemente protonizada a la forma desprotonizada una vez se encuentran a aproximadamente 550 y 340 nm. En caso de incrementarse adicionalmente el valor de pH, ocurre un desplazamiento hipsocrómico, es decir un desplazamiento hacia el rango de ondas cortas debido a la transición desde la forma desprotonizada una vez a la forma desprotonizada dos veces. Este anión de CBB tiene máximos de absorción a aproximadamente 580, 400 y 265 nm. Además, el hombro de absorción gana intensidad a aproximadamente 310 nm con el fin de formar finalmente una banda de absorción separada que tiene un máximo en este intervalo de longitud de onda.

Los puntos isobéuticos en la transición de la forma desprotonizada una vez a la forma desprotonizada se encuentran en aproximadamente 530 y 330 nm. Esta transición es decisiva en el enlace del colorante en a la proteína en el caso de usar solución reguladora típica de pH con un valor de pH de aproximadamente 0,77.

#### 1. Determinación de proteína con CBB

La determinación de la concentración de proteína se realiza por medio de una calibración, por ejemplo por medio de una línea recta de calibración. Los valores de absorción de los calibradores con concentraciones conocidas de BSA se usan para la determinación de la concentración de BSA o de proteína en muestras desconocidas. En la determinación de proteína por medio de CBB por lo regular se usa la absorción a 595 nm o el cociente de las absorciones a 595 y 470 nm ("proporción inicial").

La tabla 1 muestra la recuperación de una concentración predefinida de BSA de 40 µg/ml o de una muestra sin BSA por medio de la determinación de absorción a 595 nm o el cálculo de cociente a 595 nm y 470 nm en ausencia o presencia de diferentes sustancias de diferente concentración. En los experimentos se empleó CBB estándar. Es claro que sustancias de interferencia como glicina, Hepes, SDS, Triton X-100 o NAD, se recupera bien la concentración de BSA de una muestra con una concentración predefinida de BSA de 40 µg/ml o la de una muestra sin BSA. Sin embargo, la presencia de sustancias de interferencia da lugar a determinaciones incorrectas gruesas.

ES 2 622 843 T3

Tabla 1

	VM abs 595 / 470 nm	BSA calculado Conc. [µg/ml]	BSA "de ref." [µg/ml]	VM abs. 595 nm	BSA calculado Conc. [µg/ml]	BSA "de ref." [µg/ml]
sin glicina	1,29	38,72	40	0,84	44,60	40
glicina de 0,1 M	1,72	61,23	40	1,08	75,68	40
glicina de 0,2 M	4,08	182,24	40	1,34	109,14	40
glicina de 0,4 M	12,23	600,01	40	1,17	87,56	40
sin glicina	0,55	1,19	0	0,45	-5,31	0
glicina de 0,1 M	0,83	15,58	0	0,67	22,75	0
glicina de 0,2 M	3,32	143,31	0	1,32	107,53	0
glicina de 0,4 M	14,03	692,08	0	1,35	111,27	0
sin Hepes	1,27	37,89	40	0,83	43,79	40
Hepes de 0,1 M	2,64	108,40	40	0,97	62,03	40
Hepes de 0,15 M	3,91	173,12	40	1,05	72,58	40
Hepes de 0,2 M	6,21	291,52	40	1,10	79,09	40
sin Hepes	0,55	0,90	0	0,46	-5,04	0
Hepes de 0,1 M	1,50	49,81	0	0,74	31,87	0
Hepes de 0,15 M	3,19	136,27	0	1,05	71,88	0
Hepes de 0,2 M	5,97	278,92	0	1,25	97,60	0
sin SDS	1,30	39,58	40	0,83	43,60	40
0,1 % SDS	1,30	39,31	40	0,60	13,06	40
0,2 % SDS	1,33	41,02	40	0,52	3,55	40
0,4 % SDS	1,42	45,72	40	0,37	-15,58	40
sin SDS	0,60	3,38	0	0,46	-3,99	0

