

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 779**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2016** **E 16187839 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019** **EP 3293521**

54 Título: **Preparación de muestras lipémicas de plasma o de suero para el establecimiento de una interferencia de lípidos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PATZKE, JUERGEN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 720 779 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

Preparación de muestras lipémicas de plasma o de suero para el establecimiento de una interferencia de lípidos

5 La presente invención está en el campo del diagnóstico in vitro y se refiere a un procedimiento para la preparación de muestras lipémicas de plasma o de suero y su uso para el establecimiento de una interferencia de lípidos para la determinación cuantitativa de la cantidad o la actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero.

10 La determinación clínica de parámetros relevantes en muestras de plasma y suero puede ser influida de manera significativa por elevadas concentraciones de triglicéridos (lipemia). Las muestras lipémicas con elevada concentración de triglicéridos ocurren con relativa frecuencia y pueden ser causadas por ejemplo por alimentación rica en grasas, Diabetes mellitus, falla renal crónica, inflamación del páncreas, lupus eritematoso, mieloma múltiple o la ingesta de medicamentos o anticonceptivos orales.

15 El efecto de interferencia de elevadas concentraciones de triglicéridos descansa en primera línea en el enturbiamiento (turbidez) de las muestras reconocible en parte a simple vista, lo cual tiene como consecuencia una elevada dispersión y absorción de la luz. Este fenómeno interfiere mayormente con sistemas fotométricos de prueba. Otro efecto interferente es que puede perjudicarse la solubilidad de un analito que va a ser detectado.

20 Los aparatos de análisis modernos automáticos comprenden por ello de manera creciente las denominadas unidades preanalíticas de análisis, en las cuales el material de muestra es analizado respecto a algunas sustancias interferentes, como lípidos, hemoglobina y bilirrubina, antes de ejecutar la verdadera determinación de uno o varios analitos específicos. Si en una muestra se establecen cantidades críticas de una o varias sustancias interferentes, por ejemplo los resultados de prueba obtenidos para la muestra pueden estar acompañados con una alerta, de modo que un usuario esté informado de que aquí posiblemente se midió un resultado falso.

25 Puesto que la concentración de triglicéridos que causa una interferencia significativa es diferente para cada prueba y depende del aparato de análisis usado, los reactivos utilizados, etc., es necesario ejecutar estudios de interferencia para cada prueba, para determinar desde qué concentración de triglicéridos, una prueba específica no suministra ya resultados de prueba confiables.

30 Es un problema, que hasta ahora no existen muestras estandarizadas de material lipémico, lo cual es necesario para la ejecución de los estudios de interferencia. Hasta ahora se añaden frecuentemente intralípidos, una emulsión de soja-lípidos, a muestras de plasma o conjuntos de plasma humano, para simular las interferencias lipémicas. Sin embargo, se encontró que la adición de intralípidos no es un método aplicable en general para la determinación de interferencia de lípidos, porque las interferencias causadas por intralípidos no tienen correlación en todos los casos con las interferencias que ocurren en muestras lipémicas nativas (Bornhorst, J.A. et al., Assay-specific differences in lipemic interference in native and intralipid supplemented samples. Clin. Chem. 2004, 50(11): 2197-2201). Por ello, para los estudios de interferencia se prefiere usar muestra lipémica de donante. Heller et al., Lipid Interference in the Determination of the Concentration of Haemoglobin in Plasma Using the AC A SX Analyzer 1, Eur J Clin Chem Clin Biochem, octubre de 1996 (1996-10), páginas 811-816; divulga un procedimiento para la preparación de una muestra lipémica de plasma o de suero.

35 Sin embargo cantidades suficientes de muestras lipémicas nativas de paciente, en particular aquellas con concentraciones de triglicéridos extraordinariamente altas (> 500 mg/dL), son obtenibles sólo con muy elevado costo, puesto que tuvieron que investigarse colectivos extremadamente grandes de donantes.

40 Por ello, la presente invención basa el objetivo en encontrar un procedimiento simple para la preparación de muestras lipémicas de plasma o de suero.

El objetivo es logrado mediante la centrifugación de una muestra de plasma o de suero que tiene lípidos, para obtener una fase enriquecida en lípidos y la adición entonces de la fase enriquecida en lípidos a una muestra de plasma o de suero.

45 Esto tiene como ventaja que puede generarse cada concentración deseada de triglicéridos, sin que como intralípidos tengan que usarse sustancias artificiales.

Por consiguiente es objetivo de la presente invención un procedimiento para la fabricación de una muestra lipémica de plasma o de suero. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

50 (a) centrifugación de una primera cantidad parcial de una muestra de plasma o de suero que tiene lípidos, para separar un sobrenadante que tiene lípidos, de una fase empobrecida en lípidos;

(b) separación del sobrenadante que tiene lípidos y

(c) mezcla del sobrenadante que tiene lípidos con una segunda cantidad parcial de la misma muestra de plasma o de suero que tiene lípidos.

Los conceptos "triglicérido(s)" y "lípidos(s)" son usados como sinónimos.

5 Bajo el concepto de "muestra lipémica de plasma o de suero" se entiende una muestra de plasma o de suero de un donante individual o una mezcla (conjunto) de muestras de plasma o de suero de varios donantes, cuya concentración de triglicéridos está por encima del intervalo de referencia, es decir el que es 150 mg/dL (1,71 mmol/L) o más.

10 Bajo el concepto de "muestras de plasma o de suero que tienen lípidos" se entiende una muestra de plasma o de suero de un donante individual o una mezcla (conjunto) de muestras de plasma o de suero de varios donantes, cuya concentración de triglicéridos está dentro o por encima del intervalo de referencia de ≤ 150 mg/dL (1,71 mmol/L).

La invención se refiere en particular a muestras de plasma y suero humanos. Sin embargo, es aplicable un procedimiento análogo, básicamente también para muestras de plasma y suero animales.

