

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 350**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2015 PCT/EP2015/061292**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2015 E 15726897 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3146347**

54 Título: **Ensayo para determinar anticoagulantes en sangre o plasma sanguíneo**

30 Prioridad:

22.05.2014 SE 1450612

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

25.03.2020

73 Titular/es:

**Ravmarker AB (100.0%)
Norrbygatan 1
590 31 Borensberg, SE**

72 Inventor/es:

RÅNBY, MATS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 750 350 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

Ensayo para determinar anticoagulantes en sangre o plasma sanguíneo

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un ensayo para determinar anticoagulantes en una muestra de sangre o plasma sanguíneo.

10 **Antecedentes**

Los anticoagulantes son sustancias que disminuyen, reducen o anulan la capacidad de la sangre o el plasma sanguíneo, para coagular: los anticoagulantes reducen la velocidad a la que el fibrinógeno se convierte en fibrina.

15 Algunos anticoagulantes son naturales, endógenos y desempeñan importantes funciones fisiológicas para limitar la aparición, la velocidad de propagación y la extensión espacial de la coagulación de la sangre *in vivo*. Otros anticoagulantes aparecen en condiciones patológicas. Se han encontrado anticoagulantes en toxinas de serpientes y en excreciones de mosquitos, sanguijuelas, murciélagos y garrapatas. Un grupo de anticoagulantes que va en aumento son las sustancias artificiales creadas con el propósito de tratar y prevenir trastornos tromboembólicos.

20 La coagulación de la sangre es un fenómeno complejo que involucra una multitud de moléculas que interaccionan en el plasma sanguíneo o en la superficie de las células comprometidas. Existen numerosas interacciones celulares y moleculares, incluyendo muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, que pueden estar reguladas por disminución, o interrumpidas, por la acción de los anticoagulantes.

25 Los anticoagulantes de acción directa inhiben, obstaculizan o anulan la actividad enzimática de una o ambas enzimas críticas en el proceso de coagulación, trombina (FIIa) o factor de coagulación X activado (FXa). Los anticoagulantes de acción indirecta funcionan de alguna otra manera, una de los cuales es mejorar la potencia de los inhibidores de acción directa. De los anticoagulantes en uso terapéutico general, la heparina es un anticoagulante de acción indirecta y los antagonistas de la vitamina K (warfarina) son reductores generales de los niveles de factor de coagulación. Los anticoagulantes de acción directa son la hirudina (una proteína de la lixiviación) y los inhibidores recientemente creados de FIIa o FXa. Estos nuevos anticoagulantes de acción directa, particularmente aquellos que pueden administrarse por vía oral, DOAC o también llamados NOAC (anticoagulantes orales sin vitamina K), producen un cambio profundo en la medicina clínica y de laboratorio.

35 El hecho de que los anticoagulantes tengan diferentes modos de acción plantea un desafío a la medicina de laboratorio en lo que respecta al diseño de métodos mediante los cuales se puedan determinar los anticoagulantes. Hasta cierta medida, este desafío está estimulado por los recientes éxitos farmacológicos en la creación de nuevas sustancias para tratar los trastornos tromboembólicos, véase, por ejemplo, J. Harenburg, S. Marx y R. Kramer, Determination of the anticoagulation effects of the new oral anticoagulants: an unmet need, Expert Review of Haematology, febrero de 2012, Vol. 5, n.º 1, Páginas 107-113.

45 En los laboratorios centrales del hospital, en los que hay diversas pruebas disponibles y personal cualificado para interpretar los resultados, la detección y determinación de los DOAC parece relativamente sencilla: los inhibidores de FIIa y los inhibidores de FXa se pueden analizar mediante pruebas de tiempo de trombina (TT) o pruebas de FXa, respectivamente. Si las variantes estándar de estas pruebas no satisfacen las necesidades, alguna modificación o "dilución" de las variantes estándar lo hará. En los centros de atención primaria y en lugares, puntos, dentro de los hospitales pero alejados del laboratorio central, "fuera del sitio", la situación es diferente. La característica de la medicina de laboratorio en los sitios POC (Punto de atención) es que el número de pruebas de laboratorio diferentes es limitado porque el espacio físico de dichos sitios de laboratorio es limitado y porque la disponibilidad de personal de laboratorio cualificado es limitada. Dentro de la coagulación, la prueba POC más disponible es la prueba de protrombina (prueba de PT) con los resultados expresados en INR (proporción internacional normalizada, una relación entre el PT de la muestra y un PT normal normalizado mediante la alimentación al exponente de normalización, un índice de sensibilidad). Otras pruebas de coagulación "de rutina" o "comunes" son el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), el tiempo de coagulación activado (ACT) y el TT mencionado. Los expertos visionarios en el campo de la coagulación esperan que estas pruebas de coagulación "de rutina" o "comunes" puedan adaptarse, modificarse, "diluirse", para satisfacer la necesidad de POC analizando los "nuevos" anticoagulantes, particularmente los NOAC. Tales pensamientos/esperanzas son, por ejemplo, expresados por E.J. Favalaro y G. Lippi, The new oral anticoagulants and the future of haemostasis laboratory testing, Biochemia Medica 2012; 22(3):329-41.

60 Debido a que el PT-INR es la prueba POC más comúnmente disponible para mediciones de coagulación, es altamente deseable una prueba de PT modificada o "PT diluido" por el cual se puede determinar el NOAC. Hay informes de trabajo en esa dirección. La baja sensibilidad de la mayoría de las pruebas de PT para inhibidores directos de FXa, tales como rivaroxabán, es conocida. C. Kluff desvela en el documento EP 2 405 274 A1 que las pruebas de PT que se ven afectadas por cierto veneno de serpiente, RVV-V, también muestran sensibilidad hacia el rivaroxabán y desvela el uso de una prueba de PT que emplea tales tromboplastinas.

65

Las esperanzas de encontrar una manera de determinar los NOAC mediante alguna prueba de PT, modificada o no, se han reducido durante los últimos años. En enero de 2014, T. Lindahl, miembro del grupo de expertos en la coagulación de la organización de calidad externa de Suecia, EQUALIS, informó sobre estudios realizados por el grupo de expertos en una sustancia inhibidora de FXa apixabán. La conclusión fue que ninguna de las muchas pruebas de PT o APTT disponibles en el mercado era útil para determinar los niveles de apixabán a concentraciones clínicamente relevantes en el plasma sanguíneo. Por otro lado, las pruebas de FXa funcionaron bien para este propósito.

Los esfuerzos para corregir los resultados de la prueba PT para el efecto anticoagulante variable de los factores de coagulación que no funcionan, pivka, encontrados en la sangre de pacientes en tratamientos con antagonistas de la vitamina K, deben mencionarse. El documento US 7.767.459 B2 (J. Horsti) proporciona esto midiendo el PT del plasma sanguíneo mediante el protocolo estándar de cualquier método de PT dado y también midiendo el mismo después de una predilución del plasma con un tampón fisiológico, tal como 9 g/l de NaCl. Los resultados del PT, expresados en segundos o en INR, se representan después contra el grado de dilución plasmática final y se extrapolan a cero. El PT del plasma en la dilución final de cero, reducido por el mismo para un plasma normal, se toma como una medida del efecto pivka y se usa para corregir el resultado de PT original.

Se han diseñado nuevas pruebas de coagulación con el objetivo de determinar varios tipos diferentes de anticoagulantes, particularmente heparinas y NOAC.

Estos esfuerzos demuestran la importancia clínica de determinar estos anticoagulantes.

Véase Calatzis A, Peletz D, Haas S, Spannagl M, Rudin K, Wilmer M, Prothrombinase-induced Clotting Time Assay for Determination of the Anticoagulant Effects of UFH and LMWH, Fondaparinux, and Thrombin Inhibitors, Am J Clin Pathol 2008; 130: 446-454 y Samama MM, Martinoli JL, LeFlem L, Guinet C, Plu-Bureau G, Depasse F, Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban - an oral, direct factor Xa inhibitor, Thromb Haemost 2010; 103/4: 815-825.

Los antecedentes relevantes de la presente invención son la distinción entre los métodos de química húmeda y los métodos de química seca. La química húmeda se define mediante la mezcla de un volumen de la muestra, en un ensayo de coagulación de sangre o plasma sanguíneo, y un volumen de reactivo. La muestra se diluye así en cierto grado en la mezcla de reacción. En química seca, esta dilución no ocurre. La muestra se mezcla o se pone en contacto con sustancia reactiva en forma seca y no hay dilución de la muestra. La mayoría de las pruebas POC son pruebas de química seca porque a menudo se pueden presentar en un formato fácil de usar, por ejemplo, una tira o un chip. El operador generalmente solo necesita añadir un pequeño volumen de la muestra. Una desventaja de los métodos de química seca es que las pruebas son más difíciles de modificar. Una dimensión de la libertad otorgada por los procedimientos de química húmeda, la variación del grado de dilución de la muestra, no está disponible con química seca. Cada mención de una modificación "diluida" de una prueba de "rutina" tiene la química húmeda como requisito previo.

Sumario

Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar un ensayo para determinar anticoagulantes en una muestra de sangre o plasma sanguíneo, incluyendo el ensayo análisis con al menos dos métodos de tiempo de protrombina (PT) de química húmeda, en el que el ensayo está diseñado para ser aplicable para la determinación de anticoagulantes directos e indirectos en muestras de sangre o plasma sanguíneo.

La invención se define en la reivindicación independiente adjunta. Las realizaciones se establecen en las reivindicaciones dependientes, en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción.

Según un primer aspecto, se proporciona un ensayo para determinar los anticoagulantes en una muestra de sangre o plasma sanguíneo, en el que los anticoagulantes determinados en dicho ensayo son inhibidores de acción directa de los factores de coagulación activados IIa y Xa, que se seleccionan de un grupo que consiste en dabigatrán, apixabán, rivaroxabán o hirudina o inhibidores de acción indirecta de los factores de coagulación activados IIa y Xa, seleccionados de un grupo que consiste en heparinas fraccionadas o no fraccionadas, en el que el ensayo comprende análisis con al menos dos métodos de tiempo de protrombina (PT) de química húmeda. El ensayo comprende las etapas de: a) en un primer análisis de PT con un primer método de PT, medir el PT en una primera mezcla de reacción que comprende un primer volumen de sangre o plasma sanguíneo diluido en un primer volumen de un reactivo líquido que comprende tromboplastina, fibrinógeno y factor de coagulación V, b) en un segundo análisis e PT con un segundo método de PT, medir el PT en una segunda mezcla de reacción que comprende un segundo volumen de la sangre o plasma sanguíneo diluidos en un segundo volumen del reactivo líquido que comprende tromboplastina, fibrinógeno y factor de coagulación V, en el que la concentración de sangre o plasma sanguíneo en la segunda mezcla de reacción difiere de la concentración de sangre o plasma sanguíneo en la primera mezcla de reacción. Los al menos dos métodos de PT se calibran para dar los mismos, o aproximadamente los mismos, resultados de PT cuando se usan para analizar la sangre o plasma sanguíneo de referencia que carecen re anticoagulantes de interés para el ensayo. El ensayo comprende además la etapa de c) calcular una diferencia en el PT para las mediciones en la etapa a) y b), en el que

si la diferencia en el PT es

- 1) significativa, es indicativo de la presencia de anticoagulantes en la muestra de sangre o plasma sanguíneo, o 2) no significativa, es indicativo de una ausencia de anticoagulantes por encima del nivel detectable en la muestra de sangre o plasma sanguíneo.

Con análisis con al menos dos métodos de PT se entiende en el presente documento que el ensayo puede implicar análisis con 2, 3, 4, 5 o hasta 6 métodos de PT.

Con diferencia en el PT se entiende en este caso diferencia absoluta o diferencia relativa.

Los al menos dos métodos de PT utilizados en el ensayo pueden ser fundamentalmente el mismo método de PT, pero con alguna diferencia que puede parecer insignificante. Tales diferencias, aparte de la diferencia proporcionada por la invención, es decir, la diferencia en la relación entre el volumen de muestra y el volumen de reactivo, podría haber diferencias en la temperatura a la que se realizan las mediciones y diferencias en la fuerza iónica o el pH de la mezcla de reacción.

Con química húmeda, el método PT significa en el presente documento métodos de PT de tipo Owren.

La proporción entre el volumen de sangre o plasma sanguíneo y el volumen de reactivo líquido en la mezcla de reacción puede variar ampliamente dependiendo de las características del reactivo de PT y la concentración en la muestra del anticoagulante que se desea detectar.