## ES 2 622 843 T3

	VM abs 595 / 470 nm	BSA calculado Conc. [µg/ml]	BSA "de ref." [µg /ml]	VM abs. 595 nm	BSA calculado Conc. [µg/ml]	BSA "de ref." [µg/ml]
0,1 % SDS	1,24	36,31	0	0,72	29,15	0
0,2 %SDS	1,33	41,08	0	0,52	3,34	0
0,4 % SDS	1,42	45,56	0	0,37	-16,56	0
sin Triton	1,07	44,596	40	1,0014	54,976	40
0,05 % Triton	3,15	195,637	40	1,831	153,738	40
0,1 % Triton	9,19	633,231	40	2,6298	248,833	40
0,5% Triton	20,72	1468,769	40	2,5447	238,702	40
sin Triton	0,43	-1,517	0	0,4622	-9,214	0
0,05 % Triton	0,50	3,497	0	0,545	0,643	0
0,1 % Triton	7,15	485,114	0	2,5668	241,333	0
0,5% Triton	15,73	1106,703	0	2,5177	235,488	0
sin NAD	1,051	43,326	40	0,9444	48,190	40
NAD de 0,055 µM	1,159	51,115	40	0,8857	41,202	40
NAD de 0,278 µM	1,553	79,708	40	0,9301	46,488	40
NAD de 0,55 µM	2,380	139,622	40	0,8773	40,202	40
sin NAD	0,462	0,627	0	0,522	-2,095	0
NAD de 0,055 µM	2,759	167,097	0	1,6801	135,774	0
NAD de 0,278 µM	0,547	6,758	0	0,4232	-13,857	0
NAD de 0,55 µM	0,752	21,680	0	0,4162	-14,690	0

### 2. Determinación de proteína con CBB en combinación con Triton X-100

En una variante específica de la determinación de proteína por medio de CBB se adiciona Triton X-100 al reactivo. Esto es para incrementar la sensibilidad de la determinación. La tabla 2 muestra la recuperación de una concentración predefinida de BSA de 40 µg/ml o de una muestra sin BSA por medio de determinación de absorción a 595 nm o cálculo de cociente a 595 y 470 nm en ausencia o presencia de diferentes sustancias de diferente concentración. En los experimentos fue empleado CBB con una concentración de Triton X 100 de 0,008%. Es claro que sin otras sustancias de interferencia, se recupera bien la concentración de BSA de una muestra con una concentración predefinida de PSA de 40 µg/ml o la de una muestra sin BSA. Aunque Triton X-100 está presente en el reactivo, la

presencia de más cantidades de Triton X-100 en la muestra puede dar lugar nuevamente a determinaciones incorrectas gruesas.

Tabla 2

	VM abs. 595 / 470 nm	BSA calculado Conc. [µg/ml]	BSA "de ref." [µg/ml]	VM abs. 595 nm	BSA calculado Conc. [µg/ml]	BSA "de ref." [µg/ml]
sin Triton	0,98	35,82	40	0,85	40,65	40
0,02 % Triton	6,56	393,92	40	2,45	129,92	40
0,05 % Triton	12,62	782,32	40	2,94	161,54	40
0,1 % Triton	16,55	1034,08	40	3,02	166,93	40
sin Triton	0,46	2,50	0	0,49	4,45	0
0,02 % Triton	5,85	348,21	0	2,40	127,10	0
0,05 % Triton	12,46	771,82	0	2,90	159,24	0
0,1 % Triton	14,06	874,68	0	2,88	158,04	0

5 Fundamentalmente, las muestras que tienen valores de absorción particularmente altos ya son notables per se. En el caso de muestras que exceden una absorción de X, generalmente se realiza una dilución y se realiza una vez más una medición puesto que la conducta de absorción por encima de este umbral ya no se comporta linealmente en relación con la concentración del indicador respectivo.

10 Sin embargo, los defectos de medición causado por materiales de interferencia pueden detectarse generalmente sólo si el valor de absorción de los mismos se encuentra afuera del intervalo de valores que había sido establecido mediante calibración previa usando muestras de contenido conocido, en cuyo caso estos valores de calibración tienen que reflejar las concentraciones máximas o mínimas que se esperan del analito.

#### Dibujos

Fig. 1: dependencia del espectro de Coomassie azul brillante (CBB) del valor de pH del medio.

15 Las determinaciones de proteína o de albúmina usando CBB por lo regular se realizan a una longitud de onda de aproximadamente 595 nm. La diferencia de la absorción entre dos formas de CBB, la forma libre y la forma enlazada con proteína es la más grande aquí. Se describe que el colorante se enlaza a las proteínas por medio de interacciones de van-der-Waals e interacciones hidrófugas y principalmente por medio de interacciones con aminoácidos básicos como arginina, lisina e histidina. La cantidad de moléculas de colorante debe correlacionarse con la cantidad de cargas positivas de las proteínas. Los aminoácidos libres, los péptidos y las proteínas de bajo peso molecular, de menos de 3000 g por mol, generalmente no reaccionan con CBB.