15 En la forma de realización de acuerdo con la invención, se divide una muestra de plasma o de suero que tiene lípidos, y en la etapa (a) del procedimiento se somete a centrifugación una primera cantidad parcial de la muestra de plasma o de suero que tiene lípidos y entonces en la etapa (b) se separa el sobrenadante que tiene lípidos, y entonces en la etapa (c) se mezcla el sobrenadante que tiene lípidos con una segunda cantidad parcial de la misma muestra de plasma o de suero que tiene lípidos. Esto tiene como ventaja que en esta muestra específica, que exhibe por ejemplo una concentración o actividad de analito definidas, está aumentada solamente la cantidad de los
20 lípidos, mientras la composición restante de la muestra permanece inalterada. Además, es una ventaja que puede examinarse la interferencia que es causada por los lípidos de esta muestra específica. Con ello pudieron integrarse en un estudio con varias diferentes muestras lipémicas, también la variabilidad de estas muestras respecto a la interferencia en la determinación final del valor límite de interferencia.

25 De modo alternativo, en la etapa (c) puede mezclarse el sobrenadante separado que tiene lípidos con una cantidad parcial de la fase empobrecida en lípidos de la muestra centrifugada.

La relación de mezcla de sobrenadante que tiene lípidos y muestra de plasma o suero depende evidentemente de la concentración de triglicéridos de los materiales de partida, así como de la concentración deseada de triglicéridos.

30 La centrifugación de las muestras de plasma o de suero que tienen lípidos en la etapa (a) ocurre preferiblemente durante por lo menos 10 minutos a por lo menos 2.000xg. Mediante ella es posible también la aplicación de tiempos de centrifugación más largos y fuerzas de centrifugación más altas, como por ejemplo durante 10 minutos a 15.000xg o durante 60 minutos a 82.000xg o también durante 60 minutos a 133.000xg.

35 La centrifugación de una muestra de plasma o de suero que tiene lípidos conduce a la separación detectable a simple vista de un sobrenadante turbio que tiene lípidos, de una fase clara empobrecida en lípidos ubicada abajo. La separación del sobrenadante que tiene lípidos puede ocurrir por ejemplo picando cuidadosamente con una punta de pipeta a través del sobrenadante que tiene lípidos y succionando cuidadosamente la fase empobrecida en lípidos, de modo que en el recipiente permanece sólo el sobrenadante que tiene lípidos. Mediante la adición de una muestra de plasma o de suero al recipiente y agitación se mezcla la muestra con el sobrenadante que tiene lípidos. Pueden aplicarse también otros procedimientos conocidos para la homogenización, como por ejemplo un tratamiento con ultrasonido.

40 Otro objetivo de la presente invención es el uso de una muestra de plasma o de suero lipémica preparada con un procedimiento de acuerdo con la invención, en un procedimiento para establecer una interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación cuantitativa de las cantidades o la actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero.

45 De manera más preferida se usa una muestra lipémica de plasma o de suero preparada de acuerdo con la invención, en un procedimiento para establecer una interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación cuantitativa de la cantidad o de la actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero, en el cual el procedimiento para establecer una interferencia de lípidos comprende las siguientes etapas:

50 (a) preparación de una primera carga de prueba mediante mezcla de por lo menos un reactivo de detección específico para el analito, con una muestra de plasma o de suero no lipémica con una concentración o actividad de analito, y medición de un primer resultado de prueba;

(b) preparación de una segunda carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico para el analito con una muestra de plasma o de suero lipémica de la misma concentración o

actividad de analito, y medición de un segundo resultado de prueba;

(c) establecimiento de una diferencia entre el primero y el segundo resultado de la prueba; y

5 (d) establecimiento de una interferencia de lípidos, cuando la diferencia entre el primero y el segundo resultado de prueba supera un límite de tolerancia determinado previamente, por ejemplo cuando la diferencia entre el primero y el segundo resultado de ensayo es 5 % o más.

De este modo, para cada prueba analítica, puede determinarse desde cuál concentración de triglicéridos la prueba ya no suministra resultados confiables.

10 Se entiende por un "analito" una sustancia que va a ser detectada en un material de muestra (aquí plasma o suero) o una propiedad medible del material de muestra, que es influenciada por una multiplicidad de sustancias. Un analito puede ser por ejemplo un péptido, una proteína, un polisacárido o un ácido nucleico, en particular una
 15 proteína o complejo de proteínas con una determinada función biológica, como por ejemplo inmunoglobulinas, citoquinas, receptores, enzimas, hormonas, antígenos de cáncer, antígenos específicos de tejidos, factores de coagulación de la sangre, antígenos de patógenos microbianos, etc. Una propiedad de una muestra de plasma influida típicamente por una multiplicidad de sustancias es por ejemplo el tiempo de coagulación. Las pruebas de
 20 coagulación hacen posible la determinación in vitro de la actividad del factor individual o varios factores de coagulación, mediante la medición de la velocidad de formación de fibrina.

El procedimiento para la determinación cuantitativa de la cantidad o la actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero puede ser todo principio imaginable de prueba, como por ejemplo una prueba inmunológica reforzada de partículas, una prueba cromogénica o una prueba de coagulación.

20 Un reactivo de detección específico del analito contiene una o varias sustancias, que hace posible la detección de un analito específico u otra propiedad medible de la muestra, por ejemplo uno o varios anticuerpos o antígenos, sustratos cromogénicos de péptido y/o activadores de enzimas. Puede preverse por ejemplo mezclar con la muestra un reactivo líquido de detección que contiene en forma disuelta las sustancias específicas del analito. De modo alternativo puede preverse que un reactivo de detección consiste en una fase sólida, que está recubierta con
 25 una o varias sustancias específicas del analito.

La medición de los resultados de prueba puede ocurrir de acuerdo con el principio de prueba aplicado, por ejemplo por espectrofotometría, por turbidimetría, por nefelometría, por luminometría, por fluorometría, por radiometría, etc.