Al practicar el ensayo, no existen límites estrictos para la cantidad y la extensión de la muestra de sangre o plasma sanguíneo que se puede diluir en el reactivo de PT, los límites son de carácter práctico. El nivel más bajo de dilución de la muestra de sangre o plasma sanguíneo en un reactivo líquido es aproximadamente 1:2. A diluciones más bajas pueden perderse algunas características favorables del ensayo, por ejemplo, las muestras citradas dejan de ser analizables. La dilución más alta posible será considerablemente más alta, de aproximadamente 1:200. Tales altas diluciones pueden ser posibles porque los niveles necesarios de fibrinógeno y FV de la mezcla de reacción no necesitan provenir de la muestra. Esto se debe a que el reactivo de PT líquido del tipo Owren, aparte de la tromboplastina, También contiene niveles efectivos de fibrinógeno y FV. Aun así, también con los reactivos líquidos del tipo Owren existen limitaciones prácticas para el grado de dilución final de la muestra. A niveles muy bajos de la muestra de sangre o plasma sanguíneo en la mezcla de reacción, los niveles de FVII, FX y FII son tan bajos que el tiempo de coagulación (el PT) se hace tan largo que la detección se vuelve difícil o imposible. Por lo tanto, en la práctica de la invención, la proporción entre el volumen de sangre o plasma sanguíneo y el volumen de reactivo líquido en la mezcla de reacción pueden variar entre 1:2 y 1:200. Un intervalo de proporción preferido puede estar entre 1:5 y 1:100 o entre 1:10 y 1:50.

En el presente ensayo, el PT se analiza en al menos dos mezclas de reacción que tienen diferentes concentraciones de sangre o plasma sanguíneo en las mezclas de reacción. La concentración de sangre o plasma sanguíneo en la primera mezcla de reacción puede ser de aproximadamente 1,5 a 100 veces, de 1,5 a 50 veces, de 1,5 a 25 veces, de 1,5 a 10 veces o de 1,5 a 5 veces mayor que la concentración de sangre o plasma sanguíneo en la segunda mezcla de reacción. Es práctico lograr una diferencia en la concentración de 1,5 a 5 veces y se demuestra que con el presente ensayo permite la determinación de anticoagulantes en intervalos de concentración clínicamente relevantes.

La concentración de sangre o plasma sanguíneo en la segunda mezcla de reacción puede ser de aproximadamente 1,5 a 100 veces, de 1,5 a 50 veces, de 1,5 a 25 veces, de 1,5 a 10 veces o de 1,5 a 5 veces mayor que la concentración de sangre o plasma sanguíneo en una posible tercera mezcla de reacción.

A pesar de la diferencia en la concentración de sangre o plasma sanguíneo en la mezcla de reacción, todos los dos o más métodos de PT diferentes del ensayo están calibrados para dar, con muestras relevantes de sangre o plasma sanguíneo de referencia que carecen del anticoagulante de interés, el mismo o aproximadamente el mismo resultado de PT. Este PT se expresa de tal manera que esto es posible. La expresión en unidades de tiempo regulares no funcionará, ya que variarán de un método a otro, y son lo que son (no se pueden calibrar). Una mezcla de reacción con una baja concentración de sangre o plasma sanguíneo muestra PT largos y viceversa. Una forma natural de expresar el PT es en INR (índice normalizado internacionalizado), pero son posibles otras expresiones, varias unidades sintéticas similares al tiempo, o proporciones de tales. Es importante que una muestra relevante dada que carece de anticoagulante(s), analizada por los dos o más métodos de PT, de lo más cerca posible el mismo resultado posible. Una forma natural de comparar los resultados de un método de PT con otro es por el resultado de PT promedio y por el CV (coeficiente de variación) de la comparación. La calibración es tal que el resultado de PT promedio para varias muestras relevantes que carecen del anticoagulante debe ser casi la misma posible con todos los dos o más métodos de PT, y el CV de las comparaciones debe ser lo más bajo posible.

Los al menos dos métodos de PT pueden calibrarse de modo que los métodos de PT den el mismo resultado o aproximadamente el mismo resultado de PT cuando se usan para analizar sangre o plasma sanguíneo de referencia de un individuo normal y diluciones de dicha sangre o plasma sanguíneo de referencia. En el presente documento,

ES 2 750 350 T3

con sangre o plasma sanguíneo de un individuo normal se entiende sangre o plasma sanguíneo, o grupo o grupos de tales muestras, de una o varias personas aparentemente sanas no sujetas a tratamiento anticoagulante.

5 Los al menos dos métodos de PT pueden calibrarse para proporcionar los mismos resultados de PT o aproximadamente los mismos cuando se usan para analizar sangre o plasma sanguíneo (de uno o muchos individuos o grupo de muestras de diferentes individuos) que carecen de anticoagulantes de interés para el presente ensayo y que sangre o plasma sanguíneo tiene un valor de PT por encima de lo normal determinado por uno o varios métodos de PT establecidos.

10 En la etapa c) del ensayo, se calcula una diferencia, absoluta o relativa, en el PT entre mediciones de PT. A los términos "significativo" e "insignificante" se les da en el presente documento su definición estadística convencional. Una diferencia significativa es, por tanto, una diferencia relativa de 2 veces el CV o más, una diferencia insignificante de menos de 2 veces el CV. Expresado de manera diferente, una diferencia observada es significativa si tiene una baja probabilidad de ocurrir en una población de muestras que carecen de los anticoagulantes determinados por el ensayo. Esta probabilidad se puede establecer a diferentes niveles. Los niveles típicos son del 5 % ($p < 0,05$) o del 1 % ($p < 0,01$).

20 Si la diferencia en el PT calculada en la etapa c) es significativa y se conoce la identidad del anticoagulante, se puede calcular una concentración del anticoagulante en la muestra de sangre o plasma sanguíneo.

Si la diferencia en el PT calculada en la etapa c) no es significativa y se conoce la identidad del anticoagulante, se puede asignar el nivel por encima del cual el anticoagulante no está presente en dicha muestra de sangre o plasma sanguíneo.

25 Si la diferencia en el PT calculada en la etapa c) es significativa, se puede calcular un PT estimado de la muestra de sangre o plasma sanguíneo en ausencia de anticoagulantes.

El cálculo de la concentración de anticoagulante en una muestra de sangre o plasma sanguíneo solo se puede realizar si se conoce o se supone la identidad del anticoagulante.

30 Si se han realizado análisis con dos métodos de PT, puede ser conveniente utilizar la diferencia en los resultados de PT y el resultado de PT del análisis con la mayor dilución de muestra para este cálculo. El resultado de PT en la dilución más alta será el más cercano al resultado de PT en caso de que no haya presente anticoagulante. Usando el formalismo INR, este resultado de PT imaginado se denomina INRo. El INRo puede obtenerse restando una fracción de la diferencia o restando una función de la diferencia, dependiendo de si la respuesta a la dosis al nivel de anticoagulante es lineal o no. Dado que la respuesta a la dosis puede depender de este INRo y de la temperatura a la que se han hecho las determinaciones, la conversión del tamaño de la diferencia en la concentración de anticoagulante puede requerir una multitud de las llamadas curvas estándar. Como alternativa, se puede emplear una función multidimensional para calcular el INRo y el nivel de anticoagulante.

40 Si se han realizado análisis con más de dos métodos de PT en la práctica del ensayo de la invención, se puede calcular más de una diferencia y estas varias diferencias, y el valor de PT obtenido en la dilución de muestra más alta, puede usarse para calcular el INRo y los posibles niveles de anticoagulante dependiendo de la identidad del anticoagulante. También es posible favorecer que una de las diferencias sea más útil, ya que es un intervalo favorable para las determinaciones.

50 Las mediciones del PT pueden realizarse a una temperatura ambiente en el intervalo de 17 °C a 45 °C, preferentemente en el intervalo de 18 °C a 30 °C, más preferentemente en el intervalo de 21 °C a 30 °C y, lo más preferentemente, en el intervalo de 25 °C a 30 °C.

Tales intervalos de temperatura, más bajos pero no alejados de 30 °C, son preferentes, ya que la temperatura apenas afecta al PT, mejorando así la precisión del análisis de PT proporcionado. Además, una temperatura más baja aumenta la sensibilidad del ensayo para anticoagulantes en los ejemplos siguientes.

55 El primer volumen del reactivo líquido en la primera mezcla de reacción puede ser igual al segundo volumen del reactivo líquido en la segunda mezcla de reacción.

El volumen de sangre o plasma sanguíneo diluido en el reactivo líquido puede estar en el intervalo de 1 a 20 μ l.

60 El volumen de sangre o plasma sanguíneo se puede añadir al reactivo líquido con un capilar de extremo a extremo.

La proporción entre el volumen de sangre o plasma sanguíneo y el volumen de reactivo líquido en la mezcla de reacción puede ser de 1:2 a 1:200, de 1:5 a 1:100 o de 1:10 a 1:50.

65 Una concentración de sangre o plasma sanguíneo en la primera mezcla de reacción puede ser de aproximadamente 1,5 a 100 veces, de 1,5 a 50 veces, de 1,5 a 25 veces, de 1,5 a 10 veces o de 1,5 a 5 veces mayor que la concentración

de sangre o plasma sanguíneo en la segunda mezcla de reacción.

La mezcla de reacción puede comprender una concentración final de iones de calcio en el intervalo de 10 a 50 mM, en el intervalo de 10 a 30 mM o en el intervalo de 10 a 24 mM.

5 Con concentración final de calcio en la mezcla de reacción se entiende aquí el calcio total en la mezcla de reacción, principalmente como Ca^{2+} libre, pero también complejos iones de calcio.

10 Con una mezcla de reacción que comprende calcio de las concentraciones indicadas, puede aumentarse la sensibilidad por la cual los inhibidores de la coagulación pueden determinarse mediante el ensayo.

Se debe evitar un nivel de calcio excesivamente alto porque el aumento de los niveles de Ca^{2+} prolongará progresivamente los tiempos de coagulación, lo cual en general es desventajoso.

15 La osmolaridad de la mezcla de reacción puede ser de aproximadamente 0,3 a 0,5 Osm/kg, o de aproximadamente 0,3 a 0,4 Osm/kg.

20 Tales niveles de osmolaridad se pueden obtener aumentando los niveles de NaCl en el reactivo de PT a niveles que hacen que el reactivo de PT sea hipertónico (presión osmótica más alta que la del plasma sanguíneo y otras soluciones fisiológicas), por tanto, haciendo también la mezcla de reacción hipertónica.

Tales niveles de osmolaridad pueden aumentar la sensibilidad del ensayo anticoagulante. Los tiempos de coagulación pueden, sin embargo, llegar a ser excesivamente largos si los niveles de NaCl son demasiado altos.

25 Una combinación de mayor osmolaridad y mayores niveles de calcio en la mezcla de reacción puede aumentar la sensibilidad del ensayo anticoagulante para proporcionar la alta sensibilidad más ventajosa.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es un gráfico que muestra el contenido de apixabán medido con el presente ensayo en plasma sanguíneo normal.

La figura 2 es una ampliación de una parte del gráfico de la figura 1.

La figura 3 es un gráfico que muestra el contenido de apixabán medido con el presente ensayo en plasma sanguíneo normal (datos primarios: PT en segundos).

35 La figura 4 es una ampliación de una parte del gráfico de la figura 3.

La figura 5 es un gráfico que muestra el contenido de apixabán medido con el presente ensayo en sangre normal.

La figura 6 es una ampliación de una parte del gráfico de la figura 5.

La figura 7 es un gráfico que muestra el contenido de dabigatrán medido con el presente ensayo en sangre normal.

La figura 8 es una ampliación de una parte del gráfico de la figura 7.

40 La figura 9 es un gráfico que muestra el contenido de heparina medido con el presente ensayo en plasma sanguíneo normal.

La figura 10 es una ampliación de una parte del gráfico de la figura 9.

45 La figura 11 es un gráfico que muestra la diferencia relativa de PT20c/PT5c con respecto al PTc promedio para los métodos de 5 μl y 20 μl cuando se miden muestras de referencia de individuos normales y pacientes tratados con warfarina.

La figura 12 es un gráfico que muestra la diferencia absoluta de PT20c-PT5c frente a PTc promedio para los métodos de 5 μl y 20 μl cuando se miden muestras de referencia de individuos normales y pacientes tratados con warfarina.