20 A excepción de otras influencias en las propiedades espectrales en el caso de enlace de los colorantes a las proteínas, se supone que el cambio de las propiedades espectrales está acompañado principalmente por una reacción que es mediada por proteínas. Debido a la interacción con proteínas ocurre un cambio del equilibrio protolítico de los colorantes. Esta reacción ácido-base dependiente de la proteína está acompañada por un cambio ostensible de propiedades espectrofotométricas de CBB.

30 CBB se encuentra presente en el medio acuoso fuertemente ácido como catión doblemente protonizado ( $AH_2^+$ ). En el caso de CBB, puede ocurrir, por lo tanto, una desprotonación de dos etapas. Los valores de pK de estas reacciones se encuentran uno junto a otro. En este caso en dos pasos se desprotoniza CBB de un catión ( $AH_2^+$ ) rojo (470 nm) cargado positivamente una vez a pH 0,3 por medio de una sustancia neutra verde (650 nm) (AH) a un anión ( $A^-$ ) azul (595 nm) que tiene una carga negativa simple a pH 1,3.

Las mediciones se efectuaron con un espectrofotómetro usando cubetas de cuarzo. Se titularon paso a paso 3 ml de una solución de azul brillante de Coomassie con un valor de pH de 0,76 adicionando 150 a 300 µl de hidróxido de sodio de 1N hasta un valor de pH de 1,55. La temperatura se incrementó de 21 a 31 °C en este caso. La muestra se diluyó en aproximadamente 40%. Además, se acidificaron paso a paso 3 ml de una solución de azul brillante de Coomassie con un valor de pH de 0,76 adicionando 150 a 200 µl de solución de ácido clorhídrico de 10 N hasta un valor de pH de 0,18. La temperatura se incrementó en este caso de 21 a 29 °C la muestra se diluyó en aproximadamente 23%. Las mediciones se efectuaron aproximadamente 10 minutos después de adicionar la solución de hidróxido de sodio o la solución de ácido clorhídrico. La influencia del cambio de temperatura puede despreciarse. Puede verse bien que la reacción de indicador tiene puntos isobésticos o un intervalo isobéstico en el intervalo de aproximadamente 340 nm y en el intervalo de 520 - 520 nm. Como longitudes de onda de medición se usan en términos generales 594 nm y/o 470 nm. Con frecuencia se mide también a ambas longitudes de onda de modo simultáneo o sucesivo y se forma un cociente de ambos valores de medición ("proporción inicial"). En un ejemplo de realización, como longitud de onda de referencia se usa 540 nm. Esta longitud de onda es apropiada principalmente puesto que los aparatos habituales en este ramo con frecuencia usan filtros que permiten mediciones a la longitud de onda de 540 nm.

Fig. 2: recuperación de muestras con 0 y 40 mg/L de BSA por medio de determinación de absorción a 595 nm en ausencia o presencia de glicina.

Primero se preparó una curva de calibración usando concentraciones conocidas de BSA (reactivo de CBB, 595 nm). Esto da lugar a que la proporción entre la absorción a 595 nm y la concentración de BSA no sea completamente lineal. Los valores de referencia (sin glicina) para 0 mg/l y 40 mg/l de BSA están marcados con rectángulos. Adicionando glicina de 0,1 M (triángulo), de 0,2 M (estrella) y de 0,4 M (diamante) se incrementan los valores de absorción tanto en la muestra sin BSA como también en la muestra con BSA. La presencia de glicina de 0,1 conduce ya a una fuerte desviación del valor de referencia a 0 y 40 mg/l de BSA. Para el caso en el cual los valores de medición concretos están ostensiblemente por fuera del intervalo de absorción a esperarse con base en la curva de calibración, puede deducirse un defecto de medición por materiales de interferencia. Para el caso en que los valores de medición concretos no se encuentren ostensiblemente por fuera del intervalo de absorción a esperarse con base en la curva de calibración, no se nota un defecto de medición por materiales de interferencia.

Fig. 3: recuperación de muestras con 0 y 40 mg/L de BSA mediante determinación doble a 595 nm y 470 nm (longitudes de onda de medición) en ausencia o presencia de glicina.

Fig. 3 muestra resultados similares que en la Fig. 2. Los valores de referencia (sin glicina) están marcados con triángulos. Adicionando glicina de 0,1 M (triángulo), de 0,2 M (estrella) y de 0,4 M (diamante) se incrementa el cociente  $\text{abs}[595/470]$  de manera creciente tanto de la muestra sin BSA, como también en la muestra con BSA. Incluso la presencia de glicina de 0,1 conduce a una fuerte desviación del valor de referencia en 0 y 40 mg/l de BSA. En contraste con la Fig. 2, en la Fig. 3 se realizaron determinaciones dobles a 595 nm y 470 nm tanto para la calibración como también para las mediciones concretas y se expresaron como el cociente  $\text{abs}[595/470]$ . En tal caso, en contraste con la determinación sólo a 595 nm, resulta una proporción lineal entre los cocientes y la concentración de BSA.

