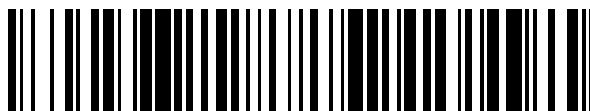


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 073**

51 Int. Cl.:

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2013 PCT/EP2013/058674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13160424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2013 E 13719520 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2841919**

54 Título: **Enfoque de aplicación múltiple para la determinación fotométrica de un analito en una muestra de fluido en un analizador automatizado**

30 Prioridad:

26.04.2012 EP 12002952

07.12.2012 EP 12196036

21.12.2012 EP 12198881

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

02.04.2019

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KURTZ, GEORG y

LOPEZ-CALLE, ELOISA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 707 073 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

Enfoque de aplicación múltiple para la determinación fotométrica de un analito en una muestra de fluido en un analizador automatizado

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la cantidad de un analito específico en una muestra que puede presentar interferencias mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción después de la interacción del analito con reactivos de ensayo específicos del analito. Se generan múltiples curvas de calibración para múltiples longitudes de onda para el analito específico de una muestra que se va a determinar, depositándose los resultados de la medición en un sistema de gestión de datos de la plataforma del instrumento. Una prueba de interferencia se realiza simultáneamente a la determinación del analito específico, para cuantificar la cantidad de sustancias interferentes presentes en la muestra a determinar. La cantidad de cada sustancia interferente se compara con valores de corte predeterminados. La señal óptica para el analito específico de una muestra que se va a determinar se mide en la mezcla de reacción en múltiples longitudes de onda durante todo el tiempo de reacción, y se selecciona una curva de calibración dependiendo de las sustancias que interfieren. Finalmente, la cantidad del analito específico de una muestra a determinar se cuantifica por comparación con la curva de calibración seleccionada para las longitudes de onda elegidas.

Los ensayos de diagnóstico para la determinación fotométrica de analitos en fluidos, incluidos los ensayos turbidimétricos, nefelométricos y colorimétricos, son comunes y bien conocidos. Debido a su sencillo procedimiento en una sola etapa y a sus cortos tiempos de ejecución, estos ensayos son candidatos ideales para la aplicación en analizadores automatizados. Hoy en día, los analizadores espectrofotométricos altamente automatizados se utilizan en los diagnósticos clínicos para realizar ensayos fotométricos de manera eficiente en tiempo y coste. El flujo de trabajo en el analizador se caracteriza por un procedimiento simple sin ninguna separación o etapa de lavado, que generalmente incluye el siguiente protocolo: a) la muestra (suero o plasma) que contiene cantidades desconocidas de analito y reactivos de ensayo específicos del analito se dispensan en una cubeta de reacción, b) en la cubeta, la muestra y los reactivos se dejan incubar durante un cierto período de tiempo a una temperatura prescrita, c) el fotómetro mide la señal óptica de la solución de ensayo en la cubeta que se correlaciona con la cantidad de analito en la muestra.

Se ofrece un amplio menú de pruebas basado en ensayos turbidimétricos, nefelométricos o colorimétricos para los analizadores de bioquímica clínica, por ejemplo, Roche Diagnostics cobas® c. La detección de estos ensayos en los instrumentos cobas® c se basa en un fotómetro con una lámpara halógena de tungsteno como fuente de irradiación, una rejilla para generar luz monocromática y una matriz de fotodiodos (12 diodos que producen 12 longitudes de onda entre 340 y 800 nm) como detector.

Betsch y otros (Clin. Lab., Vol. 56, 1 de enero de 2010) describen una evaluación analítica multicéntrica de un nuevo sistema para los puntos de atención sanitaria para la determinación de marcadores cardíacos y tromboembólicos.

A menudo, las muestras críticas se envían para pruebas bioquímicas de rutina en laboratorios clínicos que muestran interferencias con los ensayos aplicados, lo que lleva a resultados alterados e incorrectos. Cuando se trabaja con pruebas de laboratorio que utilizan procedimientos ópticos, como enfoques colorimétricos y turbidimétricos, las sustancias en la matriz de la muestra que son de colores o dispersan la luz generalmente causan interferencias. Ejemplos de tales sustancias interferentes son la hemoglobina (hemólisis), la bilirrubina (ictericia) y los lípidos (lipemia) que absorben o dispersan la luz en longitudes de onda que se usan comúnmente para pruebas espectrofotométricas.

La hemólisis es un importante factor de interferencia que generalmente es atribuible al daño *in vitro* de los eritrocitos por diferentes factores, tal como el almacenamiento prolongado de la sangre antes de separar el suero o el plasma, fuerzas de cizalladura al forzar rápidamente la sangre a través de agujas pequeñas, agitación excesiva cuando se mezcla o el acto físico de centrifugación y separación del suero. La hemólisis *in vivo* se produce con menos frecuencia, pero tiene el mismo efecto en las pruebas de laboratorio. El mecanismo por el cual la hemólisis interfiere con los procedimientos de prueba es la interferencia del color por la hemoglobina liberada, aunque también es posible que existan fugas de analitos de eritrocitos dañados e interacciones químicas entre los componentes de los glóbulos rojos y los analitos. Como consecuencia, se pueden obtener concentraciones de analito falsamente más altas o más bajas en pruebas clínicas debido a la interferencia de la hemoglobina. La muestra también puede estar contaminada por componentes de otras células sanguíneas como los leucocitos y las plaquetas. Por ejemplo, la descomposición celular puede provocar cambios en la sangre de los pacientes con leucemia; la descomposición de las plaquetas durante la coagulación da como resultado concentraciones más altas de componentes de plaquetas intracelulares en el suero.

La hemólisis puede ser causada por mecanismos bioquímicos, inmunológicos, físicos y químicos. Durante la transfusión de sangre, la hemólisis dependiente del complemento puede ser causada por anticuerpos que

reaccionan con los principales antígenos de los grupos sanguíneos. La hemólisis física es causada por la destrucción de eritrocitos por hipotonicidad, por ejemplo, la dilución de la sangre con solución hipotónica, así como también por la disminución (vacío) o aumento de la presión. La hemólisis mecánica puede producirse durante el flujo de sangre a través de dispositivos médicos, por ejemplo, catéteres, válvulas cardíacas *in vivo*, y por centrifugación inadecuada, así como también a temperaturas elevadas *in vitro*. Las sustancias contaminantes también pueden causar hemólisis *in vitro*. Finalmente, los detergentes y otras sustancias contaminantes pueden causar hemólisis. Después de la separación de las células sanguíneas, la hemólisis se detecta por el color rojo del suero o del plasma. A concentraciones de hemoglobina extracelular que exceden los 300 mg/l (18,8 mmol/l), la hemólisis es detectable por el color rojo del suero o del plasma. Las muestras con derivados terapéuticos de hemoglobina son siempre de color rojo intenso. Algunos sistemas analíticos miden la magnitud de la hemólisis comparando la absorción de muestras en dos longitudes de onda. El espectro de absorción de los portadores de oxígeno derivados de la hemoglobina utilizados como sucedáneos de la sangre no difiere sustancialmente del de la hemoglobina natural.

La bilirrubina es un pigmento amarillo producido por la degradación enzimática de la hemoglobina. Los estudios sobre la interferencia de la bilirrubina se basaron principalmente en experimentos en los que se añadió bilirrubina libre o ditauobilirrubina soluble en agua al suero. Bajo ciertas condiciones, las moléculas de bilirrubina difieren cualitativamente y cuantitativamente en sus efectos de interferencia. La bilirrubina conjugada aparece en la orina, cuando está presente en concentraciones elevadas en la sangre. En pacientes con proteinuria, la bilirrubina unida a la albúmina también puede aparecer en la orina. Después de las hemorragias intracerebrales, la bilirrubina no conjugada (libre) causa xantocromía del líquido cefalorraquídeo. A mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, puede aparecer en el LCR la bilirrubina unida a la albúmina. La bilirrubina tiene una alta absorbancia a longitudes de onda de entre 340 nm y 500 nm. Por lo tanto, las pruebas espectrofotométricas que usan estas longitudes de onda muestran limitaciones debido a la absorbancia de fondo constantemente alta causada por la bilirrubina. El aumento o la disminución aparente de un resultado por la interferencia de la bilirrubina depende del análisis y de la concentración del analito.

Las muestras lipémicas son muestras de sangre, suero o plasma que tienen un aspecto turbio o lechoso debido a un mayor contenido de lípidos. Las muestras lipémicas no pueden evitarse, ya que el aumento de la concentración de lípidos es a menudo secundario a otros estados de enfermedad tales como: diabetes mellitus, consumo de etanol, insuficiencia renal crónica y pancreatitis. La presencia de lipemia puede interferir con muchas pruebas de bioquímica clínica por diferentes mecanismos, siendo el mecanismo más frecuente la dispersión de la luz por los lípidos, principalmente quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL. Como consecuencia, las concentraciones de analito determinadas pueden alterarse, dependiendo de las longitudes de onda aplicadas y del contenido de lípidos.

En conclusión, la presencia de hemoglobina, bilirrubina y lípidos y otras sustancias interferentes en una muestra puede causar una interferencia positiva o negativa en el resultado de la medición de los análisis fotométricos dirigidos a la cuantificación de un analito específico. Dependiendo de la magnitud de la interferencia, los resultados pueden llevar a una interpretación errónea y a una intervención inadecuada.

Para superar los inconvenientes de las interferencias causadas por la hemólisis, la ictericia y la lipemia, en la literatura se conocen varios procedimientos. Las interferencias lipémicas, ictericas y hemolíticas se pueden reducir mediante el tratamiento previo de la muestra en un procedimiento preanalítico para eliminar la sustancia interferente, por ejemplo, mediante centrifugación a alta velocidad en el caso de muestras lipémicas. Sin embargo, tales contramedidas aumentan la carga de trabajo y reducen la eficiencia de coste y tiempo; dichas contramedidas también son propensas a errores en el manejo de la muestra.

Otra estrategia es utilizar otras pruebas clínicas que no sean sensibles a las interferencias. Esto puede ser un desafío, ya que las pruebas alternativas pueden necesitar otra plataforma de instrumentos que no esté disponible en el laboratorio; también puede que no haya ninguna prueba alternativa disponible en el mercado.

Una corrección de las interferencias causadas por lipemia, hemólisis e ictericia mediante el uso de un procedimiento de blancos es una alternativa para superar las limitaciones. Esto implica la medición de la absorbancia de la muestra, una vez diluida adecuadamente, antes de agregar los reactivos del ensayo. La absorbancia medida se resta de la absorbancia final. Una estrategia para realizar este procedimiento de blancos, es la utilización de 2 reactivos diferentes (reactivos del blanco y de ensayo) y 2 cubetas. Este enfoque mejora los resultados, pero tiene un inconveniente: reduce el rendimiento de las pruebas a la mitad. Otro procedimiento consiste en la adición secuencial de los reactivos en la cubeta: una primera lectura se toma después de un tiempo establecido; después se añaden los reactivos de ensayo y se incuban; finalmente se hace una segunda lectura. Sin embargo, solo se logra una mejora pobre con este procedimiento. Además, los protocolos de ensayo establecidos pueden no ser compatibles con la nueva etapa de dilución inicial de la muestra requerida para la primera lectura.

