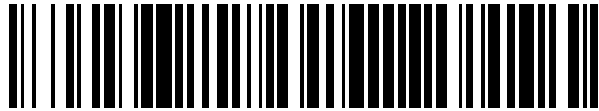


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 157**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/86**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2017 PCT/EP2017/057239**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017 WO17167706**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2017 E 17714685 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3329284**

54 Título: **Procedimiento para la determinación de fibrinógeno**

30 Prioridad:

**31.03.2016 EP 16163255**

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

**13.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GREIS, DIRK y  
ZANDER, NORBERT**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 742 157 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la determinación de fibrinógeno

La presente invención se encuentra dentro del campo del diagnóstico de la coagulación de la sangre y hace referencia a un procedimiento para la determinación de la concentración de fibrinógeno en una muestra de plasma humana, según el método de Clauss.

El fibrinógeno es el precursor soluble en agua de fibrina, el cual forma la matriz para el cierre de las heridas. La proteasa de coagulación trombina (factor IIa) disocia el fibrinógeno, activando de ese modo la formación de fibrina, por tanto la formación de coágulos. Los niveles reducidos de fibrinógeno se asocian a una tendencia a hemorragias. Con frecuencia, niveles de fibrinógeno seriamente aumentados se presentan en el caso de infecciones, postoperatorios y en otras situaciones. Los niveles de fibrinógeno aumentados a largo plazo se consideran como un indicador de riesgo de enfermedades trombóticas.

En el estado del arte se conocen una serie de distintos métodos para determinar la concentración de fibrinógeno.

En la solicitud CA 1062501 se describe un procedimiento de determinación de fibrinógeno que se basa en la medición del tiempo de trombina, donde el tiempo de trombina, de manera conocida, no permite una determinación precisa de la concentración de fibrinógeno, porque junto con el fibrinógeno, otros factores, como por ejemplo anticoagulantes como heparina o inhibidores directos de trombina, o también la presencia de productos de disociación de fibrina o de fibrinógeno, pueden influenciar el tiempo de trombina, y el tiempo de trombina en general sólo reacciona en el caso de estados graves de carencia de fibrinógeno. En un procedimiento de tiempo de trombina, habitualmente una muestra de plasma no diluida se mezcla con una cantidad de trombina relativamente reducida, se mide fotométricamente la formación de fibrina, por tanto, la variación de absorbancia de la carga de reacción, y a continuación se determina el tiempo de coagulación. Según la solicitud CA 1062501, sin embargo, no se determina un tiempo de coagulación, sino que se determina el máximo de la primera derivada de la curva de reacción o, expresado de otro modo, se determina la variación de absorbancia máxima de la curva de reacción. Se ha observado que la variación de absorbancia máxima se correlaciona de forma lineal con la concentración de fibrinógeno, de modo que esto último puede determinarse con la ayuda de una curva de calibración que fue establecida a partir de una asociación de concentraciones de fibrinógeno conocidas y variaciones de absorbancia máximas.

Un procedimiento esencialmente más preciso y empleado con frecuencia para la determinación de la concentración de fibrinógeno es el así llamado método de Clauss (Clauss, A., Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. 1957, Acta haemat. 17: 237-246). La prueba se trata de una variación del tiempo de trombina, en el cual una muestra de plasma se mezcla con trombina y se determina el tiempo de coagulación. En el método de Clauss, en la carga de reacción se combina una concentración de fibrinógeno relativamente reducida con una concentración de trombina estandarizada relativamente elevada, debido a lo cual la velocidad de formación de fibrina se correlaciona prácticamente de forma exclusiva con la concentración de fibrinógeno. La concentración de fibrinógeno relativamente reducida en la carga de reacción se produce habitualmente mediante la utilización de muestras de plasma previamente diluidas.

En la carga de reacción se determina fotométricamente la formación de fibrina, por tanto, la formación de coágulos. Mediante la formación de fibrina, la carga de reacción se oscurece de forma progresiva, de modo que mediante una medición de absorción la formación de fibrina puede medirse de forma cuantitativa.

Habitualmente se determina después el tiempo de coagulación de la muestra. El tiempo de coagulación de la muestra se comporta proporcionalmente con respecto a la cantidad de fibrina. El tiempo de coagulación de una muestra es el tiempo desde el instante de la adición de trombina a la muestra hasta el instante de la medición de una formación de fibrina detectable, por tanto, de un oscurecimiento de la carga de reacción. De este modo, la "formación de fibrina detectable" puede definirse como un valor umbral de prueba y específico del aparato, el cual - cuando es superado - indica el tiempo de coagulación. De manera alternativa, la "formación de fibrina detectable", partiendo de la diferencia de señal antes del inicio y después de la finalización de la reacción de coagulación, puede definirse como un valor de diferencia de señal porcentual, de prueba y específico del aparato, el cual - cuando es alcanzado - indica el tiempo de coagulación. La cinética de la reacción de la formación de fibrina en una prueba de Clauss se diferencia considerablemente de la cinética de reacción de la formación de fibrina en una prueba del tiempo de trombina. En la prueba de Clauss la formación de fibrina, dependiendo de la concentración de fibrinógeno, comienza ya 3 segundos después de la adición del reactivo de trombina, por tanto, esencialmente antes que en la prueba del tiempo de trombina, en la cual la formación de fibrina comienza como muy pronto después de 10 segundos. Además, en la prueba de Clauss, la velocidad de la formación de fibrina, al menos en muestras con una concentración relativamente elevada, es más elevada que en la prueba del tiempo de trombina. Las curvas de reacción para muestras con una concentración de fibrinógeno elevada en la prueba de Clauss, en comparación con la prueba del tiempo de trombina, por lo tanto, se caracterizan por una fase de latencia corta, un incremento

5 pronunciado y una fase de estabilización que se alcanza relativamente rápido. Las curvas de reacción para muestras con concentración de fibrinógeno reducida, en la prueba de Clauss, en comparación con la prueba del tiempo de trombina, muestran igualmente una fase de latencia corta, un incremento leve y una fase de estabilización tardía, de modo que la misma mayormente se presenta sólo después de finalizada la medición. La fase de estabilización en el tiempo de trombina, en cambio, se muestra marcadamente más tenue o incluso no se observa en absoluto.