Las Figs. 2 y 3 dejan claro que el hecho que un valor de medición concreto se encuentre dentro del intervalo de absorción que debe esperarse con base en una curva de calibración no ofrece una posibilidad de excluir mediciones erróneas. Si de acuerdo con la invención, no obstante, se realiza adicionalmente una medición a al menos una longitud de onda de referencia (véase más abajo), pueden excluirse mejor las mediciones erróneas.

Fig. 4: relación entre absorción a 440 nm (longitud de onda de referencia) y absorción a 594 nm (longitud de onda de medición) que se usa para la determinación de la concentración de BSA) y la influencia del material de interferencia glicina.

En la Fig. 4 se preparó primero una curva de calibración a la cual se había medido la absorción a 440 nm (longitud de onda de referencia) y 594 nm (longitud de onda de medición) para muestras de concentración conocida (CBB + 0, 10, 20, 30, 60, 80 y 100 mg/ml de BSA), libres de material de interferencia. Los valores fueron calibrados enfrentados y a continuación se realizó un ajuste de curva lineal y se calculó el intervalo de confianza. A continuación, se midieron de manera dirigida muestras contaminadas de manera similar a 440 nm (longitud de onda de referencia) y 594 nm (Longitud de onda de medición). Las muestras que contienen material de interferencia (glicina de 0,1M) (círculo) se encuentran por fuera de un intervalo de confianza y de esta manera se identifican correctamente como erróneas.

El intervalo de confianza es el intervalo de confianza al 95% o el intervalo de predicción al 95% en el cual había sido determinado por medio de una regresión lineal ( $y = -0,37x + 1,12$ ;  $R = -,99687$ ).

El intervalo de predicción superior al 95% puede describirse mediante un polinomio de segundo orden ( $Y = A + B_1x + B_2x^2$ ) con la ecuación  $y = 1,15664 - 0,40253x + 0,01693x^2$ . El intervalo inferior de predicción al 95% puede escribirse mediante un polinomio de segundo orden con la ecuación  $y = 1,08494 - 0,34598x + 0,01693x^2$ .

Para efectos de simpleza, en este caso el intervalo superior de predicción al 95% puede describirse aproximadamente bien mediante una regresión lineal ( $Y = A + B \cdot X$ ) con la ecuación  $y = -0,3729x + 1,145$ . Para el intervalo inferior de

predicción al 95%, una regresión lineal proporciona la ecuación  $y = -0,3756 x + 1,096$ . Los coeficientes de correlación R de ambas regresiones lineales son de -0,99993.

5 Es decisivo que los valores que se encuentran por encima o por debajo de los intervalos de referencia correspondientes indiquen determinaciones erróneas. Esto se muestra claramente en la realización descrita manera de ejemplo con las muestras que tienen factor de interferencia (por ejemplo, glicina de 0,1 M). Se reconocen las determinaciones erróneas de 22,75 o 75,68  $\mu\text{g/mL}$  de BSA en lugar de 0 y 40  $\mu\text{g/ml}$  de BSA (véase tabla 1).

Si se selecciona el intervalo de referencia antes mencionado, por ejemplo con una absorción de 0,72 a 594 nm de la muestra sin BSA y glicina de 0,1 M, con el algoritmo de referencia con base en la regresión lineal, la absorción a 440 nm debe encontrarse entre

10 
$$y = -0,3729 * 0,72 + 1,145 = 0,877$$

y

$$y = -0,3756 * 0,72 + 1,096 = 0,826$$

Sin embargo, este no es el caso con un valor de absorción a 440 nm de 0,7.

15 También es concebible que se usen otros algoritmos. Por ejemplo, las desviaciones estándar sencillas, dobles o triples de los calibradores individuales del estándar de la serie de calibración pueden usarse para establecer un intervalo de referencia. El valor correspondiente se adiciona al valor medio o se sustrae del mismo. La dependencia de la absorción, por ejemplo 594 nm, o de un parámetro correspondiente de los valores por encima de los valores medios y de los valores por debajo de los valores medios, se describe por medio de una función, por ejemplo una regresión polinómica o una lineal. Esta función proporciona luego las referencias superiores y las referencias inferiores o los valores límite.