30 Para el establecimiento de una interferencia de lípidos, por consiguiente un perjuicio significativo de la exactitud de la medición de un procedimiento de prueba, se ejecuta el mismo procedimiento de prueba tanto con una muestra no lipémica de plasma o de suero (con una concentración de triglicéridos de ≤ 150 mg/dL) como muestra de referencia, como también con por lo menos una muestra lipémica de plasma o de suero preparada de acuerdo con la invención (con una concentración de triglicéridos de > 150 mg/dL). En tanto las dos muestras exhiban la misma concentración o actividad de analito, la diferencia entre el primero y el segundo resultados de prueba es atribuida a la elevada
 35 concentración de triglicéridos de la muestra lipémica. Preferiblemente la muestra de referencia es la fase empobrecida en lípidos de la muestra que tiene lípidos, que fue centrifugada para la preparación de la muestra lipémica.

40 Una interferencia de lípidos está presente entonces cuando la diferencia entre el primero y el segundo resultados de prueba supera un límite preestablecido de tolerancia, por ejemplo cuando la diferencia relativa entre el primero y el segundo resultados de prueba es 5 % o más. Como límite de tolerancia puede definirse también una diferencia absoluta máxima de analito.

45 Preferiblemente para un estudio de interferencia de lípidos, para cada muestra se miden varias muestras, preferiblemente 10 a 20, de modo que puede ejecutarse una evaluación estadística. Preferiblemente se miden 10 a 20 muestra no lipémicas con concentración o actividad normales de analito y el mismo número de muestras lipémicas con concentración o actividad normal de analito. Adicionalmente o alternativamente, puede medirse un número de muestras no lipémicas y de modo paralelo este mismo número de muestras lipémicas con concentraciones o actividades de analitos, los cuales cubren el intervalo de medición del procedimiento de prueba. Además, pueden medirse también diferentes tipos de muestras lipémicas con concentración o actividad de analito normal, reducida o aumentada, que exhiben diferentes concentraciones de triglicéridos por encima del intervalo de referencia, por consiguiente concentraciones entre 150 y 3000 mg/dL.

50 Preferiblemente para el establecimiento de una interferencia de lípidos se usa una muestra lipémica de plasma o de suero y una muestra no lipémica de plasma o de suero, que son preparadas a partir de las mismas muestras de plasma o de suero que tienen lípidos, como material de partida. Esto tiene como ventaja que en las dos muestras, excepto por la equidad de lípidos cuya influencia debería ser investigada, la composición de la muestra y con ello también la concentración de analito, son idénticas.

Además, de manera preferida la muestra no lipémica de plasma o de suero puede ser preparada con un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

(a) centrifugación de una muestra de plasma o de suero que tiene lípidos y aislamiento de la fase empobrecida en lípidos del sobrenadante que tiene lípidos.

- 5 Esto tiene como ventaja que puede usarse la fase empobrecida en lípidos que surge como producto secundario en la preparación del sobrenadante que tiene lípidos, el cual es provisto para la preparación de una muestra lipémica, de modo que puede usarse un material de partida disponible, de la manera más amplia libre de desechos.

Una muestra lipémica de plasma o de suero preparada de acuerdo con la invención puede también ser usada en un procedimiento para el establecimiento de una interferencia de lípidos, en un procedimiento para la determinación
10 cuantitativa de la cantidad o actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero, en el cual el procedimiento para el establecimiento de una interferencia de lípidos comprende las siguientes etapas:

(a) preparación de una primera carga de prueba mediante mezcla de por lo menos un reactivo de detección específico para el analito, con una primera cantidad parcial de una muestra no lipémica de plasma o de suero y medición de un primer resultado de prueba;

- 15 (b) preparación de una segunda carga de prueba mediante mezcla de mismo por lo menos un reactivo de detección específico del analito, con la fase empobrecida en lípidos de una segunda cantidad parcial de la misma muestra no lipémica de plasma o de suero, que previamente había sido centrifugada durante por lo menos 10 minutos a por lo menos 2000g, y medición de un segundo resultado de prueba; y

(c) establecimiento de una primera diferencia entre el primero y el segundo resultado de prueba; y

- 20 (d) preparación de una tercera carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico del analito con una primera cantidad parcial de una muestra lipémica de plasma o de suero y medición de un tercer resultado de prueba;

(e) preparación de una cuarta carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico del analito con la fase empobrecida en lípidos de una segunda cantidad parcial de la misma muestra
25 lipémica de plasma o de suero, que había sido centrifugada previamente durante por lo menos 10 minutos a por lo menos 2000g, y medición de un cuarto resultado de prueba; y

(f) establecimiento de una segunda diferencia entre el tercero y cuarto resultados de prueba; y

- (g) establecimiento de una interferencia de lípidos, cuando la desviación entre la primera y la segunda diferencia supera un límite de tolerancia determinado previamente, por ejemplo cuando la desviación entre la primera y
30 segunda diferencias, que están expresadas por ejemplo en cada caso como diferencias relativas, supera 5 % o más.

También puede usarse una muestra lipémica de plasma o de suero en una forma de realización del procedimiento para el establecimiento de una interferencia de lípidos, en un procedimiento para la determinación cuantitativa de la
35 cantidad o de la actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero, en el cual la forma de realización del procedimiento para el establecimiento de una interferencia de lípidos comprende las siguientes etapas:

(a) preparación de varias primeras cargas de prueba, en cada caso mediante mezcla de por lo menos un reactivo de detección específico del analito, con en cada caso una primera cantidad parcial de muestra no lipémica de plasma o de suero y medición de varios primeros resultados de prueba;

- 40 (b) preparación de varias segundas cargas de prueba en cada caso mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico del analito con en cada caso la fase empobrecida en lípidos de una segunda cantidad parcial de la misma muestra no lipémica de plasma o de suero, que previamente había sido centrifugada durante por lo menos 10 minutos a por lo menos 2000g, y medición de varios segundos resultados de prueba; y