El análisis bicromático permite también corregir los resultados analíticos y, a menudo, se aplica en pruebas de laboratorio automatizadas. Se utiliza una longitud de onda secundaria (lateral) para medir la sustancia interferente. El analito a determinar no absorbe en esta segunda longitud de onda. Esta medición se resta luego de la del analito. Aquí se asume que la absorbancia de la sustancia interferente es la misma en ambas longitudes de onda, lo que

rara vez es el caso. Por lo tanto, el principio bicromático solo producirá ligeras mejoras en la reducción de interferencias. Además, es posible tratar la interferencia eliminando químicamente la sustancia interferente, por ejemplo, la bilirrubina con bilirrubina oxidasa, o la vitamina C con la ácido ascórbico oxidasa.

5 Además, los analizadores multicanal son sistemas completamente automatizados, controlados por ordenador, diseñados para el análisis de ensayos bioquímicos de rutina, inmunoensayos y fármacos terapéuticos, por ejemplo, Roche Cobas 6000 utiliza espectrofotometría para realizar reacciones cinéticas, de punto final y no lineales. Hasta
10 cierto punto, el sistema, similar a la mayoría de los analizadores modernos, reduce los efectos de interferencia espectral mediante la aplicación de procedimientos de dos reactivos y espectrofotometría bicromática. La calidad de la muestra puede ser determinada por diferentes procedimientos. Un procedimiento común es realizar una prueba de índice sérico en el analizador de laboratorio que cuantifica la cantidad de bilirrubina, hemoglobina y lípidos presentes en la muestra. La implementación de las referencias de HIL mejoró la precisión y la calidad de los resultados de las pruebas.

15 Sin embargo, todavía hay muchas muestras de pacientes que muestran interferencias por hemólisis, bilirrubina y lípidos, lo que lleva a resultados erróneos, incluso mediante el uso de referencias de HIL o procedimientos de corrección. La interferencia analítica por hemólisis, bilirrubina y lípidos en ensayos de laboratorio es la preocupación más común en los análisis clínicos. Estos resultados alterados e incorrectos pueden llevar a una interpretación incorrecta, un diagnóstico incorrecto y una intervención potencialmente inadecuada y un resultado desfavorable para
20 los pacientes. Como consecuencia, muchas muestras deben tratarse previamente en una etapa preanalítica para eliminar la sustancia interferente y luego volver a medirlas en casos en que la concentración de hemoglobina, bilirrubina y lípidos exceda un nivel de corte específico. Los tratamientos previos y las remedaciones generan gastos adicionales y suponen una pérdida de tiempo, siendo ambos factores críticos para los laboratorios que realizan esos ensayos.

25

PROBLEMA A RESOLVER

El problema abordado por la invención es, por lo tanto, proporcionar un procedimiento de ensayo mejorado para la determinación de un analito específico en muestras críticas que muestren interferencias mediante el uso de pruebas
30 de laboratorio espectrofotométricas disponibles en el mercado en la plataforma del instrumento correspondiente sin la necesidad de aplicar un tratamiento de muestra preanalítico ni de cambiar la metodología de ensayo.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que una mejor precisión de una muestra que muestra interferencias se realiza mediante los procedimientos de la presente invención. Se espera que la presente invención resuelva (al menos parcialmente) el problema del tratamiento preanalítico de la muestra y de la repetición de las mediciones de las muestras que muestran interferencias, para determinar la cantidad correcta de un analito específico en una muestra en ensayos fotométricos.

SUMARIO DE LA INVENCION

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 la determinación de la cantidad de un analito específico en una muestra que puede presentar interferencias mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción después de la interacción del analito con reactivos de ensayo específicos del analito. Se generan múltiples curvas de calibración para múltiples longitudes de onda para el analito específico de una muestra que se va a determinar, depositándose los resultados de la medición en un sistema de gestión de datos de la plataforma del instrumento. Una prueba de interferencia se realiza simultáneamente a la determinación del analito específico, para cuantificar la cantidad de sustancias interferentes presentes en la muestra a determinar. La cantidad de cada sustancia interferente se compara con valores de corte predeterminados. La señal óptica para el analito específico de una muestra que se va a determinar se mide en la mezcla de reacción en múltiples longitudes de onda durante todo el tiempo de reacción, y se selecciona una curva de calibración dependiendo de las sustancias que interfieren. Finalmente, la cantidad del analito específico de una muestra a determinar se cuantifica por comparación con la curva de calibración seleccionada para las longitudes de onda elegidas.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para reducir las interferencias de las pruebas de laboratorio basadas en espectrofotometría de muestras que muestran interferencias hemolíticas y/o ictéricas y/o lipémicas y/u otras, en el que se aplican adicionalmente condiciones de medición específicas que comprenden longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración al protocolo de medición sin aplicar un tratamiento preanalítico a la muestra y/o sin cambiar la metodología de ensayo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de condiciones de medición específicas adicionales aplicadas al protocolo de medición para reducir las interferencias de las pruebas de laboratorio basadas en espectrofotometría

para determinar la cantidad de un analito específico en una muestra que muestra interferencias que comprenden longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención se dirige a un procedimiento para la determinación de la cantidad de un analito específico en una muestra que puede presentar interferencias mediante ensayos fotométricos, en el que el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción después de la interacción del analito con reactivos de ensayo específicos del analito en un analizador de laboratorio. Se generan múltiples curvas de calibración para múltiples longitudes de onda para el analito específico de una muestra que se va a determinar, los resultados de la medición se depositan en un sistema de gestión de datos de la plataforma del instrumento.

10 Se realiza una prueba de interferencia por separado para cuantificar la cantidad de bilirrubina y/o hemoglobina y/o lípidos y/u otras sustancias interferentes presentes en una muestra a determinar, y la cantidad de cada sustancia interferente se compara con valores de corte predeterminados. Simultáneamente, la señal óptica para el analito específico de una muestra a determinar se mide en la mezcla de reacción en múltiples longitudes de onda durante el tiempo de reacción completo. Se selecciona una curva de calibración según la cantidad y el tipo de sustancias interferentes presentes en la muestra. Finalmente, la cantidad del analito específico de una muestra a determinar se cuantifica por comparación con la curva de calibración seleccionada para la(s) longitud(es) de onda elegida(s).

15 El procedimiento de la presente invención también proporciona condiciones de medición específicas que comprenden tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración y el tipo de ensayo que se aplican adicionalmente al protocolo de medición.

20 La calidad de la muestra puede ser determinada por diferentes procedimientos. Un procedimiento común es realizar una prueba de índice sérico en el analizador de laboratorio que cuantifica la cantidad de bilirrubina, hemoglobina y lípidos presentes en la muestra. De este modo, el índice sérico y la medición de la señal óptica de un analito específico se pueden realizar simultáneamente en el analizador. A veces, en el caso de altas concentraciones de sustancias interferentes, incluso es posible clasificar las muestras de suero visualmente por su color.

25 Al generar múltiples curvas de calibración en múltiples condiciones caracterizadas por longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, modo de calibración, número de puntos de calibración, que fueron predeterminados para aplicaciones específicas de analitos, ahora es posible medir un analito específico de estas muestras con mayor precisión que con las técnicas estándar. Se seleccionan una o más curvas de calibración que están optimizadas para reducir las interferencias, lo que lleva a una expansión de la cantidad tolerada de sustancias interferentes.

30 Al utilizar el procedimiento de la presente invención, las muestras críticas que muestran interferencias, por ejemplo, muestras hemolizadas, ictericas y/o lipémicas, ahora pueden medirse utilizando las pruebas de laboratorio espectrofotométricas disponibles comercialmente en la plataforma de instrumentos correspondiente. Los inventores han descubierto sorprendentemente que una mejor precisión de una muestra que muestra interferencias se realiza mediante los procedimientos de la presente invención, evitando así la necesidad de aplicar un tratamiento preanalítico de la muestra o de cambiar la metodología de ensayo o, en el peor de los casos, de rechazar la muestra.

35 Definiciones:

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

45 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.

50 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 pueden observar a simple vista o se puede monitorizar fotométricamente mediante detección turbidimétrica y nefelométrica.

55 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 basado en la aglutinación del analito específico y una molécula que

60

se une con especificidad al analito, mientras que en los ensayos colorimétricos el analito específico se cuantifica con ayuda de un reactivo de color.

5 El término «ensayos colorimétricos» de acuerdo con la presente invención se usa rutinariamente 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. Realmente se ofrece un amplio menú de pruebas para los analizadores
de bioquímica clínica, por ejemplo, Roche Diagnostics cobas® c. Los ensayos colorimétricos se caracterizan por la
10 formación o el cambio o la reducción del color en presencia del analito que se va a cuantificar, donde la formación o
el cambio o la reducción del color se miden normalmente mediante un espectrofotómetro. Debido a que este color o
luz detectados generalmente se encuentran en la región visible, realmente se puede ver un cambio en el color del
ensayo y, por lo tanto, se denominan ensayos colorimétricos. Las pruebas colorimétricas típicas que se ejecutan en
los analizadores de laboratorio son las pruebas de bioquímica clínica y las pruebas inmunoenzimáticas (CEDIA,
EMIT). El ensayo de MTT, un ensayo redox que usa un colorante de tetrazolio como sustrato, es un ejemplo
15 adicional de un ensayo colorimétrico, además de los ensayos enzimáticos con NAD(P)H. 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 oxidorreductasa 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,
20 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 de 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. Dichos ensayos se detectan por
espectrofotometría en espectrómetros. La detección de estos ensayos en los instrumentos cobas® c se basa en un
25 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 D.O. (densidad óptica, absorbancia) es
directamente proporcional a la concentración del compuesto de color. Si la formación del color está relacionada 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
30 presente invención, en el que el analito específico se cuantifica en ensayos colorimétricos con la ayuda de un
reactivo de color.

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
35 fotómetro con longitudes de onda típicas que varían de 340 a 800 nm. Muchos ensayos colorimétricos se basan en
una enzima y el sustrato correspondiente que producen productos de color 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 produce un producto de color en una reacción de una o más etapas. En inmunoensayos
40 colorimétricos como EMIT (técnica de inmunoensayo con multiplicación de enzimas) o CEDIA (inmunoensayo con
donante enzimático clonado), el color se forma normalmente por la reacción de una enzima indicadora, como la β -
galactosidasa o una deshidrogenasa, con su sustrato correspondiente que forma 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
45 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
50 una reacción se usa como el sustrato de otra reacción fácilmente detectable. Un ejemplo de 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.

El término «turbidimetría y nefelometría» son procedimientos conocidos en la técnica para determinar la cantidad de
opacidad o turbidez en una solución basándose en la medición del efecto de dicha turbidez sobre la transmisión y
55 dispersión de la luz. La turbidez en un líquido está causada por la presencia de partículas en suspensión finamente
divididas. Si se hace pasar un haz de luz a través de una muestra turbia, su intensidad se reduce por dispersión y la
cantidad de luz dispersada depende de la concentración, tamaño y distribución de tamaño de las partículas. El
espectrofotómetro mide el aumento de la turbidez (es decir, la reducción de la intensidad de la luz transmitida), que
60 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.

65 Los ensayos turbidimétricos implican la medición de la intensidad del haz incidente 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.

