

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 925**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2014 PCT/EP2014/067443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015 WO15022406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2014 E 14752616 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 3033620**

54 Título: **Procedimiento para la detección del efecto prozona de ensayos fotométricos**

30 Prioridad:

**15.08.2013 EP 13180560**

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

**10.10.2017**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HEGEL, EWELINA;  
KURZ, GEORG;  
LOPEZ-CALLE, ELOISA y  
ROEDL, JOSEF**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 636 925 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 del efecto prozona de ensayos fotométricos

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la cantidad de un analito específico en una muestra mediante inmunoensayos fotométricos, turbidimétricos o nefelométricos combinados con una decisión de si un efecto prozona está o no presente, en el que el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción después de la interacción del analito con reactivos de ensayo específicos del analito.

Los inmunoensayos homogéneos se caracterizan por un procedimiento que está libre de etapas de separación y lavado. Debido a su sencillo procedimiento en un solo paso, su rentabilidad y su rapidez, los inmunoensayos homogéneos gozan de una gran popularidad en los laboratorios clínicos y se utilizan habitualmente para el diagnóstico clínico en analizadores de química clínica altamente automatizados.

Sin embargo, los inmunoensayos homogéneos están limitados por el efecto hook o "gancho" a alta dosis, también llamado efecto prozona o efecto de exceso de antígeno, un fenómeno en el que la respuesta del ensayo a altas concentraciones de analito disminuye y da lugar a valores medidos del analito que son falsamente más bajos. Este efecto se ha observado para muchos analitos y afecta a ensayos turbidimétricos y nefelométricos, así como a otros inmunoensayos de un solo paso, y es causado por concentraciones excesivamente altas de analito que saturan los sitios de unión de los anticuerpos, evitando así la formación de complejos detectables anticuerpo-analito-anticuerpo. De esta manera, la respuesta del ensayo aumenta inicialmente al aumentar la concentración de antígeno y, a continuación, tras alcanzar un valor de concentración crítico, la respuesta del ensayo disminuye produciendo una curva en forma de campana, la llamada curva de Heidelberger. Los desarrolladores y los fabricantes de los ensayos hacen habitualmente todo lo posible por reducir el efecto gancho, por ejemplo, aumentando la cantidad de anticuerpos y reduciendo los volúmenes de muestra requeridos para el análisis. En conclusión, el efecto gancho a dosis alta es un fenómeno que es inherente a los diseños de inmunoensayos de un paso; en un formato de ensayo de dos pasos, que utiliza etapas de lavado para eliminar el exceso de antígeno, el efecto gancho a dosis alta se evita. Los efectos prozona también se pueden observar en otros ensayos de unión de un solo paso que utilizan aglutinantes no basados en anticuerpos.

La mayoría de los analizadores automatizados modernos usados en la química clínica han incorporado procedimientos para reconocer el efecto prozona en las muestras medidas. En el caso de que una muestra presente un efecto prozona, la medición de la muestra es marcada por el analizador. Para dichas mediciones marcadas, se recomienda realizar una nueva medición de la muestra después de una dilución o incluso que el analizador realice automáticamente la medición, dependiendo del ajuste del instrumento.

### 40 **Estado de la técnica**

Existen varios procedimientos para determinar si una muestra presenta un efecto prozona:

El procedimiento de dilución de muestras verifica la existencia de un efecto prozona sometiendo a ensayo muestras no diluidas y muestras después de la dilución. Si el resultado tras la dilución es más alto que el de la muestra no diluida, entonces la muestra no diluida mostraba muy probablemente el efecto prozona. Desafortunadamente, este enfoque aumenta el coste de mano de obra y de reactivos.

Para el procedimiento de readición de antígeno, se añade analito adicional a la muestra después de que se complete su medición y se interpreta el cambio adicional en la señal. Aunque este procedimiento es preciso en la detección del efecto prozona, los costes de reactivos aumentan debido a la adición de antígeno. Además, el flujo de trabajo en el analizador se incrementa mediante la etapa de pipeteado adicional, lo que conduce a un rendimiento reducido. Además, el reactivo antigénico ocupa espacio adicional en el analizador.

El procedimiento cinético verifica la existencia de un exceso de antígeno mediante el análisis de los datos cinéticos obtenidos durante la medición de la muestra. En la mayoría de los casos, la cinética de reacción depende de la concentración de analito: las muestras de baja concentración pueden presentar señales crecientes, mientras que las muestras de alta concentración pueden presentar un incremento de señal más rápido al principio y mucho menor al final de la reacción. La diferencia descrita se puede usar para reconocer la presencia del efecto prozona.

El procedimiento cinético aplicado en los analizadores cobas c de Roche también se denomina procedimiento de velocidad de reacción. Aquí se compara la tasa de cambio en la absorbancia en dos momentos diferentes después de la adición final del reactivo (véanse los manuales de operador de cobas c y la formación del manual del operador de cobas c): la relación entre la velocidad de reacción al final de la reacción y la velocidad de reacción al comienzo de la reacción, expresada como porcentaje, se define como el valor de comprobación de prozona PC. Para cada ensayo, los intervalos de PC específicos, definidos como el intervalo entre un límite inferior y un límite superior, que

indican un efecto prozona se almacenan en los ajustes de ensayo y se comparan automáticamente con los valores de PC obtenidos después de la medición de cada muestra (véanse las figuras 2, 3 y 4 de "Analizador cobas c 311-COBI CD, Compendium of Background Information"). En caso de que esté presente un efecto prozona, el resultado obtenido para la muestra se marca con >Kin.

Opcionalmente, se pueden definir hasta dos límites diferentes (véanse las casillas 8 y 9 de los ajustes de la figura 4) en los analizadores cobas c de Roche y se pueden aplicar a cada medida que decide cómo proceder antes de analizar el valor de comprobación de prozona PC para una muestra. Estos límites son valores de referencia para señales que se obtienen de una muestra a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito calculando el cambio en la señal en un cierto periodo de tiempo. Estos límites permiten ignorar muestras con velocidades de reacción extremadamente bajas procedentes de una comprobación de prozonas y clasificar dichas muestras directamente como muestras sin efecto gancho. Una desventaja del procedimiento cinético utilizado en los analizadores cobas c es que la diferenciación entre las muestras con efecto gancho y sin efecto gancho no siempre es óptima, lo que provoca dificultades a la hora de aplicar el procedimiento a diferentes lotes de un mismo ensayo al crear un marcado erróneo, por ejemplo, marcado como "Intervalo de medición superior excedido" en lugar de "Muestra con efecto gancho" o viceversa.

Otra desventaja importante de este procedimiento es que no es aplicable para todos los ensayos, por ejemplo, el ensayo de albúmina, y, en tales casos, se debe aplicar el costoso procedimiento de readición de antígeno descrito anteriormente, aumentando el flujo de trabajo en el analizador debido a la etapa de pipeteado adicional, lo que conduce a un rendimiento reducido. Además, el reactivo antigénico ocupa espacio adicional en el analizador. Varios procedimientos de detección de prozona utilizan fórmulas simples de análisis de datos cinéticos. Los analizadores que aplican estos procedimientos se suelen desconectar debido a la alta tasa de falsas alarmas de prozona (Clin. Chem. Lab. Med. 1999).

En el procedimiento cinético del documento JP 06213893 se utiliza cualquier punto de medición para la comprobación de prozona. En el documento JP 10282099 se discrimina la presencia o ausencia de un efecto prozona comparando entre sí los datos medidos de dos secciones de medición dentro del tiempo de medición.

En JP63019560 se calcula la relación entre los valores de absorbancia  $A(\lambda_1)$  y  $A(\lambda_2)$ , detectados en las longitudes de onda  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ , y se compara con un nivel de discriminación preestablecido para detectar un efecto prozona.

El documento JP 04204378 describe un procedimiento de detección de prozona que calcula la relación de la diferencia de absorbancia a dos longitudes de onda diferentes  $\Delta A(\lambda_1)$  y  $\Delta A(\lambda_2)$  y compara el valor con un valor de referencia preestablecido.

Las mediciones de los documentos JP 05093725 y JP 06094717 se realizan a 2 longitudes de onda diferentes, seguidas de la determinación de la relación de desviación entre los valores medidos y un valor objetivo usando fórmulas de regresión lineal. La detección de un efecto prozona se realiza basándose en la desviación.

El documento EP1845373 se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de un analito con una sustancia de unión a analito en una muestra usando una curva de calibración específica, en el que la cantidad del analito de una muestra positiva a la prozona se determina en una curva de calibración diferente.

La técnica previa mencionada anteriormente utiliza reactivos caros, requiere mediciones adicionales o procedimientos complejos de evaluación de señales. Además, algunos procedimientos no siempre son aplicables a todos los ensayos.

### Problema a resolver

El problema a resolver es proporcionar un procedimiento para la detección de prozona que sea rentable (idealmente sin necesidad de consumir ningún reactivo), rápido (idealmente mediante un procedimiento de detección que se realiza simultáneamente en la etapa de cuantificación de la muestra), fácil, seguro (idealmente con pocas o ninguna alarma falsa de prozona) y que se pueden implementar en analizadores de laboratorio automatizados.

El procedimiento de la presente invención permite una manera rentable sin necesidad de consumir ningún reactivo. Es rápido y fácil porque el procedimiento de detección de prozona se realiza de forma simultánea a la etapa de cuantificación de la muestra y es seguro porque detecta si está presente un efecto prozona en una muestra. Además, el procedimiento se puede implementar en analizadores de laboratorio automatizados.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para detectar un fenómeno de prozona mediante el análisis de los datos cinéticos obtenidos durante la medición de la muestra. Los modos de realización de la invención se dan en las reivindicaciones dependientes.

En un primer aspecto, el procedimiento de la presente invención para la determinación de la cantidad de un analito específico en una muestra que puede presentar un efecto prozona mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción después de la interacción del analito con reactivos de ensayo específicos del analito.

5 En una primera etapa, se genera una curva de calibración a al menos una longitud de onda y tiempo de reacción para el analito específico de una muestra a determinar y los resultados de medición se depositan en un sistema de gestión de datos de la plataforma de instrumentos.

10 La señal óptica se mide simultáneamente para el analito específico en la muestra a determinar a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y al menos a una longitud de onda específica adicional utilizada para la detección del efecto prozona durante todo el tiempo de reacción. Esta longitud de onda adicional es diferente de la longitud de onda utilizada para la determinación del analito, en el que la diferencia entre la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y al menos a una longitud de onda específica adicional utilizada para la detección del efecto prozona es superior a 10 nm, de tal manera que existe una diferenciación mejorada de las muestras con efecto gancho y sin efecto gancho en comparación con cuando se usa la misma longitud de onda para la determinación del analito y la detección del efecto prozona.

20 En la etapa siguiente, se calcula la relación de velocidades de reacción R utilizando las señales obtenidas a la longitud de onda utilizada para la detección del efecto prozona  $R = [\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2} / \text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1}] \times 100$ , con la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2 =  $[\text{señal (punto de tiempo 4)} - \text{señal (punto de tiempo 3)}] / [\text{punto de tiempo 4} - \text{punto de tiempo 3}]$  y la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1 =  $[\text{señal (punto de tiempo 2)} - \text{señal (punto de tiempo 1)}] / [\text{punto de tiempo 2} - \text{punto de tiempo 1}]$ .

25 Por comparación del valor de relación calculado R con los valores límite predeterminados, se determina si existe un efecto prozona en la muestra.

30 Finalmente, se cuantifica la cantidad del analito específico por comparación de la señal óptica obtenida a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito con la curva de calibración.