10 Se considera problemático el hecho de que mediante la dilución relativamente elevada de las muestras de plasma, en la prueba de Clauss sólo pueden alcanzarse intensidades de señal relativamente reducidas, las cuales pueden conducir a resultados de medición imprecisos mediante la distancia de señal - ruido reducida en sistemas ópticos, y ya mediante interferencias mínimas, como por ejemplo burbujas de gas en la carga de reacción, las cuales pueden producirse debido a la utilización de reactivos refrigerados.

Para evitar esos problemas, en el estado del arte se utilizan reactivos no refrigerados, y/o se agrega caolín como reactivo adicional que intensifica la señal.

15 La utilización de reactivos no refrigerados presenta la desventaja de que los reactivos presentan una estabilidad reducida y deben consumirse lo más rápido posible. Además, en los aparatos de análisis modernos con frecuencia se proporcionan exclusivamente posiciones de almacenamiento refrigeradas para contenedores de reactivos, de modo que no es posible en absoluto proporcionar un reactivo no refrigerado. La utilización de reactivos adicionales que intensifican la señal tampoco es deseable, por una parte por razones económicas y, por otra parte porque mediante el paso de pipeteado requerido de forma adicional se prolonga la realización de la prueba. Además, el coágulo que se forma, especialmente en el caso de niveles de plasma reducidos de fibrinógenos, puede aglomerarse y flotar alrededor como "burbuja de fibrina - caolín" en la carga de reacción.

20 Además es problemático el hecho de que en la determinación del tiempo de coagulación de una muestra en la prueba de Clauss, de modo ideal, debe comenzarse con la medición inmediatamente después de la adición de la trombina a la muestra. En la práctica, sin embargo, en la realización automatizada en aparatos de análisis, transcurre un período corto (varios segundos) entre la adición del reactivo de trombina en el recipiente de reacción y la colocación del recipiente de reacción en la posición de medición. En el caso de niveles de plasma muy elevados de fibrinógeno, sin embargo, durante ese breve período ya puede producirse un inicio de la reacción y, con ello, un incremento de la señal. En ese caso es difícil una determinación clásica del tiempo de coagulación, ya que para la "formación de fibrina detectable", tanto mediante un valor umbral de prueba y específico del aparato, o alternativamente mediante la diferencia de señal porcentual, referido al inicio y a la finalización de la reacción de coagulación, debe ser conocido el valor inicial.

Por lo tanto, el objeto que constituye la base de la invención consiste en modificar el método de Clauss para la determinación de la concentración de fibrinógeno en una muestra de plasma humana, de manera que una ejecución automática pueda realizarse con una precisión elevada, y de manera que pueda prescindirse de la utilización de reactivos no refrigerados y de la utilización adicional de reactivos que intensifican la señal, como por ejemplo caolín.

35 El objeto se soluciona debido a que ya no se determina el tiempo de coagulación de la muestra, habitual hasta el momento, sino que se mide la cinética de reacción de la formación de fibrina y la velocidad de reacción se utiliza para determinar la concentración de fibrinógeno.

El objeto de la presente solicitud consiste por lo tanto en un procedimiento para determinar la concentración de fibrinógeno en una muestra de plasma según el método de Clauss, el procedimiento comprende los pasos:

- 40
- puesta a disposición de una carga de reacción que contiene la muestra de plasma y trombina,
  - medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción a lo largo del tiempo,
  - establecimiento de una curva de reacción a partir de los valores de absorbancia medidos, a lo largo del tiempo,
  - determinación de la variación máxima de absorbancia mediante un procedimiento de regresión y
- 45
- determinación de la concentración de fibrinógeno con la ayuda de una curva de calibración que fue establecida a partir de una asociación de concentraciones de fibrinógeno conocidas y variaciones máximas de absorbancia.

50 La relación de la mezcla, de la muestra de plasma y las unidades de trombina, para la puesta a disposición de una carga de reacción según el método de Clauss, es decir, la combinación de una concentración de fibrinógeno relativamente reducida (desde la muestra) con una concentración de trombina relativamente elevada, de modo que

la velocidad de la formación de fibrina se correlaciona prácticamente de forma exclusiva con la concentración de fibrinógeno, es suficientemente conocida por el experto (véase también Thomas, L., Labor und Diagnose, Edición 7, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 2008, capítulo 16.15.2).

5 Preferentemente, la carga de reacción contiene aproximadamente de 0,03 a 0,4 mg/mL de fibrinógeno y aproximadamente de 25 a 40 IU/mL de trombina. Esas concentraciones, por ejemplo, pueden obtenerse de manera que se mezclan una dilución de aproximadamente 1:10 de una muestra de plasma que debe analizarse, en un tampón, y un reactivo de trombina tamponado, con una concentración de aproximadamente 100 IU/mL de trombina, en una relación de 2+1. De este modo pueden determinarse concentraciones de fibrinógeno de unos 0,5 g/L a 6,0 g/L. Mediante la variación de la dilución previa de la muestra puede medirse todo el rango de fibrinógeno que se encuentra presente fisiológicamente en el plasma humano.