50 La figura 13 es un gráfico que muestra la diferencia relativa de PT20c/PT5c con respecto al PTc promedio para los métodos de 5 μl y 20 μl cuando se miden muestras de referencia de individuos normales y pacientes tratados con warfarina y muestras de pacientes tratados con dabigatrán.

La figura 14 es un gráfico que muestra la diferencia absoluta de PT20c-PT5c frente a PTc promedio para los métodos de 5 μl y 20 μl cuando se miden muestras de referencia de individuos normales y pacientes tratados con warfarina y muestras de pacientes tratados con dabigatrán.

55 La figura 15 es un gráfico que muestra las diferencias relativas no calibradas de PT20/PT5 con el PT promedio para los métodos de 5 μl y 20 μl cuando se miden muestras de referencia de individuos normales y pacientes tratados con warfarina y muestras de pacientes tratados con dabigatrán

60 La figura 16 es un gráfico que muestra las diferencias calibradas relativas de PT20c/PT5c con el PT calibrado promedio para los métodos de 5 μl y 20 μl cuando se miden muestras de referencia de individuos normales y pacientes tratados con warfarina y muestras de pacientes tratados con dabigatrán

Descripción detallada

65 Los ejemplos siguientes se proporcionan, no para limitar el alcance de la invención, sino para seguir explicando y describiendo la invención, y para estimular el desarrollo en esta importante área de diagnóstico médico.

Se realizó un trabajo experimental con el instrumento de coagulación a temperatura ambiente disponible en el mercado, Simple Simon PT Zafena AB, Linköping, Suecia, con funciones descritas en el documento EP 1 636 595 B2. Se usó un instrumento o lector para cada método de PT. Como alternativa, se podría usar el mismo instrumento para todos los métodos de PT.

5 En los ejemplos 1 a 6 se usó un lector específico para cada uno de los tres métodos de PT, el método de 20 μ l, el método de 10 μ l y el método de 5 μ l. Los tres instrumentos se usaron juntos uno al lado del otro en un banco de laboratorio en equilibrio térmico con la temperatura ambiente del laboratorio. Para una determinada determinación de PT, cada instrumento muestra el PT en segundos, como se indica en la Tabla 2. Asimismo, a través de la capacidad interna de procesamiento de datos de cada lector, se mostró una estimación aproximada de la muestra INR para cada método de PT. Estas estimaciones aproximadas de INR se indican en las tablas 1, 3 y 4. Dado que, en cada serie de experimentos, también se analizaron muestras de referencia relevantes, los resultados de cada método de PT podrían calibrarse en una sesión de oficina separada después de la finalización de una serie experimental. No importa cómo se expresen los datos de PT principales de las dos o más determinaciones por diferentes métodos de PT, después de la calibración usando muestras de referencia, muestran los diferentes métodos de PT, lo más cerca posible, del mismo PT.

20 La temperatura ambiente del laboratorio a la que se realizó el trabajo varió entre 21 °C y 26 °C. Se favorecen los intervalos de temperatura inferiores pero no alejados de 30 °C, ya que la temperatura apenas afecta al PT, mejorando así la precisión del análisis de PT proporcionado. Además, una temperatura más baja aumenta la sensibilidad del ensayo para anticoagulantes en los ejemplos siguientes. Sin embargo, es posible realizar el ensayo a temperaturas en el intervalo de 17-45 °C.

25 El reactivo de PT fue el que liberado junto con el lote N223M del producto Simple Simon PT, un reactivo de tipo Owren que, por tanto, contiene cantidades efectivas de tromboplastina, fibrinógeno y FV (la tromboplastina de origen de cerebro de conejo y el fibrinógeno y el FV de origen de plasma sanguíneo bovino). También se pueden usar otros reactivos de tipo Owren.

30 El reactivo estaba en porciones de 200 μ l a las cuales se añadió y se mezcló una muestra, sangre citrada o plasma sanguíneo citrado. La adición se realizó mediante un capilar de plástico de extremo a extremo montado en un extremo de un cuerpo tubular con un mecanismo de desplazamiento en el otro extremo, esto para permitir una mezcla conveniente de muestra y reactivo. Tales Mixxocaps con 10 μ l de capilares se suministran con el producto Simple Simon PT. Para realizar los experimentos descritos, algunos Mixxocaps se equiparon con capilares de 20 μ l, o capilares de 5 μ l en lugar de los capilares de 10 μ l con los que fueron suministrados por el fabricante. Como alternativa, se pueden usar pipetas estándar o similares para mezclar la muestra de sangre o plasma sanguíneo con el reactivo líquido.

35 Las proporciones entre el volumen de sangre o plasma sanguíneo y el volumen de reactivo líquido utilizado en los experimentos fueron 1:11, 1:21 y 1:41. Se podrían utilizar otras proporciones dentro del intervalo de 1:5 y 1:100 o dentro del intervalo de 1:2 y 1:200.

40 La diferencia en la concentración de sangre o plasma sanguíneo entre las diferentes mezclas de reacción utilizadas en los ensayos en los experimentos fue entre 1,5 y 5 veces. La diferencia en la concentración podría estar, sin embargo, entre aproximadamente 1,5 veces y 100 veces.

45 El plasma normal anticoagulado fue el producto NKP GHI-163 lote 10188, MediRox AB, Nyköping, Suecia. Las soluciones madre de dabigatrán (Pradaxa, Boehringer-Ingelheim) y apixabán (Eliquis, Bristol-Meyers Squibb) que contenían 100 mg/l fueron un amable regalo del profesor Tomas Lindahl del Departamento de Medicina Experimental de la Universidad de Linköping. La heparina no fraccionada fue Heparina Leo lote A6888B, Leo Pharma A/S, Ballerup, Dinamarca.

Ejemplo 1

55 Apixabán es un inhibidor de acción directa del factor de coagulación X activado (FXa). Es el compuesto activo del fármaco antitrombótico Eliquis, Bristol-Meyers Squibb. Es de interés clínico medir el apixabán en plasma sanguíneo en el intervalo de 50 a 1000 μ g/l. Para preparar muestras adecuadas, se añadieron pequeños volúmenes de la solución madre de apixabán al plasma normal, el plasma de control NKP, para dar plasma normal con un contenido de apixabán en el intervalo de 0 a 1000 μ g/l. Estos plasmas normales con apixabán, incluyendo el plasma normal no adulterado (NKP) y el mismo diluido 1:2 en 9 g/l de NaCl (NKP 1:2), se analizaron mediante Simple Simon PT en adiciones de muestras de 20 μ l, 10 μ l y 5 μ l en reactivos de 200 μ l, por tanto, con tres métodos de PT con diferente contenido de muestra en las mezclas de reacción, de acuerdo con la invención. Además, era relevante que los tres métodos de PT se habían calibrado, de acuerdo con la invención, para mostrar un INR de 1.000 para NKP sin adulterar y un INR de 1,357 para NKP 1:2. Todos los valores de INR primarios, los resultados que aparecieron en las pantallas de los instrumentos (se usó un instrumento o lector para cada método de PT), se transformaron de este modo al INR corregido/calibrado mediante la fórmula $A \cdot \text{INR}_{\text{exp}}(B)$ en la que a y b se seleccionaron para dar NKP y NKP 1:2 sus valores deseados, 1,000 y 1,357, respectivamente. Se calculó el valor del INR del NKP 1:2 mediante la fórmula de

ES 2 750 350 T3

Lindahl y col. para el INR correspondiente a la actividad de PT del 50 % (la mitad del 100% que equivale a un INR de 1,000). El tratamiento de los datos se muestra en la Tabla 1. Por encima de las columnas calibradas de INR (INRc) hay un número superior y un número inferior, estos son los A y B mencionados anteriormente, respectivamente.

				0,94	0,93	0,95			
				1,31	1,21	0,97			
apixabán	INR	INR	INR	INRc	INRc	INRc	ΔINR	ΔINR	0,54
μg/l	Muestra de 20 μl	Muestra de 10 μl	Muestra de 5 μl	Muestra de 20 μl	Muestra de 10 μl	Muestra de 5 μl	20 μl-5 μl	10 μl-5 μl	INRo
1000	10,70	4,41	2,67	21,03	5,58	2,47	13,50	3,12	0,78
800	7,81	3,35	2,22	13,91	4,00	2,06	11,85	1,94	1,01
600	5,56	2,70	1,90	8,91	3,08	1,77	7,14	1,31	1,06
500	4,47	2,37	1,73	6,69	2,63	1,62	5,07	1,02	1,07
400	3,68	2,16	1,58	5,18	2,35	1,48	3,70	0,87	1,01
300	2,82	1,82	1,44	3,66	1,91	1,35	2,30	0,56	1,05
200	2,12	1,53	1,29	2,51	1,55	1,22	1,30	0,34	1,03
100	1,55	1,27	1,15	1,67	1,24	1,09	0,58	0,15	1,01
50	1,28	1,18	1,12	1,30	1,13	1,06	0,24	0,07	1,02
0	1,05	1,065	1,055	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
NKP	1.050	1.065	1.055	1.000	1.000	1.000			
NKP 1:2	1.325	1,37	1.445	1.357	1.357	1.357			

5

Tabla 1

Se muestran dos mediciones del contenido de apixabán del plasma normal, una medida más sensible, la diferencia en INRc dada por los métodos de PT con 20 μl de muestra y 5 μl de muestra, y una medida menos sensible, la diferencias INRc- entre 10 μl y con 5 μl. Las diferencias INRc se muestran aquí como diferencias absolutas, pero las diferencias relativas de INRc podrían haberse utilizado igualmente. Las diferencias de INRc se representan contra el contenido de apixabán de los plasmas normales como se muestra en el gráfico de la figura 1. Los símbolos cuadrados son la diferencia en el INRc entre los resultados del método de 20 μl y el método de 5 μl, y los símbolos redondos son la diferencia en el INRc entre el método de 10 μl y el de 5 μl.

15

Se señala que es posible estimar el INR del plasma normal en ausencia de anticoagulante, INRo. En lo anterior, esto se hace de una manera menos sofisticada. Una parte (56 %) de la menor diferencia de INRc se resta de los resultados de INRc del método de muestra de 5 μl, el resultado obviamente más cercano a INRo. Estas simples estimaciones de INRo son sorprendentemente buenas, solo la del contenido apixabán de arriba (1000 μg/l) se desvía en más de una décima parte de una unidad de INR.

20

Las figuras 1 y 2 muestran gráficos en los que la velocidad de aumento en las medidas del contenido de apixabán aumenta con el contenido. Sin embargo, para aquellos que pueden apreciarlo favorece las relaciones lineales de respuesta a la dosis, dichas relaciones se muestran en el presente documento mediante las medidas de apixabán que están por debajo de una unidad de INR, como se ve en el gráfico en la figura 2, en la que la figura 2 muestra una ampliación de una parte del gráfico de la figura 1.

25

El tratamiento de datos mostrado en la figura 1 y 2 podría ser confuso para los no familiarizados con la determinación del INR de la temperatura ambiente de la estancia. En lugar de un resultado primario de INR que se ha corregido para el efecto de la temperatura mediante los cálculos con el instrumento/lector, en su lugar se podría considerar el PT en segundos. Esto se realiza para aumentar la claridad en la descripción de la invención a pesar de introducir un error debido a que la temperatura no es estrictamente constante durante el período de tiempo en el que se realizaron los ensayos (las temperaturas variaron de 22,3 °C a 24,2 °C). A pesar de este sesgo, los resultados siguen siendo lo suficientemente buenos como para ser convincentes y se explica más claramente porque permite un tratamiento de datos familiar para todos los que tienen conocimientos en la técnica, es decir, el cálculo del INR dividiendo el PT (en segundos) por un PT normal y alimentando la relación con una constante de normalización equivalente al ISI.

35

En la Tabla 2 se muestran los resultados del ensayo en plasma normal (NKP) con apixabán añadido, pero los datos primarios están en el presente documento en PT, en segundos, y los datos se convierten en INRc por división con el PT de un plasma normal y sometiendo la relación a la potencia de un ISI, número superior e inferior, respectivamente, se muestra encima de las columnas de INRc. Como se considera relevante, el número superior se selecciona para que NKP 1:2 muestre un INRc de 1,357.

40

En la Tabla 2, los datos están sesgados por un gradiente de temperatura que va desde 22,3 °C en la parte superior a 24,2 °C en la parte inferior. Esto, sin embargo, no afecta mucho a la imagen general. Los métodos de PT utilizados, métodos de Owrens a temperatura ambiente, son más sensibles a los inhibidores que otros, aún son obvios, que uno

45

de los métodos de PT seleccionados no proporcionaría mucha información útil a niveles más bajos de apixabán.