35 En un modo de realización de la presente invención, opcionalmente, se pueden definir y aplicar límites adicionales a cada medida que decide cómo proceder antes, es decir, antes de calcular y determinar la presencia de un efecto gancho basado en la relación de velocidades de reacción R. Estos límites son valores de referencia para señales que se miden a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y/o a la longitud de onda utilizada para la detección del efecto prozona y/u otras longitudes de onda. En un ejemplo, dicho límite se puede definir para un cambio en la señal en un cierto periodo de tiempo, para ignorar muestras con velocidades de reacción extremadamente bajas procedentes de una comprobación de prozonas y clasificar dichas muestras directamente como muestras sin efecto gancho. Un ejemplo adicional para dicho límite se puede definir para un cambio en la señal en un cierto periodo de tiempo, para decidir si una muestra con una velocidad de reacción extremadamente alta se clasifica inmediatamente como muestra con efecto gancho o si la decisión se toma después del cálculo de la relación de velocidades de reacción R.

45 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una plataforma de instrumentos configurada para llevar a cabo el procedimiento mencionado anteriormente usando pruebas de laboratorio espectrofotométricas comercialmente disponibles para determinar la cantidad del analito específico en una muestra que puede presentar un efecto prozona mediante ensayos fotométricos, en el que el sistema de gestión de datos de la plataforma de instrumentos es capaz de procesar datos de tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración, longitudes de onda, para realizar simultáneamente la determinación de analito y la detección del efecto prozona a partir de una medición de muestra.

Otro aspecto de la presente invención es el procedimiento mencionado anteriormente en el que el analito es albúmina.

## 55 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para detectar un fenómeno de prozona mediante el análisis de los datos cinéticos obtenidos durante la medición de la muestra.

## 60 Definiciones:

65 El término "ensayo espectrofotométrico", también denominado "ensayo fotométrico", se conoce bien en la técnica. Los ensayos fotométricos abarcan inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos. En los inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos, el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la turbidez de la mezcla de reacción basada en la aglutinación del analito específico y un socio de unión específico del analito.

El término "turbidimetría y nefelometría" son procedimientos conocidos en la técnica para determinar la cantidad de opacidad o turbidez en una solución basada en la medición del efecto de dicha turbidez sobre la transmisión y dispersión de la luz. La turbidez en un líquido está causada por la presencia de partículas en suspensión finamente divididas. Si se hace pasar un haz de luz a través de una muestra turbia, su intensidad se reduce por dispersión y la cantidad de luz dispersada depende de la concentración, tamaño y distribución de tamaño de las partículas. El espectrofotómetro mide el aumento de la turbidez (es decir, la reducción de la intensidad de la luz transmitida), que se debe al aumento del tamaño de partícula resultante de la reacción de inmunoaglutinación.

Este aumento de la turbidez es una medida directa de la inmunoaglutinación causada por el analito o una medida indirecta de la inhibición de la inmunoaglutinación causada por el analito. En nefelometría se mide la intensidad de la luz dispersada, mientras que en turbidimetría se mide la intensidad de luz transmitida a través de la muestra.

Los ensayos turbidimétricos implican la medición de la intensidad del haz incidente a medida que pasa a través de la muestra. El haz de luz puede pasar a través de una suspensión o ser absorbido, reflejado o dispersado por las partículas. Como consecuencia, la intensidad de la luz disminuye a medida que se transmite a través de la suspensión. Para las partículas no absorbentes, la disminución de la intensidad luminosa debida a la dispersión se expresa como turbidez.

Los ensayos nefelométricos se refieren a la medición de la luz dispersada en un ángulo  $\theta$  definido desde el haz incidente cuando el haz incidente pasa a través de la muestra. En nefelometría se mide el cambio en la intensidad de la luz dispersada después de un tiempo, ya que las especies de dispersión aumentan rápidamente de tamaño. La luz dispersada es proporcional a las concentraciones iniciales de antígeno cuando se mide en presencia de un complejo anticuerpo-látex fijo. Se describen explicaciones adicionales en J.A. Molina-Bolivar et al., Journal of Macromolecular Science, Part C-Polymer Review, 45:59-98, 2005.

El procedimiento de inmunoensayo de la presente invención funciona con todas las pruebas de aglutinación conocidas con y sin mejora por micropartículas. Preferentemente, se utiliza dentro de la presente invención una "prueba de aglutinación por dispersión de luz mejorada por micropartículas", que también se denomina "inmunoensayos turbidimétricos mejorados por partículas" (PETIA). Los inmunoensayos basados en aglutinación se usan rutinariamente en el diagnóstico clínico para la cuantificación de proteínas séricas, fármacos terapéuticos y drogas de abuso en analizadores de química clínica, ya que tienen los beneficios de ser ensayos casi homogéneos que no requieren ninguna etapa de separación o lavado. Para potenciar la detección óptica entre el analito específico y un socio de unión específico del analito en la mezcla de reacción, el analito o el socio de unión específico del analito están unidos a partículas adecuadas. De este modo, el analito reacciona y se aglutina con las partículas que se recubren con socios de unión específicos de analito. Al aumentar la cantidad de analito, aumentan la aglutinación y el tamaño de los complejos, lo que conduce además a un cambio en la dispersión de la luz. Las partículas aglutinadas se determinan a continuación mediante mediciones turbidimétricas y nefelométricas.

El analito comprende una mezcla de partículas con propiedades de fuerte dispersión de la luz que llevan al menos un socio de unión de alta reactividad para el analito y partículas con propiedades de débil dispersión de la luz que llevan al menos un socio de unión de baja reactividad para el analito, como se describe en el documento EP 0898169. Las partículas con propiedades de fuerte dispersión de la luz tienen un tamaño mayor y/o un índice de refracción superior al de las partículas con propiedades de débil dispersión de la luz. El reactivo de micropartículas para un inmunoensayo de dispersión de luz mejorada por micropartículas para determinar la cantidad de un analito, que comprende una mezcla de micropartículas de 30 a 600 nm de diámetro, que incluye partículas con propiedades de fuerte dispersión de la luz que llevan al menos un socio de unión de alta reactividad para el analito y partículas con propiedades de débil dispersión de la luz que llevan al menos un socio de unión de baja reactividad para el analito.

El material de las micropartículas puede ser cualquier material inorgánico, orgánico o polimérico adecuado para ensayos de dispersión de luz mejorada por micropartículas. El material de las micropartículas puede ser cualquier material inorgánico, orgánico o polimérico adecuado para ensayos de dispersión de luz mejorada por micropartículas. Dichos materiales incluyen, por ejemplo, selenio, carbono, oro; nitruros de carbono, silicio o germanio, por ejemplo,  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ; óxidos de hierro, titanio o silicio, por ejemplo,  $\text{TiO}_2$  o  $\text{SiO}_2$ ; y materiales poliméricos tales como, por ejemplo, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), resinas epoxi, poli(cloruro de vinilideno), poli(metacrilato de alfanaftilo), poli(vinilnaftaleno), o copolímeros de los mismos, en particular copolímeros de estireno y un compuesto etilénicamente insaturado copolimerizable, por ejemplo, copolímeros de estireno-(met)acrilato. Son particularmente adecuadas micropartículas hechas de materiales poliméricos, así como partículas núcleo-envoltura que consisten en un núcleo interno polimerizado a partir de estireno y una envoltura externa formada por copolimerización a partir de estireno con un compuesto etilénicamente insaturado copolimerizable. La mayoría de los ensayos basados en partículas emplean partículas de látex, siendo el tipo predominante el poliestireno.

El término "determinar", como se usa en el presente documento, se refiere a valorar, diagnosticar, decidir, identificar, evaluar, cuantificar o clasificar un analito específico en una muestra a partir del cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción de un ensayo fotométrico basado en mediciones turbidimétricas o nefelométricas.

El término "cantidad", como se usa en el presente documento, abarca la cantidad absoluta de un analito o la cantidad y/o concentración relativa de dicho analito y/o cualquier valor y/o parámetro que se pueda correlacionar con el mismo y/o se pueda derivar del mismo.

5 El término "analito" de acuerdo con la presente invención incluye cualquier "compuesto de diagnóstico *in vitro*" tal como, por ejemplo, proteínas séricas, fármacos terapéuticos y drogas de abuso. Los analitos representativos incluyen, pero no se limitan a, antígenos, haptenos, anticuerpos, proteínas, péptidos, aminoácidos, hormonas, esteroides, marcadores de células de cáncer, células de tejidos, virus, vitaminas, ácidos nucleicos, pesticidas, enzimas, sustratos enzimáticos y cofactores enzimáticos. Como se utiliza en el presente documento, un "analito" o  
10 "analito específico" se refiere a la sustancia cuya presencia y/o concentración en una muestra ha de determinarse. El término "analito" incluye cualquier sustancia para la que exista un socio de reacción específico, por ejemplo, una molécula o sustancia de unión que se una específicamente al analito, como anticuerpos, o una molécula que reaccione específicamente con el analito, como enzimas), o para el que se puede preparar un socio de unión específico.

15 El término "analito específico" en el contexto de la presente invención significa que, para cada analito en una muestra a medir, se pueden determinar curvas de calibración específicas y longitudes de onda y tiempos de reacción específicos que se optimizan para cada analito específico para cuantificar la concentración y que pueden diferir de un analito a otro.

20 El término "socio de reacción específico de analito", como se utiliza en el presente documento, se refiere al que es capaz de reaccionar con el analito específico para formar un complejo de reacción, como un inmunocomplejo antígeno-anticuerpo. Típicamente, los socios de reacción específicos del analito incluyen, pero no se limitan a, proteínas de unión, antígenos, fragmentos de antígeno, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores y socios de unión mejorados por partículas. Dichos socios de reacción específicos para un analito dado se pueden obtener a partir de fuentes comerciales o se pueden preparar de acuerdo con procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de pares de socios de reacción específicos del analito incluyen, pero no se limitan a, hapteno:anticuerpo, célula:anticuerpo, biotina:avidina, hormona:receptor, polipéptido:anticuerpo, anticuerpo:anticuerpo, oligonucleótido:ADN o ARN complementario. El término "socio de  
25 unión específico de analito" se puede utilizar igualmente en lugar de "socio de reacción específico de analito".

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a inmunoglobulinas que se producen en respuesta a la detección de una sustancia extraña, e incluye moléculas intactas, así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Los anticuerpos que se pueden usar como socios de unión inmunológicos  
35 en el ensayo de la presente invención incluyen anticuerpos policlonales de cualquier especie, anticuerpos monoclonales de cualquier especie (incluyendo anticuerpos quiméricos y/o anticuerpos recombinantes). Debido a su capacidad de producirse de forma idéntica en cantidades ilimitadas, en general son preferentes los anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.

40 El término "antígeno", como se usa en el presente documento, se caracteriza por su capacidad para unirse en el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. La región de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo, y a la que se une el anticuerpo, se denomina "epitopo". Un antígeno es una sustancia que es capaz de inducir una respuesta inmune, es decir, producción de anticuerpos, cuando se introduce en un cuerpo animal o humano. Un hapteno es una molécula pequeña que puede provocar una respuesta inmune sólo cuando está unida a un portador grande tal  
45 como una proteína. El portador puede ser uno que tampoco provoque una respuesta inmune por sí mismo. Una vez que el cuerpo ha generado anticuerpos para un aducto hapteno-portador, el hapteno de molécula pequeña también puede ser capaz de unirse al anticuerpo.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de un fluido corporal seleccionado de sangre, es decir, sangre completa, plasma o suero u orina, LCR, esputo o a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano de un individuo respectivo. Las muestras de fluidos corporales se pueden aislar mediante técnicas bien conocidas. Se pueden aislar muestras de tejidos u órganos a partir de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células separadas se pueden aislar a partir de los fluidos corporales o tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación  
50 celular. Preferentemente, los lisados de las muestras de células, tejidos u órganos se aíslan a partir de dichas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos a los que se hace referencia en el presente documento.

Se usan calibraciones no lineales para pruebas cuyas absorbancias a diferentes concentraciones forman una gráfica no lineal pero reproducible. Se requieren al menos tres y un máximo de seis calibradores para la calibración. Un tipo típico de calibración no lineal es la función de Rodbard. Además, existen tipos de calibración cuyas curvas de calibración son funciones de interpolación definidas por partes, como Spline.