15 a medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción a lo largo del tiempo puede tener lugar de manera fotométrica, es decir, mediante la medición de la atenuación de la luz, de un haz de luz emitido por la carga de reacción, o de forma nefelométrica, es decir, mediante la medición de partes de luz dispersa, de un haz de luz emitido por la carga de reacción. En un caso ideal la medición comienza inmediatamente después de la adición de la trombina a la muestra, y la medición de los valores de absorbancia se realiza de forma continua hasta la finalización de la formación de fibrina. En la práctica, sin embargo, en la realización automatizada en aparatos de análisis, transcurre un período corto (varios segundos) entre la adición del reactivo de trombina en el recipiente de reacción, con un mezclado subsiguiente, y la colocación del recipiente de reacción en la posición de medición.

20 Se ha observado que el procedimiento según la invención es adecuado en particular para protocolos de prueba en los cuales no es posible una medición inmediata de los valores de absorbancia, por ejemplo porque la carga de reacción primero debe transportarse a la estación de medición. En una forma de ejecución específica, en la cual la puesta a disposición de una carga de reacción comprende la adición de trombina a la muestra de plasma, entre el instante de la adición de trombina a la muestra de plasma y el inicio de la medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción existe un período de 0,5 a 5 segundos, preferentemente de 3 a 4 segundos.

25 El procedimiento de regresión aplicado para determinar la variación de absorbancia máxima es un método de evaluación cinético que es conocido por el experto y en el cual, en función de un aumento determinado de forma no precisa, en un primer paso de evaluación, de la curva de reacción, en un segundo paso de evaluación se determina un intervalo de regresión individual y optimizado para el cálculo de la velocidad de reacción máxima, por tanto, de la variación de absorbancia máxima.

30 Preferentemente, el procedimiento de regresión comprende los siguientes pasos:

- un primer paso, en el cual, con un primer intervalo de regresión previamente fijado, se determina una primera variación de absorbancia máxima provisoria en la curva de reacción,
- un segundo paso, en el cual, mediante la primera variación de absorbancia máxima provisoria determinada y mediante parámetros previamente fijados, se determina un segundo intervalo de regresión, y
- 35 • un tercer paso, en el cual, con el segundo intervalo de regresión, se determina la variación de absorbancia máxima.

40 Preferentemente, de este modo, en primer lugar, dentro de un rango de evaluación definido por la prueba y específico del aparato, comenzando a partir del primer valor de medición (el cual se encuentra lo más cerca posible del instante de la adición de trombina), mediante un intervalo de regresión de prueba y específico del aparato, se calcula el aumento (= velocidad de reacción, así como variación de absorbancia) por regresión, según el método de los mínimos cuadrados. Ese cálculo se repite varias veces, utilizando el segundo, el tercer, el cuarto valor de medición, etc., como punto inicial del intervalo de medición.

45 El aumento máximo provisorio determinado (aumento no preciso) se utiliza para calcular el intervalo de regresión definitivo mediante una función de potencia, con parámetros determinados previamente de forma empírica, previamente determinados, factor y exponente. Mediante un exponente negativo se alcanza el efecto deseado, que implica que con un aumento creciente se acorta el intervalo de regresión. En principio, el cálculo del intervalo de regresión definitivo, sin embargo, puede tener lugar también mediante otra ecuación o puede extraerse de una tabla almacenada en el software.

50 Con el intervalo de regresión definitivo calculado se realiza la determinación del aumento máximo definitivo, del modo antes descrito, comenzando nuevamente desde el primer valor de medición, por regresión, según el método de los mínimos cuadrados. Ese cálculo se repite varias veces, utilizando el segundo, el tercer, el cuarto valor de medición, etc., como punto inicial del intervalo de medición.

5 Se ha observado que con la aplicación de ese procedimiento de regresión de dos etapas, para determinar el aumento máximo de una cinética de reacción de la prueba de Clauss, la concentración de fibrinógeno puede determinarse de forma precisa tanto en muestras con concentración de fibrinógeno elevada, como también reducida, aun cuando se encuentren presentes interferencias en la cinemática de reacción, como por ejemplo burbujas de gas en la carga de reacción, las cuales se superponen a la señal de medición propiamente dicha y, con ello, contienen un aumento máximo "falso".

La determinación de la concentración de fibrinógeno de la muestra tiene lugar ahora con la ayuda de una curva de calibración que fue establecida a partir de una asociación de concentraciones de fibrinógeno conocidas y de un aumento máximo (= variación de absorbancia máxima).

10 Otro objeto de la presente invención consiste en un aparato de análisis automático con al menos un dispositivo de pipeteado, una estación de medición fotométrica o nefelométrica y una unidad de procesamiento de datos, caracterizado porque el aparato de análisis comprende además un dispositivo de control que está configurado de manera que el mismo controla un procedimiento para determinar la concentración de fibrinógeno según el método de Clauss, con los siguientes pasos:

- 15
- puesta a disposición de una carga de reacción que contiene una muestra de plasma y trombina,
  - medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción a lo largo del tiempo,
  - establecimiento de una curva de reacción a partir de los valores de absorbancia medidos, a lo largo del tiempo,
  - determinación de la variación máxima de absorbancia mediante un procedimiento de regresión y
- 20
- determinación de la concentración de fibrinógeno con la ayuda de una curva de calibración que fue establecida a partir de una asociación de concentraciones de fibrinógeno conocidas y variaciones máximas de absorbancia.

25 Los aparatos de análisis automáticos de esa clase se utilizan regularmente en el área de análisis, de la medicina forense y del diagnóstico clínico, para analizar una pluralidad de muestras en una pluralidad de métodos de ensayo, de forma rápida, exacta y reproducible.