(c) determinación de una primera diferencia entre los respectivos primero y segundo resultados de prueba y formación de un promedio de valor de todas las primeras diferencias establecidas; y

- 45 (d) preparación de una tercera carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico del analito con una primera cantidad parcial de una muestra lipémica de plasma o de suero y medición de un tercer resultado de prueba;

(e) preparación de una cuarta carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico del analito con la fase empobrecida en lípidos de una segunda cantidad parcial de la misma muestra
50 lipémica de plasma o de suero, que había sido centrifugada previamente durante por lo menos 10 minutos a por lo

menos 2000g, y medición de un cuarto resultado de prueba;

(f) determinación de una segunda diferencia entre el tercero y cuarto resultado de prueba; y

(g) formación de una segunda diferencia corregida mediante sustracción del promedio del valor de todas las primeras diferencias establecidas; y

- 5 (h) determinación de una interferencia de lípidos, cuando la segunda diferencia corregida supera un límite de tolerancia establecido previamente, por ejemplo cuando la diferencia corregida supera un intervalo de confianza determinado previamente de 10 %.

10 Esto tiene como ventaja que puede reconocerse cualquier efecto del procedimiento de centrifugación que es aplicado para la preparación de la fase empobrecida en lípidos de una muestra, el cual puede causar una modificación de la concentración de analito. Cuando el procedimiento de centrifugación en sí mismo modifica el contenido de analito de la muestra, este efecto tiene que ser considerado en el establecimiento de una interferencia. Es concebible por ejemplo para una prueba de coagulación, que mediante la centrifugación sedimenten factores importantes unidos a la vesícula y mediante ello se modifique solo el tiempo de coagulación. Por esta razón se aplica el procedimiento de centrifugación no sólo a las muestras lipémicas, sino también a muestra no lipémicas. Cuando por ejemplo tanto para muestras lipémicas como también para muestra no lipémicas, se determine en cada caso una desviación del contenido de analito de 10% relativo en la fase empobrecida en lípidos respecto a las muestras no sometidas a centrifugación, esto es atribuible a la centrifugación. Entonces no está presente una interferencia por triglicéridos. Cuando el procedimiento de centrifugación genera una desviación de + 10 % en el contenido de analito de muestra no lipémicas y en muestras lipémicas se observa una desviación de + 20%, puede concluirse de ello una interferencia de 10 % por los triglicéridos.

Puesto que tanto la magnitud de la interferencia como también la posible influencia del procedimiento de centrifugación en muestras individuales no lipémicas y lipémicas puede ser fuertemente diferente, tiene sentido medir muestras lipémicas con diferentes contenidos de triglicéridos y diferentes contenidos de analito y muestra no lipémicas con diferentes contenidos de analito.

25 Descripción de las figuras

FIG. 1

Determinación de la interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación de APTT;

FIG. 2

Determinación de la interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación de proteína C.

30 Los siguientes ejemplos de realización sirven para ilustrar el procedimiento de acuerdo con la invención y no se entienden como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: determinación de la interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación de APTT

35 1a) Preparación de acuerdo con la invención de muestra lipémicas de plasma para la determinación de la interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación de APTT con reactivo Dade Actin

40 Se usaron 7 muestras lipémicas nativas de plasma-citrato (contenido de triglicéridos > 150 mg/dL) de 7 donantes. La determinación del contenido de triglicéridos ocurrió usando la prueba TRIG y con el sistema Dimension Vista (Siemens Healthcare, Newark, EEUU). Se sometieron a centrifugación 18 a 20 mL de estas muestras por 1 hora en una ultracentrífuga (Thermo Scientific Sorval WX Ultra, Rotor T-1250, ThermoFisher, Hanau, Alemania) a 33.200 rpm, lo cual corresponde a un número g de 133.000. Se tomó cuidadosamente con ayuda de una pipeta el sobrenadante superior rico en lípidos, evitando una mezcla con la fase empobrecida en lípidos ubicada abajo. Dependiendo de la muestra, se mezclaron entre 0,7 y 3,0 mL de este sobrenadante rico en lípidos con una cantidad parcial no centrifugada de la muestra nativa de plasma-citrato del mismo donante y parcialmente con un plasma no lipémico carente de factor (contenido de triglicéridos típicamente aproximadamente 100 mg/dL). El volumen total de las muestras lipémicas preparadas de esta forma era de aproximadamente 12 mL. Se midió una vez más el contenido de triglicéridos de las muestras así preparadas y estuvo entre 234 mg/dL y 1007 mg/dL.

50 La tabla 1 contiene la concentración final de triglicéridos de las muestras lipémicas Nr. L3-L9 preparadas de acuerdo con la invención y otras tres muestras lipémicas nativas (muestra Nr. L1, L2 y L10) así como la relación de mezcla de las cantidades de (muestra de plasma no tratado, no centrifugado) nativo del donante, sobrenadante que tiene lípidos, plasma carente y una solución de heparina. La mezcla con plasma carente o solución de heparina

ES 2 720 779 T3

ocurrió para ampliar el intervalo de medición de APTT.

La tabla 2 contiene la composición y la concentración final de las muestras Nr. NL1-NL12 no lipémicas, que fueron usadas así mismo en el estudio de interferencia.