La sensibilidad, la sensibilidad analítica, el límite inferior de detección (LDL), el límite de blanco (LOB), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) son términos utilizados para describir la concentración más pequeña de una medida y que se pueden medir de forma fiable por un procedimiento analítico. Todos estos términos

están relacionados pero tienen definiciones distintas (siehe Lit. clin biochem rev 2008, 29, 49). Por ejemplo, el término "sensibilidad analítica" se define como la pendiente de la curva de calibración.

5 El término "límite de detección inferior" (LDL), como se utiliza en el presente documento, también se denomina intervalo de medición inferior. Un enfoque típico para estimar el LDL consiste en medir réplicas, tales como  $n = 21$ , de un calibrador de cero o muestra en blanco, determinando el valor medio ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar (DE). El LDL se calcula como  $\bar{x} + 2DE$  o  $\bar{x} + 3DE$ . Este procedimiento para la determinación del LDL está de acuerdo con el procedimiento descrito por Kaiser (H. Kaiser, Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie, 1965, 209, n.º 1, páginas 1-18).

10 El término "límite de detección superior" (UDL), como se utiliza en el presente documento, también se denomina intervalo de medición superior. El UDL es la cantidad más alta del analito en una muestra que se puede determinar de manera fiable. En la presente invención, el UDL se determinó evaluando la linealidad del procedimiento y luego seleccionando el valor de concentración más alto dentro del intervalo lineal como el UDL. Se dice que el procedimiento es lineal cuando la recuperación del analito de una serie de soluciones de muestra (valor medido) es proporcional a la concentración real del analito (valor real) en las soluciones de muestra (Arch Pathol Lab Med 2004, 128, páginas 44-48). La forma de la curva de calibración, que puede ser parabólica o sigmoide, no debe confundirse con la linealidad del procedimiento que describe la relación entre el valor medido y el valor real. La curva de calibración describe la relación entre la señal y la concentración.

20 Es una práctica común determinar la concentración de un analito usando al menos una "curva de calibración" (también conocida comúnmente como curva estándar o curva de trabajo) que se ha dibujado preliminarmente trazando la interrelación entre las concentraciones conocidas del analito en las muestras estándar y los valores analíticos medidos (señales ópticas) tales como densidades ópticas de las muestras estándar. Cuando la curva de calibración tiene una linealidad adecuada en un rango más amplio en la región de análisis cuantitativo, la curva de calibración se puede preparar con un número relativamente menor de muestras estándar, que están cerca del límite superior, del límite inferior y del punto intermedio en el intervalo de determinación del análisis cuantitativo. En la práctica, sin embargo, hay muchas curvas de calibración que no son lineales en general. La curva de calibración turbidimétrica o nefelométrica, preparada a partir de la absorbancia a una longitud de onda específica, puede tener una curva de calibración en forma de S no lineal, en la que la sensibilidad se deteriora a una concentración cercana a cero y se satura en un lado de mayor concentración. La determinación de la calibración en forma de S requiere una calibración multipunto en la que es obligado el uso de las muestras estándar de la pluralidad de las concentraciones.

35 Al generar una curva de calibración para un ensayo de aglutinación basado en mediciones de la turbidez de la mezcla de reacción, la selección de la longitud de onda desempeña, junto al tiempo de reacción, un papel crucial para la pendiente (sensibilidad analítica) de la curva y el intervalo de medición superior alcanzable. La selección de una longitud de onda y un tiempo de reacción correspondiente para el cálculo de señales destinada a la generación de una curva de calibración puede requerir un compromiso entre la sensibilidad analítica y el intervalo de medición superior.

40 Un modo de realización de la presente invención es generar una curva de calibración a al menos una longitud de onda y tiempo de reacción para el analito específico de una muestra a determinar y los resultados de medición se depositan en un sistema de gestión de datos de la plataforma de instrumentos.

45 Posteriormente, la señal óptica para el analito específico en la muestra a determinar se mide simultáneamente a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y al menos a una longitud de onda específica adicional utilizada para la detección del efecto prozona durante todo el tiempo de reacción. Esta o estas longitudes de onda específicas adicionales son diferentes de la longitud de onda usada para la determinación del analito.

50 La diferencia entre las longitudes de onda utilizadas para la determinación del analito y al menos una longitud de onda específica adicional utilizada para la detección del efecto prozona es superior a 10 nm.

55 Preferentemente, esta o estas longitudes de onda específicas adicionales presentan una diferencia de 20 nm. En situaciones específicas, la diferencia entre la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y al menos una longitud de onda específica adicional utilizada para la detección del efecto prozona puede ser incluso superior a 20 nm.

60 El término "longitud de onda utilizada para la determinación del analito", también denominada longitud de onda principal, así como la al menos una longitud de onda para la detección del efecto prozona, como se usa en el presente documento, se refiere a las longitudes de onda generadas con un fotómetro de longitud de onda múltiple conocido en la técnica. Los fotómetros comunes son espectrofotómetros o turbidímetros para inmunoensayos turbidimétricos y nefelómetros para inmunoensayos nefelométricos. La detección de estos ensayos en los instrumentos cobas® c se basa en un fotómetro con una lámpara halógena de tungsteno como fuente de irradiación, una rejilla para generar luz monocromática y una matriz de fotodiodos (12 diodos que producen longitudes de onda entre 340 y 800 nm) como detector. Un fotómetro, por ejemplo, el analizador cobas c® 311 de Roche tiene la

capacidad de medir simultáneamente 12 longitudes de onda entre 300 nm y  $800 \pm 2$  nm. Preferentemente se utilizan las longitudes de onda de 340, 376, 415, 450, 480, 505, 546, 570, 600, 660, 700,  $800 \pm 2$  nm. El procedimiento de la presente invención es especialmente ventajoso si se usa en analizadores automatizados, tales como el cobas c 311, que tiene la capacidad de medir múltiples longitudes de onda simultáneamente. Dependiendo de la arquitectura del espectrofotómetro elegido y de las longitudes de onda disponibles, que pueden diferir de un dispositivo a otro, se seleccionan una o más longitudes de onda específicas entre múltiples longitudes de onda. Las mediciones se realizan preferentemente a una temperatura definida, preferentemente entre 20 y 40 grados centígrados, lo más preferentemente a 37 °C.

Un modo de realización de la presente invención es el que usa opcionalmente una segunda longitud de onda o una longitud de onda adicional para fines de corrección/borrado. Esta longitud de onda adicional se determina como un valor en blanco para la corrección de interferencias y la compensación de ruido fotométrico, también conocida como medición dicromática (Clin. Chem. 1979, 25, 1482-1484). Típicamente se realiza restando la señal a la longitud de onda de corrección de la señal a la longitud de onda principal.

El término "señal óptica", como se utiliza en el presente documento, describe la señal que se obtiene realizando una medición de absorbancia de la mezcla de reacción. La señal óptica puede ser un valor de absorbancia en el caso de ensayos turbidimétricos o una señal de luz dispersada para ensayos nefelométricos. La señal óptica para el analito específico en la muestra se puede medir simultáneamente en la mezcla de reacción a múltiples longitudes de onda, preferentemente en una sola pasada durante todo el tiempo de reacción.

El término "simultáneamente", como se utiliza en la presente invención, puede implicar un retardo de tiempo menor de 60 segundos, por ejemplo, un retardo de tiempo menor de 10 segundos, preferentemente menor de 1 segundo, lo más preferentemente menor de 1 ms, o incluso menor de 0,1 ms. Lo más preferentemente, el término "simultáneamente" se refiere a ningún retardo de tiempo.

El término "efecto prozona" también denominado efecto gancho a dosis alta o efecto de exceso de antígeno, como se usa en el presente documento, es un fenómeno en el que la respuesta del ensayo a altas concentraciones de analito disminuye y da lugar a valores medidos del analito que son falsamente más bajos.

Un modo de realización de la presente invención es calcular la "relación de velocidades de reacción R" utilizando las señales obtenidas a la longitud de onda utilizada para la detección del efecto prozona

La expresión "relación de velocidades de reacción R", como se usa en el presente documento, se define como:

$$R = [\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2} / \text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1}] \times 100, \text{ con la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2} = [\text{señal (punto de tiempo 4)} - \text{señal (punto de tiempo 3)}] / [\text{punto de tiempo 4} - \text{punto de tiempo 3}] \text{ y la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1} = [\text{señal (punto de tiempo 2)} - \text{señal (punto de tiempo 1)}] / [\text{punto de tiempo 2} - \text{punto de tiempo 1}].$$

Por comparación del valor de relación calculado R con los valores límite predeterminados, se determina si existe un efecto prozona en la muestra. De acuerdo con la presente invención, se puede detectar un efecto gancho utilizando las pruebas de laboratorio espectrofotométricas comercialmente disponibles en la plataforma de instrumentos correspondiente sin aplicar un tratamiento de dilución de muestra preanalítica y/o sin cambiar el procedimiento de ensayo mediante readición de analito.

Un modo de realización de la presente invención es que si un efecto prozona está presente después de diluir la muestra, la medición de una muestra se repite automáticamente.

Es un modo de realización adicional de la presente invención que, en el caso en que no esté presente ningún efecto prozona en la muestra, la cantidad determinada de analito específico en la muestra es un resultado que se puede notificar. Además, en un modo de realización de la presente invención, una o más señales adicionales se miden opcionalmente a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y/o a la longitud de onda utilizada para el cálculo de R y/o a otra longitud de onda se evalúan mediante comparación con valores límite predeterminados antes de calcular y determinar la presencia de un efecto gancho basado en la relación de velocidades de reacción R. De acuerdo con la presente invención, dicho valor límite predeterminado se puede definir para un cambio en la señal en un cierto período de tiempo, para decidir si una muestra con una velocidad de reacción extremadamente alta se clasifica inmediatamente, por ejemplo, como muestra con efecto gancho, o para ignorar muestras con velocidades de reacción extremadamente bajas procedentes de una comprobación de prozona y clasificar dichas muestras directamente, por ejemplo, como muestras sin efecto gancho.

El término "límite predeterminado" o "valor umbral", como se utiliza en el presente documento, se utiliza para cambios en la señal definidos en un cierto período de tiempo, expresado también como velocidad de reacción, o para relaciones de velocidades de reacción definidas, como se ha descrito anteriormente en la fórmula para R. El límite predeterminado puede ser también un valor de absorbancia tomado en un cierto punto de tiempo. Se aplica un límite predeterminado al procedimiento de la invención para la detección de un efecto prozona. La selección de los límites predeterminados se realiza empíricamente durante el desarrollo del ensayo comparando muestras sin efecto



gancho con muestras con efecto gancho.

Un modo de realización adicional de la presente invención es que condiciones de medición específicas que comprenden tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración y el tipo de ensayo se aplican adicionalmente al protocolo de medición de acuerdo con la presente invención.

El término "tiempo de reacción", como se utiliza en el presente documento, es, en el caso de ensayos de punto final, el período de tiempo entre la primera (o inicial) y la segunda (o final) medición de la señal óptica que se usa para el cálculo de un valor de señal de la presente. La primera medición (o inicial) se realiza antes o poco después de añadir el reactivo final a la mezcla de reacción. En el caso de mediciones cinéticas, el tiempo de reacción puede ser el período de tiempo utilizado para el cálculo del valor que expresa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo. El "tiempo de reacción" puede ser idéntico o más corto que el tiempo de reacción completo. El tiempo de reacción completo es el tiempo que se deja reaccionar la mezcla de reacción, compuesta de reactivos de ensayo específicos de muestra y de analito, después de su mezcla.

El término "tiempo de reacción completo", como se usa en el presente documento, es el período de tiempo de medición de un analito específico a una pluralidad de longitudes de onda. Las muestras se miden simultáneamente a las 12 longitudes de onda diferentes disponibles en el instrumento cobas c®. El tiempo de reacción completo típico del presente inmunoensayo varía entre 1 y 20 minutos. Preferentemente, el tiempo de reacción completo de un espectrofotómetro de longitud de onda múltiple es preferentemente de aproximadamente 10 minutos. En un modo de realización de la presente invención, las señales ópticas del analito específico se miden durante el tiempo de reacción completo.