				32,8	37,3	45,8			
				2,63	1,66	1,07			
apixabán	PT (s)	PT (s)	PT (s)	INRc	INRc	INRc	ΔINRc	ΔINRc	0,54
μg/l	Muestra de 20 μl	Muestra de 10 μl	Muestra de 5 μl	Muestra de 20 μl	Muestra de 10 μl	Muestra de 5 μl	20 μl-5 μl	10 μl-5 μl	INRo
1000	117,4	109,3	111,2	28,43	5,94	2,57	25,85	3,37	0,75
800	96,9	87,2	91,7	17,18	4,08	2,09	15,08	1,99	1,02
600	79,9	73,9	78,8	10,35	3,10	1,78	8,57	1,32	1,07
500	70,8	67,0	72,0	7,54	2,64	1,62	5,92	1,02	1,07
400	63,5	62,3	66,3	5,66	2,34	1,48	4,18	0,86	1,02
300	54,8	54,6	60,6	3,85	1,88	1,35	2,50	0,53	1,06
200	46,7	47,9	54,4	2,53	1,51	1,20	1,33	0,31	1,03
100	39,3	41,5	49,1	1,61	1,19	1,08	0,53	0,12	1,01
50	35,5	39,1	47,7	1,23	1,08	1,04	0,19	0,04	1,02
0	32,8	37,3	45,8	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
NKP	32,8	37,3	45,8	1,00	1,00	1,00			
NKP 1:2	36,9	44,9	61,0	1.357	1.357	1.357			

Tabla 2

5 Imagine que emplea el método más sensible al apixabán de los tres métodos, el que tiene 20 μl de muestra y se obtiene un PT de 35,2 segundos. Esto es más que el de un plasma normal (NKP), 32,8 segundos, pero ¿se debe el incremento en el PT a los anticoagulantes o se debe al bajo contenido de los factores de coagulación (el PT de NKP 1:2 es 36,9 segundos)? ¿Cómo se puede saber? La práctica del ensayo, realizando dos o más determinaciones del PT con métodos de PT con diferente contenido de muestras en la mezcla de reacción proporciona una imagen más clara. Dado que los métodos, que están calibrados para mostrar el mismo PT (en el presente documento, el mismo INR llamado INRc, la c por calibrado) varían para las muestras que carecen de los anticoagulantes que se determinarán, habrá poca o ninguna diferencia, es decir, no hay diferencia significativa, entre los resultados de INRc para una muestra con bajo contenido de factor de coagulación. En el presente ejemplo, se sabe que las muestras contienen el anticoagulante apixabán porque se ha añadido y aparece una diferencia en el resultado de INRc. En el ejemplo, hay tres métodos de PT usados según la invención y hay tres diferencias en los resultados de INRc que pueden examinarse (dos de los tres se muestran en la Tabla 2) y para el ensayo de plasma normal con 50 μg/l de apixabán, las tres diferencias indican la presencia de anticoagulantes. Si se conoce la identidad del anticoagulante, se puede estimar su contenido. Las diferencias de INRc se muestran en el presente documento como diferencias absolutas, pero las diferencias relativas de INRc podrían haberse utilizado igualmente. Asimismo, se puede estimar el INRc esperado para la muestra en ausencia de inhibidor, INRo. La Tabla 2 que muestra los PT en segundos, aclara la utilidad de poner en práctica la invención. Se espera que los resultados que se muestran en la Tabla 2 sean casi idénticos a los de la Tabla 1 y están bastante de acuerdo. Las diferencias observadas para las muestras con el mayor contenido de apixabán se atribuyen al efecto de la temperatura. La temperatura aumentó en aproximadamente 2 °C mientras se realizaba la serie experimental. Los instrumentos han compensado los efectos de este cambio de temperatura antes de informar de los valores de INR que se muestran en la Tabla 1. Los valores de PT (tiempo de coagulación en segundos) que se muestran en la Tabla 2, son, por supuesto, no corregidos para este efecto de temperatura (los PT expresados en segundos son lo que son). De ahí las pequeñas diferencias en el INRc que se muestran en la Tabla 1 y la Tabla 2.

30 En los gráficos de las figuras 3 y 4, se han insertado los datos de la tabla 2. Las diferencias de INRc se representan contra el contenido de apixabán de los plasmas normales (diferencia en el INRc dada por los métodos de PT con muestra de 20 μl y muestra de 5 μl (cuadrados) y la diferencia del INRc entre 10 μl y con 5 μl (puntos)). El gráfico en la figura 4 es una ampliación de una parte del gráfico en la figura 3.

Ejemplo 2

35 Se añadió apixabán en el intervalo de 0 a 1.000 μg/l a sangre citrada normal. Estas muestras de sangre y una muestra de sangre con un INR de 2,3 se analizaron mediante Simple Simon PT utilizando volúmenes de muestra de 20 μl, 10 μl y 5 μl en reactivos de 200 μl. Los resultados principales en el INR y después de una calibración relevante, INRc, se muestran en la Tabla 3:

				0,87	0,93	1,01			
				0,96	1,10	1,15			1,5
apixabán	INR	INR	INR	INRc	INRc	INRc	ΔINRc	ΔINRc	
μg/l	20 μl de sangre	10 μl de sangre	5 μl de sangre	20 μl de sangre	10 μl de sangre	5 μl de sangre	20 μl-5 μl	10 μl-5 μl	INRo
1000	8,76	3,50	2,21	6,94	3,69	2,51	4,43	1,18	0,74
714	6,06	2,78	1,87	4,88	2,86	2,08	2,80	0,78	0,91
500	4,58	2,27	1,66	3,73	2,29	1,81	1,92	0,48	1,09
250	2,61	1,64	1,32	2,18	1,60	1,39	0,79	0,21	1,07
125	1,75	1,32	1,13	1,49	1,26	1,16	0,32	0,10	1,02
63	1,41	1,19	1,04	1,21	1,12	1,06	0,15	0,06	0,96
0	1,16	1,06	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	-0,01	
N-blod 0,37	1,16	1,06	0,99	1,00	1,00	1,00	0,00	-0,01	
C-blod 2,3	2,76	2,27	2,05	2,30	2,30	2,30	0,00	0,00	

Tabla 3

5 En el presente documento se decidió, para los tres métodos de PT, que la sangre normal sin adición de apixabán debía mostrar un INRc de 1,00, y que una sangre citrada, indicado por el laboratorio central del hospital que mostraba un INR de 2,3, mostraba un INRc de 2,30. Como en ejemplos anteriores, la diferencia absoluta en los resultados de INRc (alternativamente, se puede usar la diferencia relativa) se considera como una medida del contenido de anticoagulantes, en este caso, el contenido de apixabán, y dos de las tres posibles diferencias se representan con el contenido de apixabán conocido y se muestran en las figuras 5 y 6. La diferencia en el INRc dada por los métodos de PT con 20 μl de muestra y 5 μl de muestra se muestra como cuadrados y la diferencia del INRc entre 10 μl y con 5 μl como puntos. El gráfico en la figura 6 es una ampliación de una parte del gráfico en la figura 5.

10 Las respuestas a la dosis del método de anticoagulante de la invención muestran buenas características positivas de respuesta a la dosis en un intervalo de apixabán en sangre que es de interés clínico. La respuesta a la dosis es nuevamente lineal para diferencias en el INRc de menos de la unidad, véase la figura 6.

Ejemplo 3

20 Dabigatrán es el compuesto activo formado *in vivo* cuando la preparación farmacéutica que contiene etexilato de dabigatrán, Pradaxa, Boehringer-Ingelheim, se administra por boca, es decir, oralmente. Los niveles clínicos de interés varían de 50 a 1.000 μg/l en plasma sanguíneo. Dichas muestras se crearon añadiendo pequeños volúmenes de solución madre de dabigatrán al plasma sanguíneo normal, NKP. Los resultados y el tratamiento de datos, similares a los del Ejemplo 1 se muestran en la Tabla 4.

				0,95	0,94	0,96			
				1,32	1,12	0,98			
INR de dabigatrán	INR	INR	INR	INRc	INRc	INRc	ΔINRc	ΔINRc	1
μg/l	Muestra de 20 μl	Muestra de 10 μl	Muestra de 5 μl	Muestra de 20 μl	Muestra de 10 μl	Muestra de 5 μl	20 μl-5 μl	10 μl-5 μl	INRo
1000	7,03	3,55	2,53	12,47	3,89	2,39	10,08	1,51	0,88
800	4,22	2,50	1,81	6,36	2,62	1,72	4,64	0,91	0,81
533	2,38	1,70	1,44	2,98	1,70	1,37	1,61	0,33	1,04
355	1,82	1,44	1,28	2,09	1,41	1,22	0,87	0,19	1,03
236	1,53	1,30	1,17	1,67	1,26	1,12	0,55	0,14	0,98
157	1,31	1,19	1,13	1,36	1,14	1,08	0,28	0,06	1,02
105	1,22	1,13	1,10	1,24	1,07	1,05	0,18	0,02	1,03
52	1,16	1,09	1,05	1,16	1,03	1,01	0,15	0,03	0,98
0	1,04	1,06	1,05	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	
NKP	1,04	1,06	1,05	1,000	1,000	1,000	0,00	0,00	
NKP 1:2	1,31	1,39	1,43	1,357	1,357	1,357	0,00	0,00	

Tabla 4

25 Al comparar la Tabla 4 con la Tabla 1 en el Ejemplo 1, parece que la realización mostrada de la invención es menos sensible para dabigatrán que para apixabán en plasma. La impresión se refuerza comparando los gráficos en las

figuras 7 y 8, con las figuras correspondientes del ejemplo 1.

La diferencia de INRc más sensible (20 µl menos 5 µl, mostrada como cuadrados en las figuras 7 y 8) en la parte lineal del gráfico (véase la figura 8, un aumento de una parte del gráfico en la figura 7) alcanza de 0,5 a aproximadamente 200 µg/l de dabigatrán, mientras que la misma se alcanza a aproximadamente 80 µg/l de apixabán, véase la figura 2, es decir, una diferencia de sensibilidad de más del doble. No obstante, los niveles de dabigatrán de 50 µg/l de dabigatrán parecen ser detectables. No es sorprendente que el ensayo para determinar los anticoagulantes muestra diferentes sensibilidades para diferentes anticoagulantes. Además, se esperan diferentes sensibilidades con diferentes reactivos y a diferentes temperaturas a las que se realizan los análisis de PT.

Ejemplo 4

La heparina es un anticoagulante que es difícil de determinar de manera fiable en los sitios de atención, tal como en quirófanos. Se desean métodos más convenientes. En esto, la utilidad del presente ensayo para determinar los anticoagulantes se ilustra a continuación. El ejemplo es con heparina no fraccionada, a menudo se usa como agente antitrombótico en cirugías extensas.

Las muestras se prepararon añadiendo pequeños volúmenes de una solución madre de heparina al plasma normal, NKP. En la calibración seleccionada, el INR 1,000 y el INR 1,357 se asignaron a NKP y NKP 1:2, respectivamente, que era la misma calibración relevante que la seleccionada en los Ejemplos 1 y 3 anteriores. Los detalles experimentales son los mismos que en los ejemplos 1 y 3, y los resultados y el tratamiento de datos se muestran en la Tabla 5.

				0,95	0,94	0,96			
				1,32	1,12	0,98			
NKP				INRc	INRc	INRc	ΔINRc	ΔINRc	0,43
heparina U/ml	Muestra de 20 µl	Muestra de 10 µl	Muestra de 5 µl	Muestra de 20 µl	Muestra de 10 µl	Muestra de 5 µl	20 µl-5 µl	10 µl-5 µl	INRo
5	6,47	2,10	1,35	11,17	2,16	1,29	9,88	0,87	0,91
2,5	2,46	1,40	1,13	3,12	1,37	1,08	2,04	0,29	0,96
1,2	1,47	1,19	1,11	1,58	1,14	1,06	0,52	0,08	1,03
como	1,26	1,12	1,08	1,29	1,06	1,03	0,26	0,03	1,02
0	1,04	1,06	1,05	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
NKP	1,04	1,06	1,05	1,00	1,00	1,00			
NKP 1:2	1,31	1,39	1,43	1,36	1,36	1,36			

Tabla 5

Representando la medida del contenido de anticoagulantes en el plasma normal, la diferencia absoluta en el INRc (alternativamente, se puede usar la diferencia relativa) para dos de las tres diferencias posibles contra el contenido de heparina da los gráficos en las figuras 9 y 10. Como se ve en la Tabla 5 y las Figuras 9 y 10, la heparina puede detectarse a aproximadamente 0.2 U/ml y determinarse en el intervalo de concentración de 0,2 a 5 U/ml, lo cual es de relevancia clínica.