30 Un aparato de análisis según la invención con un dispositivo de control que está configurado de modo que el mismo controla la realización de una prueba de Clauss en combinación con la evaluación cinética antes descrita, ofrece la ventaja de que el mismo posibilita la realización de una determinación de fibrinógeno precisa, donde para los reactivos que se utilizan para la puesta a disposición de la carga de reacción, en particular para el reactivo de trombina, no deben proporcionarse posiciones de almacenamiento no refrigeradas.

La puesta a disposición de una carga de reacción que contiene la muestra de plasma y trombina en el aparato de análisis automático se realiza generalmente con la ayuda de uno o de varios dispositivos de pipeteado automáticos.

La medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción a lo largo del tiempo habitualmente tiene lugar en la estación de medición fotométrica o nefelométrica.

35 Como una "estación de medición fotométrica" se entiende una unidad de medición que presenta al menos una fuente de luz y al menos un detector de luz, y la cual está diseñada de manera que la misma posibilita la medición de la absorbancia de luz de una longitud de onda determinada en una muestra. Habitualmente, la longitud de onda de la luz emitida por la fuente de luz está seleccionada de manera que la misma es atenuada por una sustancia que debe detectarse en la muestra (es absorbida, reflejada o dispersada).

40 Como una "estación de medición nefelométrica" se entiende una unidad de medición que presenta al menos una fuente de luz y al menos un detector de luz, y la cual está diseñada de manera que la misma posibilita la medición de la absorbancia de luz en una muestra. Habitualmente, la disposición de la fuente de luz y el detector de luz está seleccionada de manera que puede medirse la luz dispersa, que se dispersa por macromoléculas que deben detectarse en la muestra, por ejemplo por agregados de partículas que se producen debido a una reacción que depende del analito, en una carga de reacción, o en este caso que se dispersa desde la fibrina.

45

Para la determinación de la concentración de fibrinógeno con la ayuda de una curva de calibración, la asociación correspondiente de concentraciones conocidas de fibrinógeno y variaciones de absorbancia máximas, se encuentra almacenada, preferentemente en la unidad de procesamiento de datos. En la unidad de procesamiento de datos tiene lugar también después la determinación de la concentración de fibrinógeno mediante la lectura de la

concentración de fibrinógeno correspondiente a la variación de absorbancia máxima determinada de la carga de reacción.

5 Una forma de ejecución de un aparato de análisis automático según la invención comprende además una primera posición de recepción para recipientes de reacción, la cual está proporcionada para poner a disposición cargas de reacción, y una segunda posición de recepción para recipientes de reacción, la cual está asociada a la estación de medición, y un dispositivo para el transporte de un recipiente de reacción desde la primera hacia la segunda posición de recepción, donde el dispositivo de control, además, está configurado de manera que el mismo controla además los siguientes pasos:

- 10
- en la primera posición de recepción para recipientes de reacción, puesta a disposición de un recipiente de reacción que contiene la carga de reacción, mediante la adición de trombina a una muestra de plasma que se encuentra en el recipiente de reacción,
  - transporte del recipiente de reacción desde la primera hacia la segunda posición de recepción, y después
  - medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción a lo largo del tiempo,

15 donde entre el instante de la adición de trombina a la muestra de plasma y el inicio de la medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción existe un período de tiempo de 0,5 a 5 segundos, preferentemente de 3 a 4 segundos.

De manera preferente, el recipiente de reacción se trata de una cubeta transparente, en forma de tubo pequeño, de plástico o de vidrio.

20 Como una "posición de recepción" para un recipiente de reacción se considera un lugar que está proporcionado para posicionar un recipiente de reacción. De este modo, se trata con frecuencia de un dispositivo de recepción adecuado en cuanto a la construcción, el cual posibilita un almacenamiento estable del contenedor de líquido, como por ejemplo manguitos, en los cuales puede introducirse de forma positiva un recipiente de reacción diseñado de forma específica. Una posición de recepción se encuentra con frecuencia en dispositivos de recepción móviles, como por ejemplo platos o anillos de cubetas giratorios que presentan una pluralidad de posiciones de recepción. Las

25 posiciones de recepción que están asociadas a una estación de medición están diseñadas y dispuestas de manera que en las mismas es posible la medición de una carga de reacción que se encuentra en un recipiente de reacción.

30 Para el transporte de recipientes de reacción entre dos posiciones de recepción que se encuentran en dispositivos de recepción separados espacialmente, por ejemplo entre una primera posición de recepción en la cual se tiene acceso a un dispositivo de pipeteado y en la cual pueden ponerse a disposición e incubarse cargas de reacción, y una segunda posición de recepción en la cual tiene lugar la medición de la carga de reacción, con frecuencia están proporcionados elementos de sujeción que están fijados en un brazo de transferencia que puede desplazarse de forma horizontal y de forma vertical.

A continuación, la invención se explica mediante un dibujo.

Las figuras muestran:

35 Figura 1: un aparato de análisis automático según la invención;

Figura 2: una cinética de reacción de una muestra de plasma con concentración de fibrinógeno elevada en el método de fibrinógeno según Clauss;

Figura 3: una cinética de reacción de una muestra de plasma con concentración de fibrinógeno reducida en el método de fibrinógeno según Clauss;

40 Figura 4: una curva de calibración según la invención para el método de fibrinógeno según Clauss;

Figuras 5 y 6: curvas de calibración según el estado del arte, con tiempos de coagulación para el método de fibrinógeno según Clauss.

La figura 1 es una representación esquemática de un aparato de análisis automático 10 con algunos componentes contenidos dentro.

En este caso sólo los componentes más importantes se representan de forma muy simplificada para explicar el funcionamiento básico del aparato de análisis automático 10, sin representar en detalle las partes individuales de cada componente.