El término "número de puntos de calibración", como se usa en el presente documento, es el número de calibradores también denominados estándares de muestra utilizados para generar la curva de calibración.

El término "modo de calibración", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la determinación de una relación válida entre la señal medida [absorbancia o (para ensayos de velocidad) una tasa de cambio en la absorbancia] y la concentración del analito de interés. La representación gráfica de dicha relación señal/concentración es la curva de calibración, también denominada curva de trabajo. Los analizadores utilizan diferentes tipos de modelos matemáticos para describir esta relación. Estos modelos matemáticos se denominan tipos de calibración o modos de calibración. Existen dos modos básicos de calibración, los modos de calibración lineal y no lineal. Las calibraciones lineales se utilizan para las pruebas cuando las lecturas de absorbancia representadas frente a las concentraciones de calibradores se encuentran en una línea recta. Si una calibración lineal se basa en dos mediciones de calibrador, se denomina calibración lineal de dos puntos. Si una calibración se basa en más de dos calibradores, se denomina calibración lineal multipunto. Típicamente, una calibración multipunto se utiliza para calibraciones no lineales.

El término "tipo de ensayo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a dos tipos fundamentales de ensayos fotométricos en analizadores: ensayos de punto final y ensayos de velocidad. Las mediciones son tomadas por el fotómetro en puntos de tiempo específicos. Si las mediciones se toman una vez finalizadas las reacciones, la absorbancia (o turbidez) es un indicador de la concentración del componente de la muestra. Estos son los llamados ensayos de punto final. Para los ensayos de velocidad, la relación de velocidades de reacción (tasa de cambio en absorbancia) es proporcional a la concentración del componente de muestra que se analiza. Las mediciones se toman a medida que avanza la reacción. También hay modificaciones de estas dos técnicas posibles en este instrumento, así como una combinación de las dos.

Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento de la invención, en el que el analito a determinar es albúmina.

Otro aspecto de la invención es una plataforma de instrumentos configurada para llevar a cabo un procedimiento de la invención utilizando pruebas de laboratorio espectrofotométricas comercialmente disponibles para determinar la cantidad del analito específico en una muestra que puede presentar un efecto prozona mediante ensayos fotométricos, en el que el sistema de gestión de datos de la plataforma de instrumentos es capaz de procesar datos de tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración, longitudes de onda, para seleccionar la curva de calibración con el mejor ajuste. Se realizan correcciones adicionales de los resultados de medición de acuerdo con la presente invención que comprenden longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, modo de calibración, número de puntos de calibración y se compensan entre sí.

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta la curva de Heidelberger e intervalos importantes del inmunoensayo homogéneo de ferritina (figura de la bibliografía Clin. Chem. Lab. Med 1999, 37, 471-476).

La Figura 2 presenta la comprobación de prozona en cobas c con el procedimiento de velocidad de reacción.

La Figura 3 presenta el cálculo del valor de comprobación de prozona en cobas c.

La Figura 4 presenta los ajustes para la comprobación de prozona con el procedimiento de velocidad de reacción en cobas c 311.

5 La Figura 5 presenta la diferenciación entre muestras con efecto gancho y sin efecto gancho de la prueba CRP L3.

a) Esquema con valores PC normalizados (NPCV) del procedimiento estándar y del nuevo procedimiento;

10 b) Resumen con los resultados obtenidos con el procedimiento estándar y el nuevo procedimiento, así como los factores de mejora IF.

La Figura 6 presenta la diferenciación entre muestras con efecto gancho y sin efecto gancho del ensayo de Ferritina.

15 a) Esquema con valores PC normalizados (NPCV) del procedimiento estándar y del nuevo procedimiento;

b) Resumen con los resultados obtenidos con el procedimiento estándar y el nuevo procedimiento, así como los factores de mejora IF.

20 La Figura 7 presenta la diferenciación entre muestras con efecto gancho y sin efecto gancho. a) Esquema: se toman lecturas de absorbancia a longitudes de onda de medición de 340 nm a 700 nm. Se calcula la diferencia de señal entre el punto de medición 8 y el punto de medición 20. El límite de diferencia de señal se ajusta a 0,25. Todas las muestras que presentan diferencias de señal >0,25 son muestras con efecto gancho. En todas las muestras que presentan una diferencia de señal ≤0,25 se realiza una comprobación de prozona. b) Esquema: los valores de comprobación de prozona se calculan aplicando el procedimiento de velocidad de reacción (véase la configuración en 3.3.2.1). Las señales se generan a longitudes de onda de medición de 505 nm-700 nm y se usan para el cálculo del valor de comprobación de prozona. Las muestras con PC fuera de los límites definidos son muestras con efecto gancho.

## 30 Ejemplos

### Ejemplo 1: Detección de prozona para el ensayo de CRP

#### 35 1.1 Instrumento:

Para los experimentos se utilizó el analizador cobas c311 de Roche (Roche Diagnostics GmbH), que tiene un espectrofotómetro de longitud de onda múltiple como unidad de detección. El instrumento pipetea automáticamente la muestra y los reactivos de ensayo en celdas de reacción. Se pueden añadir hasta 3 reactivos diferentes, R1, R2 y R3, a la muestra. El instrumento utiliza una lámpara halógena de tungsteno como fuente de irradiación (12 V/50 W) y mide la absorbancia simultáneamente a 12 longitudes de onda diferentes (a 340, 376, 415, 450, 480, 505, 546, 570, 600, 660, 700 y  $800 \pm 2$  nm) con una matriz de fotodiodos que consiste en 12 fotodiodos. La longitud de la trayectoria óptica es de 5,6 mm y el intervalo óptico del detector es de 0,0000 – 3,0000 de absorbancia. Para cada celda de reacción se mide un blanco en agua y luego se toman lecturas de absorbancia 57 veces en 10 minutos, aquí también denominado el tiempo de reacción completo, dando así un total de 57 puntos de medición para la absorbancia a cada longitud de onda, también denominados puntos fotométricos o puntos de ensayo. La concentración se puede calcular utilizando al menos uno de estos puntos de medición. Existen dos tipos fundamentales de ensayos fotométricos en este instrumento: ensayos de punto final y ensayos de velocidad. Las mediciones se realizan a 37 grados Celsius.

#### 50 1.2 Procedimiento para el ensayo de CRP utilizando el enfoque estándar:

Se seleccionó la prueba CRP L3 de Roche (CRPL3, Ref. Cat. 04956842), un ensayo inmunoturbidimétrico mejorado por partículas, para este estudio. La CRP humana se aglutina con partículas de látex revestidas con anticuerpos anti-CRP monoclonales; los agregados se determinan turbidimétricamente. Los reactivos para todas las pruebas Roche se proporcionan en paquetes cobas c. Estos casetes contienen de una a tres botellas de reactivo especialmente diseñadas y tienen etiquetas de código de barras con el reactivo detallado y otra información relacionada con la prueba. Para las pruebas CRP L3 se utilizan dos reactivos en el casete: R1 (tampón TRIS con albúmina de suero bovino y conservantes) y R2 (partículas de látex recubiertas con anti-CRP (ratón) en tampón de glicina, inmunoglobulinas (ratón) y conservante). El procedimiento descrito en el folleto adjunto de la prueba CRP L3 se usó como procedimiento estándar.

#### 60 1.2.1 Esquema de pipeteado:

Posteriormente se añadieron 2 µl de muestra y 150 µl de tampón de ensayo (R1) a la celda de reacción, seguido de la adición del reactivo de látex (R2, 48 µl), la dilución con 24 µl de diluyente (agua) y el mezclado de la mezcla de reacción.

**1.2.2 Condiciones para la generación de la curva de calibración:**

Para las mediciones se utilizó 570 nm como longitud de onda principal y 800 nm como longitud de onda de corrección. El tipo de ensayo era un ensayo de dos puntos finales. Un ensayo de dos puntos finales es un ensayo de punto final que realiza un blanco de muestra. Aquí se consideran dos lecturas de absorbancia en dos puntos de medición diferentes: la primera lectura se toma generalmente antes o poco después de la adición del reactivo final; la segunda lectura se toma en cualquier momento después de añadir el reactivo final. El valor de absorbancia para la curva de calibración y, por lo tanto, para el cálculo de la concentración se obtiene restando la segunda lectura de la primera lectura. Para CRP L3, la primera lectura está en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura está en el punto de medición 18, que corresponde a un tiempo de reacción de 2,0 minutos. Para la generación de la curva de calibración se miden 6 estándares de Roche (Ref. Cat. 11355279) como duplicados con spline como tipo de calibración, que se ajusta a los intervalos entre los puntos de datos de los calibradores medidos aproximados por polinomios de tercer grado de manera que se obtenga una curva de calibración uniforme.

**1.2.3 Condiciones para la detección del efecto prozona:**

Para la detección del efecto prozona se utiliza el procedimiento de velocidad de reacción (véanse también las figuras 2, 3 y 4). En primer lugar, se aplican 2 límites diferentes a la medición: se calculan las diferencias de señal entre el punto de medición de prozona 1 (pmp<sub>1</sub>) y el punto de medición de prozona 2 (pmp<sub>2</sub>) y las diferencias de señal entre el punto de medición de prozona 3 (pmp<sub>3</sub>) y el punto de medición de prozona 4 (pmp<sub>4</sub>). Estas diferencias de señal calculadas (absorbancia) se comparan con valores límite predeterminados, 950 para (Apmp2-Apmp1) y 100 para (Apmp4-Apmp3) respectivamente (véanse las columnas 8 y 9 de los ajustes de prozona en la figura 4 y en la tabla siguiente). Las muestras con diferencias de señal calculadas que están por debajo de estos límites se clasifican directamente como muestras sin efecto gancho. Sin embargo, si las diferencias de señal calculadas de una muestra están por encima de estos límites, se realiza una comprobación de prozona calculando los valores PC de acuerdo con la figura 3: la relación de la velocidades de reacción al final de la reacción ( $v_{(pmp3,pmp4)}$ ), véanse las columnas 5 y 6 de los ajustes de prozona en la figura 4 y en la tabla a continuación) y la velocidad de reacción al comienzo de la reacción ( $v_{(pmp1,pmp2)}$ ), véanse las columnas 3 y 4 del ajuste de prozona en la figura 4 y en la tabla a continuación), que se expresa como porcentaje, se calcula para obtener el valor de comprobación de prozona PC. Para cada ensayo, los intervalos PC específicos, definidos como intervalo entre un límite inferior (véase la columna 1 en la figura 4 y en la tabla a continuación) y un límite superior (véase la columna 2 en la figura 4 y en la tabla a continuación), que indican un efecto prozona, se almacenan en los ajustes del ensayo y se comparan automáticamente con los valores PC obtenidos después de la medición de cada muestra: si la muestra presenta un valor PC que está dentro del intervalo entre el límite inferior y superior (4-15), entonces la muestra se marca como muestra con efecto gancho. Los ajustes para la comprobación de prozona para CRP L3 se representan en la tabla a continuación (véase también la figura 4 para una descripción detallada):

Longitud de onda utilizada para la comprobación de prozona, límites adicionales y cuantificación del analito: 570 nm (800 nm de longitud de onda de corrección):

Ajustes de valores de comprobación de prozona (PC): Longitud de onda: 570-800 nm							Ajustes de límites adicionales: Longitud de onda: 570-800 nm	
Límite inferior	Límite superior	pmp1	pmp2	pmp3	pmp4	Comp.	0	0
4	15	8	11	16	19	dentro	950	100

**1.3 Procedimiento para el ensayo de CRP de acuerdo con la invención:**

Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar: véase el punto 1.2. Se utilizó el procedimiento descrito en el folleto adjunto de la prueba CRP L3 con la excepción del procedimiento para la detección de un efecto prozona.

