

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 140**

51 Int. Cl.:

G01N 21/17 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2013 PCT/EP2013/058675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13160425**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2013 E 13721303 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2841918**

54 Título: **Mejora de la sensibilidad y del intervalo dinámico de ensayos fotométricos mediante la generación de múltiples curvas de calibración**

30 Prioridad:

26.04.2012 EP 12002952
07.12.2012 EP 12196036

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2018

73 Titular/es:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, DE y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

72 Inventor/es:

BRUECKNER, THORSTEN;
LOPEZ-CALLE, ELOISA;
ORANTH, NORBERT y
ROEDL, JOSEF

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 657 140 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

Mejora de la sensibilidad y del intervalo dinámico de ensayos fotométricos mediante la generación de múltiples curvas de calibración

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de un analito específico mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico de una muestra reacciona con un socio de reacción específico del analito en una mezcla de reacción. Se generan al menos dos curvas de calibración, la primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y la segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección.

10

En caso de curvas de calibración crecientes: la señal óptica para el analito específico de una muestra por determinar en la mezcla de reacción se mide simultáneamente al menos a la primera y la segunda longitudes de onda, seleccionando de ese modo la primera o la segunda curva de calibración para la cuantificación del analito específico. Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda. Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda.

15

20

En caso de curvas de calibración decrecientes: si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda. Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda. Finalmente, la cantidad del analito específico se cuantifica por comparación con la curva de calibración seleccionada.

25

30

El procedimiento se refiere especialmente al aumento de la sensibilidad y/o del intervalo dinámico de ensayos fotométricos usando diferentes longitudes de onda principales para determinar la cantidad de un analito específico mediante la generación de al menos dos curvas de calibración. De este modo, la primera curva de calibración registra la detección sensible del analito específico, mientras que la segunda curva de calibración registra el intervalo de medición superior del analito específico.

35

Técnica relacionada

La aglutinación es principalmente un fenómeno químico en el que la interacción superficial entre las macromoléculas conduce a la reticulación y a la formación de un gran complejo, lo que da como resultado un aumento de la dispersión de la luz. La formación de este gran complejo macromolecular se puede observar mediante detección turbidimétrica, nefelométrica o colorimétrica.

40

Los ensayos turbidimétricos, nefelométricos y colorimétricos tienen los beneficios de ser ensayos cuasihomogéneos que no requieren ninguna etapa de separación o lavado. Debido a su sencillo procedimiento de una sola etapa y a sus cortos tiempos de ejecución, los inmunoensayos homogéneos (HIA) son candidatos ideales para la aplicación en analizadores automatizados. Los inmunoensayos homogéneos se utilizan de forma rutinaria en los diagnósticos clínicos para la cuantificación de proteínas séricas, fármacos y drogas en analizadores de bioquímica clínica. Hasta ahora, el procedimiento estándar es el uso de una longitud de onda principal que genera una curva de calibración para la determinación de analitos en ensayos turbidimétricos, nefelométricos y colorimétricos.

45

50

Aunque se puede lograr un excelente rendimiento de ensayo con HIA en los analizadores de bioquímica clínica, todavía hay muestras de pacientes con concentraciones que están fuera del intervalo de medición. Como consecuencia, las muestras deben volver a medirse: después de la dilución en los casos en los que la concentración de la muestra supera el límite superior de detección, o utilizando volúmenes de muestra más altos para las muestras con concentraciones por debajo del límite de detección. Las remediciones generan gastos adicionales y suponen una pérdida de tiempo, siendo ambos factores críticos para los laboratorios que realizan esos ensayos. Por lo tanto, un aumento del intervalo dinámico reduciría la cantidad de repeticiones. Hay varias estrategias para resolver los problemas del procedimiento del estado actual.

55

60

El documento EP 1845373 proporciona un procedimiento para simplificar el examen de muestras con altas concentraciones de un analito. Se usan diferentes curvas de calibración o diferentes porciones de una única curva de calibración para calcular la concentración de analito dependiendo de si la muestra contiene o no altas concentraciones de analito (prozona positivo). La muestra se mezcló con un anticuerpo y se realizó la medición turbidimétrica de las muestras a una longitud de onda primaria de 340 nm. Se utiliza una longitud de onda secundaria de 800 nm para corregir interferencias. El documento US 6.284.472 describe un procedimiento de calibración que consiste en generar

65

dos curvas de medición de la velocidad de reacción, la primera curva se genera usando una muestra de mayor volumen y la segunda curva usando la misma muestra con un menor volumen. La turbidez se monitorizó a 340 nm y se eliminó a 700 nm. Para concentraciones de antígenos superiores al intervalo de ensayo, una señal de antígeno alta que utiliza las dos velocidades evita informar de resultados falsos.

5 El documento JP 06109740 se refiere a un procedimiento de análisis de inmunonefelometría implementando mediciones ópticas en diversos tipos de muestras estándar que tienen diferentes concentraciones. Se selecciona una curva de calibración en respuesta al nivel de diferencia entre los valores ópticos medidos dos veces, en la fase inicial de una reacción y después del progreso, y los valores virtuales calculados a partir de la ecuación de regresión.

10 El documento JP 06094717 describe un procedimiento para determinar si una muestra se mide en condiciones apropiadas de antígeno-anticuerpo o en condiciones de prozona en reacciones de antígeno-anticuerpo. Se irradian las soluciones de reacción antígeno-anticuerpo con dos tipos de longitudes de onda para obtener una relación de absorbancias. Cuando se considera que se trata de la condición de prozona, se calcula un factor de desplazamiento y se realiza una nueva prueba en una condición analítica que depende del desplazamiento.

15 El documento JP 08075740 se refiere a un procedimiento para cuantificar una reacción antígeno-anticuerpo mediante un procedimiento de análisis por nefelometría obteniendo curvas de calibración para una pluralidad de longitudes de onda. Se predetermina el límite superior de la absorbancia que satisface la linealidad para cada longitud de onda como el límite de determinación cuantitativa. De ese modo, la concentración del componente de análisis en cuestión se obtiene mediante la curva de calibración para la longitud de onda más corta que es igual o inferior a la determinación cuantitativa.

20 Sin embargo, las herramientas mencionadas anteriormente están lejos de ser óptimas, ya que los procedimientos descritos no resuelven el problema de cómo proceder con muestras de pacientes que están fuera del intervalo de medición, especialmente para sistemas automatizados. Como consecuencia, las muestras aún deben volver a medirse: después de la dilución en los casos en los que la concentración de la muestra supera el límite superior de detección, o utilizando volúmenes de muestra más altos para las muestras con concentraciones por debajo del límite de detección. Las remediciones, llamadas repeticiones, generan gastos adicionales y suponen una pérdida de tiempo, siendo ambos factores críticos para los laboratorios que realizan esos ensayos.

25 Además, para varios analitos hay disponibles dos sistemas de prueba para la medición de altas concentraciones de analitos y sistemas de prueba de alta sensibilidad para la determinación de una baja concentración de analito. Por ejemplo, para el analito CRP (proteína C-reactiva) existe un inmunoensayo de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) adicional para la evaluación del riesgo cardiovascular (proteína C-reactiva cardíaca Tina-quant (látex) de alta sensibilidad) para la determinación de bajas concentraciones de analito

30 Como resultado, existe una gran necesidad de aumentar la sensibilidad y de ampliar del intervalo dinámico en ensayos fotométricos. La nueva estrategia debería permitir una implementación mínima y la retención de una excelente precisión sin necesidad de realizar cambios en los reactivos y sus formulaciones.

Problema a resolver

35 El problema abordado por la invención es, por lo tanto, proporcionar un ensayo turbidimétrico, nefelométrico y colorimétrico mejorado que ofrezca un intervalo dinámico y una sensibilidad incrementados. Ahora se ha encontrado sorprendentemente que generar al menos dos curvas de calibración, una primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda optimizada para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y una segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda optimizada para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección, conduce a una mejora del intervalo dinámico y de la sensibilidad de los ensayos fotométricos. Se espera que la presente invención solucione (al menos parcialmente) el problema de las remediciones de muestras.

Resumen de la invención

40 Al menos uno de estos objetivos se logra mediante la provisión del tema en cuestión definido en las reivindicaciones y en el presente documento a continuación. En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de un analito específico mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico de una muestra reacciona con un socio de reacción específico del analito en una mezcla de reacción.

45 Se generan al menos dos curvas de calibración, la primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y la segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección.

50 La señal óptica para el analito específico de una muestra por determinar se mide simultáneamente en la mezcla de reacción al menos a la primera y segunda longitudes de onda. La primera o la segunda curva de calibración se

selecciona para la cuantificación del analito específico, mediante los siguientes criterios:

Para curvas de calibración crecientes:

- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda;

- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda.

Para curvas de calibración decrecientes:

- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda;

- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda. La cantidad del analito específico se cuantifica por comparación con la curva de calibración seleccionada.

En los inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos, el analito específico de una muestra se cuantifica a partir del cambio en la turbidez de la mezcla de reacción en base a la aglutinación del analito específico y un socio de unión específico del analito, mientras que en los inmunoensayos colorimétricos el analito específico de una muestra se cuantifica con ayuda de un reactivo de color.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para aumentar la sensibilidad y/o el intervalo dinámico de ensayos fotométricos, en el que una primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y una segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección.

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de al menos dos curvas de calibración para cuantificar la cantidad de un analito específico en ensayos fotométricos, en el que una primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y una segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de un analito específico mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico de una muestra reacciona con un socio de reacción específico del analito en una mezcla de reacción.

Se generan al menos dos curvas de calibración, la primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y la segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección.

La señal óptica para el analito específico de una muestra por determinar se mide simultáneamente en la mezcla de reacción al menos a la primera y segunda longitudes de onda. La primera o la segunda curva de calibración se selecciona para la cuantificación del analito específico, mediante los siguientes criterios para curvas de calibración crecientes:

Para curvas de calibración crecientes:

- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda;

- si al menos una señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda.

Para curvas de calibración decrecientes:

- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda;

- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda. La cantidad del analito específico se cuantifica por comparación con la curva de calibración seleccionada.

Los autores de la presente invención encontraron sorprendentemente que la medición simultánea de un analito específico a dos longitudes de onda diferentes y diferentes tiempos de reacción que generan al menos dos curvas de calibración de una ejecución (una medición) aumenta el intervalo dinámico de los ensayos fotométricos.

Los ensayos fotométricos abarcan inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos, así como ensayos colorimétricos. En los inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos, el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la turbidez de la mezcla de reacción en base a la aglutinación del analito específico y un socio de unión específico del analito, mientras que en los ensayos colorimétricos el analito específico se cuantifica con ayuda de un reactivo de color.

La medición realizada en primer lugar en la mayoría de los casos a una longitud de onda corta y un primer tiempo de reacción permite una detección óptima con respecto a la sensibilidad, y la medición paralela realizada en segundo lugar en la mayoría de los casos a una longitud de onda mayor y un segundo tiempo de reacción garantiza un elevado límite superior de detección, dando ambas como resultado un intervalo dinámico ampliado en comparación con la medición a una única longitud de onda y un único tiempo de reacción. Como consecuencia, se logra una ampliación del intervalo dinámico sin necesidad de modificar los reactivos de ensayo y sus formulaciones, garantizando así una realización rápida y rentable. Posteriormente, dependiendo del valor de señal obtenido para una muestra, se utiliza una curva de calibración adecuada para la cuantificación del analito específico. Ahora es posible aumentar el intervalo dinámico del ensayo en comparación con las técnicas estándar.

En un modo de realización adicional de la presente invención hay casos en los que una gran longitud de onda a un primer tiempo de reacción permite una detección óptima con respecto a la sensibilidad, y la medición paralela a una segunda longitud de onda menor y un segundo tiempo de reacción garantiza un elevado límite superior de detección, dando ambas como resultado un intervalo dinámico ampliado en comparación con la medición a una única longitud de onda y un único tiempo de reacción.

Cuando se realiza un ensayo de aglutinación en el formato de inhibición competitiva, la medición realizada en un primer lugar en la mayoría de los casos a una longitud de onda mayor y un primer tiempo de reacción permite una detección óptima con respecto a la sensibilidad, y la medición paralela realizada en segundo lugar en la mayoría de los casos a una longitud de onda menor y un segundo tiempo de reacción garantiza un elevado límite superior de detección, dando ambas como resultado un intervalo dinámico ampliado en comparación con la medición a una única longitud de onda y un único tiempo de reacción.

En un modo de realización adicional de la presente invención hay casos en los que una baja longitud de onda a un primer tiempo de reacción permite una detección óptima con respecto a la sensibilidad, y la medición paralela a una segunda longitud de onda mayor y un segundo tiempo de reacción garantiza un elevado límite superior de detección, dando ambas como resultado un intervalo dinámico ampliado en comparación con la medición a una única longitud de onda y un único tiempo de reacción.

Definiciones

El término «determinar», como se usa en el presente documento, significa evaluar, diagnosticar, decidir, identificar, evaluar o clasificar si un analito específico de una muestra se cuantifica a partir del cambio en la turbidez de la mezcla de reacción en base a la aglutinación del analito específico y un socio de unión específico del analito mediante inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos o si el analito específico se cuantifica con la ayuda de un reactivo de color en ensayos colorimétricos.

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.

El término «muestra», como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de un líquido corporal seleccionado entre 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 líquidos 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 líquidos corporales o tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación 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.

El término «aglutinación», como se usa en el presente documento, es principalmente un fenómeno químico en el que la interacción superficial entre la macromolécula conduce a la reticulación y a la formación de un gran complejo. La formación de este gran complejo conduce a un aumento en las propiedades de dispersión de la luz que, dependiendo del tamaño del complejo, se puede observar a simple vista o se puede monitorizar fotométricamente mediante detección turbidimétrica y nefelométrica (ver Christopher P. Price, Encyclopedia of Life Sciences 2001, p. 1-7).

El procedimiento de ensayo de la presente invención puede ser cualquier tipo de ensayo de dispersión de la luz, en particular, ensayos turbidimétricos, nefelométricos y colorimétricos. El ensayo se puede usar para determinar la cantidad de cualquier analito específico adecuado para determinarse mediante ensayos turbidimétricos, nefelométricos y colorimétricos, es decir, cualquier analito para el que haya socios de reacción que se puedan unir y que reconozcan específicamente al analito.

El término «turbidimetría y nefelometría» son procedimientos conocidos en la técnica para determinar la cantidad de opacidad o turbidez en una solución en base a 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 y de la 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 θ 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 potenciación por micropartículas.

Preferentemente, se utiliza dentro de la presente invención una «prueba de aglutinación por dispersión de luz potenciada por micropartículas», que también se denomina «inmunoturbidimetría potenciada por partículas» (PETIA). Los inmunoensayos potenciados por partículas se usan rutinariamente en el diagnóstico clínico para la cuantificación de proteínas séricas, fármacos y drogas en analizadores de bioquímica clínica, ya que tienen los beneficios de ser ensayos cuasihomogéneos 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 del 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 mediante mediciones turbidimétricas y nefelométricas.

El material de las micropartículas puede ser cualquier material inorgánico, orgánico o polimérico adecuado para ensayos de dispersión de luz potenciada por micropartículas. El material de las micropartículas puede ser cualquier material inorgánico, orgánico o polimérico adecuado para ensayos de dispersión de luz potenciada por micropartículas. Dichos materiales incluyen, por ejemplo, selenio, carbono, oro; nitruros de carbono, silicio o germanio, por ejemplo, Si_3N_4 ; óxidos de hierro, titanio o silicio, por ejemplo, TiO_2 o SiO_2 ; y materiales poliméricos tales como, por ejemplo, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), resinas epoxi, poli(cloruro de vinilideno), poli(metacrilato de alfa-naftilo), 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 de estireno con un compuesto etilénicamente insaturado copolimerizable, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.210.723. La mayoría de los ensayos basados en partículas emplean partículas de látex, siendo el tipo predominante el poliestireno. Una revisión de la prueba de aglutinación de látex se describe en J. L. Ortega-Vinuesa, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 12, n.º 4 pp.379-408 (2001).

Existen diferentes formatos de prueba para inmunoturbidimetría potenciada por partículas (PETIA), el formato competitivo y el formato directo.

El formato directo se aplica preferentemente para analitos que tienen un gran tamaño. Estos analitos son antígenos polivalentes con múltiples epítomos, por ejemplo, proteínas y microorganismos. Para el formato directo, las partículas están recubiertas con anticuerpos que se aglutinan con el analito.

Los ensayos turbidimétricos y nefelométricos también se pueden realizar en un formato de inhibición competitiva. Este formato se usa con mayor frecuencia para medir moléculas pequeñas, como haptenos, y en general se aplica en diagnóstico para las pruebas de drogas y la monitorización de fármacos. En este formato, el reactivo de ensayo no solo contiene un socio de unión específico del analito, sino también un analito químicamente modificado obtenido uniéndolo a una superficie de microesferas o a otra molécula transportadora, como una proteína (por ejemplo, albúmina de suero bovino) o un polímero u oligómero soluble. A diferencia del analito no modificado, este reactivo es capaz de aglutinarse en presencia de un socio de unión específico del analito debido a las múltiples copias del analito presentes en la molécula. El analito de una muestra se cuantifica a partir del cambio en la turbidez de la mezcla de reacción en base a la aglutinación del analito específico y un socio de unión específico del analito.

Los antígenos están unidos a un agente de reticulación, por ejemplo, polihaptenos, que compite contra el antígeno de la muestra por el sitio de unión del anticuerpo como se muestra en el documento EP 545350. Aquí, un polímero soluble, una proteína o una micropartícula actúan como molécula portadora para múltiples copias del antígeno. La cantidad de antígeno no marcado en la muestra de prueba se mide por su capacidad para competir con el antígeno marcado en el inmunoensayo. El antígeno no marcado bloquea la capacidad del antígeno marcado para unirse, ya que ese sitio de unión en el anticuerpo ya está ocupado. Por lo tanto, en un inmunoensayo competitivo, la medición de una menor cantidad de marcador en el ensayo significa que hay más antígenos no marcados (muestra de prueba) presentes.

Preferentemente se usa un ensayo de aglutinación por dispersión de luz potenciada por micropartículas para determinar la cantidad de un analito que comprende el uso de 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 potenciada 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. Las micropartículas son, en general, aproximadamente esféricas con una distribución de tamaño estrecha, siendo su diámetro medio una buena representación de su tamaño. De acuerdo con la ley de dispersión de la luz (D. J. Newman et al., 1992, Ann. Clin. Biochem. 29, 22-42), las propiedades de fuerte dispersión de la luz son el resultado de un gran tamaño de partícula y/o una elevada relación entre el índice de refracción de la partícula y el del medio, mientras que la débil dispersión de la luz es el resultado de un tamaño de partícula pequeño y/o una baja relación entre el índice de refracción de la partícula y el del medio.

El término «ensayo espectrofotométrico», también denominado «ensayo fotométrico», se conoce bien en la técnica. Los ensayos fotométricos abarcan inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos, así como ensayos colorimétricos. En los inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos, el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la turbidez de la mezcla de reacción en base a la aglutinación del analito específico y un socio de unión específico del analito, mientras que en los ensayos colorimétricos el analito específico se cuantifica con ayuda de un reactivo de color. En los ensayos espectrofotométricos, el curso de la reacción se sigue midiendo un cambio en la cantidad de luz que absorbe la solución del ensayo. Si esta luz se encuentra en la región visible, se puede observar un cambio en el color del ensayo y estos se denominan ensayos colorimétricos. El ensayo de MTT, un ensayo redox que usa un colorante de tetrazolio como sustrato, es un ejemplo de un ensayo colorimétrico. La luz UV se utiliza a menudo, ya que las coenzimas comunes NADH y NADPH absorben la luz UV en sus formas reducidas, pero no en sus formas oxidadas. Por lo tanto, una oxidoreductasa que usa NADH como sustrato se podría someter a ensayo siguiendo la disminución en la absorbancia UV a una longitud de onda de 340 nm a medida que consume la coenzima.

Incluso cuando la reacción enzimática no da como resultado un cambio en la absorbancia de la luz, todavía puede ser posible usar un ensayo espectrofotométrico para la enzima usando un ensayo acoplado. Aquí, el producto de una reacción se usa como el sustrato de otra reacción fácilmente detectable. Un ejemplo para un ensayo acoplado es la enzima hexocinasa, que se puede analizar acoplando su producción de glucosa-6-fosfato a la producción de NADPH, usando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

El término «ensayos colorimétricos», de acuerdo con la presente invención, se usa habitualmente en los diagnósticos clínicos en analizadores de bioquímica clínica altamente automatizados. Debido a su sencillo procedimiento en una sola etapa y a sus cortos tiempos de ejecución, los ensayos colorimétricos homogéneos son candidatos ideales para la aplicación en analizadores automatizados. En realidad, se ofrece un amplio menú de pruebas para los analizadores de bioquímica clínica, por ejemplo, cobas® c de Roche Diagnostics. Los ensayos colorimétricos se caracterizan por la formación o el cambio o la reducción del color en presencia del analito por cuantificar. Las pruebas colorimétricas típicas que se ejecutan en los analizadores de laboratorio son las pruebas de bioquímica clínica y las pruebas inmunoenzimáticas (CEDIA, EMIT). Dichos ensayos se detectan por espectrofotometría en espectrómetros. 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 y una matriz de fotodiodos (12 diodos que producen 12 longitudes de onda entre 340 y 800 nm) como detector. La densidad óptica es directamente proporcional a la concentración del compuesto

coloreado. Si el desarrollo del color está relacionado con la concentración de una sustancia en solución, la concentración se puede medir determinando el grado de absorción de la luz a la longitud de onda apropiada. Un modo de realización de la presente invención es el procedimiento de la presente invención, en el que el analito específico se cuantifica en inmunoensayos colorimétricos con la ayuda de un reactivo de color.