5 El aparato de análisis automático 10 está diseñado para realizar de forma totalmente automática los más diversos análisis de sangre o de otros líquidos corporales, sin que para ello se necesiten actividades de un usuario. Las intervenciones necesarias de un usuario se limitan más bien al mantenimiento o reparación y trabajos de rellenado, cuando por ejemplo deben rellenarse las cubetas o cuando los contenedores de líquido deben cambiarse.

10 Las muestras de pacientes se suministran al aparato de análisis automático 10 en recipientes de muestras primarios, sobre carros no representados en detalle, mediante un riel de suministro 20. La información relativa a los análisis que deben realizarse por muestra puede transferirse por ejemplo mediante códigos de barra colocados en los recipientes de muestras, los cuales se leen en el aparato de análisis automático 10. Desde los recipientes de muestras, con la ayuda de un primer dispositivo de pipeteado 21, se extraen alícuotas de muestras mediante una aguja de pipeteado.

15 Las alícuotas de muestras se suministran a cubetas tampoco representadas en detalle, las cuales están dispuestas en posiciones de recepción 22 de un dispositivo de incubación giratorio 23, templado a 37°C. Las cubetas se extraen desde un contenedor de reserva de cubetas 24. En el contenedor de reserva de recipientes de reactivo 25, refrigerado aproximadamente a 8-10 °C, los recipientes de reactivo 26 se almacenan con distintos líquidos reactivos, como por ejemplo con un líquido reactivo de trombina. El líquido reactivo se extrae mediante la aguja de pipeteado de un segundo dispositivo de pipeteado 27, desde un recipiente de reactivo 26, y se descarga para poner a disposición una carga de reacción en una cubeta que ya contiene una alícuota de muestra, por ejemplo una muestra de plasma. La cubeta con la carga de reacción es extraída por el brazo de transferencia 28, con un elemento de sujeción por apriete 29, desde una posición de recepción 22 del dispositivo de incubación 23, y se transfiere a un dispositivo de agitación 31, para el mezclado de la carga de reacción. Después de finalizado el proceso de mezclado, la cubeta se transporta después a una posición de recepción 32 del dispositivo de recepción giratorio 33 para la estación de medición 30 fotométrica, donde se mide la absorbancia de la carga de reacción.

Todo el proceso es controlado por una unidad de control central 40, como por ejemplo por un ordenador conectado mediante una línea de datos, respaldada por una pluralidad de otros circuitos electrónicos no representados en detalle y microprocesadores dentro del aparato de análisis automático 10 y sus componentes.

El siguiente ejemplo debe considerarse para aclarar la invención, pero no como una limitación.

### 30 EJEMPLO

Realización del método de fibrinógeno según Clauss

35 Se produjeron diluciones 1:12,5 de muestras de plasma humanas en el rango de concentración de fibrinógeno de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 5 g/L en tampón Veronal de Owren. 100 µL de esas muestras diluidas se templaron a +37 °C y se añadieron 50 µL de reactivo de trombina templado (aproximadamente 100 IU/mL). Las cargas de reacción se mezclaron y la absorbancia se midió fotométricamente con luz de una longitud de onda de 405 nm durante un período de aproximadamente 80 segundos. La puesta a disposición de las cargas de reacción, así como la medición de la absorbancia, se realizaron en un aparato de análisis automático.

Evaluación según la invención de las cinemáticas de reacción

40 La evaluación de las cinemáticas de reacción, por tanto de los valores de absorbancia medidos a lo largo del tiempo, tuvo lugar según la invención, en donde la variación de absorbancia máxima de una cinemática de reacción se determinó mediante un procedimiento de regresión.

De ese modo se estableció una curva de calibración con muestras de plasma de concentraciones de fibrinógeno conocidas y las respectivas variaciones de absorbancia máximas determinadas según la invención.

45 La figura 2 muestra el curso temporal de los valores de medición de absorbancia (mE), por tanto la cinemática de reacción (1), de una muestra de plasma con una concentración de fibrinógeno elevada (aproximadamente 5 g/L). La reacción, por tanto la formación de fibrina, ya ha comenzado al colocarse el recipiente de reacción en el canal de medición (aproximadamente 3-4 segundos después de la adición del reactivo). En este caso ya no puede realizarse de forma exacta una determinación clásica del tiempo de coagulación mediante el método de diferencia de señal, ya que la señal de inicio no es conocida. Se selecciona en este caso como método la determinación según la invención de la velocidad de reacción máxima mediante un intervalo de regresión adecuado. El intervalo de regresión adecuado en este caso es muy reducido (2 segundos). La recta (2) es la recta de la velocidad de reacción máxima (variación de la absorbancia).

5 La figura 3 muestra el curso temporal de los valores de medición de absorbancia (mE), por tanto la cinemática de reacción (1), de una muestra de plasma con una concentración de fibrinógeno reducida (aproximadamente 1 g/L). En este caso la conversión de fibrinógeno en fibrina es muy lenta y parcialmente sin una estabilización final marcada de forma clara. En este caso se selecciona igualmente el método de la determinación de la velocidad de reacción El intervalo de regresión adecuado en este caso es prolongado (9 segundos). La recta (2) es la recta de la velocidad de reacción máxima (variación de la absorbancia).

10 La figura 4 muestra una curva de calibración para la determinación según la invención de la concentración de fibrinógeno. Se analizaron 10 muestras de plasma de concentración de fibrinógeno conocida de entre 0,5 y 6,0 g/L con el procedimiento según la invención y se determinó respectivamente la variación de absorbancia máxima [mE/s]. En todos los intervalos resultó una buena separación entre los puntos de control. Mediante una variación de la dilución de las muestras, por ejemplo como dilución 1:4,2 de muestras con una concentración de fibrinógeno de menos de 1,0 g/L o una dilución 1:25 de muestras con una concentración de fibrinógeno de más de 6,0 g/L, pudo ampliarse de forma correspondiente el rango de concentración de fibrinógeno mensurable.