20 Fig. 4: relación entre absorción a 440 nm (longitud de onda de referencia) y cociente abs [595/470] (proporción inicial de dos longitudes de onda de medición) en ausencia o presencia del material de interferencia glicina.

Fig. 5 muestra resultados similares a los de la Fig. 4, aunque para la preparación de la curva de calibración aquí, la absorción a 440 nm (longitud de onda de referencia) fue graficada frente al cociente abs [595/470] (proporción inicial de dos longitudes de onda de medición). Las muestras que contienen material de interferencia (glicina de 0,1 M) (círculo, también se encuentran por fuera de los intervalos de confianza y de esta manera se identifican correctamente como erróneas.

Fig. 6: dependencia de la absorción a una longitud de onda isobéptica de 530 nm de la concentración de BSA e influencia de diferentes concentraciones de Triton X-100

30 Las concentraciones de Triton X-100 fueron de 0 % ( $\blacktriangle$ ), 0,02 % (\*), 0,05 % (O) y 0,1 % ( $\diamond$ ). Se usó azul brillante de Coomassie (CBB) que contenía 0,008 % de Triton X-100. No se encontró Triton X-100 en las muestras cuyos resultados de medición se representan con triángulos. Las barras de error ilustran la desviación estándar simple de una determinación triple. Se realizó una regresión lineal y se determinó un intervalo de predicción de 95%. Esto significa que el 95% de los valores a esperarse se encuentran dentro de este intervalo de predicción. 530 nm, tal como puede reconocerse en la Fig. 1, es una longitud de onda isobéptica para azul brillante de Coomassie (CBB), es decir una longitud de onda a la cual la absorción de CBB frente a la luz incidente no cambia dependiendo de la proteína enlazada. Es decir que de manera diferente que a 440 nm, por ejemplo, a 530 nm en muestras que además de CBB contienen solamente diferentes concentraciones de BSA, no se obtiene un cambio de absorción dependiente de concentración, sino siempre una absorción más o menos constante que está orientada de manera predominante a la concentración del colorante indicador CBB y en el presente ejemplo se encuentra a aproximadamente 0,675. Las muestras que están contaminadas con materiales de interferencia, tales como Triton X-100, tienen, a igual concentración de CBB, una desviación de este valor, que en el presente caso se encuentran por encima de la desviación mínima determinada por el intervalo de predicción de 95% y por lo tanto se evalúa como indicio de que la determinación óptica está distorsionada por defectos de medición.

45 La enseñanza de la invención puede implementarse entonces de tal manera, tal como puede reconocerse en lo expresado previamente, tanto

a) con un valor de referencia (específicamente cuando éste fue medido a una concentración dada del colorante indicador a una longitud de onda isobéptica), como también

b) con una curva de referencia (específicamente cuando ésta fue medida a una concentración dada de colorante indicador a una longitud de onda no isobéptica).