5 El término «reactivo de color» abarca cualquier reactivo de ensayo o una mezcla de reactivos de ensayo que conducen a un cambio de color, formación de color o reducción de color del ensayo que se puede medir en el fotómetro con longitudes de onda típicas que varían de 340 a 800 nm. Muchos ensayos colorimétricos implican una enzima y el sustrato correspondiente que conducen a productos coloreados en una reacción de una o más etapas; el cambio de color puede ser inducido por los cofactores enzimáticos correspondientes como NAD/NADH en lugar de por el propio sustrato. También hay ensayos colorimétricos basados en la reacción específica del analito con un reactivo químico que conduce a un producto coloreado en una reacción de una o más etapas. En inmunoensayos colorimétricos como EMIT o CEDIA, el color se forma normalmente por la reacción de una enzima indicadora, como la β -galactosidasa o una deshidrogenasa, con su sustrato correspondiente que conduce a un producto con propiedades de absorción características y detectables. La reacción de la enzima indicadora con el sustrato tiene lugar normalmente después de la inmunorreacción entre el analito y el anticuerpo que luego desencadena o inhibe la reacción enzimática. En otras pruebas colorimétricas, como las pruebas típicas de bioquímica clínica para analizadores de laboratorio, el color se forma, cambia o reduce por la reacción del analito con enzimas o con cualquier otro reactivo químico específico o una combinación de los mismos. En algunos casos, el analito mismo actúa como enzima. Incluso cuando la reacción enzimática no da como resultado un cambio en la absorbancia de la luz, todavía puede ser posible usar un ensayo espectrofotométrico para la enzima usando un ensayo acoplado. Aquí, el producto de una reacción se usa como el sustrato de otra reacción fácilmente detectable. Un ejemplo para un ensayo acoplado es la enzima hexocinasa, que se puede analizar acoplando su producción de glucosa-6-fosfato a la producción de NADPH, usando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

25 El término «dispersión de Rayleigh» es la dispersión elástica de la luz u otra radiación electromagnética por partículas mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz. Las partículas pueden ser átomos individuales o moléculas. Puede ocurrir cuando la luz viaja a través de sólidos y líquidos transparentes, pero se observa más prominentemente en los gases. La dispersión de Rayleigh es una función de la polarizabilidad eléctrica de las partículas. La dispersión por partículas similares o mayores que la longitud de onda de la luz se trata típicamente mediante la teoría de Mie, la aproximación de dipolos discretos y otras técnicas computacionales. La dispersión de Rayleigh se aplica a las partículas que son pequeñas con respecto a las longitudes de onda de la luz, y que son ópticamente «débiles» (es decir, con un índice de refracción cercano a 1). La cantidad de dispersión de Rayleigh que se produce para un haz de luz depende del tamaño de las partículas y de la longitud de onda de la luz.

35 El término «analito», de acuerdo con la presente invención, abarca cualquier «compuesto de diagnóstico *in vitro*» tal como, por ejemplo, proteínas séricas, fármacos y drogas. Los analitos representativos incluyen, pero no se limitan a, antígenos, haptenos, anticuerpos, proteínas, péptidos, aminoácidos, hormonas, esteroides, marcadores de células cancerosas, células de tejidos, virus, vitaminas, ácidos nucleicos y plaguicidas. Como se utiliza en el presente documento, un «analito» o «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) o para la que se puede preparar un socio de unión específico.

45 Los analitos que se pueden determinar mediante el ensayo de la invención incluyen analitos antigénicos, siendo los socios de unión adecuados los socios de unión inmunológicos. Los analitos antigénicos pueden ser monoméricos o poliméricos, con o sin epítodos repetitivos.

Los analitos antigénicos adecuados incluyen:

- 50 a) Proteínas específicas tales como, por ejemplo, alfa-1-glicoproteína ácida (AAGP), alfa-1-antitripsina (AAT), albúmina en suero (ALBS), microalbúmina (ALBU), apolipoproteína A-1 (APOA), apolipoproteína B (APOB), antiestreptolisina O (ASO), antitrombina III (AT III), complemento C3c (C3C), complemento C4 (C4), proteína C-reactiva (CRP), fibrinógeno (FIBG), fibronectina (FIBR), haptoglobulina (HAPT), inmunoglobulina A, G, M (IgA, IgG, IgM), lipoproteína a (LPA), factores reumatoides (RF), transferrina (TRSF), amiloide sérico A (SAA);
- 55 b) Marcadores tumorales tales como, por ejemplo, alfa-fetoproteína (AFP), subunidad beta de gonadotropina coriónica humana (b-HCG), beta-2-microglobulina, antígenos glucídicos como CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4, antígeno carcinoembrionario (CEA), ferritina, antígeno mucinoso asociado a carcinoma (MCA), enolasa neuroespecífica (NSE), antígeno prostático específico (PSA);
- 60 c) Marcadores cardiovasculares o de fibrinólisis tales como, por ejemplo, proteína de unión a ácidos grasos (FABP), productos de degradación de fibrina y fibrinógeno (FDP), dímero D de FDP, troponina, mioglobina, hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c);
- d) Marcadores de virus tales como, por ejemplo, virus de la gripe, virus del herpes simple (VHS);
- e) Inmunoglobulina E (IgE), insulina, cistatina C
- 65 f) Inmunosupresores tales como, por ejemplo, ciclosporina, everolimus, MPA (ácido micofenólico), sirolimus, tacrolimus
- g) Fármacos tales como, por ejemplo, paracetamol, aminoglicósidos, anfetaminas, amikacina, barbitúricos, benzodiacepinas, buprenorfina, carbamazepina, cocaína, digoxina, digitoxina, éxtasis, gentamicina, inhibidores de la

proteasa del VIH, lidocaína, LSD, MDEA, metadona, metanfetamina, metacualona, 6-monoacetil-morfina, napa, procainamida, fenitoína, fenciclidina, fenobarbital, propoxifeno, quinidina, salicilato, teofilina, THC, antidepresivos tricíclicos, tobramicina, vancomicina, VPA.

5 Los analitos que se pueden determinar mediante el ensayo de la invención incluyen además ácidos nucleicos, siendo los socios de unión adecuados las sondas de captura de oligonucleótidos que muestran una complementariedad de secuencia suficiente para que tenga lugar la hibridación. Los analitos de ácidos nucleicos adecuados incluyen ADN, ARN y derivados de los mismos cuya determinación de la cantidad es de interés en el campo diagnóstico o farmacéutico. Ejemplos de dichos ácidos nucleicos que se determinan cuantitativamente usando el ensayo de la
10 invención son ARN de VIH1, ARN de VIH2, ARN de VHC, ARN de enterovirus, ADN de VIH, ADN de CMV y ADN de *Mycobacterium tuberculosis*.

Como ejemplo, los analitos CRP (proteína C-reactiva), ferritina, mioglobina, dímero D, RF II (factor reumatoide II), DIG (digoxina) y fenobarbital se determinaron en una muestra de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

15 El término «socio de reacción específico del analito», como se usa en el presente documento, es capaz de reaccionar con el analito específico para formar un complejo de reacción, como un inmunocomplejo antígeno-anticuerpo, o para formar un nuevo producto, como el producto resultante de una reacción enzima-sustrato. Los socios de reacción específicos del analito típicos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de unión, antígenos, fragmentos de antígeno, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores y socios de unión potenciados por partículas, enzimas, sustratos (en los casos en que el analito es una enzima), reactivos químicos específicos que conducen a un
20 cambio de color en presencia del analito. 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, biotina:avidina, hormona:receptor, polipéptido:anticuerpo y oligonucleótido:ADN o ARN complementario, enzima-sustrato. Para socios de reacción específicos del analito que conducen a la formación de un
25 complejo de unión con el analito, como es el caso con anticuerpos, el término «socio de unión específico del analito» se puede usar igualmente en lugar de «socio de reacción específico del analito».

30 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')₂ y Fv. Los anticuerpos que se pueden usar como socios de unión inmunológicos 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
35 capacidad de producirse de forma idéntica en cantidades ilimitadas, en general son preferentes los anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.

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
40 une el anticuerpo, se denomina «epítipo». Un antígeno es una sustancia que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria, 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 inmunitaria solo cuando está unida a un portador grande tal como una proteína. El portador puede ser uno que tampoco provoque una respuesta inmunitaria por sí mismo. Una vez que el cuerpo ha generado anticuerpos para un aducto hapteno-portador, el hapteno de molécula pequeña también
45 puede ser capaz de unirse al anticuerpo.

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 de forma preliminar trazando la interrelación entre las concentraciones conocidas del analito en las muestras estándar y los valores analíticos medidos
50 tales como las densidades ópticas de las muestras estándar. Cuando la curva de calibración tiene una linealidad adecuada en un intervalo 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 del intervalo de determinación del análisis cuantitativo.

55 En la práctica, sin embargo, hay muchas curvas de calibración que no son lineales en general. La curva de calibración de los ensayos turbidimétricos, nefelométricos o colorimétricos, preparada a partir de la absorbancia a una longitud de onda específica, es típicamente 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 de múltiples puntos en la que es obligado el uso de las muestras estándar de la pluralidad de concentraciones. Además, esta curva de calibración en forma de S carece de un intervalo de medición
60 que se puede notificar a concentraciones muy bajas y muy altas. Aunque existen varios procedimientos, todavía hay muestras de pacientes con concentraciones que están fuera del intervalo de medición. Como consecuencia, las muestras se deben diluir en los casos en los que la concentración de la muestra supera el límite superior de detección, o se debe usar un mayor volumen de las muestras para las muestras con concentraciones por debajo del límite de
65 detección. Estas remedaciones, llamadas repeticiones, generan gastos adicionales y suponen una pérdida de tiempo, siendo ambos factores críticos para los laboratorios que realizan esos ensayos. Para evitar estos inconvenientes, en

el presente documento se proporcionan nuevos procedimientos para aumentar la sensibilidad y ampliar el intervalo dinámico de los ensayos turbidimétricos, nefelométricos o colorimétricos.

5 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. Para el formato de ensayo directo, las longitudes de onda pequeñas pueden conducir a curvas de calibración con grandes pendientes y señales altas, mientras que para la región de alta concentración las curvas pueden llegar a ser casi planas y conducir a valores de señal comparables para altas concentraciones y consecuentemente también a bajos límites de detección superior.

10 Por otro lado, las longitudes de onda mayores pueden conducir a curvas con pendientes pequeñas, pero a valores de señal distinguibles para la región de alta concentración. La selección de una longitud de onda y un tiempo de reacción correspondiente para el cálculo de señales destinado a la generación de una curva de calibración puede requerir, por tanto, un compromiso entre la sensibilidad analítica y el intervalo de medición superior. En los ensayos colorimétricos la situación es similar. La selección de una longitud de onda cercana al máximo de absorción del producto coloreado

15 formado garantiza una señal alta y una sensibilidad alta; por otro lado, las señales para altas concentraciones de analito pueden estar fuera del intervalo óptico especificado del detector.

En la presente invención se generan simultáneamente dos curvas de calibración para dos longitudes de onda y tiempos de reacción diferentes que permiten sorprendentemente la cuantificación de un analito específico de una muestra con un intervalo dinámico incrementado. Para este fin, la muestra también se mide usando al menos estas dos longitudes de onda y tiempos de reacción diferentes. Al menos una señal óptica de la muestra o al menos un valor de señal calculado de la misma decide qué curva de calibración se va a usar para su cuantificación.

20

El término «primera curva de calibración», como se usa en el presente documento, se genera a partir de las señales ópticas de la mezcla de reacción a una primera longitud de onda y un primer tiempo de reacción, ambos optimizados para alcanzar un límite inferior de detección. La primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda y un primer tiempo de reacción se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección.

25

El término «segunda curva de calibración», como se usa en el presente documento, se genera a partir de las señales ópticas de la mezcla de reacción a una segunda longitud de onda y un segundo tiempo de reacción, ambos optimizados para alcanzar un límite superior de detección elevado. La segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda y un segundo tiempo de reacción se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Trabajar con dos curvas de calibración en lugar de con una, como se hace en la presente invención, también puede mostrar beneficios adicionales tales como aliviar problemas relacionados con el número y concentraciones de calibradores requeridos, así como el procedimiento de ajuste de curva para la curva de calibración. Las curvas de calibración de la presente invención están predeterminadas para el analito específico utilizando una muestra estándar.

30

35

Después de preparar la muestra de medición mezclando la muestra con el socio de reacción específico del analito y el analito, que se puede modificar químicamente, la mezcla de reacción se deja reaccionar durante un tiempo de reacción completo dado. La señal óptica para el analito específico de la muestra por determinar en la mezcla de reacción se mide simultáneamente al menos a la primera y segunda longitudes de onda durante el tiempo de reacción completo.

40

La primera o la segunda curva de calibración, registrada a la primera longitud de onda y un primer tiempo de reacción o registrada a la segunda longitud de onda y un segundo tiempo de reacción, respectivamente, se selecciona para la cuantificación del analito específico, en la que en base a al menos una de las señales ópticas de la muestra o en base a al menos un valor de señal calculado de la misma, se selecciona la primera o la segunda curva de calibración para el cálculo de la concentración de analito, mediante los siguientes criterios:

45

50

Para curvas de calibración crecientes:

Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda y el primer tiempo de reacción;

55 Si al menos una señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción.

Para curvas de calibración decrecientes:

60 Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción;

65 Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda y el primer tiempo de reacción; La cantidad del analito específico se cuantifica por comparación con la curva de calibración seleccionada.

5 La presente invención proporciona un procedimiento para determinar la cantidad de un analito específico mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico de una muestra reacciona con un socio de reacción específico del analito en una mezcla de reacción. Dependiendo del espectrofotómetro y de las longitudes de onda disponibles se generan al menos dos curvas de calibración para una primera y segunda longitudes de onda a un primer y segundo tiempos de reacción, que se predeterminaron para el analito específico. De este modo, la señal óptica para el analito específico de una muestra por determinar se mide simultáneamente en la mezcla de reacción a la primera y segunda longitudes de onda.

10 El término «primera longitud de onda» y primer tiempo de reacción, como se usan en el presente documento, se optimizan para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección. Esto significa que la primera longitud de onda en combinación con el primer tiempo de reacción genera, por ejemplo, señales altas en el caso del formato de ensayo directo, lo que conduce a una curva de calibración que tiene una alta sensibilidad analítica. 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 que se puede medir de forma fiable por un procedimiento analítico. Todos estos términos están relacionados, pero tienen definiciones distintas (ver Lit. clin biochem rev 2008, 29, 49). Por ejemplo, el término «sensibilidad analítica» se define como la pendiente de la curva de calibración.

20 El término «límite inferior de detección» (LDL), como se utiliza en el presente documento, también se denomina intervalo de medición inferior. Una estrategia típica 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). Si al menos una señal óptica de una muestra (de las señales ópticas de la muestra medidas simultáneamente al menos a la primera y segunda longitudes de onda durante el tiempo de reacción completo) o al menos un valor de señal calculado de la misma es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina por comparación con la curva de calibración a la primera longitud de onda y con el primer tiempo de reacción para ensayos con curvas de calibración crecientes. En el caso de ensayos de aglutinación competitiva o en el caso de un ensayo colorimétrico con curvas de calibración decrecientes, se utilizaría la curva de calibración a la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción, si al menos una señal óptica de una muestra (de las señales ópticas de la muestra medidas simultáneamente al menos a la primera y segunda longitudes de onda durante el tiempo de reacción completo) o al menos un valor de señal calculado de la misma es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente.

35 El término «segunda longitud de onda» y segundo tiempo de reacción, como se usan en el presente documento, se optimizan para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Esto significa que la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción generan, por ejemplo, señales distinguibles para diferentes concentraciones de analito en el intervalo de medición superior en el caso del formato de ensayo directo, lo que conduce a una curva de calibración con un intervalo de medición superior alto.

La primera y la segunda longitudes de onda son diferentes, idealmente en al menos 5 nm, mientras que el primero y segundo tiempos de reacción pueden ser diferentes o idénticos.

45 El término «límite superior de detección» (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 se debe confundir 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.

55 El término «intervalo dinámico», en el contexto de la presente invención, describe la magnitud del intervalo de medición de un ensayo y se define en el presente documento como la relación entre el límite superior de detección (UDL) y el límite inferior de detección (LDL). Si no se indica lo contrario, el término «intervalo de medición» se usa como valores de concentración que comienzan en el LDL y terminan en el UDL. Esencialmente, se pueden usar otros términos de sensibilidad además del LDL, como LOD o LOQ, y también se pueden usar otros términos que describan el intervalo de medición superior además del UDL para calcular el intervalo dinámico.

Ambas longitudes de onda, la primera y la segunda longitudes de onda, son las denominadas «longitudes de onda principales» de acuerdo con el estado actual de la técnica para medir el analito.

65 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 y colorimétricos o una señal de luz dispersada en ensayos nefelométricos.

El término «valor de señal calculado de la misma», en el contexto de la presente invención, significa un cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción, y puede ser la diferencia entre dos mediciones de absorbancia, una medición inicial y una final, o puede ser un parámetro cinético que exprese el cambio en la absorbancia por unidad de tiempo. En general, la medición inicial se puede realizar antes o poco después de añadir el reactivo final a la mezcla de reacción.

El término «tiempo de reacción», como se utiliza en el presente documento, es el periodo 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 misma. 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 periodo 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 término «analito específico», en el contexto de la presente invención, significa que, para cada analito de una muestra por 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. Los fotómetros comunes son espectrofotómetros o turbidímetros para inmunoturbidimetría y nefelómetros para inmunonefelometría. Un espectrofotómetro de longitud de onda múltiple conocido en la técnica se usa para medir la señal óptica para el analito específico de una muestra por determinar en la mezcla de reacción de acuerdo con la presente invención. El que se usa preferentemente para ensayos colorimétricos e inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos es un espectrofotómetro.

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 primera y una segunda longitudes de onda entre múltiples longitudes de onda. Un fotómetro, como se usa en el presente documento, es el analizador cobas c® 311 de Roche que tiene la capacidad de medir simultáneamente 12 longitudes de onda entre 300 nm y 800 ± 2 nm. Preferentemente se utilizan las longitudes de onda de 340, 376, 415, 450, 480, 505, 546, 570, 600, 660, 700, 800 ± 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. Las mediciones se realizan preferentemente a una temperatura definida, preferentemente entre 20 y 40 grados Celsius.

Como ejemplo, la primera y segunda longitudes de onda y el primer y segundo tiempos de reacción para la generación de la primera y segunda curvas de calibración destinadas a la cuantificación de varios analitos específicos se determinaron de acuerdo con la presente invención en el analizador cobas c® 311 de Roche en condiciones estándar. El instrumento pipetea automáticamente la muestra y los reactivos de ensayo en celdas de reacción (= cubeta). El instrumento mide la absorbancia de forma simultánea a 12 longitudes de onda diferentes: 340, 376, 415, 450, 480, 505, 546, 570, 600, 660, 700, 800 ± 2 nm. Para cada celda de reacción se mide un blanco en agua y luego se toman lecturas de absorbancia 57 veces en 10 minutos, dando así un total de 57 puntos de medición para la absorbancia a cada longitud de onda. La concentración se puede calcular utilizando al menos uno de estos puntos de medición. Las mediciones se realizan a 37 grados Celsius.

Para el analito CRP (formato de ensayo directo), la primera longitud de onda se determinó en 505 nm y la segunda longitud de onda en 600 nm, mientras que la longitud de onda estándar es de 570 nm. El primer tiempo de reacción se determinó en 2,0 min y el segundo tiempo de reacción en 1,2 min, mientras que el tiempo de reacción estándar es de 2,0 min. Para la primera y segunda curvas de calibración, así como para la curva de calibración estándar, se registró y usó 800 nm para fines de corrección mediante borrado.

Para el analito Ferritina (formato de ensayo directo), la primera longitud de onda se determinó en 505 nm y la segunda longitud de onda en 570 nm, mientras que la longitud de onda estándar es de 570 nm. El primer tiempo de reacción se determinó en 4,9 min y el segundo tiempo de reacción en 5,1 min, mientras que el tiempo de reacción estándar es de 5,1 min. Para la primera y segunda curvas de calibración, así como para la curva de calibración estándar, se registró y usó 800 nm para fines de corrección mediante borrado.

Para el analito Mioglobina (formato de ensayo directo), la primera longitud de onda se determinó en 505 nm y la segunda longitud de onda en 660 nm, mientras que la longitud de onda estándar es de 570 nm. El primer tiempo de reacción se determinó en 6,7 min y el segundo tiempo de reacción en 2,6 min, mientras que el tiempo de reacción estándar es de 4,7 min. Para la primera y segunda curvas de calibración, así como para la curva de calibración estándar, se registró y usó 800 nm para fines de corrección mediante borrado.

Para el analito Dímero D (formato de ensayo directo), la primera longitud de onda se determinó en 800 nm y la segunda longitud de onda en 700 nm, mientras que la longitud de onda estándar es de 800 nm. El primer tiempo de reacción se determinó en 4,3 min y el segundo tiempo de reacción en 1,4 min, mientras que el tiempo de reacción estándar es de 4,3 minutos.

Para el analito Factor reumatoide II (formato de ensayo directo), la primera longitud de onda se determinó en 546 nm y la segunda longitud de onda en 660 nm, mientras que la longitud de onda estándar es de 570 nm. El primer tiempo de reacción se determinó en 8,5 min y el segundo tiempo de reacción en 1,4 min, mientras que el tiempo de reacción estándar es de 2,2 min. Para la primera y segunda curvas de calibración, así como para la curva de calibración estándar, se registró y usó 800 nm para fines de corrección mediante borrado.

Para el analito DIG (digoxina) (formato de ensayo competitivo), la primera longitud de onda se determinó en 660 nm y la segunda longitud de onda en 505 nm, mientras que la longitud de onda estándar es de 660 nm. El primer tiempo de reacción se determinó en 4,7 min y el segundo tiempo de reacción en 4,7 min, mientras que el tiempo de reacción estándar es de 4,7 min. Para la segunda curva de calibración, se registró y usó 800 nm para fines de corrección mediante borrado.

Para el analito Fenobarbital (formato de ensayo competitivo), la primera longitud de onda se determinó en 600 nm y la segunda longitud de onda en 505 nm, mientras que la longitud de onda estándar es de 600 nm. El primer tiempo de reacción se determinó en 6,5 min y el segundo tiempo de reacción en 7,9 min, mientras que el tiempo de reacción estándar es de 6,5 min. Para la primera y segunda curvas de calibración, así como para la curva de calibración estándar, se registró y usó 800 nm para fines de corrección mediante borrado. En la mayoría de los casos, el intervalo dinámico se mejoró mediante el uso de la estrategia de la presente invención, ya sea mejorando el LDL y/o el UDL del ensayo. Solo en el caso de Digoxina y Dímero D la mejoría es moderada.

A partir de estos ejemplos de ensayo representados anteriormente, se pueden deducir algunas tendencias para el formato de ensayo directo. La primera longitud de onda, utilizada para la primera curva de calibración y para la detección sensible del analito, suele ser más pequeña que la segunda longitud de onda, utilizada para la segunda curva de calibración y la detección de altas concentraciones de analito. Se muestra una excepción para el ensayo de Dímero D. Además, el primer tiempo de reacción es mayor que o idéntico al segundo tiempo de reacción en la mayoría de los casos. Se identifica una excepción para el ensayo de Ferritina, que muestra un primer tiempo de reacción que es menor que el segundo tiempo de reacción. Se observan tendencias similares para el ensayo con formato de ensayo competitivo que parecen comportarse a la inversa de los ensayos con formato directo.

Un modo de realización de la presente invención es que, opcionalmente, una longitud de onda adicional se determina como un valor en blanco para la corrección de interferencias y la compensación del ruido fotométrico, también conocida como medición bicromática (Clin. Chem. 1979, 25, 1482-1484). Para cada una de las dos longitudes de onda principales es opcional si se registra una longitud de onda adicional para fines de corrección restando la señal a la longitud de onda de corrección de la señal a la longitud de onda principal. Preferentemente, para el analito CRP, esta longitud de onda adicional para las correcciones se registra a 800 nm.