15 Con el fin de una comparación, en las figuras 5 y 6 se muestran curvas de calibración para los métodos de determinación de fibrinógeno según Clauss, corrientes hasta el momento, con una evaluación del tiempo de coagulación mediante valores umbral (figura 5) o mediante la diferencia de señal en porcentaje (figura 6). En ambos casos, el curso de la curva de calibración ya es plano por encima de aproximadamente 4 g/L, de manera que prácticamente ya no es posible una evaluación conveniente de los valores en bruto. La muestras con una concentración de fibrinógeno de más de 4 g/L, por tanto, ya debieron diluirse en mayor grado y medirse nuevamente. El motivo del elevado aplanamiento, entre otros, reside en la reacción ya iniciada al instante del primer registro del valor de medición.

25 Además, no es posible una evaluación de tiempos de coagulación determinados con el método de valor umbral en el caso de una concentración de 0,5 g/L, ya que la señal no alcanza el umbral mínimo. Una reducción del valor umbral como solución posible implica el riesgo de valoraciones erróneas debido a superposiciones en la curva de reacción (por ejemplo debido a burbujas de aire).

Lista de símbolos de referencia

- 1 Cinemática de reacción
- 2 Recta
- 10 Aparato de análisis
- 30 20 Riel de suministro
- 21 Dispositivo de pipeteado
- 22 Posición de recepción
- 23 Dispositivo de incubación
- 24 Contenedor de reserva de cubetas
- 35 25 Contenedor de reserva de recipientes de reactivo
- 26 Recipiente de reactivo
- 27 Dispositivo de pipeteado
- 28 Brazo de transferencia
- 29 Elemento de sujeción por apriete
- 40 30 Estación de medición
- 31 Dispositivo de agitación
- 32 Posición de recepción



33 Dispositivo de recepción

40 Unidad de control

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la determinación de la concentración de fibrinógeno en una muestra de plasma según el método de Clauss, el procedimiento comprende los pasos:

- puesta a disposición de una carga de reacción que contiene la muestra de plasma y trombina,
- 5 • medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción a lo largo del tiempo,
- establecimiento de una curva de reacción a partir de los valores de absorbancia medidos, a lo largo del tiempo,
- determinación de la variación máxima de absorbancia mediante un procedimiento de regresión y
- 10 • determinación de la concentración de fibrinógeno con la ayuda de una curva de calibración que fue establecida a partir de una asociación de concentraciones de fibrinógeno conocidas y variaciones máximas de absorbancia.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el proceso de regresión comprende los siguientes pasos:

- un primer paso, en el cual, con un primer intervalo de regresión previamente fijado, se determina una primera variación de absorbancia máxima provisoria en la curva de reacción,
- 15 • un segundo paso, en el cual, mediante la primera variación de absorbancia máxima provisoria determinada y mediante parámetros previamente fijados, se determina un segundo intervalo de regresión, y
- un tercer paso, en el cual, con el segundo intervalo de regresión, se determina la variación de absorbancia máxima.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la puesta a disposición de una carga de reacción que contiene la muestra de plasma y trombina comprende la adición de trombina a la muestra de plasma y donde entre el instante de la adición de trombina a la muestra de plasma y el inicio de la medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción existe un período de tiempo de 0,5 a 5 segundos, preferentemente de 3 a 4 segundos.

4. Aparato de análisis automático (10) con al menos un dispositivo de pipeteado (21, 27), una estación de medición fotométrica o nefelométrica (30) y una unidad de procesamiento de datos, caracterizado porque el aparato de análisis (10) comprende además un dispositivo de control que está configurado de manera que el mismo controla un procedimiento para determinar la concentración de fibrinógeno en una muestra de plasma según el método de Clauss, donde el procedimiento comprende los siguientes pasos:

- puesta a disposición de una carga de reacción que contiene la muestra de plasma y trombina,
- medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción a lo largo del tiempo,
- 30 • establecimiento de una curva de reacción a partir de los valores de absorbancia medidos, a lo largo del tiempo,
- determinación de la variación máxima de absorbancia mediante un procedimiento de regresión y
- determinación de la concentración de fibrinógeno con la ayuda de una curva de calibración que fue establecida a partir de una asociación de concentraciones de fibrinógeno conocidas y variaciones máximas de absorbancia.
- 35

5. Aparato de análisis automático (10) según la reivindicación 4, el cual comprende además una primera posición de recepción (22) para recipientes de reacción, la cual está proporcionada para poner a disposición cargas de reacción, y una segunda posición de recepción (32) para recipientes de reacción, la cual está asociada a la estación de medición (30), y un dispositivo (10, 11) para el transporte de un recipiente de reacción desde la primera hacia la segunda posición de recepción, donde el dispositivo de control, además, está configurado de manera que el mismo controla además los siguientes pasos:

40

- en la primera posición de recepción (22), puesta a disposición de un recipiente de reacción que contiene la carga de reacción, mediante la adición de trombina a una muestra de plasma que se encuentra en el recipiente de reacción,
- 5
- transporte del recipiente de reacción desde la primera hacia la segunda posición de recepción (23) y después
  - medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción a lo largo del tiempo en la estación de medición (30),

10 donde entre el instante de la adición de trombina a la muestra de plasma y el inicio de la medición de los valores de absorbancia de la carga de reacción existe un período de tiempo de 0,5 a 5 segundos, preferentemente de 3 a 4 segundos.