- 5 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 que dispersan la luz aumentan rápidamente de tamaño. La luz dispersada es proporcional a las concentraciones iniciales de antígeno cuando se mide en presencia de un complejo látex-anticuerpo fijo. Se describen explicaciones adicionales en J.A. Molina-Bolivar et al., Journal of Macromolecular Science, Part C-PolymerReview, 45:59-98, 2005.

15 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 la ventaja de ser ensayos cuasihomogéneos que no requieren ninguna etapa de separación o lavado. Para potenciar la detección óptica entre el analito específico y una molécula que se une con especificidad al analito en la mezcla de reacción, el analito o molécula que se une con especificidad al analito están unidos a partículas adecuadas. De este modo, el analito reacciona y se aglutina con las partículas que se recubren con sustancias que se unen con especificidad al 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.

25 El analito comprende una mezcla de partículas con propiedades de fuerte dispersión de la luz que portan al menos una molécula que se une con especificidad y alta reactividad al analito y partículas con propiedades de débil dispersión de la luz que portan al menos una molécula que se une con especificidad y baja reactividad al 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 una molécula que se une con especificidad y alta reactividad al analito y partículas con propiedades de débil dispersión de la luz que llevan al menos una molécula que se une con especificidad y baja reactividad al analito.

35 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 de núcleo y envoltura que consisten en un núcleo interno polimerizado a partir de estireno y una envoltura externa formada por copolimerización a partir de estireno con un compuesto etilénicamente insaturado copolimerizable. La mayoría de los ensayos basados en partículas emplean partículas de látex, siendo el tipo predominante el poliestireno.

50 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.

55 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 una molécula que se une con especificidad al analito, sino también un analito químicamente modificado que se obtiene 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 una molécula que se une con especificidad al 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 basándose en la aglutinación del analito específico y una molécula que se une con especificidad al analito.

65 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.

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, pesticidas, enzimas, sustratos enzimáticos y cofactores enzimáticos. 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 una molécula con la que reaccione específicamente, por ejemplo, una molécula o sustancia de unión que se una específicamente al analito, como anticuerpos, o una molécula que reaccione específicamente con el analito, como enzimas), o para el que se puede preparar una molécula con la que se una específicamente.

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.

El término «molécula que reacciona específicamente con el 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 moléculas de unión potenciados por partículas, enzimas, sustratos (en los casos en que el analito es una enzima), cofactores, reactivos químicos específicos que producen un cambio de color en presencia del analito. Dichas moléculas de reacción específicas 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 moléculas de reacción específicas con el analito incluyen, pero no se limitan a, hapteno:anticuerpo, célula:anticuerpo, biotina:avidina, hormona:receptor, polipéptido:anticuerpo y oligonucleótido:ADN o ARN complementario, enzima-sustrato, enzima-cofactor-sustrato, enzima-mediador-sustrato. Para moléculas de reacción específicas con el analito que conducen a la formación de un complejo de unión con el analito, como es el caso con anticuerpos, el término «molécula que se une con especificidad al analito» se puede usar igualmente en lugar de «molécula de reacción específica con el analito».

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

El término «antígeno», como se usa en el presente documento, se caracteriza por su capacidad para unirse en el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. La región de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo, y a la que se une el anticuerpo, se denomina «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 puede ser capaz de unirse al anticuerpo.

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 «interferencia» como se usa en la presente invención se define como el efecto de una sustancia presente en la muestra que altera el valor correcto de los resultados. Una muestra que muestra las interferencias como se usa en el presente documento se refiere a una muestra con una o más sustancias interferentes, tal como hemoglobina, bilirrubina y lípidos u otras sustancias interferentes que absorben o dispersan la luz en longitudes de onda que se usan comúnmente para pruebas espectrofotométricas. Otras sustancias que interfieren son fármacos y productos farmacéuticos causados por terapias, abusos o inmunoglobulinas. A veces, en el caso de altas concentraciones de sustancias interferentes, incluso es posible clasificar las muestras de suero visualmente por su color.

El término «hemólisis» se define como la liberación de componentes intracelulares de eritrocitos y otras células sanguíneas en el líquido extracelular y puede ser causada por diferentes mecanismos. La hemólisis *in vivo* o *in vitro* puede causar una disminución o aumento aparente de los resultados. Los constituyentes celulares con una concentración intracelular 10 veces mayor que la concentración extracelular aumentan en plasma/suero durante la hemólisis (por ejemplo, potasio, lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa). Las diferencias de las concentraciones de analito entre el plasma y el suero también se deben a la lisis de las células sanguíneas (esencialmente por las plaquetas): Por lo tanto, la enolasa específica neuronal, el potasio y la fosfatasa ácida son más altas en el suero.

Los constituyentes de las células sanguíneas pueden interferir directa o indirectamente en la medición de los analitos. La adenilato cinasa liberada de los eritrocitos puede producir un aumento de la creatina cinasa y la actividad de la CK-MB, especialmente cuando los inhibidores de la adenilato cinasa en la mezcla de ensayo son inadecuados. Por el contrario, la cuantificación inmunológica de CK-MB no está influenciada por la adenilato cinasa. La actividad pseudoperoxidasa de la hemoglobina libre es responsable de la interferencia en el procedimiento de bilirrubina de Jendrassik y Groof al inhibir la formación de color de diazonio. Las proteasas liberadas por las células sanguíneas pueden reducir la actividad de los factores de coagulación, mientras que la formación de productos de escisión de la fibrina puede aumentar.

El término «bilirrubina», como se usa en la presente invención, se encuentra en el plasma como una molécula libre o covalentemente unida a la albúmina. En los analizadores de coagulación que utilizan el principio turbidimétrico, una concentración de bilirrubina superior a 25 $\mu\text{mol/l}$ conduce a cambios clínicamente relevantes de los valores medidos de antitrombina III. A las concentraciones de bilirrubina más altas, la interferencia será significativa en ciertas pruebas de coagulación. La reducción de la absorción de la bilirrubina debida a la oxidación en condiciones alcalinas es la causa principal de la interferencia de la bilirrubina con las modificaciones del procedimiento de Jaffé sin desproteinización.

En un ambiente fuertemente ácido, la absorción de la bilirrubina conjugada se desplaza a las longitudes de onda UV y, por lo tanto, causa interferencia en la determinación del fosfato con el procedimiento del fosfomolibdato a través de su efecto reductor.

La bilirrubina interfiere en los sistemas de prueba basados en oxidasa/peroxidasa. Proporcionalmente a su concentración, la bilirrubina puede reaccionar con el H_2O_2 formado en el sistema de prueba, lo que causa resultados sistemáticamente menores en los procedimientos enzimáticos que se utilizan para la medición de glucosa, colesterol, triglicéridos, urato y creatinina. La bilirrubina interfiere competitivamente con los colorantes que se unen a la albúmina.

El término «lipemia» como se usa en la presente invención se define como turbidez en muestras de suero o plasma que es visible a simple vista. Esto se observa usualmente a concentraciones de triglicéridos por encima de 300 mg/dl (3,4 mmol/l). La causa más común de turbidez es un aumento de la concentración de triglicéridos. Los lípidos interfieren con casi todas las medidas fotométricas por dispersión de luz y absorción. El resultado aparente puede aumentarse o reducirse según el procedimiento de blancos. Con turbidez más alta, podría no ser posible realizar mediciones debido a los límites de la linealidad del procedimiento. Las lipoproteínas disminuyen la concentración aparente del analito al reducir el agua disponible del volumen de la muestra, ya que el volumen que ocupan las lipoproteínas en plasma o suero se incluye en el cálculo de la concentración del analito. Esta es la causa de una menor concentración de sodio y potasio en los sueros lipémicos, cuando el plasma o el suero se mide por fotometría de llama y por medición indirecta utilizando electrodos sensibles a los iones, en contraste con la potenciometría directa. La misma observación se realiza después de la centrifugación, cuando las lipoproteínas no están homogéneamente distribuidas en muestras de suero/plasma: la concentración de un analito disuelto en la fase acuosa es menor en la capa superior que en la fase inferior de la muestra. Lo contrario es cierto para la concentración de lípidos y constituyentes liposolubles, incluidos ciertos medicamentos que son absorbidos por las lipoproteínas. Un componente que es extraído por las lipoproteínas puede no ser accesible para el reactivo, por ejemplo un anticuerpo, para su detección. De manera similar, los procedimientos electroforéticos y cromatográficos pueden verse afectados por las lipoproteínas presentes en la matriz.

La presencia y la cantidad de una sustancia interferente o su ausencia pueden detectarse mediante una prueba de interferencia. Un ejemplo de una prueba de interferencia es la prueba de «referencias en suero» que se realiza al mismo tiempo que la muestra se procesa en un analizador de laboratorio: Al realizar las llamadas referencias en suero, las mediciones de absorbancia se pueden calcular para proporcionar una representación semicuantitativa de

los niveles de ictericia, hemólisis o lipemia que están presentes en muestras desconocidas. Se pueden generar valores de calibración cuantitativa para las principales sustancias interferentes de hemoglobina, bilirrubina y lípidos expresados como índice H (hemólisis), índice I (ictericia) e índice L (lipemia). Para la medición de la lipemia (L), se utilizan longitudes de onda de 700/660 nm porque este rango está libre de la influencia de la hemólisis y la ictericia. La hemólisis (H) se mide a 600/570 nm y se realiza una corrección para la absorción debida a la lipemia. La ictericia (I) se mide a 505/480 nm y se realiza una corrección para la absorción debida a lipemia y hemólisis. La calidad de la muestra se puede evaluar al mismo tiempo que se procesa la muestra. En el manual «Cobas, índices séricos: reducción de errores clínicos en los análisis clínicos» se muestra una lista detallada de las interferencias basadas en índices séricos para suero y plasma para analitos específicos que se determinan en el analizador Roche/Hitachi Systems/Cobas Integra Systems/ cobas.

El término «valor de corte», como se usa en el presente documento, se usa para una cantidad definida de la sustancia interferente. En el caso de la prueba de índice sérico, las unidades para una cantidad definida de la sustancia interferente son los valores del índice sérico, expresados como valores de H (para hemoglobina), L (para lípidos) e I (para bilirrubina).

El término «longitudes de onda múltiples», como se usa en el presente documento, se refiere a las longitudes de onda generadas con un fotómetro de longitudes de onda múltiples conocido en la técnica. Los fotómetros comunes son espectrofotómetros o turbidímetros para inmunoturbidimetría y nefelómetros para inmunonefelometría. El que se usa preferentemente para ensayos colorimétricos e inmunoensayos turbidimétricos y nefelométricos es un espectrofotómetro. La detección de estos ensayos en los instrumentos cobas® c se basa en un fotómetro con una lámpara halógena de tungsteno como fuente de irradiación, una rejilla para generar luz monocromática y una matriz de fotodiodos (12 diodos que producen 12 longitudes de onda entre 340 y 800 nm) como detector. Un fotómetro, por ejemplo, el analizador cobas c® 311 de Roche tiene la capacidad de medir simultáneamente 12 longitudes de onda entre 300 nm y 800 ± 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. Dependiendo de la arquitectura del espectrofotómetro elegido y de las longitudes de onda disponibles, que pueden diferir de un dispositivo a otro, se seleccionan una o más longitudes de onda específicas entre múltiples longitudes de onda. Las mediciones se realizan preferentemente a una temperatura definida, preferentemente entre 20 y 40 grados centígrados, lo más preferentemente a 37 °C.