Para la «primera longitud de onda» y el primer tiempo de reacción y para la «segunda longitud de onda» y el segundo tiempo de reacción, las curvas de calibración se construyen con muestras estándar para un analito específico que se miden simultáneamente. De acuerdo con la presente invención, el registro de la primera curva de calibración a la primera longitud de onda (λ_1) y el primer tiempo de reacción (t_1) se optimiza para la sensibilidad o el límite inferior de detección (LDL). El registro de la segunda curva de calibración a la segunda longitud de onda (λ_2) y el segundo tiempo de reacción (t_2) se optimiza para el límite superior de detección (UDL) elevado. Como ejemplo, para el ensayo de CRP, las muestras estándar se miden simultáneamente a las 12 longitudes de onda disponibles en el cobas c 311, incluidas λ_1 (= 505 nm) y λ_2 (= 600 nm) y la longitud de onda de corrección (800 nm), en un periodo de tiempo de 10 min (= tiempo de reacción completo). Al corregir todos los valores de absorbancia a 505 nm medidos durante el tiempo de reacción completo (aproximadamente 10 min) mediante la sustracción de los valores de absorbancia correspondientes a 800 nm, seguido del cálculo de los valores de señal para el primer tiempo de reacción (t_1) de la misma calculando la diferencia entre el valor de absorbancia poco después de añadir el reactivo final a la mezcla de reacción y el valor de absorbancia registrado 2,0 min después de que el reactivo final se añadiera a la mezcla de reacción, se obtiene la curva de calibración 1; simultáneamente, al corregir todos los valores de absorbancia a 600 nm medidos durante el tiempo de reacción completo (aproximadamente 10 min) mediante la sustracción de los valores de absorbancia correspondientes a 800 nm seguido del cálculo de los valores de señal para el segundo tiempo de reacción (t_2) de la misma calculando la diferencia entre el valor de absorbancia poco después de añadir el reactivo final a la mezcla de reacción y el valor de absorbancia registrado 1,2 min después de que se añadiera el reactivo final a la mezcla de reacción, se obtiene la curva de calibración 2.

Un modo de realización adicional es el procedimiento de acuerdo con la presente invención en el que se generan dos curvas de calibración que se registran a las mismas longitudes de onda y a diferentes tiempos de reacción.

Después de construir las curvas de calibración 1 y 2 para el analito específico, se puede determinar la concentración de las muestras. Por lo tanto, una muestra que contiene un analito específico que ha de ser determinado se agrega a los reactivos de prueba en una cubeta. Esta mezcla se incuba durante un cierto tiempo de reacción, aquí el tiempo de reacción completo, por ejemplo, 10 min.

El término «señal óptica» para este analito, también denominada absorbancia como se usa en el presente documento, se mide simultáneamente en la mezcla de reacción al menos a las dos longitudes de onda predeterminadas, la primera

y la segunda longitudes de onda, en una ejecución durante el tiempo de reacción completo. Opcionalmente, también se puede registrar la señal óptica a la longitud de onda de corrección.

El término «valor umbral», como se usa en el presente documento, también denominado «valor de corte», se usa para valores de absorbancia definidos o una cantidad definida del analito del presente procedimiento; se usan preferentemente los valores de absorbancia. Idealmente, el valor umbral se toma del punto en el que las dos curvas de calibración del presente procedimiento cambian de la primera curva de calibración a la segunda curva de calibración. Solo se puede definir un valor de absorbancia como umbral, ya sea un valor ($A[\lambda_1, t_1]$) para la primera longitud de onda y el primer tiempo de reacción o un valor ($A[\lambda_2, t_2]$) para la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción, o se pueden considerar dos valores de absorbancia ($A[\lambda_1, t_1]$ y $A[\lambda_2, t_2]$) en paralelo. Como ejemplo, para el ensayo de CRP, $A[\lambda_1, t_1]$ y/o $A[\lambda_2, t_2]$ se pueden definir como valores umbral que corresponden a una concentración de 73 mg/l para CRP. En el caso de ensayos con curvas de calibración crecientes como es el caso con CRP, el valor $A[\lambda_1, t_1]$ es el valor de señal más alto de la curva de calibración 1, y $A[\lambda_2, t_2]$ es el valor de señal más bajo de la curva de calibración 2. Las señales de absorbancia sin procesar correspondientes a los valores de absorbancia $A[\lambda_1, t_1]$ y/o $A[\lambda_2, t_2]$ también se pueden definir como umbral. Si al menos una señal óptica de una muestra o al menos un valor de señal calculado de la misma supera el valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina por comparación con la segunda curva de calibración a la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción. Es importante para un ensayo de IVD que los valores umbral se elijan a una concentración que no coincida con el valor de la decisión clínica.

Para la selección del punto en el que las dos curvas de calibración del presente procedimiento cambian de la primera curva de calibración a la segunda curva de calibración existe, en general, una gran flexibilidad. Es importante que en el punto seleccionado ambas curvas cumplan los requisitos relacionados con la linealidad del procedimiento y con la precisión y la sensibilidad. Por ejemplo, la curva de calibración 2 idealmente debería tener un LDL que al menos cubra la concentración en el punto seleccionado; y la curva de calibración 1 idealmente debería mostrar la linealidad del procedimiento al menos hasta dicho punto seleccionado.

La selección de la primera longitud de onda óptima y el primer tiempo de reacción para la primera curva de calibración, caracterizada por producir un LDL óptimo, así como la selección de la segunda longitud de onda óptima y el segundo tiempo de reacción para la segunda curva de calibración, caracterizada por producir un UDL óptimo, se realizaron mediante un procedimiento de prueba y error. Aunque hay algunas tendencias para elegir las longitudes de onda y los tiempos de reacción óptimos, también hay excepciones a dichas tendencias y, como consecuencia, se deben verificar todas las combinaciones de longitudes de onda y tiempos de reacción para determinar su capacidad de producir un LDL o UDL óptimo. Sin embargo, al hacer estos cálculos manualmente, es decir, sin la ayuda de herramientas de cálculo automatizadas ni algoritmos, no es posible realizar los cálculos para LDL y UDL para todas las combinaciones de longitudes de onda y tiempos de reacción empleando un esfuerzo razonable y en un periodo de tiempo razonable. Por esta razón, el siguiente procedimiento se usó en la presente invención para el desarrollo de un procedimiento para un cierto ensayo, en otras palabras, para la selección de la primera longitud de onda y el primer tiempo de reacción óptimos, así como para la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción, así como el umbral:

1) Medición de los valores de absorbancia de las siguientes muestras simultáneamente a las 12 longitudes de onda disponibles, por ejemplo, en el analizador cobas c 311 durante el tiempo de reacción completo:

- al menos 6 estándares en duplicados para la calibración,
- una muestra en blanco en 21 réplicas para la determinación de LDL,
- al menos 2 muestras en 21 réplicas para la determinación de la precisión (coeficiente de variación),
- series de dilución que cubren concentraciones, por ejemplo, 2-4 veces superiores al UDL conocido para la determinación del UDL y la linealidad del procedimiento.

2) Selección del primer tiempo de reacción (t_1) y la primera longitud de onda (λ_1) para la primera curva de calibración mediante el análisis de las 12 curvas cinéticas, registradas a las 12 longitudes de onda principales diferentes durante el tiempo de reacción completo, de la muestra en blanco (21 réplicas) y de una muestra a baja concentración. Opcionalmente, las longitudes de onda de corrección se pueden considerar adicionalmente aumentando así el número de curvas cinéticas por analizar para la selección de las mejores longitudes de onda y tiempos de reacción. La muestra a baja concentración tiene una concentración en el intervalo de 1-5 veces el valor de LOQ conocido y puede ser una de las muestras estándar o una de las muestras de precisión medidas en el punto 1). Las curvas cinéticas describen los valores de absorbancia en el eje de ordenadas y el tiempo (en el caso del cobas c 311, el tiempo se representa como punto de medición) en el eje de abscisas. Solo se consideran los valores de absorbancia que se encuentran dentro del intervalo óptico especificado del detector (absorbancia de 0,0000-3,0000). En la primera etapa se determinan algunos tiempos de reacción óptimos para cada longitud de onda de la curva cinética correspondiente eligiendo un punto de tiempo (o punto de medición) inicial, antes o poco después de añadir el reactivo final, y eligiendo un punto de tiempo (o punto de medición) final, cumpliendo las siguientes pautas:

la variación de señal de la muestra en blanco (21 réplicas) es mínima y la señal de la muestra en blanco es baja en el punto de tiempo inicial

la lectura de absorbancia para la muestra a baja concentración es baja en el punto de tiempo inicial y alta en el punto de tiempo final, es decir, la diferencia entre la lectura de absorbancia inicial y la lectura de absorbancia final es máxima.

El término «tiempo de reacción», como se usa en el presente documento, es la diferencia entre el punto de tiempo

inicial y el punto de tiempo final. Después de haber seleccionado algunos tiempos de reacción óptimos para cada longitud de onda, se calcula el LDL para las 12 longitudes de onda en estos tiempos de reacción. La longitud de onda y el tiempo de reacción que producen el mejor LDL se seleccionan como la primera longitud de onda y el primer tiempo de reacción para la generación de la primera curva de calibración.

- 5
- 3) Selección del segundo tiempo de reacción (t_2) y la segunda longitud de onda (λ_2) para la segunda curva de calibración mediante el análisis de las 12 curvas cinéticas, registradas a las 12 longitudes de onda principales diferentes durante el tiempo de reacción completo, de las series de dilución que cubren concentraciones, por ejemplo, 2-4 veces superiores al UDL conocido. Opcionalmente, las longitudes de onda de corrección se pueden considerar
- 10 adicionalmente aumentando así el número de curvas cinéticas por analizar para la selección de las mejores longitudes de onda y tiempos de reacción. Solo se consideran los valores de absorbancia que se encuentran dentro del intervalo óptico especificado del detector (0,0000-3,0000). En la primera etapa se determinan algunos tiempos de reacción óptimos para cada longitud de onda de la curva cinética correspondiente eligiendo un punto de tiempo (o punto de medición) inicial, antes o poco después de añadir el reactivo final, y eligiendo un punto de tiempo (o punto de medición) final, cumpliendo los siguientes criterios:
- 15
- el punto de tiempo inicial se elige en un momento antes o poco después de añadir el reactivo final
 - el punto de tiempo final se elige de forma que las muestras más concentradas de las series de dilución muestren señales distinguibles y crecientes con concentraciones crecientes, es decir, el valor absoluto de la diferencia entre la lectura de absorbancia inicial y la lectura de absorbancia final para una determinada muestra concentrada es mayor
- 20 que el valor absoluto correspondiente del valor de diferencia para la muestra con la siguiente concentración más baja.

Después de haber seleccionado algunos tiempos de reacción óptimos (diferencia entre el punto de tiempo inicial y el punto de tiempo final) para cada longitud de onda, se calcula el UDL para las 12 longitudes de onda en estos tiempos de reacción. La longitud de onda y el tiempo de reacción que producen el mejor UDL se seleccionan como la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción para la generación de la segunda curva de calibración.

- 25
- 4) Configuración del umbral: los valores umbral se establecen a una concentración en la que las curvas de calibración cambian de la primera a la segunda curva de calibración, es decir, se usa la primera curva de calibración para la cuantificación del analito a concentraciones más bajas y se usa la segunda curva de calibración para la cuantificación del analito a concentraciones más altas. Para la selección del punto o la concentración en la que cambian las curvas de calibración existe, en general, una gran flexibilidad.
- 30

En este punto es importante que se cumplan los siguientes criterios:

- 35
- que ambas curvas de calibración muestren la linealidad del procedimiento, la primera curva de calibración en el intervalo desde el LDL hasta la concentración en el umbral y la segunda curva de calibración en el intervalo desde la concentración en el umbral hasta el UDL,
 - que la segunda curva de calibración muestre un LDL que al menos cubra la concentración en el umbral,
 - que la concentración en el umbral no sea idéntica al valor de decisión clínica de la prueba IVD.

- 40 Por lo tanto, un modo de realización es un procedimiento implementado por ordenador para determinar la longitud de onda, el tiempo de reacción y el umbral óptimos de acuerdo con la presente invención, que comprende las etapas de:
- a) recibir un conjunto de datos que representen los valores de absorbancia de las muestras disponibles simultáneamente en un analizador, en el que dicho conjunto de datos incluye una pluralidad de puntos de datos:
- 45
- estándares por duplicado para la calibración,
 - una muestra en blanco para la determinación del LDL,
 - al menos 2 muestras en réplicas para la determinación de la precisión,
- b) realizar series de dilución que cubran las concentraciones que determinan el primer tiempo de reacción y la primera longitud de onda para la primera curva de calibración analizando las curvas cinéticas, registradas a diferentes longitudes de onda principales durante el tiempo de reacción completo, de la muestra en blanco y una muestra a baja
- 50 concentración,
- c) determinar el segundo tiempo de reacción y la segunda longitud de onda para la segunda curva de calibración analizando las curvas cinéticas, registradas a diferentes longitudes de onda principales durante el tiempo de reacción completo,
- d) establecer los valores umbral a una concentración en la que las curvas de calibración cambian de la primera a la
- 55 segunda curva de calibración, usando la primera curva de calibración para la cuantificación del analito a concentraciones más bajas y usando la segunda curva de calibración para la cuantificación del analito a concentraciones más altas.

60 El procedimiento se puede implementar utilizando sistemas informáticos personales convencionales que incluyen, pero no se limitan a, un dispositivo de entrada para introducir un conjunto de datos, tal como un teclado, un ratón y similares; un dispositivo de visualización para representar un punto de interés específico en una región de una curva, tales como un monitor; un dispositivo de procesamiento necesario para llevar a cabo cada etapa del procedimiento, tal como una CPU; una interfaz de red tal como un módem, un dispositivo de almacenamiento de datos para almacenar el conjunto de datos, un código informático que se ejecuta en el procesador y similares. Además, el procedimiento

65 también se puede implementar en un analizador, por ejemplo, el analizador cobas c 311.

En el caso de que estos criterios no se cumplan para el umbral a cualquier concentración, las condiciones para la primera curva de calibración (primera longitud de onda y primer tiempo de reacción) y/o las condiciones para la segunda curva de calibración (segunda longitud de onda y segundo tiempo de reacción) tienen que cambiarse para que se cumplan los criterios. Dichos cambios pueden comprometer el factor de mejora logrado para el intervalo dinámico. En el procedimiento descrito anteriormente para la selección de las longitudes de onda y los tiempos de reacción óptimos para las curvas de calibración 1 y 2 solo se aplicó el procedimiento de dos puntos finales para calcular las señales. Un procedimiento 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. Esencialmente, para la selección de la primera longitud de onda y el primer tiempo de reacción óptimos, así como para la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción, se considera adicionalmente un procedimiento de cálculo de señales cinéticas que puede proporcionar mejores resultados en ciertos ensayos en comparación con el procedimiento de dos puntos finales.

Al seleccionar la primera o la segunda curva de calibración para la cuantificación del analito específico, que depende de la señal óptica de la muestra que se va a determinar, se logra un intervalo dinámico o intervalo de medición ampliado.

El término «intervalo dinámico ampliado», como se usa en el presente documento, significa que se pueden determinar muestras con una concentración muy baja del analito específico y/o muestras con una concentración muy alta del analito específico, que no es el caso de los procedimientos estándar que usan solo una longitud de onda principal y una curva de calibración. De acuerdo con la presente invención, la mejora del límite inferior de detección y/o del límite superior de detección da como resultado un intervalo dinámico mejorado.

De acuerdo con la presente invención, «una alta concentración de un analito específico», como se usa en este documento, no está causando un «efecto gancho» de dosis alta. El efecto gancho es un fenómeno común en el trabajo diario de un laboratorio clínico. Principalmente, el efecto gancho depende de la concentración del analito, ya que una cantidad excesiva de analito anula la capacidad de unión del anticuerpo de captura. Esto da como resultado una señal inapropiadamente baja que causa un resultado erróneo bajo o normal (resultado «enganchado») para una muestra con una concentración de analito excesivamente elevada. Implica la presencia de un gran exceso de analito que sature todos los sitios de unión del anticuerpo. Existe un efecto gancho si en las muestras diluidas se miden valores más altos que en la muestra no diluida. Algunos analizadores automatizados tienen un sistema para reconocer el exceso de un analito mientras la muestra se está diluyendo simultáneamente. De acuerdo con la presente invención, no se puede evitar que una cantidad excesiva de un analito específico cause un «efecto gancho» de dosis alta en comparación con la segunda curva de calibración.

Un modo de realización de la presente invención es la provisión de marcos para corregir curvas de calibración. El analito CRP se mide a 505 nm para la primera longitud de onda para la detección sensible y a 600 nm para la segunda longitud de onda para el límite superior de detección. La tercera longitud de onda se registra a 800 nm para corregir las interferencias y las compensaciones de la mayor parte del ruido fotométrico en la primera y segunda curvas de calibración.

El término «tiempo de reacción completo», como se usa en el presente documento, es el periodo de tiempo de medición de un analito específico a una pluralidad de longitudes de onda. Para la selección de las mejores dos longitudes de onda destinadas a la generación de las dos curvas de calibración, los estándares se midieron simultáneamente a las 12 longitudes de onda diferentes disponibles en el instrumento cobas c®. Solo se consideraron los valores de absorbancia que se encuentran dentro del intervalo óptico del detector (absorbancia de 0,0000-3,0000).

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. Más preferentemente, la señal óptica del analito específico se mide simultáneamente al menos a la primera y a la segunda longitudes de onda principales. El término «retardo de tiempo», como se usa en el presente documento, es el periodo de tiempo entre la primera y la segunda longitudes de onda principales para la detección del analito específico. 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.

Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento para aumentar la sensibilidad y/o el intervalo dinámico de ensayos fotométricos, en el que el analito específico de una muestra reacciona con un socio de reacción específico del analito en una mezcla de reacción, que comprende las etapas de generar al menos dos curvas de calibración, en la que la primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y la segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico,

maximizando así el límite superior de detección, y la señal óptica se mide simultáneamente para el analito específico de una muestra por determinar en la mezcla de reacción al menos a la primera y segunda longitudes de onda. La primera o la segunda curva de calibración se selecciona para la cuantificación del analito específico, mediante los siguientes criterios:

5 Para curvas de calibración crecientes:

Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda. Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda y, finalmente, cuantificando la cantidad del analito específico.

Para curvas de calibración decrecientes:

Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda. Si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda y, finalmente, cuantificando la cantidad del analito específico. Preferentemente, se generan dos curvas de calibración para una primera y una segunda longitudes de onda y tiempos de reacción, que estaban predeterminados para un analito específico. De acuerdo con la presente invención, el límite inferior de detección y el límite superior de detección dan como resultado un aumento de la sensibilidad y/o del intervalo dinámico. El beneficio es un número reducido de repeticiones, lo que conduce a un mayor rendimiento de las muestras y un menor tiempo de respuesta. Además, se redujeron los costos de prueba y se mejoró la fiabilidad.

La presente invención conduce a una mejora para el límite inferior de detección (LDL) y/o el límite superior de detección (UDL). Preferentemente, se muestra una mejora de 1 a 2 veces para el límite inferior de detección (LDL) y/o el límite superior de detección (UDL). Más preferentemente, se muestra una mejora de 3 a 4 veces para el límite inferior de detección (LDL) y/o el límite superior de detección (UDL). Lo más preferentemente, la presente invención conduce a una mejora de 5 veces para el límite inferior de detección (LDL) y/o el límite superior de detección (UDL). Preferentemente, el factor de mejora es mayor que el factor 1, más preferentemente el factor es mayor que el factor 3, más preferentemente el factor de mejora es mayor que el factor 5, como se muestra para el ensayo directo de RF II.

Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento para determinar la cantidad de CRP mediante inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos, en el que la CRP en una muestra se cuantifica a partir del cambio en la turbidez de la mezcla de reacción en base a la agregación de CRP y un socio de unión a CRP. Se generan dos curvas de calibración para una primera y una segunda longitudes de onda y el primer y segundo tiempos de reacción correspondientes, que estaban predeterminados para CRP. La señal óptica para CRP de una muestra por determinar se mide simultáneamente en la mezcla de reacción al menos a la primera y segunda longitudes de onda durante el tiempo de reacción completo. La primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones de CRP, maximizando así el límite inferior de detección, mientras que la segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones de CRP, maximizando así el límite superior de detección. La primera o la segunda longitud de onda y el primer o segundo tiempo de reacción se seleccionan para la cuantificación de CRP. Si al menos una de las señales ópticas de una muestra medida durante el tiempo de reacción completo o al menos un valor de señal calculado de la misma es inferior a un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración de CRP se determina por comparación con la curva de calibración a la primera longitud de onda y primer tiempo de reacción. Por otra parte, si al menos una de las señales ópticas de una muestra o al menos un valor de señal calculado de la misma supera el valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración de CRP se determina por comparación con la curva de calibración a la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción.

En el caso de la prueba de CRP, la curva de calibración registrada a 505 nm con un tiempo de reacción de 2,0 min y corregida a 800 nm dio como resultado el mejor LDL (0,036 mg/l). La comparación entre el rendimiento estándar y la estrategia de la invención da como resultado un aumento de la sensibilidad (LDL) en un factor de 1,8 y una ampliación del intervalo dinámico en un factor de aproximadamente 3,1. La curva de calibración 2 registrada a 600 nm con un tiempo de reacción de 1,2 min y corregida a 800 nm dio como resultado el mejor UDL (660 mg/l). El UDL muestra un aumento en un factor de 1,8 en comparación con las condiciones estándar.

Además, para ensayos turbidimétricos potenciados por partículas, la combinación de la estrategia de la presente invención con tamaños de partículas y niveles de carga de anticuerpo adaptados se evaluó usando el ensayo CRP L3 como parámetro principal. El ensayo CRP L3 incluye dos tipos diferentes de partículas, como se describe en el documento EP 0898169, partículas de látex grandes (MP2) recubiertas con anticuerpos altamente afines y partículas de látex pequeñas (MP1) recubiertas con anticuerpos menos afines (clon 21F12, concentración para recubrimiento de látex: 45 mg/g de látex).

Se obtuvo una mejora adicional de la sensibilidad del ensayo de CRP usando partículas grandes de 230-400 nm, más

preferentemente de 250-350 nm, lo más preferentemente de 280-320 nm de diámetro para una mayor eficacia de dispersión de la luz y usando un alto nivel de carga de las partículas con anticuerpo, obtenido usando una concentración del anticuerpo de 55-70 mg de IgG/gramo de partículas, preferentemente de 60-70 mg de IgG/gramo de partículas para su conjugación a las partículas.

5 La combinación del procedimiento de la presente invención con tamaños de partículas grandes de 230-330 nm y una concentración de anticuerpo de 55-70 mg de IgG/gramo de partículas para la reacción de conjugación conduce a un aumento adicional de la sensibilidad (LDL) en comparación con el ensayo estándar (tamaño de partículas grandes: 220 nm, concentración de anticuerpo de 50 mg de IgG/gramo de partículas para la conjugación de las partículas grandes; tamaño de partículas pequeñas: 110-140 nm) por un factor de aproximadamente ocho y, por lo tanto, a una ampliación del intervalo dinámico en un factor de aproximadamente ocho.

15 Un modo de realización adicional de la presente invención es, por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención en el que, para el analito CRP específico, se usan un tamaño de partícula para partículas grandes de 230-400 nm y para partículas pequeñas de aproximadamente 110-140 nm y una concentración de anticuerpo de 55-70 mg de IgG/gramo de partículas para la reacción de conjugación para la conjugación de las partículas grandes. La primera curva de calibración se registró a una primera longitud de onda de 505 nm con 800 nm como longitud de onda de corrección y un primer tiempo de reacción de 2,8 min; la segunda curva de calibración se midió a 570 nm como longitud de onda principal y 800 nm como longitud de onda de corrección y un tiempo de reacción de 2,0 min. El procedimiento estándar tiene una sola curva de calibración, medida a 570 nm como longitud de onda principal y 800 nm como longitud de onda de corrección y un tiempo de reacción de 2,0 min.

25 Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de al menos dos longitudes de onda y al menos dos tiempos de reacción predeterminados para un analito específico para la generación de al menos dos curvas de calibración para cuantificar la cantidad de un analito específico de ensayos fotométricos, en el que una primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y una segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección, y la señal óptica del analito específico a la primera y segunda longitudes de onda se mide simultáneamente durante el tiempo de reacción completo.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra las curvas de calibración a diferentes longitudes de onda del ensayo de CRP. Se miden simultáneamente 6 estándares a las 12 longitudes de onda diferentes disponibles en el instrumento cobas c®. Solo se consideraron los valores de absorbancia que se encuentran dentro del intervalo óptico del detector (absorbancia de 0,0000-3,0000). Aquí se muestran cinco curvas de calibración como ejemplos que se registraron en 5 longitudes de onda principales diferentes de las 12 longitudes de onda posibles, para las longitudes de onda principales de 480 nm, 505 nm, 546 nm, 570 nm y 600 nm. Todas las curvas se corrigieron a la longitud de onda de 800 nm y se tomaron en un tiempo de reacción de 2,0 min.

La Figura 2 muestra la mejora obtenida con el ensayo de CRP mediante la aplicación del procedimiento de la presente invención en combinación con diferentes tamaños de partículas y diferentes cargas de anticuerpos de las partículas.

45 En el primer ejemplo, la nueva estrategia se combinó con la adaptación de partículas dirigida a aumentar la sensibilidad (LDL). La combinación de la nueva estrategia con tamaños de partícula más grandes (290 nm en lugar de 220 nm de diámetro de partículas MP2) para aumentar la eficacia de dispersión de la luz y de niveles de carga de anticuerpo más elevados (concentración de anticuerpos de 60 mg de IgG/g de partículas para la reacción de conjugación de las partículas grandes) para aumentar la reactividad inmunitaria conduce a un aumento de la sensibilidad (LDL) en un factor de aproximadamente ocho y a una ampliación del intervalo dinámico en un factor de ocho.

50 En el segundo ejemplo, los tamaños y la carga de anticuerpos de ambas partículas, las partículas grandes MP2 y las partículas pequeñas MP1, se modificaron:
 - partículas MP2 más grandes (290 nm en lugar de 220 nm), conjugadas con una concentración de anticuerpo de 70 mg de IgG/g de partículas, y
 - partículas MP1 más pequeñas (90 nm en lugar de 110-140 nm) conjugadas con una concentración de anticuerpo de 50 mg de IgG/g de partículas

60 Estas nuevas partículas dieron como resultado un LDL mejorado en un factor de 3 y un UDL mejorado en un factor de aproximadamente 2 en comparación con el ensayo estándar (MP1: 110-140 nm con 45 mg de IgG/g y MP2: 220 nm con 50 mg de IgG/g).

La Figura 3 muestra esquemáticamente cómo se pueden colocar los valores umbral para la selección de una de las dos curvas de calibración de la presente invención.

65 La Figura 4 muestra las curvas de calibración para el ensayo de CRP. La curva de calibración estándar se obtiene

mediendo a 570-800 nm. La curva de calibración 1 (Cal 1) registrada a 505-800 nm y un tiempo de reacción de 2,0 min dio como resultado el mejor LDL (0,036 mg/l). La curva de calibración 2 (Cal 2) registrada a 600-800 nm y 1,2 min de tiempo de reacción dio como resultado el mejor UDL (660 mg/l). El valor umbral para CRP se puede definir como al menos uno de los dos valores de absorbancia a 73 mg/l.

5 La Figura 5 muestra el beneficio de la nueva estrategia mediante el uso de pruebas comerciales de la cartera de productos de Roche. Los analitos que se determinaron son Ferritina, Mioglobina, Dímero D, Factor reumatoide II (RF II), CRP, Digoxina (DIG), Fenobarbital (PHENO). En la segunda columna se muestran las condiciones para las curvas de calibración estándar. Las columnas tres y cuatro muestran las nuevas condiciones para las curvas de calibración 1 y 2. Para cada analito específico se determinaron las mejores longitudes de onda para LDL y UDL y los factores de mejora para LDL, UDL. En la mayoría de los casos, la nueva estrategia mejora el intervalo dinámico sin ninguna modificación de reactivos o formulaciones.

15 La Figura 6 muestra curvas cinéticas ejemplares para el ensayo de ferritina que muestran la magnitud de señal (absorbancia) de una muestra a baja concentración (10 µg/ml de ferritina, 21 réplicas) y una muestra en blanco (0 µg/ml de ferritina, 21 réplicas) a 2 longitudes de onda principales diferentes, 505 nm (figura 6 a) y 570 nm (figura 6 b). Las curvas cinéticas describen los valores de absorbancia en el eje de ordenadas y el tiempo (en el caso del cobas c 311, el tiempo se representa como punto de medición) en el eje de abscisas. Los tiempos de reacción óptimos para la primera curva de calibración se determinan eligiendo un punto de tiempo (o punto de medición) inicial, antes o poco después de añadir el reactivo final, y eligiendo un punto de tiempo (o punto de medición) final, cumpliendo las siguientes pautas:

20 - la variación de señal de la muestra en blanco (21 réplicas) es mínima y la señal de la muestra en blanco es baja en el punto de tiempo inicial
 - la lectura de absorbancia para la muestra a baja concentración es baja en el punto de tiempo inicial y alta en el punto de tiempo final, es decir, la diferencia entre la lectura de absorbancia inicial y la lectura de absorbancia final es máxima.

El tiempo de reacción es la diferencia entre el punto de tiempo inicial y el punto de tiempo final. En la mayoría de los casos, cuanto mayor es la magnitud de la señal de la muestra a baja concentración, mejores valores de LDL se obtienen siempre que la desviación estándar de la muestra en blanco sea comparable.

30 La Figura 7 muestra curvas cinéticas ejemplares para el ensayo de ferritina que muestran la magnitud de señal (absorbancia) de diferentes muestras altamente concentradas (981-4950 µg/l de ferritina) registradas a la longitud de onda principal de 570 nm, corregidas por la absorbancia a la longitud de onda de 800 nm. Las curvas cinéticas describen los valores de absorbancia en el eje de ordenadas y el tiempo (en el caso del cobas c 311, el tiempo se representa como punto de medición) en el eje de abscisas. Los tiempos de reacción óptimos para la segunda curva de calibración se determinan eligiendo un punto de tiempo (o punto de medición) inicial, antes o poco después de añadir el reactivo final, y eligiendo un punto de tiempo (o punto de medición) final, cumpliendo los siguientes criterios:

35 - el punto de tiempo inicial se elige en un momento antes o poco después de añadir el reactivo final
 - el punto de tiempo final se elige de forma que las muestras más concentradas de las series de dilución muestren señales distinguibles y crecientes con concentraciones crecientes, es decir, la diferencia entre la lectura de absorbancia inicial y la lectura de absorbancia final para una determinada muestra concentrada es mayor que el correspondiente valor de diferencia para la muestra con la siguiente concentración más baja.

45 El tiempo de reacción es la diferencia entre el punto de tiempo inicial y el punto de tiempo final. En general, se obtienen buenos valores de UDL cuando las señales de las muestras altamente concentradas son distinguibles y cuando las señales aumentan con la concentración de la muestra.

50 En la Figura 8, como se muestra en la tabla 4 y los ejemplos 6, 7, 8, 9, la aplicación de la invención conduce a una ampliación del intervalo de medición de los ensayos disponibles comercialmente.

Un beneficio de esta ampliación del intervalo de medición es que, para ensayos que se ejecutan en analizadores de laboratorio automatizados, se puede reducir la tasa de repetición, que está causada por muestras con concentraciones de analitos que superan el intervalo de medición. Con el fin de hacer una estimación aproximada de la escala de reducción de la tasa de repetición alcanzable, los resultados obtenidos para al menos 1000 muestras clínicas por ensayo en un analizador cobas c 501 se analizaron con el procedimiento estándar y con el procedimiento de la presente invención. Las muestras con concentraciones de analito que están fuera del intervalo de medición provocan una repetición automática en el analizador. El intervalo de medición alcanzable con el procedimiento estándar se describe en las instrucciones de uso de la prueba comercial.

60 Ejemplo para ALTL: utilizando el procedimiento de la presente invención, el intervalo de medición del ensayo se amplió en un factor de 12,1 en comparación con el procedimiento estándar. Esta mejora del intervalo dinámico conduce a una reducción de las repeticiones en comparación con el procedimiento estándar: aplicando el procedimiento de la presente invención se pueden evitar un 87 % de todas las repeticiones causadas por muestras con concentraciones de analito por debajo del intervalo de medición estándar y se pueden evitar un 99 % de todas las repeticiones causadas por muestras que superan el intervalo de medición estándar. Las muestras utilizadas para este estudio son muestras de donantes con un perfil de salud comparable al de los pacientes que acuden a los laboratorios centrales estándar.

Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación del intervalo dinámico de la prueba CRP L3

5

1.1 Instrumento

Para los experimentos se utilizó el analizador cobas c 311 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 ± 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.

20

1.2 Procedimiento para el ensayo de CRP utilizando la estrategia estándar

Se seleccionó para este estudio la prueba CRP L3 de Roche (CRPL3, Ref. Cat. 04956842), un ensayo inmunoturbidimétrico potenciado por partículas. La CRP humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-CRP monoclonales; los agregados se determinan turbidiméricamente. 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 las instrucciones de uso de la prueba CRP L3 se usó como procedimiento estándar.

30

1.3 Esquema de pipeteo

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

35

1.4 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 primera lectura de la segunda lectura. Para CRP L3, la primera lectura se realiza en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza 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 ajusta 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.

50

1.5 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 ejemplo 1.2. Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba CRP L3, con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

55

1.6 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo 1.3

60

1.7 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Las mejores condiciones para ambas curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente y se obtuvo el siguiente resultado: se usó 505 nm como primera longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 2,0 minutos como primer tiempo de reacción; se usó 600 nm como segunda longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 1,2 minutos como segundo tiempo de reacción. El tipo de ensayo era un ensayo

65

de dos puntos finales, como se describe en el ejemplo 1.4.

5 Para la primera curva de calibración, la primera lectura se realiza en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 18, que corresponde a un tiempo de reacción de 2,0 minutos; para la segunda curva de calibración, la primera lectura se realiza en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 14, que corresponde a un tiempo de reacción de 1,2 minutos. Para la generación de ambas curvas de calibración, se miden cada uno de los 6 estándares que cubren los intervalos de concentraciones correspondientes como duplicados con spline como tipo de calibración, que ajusta los intervalos entre los puntos de datos de los
10 calibradores medidos aproximados por polinomios de tercer grado de manera que se obtenga una curva de calibración uniforme. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron los 6 estándares del procedimiento estándar (Ref. Cat. 11355279) para ambas curvas de calibración.

15 Se utiliza la primera curva de calibración que está optimizada para una baja concentración del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y se utiliza la segunda curva de calibración que está optimizada para una alta concentración del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Para la cuantificación de CRP se debe seleccionar la primera curva de calibración o la segunda curva de calibración, dependiendo del contenido de analito o la absorbancia correspondiente de la muestra por cuantificar. Para este fin, la señal de la muestra se compara con un valor umbral predeterminado. El valor umbral para CRP se puede definir como uno de los
20 dos o ambos valores de absorbancia en las curvas de calibración para CRP que corresponden a una concentración de 73 mg/l (ver figura 3 o figura nueva), es decir, la absorbancia a 505 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 2,0 minutos ($A[\lambda_1, t_1] = A[505 \text{ nm-800 nm}, 2,0 \text{ minutos}]$) y/o la absorbancia a 600 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 1,2 minutos ($A[\lambda_2, t_2] = A[600 \text{ nm-800 nm}, 1,2 \text{ minutos}]$).

25 Si la señal óptica de la muestra calculada para 505 nm-800 nm y 2,0 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[505 \text{ nm-800 nm}, 2,0 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 600 nm-800 nm y 1,2 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[600 \text{ nm-800 nm}, 1,2 \text{ minutos}]$, se usa la primera curva de calibración para su cuantificación.

30 Si la señal óptica de la muestra calculada para 505 nm-800 nm y 2,0 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[505 \text{ nm-800 nm}, 2,0 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 600 nm-800 nm y 1,2 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[600 \text{ nm-800 nm}, 1,2 \text{ minutos}]$, se usa la segunda curva de calibración para su cuantificación. Como resultado, se obtienen dos curvas de calibración para cubrir el intervalo de medición para la determinación de CRP, la primera cubriendo concentraciones de analito desde 0 hasta 73 mg/l y la segunda cubriendo el intervalo desde 73 mg/l hasta el UDL.
35

Resultados para el ensayo de CRP usando la estrategia estándar y la estrategia de acuerdo con la invención

1.8 Determinación del LDL

40 Se generaron 21 réplicas de una muestra en blanco y se calcularon los valores de señal correspondientes x_1, x_2, \dots, x_{21} , corrigiendo los valores de absorbancia registrados a la longitud de onda principal de 570 nm mediante la sustracción de la absorbancia a 800 nm seguida de la sustracción del valor tomado en el punto de medición 8 del valor tomado en el punto de medición 18. Finalmente, se calcula el valor medio \bar{x} de los 21 valores de señal x_1, x_2, \dots, x_{21}
45 y la desviación estándar correspondiente. El LDL se determina como la concentración correspondiente al valor de la señal ($\bar{x} + 3 \text{ DE}$). Para la nueva estrategia solo se utilizan los datos generados a la primera longitud de onda y el primer tiempo de reacción, así como la primera curva de calibración correspondiente.

1.9 Determinación del UDL

50 Se midieron series de dilución de muestra que cubrían concentraciones de aprox. 2 a 4 veces el UDL conocido del ensayo de Roche, seguido del cálculo de la recuperación del analito creando la relación entre el valor medido y el valor teórico. Para valores entre un 90 % y un 110 %, el procedimiento se consideró lineal. El UDL se seleccionó como el valor de concentración más alto dentro del intervalo lineal. Para la nueva estrategia solo se utilizan los datos
55 generados a la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción, así como la segunda curva de calibración correspondiente.

1.10 Determinación del coeficiente de variación (CV)

60 Se midieron 21 réplicas de muestras de suero de cierta concentración y se calculó el CV de los valores de concentración encontrados mediante la relación entre la desviación estándar y la media. Para la nueva estrategia, dependiendo de la concentración del analito que se evaluará, se utilizan
- los datos generados a la primera longitud de onda y el primer tiempo de reacción, así como la primera curva de calibración correspondiente, o
65 - los datos generados en la segunda longitud de onda y el segundo tiempo de reacción, así como la segunda curva de calibración correspondiente. Se evaluaron dos muestras de baja concentración (1 y 5 mg/l de CRP) para el ensayo.

1.11 Resumen de resultados y conclusiones

El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 1. La aplicación de la nueva estrategia a la prueba de CRP muestra un aumento de la sensibilidad (LDL, límite inferior de detección) en un factor de 1,8 y una ampliación del límite superior de detección (UDL) en un factor de 1,8. La mejora del intervalo dinámico correspondiente es por un factor de 3,1. La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. La nueva estrategia brinda una mínima implementación; la aplicación de la estrategia no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Solo se pueden adaptar el número y la concentración de estándares para la calibración.

Tabla 1: Resumen de resultados para CRP L3

	Procedimiento estándar (longitud de onda de 570 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 2,0 min)	Nuevo procedimiento (curva de calibración 1: longitud de onda de 505 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 2,0 min.; curva de calibración 2: longitud de onda de 600 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 1,2 min)
LDL (mg/l)	0,063	0,036
UDL (mg/l)	370	660
Intervalo dinámico	5, 870	18 330
Intervalo de medición (mg/l)	0,063-370	0,036-660
CV a 1 mg/l (%)	5,3	5,0
CV a 5 mg/l (%)	1,8	1,7

Ejemplo 2: Determinación del intervalo dinámico de ensayos adicionales

2.1 Instrumento: ver el ejemplo 1

2.2 Procedimiento para el ensayo de ferritina utilizando la estrategia estándar

Se seleccionó para este estudio la prueba de ferritina de Roche (FERR4, Ref. Cat. 04885317), un ensayo inmunoturbidimétrico potenciado por partículas. La ferritina humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-ferritina; 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 de ferritina se utilizan dos reactivos en el casete: R1 (tampón TRIS, pH 7,5, inmunoglobulinas (conejo) y conservante) y R3 (partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-ferritina humana (conejo), conservante). El procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba de ferritina se usó como procedimiento estándar.

2.3 Esquema de pipeteo

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

2.4 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, como se describe en el ejemplo 1.4. Para ferritina, la primera lectura se realiza en el punto de medición 24 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza 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 ajusta 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.

2.5 Procedimiento para el ensayo de ferritina de acuerdo con la invención

Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar, como se describe en el ejemplo 2.2. Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba de ferritina, con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

2.6 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo, como se describe en 2.3**2.7 Condiciones para la generación de la curva de calibración**

5 Las mejores condiciones para ambas curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente y se obtuvo el siguiente resultado: se usó 505 nm como primera longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 4,9 minutos como primer tiempo de reacción; se usó 570 nm como segunda longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 5,1 minutos como segundo tiempo de reacción. El tipo de ensayo era un ensayo de dos puntos finales, como se describe en el ejemplo 1.4. Para la primera curva de calibración, la primera lectura se realiza en el punto de medición 25 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 57, que corresponde a un tiempo de reacción de 4,9 minutos; para la segunda curva de calibración, la primera lectura se realiza en el punto de medición 24 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 57, que corresponde a un tiempo de reacción de 5,1 minutos. Para la generación de ambas curvas de calibración, se miden cada uno de los 6 estándares que cubren los intervalos de concentraciones correspondientes como duplicados con spline como tipo de calibración, que ajusta 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. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron los 6 estándares del procedimiento estándar (Ref. Cat. 11355279) para ambas curvas de calibración. El umbral se puede definir como uno de los dos o ambos valores de absorbancia en las curvas de calibración para ferritina a una concentración de 100 µg/l.

Resultados para el ensayo de ferritina usando la estrategia estándar y la estrategia de acuerdo con la invención**2.8 Determinación de LDL / UDL / CV: ver el ejemplo 1****2.9 Resumen de resultados y conclusiones**

30 El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 2. La aplicación de la nueva estrategia a la prueba de ferritina de Roche muestra un aumento de la sensibilidad (LDL, límite inferior de detección) en un factor de 1,7 y conservación del límite superior de detección (UDL). La mejora del intervalo dinámico correspondiente es por un factor de 1,7. La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. La nueva estrategia brinda una mínima implementación; la aplicación de la estrategia no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Solo se pueden adaptar el número y la concentración de estándares para la calibración.

Tabla 2: Resumen de resultados para FERR4

	Procedimiento estándar (longitud de onda de 570 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 5,1 min)	Nuevo procedimiento (curva de calibración 1: longitud de onda de 505 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 4,9 min.; curva de calibración 2: longitud de onda de 570 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 5,1 min)
LDL (µg/l)	2,0	1,2
UDL (µg/l)	1940	1940
Intervalo dinámico	970	1617
Intervalo de medición (µg/l)	2-1940	1,2-1940
CV a 10 µg/l (%)	8,9	6,7
CV a 30 µg/l (%)	2,9	1,7
CV a 145 µg/l	0,7	0,7

Ejemplo 3: Evaluación del potencial de ampliación de intervalo dinámico de pruebas adicionales de Roche**3.1 Instrumento: ver el ejemplo 1****3.2 Procedimiento para los ensayos utilizando la estrategia estándar**

45 Se evaluaron los siguientes ensayos inmunoturbidimétricos potenciados por partículas de Roche: tres ensayos con el formato de prueba directa, mioglobina (MYO2, Ref. Cat. 04580010), dímero D (D-DI2, Ref. Cat. 04912551) y factores

reumatoides (RF-II, Ref. Cat. 20764574), así como dos ensayos con un formato de prueba competitivo (KIMS: interacción cinética de micropartículas en solución), digoxina (DIG, Ref. Cat. 20737836) y fenobarbital (PHNO2, Ref. Cat. 04490924). En el ensayo de DIG, las partículas se recubren con digoxina y se agregan rápidamente en presencia de una solución de anticuerpo en función de la concentración de digoxina de la muestra. En el ensayo de PHNO2, el anticuerpo anti-fenobarbital se acopla covalentemente a micropartículas y el derivado de fenobarbital se une a una macromolécula; la unión del derivado de fenobarbital al anticuerpo en las micropartículas se inhibe por la presencia de fenobarbital en la muestra. El procedimiento descrito en las instrucciones de uso correspondientes de las pruebas mencionadas anteriormente se usó como procedimiento estándar.

10 **3.3 Resumen de los reactivos y del procedimiento de pipeteo y calibración**

El procedimiento fue como se describe en las instrucciones de uso de las pruebas y se resume en la tabla a continuación (tabla 3).