Ejemplo 5

De acuerdo con el presente ensayo anticoagulante, se calibran dos o más métodos de PT, de los cuales uno tiene una mayor proporción de la muestra en la mezcla de reacción que otra, para que muestren, lo más cerca posible, el mismo PT para las muestras de referencia desprovistas de anticoagulantes de interés, es decir, desprovistas de anticoagulantes que se pueden determinar mediante el ensayo. Por definición, los PT de las muestras de referencia son conocidos, ya sea como promedio para un grupo de muestras de referencia, o individualmente.

En este ejemplo, las muestras de referencia son de dos tipos; muestras de plasma de individuos normales (n = 34) y muestras de plasma de pacientes tratados con warfarina (n = 30). El PT de las muestras de referencia se conoce mediante análisis de referencia realizados en el laboratorio central del Hospital Universitario de Linköping, Suecia. El PT de referencia promedio de los individuos normales y los pacientes con warfarina fue de 23,1 y 51,5 segundos, respectivamente.

Los dos métodos de PT del presente ensayo anticoagulante fueron uno con 20 µl de muestra añadida a 200 µl de reactivo de PT (mayor proporción de muestra en la mezcla de reacción) y otro con 5 µl de muestra añadida a 200 µl del mismo reactivo (menor proporción de muestra en la mezcla de reacción). Estos dos métodos mostraron PT promedio de 32,8 y 65,3 segundos, y 41,8 y 104,3 segundos para las muestras de referencia de individuos normales y de pacientes con warfarina, respectivamente. Ambos métodos de PT, el método de 20 µl y el método de 5 µl, se calibraron después para mostrar el mismo PT promedio (en segundos sintéticos) que el método de referencia para

ambos conjuntos de muestras de referencia. Esto se logró mediante las constantes A20 y B20, y A5 y B5 en la transformación de los PT del método de 20 µl y del método de 5 µl, respectivamente, en los valores de PT calibrados (PTc) mediante la expresión $PTc = A * PT_{exp}B$. Las diferencias en la PTc para cada muestra mediante los dos métodos, expresados como una relación (PT20c/PT5c) o en términos absolutos (PT20c menos PT5c), se calcularon y se representaron frente al PTc promedio de los dos métodos, véanse las figuras 11 y 12.

Dos de las muestras de referencia en el grupo de pacientes (marcadas con una X en los gráficos) mostraron diferencias que estaban estadísticamente fuera de una distribución normal de las diferencias definidas por las otras muestras de referencia (cuadrados). Estas muestras desviadas pueden contener la heparina anticoagulante, un anticoagulante que puede determinarse mediante el presente ensayo anticoagulante (véase el Ejemplo 4), y que se usa para tratar a algunos pacientes hospitalizados con warfarina mientras el tratamiento con warfarina está en vigencia.

El uso de la diferencia relativa, figura 11, o la diferencia absoluta, figura 12, entre los resultados de PT calibrados de los dos métodos de PT del ensayo es una opción. En el presente documento, la diferencia relativa, expresada como la proporción, muestra una ventaja porque la desviación estándar es casi la misma en el intervalo de PT normal que en el intervalo de PT elevado, 0,054 y 0,044, respectivamente. La proporción de PTc de las muestras de pacientes sospechosas de contener heparina mostró desviaciones positivas del promedio en 3,0 y 4,5 veces la desviación estándar definida por las otras 28 muestras de pacientes. Estadísticamente, las dos desviaciones tienen poca probabilidad, $p < 0,05$, de formar parte de una distribución de proporciones de PTc definidas por las otras muestras de pacientes.

La misma configuración experimental utilizada para analizar los 34 plasmas de referencia de individuos normales y los 30 plasmas de referencia de pacientes con warfarina también se utilizó para analizar muestras de plasma (n= 13) de pacientes sometidos a tratamiento con dabigatrán (un NOAC que inhibe la trombina), o aproximadamente para comenzar con tal tratamiento. Las 13 muestras de plasma de pacientes provenían del Departamento de Medicina Interna Aguda del Hospital Universitario de Linköping, Suecia.

Las diferencias en PT20c y PT5c para los plasmas del paciente (marcados con X), expresadas como la proporción o en números absolutos, se introdujeron en los gráficos de las muestras de referencia (marcadas con cuadrados) como se ve en las figuras 13 y 14, respectivamente.

Tres de los pacientes con NOAC mostraron diferencias de PTc que se elevaron fuera de la distribución normal definida por las muestras de referencia. Según un método establecido para determinar el dabigatrán, el método del tiempo de trombina diluido (dTT), las tres muestras que mostraron una diferencia elevada de PTc contenían 172, 224 y 350 µg/l de dabigatrán, respectivamente. Las otras 10 muestras de plasma de pacientes con NOAC, ninguno de los cuales mostró una elevada diferencia de PTc, contenían todas <30 µg/l de dabigatrán de acuerdo con el método dTT.

Curiosamente, hubo varias muestras entre las 13 muestras de pacientes con dabigatrán que mostraron valores elevados de PTc tanto con el método de 20 µl como con el método de 5 µl, pero sin diferencia significativa entre los métodos. Los hallazgos son consistentes con los efectos del tratamiento con warfarina, pero no del tratamiento con dabigatrán. El ensayo anticoagulante desvelado es, por lo tanto, capaz de hacer la distinción. Por lo tanto, el ensayo es capaz de estimar el contenido de PT y NOAC (anticoagulante) de una muestra. El no contenido de dabigatrán, <30 µg/l, de las muestras se mostró por una diferencia de PTc insignificante. El hallazgo se confirmó mediante el método establecido (dTT) para la determinación de dabigatrán. De las 13 muestras con una diferencia de PTc insignificante por el presente ensayo, 10 contenían <30 µg/l según la determinación de dTT.

Al practicar el ensayo anticoagulante, ambos métodos de PT, el que tiene alto contenido y el que tiene bajo contenido de muestra en la mezcla de reacción, están calibrados para mostrar numéricamente los niveles de referencia de PT. En este caso, en este ejemplo, los resultados de PT de los dos métodos del ensayo se calibraron para mostrar lo que se conoce como tiempo sintético, no segundos reales, sino los valores numéricos que imitan al PT, en segundos, de un método de referencia. Si el PT de las muestras de referencia se expresa en INR, los métodos de la invención se calibran para dar, lo más cerca posible, el mismo INR que estas muestras de referencia. Si las muestras de referencia tienen su PT de referencia expresado en porcentaje del PT normal, se usan estos valores en la calibración.

55 **Ejemplo 6**

Como en el ejemplo anterior 5, los dos o más métodos PT del presente ensayo anticoagulante, uno con mayor contenido de muestra en la mezcla de reacción que otro, se calibran ambos para mostrar resultados de PT de referencia con dos conjuntos de muestras de referencia; 34 plasmas de individuos normales y 30 de plasma de pacientes en tratamiento con warfarina.

Todos los valores de PT de referencia fueron determinados por el laboratorio central del Hospital Universitario de Linköping, Suecia. Como en el ejemplo 5A, los dos métodos PT fueron uno con 20 µl de muestra añadida a 200 µl de reactivo PT y el otro con 5 µl añadidos a 200 µl del mismo reactivo de PT. Los resultados de PT no calibrados se denominan PT20 y PT5, y los resultados de PT calibrados se denominan PT20c y PT5c, respectivamente.

También se analizaron mediante los dos métodos de PT muestras de plasma ($n = 20$) de pacientes en tratamiento con dabigatrán en el Departamento de Medicina Interna Aguda del Hospital Universitario de Linköping, Suecia. Todas estas 20 muestras de plasma tenían niveles de dabigatrán superiores a $34 \mu\text{g/l}$ de acuerdo con un método establecido de dTT mencionado también en el Ejemplo 5.

5 En las figuras 15 y 16, antes y después de la calibración, respectivamente, la diferencia entre los dos resultados PT del ensayo, expresado como proporciones, se representan contra la media de los dos resultados de PT. En las figuras, los cuadrados muestran los resultados con las muestras de referencia, y X los de las muestras NOAC (dabigatrán).

10 Antes de la calibración, figura 15, las muestras de referencia normales muestran un PT promedio de aproximadamente 35 segundos y las muestras de referencia de warfarina para pacientes tienen un PT promedio de aproximadamente 65 a 110 segundos. Después de la calibración, figura 16, el PT medio (PTc medio) de las muestras de referencia normales es 23,1, no segundos reales sino sintéticos, y el PTc medio de las muestras de referencia de pacientes con warfarina varía de aproximadamente 40 a 70. Después de la calibración, estos promedios y intervalos son, por
15 supuesto, muy similares a los obtenidos por el método de referencia, es decir, reflejan los valores de referencia. Al comparar la figura 15 con la figura 16, es evidente que la calibración da como resultado mejoras decisivas del presente ensayo anticoagulante. El análisis estadístico directo muestra que aproximadamente el 80 % de las muestras clínicas de dabigatrán, véase la figura 16, tiene niveles detectables de anticoagulante (proporciones de PTc superiores a la media más $2 \cdot \text{SD}$ para las muestras de referencias normales). Antes de la calibración, esto fue solo el 70 %, véase la
20 figura 15. Si no se realiza una calibración, es necesario diseñar un análisis estadístico más sofisticado y menos intuitivo. Después de la calibración, las muestras de dabigatrán muestran una diferencia de PT (diferencia de PTc) de un intervalo más amplio, más adecuado para la determinación cuantitativa de NOAC. No menos importante es la lógica del ensayo tal como la concibe un operador. Después de la calibración, el método de PT con la mayor proporción de muestra en la mezcla de reacción mostrará valores de PT más altos para muestras con anticoagulantes que el método
25 de PT con menor proporción, si no hay niveles detectables de anticoagulantes en las muestras, los dos métodos de PT, por supuesto, mostrarán más o menos lo mismo. Sin calibración no existe tal lógica directa.

Los dos métodos de PT del ensayo anticoagulante se pueden calibrar para mostrar los valores de referencia de las muestras de referencia, independientemente de cómo se expresen los valores de referencia. Los valores de referencia
30 pueden, como en este ejemplo, expresarse en PT (segundos) o pueden expresarse en INR o como fracción de la actividad normal. La calibración es en todos los casos posible y ventajosa.

Ejemplo 7

35 Los ejemplos 5 y 6 demostraron la necesidad de aumentar la sensibilidad del ensayo anticoagulante utilizado, ya que solo aproximadamente el 80 % de las muestras clínicas con niveles de dabigatrán superiores a $30 \mu\text{g/l}$ (según la metodología establecida de dabigatrán (dTT)) mostraron niveles de anticoagulantes por encima del límite de detección mediante el ensayo, véase la figura 16 (tenga en cuenta que el límite de detección está prácticamente a lo largo de la línea horizontal de 1,1).

40 El presente ejemplo describe experimentos realizados con el objetivo de mejorar la sensibilidad del ensayo. La Tabla 6 muestra datos de experimentos en los que el reactivo líquido de PT (lote P161) contenía varios niveles de CaCl_2 añadido; ya sea 4, 8, 16 o 32 mM. Con cada reactivo, se analizaron tres muestras mediante los dos métodos de PT del ensayo anticoagulante, el método de $20 \mu\text{l}$ y el método de $5 \mu\text{l}$. Dos de las muestras eran muestras de referencia,
45 los plasmas de control NKP y ZAP, con valores de INR establecidos de 1,00 y 2,50, respectivamente. La tercera muestra fue el NKP al que se le había añadido un pequeño volumen de solución madre de apixabán para dar una concentración de apixabán de $500 \mu\text{g/l}$. Los resultados con cada reactivo se calibraron después para mostrar el INRc de 1,00 para el NKP y el INRc de 2,50 para el ZAP. El NKP con $500 \mu\text{g/l}$ de apixabán (NKP + 500) mostró a continuación varios resultados de INR20c e INR5c. La diferencia, expresada como la proporción, INR20c/INR5c, se calculó para
50 cada reactivo y se muestra en la Tabla 6 en la columna al lado a la derecha.