Tabla 1: Composición de las muestras lipémicas

Nr. De muestra	Composición						Concentración final de triglicéridos
	Cantidad de muestra nativa	Sobrenadante que tiene lípidos	Plasma con una carencia de			Solución de heparina	
			FV	FVII	PC		
	mL	mL	mL	mL	mL	mL	mg/dL
L1	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	237,5
L2	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	399,5
L3	11,1	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	731,0
L4	3,0	3,0	0,0	6,0	0,0	0,0	316,5
L5	3,0	2,5	0,0	0,0	8,0	0,0	481,5
L6	6,5	0,7	0,0	5,0	0,0	0,0	1.006,6
L7	3,5	1,2	7,5	0,0	0,0	0,0	233,5
L8	4,0	2,0	6,0	0,0	0,0	0,0	405,5
L9	4,5	1,6	6,0	0,0	0,0	0,0	432,5
L10	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	215,5

5

Tabla 2: Composición de las muestras no lipémicas

Nr. de muestra	Composición						Concentración final de triglicéridos
	Cantidad de muestra nativa	Sobrenadante que tiene lípidos	Plasma con una carencia de			Solución de heparina	
			FV	FVII	PC		
	mL	mL	mL	mL	mL	mL	mg/dL
NL1	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,0	148,0
NL2	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,0	120,5

ES 2 720 779 T3

Nr. de muestra	Composición						Concentración final de triglicéridos
	Cantidad de muestra nativa	Sobrenadante que tiene lípidos	Plasma con una carencia de			Solución de heparina	
			FV	FVII	PC		
	mL	mL	mL	mL	mL	mL	mg/dL
NL3	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,0	73,5
NL4	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,0	52,6
NL5	6,0	---	6,0	0,0	0,0	0,0	143,5
NL6	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,0	83,0
NL7	1,2	---	0,0	10,8	0,0	0,0	100,0
NL8	3,0	---	0,0	9,0	0,0	0,0	99,5
NL9	7,0	---	5,0	0,0	0,0	0,0	62,5
NL10	6,0	---	6,0	0,0	0,0	0,0	105,5
NL11	6,6	---	5,4	0,0	0,0	0,0	107,0
NL12	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,2	92,2
NL13	11,5	---	0,0	0,0	0,0	0,6	53,8
NL14	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,7	73,8

1b) Determinación de la interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación de APTT con reactivo Dade Actin

5 En el tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT) se mezcla una muestra de plasma con reactivos, que contienen fosfolípidos y un activador superficial (reactivo Dade Actin, Siemens Healthcare, Marburg, Alemania). Después de un tiempo de incubación, mediante la adición de CaCl₂ se desencadena la coagulación. En el ejemplo descrito aquí se procesó automáticamente el APTT del aparato de análisis Sysmex CS-5100 (Siemens Healthcare, Marburg, Alemania). La reacción de coagulación es medida por vía fotométrica como aumento de la extinción. El tiempo hasta un determinado aumento de la extinción es el tiempo de coagulación en segundos, que representa el resultado de la prueba APTT.

10 De todas las muestras preparadas bajo 1a) se usó una cantidad parcial para la medición del APTT (resultado 1 de prueba). Una segunda cantidad parcial de cada una de las muestras preparadas bajo 1a) fue centrifugada durante 1 hora a 133.000xg y la fase empobrecida en lípidos fue usada como muestra para la medición de APTT (resultado 2 de prueba). En tanto la centrifugación no haya tenido ninguna influencia, la fase empobrecida en lípidos de la alícuota centrifugada debería contener la misma cantidad de analito que la muestra no centrifugada. Se compararon mutuamente los dos resultados de prueba (tiempos de coagulación, en segundos) de cada muestra, y se formó la diferencia relativa en % ($100 \times \text{resultado 1 de prueba} - \text{resultado 2 de prueba} / \text{resultado 2 de prueba}$).

20 A partir de las diferencias relativas de los resultados de prueba para las muestras no lipémicas, se calculó el promedio del valor (aquí: 0,6). Puesto que las muestras no lipémicas no exhiben ninguna interferencia por lipemia, el promedio de diferencia es atribuido a un factor de influencia no específico del procedimiento (por ejemplo la

centrifugación). Para la corrección de este efecto se determinó para cada muestra una diferencia corregida, en lo cual este valor medio fue sustraído de la diferencia relativa. La diferencia corregida es una medida para la interferencia causada por los lípidos.

5 La Tabla 3 exhibe para cada muestra los resultados de las pruebas 1 y 2, la diferencia relativa determinada y la diferencia corregida. Los valores de diferencia son valores redondeados.

Tabla 3: resultados de prueba de APTT y desviaciones

No. de muestra		Concentración de triglicéridos	Cantidad parcial de la muestra no centrifugada	Fase empobrecida en lípidos de una cantidad parcial de la muestra centrifugada	Diferencia relativa	Diferencia corregida
			1er resultado de prueba	2do resultado de prueba		
		mg/dL	APTT [s]	APTT [s]	%	%
NL1	No lipémica	148,0	26,4	26,2	0,6	-0,0
NL2		120,5	27,8	26,6	4,5	3,9
NL3		73,5	28,5	27,1	5,2	4,6
NL4		52,6	23,0	23,1	-0,2	-0,8
NL5		143,5	34,6	34,5	0,3	-0,3
NL6		83,0	32,7	31,4	4,3	3,7
NL7		100,0	30,1	31,0	-2,9	-3,5
NL8		99,5	28,4	29,9	-5,0	-5,6
NL9		62,5	39,8	40,8	-2,3	-2,9
NL10		105,5	38,2	38,8	-1,5	-2,1
NL11		107,0	37,6	38,1	-1,3	-1,9
NL12		92,2	65,0	61,1	6,5	5,9
NL13		53,8	115,8	115,5	0,3	-0,3
NL14		73,8	100,1	100,3	-0,2	-0,8
				Valor medio:	0,6	
		mg/dL	APTT [s]	APTT [s]	%	%
L1	Lipémica	237,5	27,1	26,7	1,5	0,9
L2		399,5	22,8	22,8	0,0	-0,6
L3		731,0	22,2	20,7	7,5	6,9
L4		316,5	28,7	29,4	-2,2	-2,8
L5		481,5	30,6	29,0	5,5	4,9
L6		1.006,6	25,2	23,8	6,1	5,5
L7		233,5	42,0	42,1	-0,2	-0,8
L8		405,5	36,2	36,3	-0,3	-0,9
L9		432,5	40,7	40,0	1,6	1,0
L10		215,5	68,9	70,6	-2,5	-3,1

10 La diferencia corregida, por consiguiente la desviación de los resultados de prueba de las muestras no centrifugadas frente a los resultados de prueba de las muestras centrifugadas (disminuido en el valor promedio de la diferencia de las muestras no lipémicas) fue graficado contra la concentración de triglicéridos de las muestras no centrifugadas (figura 1, línea 1). Se aplicó un procedimiento de ajuste polinómico y se calculó el intervalo de confianza correspondiente (figura 1, línea 2). El punto de corte del límite del intervalo de confianza con el criterio de 10 % de desviación relativa denota la concentración de triglicéridos desde la cual se espera una interferencia de 15 lípidos en el procedimiento de prueba de APTT probado (676,5 mg/dL).