FIG 1

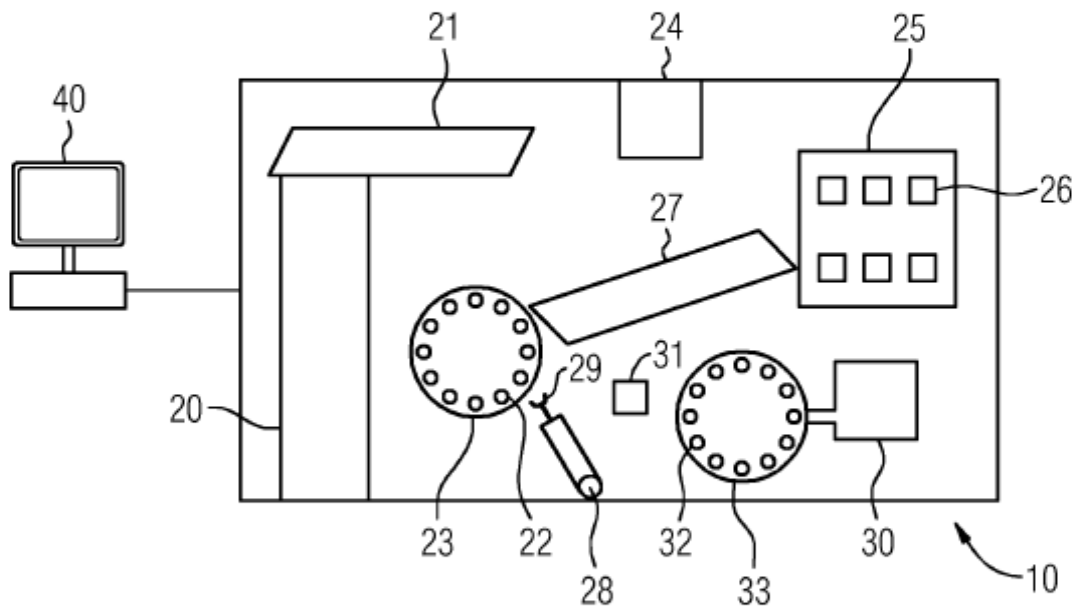


FIG 2

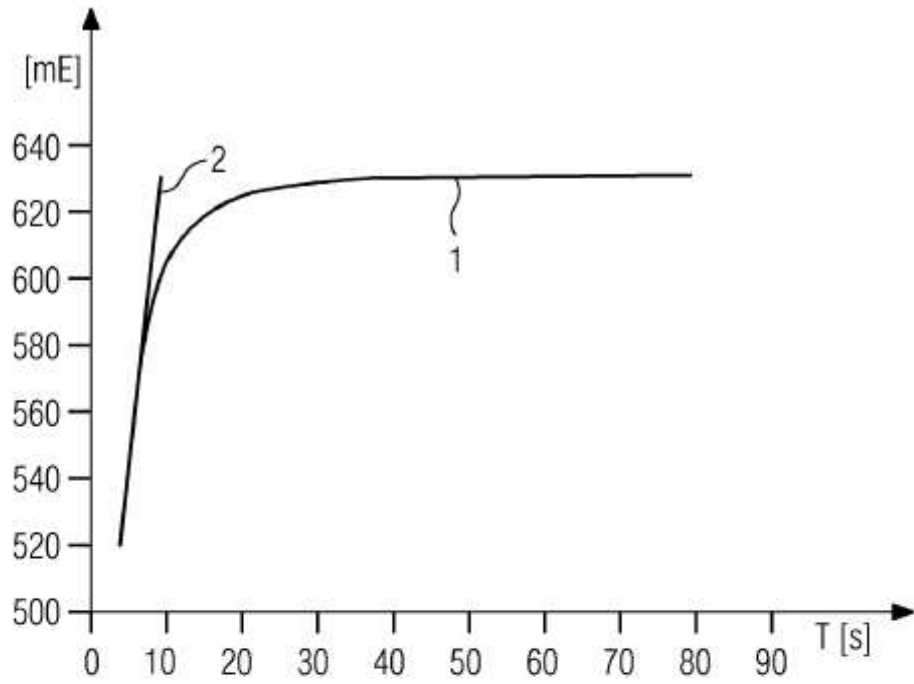


FIG 3

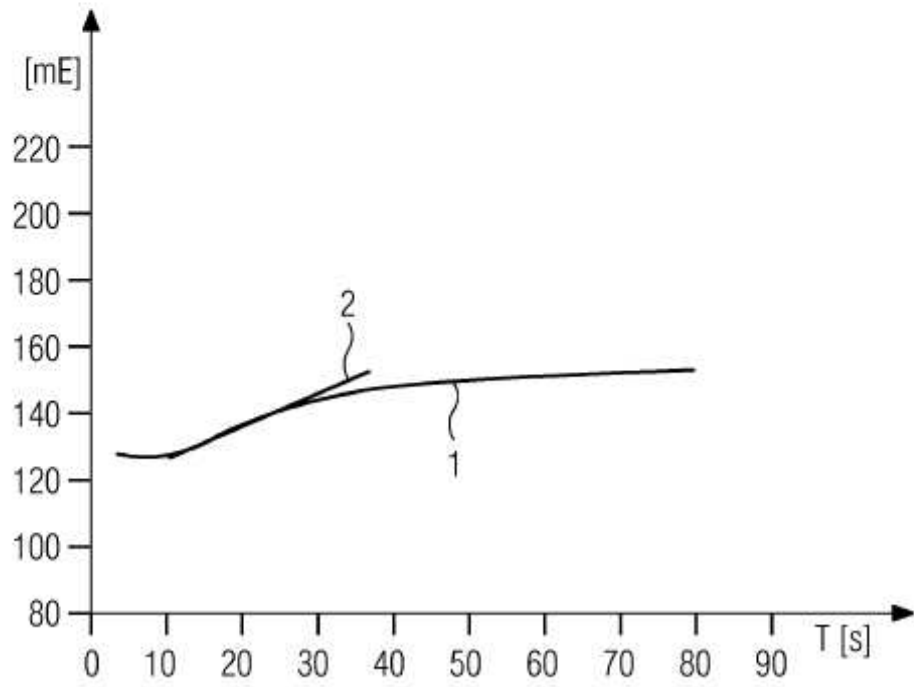