Para obtener una medida de sensibilidad, el límite de detección se estimó a partir de la proporción de INR20c/INR5c que se observó para la muestra NKP+500. Esta estimación se realizó bajo los supuestos de que i) la SD para las proporciones de los plasmas de referencia normales fue de 0,052 para todos los reactivos (este valor se obtuvo de los
55 datos del Ejemplo 6, y que ii) la proporción menos uno aumenta desde cero en proporción al nivel de dabigatrán. Bajo estos supuestos, el límite de detección para cada reactivo se calculó como el nivel de dabigatrán en el que la proporción alcanza uno más $0,104 (2 \cdot \text{SD})$. Los límites de detección calculados se muestran en la columna del extremo derecho de la Tabla 6.

60 El límite de detección más alto (sensibilidad más baja), aproximadamente $94 \mu\text{g/l}$, se obtuvo con un reactivo que contenía 4 mM de CaCl_2 . Para un reactivo que contenía 8 mM de CaCl_2 , la sensibilidad fue mayor y el límite de detección de aproximadamente $70 \mu\text{g/l}$, y para un reactivo con CaCl_2 16 mM, la sensibilidad fue aún mayor con un límite de detección de $38 \mu\text{g/l}$. Un mayor contenido de reactivo de CaCl_2 (24 y 32 mM) no aumentó aún más la sensibilidad y el límite de detección permaneció aproximadamente al mismo nivel que con CaCl_2 16 mM en el reactivo.
65

		Método de 20ul	Método de 5 ul	Método de 20ul	Método de 5 ul	Método de 20ul	Método de 5 ul		apixabán
ID de reactivo	añadido	NKP	NKP	ZAP	ZAP	NKP+500	NKP+500	proporción	detección
	Ca ²⁺ (mM)	INR20C	INR5c	INR20C	INR5c	(NR20c	INR5c	INR20c/INR5c	límite de ug/l
P161 con cero Ca ²⁺	4	1,00	1,00	2,50	2,50	1,83	1,18	1,55	94
P161 con cero Ca ²⁺	8	1,00	1,00	2,50	2,50	2,15	1,23	1,75	70
P161 con cero Ca ²⁺	16	1,00	1,00	2,50	2,50	3,15	1,33	2,37	38
P161 con cero Ca ²⁺	24	1,00	1,00	2,50	2,50	3,30	1,41	2,34	39
P161 con cero Ca ²⁺	32	1,00	1,00	2,50	2,50	3,38	1,49	2,27	41

Tabla 6

5 La Tabla 6 muestra que un contenido de calcio ionizado en el reactivo de PT en el intervalo de aproximadamente 10 a 50 mM da como resultado una mayor sensibilidad del presente ensayo anticoagulante. Esto se manifiesta como un límite de detección disminuido. El nivel de calcio ionizado en la mezcla de reacción es, porque el reactivo se diluye solo marginalmente mediante la adición de muestra, aproximadamente el mismo que en el reactivo de PT (diluido en aproximadamente un 10 % en un método de 20 µl y en aproximadamente un 3 % en un método de 5 µl). Los resultados son sorprendentes e inesperados, ya que el nivel de calcio ionizado es normalmente de aproximadamente 8 mM en la mezcla de reacción de los métodos de PT estándar. Este nivel se alcanza normalmente mediante la adición de la sal de calcio soluble CaCl₂ al reactivo de PT, pero son posibles otras fuentes de iones de calcio, incluido hidróxido de calcio, lactato de calcio y otras sales de calcio solubles que comprenden aniones no perturbadores. Incluso la adición de calcio metálico es posible, aunque menos práctico.

10 Un aumento en la concentración de calcio ionizado en la mezcla de reacción de PT dio como resultado un aumento progresivo del tiempo necesario para alcanzar el punto de coagulación, el tiempo de coagulación. Para el método de 5 µl y la muestra de NKP (INR 1,00), el tiempo de coagulación fue de 42,1, 47,4, 52,5, 70,1 y 82,1 segundos para contenidos de iones de calcio de aproximadamente 4, 8, 16, 24 y 32 mM, respectivamente, en la mezcla de reacción. Un aumento en los niveles de calcio ionizado por encima de lo necesario para un aumento ventajoso de la sensibilidad del ensayo, debido al aumento del tiempo de coagulación, se percibe como desventajoso. Debido a esto, un nivel de concentración de iones de calcio ionizado preferido está en el intervalo de entre 10 y 30 mM o incluso dentro del intervalo de entre 10 y 24 mM.

25 En las reacciones de coagulación, el magnesio ionizado a menudo puede reemplazar las funciones del calcio ionizado. Este también podría ser el caso. Por lo tanto, los límites de los niveles de calcio ionizado establecidos podrían considerarse como límites para la suma de los niveles de calcio ionizado y los niveles de magnesio ionizado.

30 En experimentos adicionales destinados a aumentar la sensibilidad del ensayo anticoagulante, los niveles de NaCl aumentaron en el reactivo PT a niveles que hicieron que el reactivo PT fuera hipertónico (presión osmótica más alta que la del plasma sanguíneo y otras soluciones fisiológicas), por tanto, también hizo que la mezcla de reacción fuera hipertónica. Esto aumentó la sensibilidad del ensayo anticoagulante. El aumento de la sensibilidad del ensayo anticoagulante por el aumento de la osmolaridad también tiene un alcance limitado porque los tiempos de coagulación pueden ser excesivamente largos si los niveles de NaCl son demasiado altos. En la práctica, para aumentar la sensibilidad del ensayo anticoagulante, la osmolaridad de la mezcla de reacción puede aumentarse para estar dentro del intervalo de 0,3 a 0,5 Osm/kg, o puede estar aún más limitada para estar dentro del intervalo de 0,3 y 0,4 Osm/kg. Normalmente, la osmolaridad de las mezclas de reacción de los métodos de PT es bastante cercana a 0,308 osm/kg fisiológicos, lo mismo que una solución de NaCl 0,154 M.

40 Es concebible que una combinación de las medidas descritas anteriormente que aumentan la sensibilidad del ensayo anticoagulante se puede combinar para proporcionar la alta sensibilidad más ventajosa. La mezcla de reacción puede ser hipertónica mediante la adición de NaCl en el intervalo entre 0,3 y 0,4 Osm/kg y también tener niveles de calcio ionizado en el intervalo de 12 a 30 mM.

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo para determinar los anticoagulantes en una muestra de sangre o de plasma sanguíneo, en el que los anticoagulantes determinados en dicho ensayo son inhibidores de acción directa de los factores de coagulación activados IIa y Xa, que se seleccionan de un grupo que consiste en dabigatrán, apixabán, rivaroxabán o hirudina o inhibidores de acción indirecta de los factores de coagulación activados IIa y Xa, seleccionados de un grupo que consiste en heparinas fraccionadas o no fraccionadas, en donde dicho ensayo comprende análisis con al menos dos métodos de tiempo de protrombina (PT) de química húmeda, comprendiendo el ensayo las etapas de:
- 5 a) en un primer análisis de PT con un primer método de PT, medir el PT en una primera mezcla de reacción que comprende un primer volumen de sangre o de plasma sanguíneo diluidos en un primer volumen de un reactivo líquido que comprende tromboplastina, fibrinógeno y factor de coagulación V;
- 10 b) en un segundo análisis de PT con un segundo método de PT, medir el PT en una segunda mezcla de reacción que comprende un segundo volumen de dichos sangre o plasma sanguíneo diluidos en un segundo volumen de dicho reactivo líquido que comprende tromboplastina, fibrinógeno y factor de coagulación V, en donde la concentración de sangre o de plasma sanguíneo en la segunda mezcla de reacción difiere de la concentración de sangre o de plasma sanguíneo en la primera mezcla de reacción;
- 15
- caracterizado por que**
- 20 dichos al menos dos métodos de PT se calibran para:
- dar los mismos resultados de PT, o aproximadamente los mismos, cuando se usan para analizar sangre o plasma sanguíneo de referencia que carecen de anticoagulantes de interés para dicho ensayo;
- 25 y en donde el ensayo comprende además la etapa de:
- c) calcular una diferencia en el PT con respecto a las mediciones en las etapas a) y b), en donde si dicha diferencia en el PT es
- 30 1) significativa, es indicativo de una presencia de anticoagulantes en la muestra de sangre o de plasma sanguíneo; o
- 2) no significativa, es indicativo de una ausencia de anticoagulantes por encima del nivel detectable en la muestra de sangre o de plasma sanguíneo.
- 35 2. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que si la diferencia en el PT calculada en la etapa c) es significativa y se conoce la identidad del anticoagulante, se puede calcular una concentración del anticoagulante en dicha muestra de sangre o de plasma sanguíneo.
- 40 3. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que si la diferencia en el PT calculada en la etapa c) no es significativa y se conoce la identidad del anticoagulante, el nivel por encima del cual el anticoagulante no está presente en dicha muestra de sangre o de plasma sanguíneo es asignable.
- 45 4. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que si la diferencia en el PT calculada en la etapa c) es significativa, se puede calcular un PT estimado de la muestra de sangre o de plasma sanguíneo en ausencia de anticoagulantes.
- 50 5. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los análisis del PT se realizan a temperatura ambiente en el intervalo de 17 °C a 45 °C, preferentemente en el intervalo de 18 °C a 30 °C, más preferentemente en el intervalo de 21 °C a 30 °C y, lo más preferentemente, en el intervalo de 25 °C a 30 °C.
6. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer volumen del reactivo líquido en la primera mezcla de reacción es igual al segundo volumen del reactivo líquido en la segunda mezcla de reacción.
- 55 7. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el volumen de sangre o de plasma sanguíneo diluido en el reactivo líquido está en el intervalo de 1 a 20 µl.
8. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el volumen de sangre o de plasma sanguíneo se añade al reactivo líquido con un capilar de extremo a extremo.
- 60 9. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una proporción entre el volumen de sangre o de plasma sanguíneo y el volumen de reactivo líquido en la mezcla de reacción es de 1:2 a 1:200, de 1:5 a 1:100 o de 1:10 a 1:50.
- 65 10. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una concentración de sangre o de plasma sanguíneo en la primera mezcla de reacción es de aproximadamente 1,5 a 100 veces, de 1,5 a 50 veces, de 1,5 a 25 veces, de 1,5 a 10 veces o de 1,5 a 5 veces mayor que la concentración de sangre o de plasma sanguíneo

en la segunda mezcla de reacción.

5 11. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de reacción comprende una concentración final de iones de calcio en el intervalo de 10 a 50 mM, en el intervalo de 10 a 30 mM o en el intervalo de 10 a 24 mM.

12. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la osmolaridad de la mezcla de reacción es de aproximadamente 0,3 a 0,5 Osm/kg o de aproximadamente 0,3 a 0,4 Osm/kg.