**1.3.1 Condiciones de medición:**

Esquema de pipeteado: es idéntico al esquema de pipeteado del procedimiento estándar descrito en el punto 1.2.1. Condiciones para la generación de la curva de calibración: son idénticas a las condiciones de calibración utilizadas en el procedimiento estándar descrito en el punto 1.2.2.

**1.3.2 Condiciones para la detección del efecto prozona de acuerdo con la invención:**

Para la detección del efecto prozona, el procedimiento de la invención también utiliza un análisis de la velocidad de reacción, aunque usando otras longitudes de onda diferentes a las utilizadas para la cuantificación del analito. En primer lugar, se aplican 2 límites diferentes a la medición: se calculan las diferencias de señal entre el punto de medición de prozona 7 (pmp7) y el punto de medición de prozona 8 (pmp8) y las diferencias de señal entre el punto de medición de prozona 9 (pmp9) y el punto de medición de prozona 10 a la longitud de onda de 660 nm (800 nm de longitud de onda de corrección). Estas diferencias de señal calculadas (absorbancia) se comparan con valores límite predeterminados, 500 para (Apmp8-Apmp7) y 200 para (Apmp10-Apmp9) respectivamente (véanse las columnas 8 y 9 en la tabla a continuación). Las muestras con diferencias de señal calculadas que están por debajo de estos límites se clasifican directamente como muestras sin efecto gancho.

Sin embargo, si las diferencias de señal calculadas de una muestra están por encima de estos límites, se realiza una comprobación de prozona calculando la relación de velocidades de reacción R a partir de las señales obtenidas a la longitud de onda utilizada para la detección del efecto prozona:

$$R = [\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2} / \text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1}] \times 100, \text{ con la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2} = [\text{señal (punto de tiempo 4)} - \text{señal (punto de tiempo 3)}] / [\text{punto de tiempo 4} - \text{punto de tiempo 3}] \text{ y la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1} = [\text{señal (punto de tiempo 2)} - \text{señal (punto de tiempo 1)}] / [\text{punto de tiempo 2} - \text{punto de tiempo 1}].$$

Punto de tiempo 4: es el punto de medición de prozona 4 pmp4 e idéntico al punto de medición 4; punto de tiempo 3: es el punto de medición de prozona 3 pmp3 e idéntico al punto de medición 3; punto de tiempo 2: es el punto de medición de prozona 2 pmp2 e idéntico al punto de medición 2; punto de tiempo 1: es el punto de medición de prozona 1 pmp1 e idéntico al punto de medición 1; véase también las columnas 3 y 6 de la tabla a continuación.

Para cada ensayo, los intervalos R específicos y predeterminados, definidos como intervalo entre un límite inferior predeterminado (véase la columna 1 de la tabla a continuación) y un límite superior predeterminado (véase la columna 2 de la tabla a continuación), que indican un efecto prozona, se almacenan en los ajustes del ensayo, y se comparan automáticamente con los valores de R obtenidos después de la medición de cada muestra:

si la muestra presenta un valor de R que está dentro (según la columna 7 en la tabla a continuación) del límite inferior y superior (8-17,2), entonces la muestra se marcará como muestra con efecto gancho.

Los ajustes para la comprobación de prozona para CRP L3 se muestran en la tabla a continuación:

Longitud de onda usada para la comprobación de prozona: **660 nm** (800 nm de longitud de onda de corrección):  
 Longitud de onda utilizada para los límites adicionales: **660 nm** (800 nm de longitud de onda de corrección):  
 Longitud de onda utilizada para la cuantificación del analito: **570 nm** (800 nm de longitud de onda de corrección):

Parámetros/ajustes del valor de comprobación de prozona: Longitud de onda: 660-800 nm							Límites adicionales: Longitud de onda: 660-800 nm	
Límite inferior	Límite superior	pmp1	pmp2	pmp3	pmp4	Comp.	Límite mín. Apmp8-Apmp7	Límite mín. Apmp10-Apmp9
8	17,2	8	10	17	20	dentro	500 (pmp8: 10, pmp7: 8)	200 (pmp10: 20, pmp9: 17)

Opcionalmente, las longitudes de onda a utilizar para cada uno de los límites adicionales pueden ser diferentes. En este caso se obtuvieron buenos resultados utilizando la misma longitud de onda para ambos límites adicionales.

**1.4 Resultados para el ensayo de CRP usando el enfoque estándar y el enfoque de acuerdo con la invención:**

La descripción de los resultados se muestra en la figura 5. La aplicación del nuevo enfoque al ensayo de CRP muestra una diferenciación mejorada entre muestras con efecto gancho y sin efecto gancho por un factor de 2,7. El nuevo enfoque brinda mínimos esfuerzos de implementación; la aplicación del enfoque no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Para su aplicación en el analizador cobas c sólo es necesario adaptar las ventanas de entrada del software: extensión por el ajuste adicional de la longitud de onda de medición y la posibilidad de introducir valores de límite inferior/superior con unidades decimales, por ejemplo, 17,2 en lugar de solamente 17.

**Ejemplo 2: Detección de prozona para el ensayo de ferritina**

2.1 Instrumento: Véase el punto 1.1.

**2.2 Procedimiento para el ensayo de ferritina utilizando el enfoque estándar:**

Se seleccionó para este estudio la prueba Ferr4 de Roche (Ferr4, Ref. Cat. 04885317), un ensayo inmunoturbidimétrico mejorado por partículas. La ferritina humana se aglutina con partículas de látex revestidas con anticuerpos anti-ferritina monoclonales; los agregados se determinan turbidimétricamente. Los reactivos para todas las pruebas Roche se proporcionan en paquetes cobas c. Estos casetes contienen de una a tres botellas de reactivo especialmente diseñadas y tienen etiquetas de código de barras con el reactivo detallado y otra información relacionada con la prueba. Para las pruebas Ferr4 se utilizan dos reactivos en el casete: R1 (tampón TRIS, pH 7,5, inmunoglobulinas (conejo), conservante, estabilizantes) y R3 (matriz acuosa que contiene partículas de látex revestidas con anticuerpos anti ferritina humana (conejo), conservante, estabilizantes). El procedimiento descrito en el folleto adjunto de la prueba Ferr4 se usó como procedimiento estándar.

**2.2.1 Esquema de pipeteado:**

Se añadieron posteriormente 10 µl de muestra y 80 µl de tampón de ensayo (R1) a la celda de reacción, seguido de la adición de 80 µl del reactivo de látex (R3) y el mezclado de la mezcla de reacción.

**2.2.2 Condiciones para la generación de la curva de calibración:**

Para las mediciones se utilizó 570 nm como longitud de onda principal y 800 nm como longitud de onda de corrección. El tipo de ensayo era un ensayo de dos puntos finales. Un ensayo de dos puntos finales es un ensayo de punto final que realiza un blanco de muestra. Aquí se consideran dos lecturas de absorbancia en dos puntos de medición diferentes: la primera lectura se toma generalmente antes o poco después de la adición del reactivo final; la segunda lectura se toma en cualquier momento después de añadir el reactivo final. El valor de absorbancia para la curva de calibración y, por lo tanto, para el cálculo de la concentración se obtiene restando la segunda lectura de la primera lectura. Para CRP L3, la primera lectura está en el punto de medición 24 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura está en el punto de medición 57, que corresponde a un tiempo de reacción de 5,1 minutos. Para la generación de la curva de calibración se miden 6 estándares de Roche (Ref. Cat. 11355279) como duplicados con spline como tipo de calibración, que se ajusta a los intervalos entre los puntos de datos de los calibradores medidos aproximados por polinomios de tercer grado de manera que se obtenga una curva de calibración uniforme.

**2.2.3 Condiciones para la detección del efecto prozona:**

Para la detección del efecto prozona se utiliza el procedimiento de velocidad de reacción (véanse también las figuras 2, 3 y 4). En primer lugar, se aplica un límite a la medición: se calcula la diferencia de señal entre el punto de medición de prozona 1 ( $pmp_1$ ) y el punto de medición de prozona 2 ( $pmp_2$ ). Esta diferencia de señal (absorbancia) calculada se compara con el valor límite predeterminado, que es 1000 para ( $Apmp_2 - Apmp_1$ ) (véase la columna 8 de los ajustes de prozona en la figura 4 y en la tabla a continuación). Las muestras con diferencia de señal calculada que está por debajo de este límite se clasifican directamente como muestras sin efecto gancho. Sin embargo, si la diferencia de señal calculada de una muestra está por encima de este límite, se realiza una comprobación de prozona calculando los valores PC de acuerdo con la figura 3: la relación de la velocidades de reacción al final de la reacción ( $v_{(pmp_3, pmp_4)}$ ), véanse las columnas 5 y 6 de los ajustes de prozona en la figura 4 y en la tabla a continuación) y la velocidad de reacción al comienzo de la reacción ( $v_{(pmp_1, pmp_2)}$ ), véanse las columnas 3 y 4 del ajuste de prozona en la figura 4 y en la tabla a continuación), que se expresa como porcentaje, se calcula para obtener el valor de comprobación de prozona PC. Para cada ensayo, los intervalos PC específicos, definidos como intervalo entre un límite inferior (véase la columna 1 en la figura 4 y en la tabla a continuación) y un límite superior (véase la columna 2 en la figura 4 y en la tabla a continuación), que indican un efecto prozona, se almacenan en los ajustes del ensayo y se comparan automáticamente con los valores PC obtenidos después de la medición de cada muestra: si la muestra presenta un valor PC que está dentro del intervalo entre el límite inferior y superior (0-10), entonces la muestra se marca como muestra con efecto gancho. Los ajustes para la comprobación de prozona para Ferr4 se representan en la tabla a continuación (véase también la figura 4 para una descripción detallada):

Longitud de onda utilizada para la comprobación de prozona, límites adicionales y cuantificación del analito: 570 nm (800 nm de longitud de onda de corrección):

Parámetros/ajustes del valor de comprobación de prozona: Longitud de onda: 570-800 nm							Límites adicionales: Longitud de onda: 570-800 nm	
Límite inferior	Límite superior	pmp1	pmp2	pmp3	pmp4	Comp.	0	0
0	10	25	29	43	47	dentro	1000	-

**2.3 Procedimiento para el ensayo de ferritina de acuerdo con la invención:**

5 Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar: véase el punto 2.2. Se utilizó el procedimiento descrito en el folleto adjunto de la prueba Ferr4 con la excepción del procedimiento para la detección de un efecto prozona.

**2.3.1 Condiciones de medición:**

10 Esquema de pipeteado: es idéntico al esquema de pipeteado del procedimiento estándar descrito en el punto 2.2.1. Condiciones para la generación de la curva de calibración: son idénticas a las condiciones de calibración utilizadas en el procedimiento estándar descrito en el punto 2.2.2.

**2.3.2 Condiciones para la detección del efecto prozona según la invención:**

15 Para la detección del efecto prozona, el procedimiento de la invención también utiliza un análisis de la velocidad de reacción, aunque usando otras longitudes de onda diferentes a las utilizadas para la cuantificación del analito. En primer lugar, se aplica un límite a la medición: se calcula la diferencia de señal entre el punto de medición de prozona 7 (pmp7) y el punto de medición de prozona 8 (pmp8) a la longitud de onda de 505 nm (800 nm de longitud de onda de corrección). Esta diferencia de señal (absorbancia) calculada se compara con el valor límite predeterminado, que es 1000 para (Apmp8-Apmp7) (véase la columna 8 en la tabla a continuación). Las muestras con diferencias de señal calculadas que están por debajo de este límite se clasifican directamente como muestras sin efecto gancho. Sin embargo, si la diferencia de señal calculada de una muestra está por encima de este límite, se realiza una comprobación de prozona calculando la relación de velocidades de reacción R a partir de las señales obtenidas a la longitud de onda utilizada para la detección del efecto prozona:

20 
$$R = \left[ \frac{\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2}}{\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1}} \right] \times 100$$
, con la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2 = [señal (punto de tiempo 4) – señal (punto de tiempo 3)]/[punto de tiempo 4 – punto de tiempo 3] y la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1 = [señal (punto de tiempo 2) – señal (punto de tiempo 1)]/[punto de tiempo 2 – punto de tiempo 1].