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. La señal óptica para el analito específico en la muestra se puede medir simultáneamente en la mezcla de reacción a múltiples longitudes de onda, preferentemente en una sola pasada durante todo el tiempo de reacción. Dependiendo de las sustancias interferentes, por ejemplo, la bilirrubina y/o la hemoglobina y/o los lípidos y/u otras sustancias interferentes presentes en la muestra, la cantidad del analito específico de una muestra que debe determinarse se cuantifica comparando con las curvas de calibración seleccionadas. La elección de la curva de calibración para la cuantificación del analito específico puede depender adicionalmente de la magnitud de la señal óptica obtenida para el analito específico en la muestra, teniendo así en cuenta, si la concentración del analito específico en la muestra es baja, o media o alta.

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 (señales ópticas) 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. En la práctica, sin embargo, hay muchas curvas de calibración que no son lineales en general. La curva de calibración de ensayos turbidimétricos, nefelométricos o colorimétricos, preparada a partir de la absorbancia a una longitud de onda específica, puede tener una curva de calibración en forma de S no lineal, en la que la sensibilidad se deteriora a una concentración cercana a cero y se satura en un lado de mayor concentración. La determinación de la calibración en forma de S requiere una calibración de múltiples puntos en la que es obligado el uso de las muestras estándar de la pluralidad de concentraciones.

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 concentraciones altas las curvas pueden llegar a ser casi planas y conducir a valores de señal similares para las concentraciones altas y consecuentemente también a que los límites de detección superior sean bajos. 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 equilibrio 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 de color formado garantiza una señal alta y una sensibilidad alta; por otro lado, las señales para concentraciones altas de analito pueden estar fuera del intervalo óptico especificado del detector.

Las curvas de calibración de la presente invención están predeterminadas para el analito específico y se caracterizan por los parámetros utilizados para su cálculo: longitud(es) de onda, tiempo de reacción, número de puntos de calibración, modo de calibración y tipo de ensayo. Para la determinación de un analito específico de una muestra, se generan múltiples curvas de calibración para múltiples longitudes de onda, optimizando cada curva de calibración para los siguientes casos:

- muestras libres de interferencias,
- muestras hemolizadas
- muestras ictericas
- muestras lipemicas
- muestras hemolizadas e ictericas
- muestras hemolizadas y lipemicas
- muestras ictericas y lipemicas
- muestras hemolizadas, ictericas y lipemicas

- y también para escenarios de muestras que además tienen en cuenta la cantidad del analito específico presente en la muestra, alta, baja o media.

Como ejemplo de una muestra icterica con una baja concentración del analito específico, una curva de calibración se optimiza para reducir la interferencia icterica y al mismo tiempo lograr una alta sensibilidad analítica.

Los resultados de las mediciones se depositan en un sistema de gestión de datos de la plataforma del instrumento. Después de preparar la muestra de medición mezclando la muestra con los reactivos de ensayo específicos del analito, 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 en las múltiples longitudes de onda descritas anteriormente para registrar las curvas de calibración durante el tiempo de reacción completo.

Simultáneamente a la medición de la muestra, se realiza una prueba de interferencia, como la evaluación del índice sérico, para cuantificar la cantidad de bilirrubina y/o hemoglobina y/o lípidos y/u otras sustancias interferentes presentes en la muestra a determinar y la cantidad de cada sustancia de interferencia se compara con valores de corte predeterminados.

Finalmente, la curva de calibración se selecciona dependiendo de las interferencias encontradas en la prueba de interferencia; y además de las interferencias, la cantidad de analito en la muestra se puede tener en cuenta para la selección de la curva de calibración que se indica por la magnitud de la señal óptica de la muestra.

Paralelamente a la medición del analito específico que se determinará en la muestra, se realiza una evaluación cuantitativa del índice sérico en el analizador de laboratorio para la cuantificación de las principales sustancias interferentes, como el índice sérico de hemoglobina, bilirrubina y lípidos. Si se detecta una sustancia interferente para la muestra a determinar, se selecciona una longitud de onda para su cuantificación que esté fuera del rango de absorción de la sustancia interferente, pero que esté cerca del máximo de absorción de la mezcla de ensayo para el analito específico a determinar para garantizar una alta señal y una óptima sensibilidad.

Para cada tipo de interferencia y sus combinaciones de la presente invención se establece una curva de calibración específica. Las curvas de calibración están optimizadas para reducir la interferencia para un cierto rango de concentración de una muestra que muestra interferencias. Las curvas de calibración pueden generarse en múltiples condiciones que comprenden longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, modo de calibración, número de puntos de calibración, y que están predeterminadas para cada analito específico a determinar. Todos los resultados de las mediciones se depositan en un sistema de gestión de datos de la plataforma del instrumento y se evalúan automáticamente.

Al utilizar estas longitudes de onda y tiempos de reacción alternativos, lo que significa medir en una longitud de onda en la que la sustancia interferente no se absorbe o se absorbe en menor medida, se logra una reducción de la(s) interferencia(s).

5 El término «tipo de ensayo», como se utiliza en el presente documento, se refiere a dos tipos fundamentales de ensayos fotométricos en analizadores: ensayos de punto final y ensayos de velocidad. Las mediciones son tomadas por el fotómetro en puntos de tiempo específicos. Si las mediciones se toman una vez finalizadas las reacciones, la intensidad del producto de color (o turbidez) es un indicador de la concentración del componente de la muestra. 10 Estos son los llamados ensayos de punto final. Para los ensayos de velocidad, la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración o actividad del componente de la muestra que se está analizando. Las mediciones se toman a medida que avanza la reacción. También hay modificaciones de estas dos técnicas posibles en este instrumento, así como una combinación de las dos.

15 El término «tiempo de reacción», como se utiliza en el presente documento, es, en el caso de ensayos de punto final, el periodo de tiempo entre la medición primera (o inicial) y segunda (o final) de la señal óptica que se usa para el cálculo de un valor de señal de la presente. La primera medición (o inicial) se realiza antes o poco después de añadir el reactivo final a la mezcla de reacción. En el caso de mediciones cinéticas, el tiempo de reacción puede ser el periodo de tiempo utilizado para el cálculo del valor que expresa el cambio de absorbancia por unidad de tiempo. 20 El «tiempo de reacción» puede ser idéntico o más corto que el tiempo de reacción completo. El tiempo de reacción completo es el tiempo que se deja reaccionar la mezcla de reacción, compuesta por reactivos de ensayo específicos para la muestra y el analito, después de su mezcla.

25 El término «modo de calibración», como se utiliza en el presente documento, se refiere a la determinación de una relación válida entre la señal medida [absorbancia o (para ensayos de velocidad) una tasa de cambio en la absorbancia] y la concentración del analito de interés. La representación gráfica de dicha relación señal/concentración es la curva de calibración, también denominada curva de trabajo. Los analizadores utilizan diferentes tipos de modelos matemáticos para describir esta relación. Estos modelos matemáticos se conocen como tipos de calibración o modos de calibración. Existen dos modos básicos de calibración, los modos de calibración 30 lineal y no lineal. Las calibraciones lineales se utilizan para las pruebas cuando las lecturas de absorbancia representadas frente a las concentraciones de calibradores se encuentran en una línea recta. Si una calibración lineal se basa en dos mediciones de calibradores, se denomina calibración lineal de dos puntos. Si se basa en más de dos calibradores, se denomina calibración lineal multipunto.

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

40 El término «número de puntos de calibración», como se usa en el presente documento, es el número de calibradores también denominados estándares de muestra utilizados para generar la curva de calibración. A continuación, se describen ejemplos de curvas de calibración optimizadas para reducir la interferencia para una determinada sustancia interferente:

45 La presente invención abarca la curva de calibración 1 que se utiliza para una muestra que no muestra interferencias.

La presente invención abarca la curva de calibración 2, que está optimizada para una muestra que muestra interferencia hemolítica.

50 La presente invención abarca la curva de calibración 3, que está optimizada para una muestra que muestra interferencia icterica.

La presente invención abarca la curva de calibración 4, que está optimizada para una muestra que muestra interferencia lipémica.

55 Un modo de realización adicional de la presente invención es la curva de calibración 5, que está optimizada para una muestra que muestra interferencias hemolíticas e ictericas o lipémicas.

60 Un modo de realización adicional de la presente invención es la curva de calibración 6, que está optimizada para una muestra que muestra interferencia hemolítica y/o lipémica y/o icterica a bajas concentraciones de analito. El término «curva de calibración 6», tal como se usa en el presente documento, se genera a partir de las señales ópticas de la mezcla de reacción en una longitud de onda optimizada para lograr un límite de detección inferior satisfactorio y al mismo tiempo optimizada para reducir la(s) interferencia(s). La curva de calibración 6 registrada en una longitud de onda que está optimizada para bajas concentraciones del analito específico optimiza así el límite de 65 detección inferior y, al mismo tiempo, está optimizada para reducir la(s) interferencia(s).

Un modo de realización adicional de la presente invención es la curva de calibración 7, que está optimizada para una muestra que muestra interferencia hemolítica y/o lipémica y/o icterica a altas concentraciones de analito. El término «curva de calibración 7», tal como se usa en el presente documento, se genera a partir de las señales ópticas de la mezcla de reacción en una longitud de onda, optimizada para lograr un límite de detección superior satisfactorio y al mismo tiempo optimizada para reducir la(s) interferencia(s). La curva de calibración 7 registrada en una longitud de onda que está optimizada para altas concentraciones del analito específico optimiza así el límite de detección superior y, al mismo tiempo, está optimizada para reducir la(s) interferencia(s).

Un modo de realización adicional de la presente invención es el uso de más de 2 curvas de calibración que pueden definirse sobre el rango de medición, cada una optimizada para reducir la interferencia de una muestra para un cierto rango de concentración.

Dependiendo del valor de la señal óptica y de las sustancias interferentes, idealmente se selecciona una curva de calibración adecuada, como se describe anteriormente, para la cuantificación de un analito específico y la cantidad del analito específico se cuantifica por comparación con la curva de calibración seleccionada.

Trabajar con múltiples 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 las concentraciones de calibradores requeridos, así como el procedimiento de ajuste de curva para la curva de calibración.

Al generar múltiples curvas de calibración en múltiples condiciones caracterizadas por longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, modo de calibración, número de puntos de calibración, que fueron predeterminados para aplicaciones específicas de analitos, ahora es posible medir un analito específico de estas muestras con mayor precisión que con las técnicas estándar.