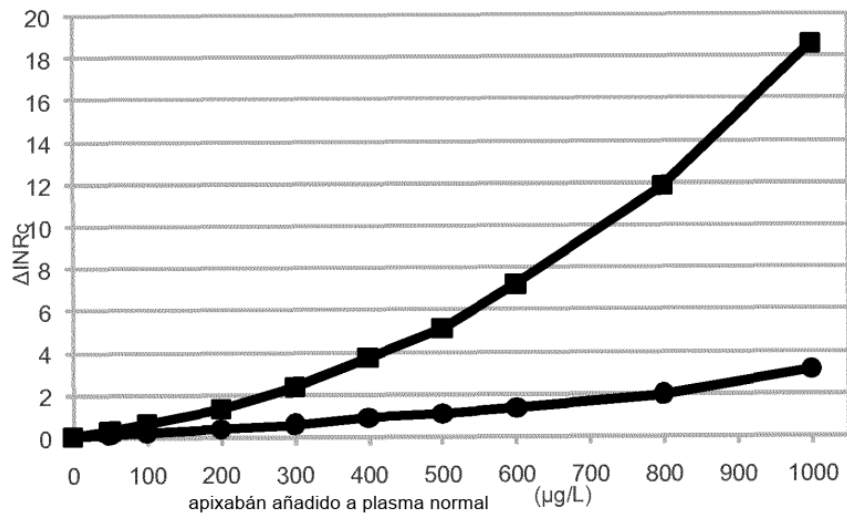


Fig. 1

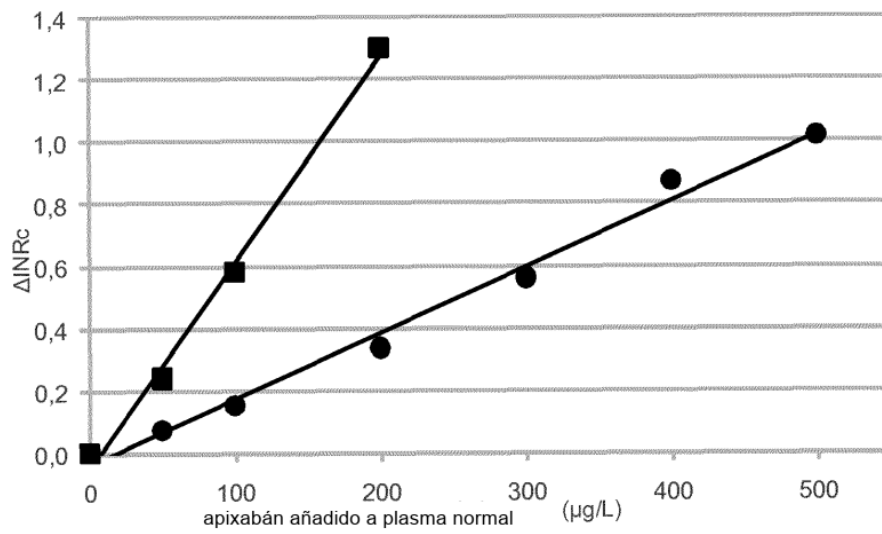


Fig. 2

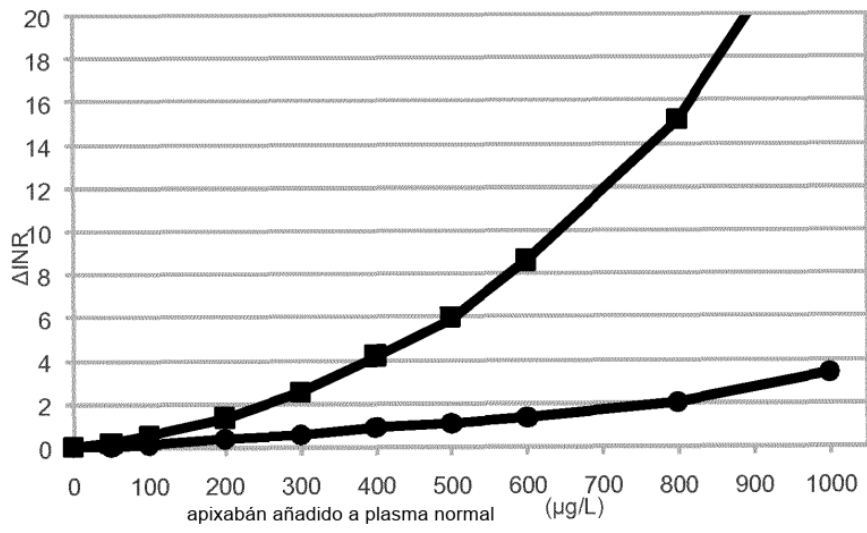


Fig. 3

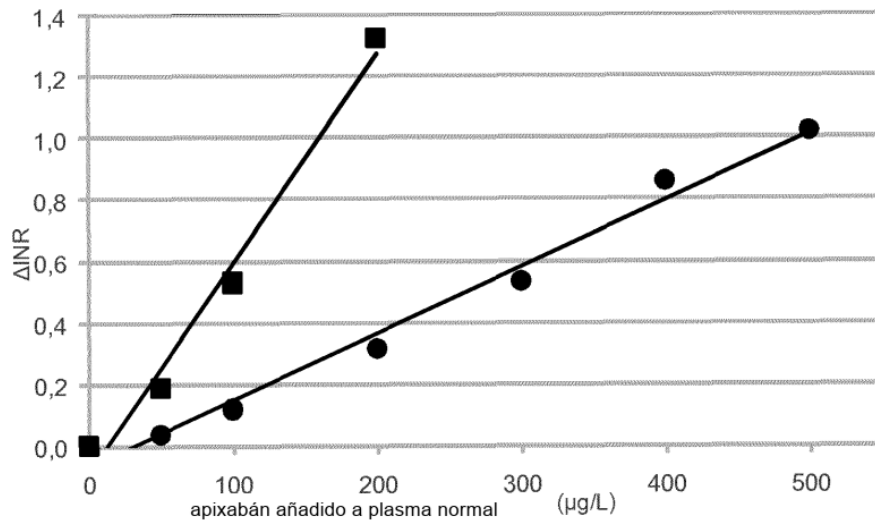


Fig. 4

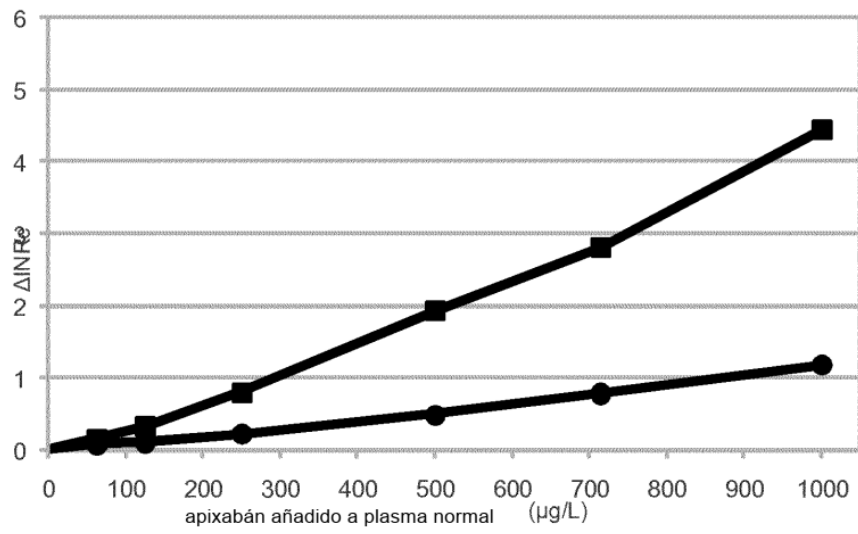


Fig. 5

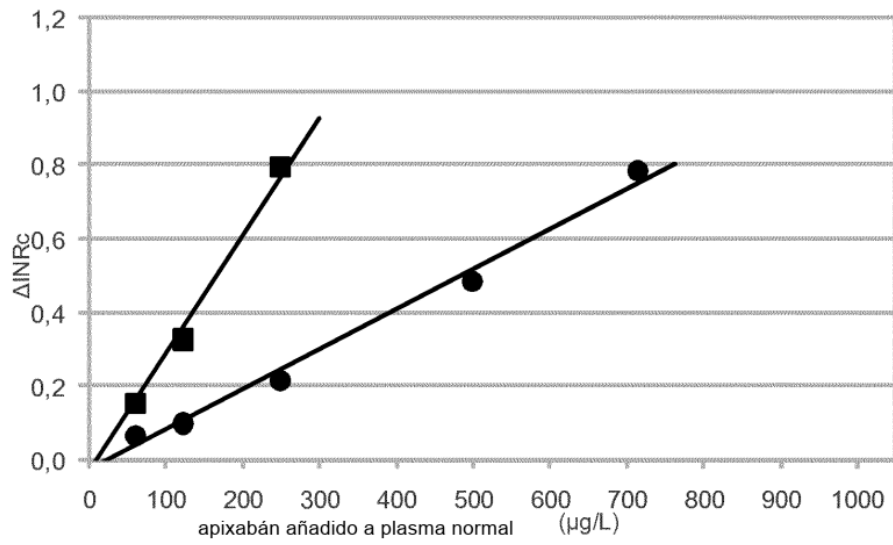


Fig. 6

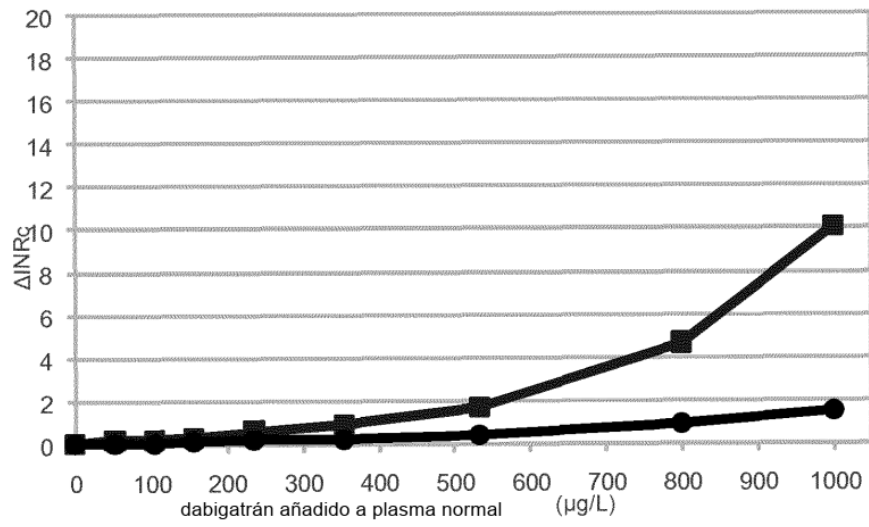


Fig. 7

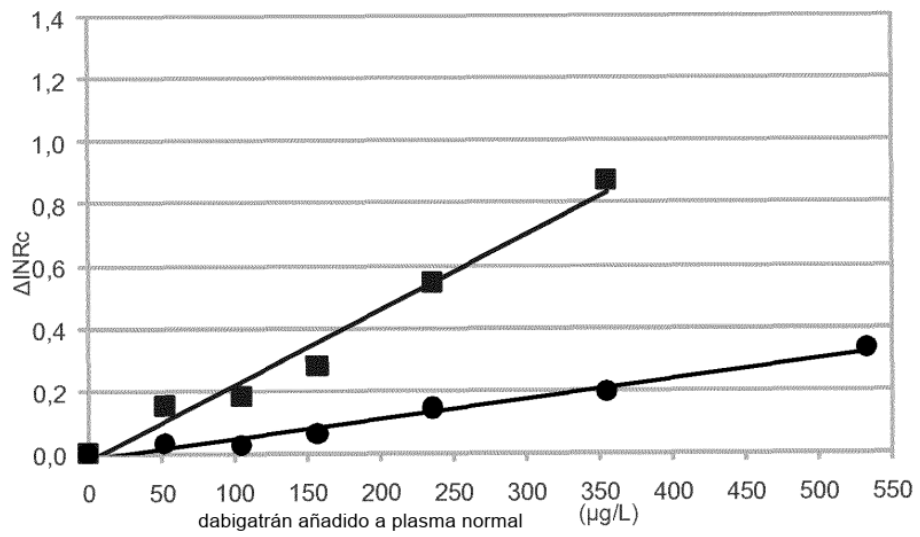


Fig. 8