50 La elección de si la medición se realiza a una longitud de onda isobéptica o una longitud de onda no isobéptica depende, entre otras cosas, de las longitudes de onda de medición disponibles en el respectivo dispositivo de medición.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la determinación óptica de al menos un analito en una muestra, y en el dicho procedimiento se usa al menos un colorante indicador el cual cambia al menos una propiedad óptica al menos una longitud dada de onda de luz ("longitud de onda de medición") dependiendo de la concentración de un analito dado, en el cual
- 5 a) se determina al menos una propiedad óptica de la muestra a al menos una longitud de onda de medición,
- b) se determina al menos una propiedad óptica de la muestra adicionalmente al menos otra longitud de onda de luz ("longitud de onda de referencia"), y
- c) a partir de ambos valores de medición determinados en los pasos a) y b) se determina un valor aritméticamente calculado,
- 10 y
- d) el valor calculado aritméticamente en el paso c) se compara con una curva de referencia que ha sido determinada por medio de valores de medición ("valores de medición de calibración"), los cuales han sido determinados en la medición de al menos una propiedad óptica de las muestras de referencia a la longitud de onda de medición, al menos una, y a la longitud de onda de referencia, al menos una, en cuyo caso las muestras de referencia contienen al igual que la muestra al menos un colorante indicador y concentraciones conocidas del analito,
- 15 e) y se evalúa una desviación mínima del valor calculado aritméticamente en el paso c) de la curva de referencia como indicio de que la determinación óptica del analito, al menos uno, está distorsionado por defectos de medición.
2. Procedimiento para la determinación óptica de al menos un analito en una muestra, y en dicho procedimiento se usa al menos un colorante indicador que cambia al menos una propiedad óptica al menos una longitud dada de onda de luz ("longitud de onda de medición") dependiendo de la concentración de un analito dado, en el cual
- 20 a) se determina al menos una propiedad óptica de la muestra a al menos una longitud de onda de medición,
- b) se determina al menos una propiedad óptica de la muestra adicionalmente a al menos otra longitud de onda de luz ("longitud de onda de referencia"), que es una longitud de onda isosbética con respecto al colorante indicador, y
- 25 el valor de medición obtenido en el paso b) mediante determinación de la propiedad óptica, al menos una, de la muestra a la longitud de onda de referencia se compara con un valor de referencia que había sido determinada por medio de valores de medición ("valores de medición de calibración"), que habían sido determinados en la medición de al menos una propiedad óptica de las muestras de referencia a la longitud de onda de medición, al menos una, y a la longitud de onda de referencia, al menos una, en cuyo caso las muestras de referencia contienen, igualmente que la muestra, al menos un colorante indicador así como concentraciones conocidas del analito,
- 30 y una desviación mínima del valor de medición, obtenido en el paso b) mediante determinación de la propiedad óptica, al menos una, de la muestra a la longitud de onda de referencia, del valor de referencia se evalúa como indicio de que la determinación óptica del analito, al menos uno, se ha distorsionado por defectos de medición.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 y 2, en el cual durante la determinación óptica se determina la concentración de al menos un analito en la muestra.
- 35 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el cual el analito es al menos una biomolécula preferiblemente seleccionada del grupo que contiene proteínas, péptidos, aminoácidos, poli-, oligo- o mono sacáridos, ácidos poli-, oligo- o mononucleicos, o lípidos.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el cual las propiedades ópticas que van a determinarse para el colorante indicador y/o la muestra son absorción y/o extinción.
- 40 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el cual el colorante indicador es un colorante seleccionado del grupo que contiene
- azul brillante de Coomassie (CBB)
  - DIDNTB
  - HABA
- 45 • verde de bromocresol (BCG)
- púrpura de bromocresol (BCP)
  - azul de bromofenol (BPB)
  - azul de tetrabromofenol (TBPB), y/o
  - sulfoneftaleína de pirogalol.
- 50 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el cual el defecto de medición es causado por al menos un material de interferencia.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la longitud de onda de referencia con respecto al colorante indicador es una longitud de onda a la cual el colorante indicador no es un máximo de absorción ni un mínimo de absorción.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la curva de referencia había sido obtenida mediante

- 5
- inter- y/o extrapolación
  - regresión lineal, y/o
  - ajuste de curva por medio de un polinomio de segundo orden o de orden superior

de los valores de medición de calibración obtenidos de acuerdo con el paso d).

- 10
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el cual la determinación óptica del analito, al menos uno, y/o la medición de las propiedades ópticas de la muestra de referencia se realizan en un recipiente seleccionado del grupo que contiene cubeta, placa de microtitulación, tubo de ensayo, portaobjetos y chip de detección.