Ejemplo 2: determinación de la interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación de proteína C

2a) Preparación de acuerdo con la invención de muestras lipémicas de plasma, para la determinación de la interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación de proteína C con la prueba de proteína Berichrom

- 5 Se usaron 12 muestras nativas lipémicas de plasma-citrato (contenido de triglicéridos > 150 mg/dL) de 12 donantes, y se procedió como se describe bajo 1a). Se midió una vez más el contenido de triglicéridos de las muestras así preparadas y estuvo entre 199 mg/dL y 1007 mg/dL.

10 La Tabla 4 contiene la concentración final de triglicéridos de las muestras Nr. L1-L12 lipémicas preparadas de acuerdo con la invención, así como de otra muestra lipémica nativa (Nr. de muestra L13) así como la relación de mezcla de las cantidades de (muestra de plasma no tratado, no centrifugado) nativo del donante, sobrenadante que tiene lípidos, plasma carente y una solución de heparina. La mezcla con el plasma carente ocurrió para ampliar el intervalo de medición de la proteína C.

La Tabla 5 contiene la composición y la concentración final de triglicéridos de las muestras Nr. NL1-NL12 no lipémicas, que fueron usadas así mismo en el estudio de interferencia.

15 Tabla 4: Composición de las muestras lipémicas

Nr. de muestra	Composición						Concentración final de triglicéridos
	Cantidad de muestra nativa	Sobrenadante que tiene lípidos	Plasma con una carencia de			Solución de heparina	
			FV	FVII	PC		
mL	mL	mL	mL	mL	mL	mg/dL	
L1	3,0	3,0	0,0	0,0	6,0	0,0	330,5
L2	3,7	2,1	0,0	0,0	5,7	0,0	351,0
L3	3,0	2,5	0,0	0,0	8,0	0,0	481,5
L4	2,8	1,7	0,0	0,0	7,5	0,0	566,5
L5	3,5	1,2	7,5	0,0	0,0	0,0	233,5
L6	5,5	2,3	0,0	0,0	3,8	0,0	545,5
L7	6,3	1,2	0,0	0,0	4,5	0,0	967,5
L8	4,3	0,9	6,8	0,0	0,0	0,0	199,0
L9	3,0	2,7	0,0	6,3	0,0	0,0	369,5
L10	4,5	1,6	6,0	0,0	0,0	0,0	432,5
L11	11,1	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	731,0
L12	6,5	0,7	0,0	5,0	0,0	0,0	1.006,6
L13	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	237,5

Tabla 5: Composición de las muestras no lipémicas

Nr. de muestra	Composición						Concentración final de triglicéridos
	Cantidad de muestra nativa	Sobrenadante que tiene lípidos	Plasma con una carencia de			Solución de heparina	
			FV	FVII	PC		
	mL	mL	mL	mL	mL	mL	mg/dL
NL1	3,0	---	0,0	0,0	9,0	0,0	91,0
NL2	4,0	---	0,0	0,0	8,0	0,0	95,5
NL3	4,0	---	0,0	0,0	8,0	0,0	103,0
NL4	4,0	---	0,0	0,0	8,0	0,0	87,5
NL5	7,0	---	5,0	0,0	0,0	0,0	62,5
NL6	11,5	---	0,0	0,0	0,0	0,6	53,8
NL7	6,0	---	0,0	0,0	6,0	0,0	88,0
NL8	7,0	---	0,0	0,0	5,0	0,0	92,0
NL9	6,0	---	6,0	0,0	0,0	0,0	105,5
NL10	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,0	83,0
NL11	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,0	120,5
NL12	12,0	---	0,0	0,0	0,0	0,0	73,5

2b) Determinación de la interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación de proteína C con la prueba de proteína C Berichrom

- 5 En la carga de prueba se incubó una muestra de plasma con un activador de veneno de serpiente, mediante lo cual se activa la proteína C. Además se añade un sustrato cromogénico de péptido, el cual es escindido por la proteína C activada. Mediante esta reacción se alcanza un incremento en la extinción, el cual es medido a 405 nm. El aumento de la extinción es convertido mediante una curva de calibración al resultado de proteína C (% del estándar). En los ejemplos aquí escritos se procesó de manera automática la prueba de proteína C en el aparato de análisis Sysmex CS-5100 (Siemens Healthcare, Marburg, Alemania).

10 De todas las muestras preparadas bajo 2a) se usó una cantidad parcial para la medición de la proteína C (resultado 1 de prueba). Una segunda cantidad parcial de cada una de las muestras preparadas bajo 2a) fue centrifugada durante 1 hora a 133.000xg y la fase empobrecida en lípidos fue usada como muestra para la medición de proteína C (resultado 2 de prueba). En tanto la centrifugación no haya tenido ninguna influencia, la fase empobrecida en lípidos de la alícuota centrifugada debería contener la misma cantidad de analito que la muestra no centrifugada. Se compararon mutuamente los dos resultados de prueba (% del estándar) de cada muestra, y se formó la diferencia relativa en % ($100 \times \text{resultado 1 de prueba} - \text{resultado 2 de prueba} / \text{resultado 2 de prueba}$).