25 Punto de tiempo 4: es el punto de medición de prozona 4 pmp4 e idéntico al punto de medición 4; punto de tiempo 3: es el punto de medición de prozona 3 pmp3 e idéntico al punto de medición 3; punto de tiempo 2: es el punto de medición de prozona 2 pmp2 e idéntico al punto de medición 2; punto de tiempo 1: es el punto de medición de prozona 1 pmp1 e idéntico al punto de medición 1; véase también las columnas 3 y 6 de la tabla a continuación.

30 Para cada ensayo, los intervalos R específicos y predeterminados, definidos como intervalo entre un límite inferior predeterminado (véase la columna 1 en la tabla a continuación) y un límite superior predeterminado (véase la columna 2 en la tabla a continuación), que indican un efecto prozona, se almacenan en los ajustes del ensayo y se comparan automáticamente con los valores R obtenidos después de la medición de cada muestra: si la muestra presenta un valor R que está dentro (de acuerdo con la columna 7 en la tabla a continuación) del intervalo entre el límite inferior y superior (entre -5 y 5), entonces la muestra se marca como muestra con efecto gancho.

35 Los ajustes para la comprobación de prozona para la FERR4 se representan en la tabla a continuación:

Longitud de onda usada para la comprobación de prozona: **505 nm** (800 nm de longitud de onda de corrección);  
Longitud de onda utilizada para los límites adicionales: **505 nm** (800 nm de longitud de onda de corrección);  
Longitud de onda utilizada para la cuantificación del analito: **570 nm** (800 nm de longitud de onda de corrección):

50

Parámetros/ajustes del valor de comprobación de prozona: Longitud de onda: 505-800 nm							Límites adicionales: Longitud de onda: 505-800 nm	
inferior Límite	superior Límite	pmp1	pmp2	pmp3	pmp4	Comp.	Límite mín.	Límite mín.
							Amp8- Amp7	Amp10- Amp9
-5	5	24	26	41	43	dentro	1000 (pmp8: 26, pmp7: 24)	-

**2.4 Resultados para el ensayo de ferritina usando el enfoque y el enfoque de acuerdo con la invención:**

5 La descripción de los resultados se muestra en la figura 6. La aplicación del nuevo enfoque de ferritina muestra una diferenciación mejorada entre muestras con efecto gancho y sin efecto gancho por un factor de 1,8. El nuevo enfoque brinda mínimos esfuerzos de implementación; la aplicación del enfoque no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Para su aplicación en el analizador cobas c sólo se es necesario adaptar las ventanas de entrada del software: extensión por el ajuste adicional de la longitud de onda de medición.

10

**Ejemplo 3: Detección de Prozona para el ensayo de albúmina**

**3.1 Instrumento:** Véase el punto 1.1.

15

**3.2 Procedimiento para el ensayo de albúmina utilizando el enfoque estándar:**

20

Se seleccionó para este estudio la prueba de Albúmina de Roche (ALBT2, Ref. Cat. 04469658), un ensayo inmunoturbidimétrico. Esta prueba se utiliza para determinar la albúmina en muestras de orina. La albúmina humana reacciona con anticuerpos policlonales anti-albúmina formando complejos antígeno/anticuerpo; los agregados se determinan turbidiméricamente.

25

Los reactivos para todas las pruebas Roche se proporcionan en paquetes cobas c. Estos casetes contienen de una a tres botellas de reactivo especialmente diseñadas y tienen etiquetas de código de barras con el reactivo detallado y otra información relacionada con la prueba. Para las pruebas ALBT2 se utilizan tres reactivos en el casete: R1 (tampón TRIS: 50 mmol/l, pH 8,0, PEG: 4,2 %, EDTA: 2,0 mmol/l, conservante), R2 (anticuerpos policlonales anti-albúmina humana (oveja): dependiendo del título, tampón TRIS: 100 mmol/l, pH 7,2, conservante) y R3 (albúmina en suero diluido (humano), NaCl: 150 mmol/l, tampón fosfato: 50 mmol/l, pH 7,0, conservante). El reactivo R3 se utiliza para realizar la comprobación del exceso de antígeno mediante el procedimiento de readición de antígeno. El procedimiento descrito en el folleto adjunto de la prueba ALBT2 se usó como procedimiento estándar.

30

**3.2.1 Esquema de pipeteado:**

35

Se añadieron posteriormente 6 µl de muestra y 100 µl de tampón de ensayo (R1) a la celda de reacción, seguido de la adición de 20 µl del reactivo de anticuerpo (R2) y el mezclado de la mezcla de reacción. Posteriormente se añadieron a la mezcla de reacción 6 µl de reactivo R3 (comprobación del exceso de antígeno), se diluyó con 20 µl de diluyente (agua) y se mezcló.

**3.2.2 Condiciones para la generación de la curva de calibración:**

40

Para las mediciones se utilizó 340 nm como longitud de onda principal y 700 nm como longitud de onda de corrección. El tipo de ensayo era un ensayo de dos puntos finales. Un ensayo de dos puntos finales es un ensayo de punto final que realiza un blanco de muestra. Aquí se consideran dos lecturas de absorbancia en dos puntos de medición diferentes: la primera lectura se toma generalmente antes o poco después de la adición del reactivo final; la segunda lectura se toma en cualquier momento después de añadir el reactivo final. El valor de absorbancia para la curva de calibración y, por lo tanto, para el cálculo de la concentración se obtiene restando la segunda lectura de la primera lectura. Para ALBT2, la primera lectura está en el punto de medición 6 y corresponde a poco antes de la adición del reactivo final (R2), y la segunda lectura está en el punto de medición 15, que corresponde a un tiempo de reacción de 1,8 minutos. Para la generación de la curva de calibración se miden 6 estándares de Roche (Ref. Cat. 03121305) como duplicados con RCM como tipo de calibración (función de ajuste de Rodbard).

50

**3.2.3 Condiciones para la detección del efecto prozona:**

Para la detección del efecto prozona se utiliza el procedimiento de readición de antígeno. Después de completar el ensayo (entre los puntos de medición 23 y 24), se añade el reactivo de albúmina (R3) a la mezcla de ensayo y se

interpreta el cambio adicional en la señal. Típicamente, en las muestras con efecto gancho la señal disminuye, y en las muestras sin efecto gancho la señal aumenta. Las longitudes de onda utilizadas para la cuantificación del analito y para el análisis de la señal después de la adición del antígeno son idénticas.

5 **3.3 Procedimiento para el ensayo de albúmina de acuerdo con la invención:**

Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar: véase el punto 3.2. El procedimiento descrito en el folleto adjunto de la prueba ALBT2 se usó con la excepción del procedimiento de comprobación de prozona.

10

**3.3.1 Condiciones de medición:**

Esquema de pipeteado: es idéntico al esquema de pipeteado del procedimiento estándar descrito en el punto 3.2.1. Condiciones para la generación de la curva de calibración: son idénticas a las condiciones de calibración utilizadas en el procedimiento estándar descrito en el punto 3.2.2.

15

**3.3.2 Condiciones para la detección del efecto prozona según la invención:**

20 a) Para la detección del efecto prozona, el procedimiento de la invención también utiliza un análisis de la velocidad de reacción, aunque usando otras longitudes de onda diferentes a las utilizadas para la cuantificación del analito. En primer lugar, se aplica un límite a la medición: se calcula la diferencia de señal entre el punto de medición de prozona 5 (pmp5) y el punto de medición de prozona 6 (pmp6) a la longitud de onda de 340 nm (700 nm de longitud de onda de corrección). Esta diferencia de señal (absorbancia) calculada se compara con el valor límite predeterminado, que es 2500 para (A<sub>pmp6</sub>-A<sub>pmp5</sub>) (véase la columna 10 en la tabla a continuación). Las muestras con diferencias de señal calculadas que están por encima de este límite se clasifican directamente como muestras con efecto gancho. Sin embargo, si la diferencia de señal calculada de una muestra está por debajo de este límite, se realiza una comprobación de prozona calculando la relación de velocidades de reacción R de las señales obtenidas a la longitud de onda utilizada para la detección del efecto prozona (505 nm de longitud de onda principal, 700 nm de longitud de onda de corrección):  $R = [\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2}/\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1}] \times 100$ , con la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2 = [señal (punto de tiempo 4) – señal (punto de tiempo 3)]/[punto de tiempo 4 – punto de tiempo 3] y la velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1 = [señal (punto de tiempo 2) – señal (punto de tiempo 1)]/[punto de tiempo 2 – punto de tiempo 1].

25

30

35

Punto de tiempo 4: es el punto de medición de prozona 4 pmp4 e idéntico al punto de medición 4; punto de tiempo 3: es el punto de medición de prozona 3 pmp3 e idéntico al punto de medición 3; punto de tiempo 2: es el punto de medición de prozona 2 pmp2 e idéntico al punto de medición 2; punto de tiempo 1: es el punto de medición de prozona 1 pmp1 e idéntico al punto de medición 1; véase también las columnas 3 y 6 de la tabla a continuación.

40

45

Para cada ensayo, los intervalos R específicos y predeterminados, definidos como intervalo entre un límite inferior predeterminado (véase la columna 1 en la tabla a continuación) y un límite superior predeterminado (véase la columna 2 en la tabla a continuación), que indican un efecto prozona, se almacenan en los ajustes del ensayo y se comparan automáticamente con los valores R obtenidos después de la medición de cada muestra: si la muestra presenta un valor R que está fuera (de acuerdo con la columna 7 en la tabla a continuación) del intervalo entre el límite inferior y superior (entre -5 y 42), entonces la muestra se marca como muestra con efecto gancho.

Los ajustes para la comprobación de prozona para el ensayo de albúmina se muestran en la tabla a continuación:

50

Longitud de onda usada para la comprobación de prozona: **505 nm** (700 nm de longitud de onda de corrección);  
Longitud de onda utilizada para los límites adicionales: **340 nm** (700 nm de longitud de onda de corrección);  
Longitud de onda utilizada para la cuantificación del analito: **340 nm** (700 nm de longitud de onda de corrección).

Parámetros/ajustes del valor de comprobación de prozona: Longitud de onda: 505-700 nm							Límites adicionales: Longitud de onda: 340-700 nm		
Límite inferior	Límite superior	pmp1	pmp2	pmp3	pmp4	Comp.	Límite mín. A <sub>pmp8</sub> -A <sub>pmp7</sub>	Límite mín. A <sub>pmp10</sub> -A <sub>pmp9</sub>	Límite máx. A <sub>pmp6</sub> -A <sub>pmp5</sub>
-5	42	6	10	14	22	fuera	-	-	2500 (pmp6: 23, pmp5: 8)



**3.4 Resultados para el ensayo de albúmina usando el enfoque estándar y el enfoque de acuerdo con la invención:**

5 La descripción de los resultados se muestra en la figura 7. La aplicación del nuevo enfoque de la prueba ALBT2  
permite una clara diferenciación entre las muestras con efecto gancho y sin efecto gancho aplicando el  
procedimiento de velocidad de reacción. Como consecuencia, evitar una segunda adición de antígeno conduce a un  
ahorro de costes y tiempo. El nuevo enfoque brinda mínimos esfuerzos de implementación; la aplicación del enfoque  
no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Para su aplicación en el analizador cobas c sólo se  
10 es necesario adaptar y/o modificar ligeramente las ventanas de entrada del software: la extensión por el ajuste  
adicional de la longitud de onda de medición y un ajuste adicional necesario para un límite (límite máx.) que se  
puede definir como un cambio de señal en un cierto período de tiempo, para decidir si una muestra con una  
velocidad de reacción extremadamente alta se clasifica inmediatamente como muestra con efecto gancho o si la  
decisión se realiza después del cálculo de la relación de velocidades de reacción R.