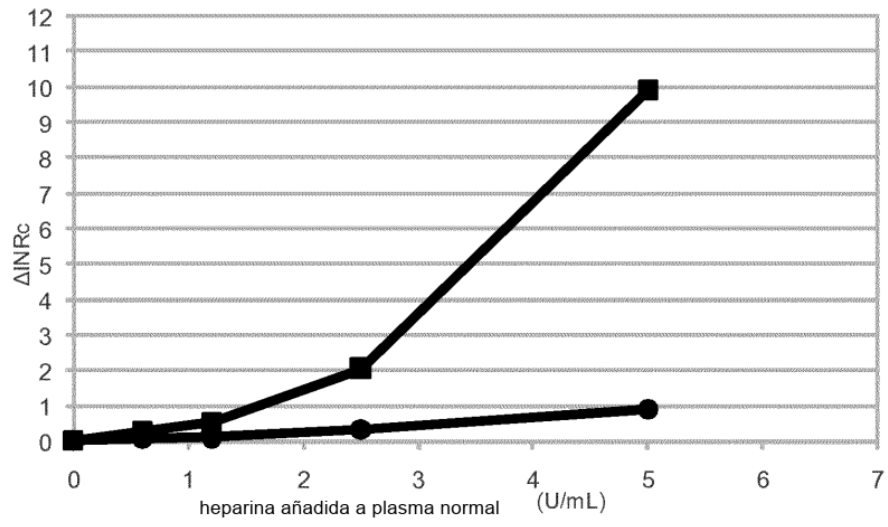


Fig. 9

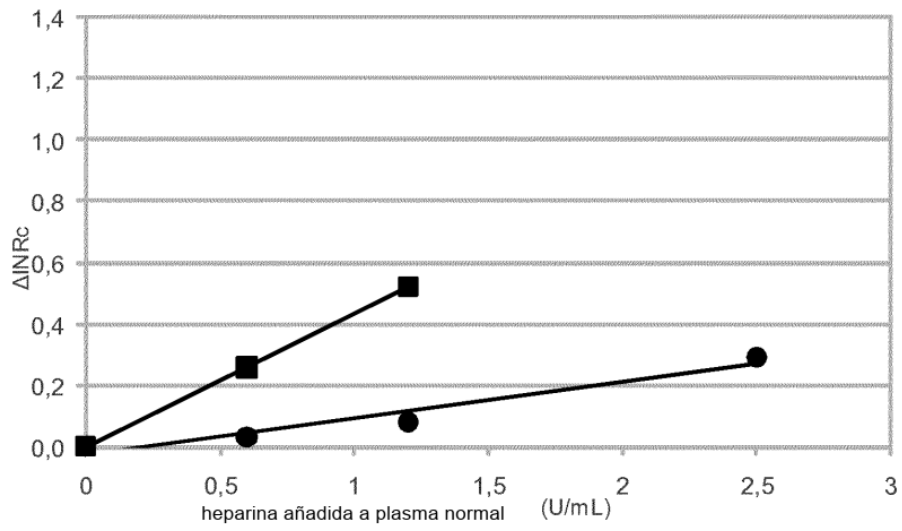


Fig. 10

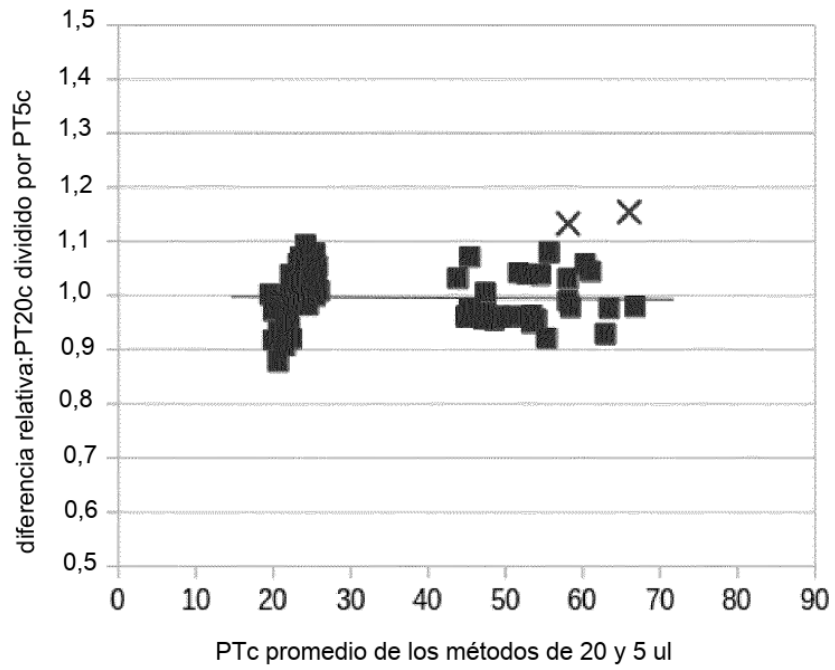


Fig. 11

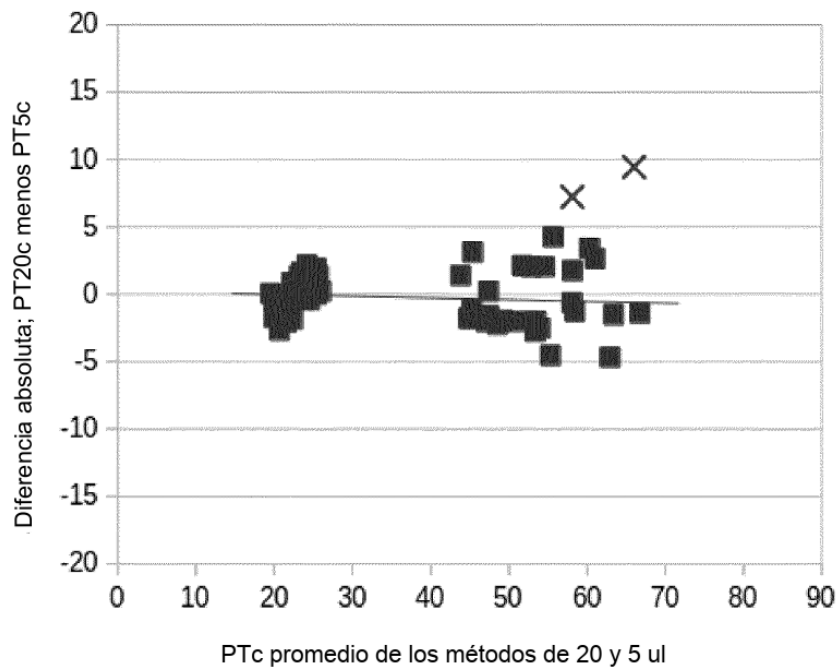


Fig. 12

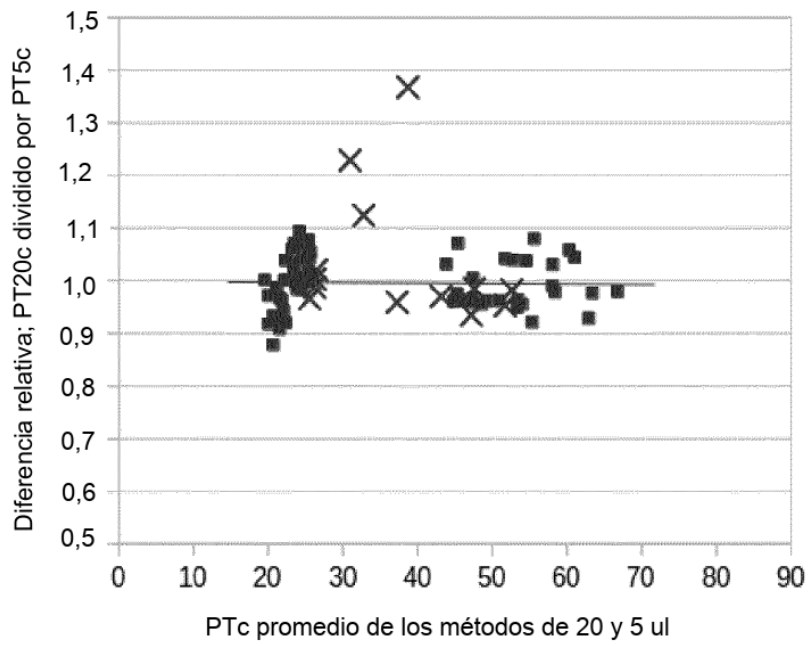


Fig. 13

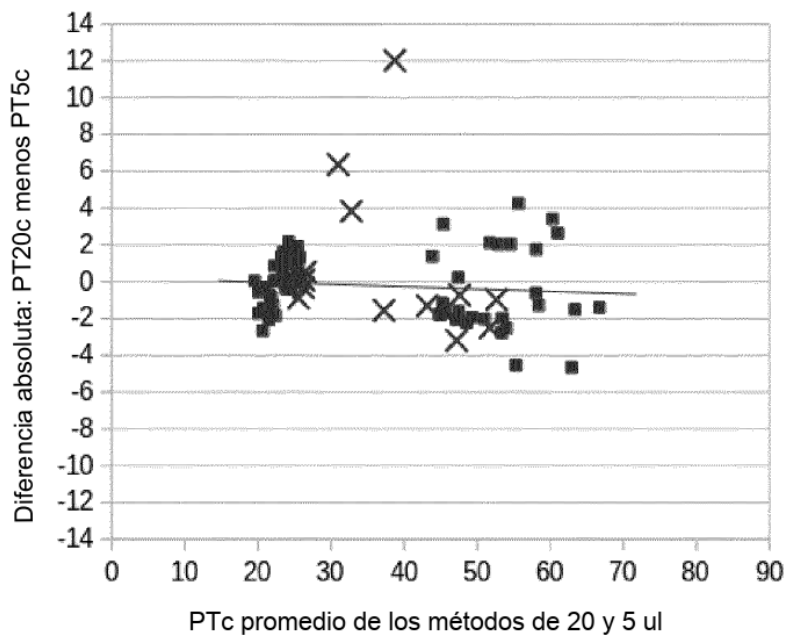


Fig. 14

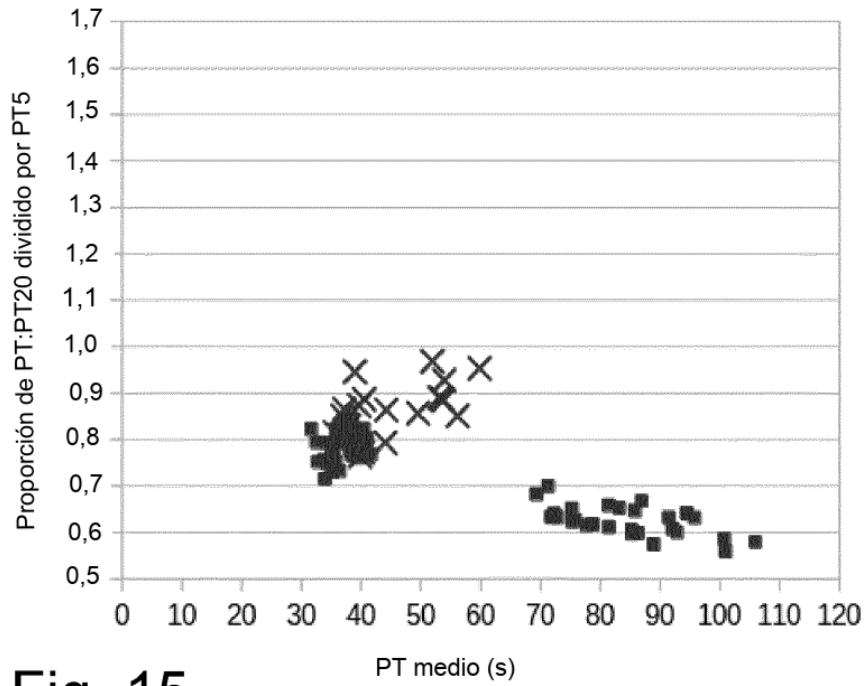


Fig. 15

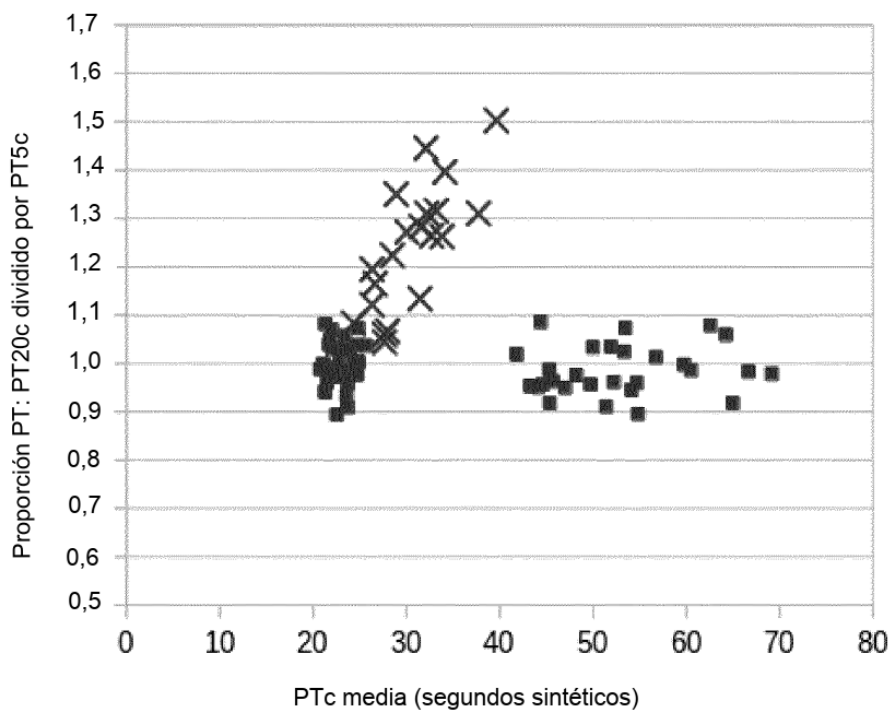


Fig. 16