15 A partir de las diferencias relativas de los resultados de prueba para las muestras no lipémicas, se calculó el promedio del valor (aquí: -2,4). Puesto que las muestras no lipémicas no exhiben ninguna interferencia por lipemia,

este promedio de diferencia es atribuido a un factor de influencia no específico del procedimiento (por ejemplo la centrifugación). Para la corrección de este efecto se determinó para cada muestra una diferencia corregida, en lo cual este valor medio fue sustraído de la diferencia relativa. La diferencia corregida es una medida para la interferencia causada por los lípidos.

- 5 La tabla 6 exhibe para cada muestra el resultado de las pruebas 1 y 2, la diferencia relativa determinada y la diferencia corregida. Los valores de diferencia son valores redondeados.

Tabla 6: Resultados de prueba de proteína C y desviaciones

No. de muestra		Concentración de triglicéridos	Cantidad parcial de la muestra no centrifugada	Fase empobrecida en lípidos de una cantidad parcial de la muestra centrifugada	Diferencia relativa	Diferencia corregida
			1er resultado de prueba	2do resultado de prueba		
		mg/dL	PC [% del estándar]	PC [% del estándar]	%	%
NL1		91,0	28,7	29,3	-2,0	0,3
NL2	No lipémica	95,5	30,4	31,1	-2,3	0,1
NL3		103,0	40,8	42,7	-4,4	-2,1
NL4		87,5	30,6	31,3	-2,2	0,1
NL5		62,5	76,3	76,5	-0,3	2,1
NL6		53,8	74,1	73,8	0,4	2,8
NL7		88,0	56,1	62,1	-9,6	-7,2
NL8		92,0	53,5	54,9	-2,6	-0,2
NL9		105,5	91,5	89,2	2,5	4,9
NL10		83,0	96,2	98,3	-2,1	0,2
NL11		120,5	110,4	114,0	-3,2	-0,8
NL12		73,5	113,9	116,7	-2,4	-0,1
					Valor medio:	-2,4
		mg/dL	PC [% del estándar]	PC [% del estándar]	%	%
L1	Lipémica	330,5	48,7	50,9	-4,2	-1,9
L2		351,0	44,7	46,4	-3,7	-1,3
L3		481,5	50,4	52,1	-3,3	-0,9
L4		566,5	39,5	43,1	-8,4	-6,0
L5		233,5	81,3	85,3	-4,7	-2,3
L6		545,5	96,7	99,3	-2,6	-0,2
L7		967,5	62,7	75,4	-16,8	-14,4
L8		199,0	83,5	85,7	-2,5	-0,2
L9		369,5	94,1	97,3	-3,2	-0,9
L10		432,5	83,0	87,1	-4,7	-2,3
L11		731,0	100,3	109,9	-8,8	-6,4
L12		1.006,6	97,8	106,5	-8,2	-5,8
L13		237,5	105,5	110,3	-4,4	-2,0

5 La diferencia corregida, por consiguiente la desviación de los resultados de prueba de las muestras no centrifugadas frente a los resultados de prueba de las muestras centrifugadas (disminuido en el valor promedio de la diferencia de las muestras no lipémicas) fue graficado contra la concentración de triglicéridos de las muestras no centrifugadas (figura 2, línea 1). Se aplicó un procedimiento de ajuste polinómico y se calculó el intervalo de confianza correspondiente (figura 2, línea 2). El punto de corte del límite del intervalo de confianza con el criterio de 10 % de desviación relativa denota la concentración de triglicéridos desde la cual se espera una interferencia de lípidos en el procedimiento de prueba de proteína C probado (867,5 mg/dL).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de una muestra lipémica de plasma o de suero, donde el procedimiento comprende las etapas de:
- 5 (a) centrifugación de una primera cantidad parcial de una muestra de plasma o de suero que tiene lípidos, para separar un sobrenadante que tiene lípidos, de una fase empobrecida en lípidos;
- (b) separación del sobrenadante que tiene lípidos y
- (c) mezcla del sobrenadante que tiene lípidos con una segunda cantidad parcial de la misma muestra de plasma o de suero que tiene lípidos.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en (c) de modo alternativo se mezcla el sobrenadante separado que tiene lípidos con una cantidad parcial de la fase empobrecida en lípidos.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en el que en la etapa (a) las muestras de plasma o de suero que tienen lípidos son centrifugadas durante por lo menos 10 minutos a por lo menos 2000xg.
- 15 4. Uso de una muestra lipémica de plasma o de suero preparada con un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en un procedimiento para el establecimiento de una interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación cuantitativa de la cantidad o de la actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero.
5. Procedimiento para el establecimiento de una interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación cuantitativa de la cantidad o de la actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero, donde el procedimiento para el establecimiento de una interferencia de lípidos comprende las etapas de:
- 20 (a) preparación de una primera carga de prueba mediante mezcla de por lo menos un reactivo de detección específico para el analito, con una muestra de plasma o de suero no lipémica con una concentración o actividad de analito, y medición de un primer resultado de prueba;
- (b) preparación de una segunda carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico para el analito con una muestra de plasma o de suero lipémica de la misma concentración o actividad de analito, y medición de un segundo resultado de prueba;
- 25 (c) establecimiento de una diferencia entre el primero y el segundo resultado de la prueba; y
- (d) establecimiento de una interferencia de lípidos, cuando la diferencia entre el primero y el segundo resultado de prueba supera un límite de tolerancia determinado previamente;
- 30 caracterizado porque la muestra lipémica de plasma o de suero es preparada con un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la muestra no lipémica de plasma o de suero es preparada con un procedimiento que comprende la siguiente etapa:
- (a) centrifugación de una muestra de plasma o de suero que tiene lípidos y aislamiento de la fase empobrecida en lípidos, del sobrenadante que tiene lípidos.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 y 6, en el que la muestra lipémica de plasma o de suero y la muestra no lipémica de plasma o de suero son preparadas a partir de la misma muestra de plasma o de suero que tienen lípidos, como material de partida.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la muestra no lipémica y la muestra lipémica de plasma o de suero exhiben en cada caso una concentración o actividad de analito reducida o aumentada respecto al estándar.
- 40 9. Procedimiento para el establecimiento de una interferencia de lípidos en un procedimiento para la determinación cuantitativa de la cantidad o la actividad de un analito en una muestra de plasma o de suero, donde el procedimiento para la determinación de una interferencia de lípidos comprende las etapas de:
- 45 (a) preparación de una primera carga de prueba mediante mezcla de por lo menos un reactivo de detección específico para el analito, con una primera cantidad parcial de una muestra no lipémica de plasma o de suero y medición de un primer resultado de prueba;
- (b) preparación de una segunda carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de