Se selecciona una curva de calibración, registrada a una longitud de onda elegida y un tiempo de reacción elegido para la cuantificación del analito específico para el cálculo de la concentración de analito, según los siguientes criterios:

1. Para seleccionar la curva de calibración, se toma una decisión, idealmente automática en el analizador, si en la muestra se muestran interferencias y, en caso afirmativo, qué tipo de interferencia, hemólisis, ictericia y/o lipemia. Esta decisión se toma con los datos obtenidos de la prueba de interferencias o la prueba del índice sérico mediante la comparación de las concentraciones obtenidas para cada sustancia interferente, expresada como índice H (hemólisis), índice I (ictericia) e índice L (lipemia), con valores de corte predeterminados. Como resultado, se obtienen los tipos de interferencias presentes en la muestra: la muestra puede estar libre de interferencias, ser hemolizada, icterica o lipémica, o ser una combinación de hemolizada y/o icterica y/o lipémica. Dependiendo de las sustancias interferentes presentes en la muestra, se selecciona una curva de calibración para su cuantificación: ya sea la curva de calibración para

- la muestra libre de interferencias, registrada a una longitud de onda óptima L (libre) y tiempo de reacción óptimo t (libre), o

- la muestra hemolizada, registrada a una longitud de onda óptima L (H) y tiempo de reacción óptimo t (H), o

- la muestra icterica, registrada a una longitud de onda óptima L (I) y tiempo de reacción óptimo t (I), o

- la muestra lipémica, registrada a una longitud de onda óptima L (L) y tiempo de reacción óptimo t (L), o

- la muestra hemolizada e icterica, registrada a una longitud de onda óptima L (HI) y tiempo de reacción óptimo t (HI), o

- la muestra hemolizada y lipémica, registrada a una longitud de onda óptima L (HL) y tiempo de reacción óptimo t (HL), o

- la muestra icterica y lipémica, registrada a una longitud de onda óptima L (IL) y tiempo de reacción óptimo t (IL), o

- la muestra hemolizada e icterica y lipémica, registrada a una longitud de onda óptima L (HIL) y tiempo de reacción óptimo t (HIL).

2. Además de las interferencias, la curva de calibración también puede seleccionarse teniendo en cuenta también la cantidad de analito presente en la muestra: aquí se hace una comparación de la magnitud de la señal óptica medida para el analito específico de la muestra con un valor de umbral predeterminado hecho para decidir si una muestra tiene una concentración alta o baja de analito. En tal caso, se generarían dos curvas de calibración para cubrir el rango de medición para la cuantificación del analito,

- una primera curva de calibración registrada en una primera longitud de onda óptima y un primer tiempo de reacción óptimo para las muestras de baja concentración y

5 - una segunda curva de calibración registrada en una segunda longitud de onda óptima y un segundo tiempo de reacción óptimo para las muestras altamente concentradas.

10 Dependiendo de si la muestra medida produce una señal óptica o un valor de concentración calculado de la misma que exceda o esté por debajo del valor umbral, se usará una de las dos curvas de calibración para la cuantificación del analito. Si es necesario, se pueden considerar más niveles de concentración, tal como la diferenciación entre niveles de concentración alto, medio y bajo; en este caso, se deben definir 2 valores de umbral predeterminados para la selección de la curva de calibración.

15 El término «primera longitud de onda y primer tiempo de reacción», como se usan en el presente documento, se optimizan para concentraciones bajas 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.

20 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 (véase Lit. clinbiochemrev 2008, 29, 49). Por ejemplo, el término «sensibilidad analítica» se define como la pendiente de la curva de calibración. El término «límite inferior de detección» (LDL), como se utiliza en el presente documento, también se denomina intervalo de medición inferior.
25 Una estrategia típica para estimar el LDL consiste en medir réplicas, tales como $n = 21$, de un calibrador de cero o muestra de 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.

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.

40 La primera y la segunda longitudes de onda son diferentes, idealmente en al menos 5 nm, o idénticas y 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 (ArchPatholLabMed 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.

50 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.

60 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.

65 Las longitudes de onda de la presente invención son las denominadas «longitudes de onda principales» de acuerdo con el estado actual de la técnica para medir el analito.

Un modo de realización de la presente invención es que, opcionalmente, una longitud de onda adicional se determina como un valor de 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 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.

Para cada longitud de onda y tiempo de reacción seleccionados para la cuantificación, se construye un analito específico en una muestra, que muestra las interferencias de una o múltiples curvas de calibración con muestras estándar que se miden simultáneamente.

El término «valor umbral», como se usa en el presente documento se usa para valores de absorbancia definidos o una cantidad definida del analito del presente procedimiento, por ejemplo, expresado como valor de concentración; se usan preferentemente los valores de concentración. Se aplica un valor umbral al procedimiento de la invención cuando, para la cuantificación de un analito, se utilizan una o más curvas de calibración para cubrir el rango de medición. Típicamente, se usan 2 curvas de calibración, una primera curva de calibración optimizada para la cuantificación de muestras con bajas concentraciones de analito y una segunda curva de calibración optimizada para la cuantificación de muestras con altas concentraciones de analito. Idealmente, el valor umbral se toma del punto en el que las dos curvas de calibración cambian de la primera curva de calibración a la segunda curva de calibración. Como se muestra en el ejemplo 2 y la figura 3, para el ensayo de fenobarbital se utilizan dos curvas de calibración para la cuantificación de muestras lipémicas, la primera curva de calibración cubre las concentraciones de 0 a 45 µg/ml y la segunda curva de calibración cubre las concentraciones de 45 a 60 µg/ml. El valor umbral en este caso es de 45 µg/ml. 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 valor umbral suele haber una amplia flexibilidad. Es importante que en el valor umbral seleccionado ambas curvas de calibración cumplan los requisitos relacionados con la linealidad del procedimiento con la precisión y la sensibilidad. Por ejemplo, la segunda curva de calibración idealmente debería tener un LDL que al menos cubra la concentración en el valor umbral seleccionado; y la primera curva de calibración idealmente debería mostrar la linealidad del procedimiento al menos hasta dicho valor umbral seleccionado.

Un posible procedimiento para la selección de las condiciones de medición óptimas para las curvas de calibración de la presente invención comprende las siguientes etapas:

1. Primero, una serie de datos se generan a múltiples longitudes de onda. Para nuestros ejemplos 1 y 2, la medición de los valores de absorbancia de las siguientes muestras se realizó simultáneamente a las 12 longitudes de onda disponibles, por ejemplo, en el analizador cobas c 311 durante el tiempo de reacción completo:

- al menos 2 a 6 estándares en duplicados para la calibración,
- una muestra de blanco (concentración de analito = 0) en 21 réplicas para la determinación de LDL,
- al menos 2 muestras (2 concentraciones de analito diferentes) en 21 réplicas para la determinación de la precisión (coeficiente de variación),
- series de dilución que cubren concentraciones de analito, por ejemplo, 2-4 veces superiores al UDL conocido para la determinación del UDL y la linealidad del procedimiento.
- Muestras que contienen analito y cantidades crecientes de sustancia(s) interferente(s) (hemoglobina, bilirrubina y/o lípidos) para la simulación de muestras críticas que contienen cantidades crecientes de sustancias interferentes.

2. La selección de la longitud de onda y el tiempo de reacción óptimos para la curva de calibración para la cuantificación de muestras sin interferencias se realiza de acuerdo con los procedimientos más modernos.

3. La selección de la longitud de onda óptima y el tiempo de reacción para la curva de calibración para la cuantificación de muestras con sustancia(s) interferente(s) se realiza seleccionando longitudes de onda que están fuera o casi fuera del rango de absorción de la(s) sustancia(s) interferente(s), pero que siguen estando muy próximas al máximo de absorción de la mezcla de ensayo específica para el analito a determinar para garantizar una señal alta y, por lo tanto, una sensibilidad suficiente. Después, los mejores tiempos de reacción se seleccionan mediante un procedimiento de prueba y error utilizando los datos generados en el punto 1:

Para una serie de muestras con una concentración de analito fija a la que se añaden cantidades crecientes de sustancia(s) interferente(s), la recuperación de la concentración de analito teórica (concentración de la muestra sin interferencias) se determina para las diferentes condiciones (longitudes de onda óptimas como se definió anteriormente, tiempos de reacción) en un procedimiento de prueba y error. Una sustancia interferente a una concentración dada se define como tolerada (o que no muestra interferencia) cuando la recuperación de la

concentración teórica de analito está dentro de +/- 10 %. Se seleccionan las longitudes de onda y los tiempos de reacción que producen la mejor tolerancia frente a concentraciones altas de sustancias interferentes.

5 Para estas longitudes de onda y tiempos de reacción seleccionados, se calculan el UDL y el LDL y se selecciona la condición (longitud de onda y tiempo de reacción) que produce el mejor rango de medición para la curva de calibración. Idealmente, debería cubrirse un rango de medición que sea comparable con el rango de medición alcanzado con la muestra sin interferencias del punto 2. En el ejemplo 1 se aplicó este procedimiento.

10 4. La selección de la longitud de onda óptima y el tiempo de reacción para la curva de calibración para la cuantificación de muestras con sustancias interferentes y, al mismo tiempo, teniendo en cuenta adicionalmente la cantidad de analito es impulsada por el objetivo de reducir la(s) interferencia(s) y al mismo tiempo obtener una calibración con rango de medición óptimo. Para este propósito, se definen al menos dos curvas de calibración: una primera calibración, registrada a una primera longitud de onda y un primer tiempo de reacción, curva para concentraciones bajas de analito y que, por lo tanto, cubre el extremo inferior del rango de medición, y una segunda curva de calibración, registrada a una segunda longitud de onda y un segundo tiempo de reacción, para concentraciones altas de analito y que, por lo tanto, cubre el extremo superior del rango de medición. Un posible enfoque para la selección de las mejores condiciones comprende:

15 - la selección de la(s) longitud(es) de onda óptima(s) para una interferencia dada como se describe en el punto 3,

20 - luego, para al menos una serie de muestras con baja concentración de analito y una serie de muestras con alta concentración de analito, cada serie de muestras a la que se añaden cantidades crecientes de sustancia(s) interferente(s) la recuperación de la concentración teórica de analito (concentración de la muestra sin interferencias) se determina para las diferentes condiciones (longitudes de onda óptimas definidas en el punto 3, tiempos de reacción) en un procedimiento de prueba y error. Una sustancia interferente a una concentración dada se define como tolerada (o que no muestra interferencia) cuando la recuperación de la concentración teórica de analito está dentro de +/- 10 %. Se seleccionan las longitudes de onda y los tiempos de reacción que producen la mejor tolerancia frente a concentraciones altas de sustancias interferentes.

25 Para estas longitudes de onda y tiempos de reacción seleccionados, se calculan la UDL (para la muestra de analito a concentración alta) y la LDL (para la muestra de analito a concentración baja) y se seleccionan las condiciones (longitud de onda y tiempo de reacción) que producen el mejor rango de medición para la primera curva de calibración (muestra de analito a concentración baja) y segunda curva de calibración (muestra de analito a concentración alta). Idealmente, debería cubrirse un rango de medición que sea comparable con el rango de medición alcanzado con la muestra sin interferencias del punto 2. En el ejemplo 2 se aplicó este procedimiento.

30 Un modo de realización de la presente invención es la provisión de casos para corregir curvas de calibración.

35 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 dos longitudes de onda mejores para 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 a 3,0000).

40 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.

45 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 retardo de tiempo cero.

50 Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento para reducir las interferencias de las pruebas de laboratorio basadas en espectrofotometría de muestras que muestran interferencias hemolíticas y/o ictericas y/o lipémicas, en el que las condiciones de medición específicas comprenden longitudes de onda para la medición, puntos de ensayo, puntos de calibración y modo de calibración se aplican de forma adicional al protocolo de medición sin aplicar el tratamiento preanalítico de la muestra y/o sin cambiar la metodología del ensayo.

55 Un modo de realización es además un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que se seleccionan una o más de las múltiples curvas de calibración dependiendo de si la muestra es hemolizada y/o lipémica y/o icterica y la cantidad del analito específico se cuantifica por comparación con la(s) curva(s) de calibración seleccionada(s).