15 **Tabla 3: Resumen de la prueba**

	Reactivos	Esquema de pipeteo	Longitud de onda, tiempo de reacción**	Calibración
Mioglobina	R1: tampón de glicina, conservantes. R2: partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-mioglobina, tampón con conservantes.	3 µl de muestra, 90 µl de R1, 30 µl de R2	570 nm-800 nm, 4,7 min (7-29)	Estándares: calibración de 6 puntos, Ref. Cat. 04580044. Tipo de calibración: RCM*. Tipo de ensayo: dos puntos finales.
Dímero D	R1: tampón Tris, conservantes. R3: partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-Dímero D, tampón con conservantes.	5 µl de muestra, 90 µl de R1, 90 µl de R3	800 nm, 4,3 min (27-57)	Estándares: calibración de 6 puntos, Ref. Cat. 05050901. Tipo de calibración: Spline. Tipo de ensayo: dos puntos finales.
RF II	R1: tampón de glicina, conservantes. R2: partículas de látex recubiertas con IgG humana, tampón con conservantes.	3 µl de muestra, 90 µl de R1, 30 µl de R2	570 nm-800 nm, 2,2 min (7-18)	Estándares: calibración de 6 puntos, Ref. Cat. 12172828. Tipo de calibración: RCM*. Tipo de ensayo: dos puntos finales.
DIG	R1: anticuerpo anti-digoxina en tampón con conservantes. R2: micropartículas conjugadas de derivado de digoxina, tampón con conservantes.	5,5 µl de muestra, 84 µl de R1, 22 µl de R2 (diluido con 20 µl de agua)	660 nm, 4,7 min (9-31)	Estándares: calibración de 6 puntos, Ref. Cat. 03375790. Tipo de calibración: RCM*. Tipo de ensayo: dos puntos finales.
PHENO	R1: conjugado de fenobarbital en tampón con conservantes. R2: partículas de látex recubiertas con anticuerpo anti-fenobarbital, tampón con conservantes.	2 µl de muestra, 93 µl de R1, 93 µl de R2	600 nm–800 nm, 6,5 min (10-49)	Estándares: calibración de 6 puntos, Ref. Cat. 03375790. Tipo de calibración: RCM*. Tipo de ensayo: dos puntos finales.

*RCM: Ajuste de curva de Rodbard; **Longitud de onda principal - longitud de onda de corrección; tiempo de reacción en minutos; entre paréntesis se muestra el punto de medición para la primera y segunda lecturas.

3.4 Procedimiento para los ensayos de acuerdo con la presente invención

20 Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar, como se describe en el ejemplo 3.2. Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba de ferritina, con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

3.5 Resumen de los reactivos y del procedimiento de pipeteo y calibración

El procedimiento fue como se describe en las instrucciones de uso de las pruebas y se resume en la tabla 3, si no se menciona lo contrario.

Resultados para los ensayos de mioglobina, dímero D, RF II, DIG y PHENO utilizando la estrategia estándar y la nueva estrategia de la invención

3.6 Determinación de LDL / UDL / CV: ver el ejemplo 1

3.7 Resumen de resultados y conclusiones

El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 4. Las longitudes de onda y tiempos de reacción óptimos para la primera y la segunda curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente. La aplicación de la nueva estrategia a las pruebas comerciales de Roche conduce, en la mayoría de los casos, a una mejora de la sensibilidad (LDL, límite inferior de detección) y/o a una mejora del intervalo de medición superior. La mejora del intervalo dinámico es por un factor de 1,5 a 5,8. En dos casos, Dímero D y DIG, la mejora es moderada. En los casos en que la mejora fue moderada, el factor de mejora se muestra entre paréntesis. La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. La nueva estrategia brinda una mínima implementación; la aplicación de la estrategia no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Solo se pueden adaptar el número y la concentración de estándares para la calibración.

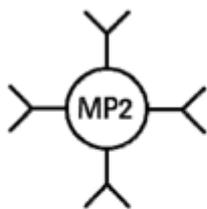
Tabla 4: Resumen de resultados

Prueba de Roche	Condiciones estándar ^d	Nuevas condiciones ^d		Factor de mejora ^c		
		Cal 1	Cal 2	LDL	UDL	Intervalo dinámico
Mioglobina	570 nm-800 nm	505 nm-800 nm	660 nm-800 nm	2 ^a	2	4
Gen. 2	4,7 min (7-29)	6,7 min (9-50)	2,6 min (7-20)			
Dímero D	800 nm	800 nm	700 nm	-	(1,14)	(1,14)
Gen. 2	4,3 min (27-57)	4,3 min (27-57)	1,4 min (26-33)			
RF II	570 nm-800 nm 2,2 min (7-18)	546 nm-800 nm 8,5 min (7-57)	660 nm-800 nm 1,4 min (7-14)	5 ^b	(1,15)	5,8
DIG	660 nm 4,7 min (9-31)	660 nm 4,7 min (9-31)	505 nm-800 nm 4,7 min (9-31)	-	(1,15)	(1,15)
PHENO	600 nm-800 nm 6,5 min (10-49)	600 nm-800 nm 6,5 min (10-49)	505 nm-800 nm 7,9 min (10-57)	-	1,5	1,5

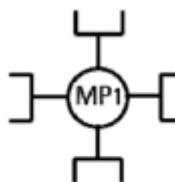
^a Sin factor del instrumento, ^b Cambiar la calibración a spline, ^c En las nuevas condiciones se conserva la buena precisión de las condiciones estándar, ^d Primera fila: longitud de onda principal - longitud de onda de corrección; segunda fila: tiempo de reacción en minutos, puntos de medición entre paréntesis

Ejemplo 4: Mejora adicional del intervalo dinámico para el ensayo de combinación de la invención con partículas modificadas MP2

4.1 Además, la combinación del ensayo de la presente invención con tamaños de partícula y niveles de carga de anticuerpo adaptados se evaluó usando el ensayo CRP L3 como parámetro principal. El ensayo CRP L3 incluye dos tipos diferentes de partículas, como se describe en el documento EP 0898169, partículas de látex grandes (MP2, aproximadamente 220 nm de diámetro) recubiertas con anticuerpos altamente afines (clon 36F12; concentración para recubrimiento de látex: 50 mg/g de látex) y partículas de látex pequeñas (MP1, aproximadamente 110-140 nm de diámetro) recubiertas con anticuerpos menos afines (clon 21F12, concentración para recubrimiento de látex: 45 mg/g de látex). Aquí, las partículas MP2 se modificaron usando tamaños y niveles de carga de anticuerpo mayores para aumentar la sensibilidad analítica y, finalmente, se determinó el LDL y el intervalo dinámico alcanzables en el ensayo, como se describe a continuación.



- ~ 220 nm Ø látex
- Anti-CRP 36F12 (alta afinidad)
- 50 mg 36F12/g de látex



- 110-140 Ø látex
- Anti-CRP 21F12 (baja afinidad)
- 45 mg 21F12/g de látex

4.2 Síntesis de las partículas MP2 modificadas

- 5 A partículas de látex (micropartículas modificadas con carboxilato, tamaño de 290 nm) con una concentración de un 2 % de sólidos en 750 µl de tampón MES (20 mM, pH 6,1) se añadieron sucesivamente 30 µl de una solución de sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida, 100 mM en tampón MES) y 30 µl de una solución de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, 100 mM en tampón MES). La mezcla de reacción se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente en una rueda mezcladora. Después se
- 10 mezclaron 60 mg de anticuerpo 36F12 por gramo de látex en 750 µl de tampón MES (20 mM, pH 6,1) que contenía 37 µl de solución Synperonic P85 (1 % en MES) con las partículas de látex activadas con sulfo-NHS/EDC. La mezcla de reacción se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente en una rueda mezcladora. A la mezcla de reacción se añadieron 45 µl de solución de glicina (2 M, pH 11), se sometió a ultrasonidos y se mezcló durante 15 minutos en una rueda mezcladora. Finalmente, las partículas se lavaron 2 veces
- 15 mediante centrifugación y resuspensión en glicina (50 mM, pH 8) que contenía un 0,03 % de Synperonic P85. Después de una etapa de centrifugación y resuspensión final, las partículas de látex (1 % de sólidos) se almacenaron en glicina (50 mM, pH 8) que contenía un 0,03 % de Synperonic P85, un 0,1 % de BSA y un 0,05 % de azida de sodio.

4.3 Síntesis de las partículas MP1 estándar

- 20 A partículas de látex (micropartículas modificadas con carboxilato, tamaño de 110-140 nm) con una concentración de un 2 % de sólidos en 750 µl de tampón MES (20 mM, pH 6,1) se añadieron sucesivamente 30 µl de una solución de sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida, 100 mM en tampón MES) y 30 µl de una solución de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, 100 mM en tampón MES). La mezcla de reacción se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente en una rueda mezcladora. Después se
- 25 mezclaron 45 mg de anticuerpo 21F12 por gramo de látex en 750 µl de tampón MES (20 mM, pH 6,1) con las partículas de látex activadas con sulfo-NHS/EDC. Después de 20 minutos, se añadieron 37 µl de solución Synperonic P85 (1 % en MES) a la mezcla. La mezcla de reacción se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó reaccionar durante 100 minutos a temperatura ambiente en una rueda mezcladora. A la mezcla de reacción se añadieron 45 µl de solución de glicina (2 M, pH 11), se sometió a ultrasonidos y se mezcló durante 15 minutos en una rueda mezcladora. Finalmente, las partículas se lavaron 2 veces mediante centrifugación y resuspensión en glicina (50 mM, pH 8) que contenía un 0,03 % de Synperonic P85. Después de una etapa de centrifugación y resuspensión final, las partículas de látex (1 % de sólidos) se almacenaron en glicina (50 mM, pH 8) que contenía un 0,03 % de Synperonic P85, un
- 30 0,1 % de BSA y un 0,05 % de azida de sodio.

4.4 Preparación de los reactivos R1 y R2 para el ensayo en el analizador

- Los reactivos R1 y R2 son como se describe en las instrucciones de uso de las pruebas. El reactivo R2 se prepara mezclando las partículas MP1 y MP2 sintetizadas en las etapas a) y b). El reactivo se añade a un paquete de cobas
- 40 c.

4.5 Instrumento: ver el ejemplo 1

- 4.6 Procedimiento para el ensayo de CRP usando la estrategia estándar: idéntico al procedimiento del ejemplo 1.2.
- 45

4.7 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo del ejemplo 1.3.

4.8 Condiciones para la generación de la curva de calibración: idénticas a las del ejemplo 1.4.

50

4.9 Procedimiento para el ensayo de CRP utilizando la nueva estrategia de la invención

Los reactivos usados para estos experimentos se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 1.2. Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba CRP L3, con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

5 4.10 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo del ejemplo 1.3.

4.11 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Las mejores condiciones para ambas curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente y se obtuvo el siguiente resultado: se usó 505 nm como primera longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 2,8 minutos como primer tiempo de reacción; se usó 570 nm como segunda longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 2,0 minutos como segundo tiempo de reacción. El tipo de ensayo era un ensayo de dos puntos finales, como se describe en el ejemplo 1.4. Para la primera curva de calibración, la primera lectura se realiza en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 22, que corresponde a un tiempo de reacción de 2,8 minutos; para la segunda curva de calibración, la primera lectura se realiza en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 18, que corresponde a un tiempo de reacción de 2,0 minutos. Para la generación de ambas curvas de calibración, se miden cada uno de los 6 estándares que cubren los intervalos de concentraciones correspondientes como duplicados con spline como tipo de calibración, que ajusta 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. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron los 6 estándares del procedimiento estándar (Ref. Cat. 11355279) para ambas curvas de calibración. Se utiliza la primera curva de calibración que está optimizada para una baja concentración del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y se utiliza la segunda curva de calibración que está optimizada para una alta concentración del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Para la cuantificación de CRP se debe seleccionar la primera curva de calibración o la segunda curva de calibración, dependiendo del contenido de analito o la absorbancia correspondiente de la muestra por cuantificar. Para este fin, la señal de la muestra se compara con un valor umbral predeterminado. El valor umbral para CRP se puede definir como uno de los dos o ambos valores de absorbancia en las curvas de calibración para CRP que corresponden a una concentración de 10 mg/l, es decir, la absorbancia a 505 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 2,8 minutos ($A[\lambda_1, t_1] = A[505 \text{ nm-}800 \text{ nm}, 2,8 \text{ minutos}]$) y/o la absorbancia a 570 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 2,0 minutos ($A[\lambda_2, t_2] = A[570 \text{ nm-}800 \text{ nm}, 2,0 \text{ minutos}]$).

Si la señal óptica de la muestra calculada para 505 nm-800 nm y 2,8 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[505 \text{ nm-}800 \text{ nm}, 2,8 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 570 nm-800 nm y 2,0 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[570 \text{ nm-}800 \text{ nm}, 2,0 \text{ minutos}]$, se usa la primera curva de calibración para su cuantificación.

Si la señal óptica de la muestra calculada para 505 nm-800 nm y 2,8 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[505 \text{ nm-}800 \text{ nm}, 2,8 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 570 nm-800 nm y 2,0 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[570 \text{ nm-}800 \text{ nm}, 2,0 \text{ minutos}]$, se usa la segunda curva de calibración para su cuantificación. Como resultado, se obtienen dos curvas de calibración para cubrir el intervalo de medición para la determinación de CRP, la primera cubriendo concentraciones de analito desde 0 hasta 10 mg/l y la segunda cubriendo el intervalo desde 10 mg/l hasta el UDL.

Resultados para el ensayo de CRP usando la estrategia estándar y la estrategia de acuerdo con la invención:

4.12 Determinación de LDL, UDL y CV: ver el ejemplo 1.

50 4.13 Resumen de resultados y conclusiones

Como se muestra en la figura 2 y la tabla 5, el uso de partículas MP2 más grandes (290 nm en lugar de 220 nm) con niveles de carga de anticuerpo más elevados (60 mg 36F12/g de látex en lugar de 50 mg/g) en combinación con la estrategia de múltiples aplicaciones conduce a una mejora del LDL y del intervalo dinámico en un factor de 8 en comparación con el ensayo CRP L3 estándar comercial usando las condiciones estándar (reactivo de látex con partículas MP1 y MP2 no modificadas, medición a una longitud de onda principal de 570 nm, corregida de 800 nm, tiempo de reacción de 2,0 min). La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. Las condiciones para la nueva estrategia son una primera curva de calibración, registrada a 505 nm con 800 nm como longitud de onda de corrección y 2,8 minutos de tiempo de reacción, y una segunda curva de calibración, registrada a 570 nm con 800 nm como longitud de onda de corrección y 2,0 minutos de tiempo de reacción.

Tabla 5: Resumen de resultados para CRP con partículas MP2 adaptadas

	Reactivos estándar (MP1: 110-140 nm, 45 mg 21F12/g de látex; MP2: 220 nm, 50 mg 36F12/g de látex), Procedimiento estándar (570 nm-800 nm, 2,0 min)	Reactivos adaptados (MP1: 110-140 nm, 45 mg 21F12/g de látex; MP2: 290 nm, 60 mg 36F12/g de látex), Nuevo procedimiento (Cal 1: 505 nm-800 nm, 2,8 min; Cal 2: 570 nm-800 nm, 2,0 min)
LDL (mg/l)	0,091	0,011
UDL (mg/l)	350	350
Intervalo dinámico	3846	31 818
Intervalo de medición (mg/l)	0,091-350	0,011-350
CV a 1 mg/l (%)	4,6	3,4
CV a 5 mg/l (%)	1,5	0,9

5 **Ejemplo 5: Mejora adicional del intervalo dinámico para la combinación de la estrategia de múltiples aplicaciones con partículas modificadas MP1 y MP2**

10 5.1 Además, la combinación de la estrategia de múltiples aplicaciones con tamaños de partícula y niveles de carga de anticuerpo adaptados se evaluó usando el ensayo CRP L3 como parámetro principal. El ensayo CRP L3 incluye dos tipos diferentes de partículas, como se describe en el documento EP 0898169, partículas de látex grandes (MP2, aproximadamente 220 nm de diámetro) recubiertas con anticuerpos altamente afines (clon 36F12; concentración para recubrimiento de látex: 50 mg/g de látex) y partículas de látex pequeñas (MP1, aproximadamente 110-140 nm de diámetro) recubiertas con anticuerpos menos afines (clon 21F12, concentración para recubrimiento de látex: 45 mg/g de látex). Aquí, las partículas MP2 se modificaron usando tamaños y niveles de carga de anticuerpo mayores y las partículas MP1 pequeñas se modificaron usando partículas más pequeñas y, finalmente, se determinó el LDL, el UDL y el intervalo dinámico alcanzables en el ensayo, como se describe a continuación.

20 5.2 Síntesis de las partículas MP2 modificadas

25 A partículas de látex (micropartículas modificadas con carboxilato, tamaño de 290 nm) con una concentración de un 2 % de sólidos en 750 µl de tampón MES (20 mM, pH 6,1) se añadieron sucesivamente 30 µl de una solución de sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida, 100 mM en tampón MES) y 30 µl de una solución de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, 100 mM en tampón MES). La mezcla de reacción se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente en una rueda mezcladora. Después se mezclaron 70 mg de anticuerpo 36F12 por gramo de látex en 750 µl de tampón MES (20 mM, pH 6,1) que contenía 37 µl de solución Synperonic P85 (1 % en MES) con las partículas de látex activadas con sulfo-NHS/EDC. La mezcla de reacción se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente en una rueda mezcladora. A la mezcla de reacción se añadieron 45 µl de solución de glicina (2 M, pH 11), se sometió a ultrasonidos y se mezcló durante 15 minutos en una rueda mezcladora. Finalmente, las partículas se lavaron 2 veces mediante centrifugación y resuspensión en glicina (50 mM, pH 8) que contenía un 0,03 % de Synperonic P85. Después de una etapa de centrifugación y resuspensión final, las partículas de látex (1 % de sólidos) se almacenaron en glicina (50 mM, pH 8) que contenía un 0,03 % de Synperonic P85, un 0,1 % de BSA y un 0,05 % de azida de sodio.

35 5.3 Síntesis de las partículas MP1 modificadas

40 A partículas de látex (micropartículas modificadas con carboxilato, tamaño de 90 nm) con una concentración de un 2 % de sólidos en 750 µl de tampón MES (20 mM, pH 6,1) se añadieron sucesivamente 30 µl de una solución de sulfo-NHS (sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida, 100 mM en tampón MES) y 30 µl de una solución de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, 100 mM en tampón MES). La mezcla de reacción se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente en una rueda mezcladora. Después se mezclaron 50 mg de anticuerpo 21F12 por gramo de látex en 750 µl de tampón MES (20 mM, pH 6,1) con las partículas de látex activadas con sulfo-NHS/EDC. Después de 20 minutos, se añadieron 37 µl de solución Synperonic P85 (1 % en MES) a la mezcla. La mezcla de reacción se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó reaccionar durante 45 100 minutos a temperatura ambiente en una rueda mezcladora. A la mezcla de reacción se añadieron 45 µl de solución de glicina (2 M, pH 11), se sometió a ultrasonidos y se mezcló durante 15 minutos en una rueda mezcladora. Finalmente, las partículas se lavaron 2 veces mediante centrifugación y resuspensión en glicina (50 mM, pH 8) que contenía un 0,03 % de Synperonic P85. Después de una etapa de centrifugación y resuspensión final, las partículas de látex (1 % de sólidos) se almacenaron en glicina (50 mM, pH 8) que contenía un 0,03 % de Synperonic P85, un 0,1 % de BSA y un 0,05 % de azida de sodio.

5.4 Preparación de los reactivos R1 y R2 para el ensayo en el analizador

5 Los reactivos R1 y R2 son como se describe en las instrucciones de uso de las pruebas. El reactivo R2 se prepara mezclando las partículas MP1 y MP2 sintetizadas en las etapas a) y b). Los reactivos se añaden a un paquete de cobas c.

5.5 Instrumento: ver el ejemplo 1

10 **5.6 Procedimiento para el ensayo de CRP usando la estrategia estándar: idéntico al procedimiento del ejemplo 1.2.**

5.7 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo del ejemplo 1.3.

15 **5.8 Condiciones para la generación de la curva de calibración: idénticas a las del ejemplo 1.4.**

5.9 Procedimiento para el ensayo de CRP utilizando la nueva estrategia de la invención

20 Los reactivos utilizados para estos experimentos se prepararon como se describe anteriormente y luego se añadieron a paquetes de cobas c: R1 (tampón TRIS) y R2 (partículas de látex recubiertas con anti-CRP (ratón) en tampón de glicina). Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba CRP L3, con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

5.10 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo del ejemplo 1.3.

25

5.11 Condiciones para la generación de la curva de calibración

30 Las mejores condiciones para ambas curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente y se obtuvo el siguiente resultado: se usó 546 nm como primera longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 7,1 minutos como primer tiempo de reacción; se usó 660 nm como segunda longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 0,8 minutos como segundo tiempo de reacción. El tipo de ensayo era un ensayo de dos puntos finales, como se describe en el ejemplo 1.4. Para la primera curva de calibración, la primera lectura se realiza en el punto de medición 7 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 50, que corresponde a un tiempo de reacción de 7,1 minutos; para la segunda curva de calibración, la primera lectura se realiza en el punto de medición 7 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 11, que corresponde a un tiempo de reacción de 0,8 minutos. Para la generación de ambas curvas de calibración, se miden cada uno de los 6 estándares que cubren los intervalos de concentraciones correspondientes como duplicados con spline como tipo de calibración, que ajusta 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. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron los 6 estándares del procedimiento estándar (Ref. Cat. 11355279) para ambas curvas de calibración.

40

45 Se utiliza la primera curva de calibración que está optimizada para una baja concentración del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y se utiliza la segunda curva de calibración que está optimizada para una alta concentración del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Para la cuantificación de CRP se debe seleccionar la primera curva de calibración o la segunda curva de calibración, dependiendo del contenido de analito o la absorbancia correspondiente de la muestra por cuantificar. Para este fin, la señal de la muestra se compara con un valor umbral predeterminado. El valor umbral para CRP se puede definir como uno de los dos o ambos valores de absorbancia en las curvas de calibración para CRP que corresponden a una concentración de 50 mg/l, es decir, la absorbancia a 546 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 7,1 minutos ($A[\lambda_1, t_1] = A[546 \text{ nm}-800 \text{ nm}, 7,1 \text{ minutos}]$) y/o la absorbancia a 660 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 0,8 minutos ($A[\lambda_2, t_2] = A[660 \text{ nm}-800 \text{ nm}, 0,8 \text{ minutos}]$).

50

55 Si la señal óptica de la muestra calculada para 546 nm-800 nm y 7,1 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[546 \text{ nm}-800 \text{ nm}, 7,1 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 660 nm-800 nm y 0,8 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[660 \text{ nm}-800 \text{ nm}, 0,8 \text{ minutos}]$, se usa la primera curva de calibración para su cuantificación.

60

60 Si la señal óptica de la muestra calculada para 546 nm-800 nm y 7,1 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[546 \text{ nm}-800 \text{ nm}, 7,1 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 660 nm-800 nm y 0,8 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[660 \text{ nm}-800 \text{ nm}, 0,8 \text{ minutos}]$, se usa la segunda curva de calibración para su cuantificación. Como resultado, se obtienen dos curvas de calibración para cubrir el intervalo de medición para la determinación de CRP, la primera cubriendo concentraciones de analito desde 0 hasta 50 mg/l y la segunda cubriendo el intervalo desde 50 mg/l hasta el UDL.

65

Resultados para el ensayo de CRP usando la estrategia estándar y la nueva estrategia de la invención

5.12 Determinación de LDL / UDL / CV: ver el ejemplo 1**5.13 Resumen de resultados y conclusiones**

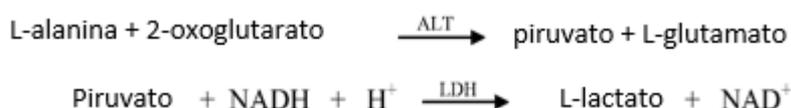
5 Como se muestra en la figura 2 y la tabla 6, el uso de partículas MP2 más grandes (290 nm en lugar de 220 nm) con niveles de carga de anticuerpo más elevados (70 mg 36F12/g de látex en lugar de 50 mg/g) y partículas MP1 más pequeñas (90 nm en lugar de 110-140 nm, 50 mg 21F12/g de látex para la reacción de conjugación de látex) en combinación con la estrategia de múltiples aplicaciones conduce a una mejora del LDL, el UDL y el intervalo dinámico en un factor de 3,0, 2,3 y 6,9, respectivamente, en comparación con el ensayo CRP L3 estándar comercial usando las condiciones estándar (reactivo de látex con partículas MP1 y MP2 no modificadas, medición a una longitud de onda principal de 570 nm, corregida a 800 nm, tiempo de reacción de 2,0 min). La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. Las condiciones para la nueva estrategia son una primera curva de calibración, registrada a 546 nm con 800 nm como longitud de onda de corrección y 7,1 minutos de tiempo de reacción, y una segunda curva de calibración, registrada a 660 nm con 800 nm como longitud de onda de corrección y 0,8 minutos de tiempo de reacción.

Tabla 6: Resumen de resultados para CRP con partículas MP1 y MP2 adaptadas

	Reactivos estándar (MP1: 110-140 nm, 45 mg 21F12/g de látex; MP2: 220 nm, 50 mg 36F12/g de látex), Procedimiento estándar (570 nm-800 nm, 2,0 min)	Reactivos adaptados (MP1: 90 nm, 50 mg 21F12/g de látex; MP2: 290 nm, 70 mg 36F12/g de látex), Nuevo procedimiento (Cal 1: 546 nm-800 nm, 7,1 min; Cal 2: 660 nm-800 nm, 0,8 min)
LDL (mg/l)	0,060	0,020
UDL (mg/l)	367	844
Intervalo dinámico	6117	42 200
Intervalo de medición (mg/l)	0,060-367	0,020-844
CV a 1 mg/l (%)	8,3	2,7
CV a 5 mg/l (%)	1,9	0,9
CV a 10 mg/l (%)	1,3	1,3
CV a 100 mg/l (%)	1,3	1,3

Ejemplo 6: Determinación del intervalo dinámico de ensayos colorimétricos Alanina aminotransferasa (ALTL)**6.1 Instrumento: ver el ejemplo 1****6.2 Procedimiento para el ensayo de ALTL (alanina aminotransferasa) utilizando la estrategia estándar**

Se seleccionó para este estudio la prueba de alanina aminotransferasa de Roche (ALTL, Ref. Cat. 20764957), un ensayo colorimétrico. La enzima alanina aminotransferasa (ALT) cataliza la reacción entre L-alanina y 2-oxoglutarato. El piruvato formado se reduce por NADH en una reacción catalizada por lactato deshidrogenasa (LDH) para formar L-lactato y NAD⁺. La tasa de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de ALT que se mide fotométricamente. Se determina midiendo la disminución en la absorbancia.



35 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 e información relacionada con la prueba. Para las pruebas ALTL, el casete está compuesto por dos reactivos: R1 (tampón TRIS, pH 7,3, L-alanina, albúmina (bovina), LDH (microorganismos), estabilizantes y conservante) y R2 (2-oxoglutarato, NADH, aditivos y conservante). El procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba ALTL se usó como procedimiento estándar.

6.3 Esquema de pipeteo

Se añadieron posteriormente a la celda de reacción 9 µl de muestra y 59 µl de reactivo R1 diluido con 32 µl de diluyente

(agua), seguido de la adición de 17 µl de 2-oxoglutarato y reactivo NADH (R2) diluido con 20 µl de diluyente (agua). Después, todos los componentes de la reacción se mezclaron.

6.4 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Las lecturas de absorbancia se llevaron a cabo a 340 nm como longitud de onda principal y a 700 nm como longitud de onda de corrección. El tipo de ensayo fue un ensayo cinético A, también llamado ensayo de tasa A.

Para los ensayos de tasa, el transcurso de la reacción se sigue midiendo la absorbancia en función del tiempo. Es decir, las mediciones se toman a medida que avanza la reacción. Los ensayos de tasa utilizan estas mediciones porque sus cálculos de concentración se basan en la determinación de la tasa de cambio en la absorbancia. Un ensayo de tasa A está programado para múltiples puntos de medición. Esto significa que hay una ventana de medición y que cada medición fotométrica realizada dentro de esta ventana se tiene en cuenta para el cálculo de la tasa, comenzando con la lectura en el primer punto de medición programado y hasta la lectura en el segundo punto de medición programado. Los valores de absorbancia se convierten en la tasa de cambio en la absorbancia mediante análisis de mínimos cuadrados. Para ALTL, el primer punto de medición programado (punto de medición inicial) fue el punto de medición 12 que corresponde a poco después de que la muestra y el reactivo final se pipetearan a la celda de reacción (66 segundos después de la adición del reactivo final). El segundo punto de medición programado (punto de medición final) se tomó en el punto de medición 31 que corresponde a un tiempo de reacción de 4,1 minutos. La señal se calculó a partir de cada una de las lecturas entre los puntos de medida inicial y final. La tasa de cambio en la absorbancia (pendiente) entre estos dos puntos de medición se calculó mediante el procedimiento de mínimos cuadrados. Para la generación de la curva de calibración se midieron dos estándares de Roche (estándar 1: agua para la medición en blanco; estándar 2, Ref. Cat. 10759350) como duplicados con tipo de calibración lineal, que ajusta los puntos de datos de los calibradores medidos por un modo lineal de manera que se obtenga una curva de calibración lineal.

6.5 Procedimiento para el ensayo de ALTL de acuerdo con la invención

Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar, como se describe en el ejemplo 6.2. Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba de ALTL, con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

6.6 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo 6.3

6.7 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Para la generación de las dos curvas de calibración se midieron 2 estándares como duplicados con tipo de calibración lineal, que ajusta los puntos de datos de los calibradores medidos por un modo lineal de manera que se obtenga una curva de calibración lineal (estándar 1: agua para la medición en blanco); estándar 2: Roche, Ref. Cat. 10759350). Las mejores condiciones para ambas curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente y se obtuvo el siguiente resultado: se usó 340 nm como primera longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 8,5 minutos como primer tiempo de reacción; se usó 376 nm como segunda longitud de onda, 700 nm como longitud de onda de corrección y 1,4 minutos como segundo tiempo de reacción. El tipo de ensayo fue un ensayo de dos puntos finales para ambas, la primera y la segunda curva de calibración, como se describe en el ejemplo 1.4. Para la primera curva de calibración, la primera lectura se realizó en el punto de medición 7 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realizó en el punto de medición 57, que corresponde a un tiempo de reacción de 8,5 minutos; para la segunda curva de calibración, la primera lectura se realizó en el punto de medición 7 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realizó en el punto de medición 14, que corresponde a un tiempo de reacción de 1,4 minutos. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otros tipos de ensayo, como la cinética A, para el cálculo de la primera y/o la segunda curvas de calibración. Además, se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otras concentraciones estándar aparte de las utilizadas aquí (calibradores comercialmente disponibles de Roche, Ref. Cat. 10759350), así como cuando se usaron más de 2 estándares, por ejemplo, hasta seis estándares para la generación de cada curva de calibración, y diferentes tipos de calibración para cada una de las dos curvas de calibración (por ejemplo, spline).

Se utiliza la primera curva de calibración que está optimizada para una baja concentración del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y se utiliza la segunda curva de calibración que está optimizada para una alta concentración del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Para la cuantificación de ALTL se debe seleccionar la primera curva de calibración o la segunda curva de calibración, dependiendo del contenido de analito o la absorbancia correspondiente de la muestra por cuantificar. Para este fin, la señal de la muestra se compara con un valor umbral predeterminado. El valor umbral para ALTL se puede definir como uno de los dos o ambos valores de absorbancia en las curvas de calibración para ALTL que corresponden a una concentración de 200 U/l, es decir, la absorbancia a 340 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 8,5 minutos ($A[\lambda_1, t_1] = A[340 \text{ nm}-800 \text{ nm}, 8,5 \text{ minutos}]$) y/o la absorbancia a 376 nm-700 nm para el tiempo de reacción de 1,4 minutos ($A[\lambda_2, t_2] = A[376 \text{ nm}-700 \text{ nm}, 1,4 \text{ minutos}]$).

Si la señal óptica de la muestra calculada para 340 nm-800 nm y 8,5 minutos de tiempo de reacción está por debajo

del valor umbral predeterminado A[340 nm-800 nm, 8,5 minutos] y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 376 nm-700 nm y 1,4 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado A[376 nm-700 nm, 1,4 minutos], se usa la segunda curva de calibración para su cuantificación.

- 5 Si la señal óptica de la muestra calculada para 340 nm-800 nm y 8,5 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado A[340 nm-800 nm, 8,5 minutos] y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 376 nm-700 nm y 1,4 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado A[376 nm-700 nm, 1,4 minutos], se usa la primera curva de calibración para su cuantificación. Como resultado, se obtienen dos curvas de calibración para cubrir el intervalo de medición para la determinación de ALTL, la primera cubriendo concentraciones de analito desde 0 hasta 200 U/l y la segunda cubriendo el intervalo desde 200 U/l hasta el UDL.

Resultados para el ensayo de ALTL usando la estrategia estándar y la estrategia de acuerdo con la invención

15 **6.8 Determinación de LDL / UDL / CV: ver el ejemplo 1**

6.9 Resumen de resultados y conclusiones

El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 7. La aplicación de la nueva estrategia a la prueba de ALTL de Roche muestra un aumento de la sensibilidad (LDL, límite inferior de detección) en un factor de 2,9 y una ampliación del límite superior de detección (UDL) en un factor de 4,2. Finalmente, el intervalo dinámico se amplió en un factor de 12,2. La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. La nueva estrategia brinda una mínima implementación; la aplicación de la estrategia no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Solo se pueden adaptar el número y/o la concentración de estándares para la calibración, en caso necesario.

25 **Tabla 7: Resumen de resultados para ALTL**

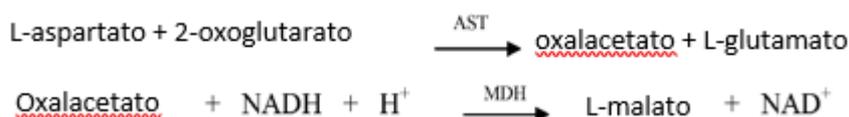
	Procedimiento estándar (longitud de onda de 340 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 4,1 min)	Nuevo procedimiento (curva de calibración 1: longitud de onda de 340 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 8,5 min.; curva de calibración 2: longitud de onda de 376 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 1,4 min)
LDL (U/l)	1,6	0,55
UDL (U/l)	811	3383
Intervalo dinámico	507	6151
Intervalo de medición (U/l)	1,6-811	0,55-3383
CV a 10 U/l (%)	8,37	5,00
CV a 150 U/l (%)	0,53	0,30
CV a 2000 U/l (%)	0,47	0,44

30 **Ejemplo 7: Determinación del intervalo dinámico de ensayos colorimétricos Aspartato aminotransferasa (ASTL)**

7.1 Instrumento: ver el ejemplo 1

35 **7.2 Procedimiento para el ensayo de ASTL (aspartato aminotransferasa) utilizando la estrategia estándar**

Se seleccionó para este estudio la prueba de aspartato aminotransferasa de Roche (ASTL, Ref. Cat. 20764949), un ensayo colorimétrico. La enzima aspartato aminotransferasa (AST) cataliza la reacción entre L-aspartato y 2-oxoglutarato. El oxalacetato formado se reduce por NADH en una reacción catalizada por malato deshidrogenasa (MDH) para formar L-malato y NAD⁺. La tasa de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de AST que se mide fotométricamente. Se determina midiendo la disminución en la absorbancia.



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 e información relacionada con la prueba. Para las pruebas ASTL, el casete está compuesto por dos reactivos: R1 (tampón TRIS, pH 7,8, L-aspartato, albúmina (bovina), MDH (microorganismos), LDH (microorganismos), estabilizantes y conservante) y R2 (2-oxoglutarato, NADH y conservante). El procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba ASTL se usó como procedimiento estándar.

7.3 Esquema de pipeteo

Se añadieron posteriormente a la celda de reacción 9 µl de muestra y 40 µl de reactivo R1 diluido con 51 µl de diluyente (agua), seguido de la adición de 17 µl de reactivo R2 diluido con 20 µl de diluyente (agua). Después, la mezcla de reacción se mezcló.

7.4 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Las lecturas de absorbancia se llevaron a cabo a 340 nm como longitud de onda principal y a 700 nm como longitud de onda de corrección. El tipo de ensayo fue un ensayo cinético A, también llamado ensayo de tasa A.

Para los ensayos de tasa, el transcurso de la reacción se sigue midiendo la absorbancia en función del tiempo. Es decir, las mediciones se toman a medida que avanza la reacción. Los ensayos de tasa utilizan estas mediciones porque sus cálculos de concentración se basan en la determinación de la tasa de cambio en la absorbancia. Un ensayo de tasa A está programado para múltiples puntos de medición. Esto significa que hay una ventana de medición y que cada medición fotométrica realizada dentro de esta ventana se tiene en cuenta para el cálculo de la tasa, comenzando con la lectura en el primer punto de medición programado y hasta la lectura en el segundo punto de medición programado. Los valores de absorbancia se convierten en la tasa de cambio en la absorbancia mediante análisis de mínimos cuadrados. Para ALTL, el primer punto de medición programado (punto de medición inicial) fue el punto de medición 12 que corresponde a poco después de que la muestra y el reactivo final se pipetearan a la celda de reacción (66 segundos después de la adición del reactivo final). El segundo punto de medición programado (punto de medición final) se tomó en el punto de medición 31 que corresponde a un tiempo de reacción de 4,1 minutos. La señal se calculó a partir de cada una de las lecturas entre los puntos de medida inicial y final. La tasa de cambio en la absorbancia (pendiente) entre estos dos puntos de medición se calculó mediante el procedimiento de mínimos cuadrados. Para la generación de la curva de calibración se midieron dos estándares de Roche (estándar 1: agua para la medición en blanco; estándar 2, Ref. Cat. 10759350) como duplicados con tipo de calibración lineal, que ajusta los puntos de datos de los calibradores medidos por un modo lineal de manera que se obtenga una curva de calibración lineal.

7.5 Procedimiento para el ensayo de ASTL de acuerdo con la presente invención

Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar, como se describe en el ejemplo 7.2. Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba ASTL, con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

7.6 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo 7.3

7.7 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Para la generación de las dos curvas de calibración se midieron 2 estándares como duplicados con tipo de calibración lineal, que ajusta los puntos de datos de los calibradores medidos por un modo lineal de manera que se obtenga una curva de calibración lineal (estándar 1: agua para la medición en blanco); estándar 2: Roche, Ref. Cat. 10759350). Las mejores condiciones para ambas curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente y se obtuvo el siguiente resultado: se usó 340 nm como primera longitud de onda, 700 nm como longitud de onda de corrección y 8,3 minutos como primer tiempo de reacción; se usó 376 nm como segunda longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 1,2 minutos como segundo tiempo de reacción. El tipo de ensayo fue un ensayo de dos puntos finales para ambas, la primera y la segunda curva de calibración, como se describe en el ejemplo 1.4. Para la primera curva de calibración, la primera lectura se realizó en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realizó en el punto de medición 57, que corresponde a un tiempo de reacción de 8,3 minutos; para la segunda curva de calibración, la primera lectura se realizó en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realizó en el punto de medición 14, que corresponde a un tiempo de reacción de 1,2 minutos. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otros tipos de ensayo, como la cinética A, para el cálculo de la primera y/o la segunda curvas de calibración. Además, se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otras concentraciones estándar aparte de las utilizadas aquí (calibradores comercialmente disponibles de Roche, Ref. Cat. 10759350), así como cuando se usaron más de 2 estándares, por ejemplo, hasta seis estándares para la generación de cada curva de calibración, y diferentes tipos de calibración para cada una de las dos curvas de calibración (por ejemplo, spline).

Se utiliza la primera curva de calibración que está optimizada para una baja concentración del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y se utiliza la segunda curva de calibración que está optimizada para una alta concentración del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Para la cuantificación de ASTL se debe seleccionar la primera curva de calibración o la segunda curva de calibración, dependiendo del contenido de analito o la absorbancia correspondiente de la muestra por cuantificar. Para este fin, la señal de la muestra se compara con un valor umbral predeterminado. El valor umbral para ASTL se puede definir como uno de los dos o ambos valores de absorbancia en las curvas de calibración para ASTL que corresponden a una concentración de 200 U/l, es decir, la absorbancia a 340 nm-700 nm para el tiempo de reacción de 8,3 minutos ($A[\lambda_1, t_1] = A[340 \text{ nm-700 nm}, 8,3 \text{ minutos}]$) y/o la absorbancia a 376 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 1,2 minutos ($A[\lambda_2, t_2] = A[376 \text{ nm-800 nm}, 1,2 \text{ minutos}]$).

Si la señal óptica de la muestra calculada para 340 nm-700 nm y 8,3 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[340 \text{ nm-700 nm}, 8,3 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 376 nm-800 nm y 1,2 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[376 \text{ nm-800 nm}, 1,2 \text{ minutos}]$, se usa la segunda curva de calibración para su cuantificación.

Si la señal óptica de la muestra calculada para 340 nm-700 nm y 8,3 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[340 \text{ nm-700 nm}, 8,3 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 376 nm-800 nm y 1,2 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[376 \text{ nm-800 nm}, 1,2 \text{ minutos}]$, se usa la segunda curva de calibración para su cuantificación. Como resultado, se obtienen dos curvas de calibración para cubrir el intervalo de medición para la determinación de ASTL, la primera cubriendo concentraciones de analito desde 0 hasta 200 U/l y la segunda cubriendo el intervalo desde 200 U/l hasta el UDL.

Resultados para el ensayo de ASTL usando la estrategia estándar y la estrategia de acuerdo con la invención:

7.8 Determinación de LDL / UDL / CV: ver el ejemplo 1

7.9 Resumen de resultados y conclusiones

El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 8. La aplicación de la nueva estrategia a la prueba de ASTL de Roche muestra un aumento de la sensibilidad (LDL, límite inferior de detección) en un factor de 2,2 y una ampliación del límite superior de detección (UDL) en un factor de 3,4. Finalmente, el intervalo dinámico se amplió en un factor de 7,5. La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. La nueva estrategia brinda una mínima implementación; la aplicación de la estrategia no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Solo se pueden adaptar el número y/o la concentración de estándares para la calibración, en caso necesario.

Tabla 8: Resumen de resultados para ASTL

	Procedimiento estándar (longitud de onda de 340 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 4,1 min)	Nuevo procedimiento (curva de calibración 1: longitud de onda de 340 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 8,3 min.; curva de calibración 2: longitud de onda de 376 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 1,2 min)
LDL (U/l)	1,71	0,78
UDL (U/l)	854	2868
Intervalo dinámico	502	3677
Intervalo de medición (U/l)	1,71-854	0,78-2868
CV a 20 U/l (%)	4,46	1,67
CV a 150 U/l (%)	0,58	0,27
CV a 2000 U/l (%)	1,12	0,31

Ejemplo 8: Determinación del intervalo dinámico de ensayos colorimétricos Sangre-Urea-Nitrógeno (U-BUN)

8.1 Instrumento: ver el ejemplo 1

8.2 Procedimiento para el ensayo de U-BUN (sangre-urea-nitrógeno) utilizando la estrategia estándar

Se seleccionó para este estudio la prueba de Sangre-Urea-Nitrógeno de Roche (UREAL, Ref. Cat. 04460715), un ensayo colorimétrico. La enzima ureasa hidroliza la urea en presencia de ureasa para formar amonio y carbonato. En la siguiente reacción, la glutamato deshidrogenasa (GLDH) cataliza la reacción entre 2-oxoglutarato, amonio y NADH dando como resultado la formación de L-glutamato y NAD⁺. La tasa de disminución en la concentración de NADH es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra y se mide fotométricamente. Se determina midiendo la disminución en la absorbancia.



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 e información relacionada con la prueba. Para las pruebas U-BUN, el casete está compuesto por dos reactivos: R1 (NaCl 9 %) y R2 (tampón TRIS, pH 8,6, 2-oxoglutarato, NADH, ADP, ureasa (judía sable), GLDH (hígado bovino), estabilizadores no reactivos y conservantes). El procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba U-BUN (UREAL) se usó como procedimiento estándar.

8.3 Esquema de pipeteo

Se añadieron posteriormente a la celda de reacción 2 µl de muestra y 10 µl de reactivo R1 diluido con 90 µl de diluyente (agua), seguido de la adición de 38 µl de reactivo R2 diluido con 110 µl de diluyente (agua). Posteriormente, los componentes de la reacción se mezclaron.

8.4 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Las lecturas de absorbancia se llevaron a cabo a 340 nm como longitud de onda principal y a 700 nm como longitud de onda de corrección. El tipo de ensayo fue un ensayo cinético A, también llamado ensayo de tasa A. Para los ensayos de tasa, el transcurso de la reacción se sigue midiendo la absorbancia en función del tiempo. Es decir, las mediciones se toman a medida que avanza la reacción. Los ensayos de tasa utilizan estas mediciones porque sus cálculos de concentración se basan en la determinación de la tasa de cambio en la absorbancia. Un ensayo de tasa A está programado para múltiples puntos de medición. Esto significa que hay una ventana de medición y que cada medición fotométrica realizada dentro de esta ventana se tiene en cuenta para el cálculo de la tasa, comenzando con la lectura en el primer punto de medición programado y hasta la lectura en el segundo punto de medición programado. Los valores de absorbancia se convierten en la tasa de cambio en la absorbancia mediante análisis de mínimos cuadrados. Para U-BUN, el primer punto de medición programado (punto de medición inicial) fue el punto de medición 10 que corresponde a poco después de que la muestra y el reactivo final se pipetearan a la celda de reacción (42 segundos después de la adición del reactivo final). El segundo punto de medición programado (punto de medición final) se tomó en el punto de medición 19 que corresponde a un tiempo de reacción de 1,8 minutos. La señal se calculó a partir de cada una de las lecturas entre los puntos de medida inicial y final. La tasa de cambio en la absorbancia (pendiente) entre estos dos puntos de medición se calculó mediante el procedimiento de mínimos cuadrados. Para la generación de la curva de calibración se midieron dos estándares de Roche (estándar 1: agua para la medición en blanco; estándar 2, Ref. Cat. 10759350) como duplicados con tipo de calibración lineal, que ajusta los puntos de datos de los calibradores medidos por un modo lineal de manera que se obtenga una curva de calibración lineal.