FIG 4

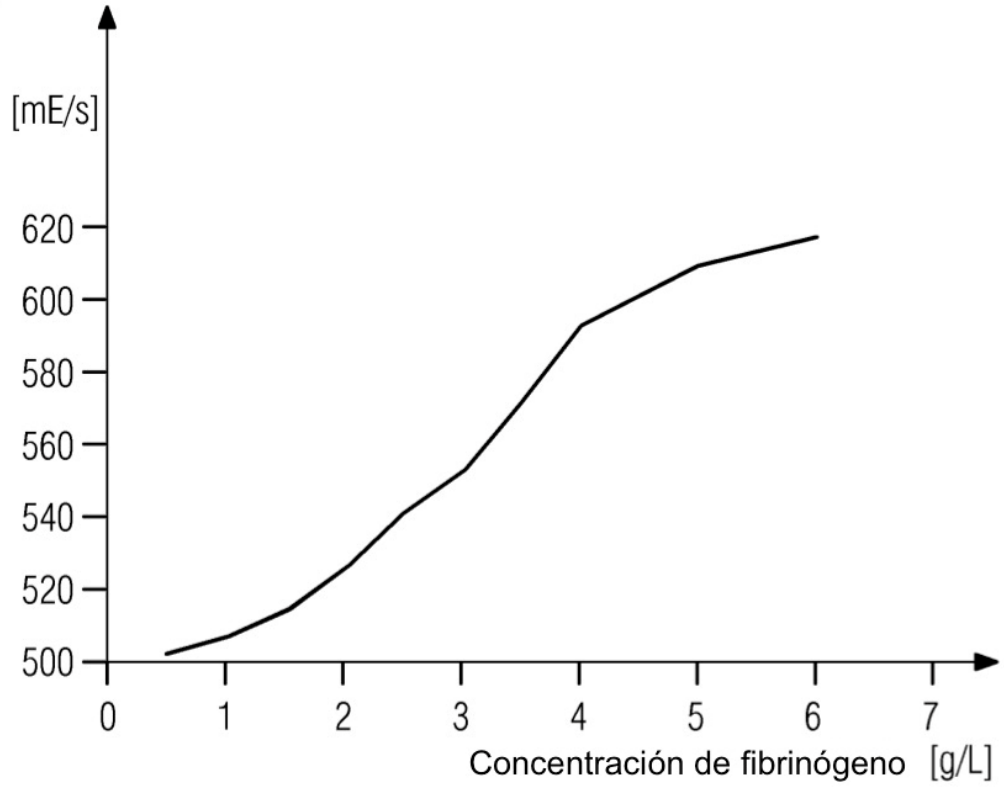
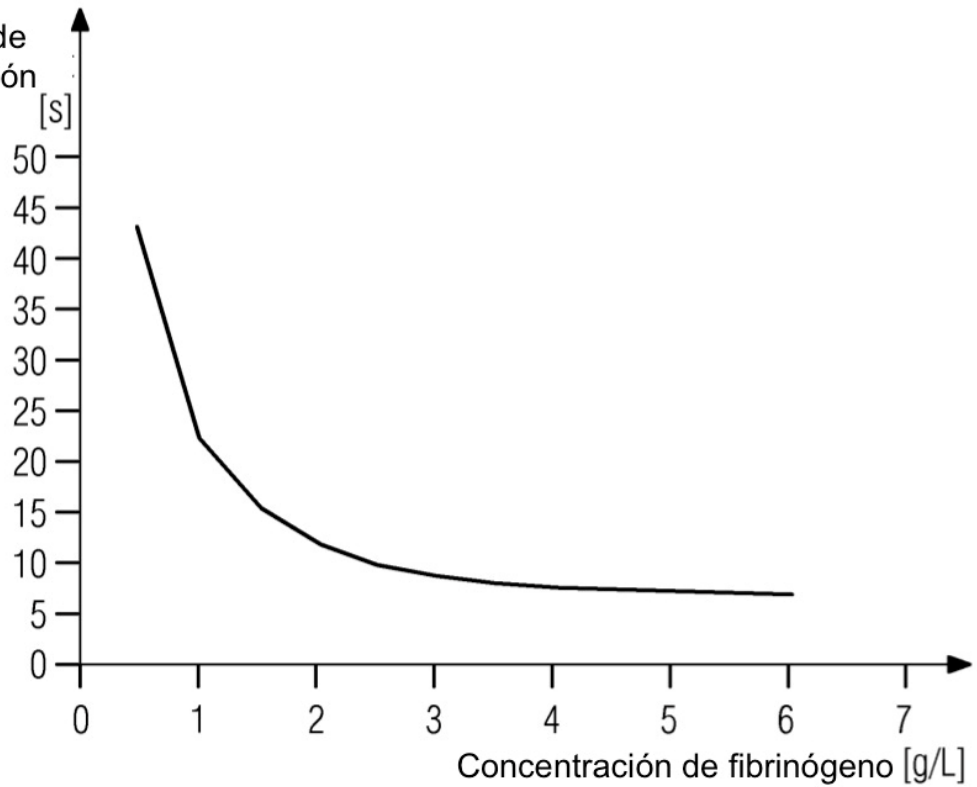


FIG 5

Tiempo de coagulación



**FIG 6**