15

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación de la cantidad de un analito específico en una muestra que puede presentar un efecto prozona mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción después de la interacción del analito con reactivos de ensayo específicos del analito, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) generar una curva de calibración a al menos una longitud de onda y tiempo de reacción para el analito específico de una muestra a determinar y depositar los resultados de medición en un sistema de gestión de datos de la plataforma de instrumentos,
- 10 b) medir simultáneamente la señal óptica para el analito específico en la muestra a determinar a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y al menos a una longitud de onda específica adicional utilizada para la detección del efecto prozona durante el tiempo de reacción completo, que es diferente de la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y al menos una longitud de onda específica adicional utilizada para la detección del efecto prozona es superior a 10 nm, de tal manera que existe una diferenciación mejorada de las muestras con efecto gancho y sin efecto gancho en comparación con cuando se usa la misma longitud de onda para la determinación del analito y la detección del efecto prozona,
- 15 c) calcular la relación de velocidades de reacción R utilizando las señales obtenidas a la longitud de onda utilizada para la detección del efecto prozona
- 20 
$$R = \frac{\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 2}}{\text{velocidad de reacción en el periodo de tiempo 1}} \times 100$$
 con  
 velocidad de reacción en el período de tiempo 2 = [señal (punto de tiempo 4) - señal (punto de tiempo 3)]/[punto de tiempo 4 - punto de tiempo 3]  
 y  
 velocidad de reacción en el período de tiempo 1 = [señal (punto de tiempo 2) - señal (punto de tiempo 1)]/[punto de tiempo 2 - punto de tiempo 1]
- 25 d) determinar si está presente un efecto prozona en la muestra por comparación del valor de relación calculado R con valores límite predeterminados,
- 35 e) cuantificar la cantidad del analito específico por comparación de la señal óptica obtenida a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito con la curva de calibración.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en el caso en que no esté presente ningún efecto prozona en la muestra, la cantidad determinada de analito específico en la muestra es un resultado que se puede notificar.
- 40 3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que opcionalmente se utiliza una longitud de onda adicional para fines de corrección/borrado.
- 45 4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que la medición de una muestra diluida se repite automáticamente si está presente un efecto prozona.
5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que una o más señales adicionales medidas a la longitud de onda utilizada para la determinación del analito y/o la longitud de onda utilizada para el cálculo de R y/o a otra longitud de onda se evalúan mediante comparación con valores límite predeterminados antes de calcular y determinar la presencia de un efecto gancho basado en la relación de velocidades de reacción R.
- 50 6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que se define un valor límite predeterminado para un cambio de señal en un cierto periodo de tiempo, para ignorar muestras con velocidades de reacción extremadamente bajas procedentes de una comprobación de prozonas y clasificar dichas muestras directamente como muestras sin efecto gancho.
- 55 7. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que se define un valor límite predeterminado para un cambio de señal en un cierto período de tiempo, para decidir si una muestra con una velocidad de reacción extremadamente alta se clasifica inmediatamente como muestra con efecto gancho.
- 60 8. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que se define un límite predeterminado para un cambio de señal en un cierto periodo de tiempo, para decidir si una muestra con una velocidad de reacción extremadamente alta se clasifica como muestra con efecto gancho después del cálculo de la relación de velocidades de reacción R.
- 65

9. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, en el que condiciones de medición específicas que comprenden tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración y el tipo de ensayo se aplican adicionalmente al protocolo de medición.
- 5 10. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, en el que se puede detectar un efecto gancho utilizando las pruebas de laboratorio espectrofotométricas comercialmente disponibles en la plataforma de instrumentos correspondiente sin aplicar un tratamiento de dilución de muestra preanalítica y/o sin cambiar el procedimiento de ensayo mediante readición de analito.
- 10 11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el analito a determinar es albúmina.
- 15 12. Plataforma de instrumentos configurada para llevar a cabo el procedimiento de las reivindicaciones 1-11, utilizando pruebas de laboratorio espectrofotométricas comercialmente disponibles para determinar la cantidad del analito específico en una muestra que puede presentar un efecto prozona mediante ensayos fotométricos, en el que el sistema de gestión de datos de la plataforma de instrumentos es capaz de procesar datos de tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración, longitudes de onda, índices de suero para seleccionar la curva de calibración con el mejor ajuste.
- 20 13. Plataforma de instrumentos según la reivindicación 12, en la que se realizan correcciones adicionales de los resultados de medición que comprenden longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, modo de calibración, número de puntos de calibración y se compensan entre sí.