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de condiciones de medición específicas adicionales aplicadas al protocolo de medición para reducir las interferencias de las pruebas de laboratorio basadas en espectrofotometría para determinar la cantidad del analito específico en una muestra que puede mostrar interferencias hemolíticas y/o ictéricas y/o lipémicas que comprenden longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, puntos de calibración y modo de calibración.

Un aspecto adicional de la presente invención es una plataforma de instrumentos que utiliza pruebas de laboratorio espectrofotométricas comercialmente disponibles para determinar la cantidad del analito específico en una muestra que puede presentar interferencias hemolíticas y/o ictéricas y/o lipémicas, en el que el sistema de gestión de datos de la plataforma de instrumentos es capaz de procesar datos de tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración, longitudes de onda, índices séricos para seleccionar la curva de calibración que mejor se ajusta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los espectros de absorción de las sustancias interferentes bilirrubina, hemoglobina y lípidos.

La figura 2 muestra un posible flujo de trabajo para reducir las interferencias hemolíticas en el ensayo de PCR de acuerdo con el procedimiento de la invención, como se describe en el ejemplo 1.

La figura 3 muestra un posible flujo de trabajo para reducir las interferencias lipémicas en el ensayo de fenobarbital de acuerdo con el procedimiento de la invención, como se describe en el ejemplo 2.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Reducción de la interferencia hemolítica en el ensayo de PCR

El beneficio del procedimiento de la invención para reducir la interferencia de muestras hemolizadas se evaluó utilizando el ensayo comercial CRP L3 de Roche, un inmunoensayo turbidimétrico con látex y el analizador cobas c311 de Roche.

Instrumento cobas c311:

Para los experimentos se utilizó el analizador cobas c311 de Roche (Roche Diagnostics GmbH), que tiene un espectrofotómetro de longitud de onda múltiple como unidad de detección. El instrumento pipetea automáticamente la muestra y los reactivos de ensayo en cubetas 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 a 3,0000 de absorbancia. Para cada cubeta de reacción se mide un blanco de 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.

Ensayo CRP L3:

Principio de ensayo de la prueba CRP L3 de Roche (CRPL3, N.º de cat. 04956842): La PCR humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-PCR; los agregados se determinan turbidimétricamente.

Los reactivos para todas las pruebas Roche se proporcionan en paquetes cobas c. Estos casetes contienen de una a tres botellas de reactivo especialmente diseñadas y tienen etiquetas de código de barras con el reactivo detallado y otra información relacionada con la prueba. Para las pruebas CRP L3 se utilizan dos reactivos en el casete: R1 (tampón TRIS con albúmina de suero bovino y conservantes) y R2 (partículas de látex recubiertas con anticuerpo anti-PCR (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.

Esquema de pipeteo: se añadieron posteriormente 2 µl de muestra y 150 µl de reactivo R1 a la cubeta de reacción, seguido de la adición de 48 µl de reactivo R2, diluido con 24 µl de diluyente (agua) y el mezclado de la mezcla de reacción.

Condiciones de la medición: 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 (N.º de cat. 11355279) por duplicado con spline como modo 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.

Procedimiento para evaluar la interferencia:

15 El ensayo CRP L3 se realizó con muestras hemolizadas y sin interferencias utilizando el procedimiento estándar descrito en las instrucciones de uso (ver a continuación, a) y el nuevo procedimiento (ver a continuación, b) que utiliza otras longitudes de onda para las mediciones de absorbancia que el procedimiento estándar. Las muestras se midieron por triplicado en el cobas c311. Finalmente se evaluó la magnitud de la interferencia hemolítica obtenida con ambos procedimientos: La recuperación de las concentraciones de PCR medidas (mediana) se calculó para todas las muestras que contienen hemoglobina y se comparó con el valor de PCR obtenido con la muestra sin interferencias. Las muestras están libres de interferencias cuando la recuperación del valor de concentración de PCR inicial está dentro de +/- 10 %; los resultados que caen dentro de esta región de recuperación son resultados reportables (precisos).

25 Muestras de suero hemolizado: generadas mediante la adición de diferentes cantidades de hemoglobina a concentraciones entre -154 y -1397 mg/dl y la adición de PCR humana a 5 mg/l. Muestras de suero libres de interferencias: generadas mediante la adición de PCR humana a 5 mg/l.

a) Procedimiento estándar:

- 30 • Longitud de onda principal: 570 nm
- Longitud de onda secundaria (para fines de corrección): 800 nm
- 35 • Tiempo de reacción completo/tiempo de reacción: 10 min/2,0 min
- Calibración de 6 puntos
- Modo de calibración: spline
- 40 • Tipo de ensayo: punto final (2 puntos finales)

b) Nuevo procedimiento:

- 45 • Longitud de onda principal: 600 nm
- Longitud de onda secundaria (para fines de corrección): 800 nm
- 50 • Tiempo de ensayo/tiempo de reacción: 10 min/2,0 min
- Calibración de 6 puntos
- Modo de calibración: spline
- 55 • Tipo de ensayo: punto final (2 puntos finales)

Resultados:

60 Como se muestra en la tabla 1, cuando se usa el procedimiento estándar, no se encuentra interferencia por hemólisis hasta un índice H de 612 (concentración de hemoglobina de ~ 612 mg/dl). Para índices H más altos, la recuperación está fuera del intervalo de +/- 10 %.

ES 2 707 073 T3

Como se muestra en la tabla 2, cuando se usa el nuevo procedimiento, no se encuentra interferencia por hemólisis hasta un índice H de al menos 1397 (concentración de hemoglobina de ~ 1397 mg/dl).

- 5 Este resultado muestra una mejora de un factor aproximado de 2,3 con respecto al grado hemolítico tolerado por el ensayo cuando se usa el nuevo procedimiento. En otras palabras, al aplicar el nuevo procedimiento, la interferencia hemolítica se redujo en un factor de 2,3. Para la implementación del nuevo procedimiento no se requieren cambios en la formulación del reactivo; solo el software del analizador debe adaptarse para un procesamiento completamente automático del procedimiento.
- 10 La aplicación del nuevo procedimiento para el ensayo CRP L3 conduce a algunos cambios en el rendimiento del ensayo debidos a la variación de la longitud de onda y el tiempo de reacción: mientras que el límite de detección superior (UDL) sigue siendo similar al procedimiento estándar, el límite de detección inferior (LDL) se reduce ligeramente (de 0,06 mg/l a 0,09 mg/l).
- 15 Para este ensayo, un posible flujo de trabajo en el analizador de acuerdo con la invención sería (ver también la figura 2):
- Generación de curvas de calibración para PCR
 - 20 - Curva de calibración registrada en condiciones estándar (procedimiento estándar a)
 - Curva de calibración registrada bajo las nuevas condiciones (nuevo procedimiento b)
 - La muestra se mide simultáneamente en los siguientes ensayos
 - 25 - ensayo de índice sérico y
 - el ensayo CRP L3 al menos en las siguientes longitudes de onda: 570 nm, 600 nm, 800 nm
 - Sobre la base del valor del índice H obtenido en el ensayo del índice sérico y su comparación con los valores de corte (H = 612, H = 1397), el analizador selecciona la curva de calibración correspondiente para la cuantificación de la PCR en la muestra:
 - 30 - H ≤ 612: curva de calibración registrada en condiciones estándar (procedimiento estándar a)
 - 35 - H > 612, H ≤ 1397: curva de calibración registrada en las nuevas condiciones (nuevo procedimiento b)
 - 40 - H > 1397: rechazo de la muestra
 - Determinación de la cantidad de PCR en la muestra por comparación de la señal óptica con la curva de calibración seleccionada

45 Tabla 1: Datos para el procedimiento estándar:

Concentración de PCR en mg/l teórica	Índice H	Procedimiento estándar		
		Concentración de PCR en mg/l medida	Sesgo frente a Índice H 0	Recuperación porcentual
5	0	4,31		100 %
5	154	3,99	-7 %	93 %
5	304	4,00	-7 %	93 %
5	462	3,89	-10 %	90 %
5	612	4,01	-7 %	93 %
5	717	3,83	-11 %	89 %
5	919	3,80	-12 %	88 %
5	1085	3,78	-12 %	88 %
5	1240	3,74	-13 %	87 %
5	1397	3,70	-14 %	86 %

Tabla 2: Datos para el nuevo procedimiento:

Nuevo procedimiento				
Concentración de PCR en mg/l teórica	Índice H	Concentración de PCR en mg/l medida	Sesgo frente a Índice H 0	Recuperación porcentual
5	0	4,3		100 %
5	154	4,0	-7 %	93 %
5	304	4,0	-6 %	94 %
5	462	4,0	-7 %	93 %
5	612	4,1	-4 %	96 %
5	717	4,0	-7 %	93 %
5	919	4,0	-7 %	93 %
5	1085	4,0	-6 %	94 %
5	1240	4,0	-6 %	94 %
5	1397	4,0	-7 %	93 %

Ejemplo 2: Reducción de la interferencia lipémica en el ensayo de fenobarbital

5 El beneficio del procedimiento de la invención para reducir la interferencia de las muestras lipémicas se evaluó utilizando el ensayo comercial Phenobarbital de Roche, un inmunoensayo turbidimétrico con látex (KIMS: interacción cinética de micropartículas en una solución) y el analizador Cobas c311 de Roche.

10 Instrumento cobas c311:

Para los experimentos se utilizó el analizador cobas c311 de Roche (Roche Diagnostics GmbH), que tiene un espectrofotómetro de longitud de onda múltiple como unidad de detección. El instrumento pipetea automáticamente la muestra y los reactivos de ensayo en cubetas 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 a 3,0000 de absorbancia. Para cada cubeta de reacción se mide un blanco de 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.

25 Ensayo Phenobarbital:

Principio de ensayo de la prueba Phenobarbital de Roche (N.º de cat. 04490924): El anticuerpo contra fenobarbital se acopla covalentemente a las micropartículas y el derivado del fármaco se une a una macromolécula. La interacción cinética de las micropartículas en solución se induce mediante la unión del fármaco conjugado al anticuerpo en las micropartículas y se inhibe por la presencia de fenobarbital en la muestra. Se produce una reacción competitiva entre el fármaco conjugado y el fenobarbital en la muestra de suero para unirse al anticuerpo anti-fenobarbital en las micropartículas. La interacción cinética resultante de las micropartículas es indirectamente proporcional a la cantidad de fármaco presente en la muestra.

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 Phenobarbital se utilizan dos reactivos en el casete: R1 (Tampón con conjugado de fenobarbital, conservante y estabilizador) y R2 (Partículas de látex recubiertas con anticuerpo anti-fenobarbital (monoclonal de ratón) en tampón, conservante y estabilizador). El procedimiento descrito en las instrucciones de uso de la prueba Phenobarbital se usó como procedimiento estándar.

Esquema de pipeteo: se añadieron posteriormente 2 µl de muestra y 93 µl de reactivo R1 a la cubeta de reacción, seguido de la adición de 93 µl del reactivo R2 y el mezclado de la mezcla de reacción.

Condiciones de la medición: Para las mediciones se utilizó 600 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 fenobarbital, la primera lectura se realiza en el punto de

medición 10 y corresponde a poco después de la adición del reactivo final, y la segunda lectura se realiza en el punto de medición 49, que corresponde a un tiempo de reacción de 6,5 minutos. Para la generación de la curva de calibración se miden 6 estándares de Roche (N.º de cat. 03375790) por duplicado con RCM (función de Rodbard) como modo de calibración.