FIG 1

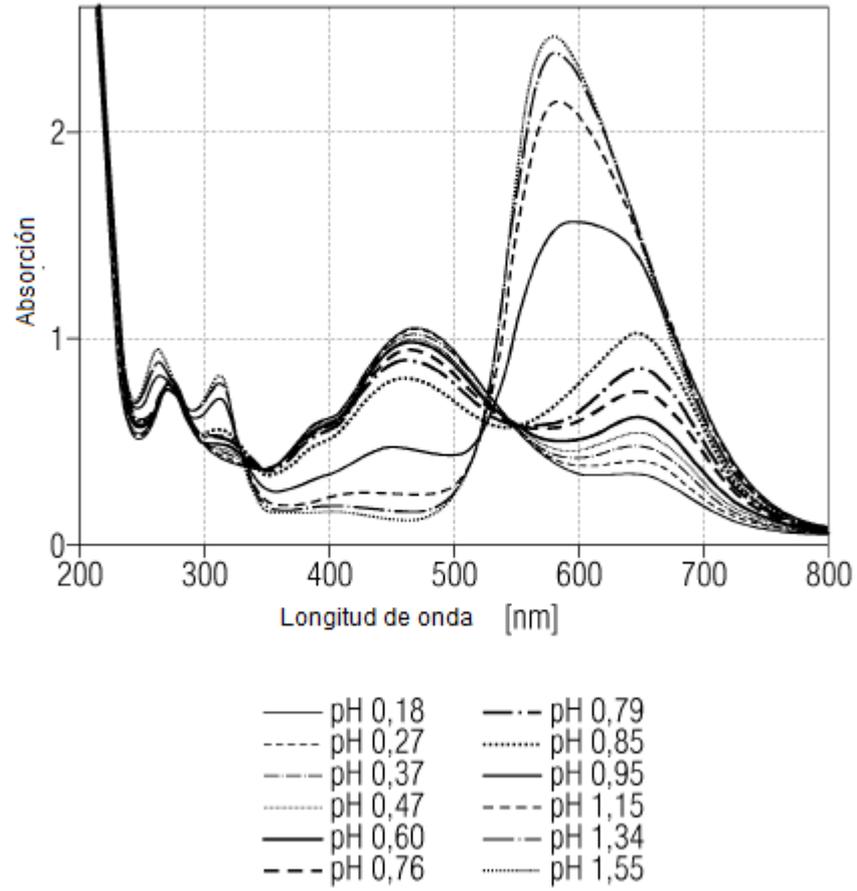


FIG 2

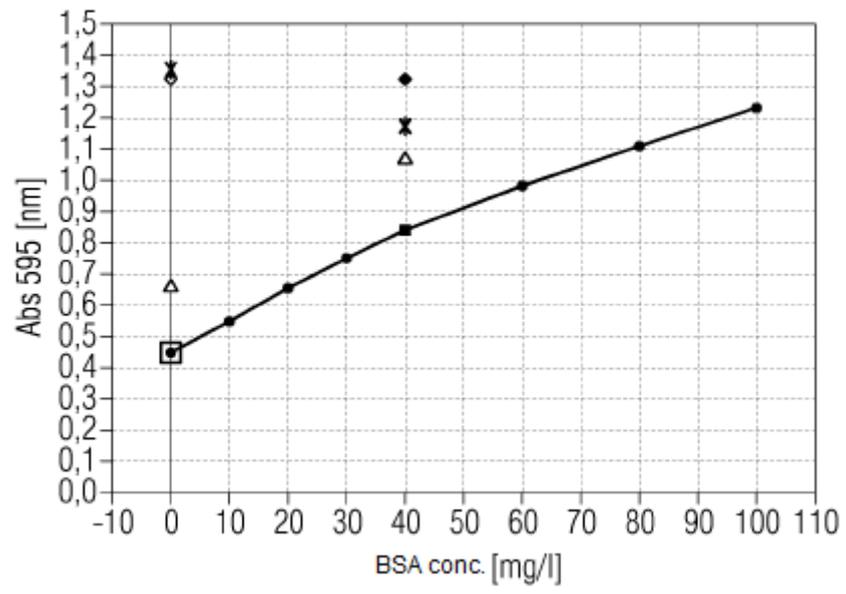


FIG 3

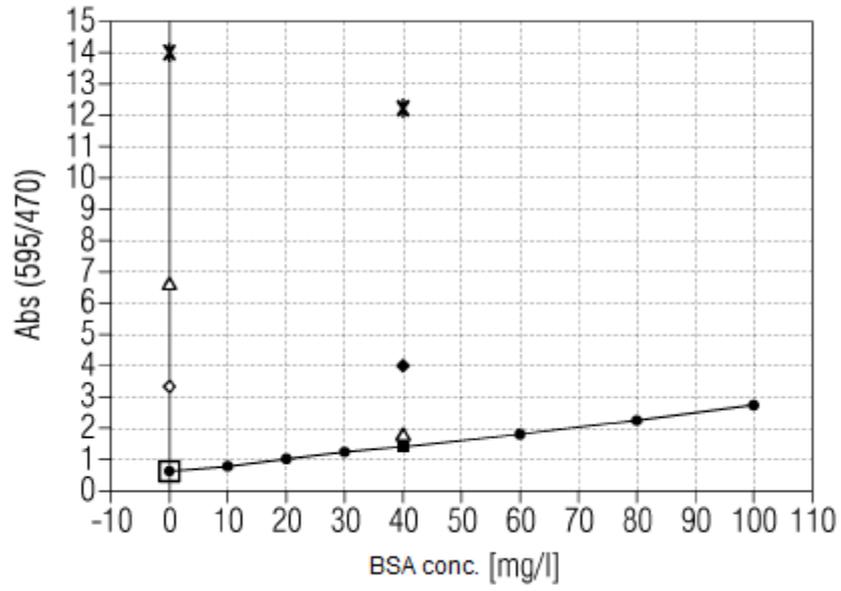


FIG 4

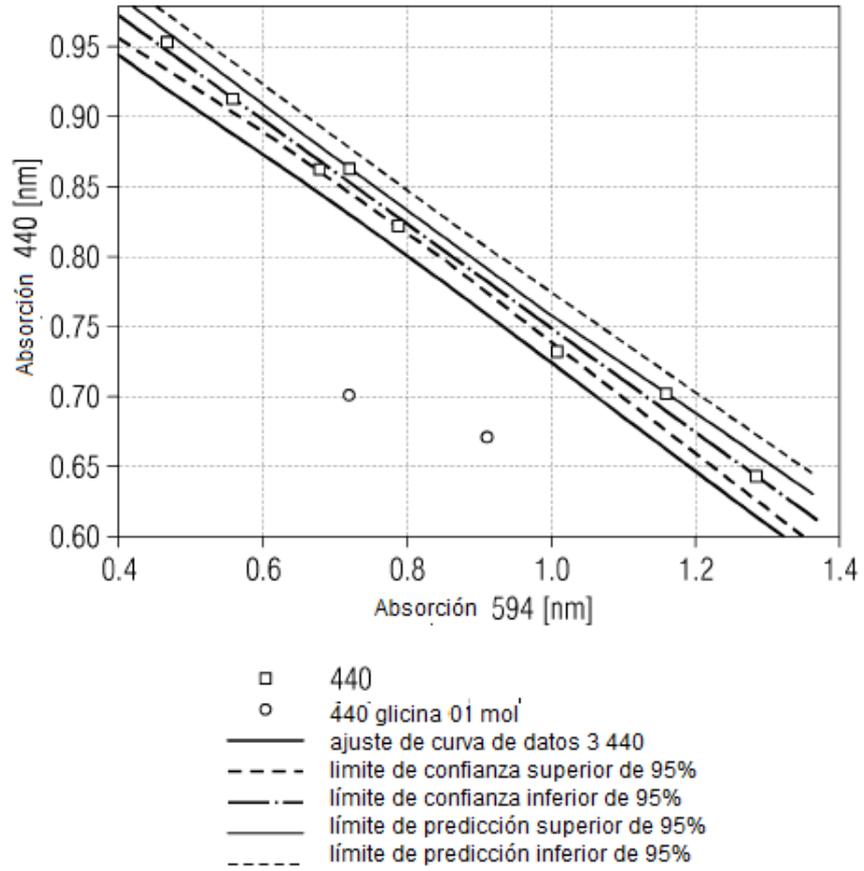
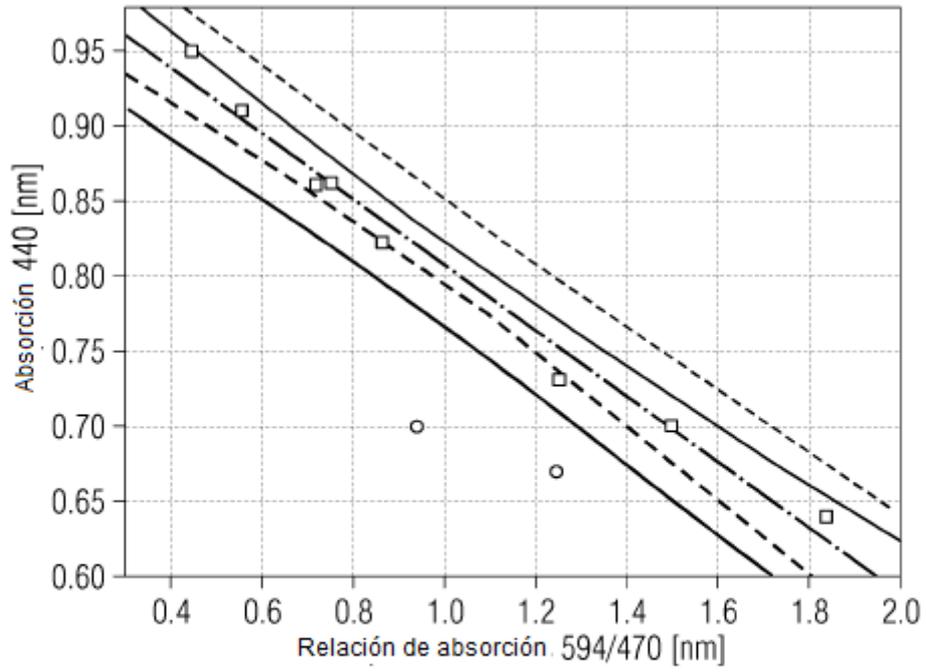


FIG 5



- 440
- 440 glicina 01 mol
- ajuste de curva de datos 6 440
- - - límite de confianza superior de 95%
- · - límite de confianza inferior de 95%
- límite de predicción superior de 95%
- - - límite de predicción inferior de 95%

FIG 6