Figura 1

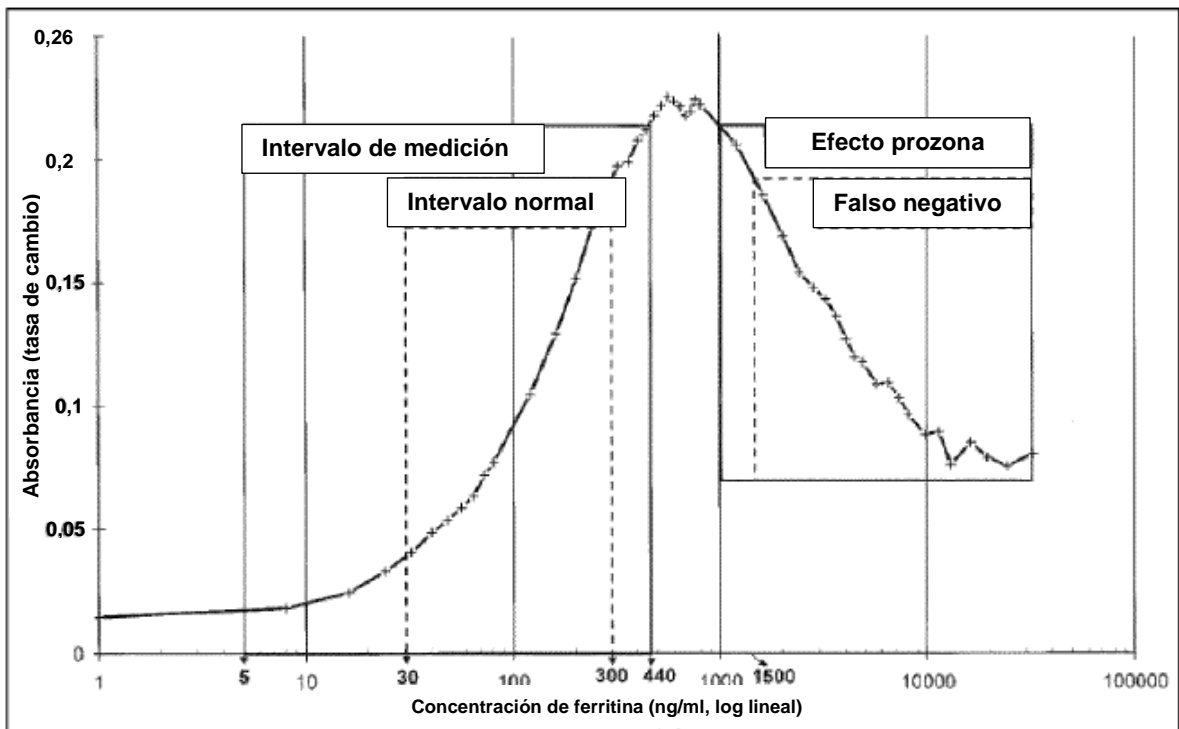


Figura 2

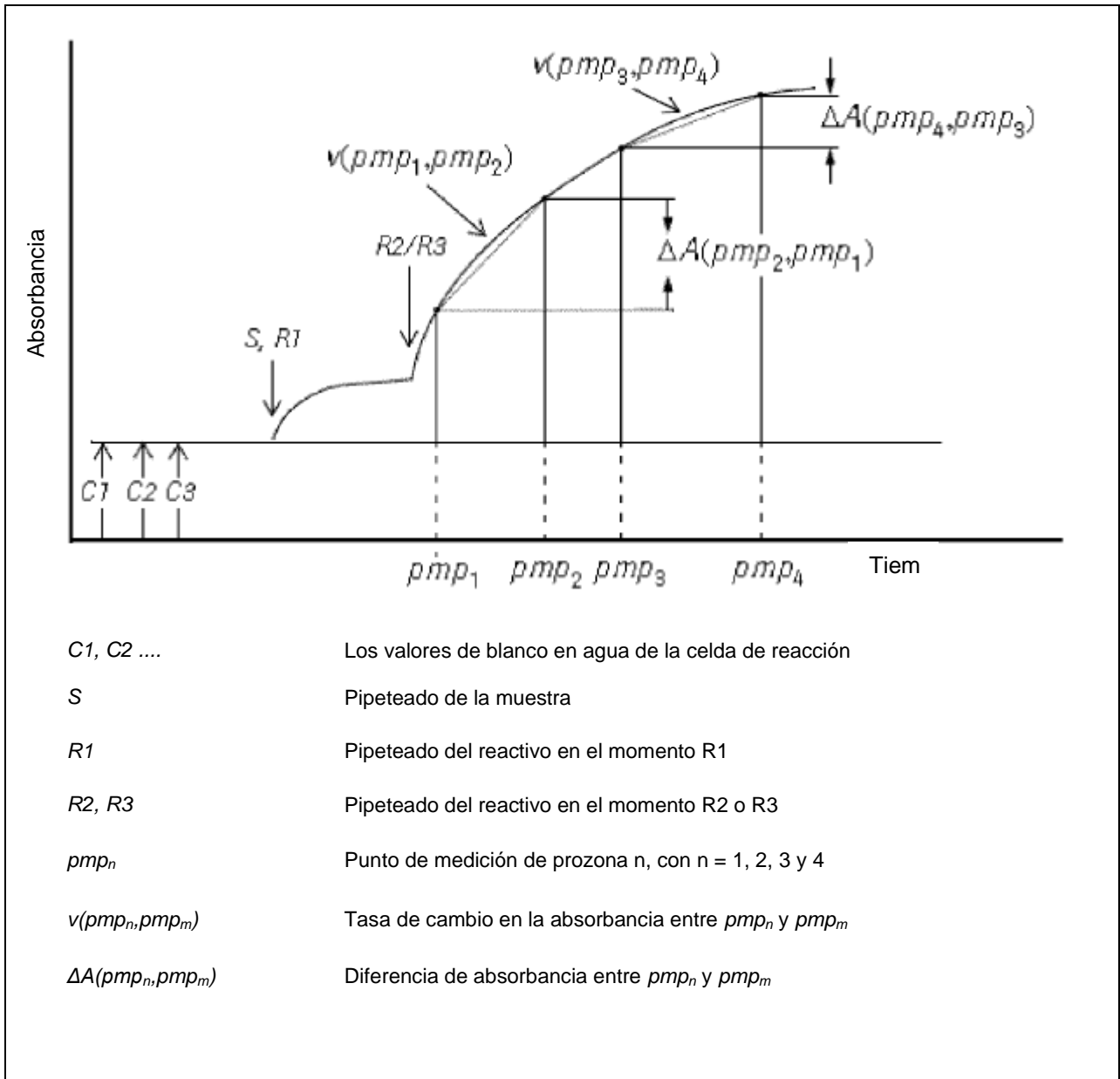


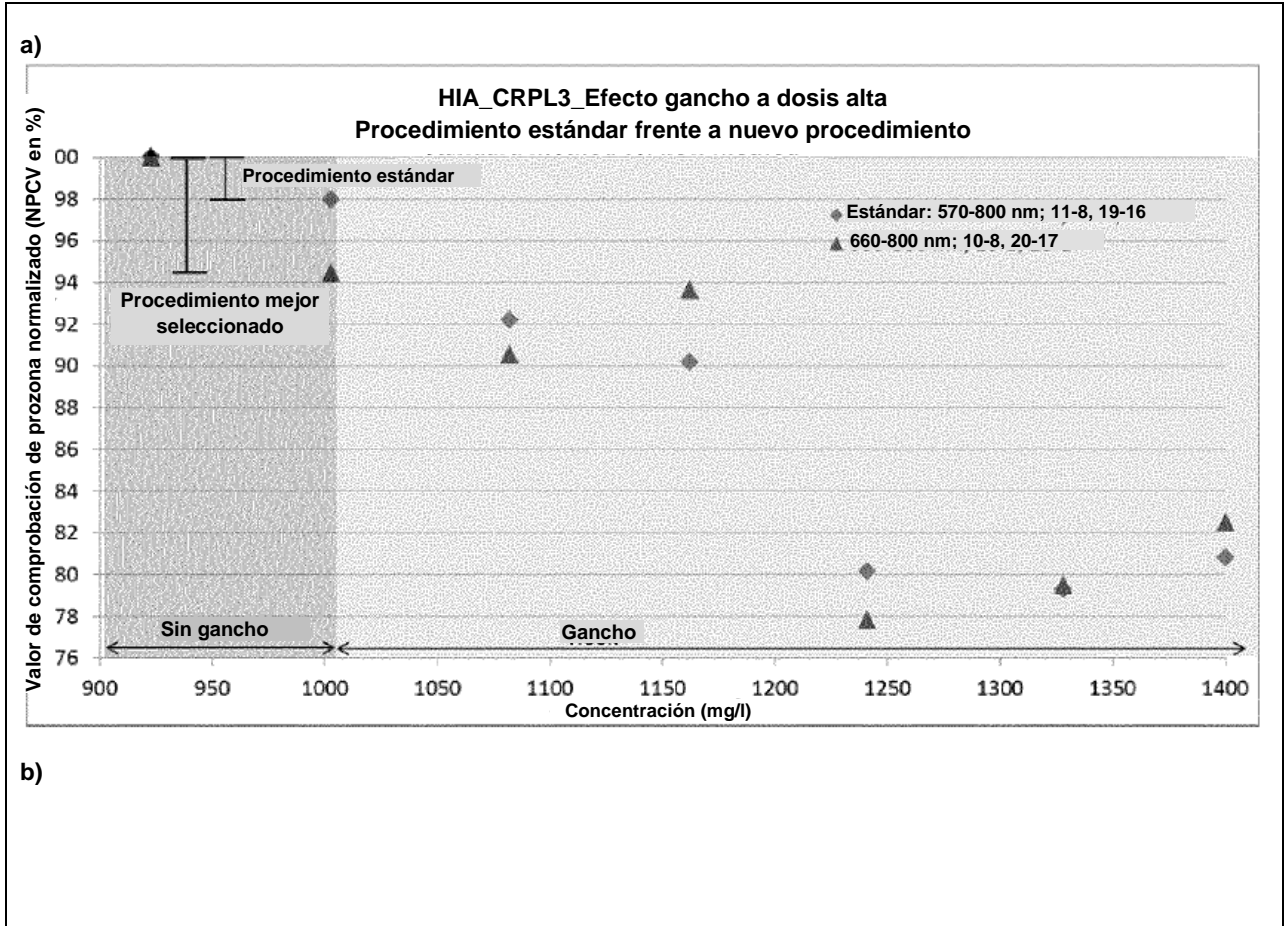
Figura 3

	$PC = [v(pmp_3, pmp_4) / v(pmp_1, pmp_2)] \times 100$ <p>con</p> $v(pmp_3, pmp_4) = (A_{pmp_4} - A_{pmp_3}) / (pmp_4 - pmp_3)$ $v(pmp_1, pmp_2) = (A_{pmp_2} - A_{pmp_1}) / (pmp_2 - pmp_1)$
<i>PC</i>	Valor de comprobación de prozona
<i>pmp<sub>n</sub></i>	Punto de medición de prozona n (con n = 1, 2, 3 o 4)
<i>v(pmp<sub>n</sub>, pmp<sub>m</sub>)</i>	Tasa de cambio en la absorbancia entre <i>pmp<sub>n</sub></i> y <i>pmp<sub>m</sub></i>
<i>A<sub>pmp<sub>n</sub></sub> - A<sub>pmp<sub>m</sub></sub></i>	Diferencia de absorbancia entre <i>pmp<sub>n</sub></i> y <i>pmp<sub>m</sub></i>
<i>pmp<sub>n</sub> - pmp<sub>m</sub></i>	Diferencia de tiempo entre <i>pmp<sub>n</sub></i> y <i>pmp<sub>m</sub></i>

Figura 4

<p>A la derecha del campo Límite de prozona hay nueve casillas:</p> <p>[Límite inferior] [Límite superior] [<math>pmp_1</math>] [<math>pmp_2</math>] [<math>pmp_3</math>] [<math>pmp_4</math>] [comp.] [0] [0]</p> <p>* Las dos primeras casillas indican los límites de prozona inferior y superior  * Las siguientes cuatro casillas son para los puntos de medición de prozona (pmp):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 3ª entrada: primer punto de medición de la prozona (<math>pmp_1</math>)</li> <li>◦ 4ª entrada: segundo punto de medición de la prozona (<math>pmp_2</math>)</li> <li>◦ 5ª entrada: tercer punto de medición de la prozona (<math>pmp_3</math>)</li> <li>◦ 6ª entrada: cuarto punto de medición de la prozona (<math>pmp_4</math>)</li> </ul> <p>Los valores apropiados son: <math>1 \leq pmp_1 &lt; pmp_2 \leq 57</math> y <math>1 \leq pmp_3 &lt; pmp_4 \leq 57</math>. Si todas las entradas están ajustadas a cero, no se realiza la comprobación de prozona.</p> <p>* La séptima casilla (dentro/fuera) indica en qué caso se emite una alarma de datos (&gt;Kin): Si la entrada se establece en Dentro, se emite una alarma en caso de que el valor de comprobación obtenido esté dentro del intervalo definido entre los límites de prozona inferior y superior (dos primeras casillas).</p> <p>Al contrario, si la entrada se establece en Fuera, se emite una alarma en caso de que el valor de comprobación obtenido se encuentre fuera del intervalo definido.</p> <p>* Las casillas octava y novena definen condiciones adicionales para el procedimiento de velocidad de reacción. Éstas le permiten ignorar la comprobación de prozona en caso de que las velocidades de reacción se vuelvan demasiado bajas.</p> <p>La entrada en la octava casilla define el límite (en Abs x <math>10^4</math>) para la diferencia de absorbancia entre <math>pmp_1</math> y <math>pmp_2</math>. Si la diferencia medida entre estos puntos cae por debajo del límite, la comprobación de prozona se ignora. En otras palabras:</p> <p>Si <math> A_{pmp_2} - A_{pmp_1}  &lt; F \times 10^{-4}</math>, la comprobación de prozona de velocidad de reacción no se realiza, donde <math>F</math> se define en la octava casilla</p> <p>Asimismo, la novena casilla define el límite entre <math>pmp_3</math> y <math>pmp_4</math>. Si la diferencia medida cae por debajo del límite, la comprobación de prozona se ignora. En otras palabras:</p> <p>Si <math> A_{pmp_4} - A_{pmp_3}  &lt; G \times 10^{-4}</math>, la comprobación de prozona de la velocidad de reacción no se realiza, donde <math>G</math> se define en la última casilla de la línea Límite de prozona.</p>
--

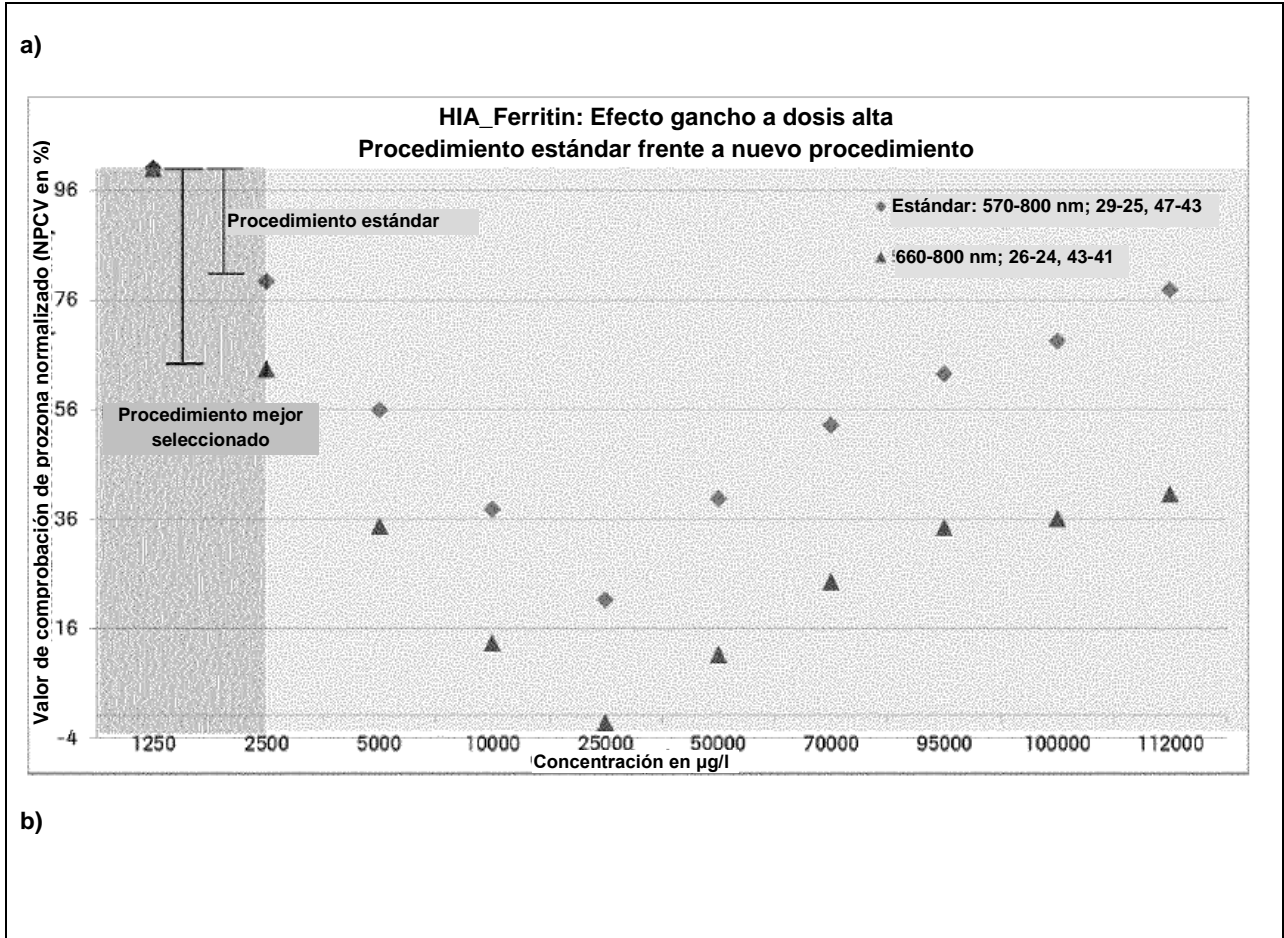
Figura 5



Longitud de onda	Puntos de ensayo, v(inicio), v(final)	PCV Sin gancho = 923 mg/l	PCV Gancho = 1003 mg/l	% NPCV Sin gancho	% NPCV Gancho	Diferenciación	IF
570-800	11-8, 19-16	15,0	14,7	100	98	2	Estándar
660-800	10-8, 20-17	17,2	16,2	100	94	6	2,7



Figura 6



Longitud de onda	Puntos de ensayo, v(inicio), v(final)	PCV Sin gancho = 1250 µg/l	PCV Gancho = 2500 µg/l	% NPCV Sin gancho	% NPCV Gancho	Diferenciación	IF
570-800 nm	29-25, 47-43	10,8	8,6	100	79,273	21	Estándar
505-800 nm	26-24, 43-41	6,9	4,4	100	63,445	37	1,76

Figura 7