5 Procedimiento para evaluar la interferencia:

10 El ensayo Phenobarbital se realizó con muestras lipémicas y sin interferencias utilizando el procedimiento estándar descrito en las instrucciones de uso (ver a continuación, a) y el nuevo procedimiento (ver a continuación, b) que utiliza otras longitudes de onda para las mediciones de absorbancia que el procedimiento estándar. Las muestras se midieron por triplicado en el cobas c311. Finalmente se evaluó la magnitud de la interferencia lipémica obtenida con ambos procedimientos: La recuperación de las concentraciones de fenobarbital medidas (mediana) se calculó para todas las muestras que contenían lípidos y se comparó con el valor de fenobarbital obtenido con la muestra sin interferencias. Las muestras están libres de interferencias cuando la recuperación del valor de concentración de fenobarbital inicial está dentro de +/- 10 %; los resultados que caen dentro de esta región de recuperación son resultados reportables (precisos).

15 Muestras de suero lipémico: generadas mediante la adición de diferentes cantidades de intralípidos a concentraciones entre ~ 6 y ~ 1903 mg/dl y la adición de fenobarbital a 5 y 45 µg/ml, respectivamente.
20 Muestras de suero libres de interferencias: generadas por adición de fenobarbital a 5 y 45 µg/ml respectivamente.

a) Procedimiento estándar:

- 25
- Longitud de onda principal: 600 nm
 - Longitud de onda secundaria (para fines de corrección): 800 nm
 - Tiempo de reacción completo/tiempo de reacción: 10 min/6,5 min
 - Calibración de 6 puntos
 - Modo de calibración: RCM (Rodbard)
- 30
- Tipo de ensayo: punto final (2 puntos finales)

b) Nuevo procedimiento:

Para la concentración de fenobarbital de **5 µg/ml**:

- 35
- Longitud de onda principal: 505 nm
 - Longitud de onda secundaria (para fines de corrección): 800 nm
 - Tiempo de reacción completo/tiempo de reacción: 10 min/6,5 min
 - Calibración de 6 puntos
 - Modo de calibración: RCM (Rodbard)
- 40
- Tipo de ensayo: punto final (2 puntos finales)

Para la concentración de fenobarbital de **45 µg/ml**:

- 45
- Longitud de onda principal: 450 nm
 - Longitud de onda secundaria (para fines de corrección): 800 nm
 - Tiempo de reacción completo/tiempo de reacción: 10 min/3,6 min
 - Calibración de 6 puntos
 - Modo de calibración: RCM (Rodbard)
- 50
- Tipo de ensayo: punto final (2 puntos finales)

Resultados:

55 Como se muestra en la tabla 3 para una concentración de fenobarbital de 5 µg/ml, cuando se usa el procedimiento estándar, no se encuentra interferencia por lipemia hasta un índice L de 598 (concentración de intralípidos de ~ 598 mg/dl). Para índices L más altos, la recuperación está fuera del intervalo de +/- 10 %.

Como se muestra en la tabla 4, para una concentración de fenobarbital de 5 µg/ml, cuando se usa el nuevo procedimiento, no se encuentra interferencia por lipemia hasta un índice L de 902 (concentración de intralípidos de ~ 902 mg/dl).

60 Como se muestra en la tabla 5, para una concentración de fenobarbital de 45 µg/ml, cuando se usa el procedimiento estándar, no se encuentra interferencia por lipemia hasta un índice L de 802 (concentración de intralípidos de ~ 802 mg/dl). Para índices L más altos, la recuperación está fuera del intervalo de +/- 10 %.

Como se muestra en la tabla 6, para una concentración de fenobarbital de 45 µg/ml, cuando se usa el nuevo procedimiento, no se encuentra interferencia por lipemia hasta un índice L de 1262 (concentración de intralípidos de ~ 1262 mg/dl).

5 Estos resultados muestran una mejora de un factor aproximado de 1,5 con respecto al grado lipémico tolerado por el ensayo cuando se usa el nuevo procedimiento (ver la tabla 7). En otras palabras, al aplicar el nuevo procedimiento, la interferencia lipémica se redujo en un factor de 1,5. Para la implementación del nuevo procedimiento no se requieren cambios en la formulación del reactivo; solo el software del analizador debe adaptarse para un procesamiento completamente automático del procedimiento.

10 La aplicación del nuevo procedimiento para el ensayo de Phenobarbital no produce cambios en el rendimiento del ensayo debidos a la variación de la longitud de onda y el tiempo de reacción: LDL y UDL siguen siendo similares al procedimiento estándar.

15 Por lo tanto, para este ensayo, un posible flujo de trabajo en el analizador de acuerdo con la invención sería (ver también la figura 3):

1. Generación de curvas de calibración para fenobarbital

- Curva de calibración registrada en condiciones estándar (procedimiento estándar a)
- Dos curvas de calibración registradas bajo las nuevas condiciones (nuevo procedimiento b)

20 2. La muestra se mide simultáneamente en los siguientes ensayos

- ensayo de índice sérico y
- el ensayo de fenobarbital al menos en las siguientes longitudes de onda: 450 nm, 505 nm, 600 nm, 800 nm

25 3. Basado en el valor del índice L obtenido en el ensayo del índice sérico y su comparación con los valores de corte (L1 = 598, L2 = 902, L3 = 1262), y basándose en la estimación aproximada de la concentración de fenobarbital por comparación de la señal óptica de la muestra obtenida en el ensayo de fenobarbital con un valor umbral predeterminado T1 (T1 puede ser la señal óptica en la curva de calibración medida con el procedimiento estándar correspondiente a una concentración de fenobarbital de 45 µg/ml), la curva de calibración correspondiente se selecciona mediante el analizador para la cuantificación de fenobarbital en la muestra:

- $L \leq 598 \rightarrow$ curva de calibración registrada en condiciones estándar (procedimiento estándar a), independientemente de la concentración de fenobarbital en

- $L > 598 \rightarrow$ selección de la curva de calibración basada en el índice L encontrado y también basada en la concentración aproximada de fenobarbital en la muestra por comparación de la señal óptica medida de la muestra en el ensayo de fenobarbital con un valor umbral correspondiente:

35 - si $L > 598$ y $L \leq 902$ y si la señal óptica medida indica una concentración de fenobarbital $< 45 \mu\text{g/ml}$:

\rightarrow curva de calibración registrada en las nuevas condiciones (nuevo procedimiento b, condiciones para 5 µg/ml de fenobarbital)

40 - si $L > 598$ y $L > 902$ y si la señal óptica medida indica una concentración de fenobarbital $< 45 \mu\text{g/ml}$:

\rightarrow rechazo de muestra

45 - si $L > 598$ y $L \leq 1262$ y si la señal óptica medida indica una concentración de fenobarbital $\geq 45 \mu\text{g/ml}$:

\rightarrow curva de calibración registrada en las nuevas condiciones (nuevo procedimiento b, condiciones para 45 µg/ml de fenobarbital)

50 - si $L > 598$ y $L > 1262$ y si la señal óptica medida indica una concentración de fenobarbital $\geq 45 \mu\text{g/ml}$:

\rightarrow rechazo de muestra

55 4. Determinación de la cantidad de fenobarbital en la muestra por comparación de la señal óptica con la curva de calibración seleccionada.

Tabla 3: 5 µg/ml de fenobarbital: Datos para el procedimiento estándar (600-800nm, 6,5 min)

		Estándar		
Concentración de fenobarbital en µg/ml teórica	Índice L	Concentración de fenobarbital en µg/ml medida	Sesgo frente a Índice L 0	Recuperación porcentual
5	7	4,6		100 %
5	145	4,7	0,1	102 %
5	292	4,6	0,0	99 %

ES 2 707 073 T3

5	453	4,4	-0,3	94 %
5	598	4,2	-0,4	91 %
5	736	3,9	-0,7	85 %
5	902	3,6	-1,0	78 %
5	1056	3,3	-1,3	71 %
5	1289	3,0	-1,6	66 %
5	1349	2,8	-1,8	61 %
5	1485	2,4	-2,2	51 %

Tabla 4: 5 µg/ml de fenobarbital: Datos para el nuevo procedimiento (505-800nm, 6,5 min)

Nuevo procedimiento				
Concentración de fenobarbital en µg/ml teórica	Índice L	Concentración de fenobarbital en µg/ml medida	Sesgo frente a Índice L 0	Recuperación porcentual
5	7	4,6		100 %
5	145	4,8	0,2	104 %
5	292	4,7	0,1	102 %
5	453	4,6	0,0	99 %
5	598	4,6	-0,1	99 %
5	736	4,4	-0,2	95 %
5	902	4,2	-0,4	92 %
5	1056	4,1	-0,5	89 %
5	1289	4,0	-0,6	87 %
5	1349	4,0	-0,6	86 %

5 **Tabla 5:** 45 µg/ml de fenobarbital: Datos para el procedimiento estándar (600-800nm, 6,5 min)

Procedimiento estándar				
Concentración de fenobarbital en µg/ml teórica	Índice L	Concentración de fenobarbital en µg/ml medida	Sesgo frente a Índice L 0	Recuperación porcentual
45	6	39,6		100 %
45	154	39,1	-1 %	99 %
45	313	38,8	-2 %	98 %
45	472	38,3	-3 %	97 %
45	656	37,7	-5 %	95 %
45	802	37,0	-7 %	93 %
45	967	35,3	-11 %	89 %
45	1262	33,9	-14 %	86 %
45	1419	30,6	-23 %	77 %
45	1526	31,4	-21 %	79 %
45	1670	31,0	-22 %	78 %
45	1780	29,2	-26 %	74 %
45	1903	28,5	-28 %	72 %

Tabla 6: 45 µg/ml de fenobarbital: Datos para el nuevo procedimiento (450-800nm, 3,6 min)

Nuevo procedimiento				
Concentración de fenobarbital en µg/ml teórica	Índice L	Concentración de fenobarbital en µg/ml medida	Sesgo frente a Índice L 0	Recuperación porcentual
45	6	40,2		100 %
45	154	40,2	-0,1 %	100 %
45	313	39,6	-2 %	98 %
45	472	39,6	-2 %	98 %
45	656	39,2	-2 %	98 %
45	802	38,5	-4 %	96 %
45	967	37,4	-7 %	93 %
45	1262	36,8	-9 %	91 %
45	1419	34,3	-15 %	85 %
45	1526	35,2	-12 %	88 %
45	1670	34,2	-15 %	85 %
45	1780	33,4	-17 %	83 %
45	1903	33,4	-17 %	83 %

Tabla 7: Comparación entre el procedimiento estándar y el nuevo para el fenobarbital para reducir la interferencia de la lipemia

Interferencia evaluada a las siguientes concentraciones de analito	Cantidades toleradas de sustancia interferente [§] con el procedimiento estándar*	Cantidades toleradas de sustancia interferente [§] con el nuevo procedimiento*	Factor de mejora
	600 nm-800 nm, 6,5 min:	505 nm-800 nm, 6,5 min:	
5 µg/ml de fenobarbital	Índice L ≤ 598	Índice L < 902	1,5
		450 nm-800 nm, 3,6 min:	
45 µg/ml de fenobarbital	Índice L ≤ 802	Índice L < 1262	1,5