ES 2 720 779 T3

detección específico del analito, con la fase empobrecida en lípidos de una segunda cantidad parcial de la misma muestra no lipémica de plasma o de suero, que previamente había sido centrifugada durante por lo menos 10 minutos a por lo menos 2000g, y medición de un segundo resultado de prueba; y

(c) establecimiento de una primera diferencia entre el primero y el segundo resultado de prueba; y

5 (d) preparación de una tercera carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico del analito con una primera cantidad parcial de una muestra lipémica de plasma o de suero y medición de un tercer resultado de prueba;

10 (e) preparación de una cuarta carga de prueba mediante mezcla del mismo por lo menos un reactivo de detección específico del analito con la fase empobrecida en lípidos de una segunda cantidad parcial de la misma muestra lipémica de plasma o de suero, que había sido centrifugada previamente durante por lo menos 10 minutos a por lo menos 2000g, y medición de un cuarto resultado de prueba; y

(f) establecimiento de una segunda diferencia entre el tercero y cuarto resultados de prueba; y

(g) establecimiento de una interferencia de lípidos, cuando la desviación entre la primera y la segunda diferencia supera un límite de tolerancia determinado previamente,

15 caracterizado porque la muestra lipémica de plasma o de suero es preparada con procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.

FIG 1

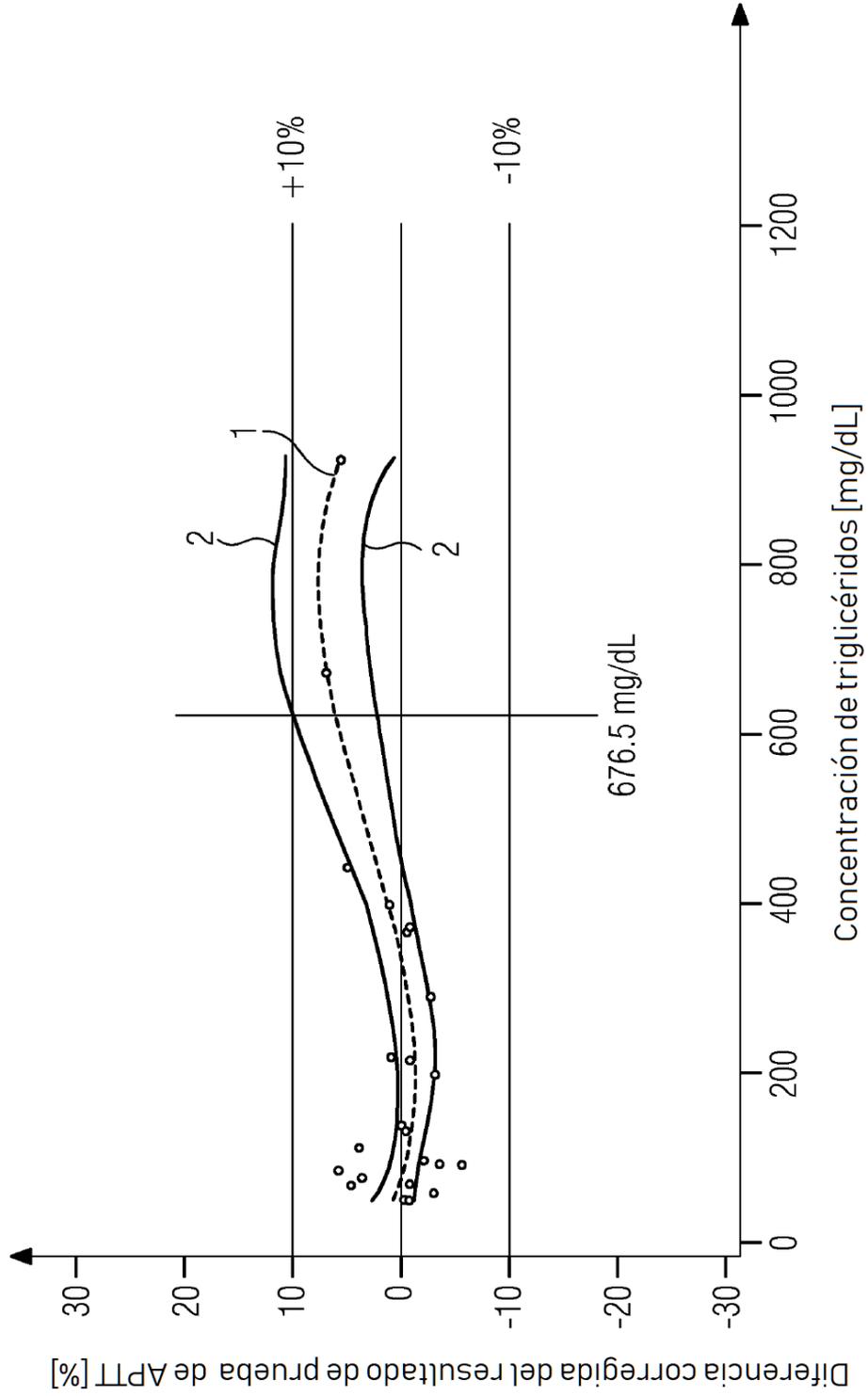


FIG 2