8.5 Procedimiento para el ensayo de U-BUN de acuerdo con la presente invención

Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar, como se describe en el ejemplo 8.2. Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba U-BUN (UREAL), con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

8.6 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo 8.3

8.7 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Para la generación de las dos curvas de calibración se midieron 2 estándares como duplicados con tipo de calibración lineal, que ajusta los puntos de datos de los calibradores medidos por un modo lineal de manera que se obtenga una curva de calibración lineal (estándar 1: agua para la medición en blanco); estándar 2: Roche, Ref. Cat. 10759350). Las mejores condiciones para ambas curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente y se obtuvo el siguiente resultado: para la primera curva de calibración se usó 340 nm como primera longitud de onda, 800 nm como longitud de onda de corrección y 8,3 minutos como primer tiempo de reacción; para la segunda curva de calibración se usó 376 nm como segunda longitud de onda, 700 nm como longitud de onda de corrección y

1,4 minutos como segundo tiempo de reacción. El tipo de ensayo fue un ensayo de dos puntos finales para ambas, la primera y la segunda curva de calibración, como se describe en el ejemplo 1.4. Para la primera curva de calibración, la primera lectura se realizó en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realizó en el punto de medición 57, que corresponde a un tiempo de reacción de 8,3 minutos; para la segunda curva de calibración, la primera lectura se realizó en el punto de medición 8 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realizó en el punto de medición 15, que corresponde a un tiempo de reacción de 1,4 minutos. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otros tipos de ensayo, como la cinética A, para el cálculo de la primera y/o la segunda curvas de calibración. Además, se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otras concentraciones estándar aparte de las utilizadas aquí (calibradores comercialmente disponibles de Roche, Ref. Cat. 10759350), así como cuando se usaron más de 2 estándares, por ejemplo, hasta seis estándares para la generación de cada curva de calibración, y diferentes tipos de calibración para cada una de las dos curvas de calibración (por ejemplo, spline).

Se utiliza la primera curva de calibración que está optimizada para una baja concentración del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y se utiliza la segunda curva de calibración que está optimizada para una alta concentración del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Para la cuantificación de U-BUN se debe seleccionar la primera curva de calibración o la segunda curva de calibración, dependiendo del contenido de analito o la absorbancia correspondiente de la muestra por cuantificar. Para este fin, la señal de la muestra se compara con un valor umbral predeterminado. El valor umbral para U-BUN se puede definir como uno de los dos o ambos valores de absorbancia en las curvas de calibración para U-BUN que corresponden a una concentración de 10 mmol/l, es decir, la absorbancia a 340 nm-800 nm para el tiempo de reacción de 8,3 minutos ($A[\lambda_1, t_1] = A[340 \text{ nm-800 nm}, 8,3 \text{ minutos}]$) y/o la absorbancia a 376 nm-700 nm para el tiempo de reacción de 1,4 minutos ($A[\lambda_2, t_2] = A[376 \text{ nm-700 nm}, 1,4 \text{ minutos}]$).

Si la señal óptica de la muestra calculada para 340 nm-800 nm y 8,3 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[340 \text{ nm-800 nm}, 8,3 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 376 nm-700 nm y 1,4 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[376 \text{ nm-700 nm}, 1,4 \text{ minutos}]$, se usa la segunda curva de calibración para su cuantificación.

Si la señal óptica de la muestra calculada para 340 nm-800 nm y 8,3 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[340 \text{ nm-800 nm}, 8,3 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 376 nm-700 nm y 1,4 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[376 \text{ nm-700 nm}, 1,4 \text{ minutos}]$, se usa la primera curva de calibración para su cuantificación. Como resultado, se obtienen dos curvas de calibración para cubrir el intervalo de medición para la determinación de U-BUN, la primera cubriendo concentraciones de analito desde 0 hasta 10 mmol/l y la segunda cubriendo el intervalo desde 10 mmol/l hasta el UDL.

Resultados para el ensayo de U-BUN (UREAL) usando la estrategia estándar y la estrategia de acuerdo con la invención

8.8 Determinación de LDL / UDL / CV: ver el ejemplo 1

8.9 Resumen de resultados y conclusiones

El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 9. La aplicación de la nueva estrategia a la prueba de U-BUN de Roche muestra un aumento de la sensibilidad (LDL, límite inferior de detección) en un factor de 2,2 y una ampliación del límite superior de detección (UDL) en un factor de 1,4. Finalmente, el intervalo dinámico se amplió en un factor de 3. La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. La nueva estrategia brinda una mínima implementación; la aplicación de la estrategia no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Solo se pueden adaptar el número y/o la concentración de estándares para la calibración, en caso necesario.

Tabla 9: Resumen de resultados para U-BUN

	Procedimiento estándar (longitud de onda de 340 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 1,8 min)	Nuevo procedimiento (curva de calibración 1: longitud de onda de 340 nm, longitud de onda de corrección de 800 nm, tiempo de reacción de 8,3 min.; curva de calibración 2: longitud de onda de 376 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 1,4 min)
LDL (mmol/l)	0,071	0,032
UDL (mmol/l)	57	78
Intervalo dinámico	803	2438

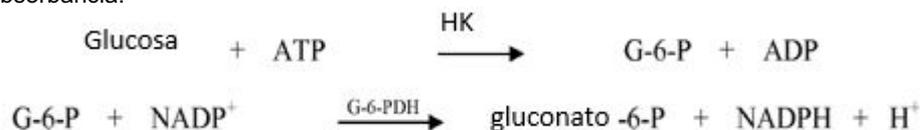
Intervalo de medición (mmol/l)	0,071-57	0,032-78
CV a 2 mmol/l (%)	1,74	1,35
CV a 10 mmol (%)	0,99	0,91
CV a 60 mmol (%)	0,72	0,92

Ejemplo 9: Determinación del intervalo dinámico de ensayos colorimétricos Glucosa (Gluc3)

9.1 Instrumento ver el ejemplo 1.

9.2 Procedimiento para el ensayo de glucosa (Glu3) utilizando la estrategia estándar

Se seleccionó para este estudio la prueba de glucosa de Roche (Gluc3, Ref. Cat. 04404483), un ensayo colorimétrico. La enzima hexocinasa cataliza la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato (G-6-P) por ATP. En la siguiente reacción, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) oxida la glucosa-6-fosfato en presencia de NADP⁺ dando como resultado la formación de gluconato-6-fosfato y NADPH. La tasa de formación de NADPH es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra y se mide fotométricamente. Se determina midiendo el aumento en la absorbancia.



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 e información relacionada con la prueba. Para las pruebas Gluc3, el casete está compuesto de dos reactivos: R1 (tampón MES, pH 6,0, Mg²⁺, ATP, NADP y conservante) y R2 (tampón HEPES, pH 8,0, Mg²⁺, hexocinasa (levadura), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*E. coli*) y conservantes). El procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba Glu3 se usó como procedimiento estándar.

9.3 Esquema de pipeteo

Se añadieron posteriormente a la celda de reacción 2 µl de muestra y 28 µl de reactivo R1 diluido con 141 µl de diluyente (agua), seguido de la adición de 10 µl de reactivo R2 diluido con 20 µl de diluyente (agua). Posteriormente, los componentes de la reacción se mezclaron.

9.4 Condiciones para la generación de la curva de calibración

Las lecturas de absorbancia se llevaron a cabo a 340 nm como longitud de onda principal y a 700 nm como longitud de onda de corrección. Las lecturas de absorbancia se realizaron en dos puntos de medición diferentes. 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 primera lectura de la segunda lectura.

Para Gluc3, la primera lectura se realiza en el punto de medición 6 y corresponde a poco antes de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 32, que corresponde a un tiempo de reacción de 5,5 minutos. Para la generación de la curva de calibración se midieron dos estándares como duplicados con tipo de calibración lineal, que ajusta los puntos de datos de los calibradores medidos por un modo lineal de manera que se obtenga una curva de calibración lineal (estándar 1: agua para la medición en blanco); estándar 2: Roche, Ref. Cat. 10759350).

9.5 Procedimiento para el ensayo Glu3 de acuerdo con la invención

Los reactivos utilizados para estos experimentos fueron idénticos a los utilizados para el procedimiento estándar, como se describe en el ejemplo 9.2. Se utilizó el procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba Glu3, con la excepción de las longitudes de onda y los tiempos de reacción.

9.6 Esquema de pipeteo: idéntico al esquema de pipeteo 9.3

9.7 Condiciones para la generación de la curva de calibración

5 Para la generación de las dos curvas de calibración se midieron dos estándares como duplicados con tipo de calibración lineal, que ajusta los puntos de datos de los calibradores medidos por un modo lineal de manera que se obtenga una curva de calibración lineal (estándar 1: agua para la medición en blanco); estándar 2: Roche, Ref. Cat. 10759350). Las mejores condiciones para ambas curvas de calibración se determinaron como se describe anteriormente y se obtuvo el siguiente resultado: para la primera curva de calibración se usó 340 nm como primera longitud de onda, 700 nm como longitud de onda de corrección y 8,7 minutos como primer tiempo de reacción; para 10 la segunda curva de calibración se usó 376 nm como segunda longitud de onda, 700 nm como longitud de onda de corrección y 5,5 minutos como segundo tiempo de reacción. El tipo de ensayo fue un ensayo de dos puntos finales que ya se describió en el procedimiento estándar para la prueba Gluc3. Para la primera curva de calibración, la primera lectura se realizó en el punto de medición 6 (6 segundos antes de la adición del reactivo final) y la segunda lectura se realizó en el punto de medición 57, que corresponde a un tiempo de reacción de 8,7 minutos; para la segunda curva de calibración, la primera lectura también se realizó también en el punto de medición 6 y la segunda lectura se realizó 15 en el punto de medición 32, que corresponde a un tiempo de reacción de 5,5 minutos. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otros tipos de ensayo, como la cinética A, para el cálculo de la primera y/o la segunda curvas de calibración. Además, se obtuvieron resultados similares cuando se usaron otras concentraciones estándar aparte de las utilizadas aquí (calibradores comercialmente disponibles de Roche, Ref. Cat. 10759350), así como 20 cuando se usaron más de 2 estándares, por ejemplo, hasta seis estándares para la generación de cada curva de calibración, y diferentes tipos de calibración para cada una de las dos curvas de calibración (por ejemplo, spline).

Se utiliza la primera curva de calibración que está optimizada para una baja concentración del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección, y se utiliza la segunda curva de calibración que está optimizada para 25 una alta concentración del analito específico, maximizando así el límite superior de detección. Para la cuantificación de Glu3 se debe seleccionar la primera curva de calibración o la segunda curva de calibración, dependiendo del contenido de analito o la absorbancia correspondiente de la muestra por cuantificar. Para este fin, la señal de la muestra se compara con un valor umbral predeterminado. El valor umbral para Gluc3 se puede definir como uno de los dos o ambos valores de absorbancia en las curvas de calibración para Gluc3 que corresponden a una 30 concentración de 10 mmol/l, es decir, la absorbancia a 340 nm-700 nm para el tiempo de reacción de 8,7 minutos ($A[\lambda_1, t_1] = A[340 \text{ nm-700 nm}, 8,7 \text{ minutos}]$) y/o la absorbancia a 376 nm-700 nm para el tiempo de reacción de 5,5 minutos ($A[\lambda_2, t_2] = A[376 \text{ nm-700 nm}, 5,5 \text{ minutos}]$).

Si la señal óptica de la muestra calculada para 340 nm-700 nm y 8,7 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[340 \text{ nm-700 nm}, 8,7 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 376 nm-700 nm y 5,5 minutos de tiempo de reacción está por debajo del valor umbral predeterminado $A[376 \text{ nm-700 nm}, 5,5 \text{ minutos}]$, se usa la primera curva de calibración para su cuantificación.

Si la señal óptica de la muestra calculada para 340 nm-700 nm y 8,7 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[340 \text{ nm-700 nm}, 8,7 \text{ minutos}]$ y/o si la señal óptica de la muestra calculada para 376 nm-700 nm y 5,5 minutos de tiempo de reacción supera el valor umbral predeterminado $A[376 \text{ nm-700 nm}, 5,5 \text{ minutos}]$, se usa la segunda curva de calibración para su cuantificación. Como resultado, se obtienen dos curvas de calibración para cubrir el intervalo de medición para la determinación de Glu3, la primera cubriendo concentraciones de analito desde 0 hasta 10 mmol/l y la segunda cubriendo el intervalo desde 10 mmol/l hasta el UDL.

Resultados para el ensayo de Glu3 usando la estrategia estándar y la estrategia de acuerdo con la invención

9.8 Determinación de LDL / UDL / CV: ver el ejemplo 1.

50 9.9 Resumen de resultados y conclusiones

El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 10. La aplicación de la nueva estrategia a la prueba Gluc3 de Roche muestra un aumento de la sensibilidad (LDL, límite inferior de detección) en un factor de 1,5 y una ampliación del límite superior de detección (UDL) en un factor de 1,6. Finalmente, el intervalo dinámico se amplió en un factor de 55 2,4. La precisión (CV) obtenida con el nuevo procedimiento es comparable a la del procedimiento estándar. La nueva estrategia brinda una mínima implementación; la aplicación de la estrategia no necesita ningún cambio de reactivos ni de sus formulaciones. Solo se pueden adaptar el número y/o la concentración de estándares para la calibración, en caso necesario.

60 **Tabla 10: Resumen de resultados para Gluc3**

ES 2 657 140 T3

	Procedimiento estándar (longitud de onda de 340 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 5,5 min)	Nuevo procedimiento (curva de calibración 1: longitud de onda de 340 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 8,7 min.; curva de calibración 2: longitud de onda de 376 nm, longitud de onda de corrección de 700 nm, tiempo de reacción de 5,5 min)
LDL (mmol/l)	0,017	0,011
UDL (mmol/l)	46	73
Intervalo dinámico	2706	6636
Intervalo de medición (mmol/l)	0,017-46	0,011-73
CV a 0,3 mmol (%)	6,51	5,94
CV a 10 mmol (%)	0,75	0,71
CV a 100 mmol (%)	0,55	0,83

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la cantidad de un analito específico mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico de una muestra reacciona con un socio de reacción específico del analito en una mezcla de reacción, que comprende las etapas de:
- 5 a) generar al menos dos curvas de calibración, en las que
- la primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección y,
 - la segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección,
- 10 b) medir simultáneamente la señal óptica para el analito específico de una muestra por determinar en la mezcla de reacción al menos a la primera y la segunda longitudes de onda,
- c) seleccionar la primera o la segunda curva de calibración para la cuantificación del analito específico, mediante los siguientes criterios:
- 15 para curvas de calibración crecientes:
- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda;
 - si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda,
- 20 para curvas de calibración decrecientes:
- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración registrada a la segunda longitud de onda;
 - si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda,
- 25 d) cuantificar la cantidad del analito específico por comparación con la curva de calibración seleccionada.
- 30
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos, el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la turbidez de la mezcla de reacción basado en la aglutinación del analito específico y un socio de unión específico del analito.
- 35
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, en ensayos colorimétricos, el analito específico se cuantifica con la ayuda de un reactivo de color.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera curva de calibración se registra a una primera longitud de onda y a un primer tiempo de reacción.
- 40
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la segunda curva de calibración se registra a una segunda longitud de onda y a un segundo tiempo de reacción.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que la medición simultánea de la señal óptica para el analito específico de una muestra por determinar en la mezcla de reacción se realiza al menos a la primera y la segunda longitudes de onda durante el tiempo de reacción completo.
- 45
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que los resultados de medición se almacenan en un sistema de gestión de datos de la plataforma del instrumento.
- 50
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que opcionalmente se determinan longitudes de onda adicionales como un valor del blanco para la corrección de interferencias y la compensación del ruido fotométrico.
- 55
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que se generan al menos dos curvas de calibración que se registran a las mismas longitudes de onda y a diferentes tiempos de reacción.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que el socio de reacción específico del analito comprende proteínas de unión, antígenos, fragmentos de antígeno, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores y socios de unión potenciados por partículas, enzimas, sustratos o reactivos químicos específicos que conducen a un cambio de color o a un cambio de turbidez en presencia de un analito.
- 60
11. Procedimiento para aumentar la sensibilidad y/o el intervalo dinámico de ensayos fotométricos, en el que el analito específico en una muestra reacciona con un socio de reacción específico del analito en una mezcla de reacción, que comprende las etapas de:
- 65 a) generar al menos dos curvas de calibración, en las que

- la primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda se optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección y,
 - la segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección,
- 5 b) medir simultáneamente la señal óptica para el analito específico de una muestra por determinar en la mezcla de reacción al menos a la primera y la segunda longitudes de onda,
- c) seleccionar la primera o la segunda curva de calibración para la cuantificación del analito específico, mediante los siguientes criterios:
- para curvas de calibración crecientes:
- 10 - si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda;
- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración
- 15 registrada a la segunda longitud de onda,
- para curvas de calibración decrecientes:
- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda es menor que un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la segunda curva de calibración
- 20 registrada a la segunda longitud de onda;
- si la señal óptica de la primera y/o segunda longitudes de onda supera un valor umbral predeterminado correspondiente, la concentración del analito se determina mediante el uso de la primera curva de calibración registrada a la primera longitud de onda,
- d) cuantificar la cantidad del analito específico por comparación con la curva de calibración seleccionada.
- 25 12. Uso de al menos dos longitudes de onda y al menos dos tiempos de reacción predeterminados para un analito específico para la generación de al menos dos curvas de calibración para cuantificar la cantidad de un analito específico en ensayos fotométricos, en el que el analito específico de una muestra reacciona con un socio de reacción específico del analito en una mezcla de reacción, en el que
- una primera curva de calibración registrada a una primera longitud de onda y a un primer tiempo de reacción se
- 30 optimiza para bajas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite inferior de detección y
- una segunda curva de calibración registrada a una segunda longitud de onda y a un segundo tiempo de reacción se optimiza para altas concentraciones del analito específico, maximizando así el límite superior de detección.
- 35 13. Un procedimiento implementado por ordenador para determinar la longitud de onda, el tiempo de reacción y el umbral óptimos de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, que comprende las etapas de:
- a) recibir un conjunto de datos que representa los valores de absorbancia de las muestras registradas a múltiples longitudes de onda durante el tiempo de reacción completo disponibles simultáneamente en un analizador, en el que dicho conjunto de datos incluye una pluralidad de puntos de datos para:
- 40 - estándares para la calibración,
- una muestra en blanco para la determinación del LDL,
- al menos 2 muestras para la determinación de la precisión,
- series de dilución
- b) establecer los valores umbral a una concentración en la que las curvas de calibración cambian de la primera a la
- 45 segunda curva de calibración, usando la primera curva de calibración para la cuantificación del analito a concentraciones más bajas y usando la segunda curva de calibración para la cuantificación del analito a concentraciones más altas
- c) determinar la primera y la segunda longitudes de onda, así como el primer y el segundo tiempos de reacción; analizar las curvas cinéticas y seleccionar la configuración óptima para la primera curva de calibración y la segunda
- 50 curva de calibración de acuerdo con las reivindicaciones 1-10.

Figura 1:

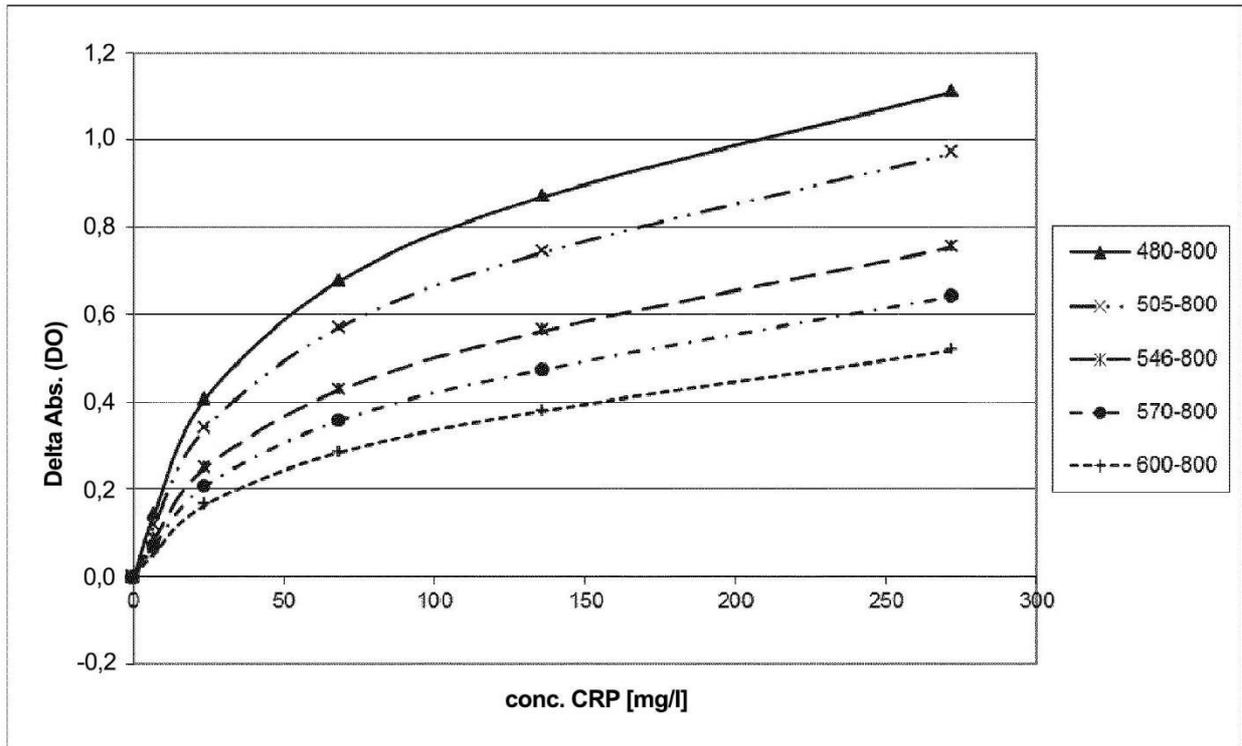


Figura 2:

Prueba	Condiciones estándar ^{a,c}	Nuevas condiciones ^{a,c}		Factor de mejora:		
		Cal 1	Cal 2	LDL	LDL	intervalo din.
CRP: formato de ensayo directo con MP2 seleccionada	570 - 800 nm / 2,0 min	505 - 800 / 2,8 min	570 - 800 nm / 2,0 min	8	-	8
	MP1: 110-140 nm, 45 mg de IgG/g MP2: 220 nm, 50 mg de IgG/g	MP1: 110-140 nm, 45 mg de IgG/g MP2: 290 nm, 60 mg de IgG/g	MP1: 110-140 nm, 45 mg de IgG/g MP2: 290 nm, 60 mg de IgG/g			
CRP: formato de ensayo directo con MP1 y MP2 seleccionadas	570 - 800 nm / 2,0 min	545 - 800 / 7,1 min	660 - 800 nm / 0,8 min	3,0	2,3	6,9
	MP1: 110-140 nm, 45 mg de IgG/g MP2: 220 nm, 50 mg de IgG/g	MP1: 90 nm, 50 mg de IgG/g MP2: 290 nm, 70 mg de IgG/g	MP1: 90 nm, 50 mg de IgG/g MP2: 290 nm, 70 mg de IgG/g			

- a** El ensayo CRP L3 de Roche incluye dos tipos diferentes de partículas, partículas grandes MP2 (aproximadamente 220 nm) con anticuerpos anti-CRP altamente afines y partículas pequeñas MP1 (aproximadamente 110-140nm) con anticuerpos anti-CRP menos afines,
- b** La buena precisión de las condiciones estándar se conserva en las nuevas condiciones,
- c** Longitud de onda principal - longitud de onda de corrección/tiempo de reacción en minutos

Figura 3:

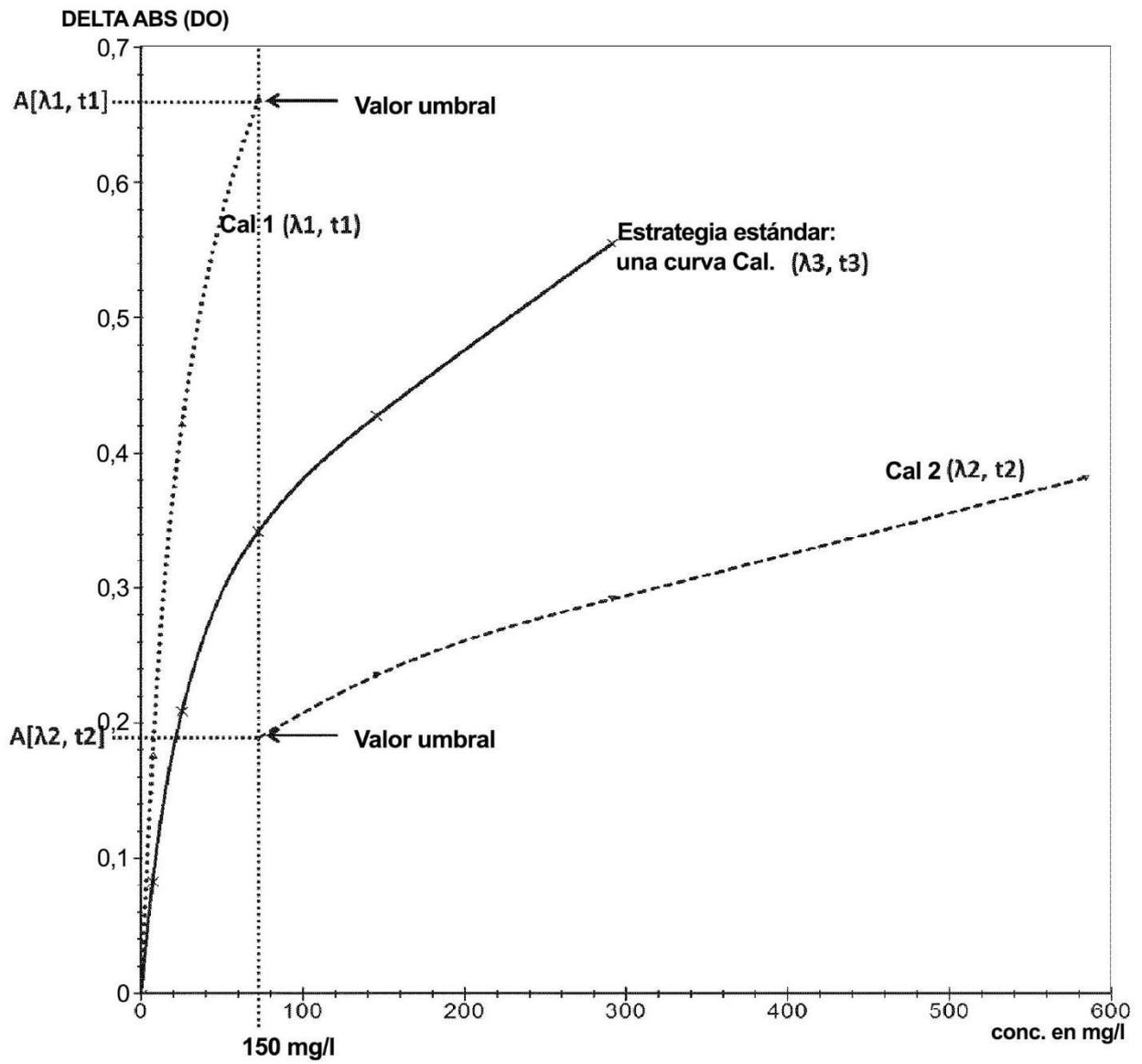


Figura 4:

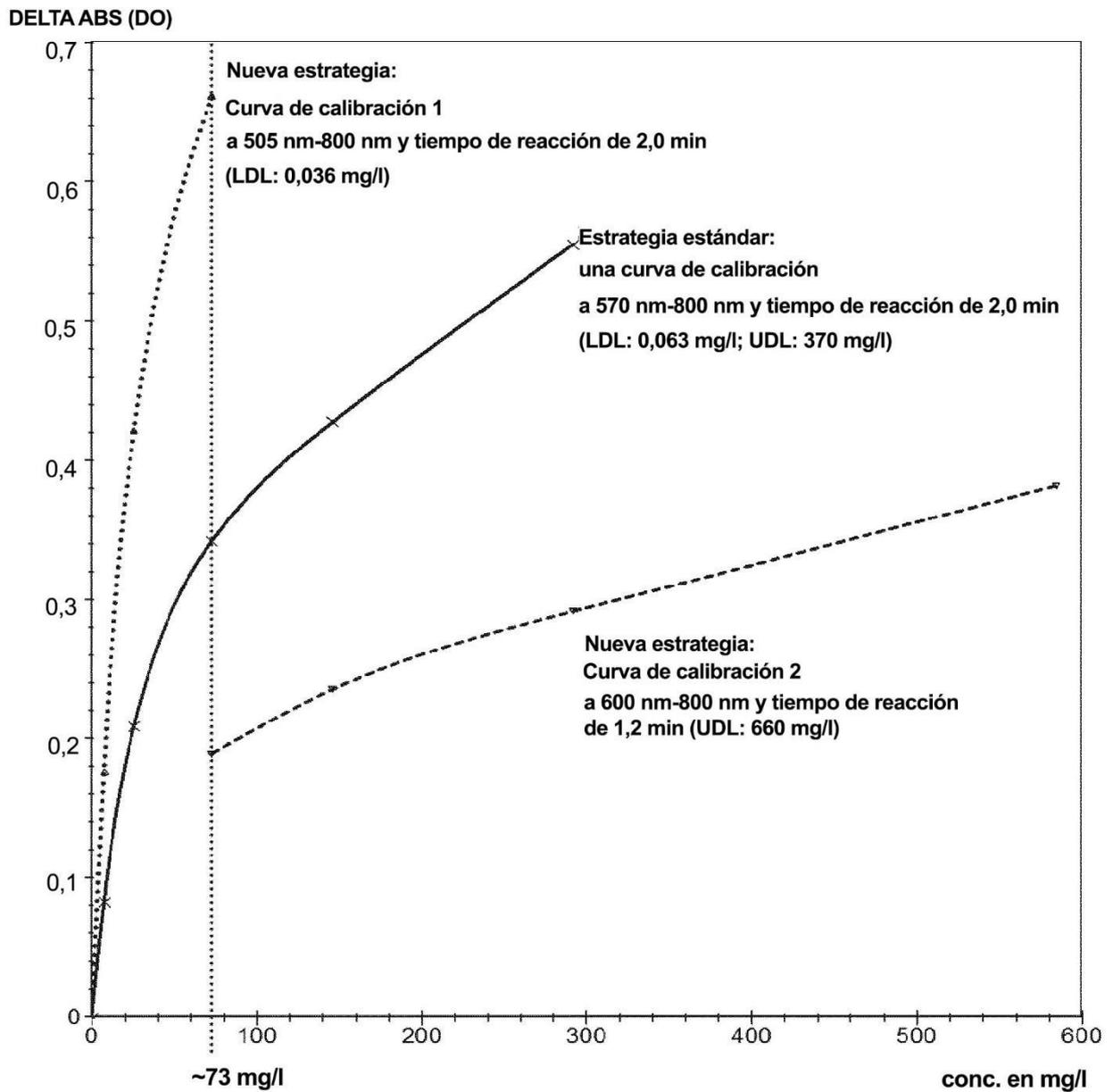


Figura 5:

Resumen de resultados - en la mayoría de los casos, la nueva estrategia mejora/amplía el intervalo dinámico *sin modificación de reactivos*

Prueba de Roche	Condiciones estándar ^d	Nuevas condiciones ^d		Factor de mejora ^c		
		Cal 1	Cal 2	LDL	UDL intervalo din.	
Ferritina Gen. 4 ensayo directo	570 nm - 800 nm / 5,1 min	505 nm - 800 nm / 4,9 min	570 - 800 nm / 5,1 min	1,7	-	1,7
Mioglobina Gen. 2 ensayo directo	570 nm - 800 nm / 4,7 min	505 nm - 800 nm / 6,7 min	660 - 800 nm / 2,6 min	2 ^a	2	4
Dímero D Gen. 2 ensayo directo	800 nm / 4,3 min	800 nm / 4,3 min	700 nm / 1,4 min	-	(1,14)	(1,14)
RF II ensayo directo	570 nm - 800 nm / 2,2 min	546 nm - 800 nm / 8,5 min	660 - 800 nm / 1,4 min	5 ^b	(1,15)	5,8
CRP L3 (Gen. 3) ensayo directo	570 nm - 800 nm / 2,0 min	505 nm - 800 nm / 2,0 min	600 - 800 nm / 1,2 min	1,8	1,8	3,1
DIG ensayo competitivo	660 nm / 4,7 min	660 nm / 4,7 min	505 - 800 nm / 4,7 min	-	(1,15)	(1,15)
PHENO ensayo competitivo	600 nm - 800 nm / 6,5 min	600 nm - 800 nm / 6,5 min	505 - 800 nm / 7,9 min	-	1,5	1,5

^a Sin factor del instrumento, ^b Cambiar la calibración a spline, ^c La buena precisión de las condiciones estándar se conserva en las nuevas condiciones, ^d Longitud de onda principal - longitud de onda de corrección/tiempo de reacción en minutos

Figura 6 a:

Ferritina, 0 y 10 μl (N = 21) a

A) 505 nm y

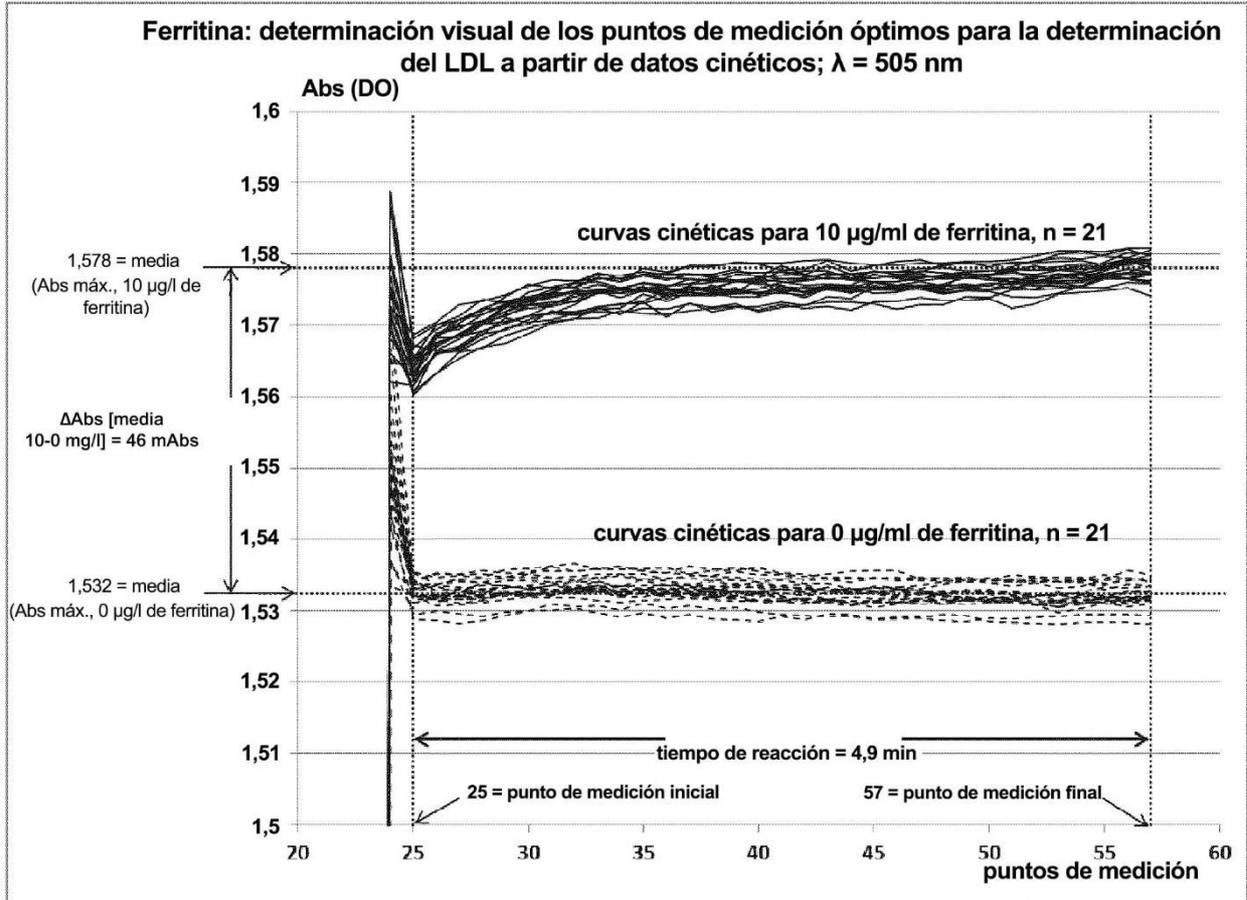


Figura 6 b:

Ferritina, 0 y 10 μl (N = 21) a

B) 570 nm

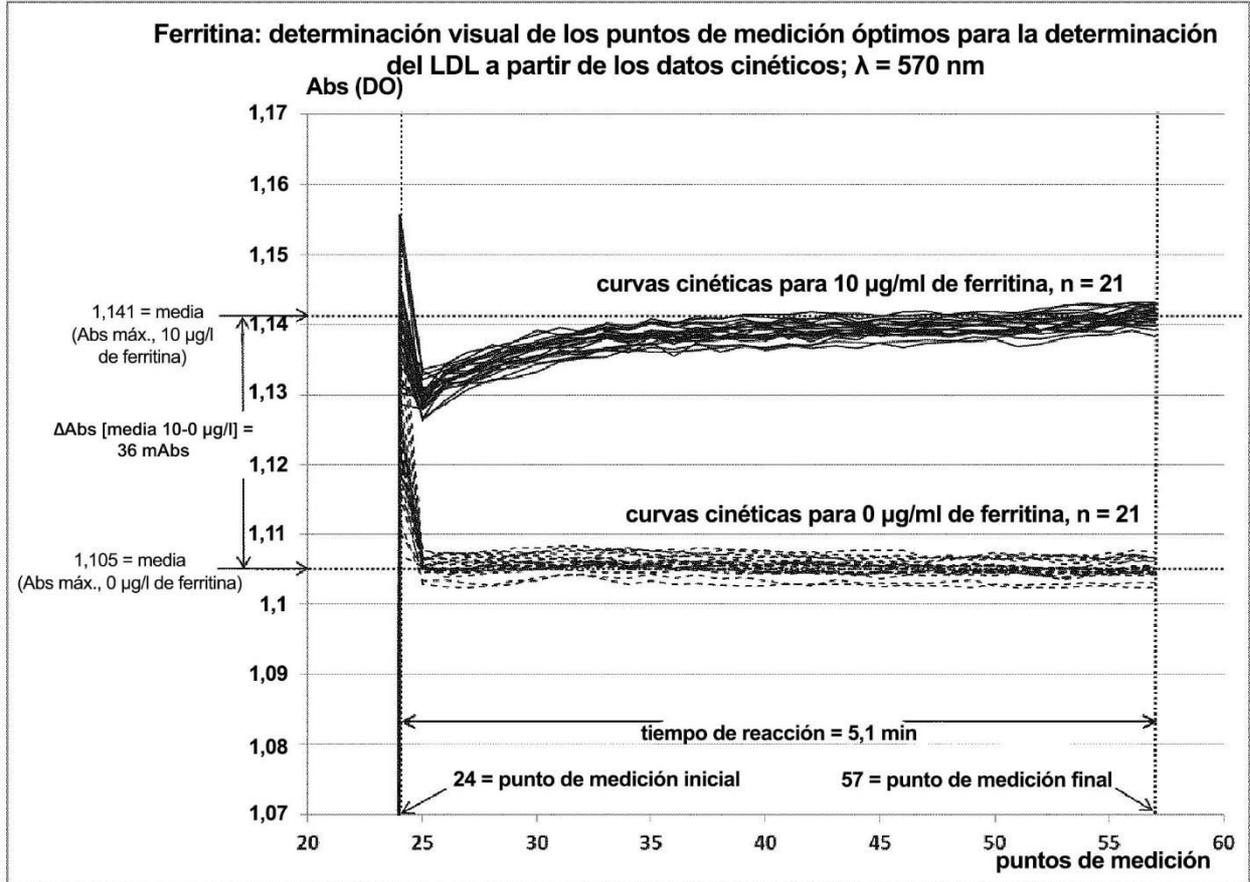


Figura 7:

Ferritina, 981-4950 $\mu\text{g/l}$ (N = 1) a 570-800 nm

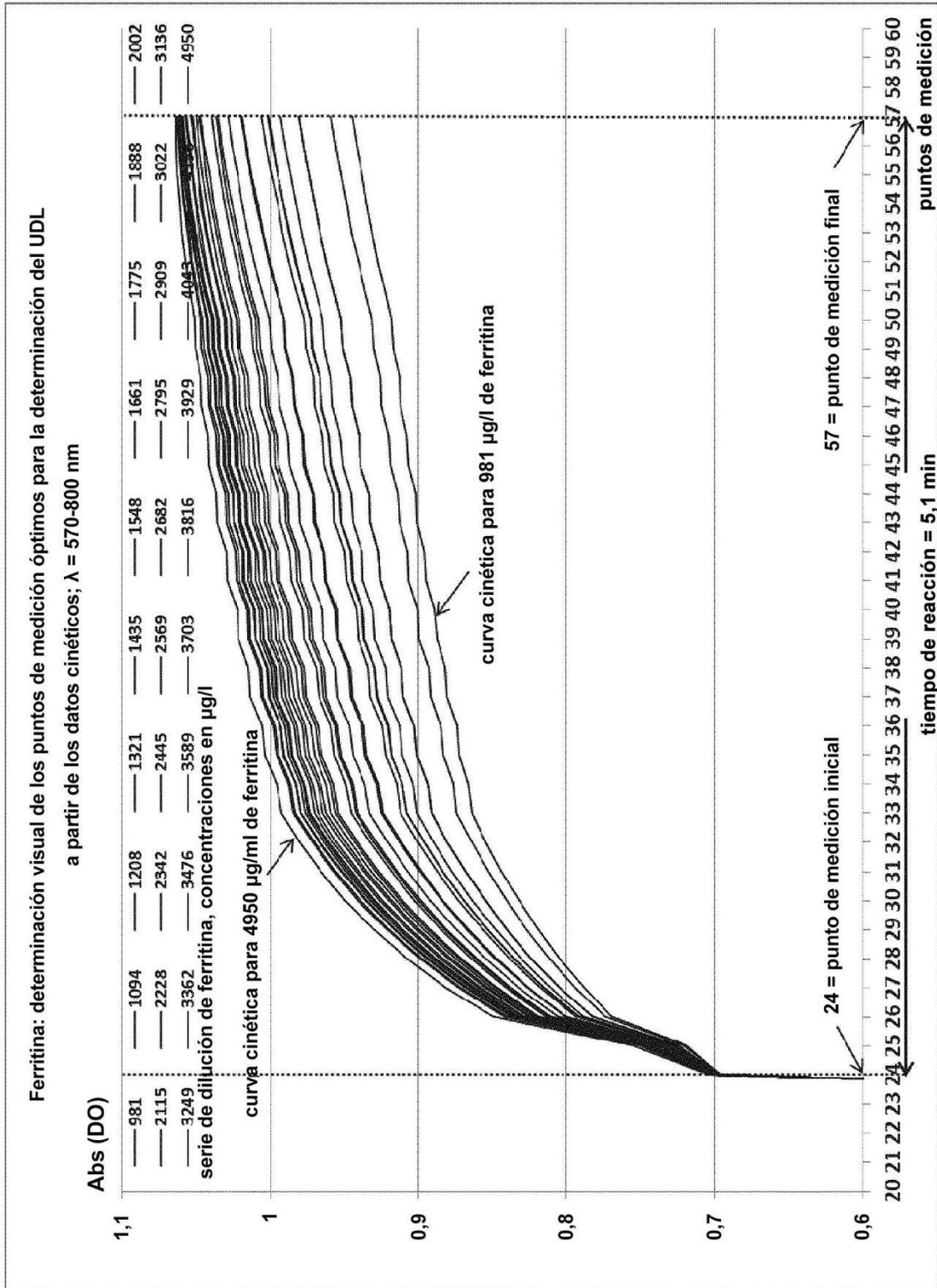


Figura 8:

Ensayo	Factor de mejora para el intervalo dinámico basado en la invención	Reducción de las repeticiones automáticas por la invención	
		Repeticiones provocadas por muestras por debajo del intervalo de medición estándar	Repeticiones provocadas por muestras por encima del intervalo de medición estándar
ALTL	12,2	87 %	99 %
ASTL	7,5	87 %	99 %
CRPL3	3,1	57 %	99 %
Dímero D Gen.2	1,14	sin cálculo *	0 %
DIG	1,15	0 %	27 %
Ferritina Gen.4	1,7	71 %	0 %
GLUC3	2,4	81 %	96 %
MYO2	4	sin cálculo *	51 %
PHENO	1,5	3 %	77 %
RF II	5,8	97 %	9 %
U-BUN	3	sin cálculo *	87 %

* no hay suficientes datos disponibles para el cálculo