5 * Los procedimientos se describen indicando la longitud de onda principal utilizada, la longitud de onda de corrección, el tiempo de reacción

§ El índice L 1 es de aproximadamente 1 mg/dl de lípidos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de determinación de la cantidad del analito específico de una muestra que puede presentar interferencias en ensayos fotométricos, en el que el analito específico se cuantifica a partir del cambio en la señal óptica de la mezcla de reacción después de la interacción del analito con reactivos de ensayo específicos del analito, que comprende las etapas de:
- 10 a) generar múltiples curvas de calibración para múltiples longitudes de onda para el analito específico de una muestra a determinar, en el que
- 15 - la curva de calibración 1 se registra a la longitud de onda 1 y el tiempo de reacción 1 optimizados para muestras que no muestran interferencias,
- la curva de calibración 2 se registra a la longitud de onda 2 y el tiempo de reacción 2 optimizados para muestras que muestran interferencias hemolíticas,
- 20 - la curva de calibración 3 se registra a la longitud de onda 3 y el tiempo de reacción 3 optimizados para muestras que muestran interferencias ictericas,
- la curva de calibración 4 se registra a la longitud de onda 4 y el tiempo de reacción 4 para muestras que muestran interferencias lipémicas,
- 25 - y depositar estos resultados de medición predeterminados en un sistema de gestión de datos de la plataforma del instrumento,
- 30 b) realizar una prueba de interferencia, simultáneamente a la determinación del analito específico, para cuantificar la cantidad de sustancias interferentes presentes en la muestra a determinar y comparar la cantidad de cada sustancia interferente con los valores de corte predeterminados,
- 35 c) medir la señal óptica para el analito específico de una muestra a determinar en la mezcla de reacción a múltiples longitudes de onda y puntos de tiempo,
- d) seleccionar la curva de calibración correspondiente de la etapa a) dependiendo de las sustancias interferentes,
- e) cuantificar la cantidad del analito específico de una muestra a determinar por comparación con la curva de calibración seleccionada de la etapa d) para las longitudes de onda elegidas.
- 40 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que se aplican condiciones de medición específicas adicionales al protocolo de medición que comprenden tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración y el tipo de ensayo.
- 45 3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en el que se puede cuantificar una muestra que muestra interferencias utilizando las pruebas de laboratorio espectrofotométricas comercialmente disponibles de la plataforma del instrumento correspondiente sin aplicar un tratamiento preanalítico a la muestra ni/o sin cambiar la formulación ni el procedimiento del ensayo.
- 50 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que se usa la curva de calibración 5 registrada a la longitud de onda 5, que está optimizada para una muestra que muestra interferencias hemolíticas e ictericas o lipémicas.
- 55 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que se usa la curva de calibración 6 registrada a la longitud de onda 6, que está optimizada para una muestra que muestra interferencia hemolítica a bajas concentraciones de analito.
- 60 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que se usa la curva de calibración 7 registrada a la longitud de onda 7, que está optimizada para una muestra que muestra interferencia hemolítica a altas concentraciones de analito.
- 65 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que se pueden definir más de 2 curvas de calibración sobre el rango de medición, cada una optimizada para reducir la interferencia de una muestra para un cierto rango de concentración.
8. Procedimiento para reducir las interferencias de las pruebas de laboratorio basadas en espectrofotometría de muestras que muestran interferencias hemolíticas y/o ictericas y/o lipémicas y/u otras, en el que se aplican adicionalmente condiciones de medición específicas que comprenden longitudes de onda para la medición,

tiempos de reacción, puntos de calibración, metodología del modo de calibración de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 7, al protocolo de medición sin aplicar un tratamiento preanalítico a la muestra y/o sin cambiar la metodología de ensayo.

- 5 9. Uso de condiciones de medición específicas adicionales aplicadas al protocolo de medición para reducir las interferencias de las pruebas de laboratorio basadas en espectrofotometría para determinar la cantidad del analito específico en una muestra que puede mostrar interferencias hemolíticas y/o ictéricas y/o lipémicas que comprenden longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, puntos de calibración y modo de calibración de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10
10. Plataforma de instrumentos que utiliza pruebas de laboratorio espectrofotométricas comercialmente disponibles para determinar la cantidad del analito específico en una muestra que puede presentar interferencias hemolíticas y/o ictéricas y/o lipémicas, en el que el sistema de gestión de datos de la plataforma de instrumentos es capaz de procesar datos de tiempos de reacción, puntos de calibración, modo de calibración, longitudes de onda, índices séricos para seleccionar la curva de calibración que mejor se ajusta de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 7.
- 15
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que se realizan correcciones adicionales de los resultados de medición que comprenden longitudes de onda para la medición, tiempos de reacción, modo de calibración, número de puntos de calibración y se compensan entre sí.
- 20

Figura 1:

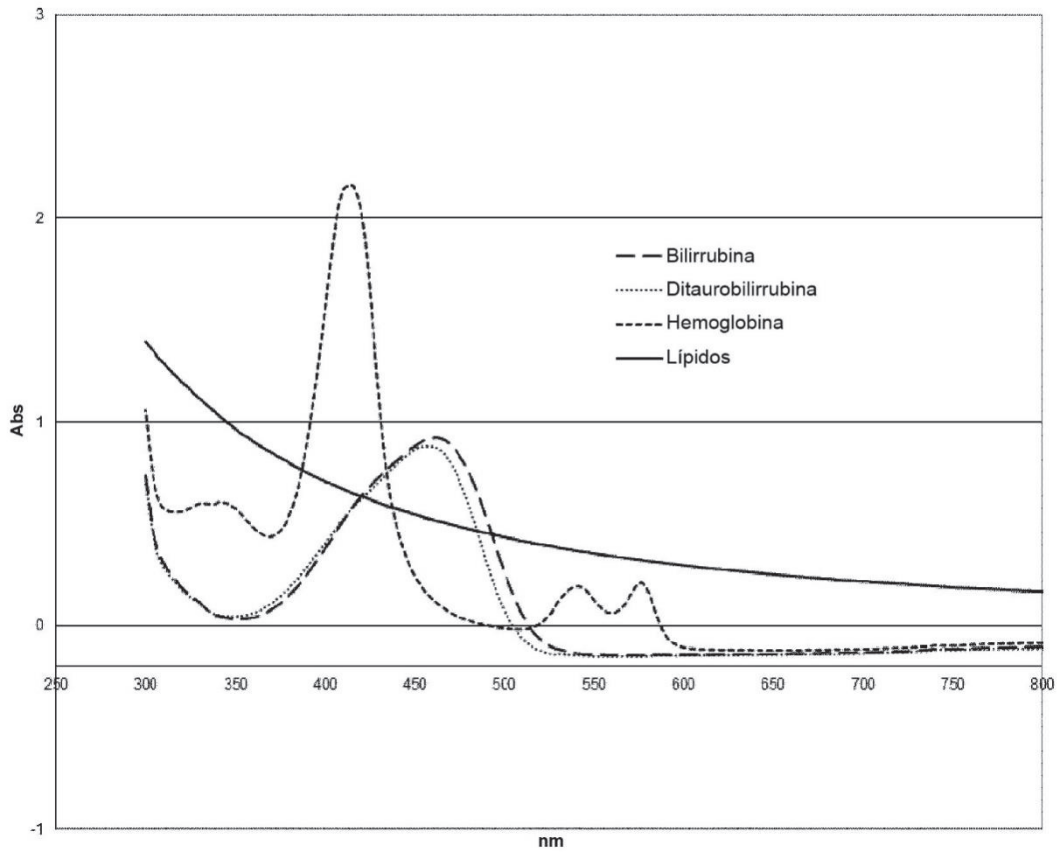


Figura 2:

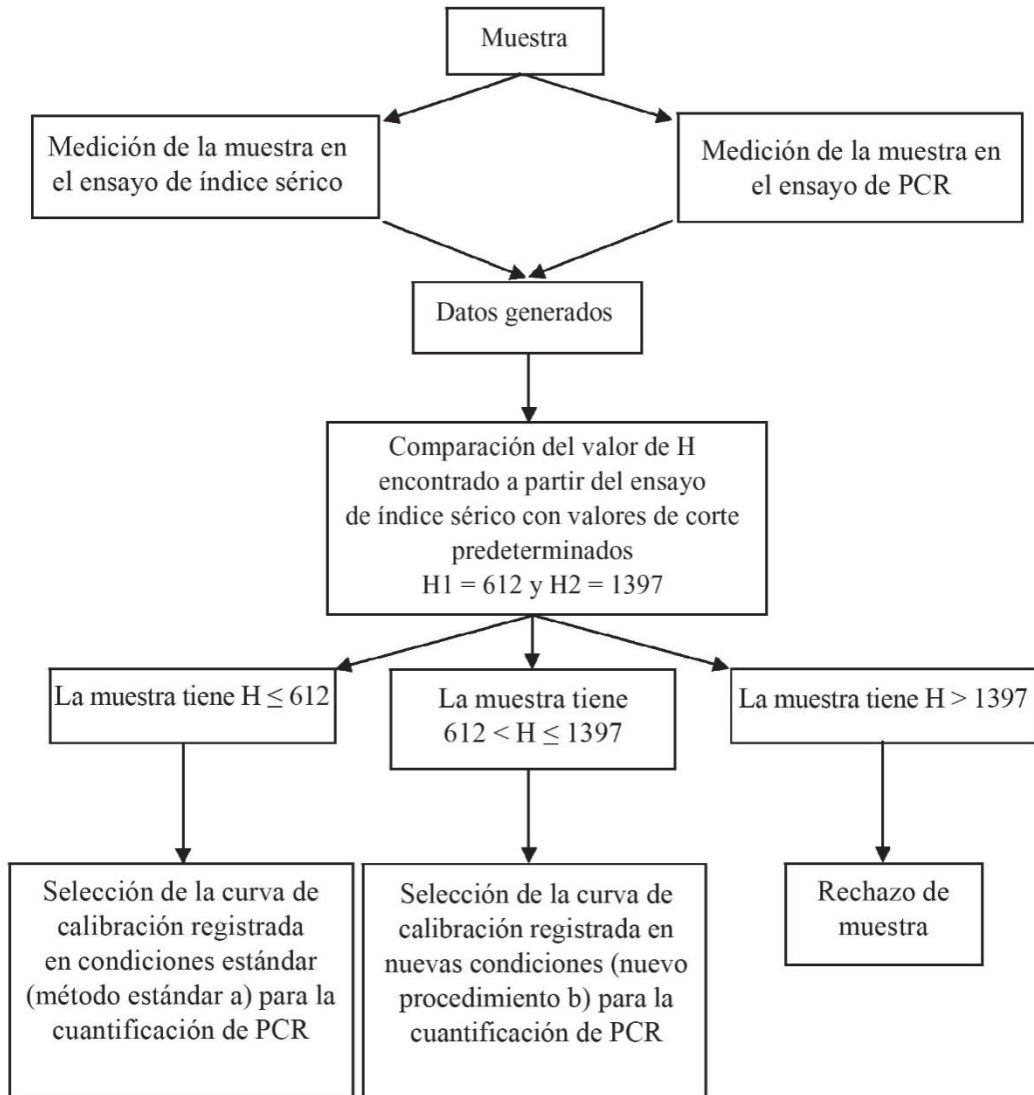


Figura 3:

