(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 125**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/96 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06010455 .1**
(96) Fecha de presentación : **20.05.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1734369**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

(54) Título: **Procedimiento para la estandarización de ensayos de coagulación.**

(30) Prioridad: **16.06.2005 DE 10 2005 028 018**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.06.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.06.2009

(73) Titular/es:
Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Görzhäuser Hof, Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE

(72) Inventor/es: **Wilkens, Matthias y**
Zander, Norbert

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la estandarización de ensayos de coagulación.

La presente invención se refiere al sector del diagnóstico de la coagulación y se refiere a un procedimiento para la estandarización de los ensayos de coagulación *in vitro*.

Los ensayos de coagulación hacen posible la medición de la actividad de un factor individual o de varios factores de coagulación por medición de la velocidad de formación de fibrina *in vitro*, es decir fuera del cuerpo humano o animal (coagulometría). El resultado primario de estos ensayos es un tiempo de coagulación, que habitualmente se mide en segundos desde el instante de la adición de un activador y/o de iones Ca^{2+} a la muestra o, respectivamente, mezcla de muestras, hasta la formación de un coagulo de fibrina detectable. Tiempo de coagulación es, por tanto, una medida del potencial hemostático, la capacidad de coagulación, de una muestra, en la que participan las influencias de todos los factores y sustancias contenidas en la muestra que fomentan y que impiden la coagulación y que son captadas por el correspondiente ensayo.

Los tiempos de coagulación se pueden determinar por métodos manuales o automáticos. En la determinación automática está muy extendida la medición de una propiedad mecánica u óptica de la mezcla de muestras/mezcla de reactivos, por ejemplo de la viscosidad o turbidez. En todos los casos de medición automática se mide de forma continua una propiedad de la mezcla de muestras/mezcla de reactivos, y a partir de la variación de la propiedad en función del tiempo se puede determinar, con ayuda de procedimientos de evaluación, el tiempo de coagulación como punto final.

Ejemplos típicos de estos ensayos de coagulación son el tiempo de protrombina (PT), el cual también se denomina ensayo Quick o tiempo de tromboplastina, el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA), el tiempo de trombina (TT), el tiempo de batroxobina (BT) o el tiempo de ecarina (ECT). Estos ensayos y sus variantes se utilizan corrientemente para el "screening" de defectos en una zona parcial del sistema de coagulación (ensayo de "screening", ensayos globales, ensayos de búsqueda) o para medición de la actividad de factores individuales. [Aspecto general en Barthels, M. y von Depka, M: Das Gerinnungskompendium, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2003]. A los defectos del sistema de coagulación, los cuales pueden tener como consecuencia una tendencia a hemorragias o a una trombosis, pertenecen por ejemplo (a) concentraciones o actividades muy bajas o muy elevadas de los factores de coagulación, (b) mutantes de los factores de coagulación, (c) concentraciones o actividades muy bajas o muy elevadas de inhibidores, (d) mutantes de inhibidores o (e) anticuerpos contra elementos del sistema de coagulación.

El documento de patente US 5,670,329 describe, por ejemplo, un procedimiento para la determinación cuantitativa del factor individual fibrinógeno de una muestra por medio del tiempo de trombina. Para ello, se miden los tiempos de coagulación de calibradores con contenidos conocidos de fibrinógeno, en el mismo sistema local de ensayo que el de la muestra a determinar, y el tiempo de coagulación medido de la muestra se transforma en el contenido de fibrinógeno de la muestra con ayuda de una curva de calibración, que fue trazada a partir de la correspondencia de los contenidos conocidos de fibrinógeno y de los tiempos de coagulación de los calibradores, medidos. El procedimiento descrito en el documento US 5,670,329 se puede utilizar también como ensayo de "screening" para concentraciones de fibrinógeno anormales, siempre que el material de muestra se utilice sin diluir.

En la rutina clínica diaria se emplean ensayos de "sceening" en primer lugar para el diagnóstico de diatesis hemorrágicas o trombófilas, así como también para el control de terapias con medicamentos que influyen sobre el sistema de coagulación. Por ejemplo, la determinación de la TTPA sirve por un lado para el "screening" de defectos de la zona de la cascada de coagulación que se inicia por la denominada vía intrínseca y que confluye en la vía conjunta, y la cual se compone de los factores de coagulación FVIII, FIX, FXI, FXII, precalicreína, HMW quininógeno, FV, FX, FII y fibrinógeno. Un resultado del TTPA por encima del rango normal, es decir un tiempo de coagulación prolongado, puede apuntar a un defecto de uno o varios de estos factores, por ejemplo a un defecto de FVIII, también conocido como hemofilia A. Por otra parte, el TTPA reacciona también de forma sensible a la presencia de anticoagulantes como, por ejemplo, de heparina, y por lo tanto se utiliza también para el control de las terapias con heparina.

Para el dictamen médico del resultado de un ensayo de coagulación, el resultado del ensayo de una muestra del paciente se compara con un denominado rango de referencia (denominado también rango normal). El rango de referencia de un ensayo de coagulación se determina llevando a cabo el ensayo en un gran número de personas aparentemente sanas (preferentemente ≥ 20). Algunas de las personas sanas tendrán valores de ensayo bajos, otras algo más altos, la mayoría de los valores oscilarán alrededor de un valor medio. Si se representan los valores del ensayo en el eje X y el número de personas en el eje Y, se obtiene en el caso ideal una distribución normal. Con métodos estadísticos se determina habitualmente el límite inferior y superior de referencia, dentro del cual se encuentra el 90% de las personas sanas. Por lo regular, el rango de referencia (rango normal) comprende el 90% de los valores que se midieron en el caso de personas de referencia sanas. Circunstancialmente, para un ensayo es necesario establecer diferentes rangos de referencia, por ejemplo en función de la edad o del sexo.

Si el resultado del ensayo de un paciente difiere del rango de referencia, ello puede indicar una perturbación del equilibrio hemostático. Una desviación del rango de referencia del TTPA en el sentido de tiempos de coagulación más largos puede indicar, por ejemplo, un defecto del factor VIII, una desviación del rango de referencia del PT en el sentido de tiempos de coagulación más cortos puede indicar, por ejemplo, un nivel incrementado del factor II,

provocado por ejemplo por una mutación en la región promotora del gen del factor II, la cual conduce a una síntesis incrementada de factor II.

En el control de terapias con medicamentos que influyen sobre el sistema de coagulación, como por ejemplo la terapia con anticoagulantes, se trata del ajuste del sistema de coagulación del paciente a una determinada magnitud diana. En este caso, la medicación se varía tantas veces hasta que el resultado del ensayo de la muestra del paciente se encuentre en un denominado rango terapéutico definido. El rango terapéutico se obtiene por lo regular a partir de amplios estudios clínicos. Para ello se establece un máximo de eficacia terapéutica y un mínimo de efectos secundarios no deseados, en relación con un determinado rango de valores del resultado diagnóstico de un ensayo o, respectivamente, con un determinado rango de concentración del medicamento.

La inhibición medicamentosa de la capacidad de coagulación por la administración de anticoagulantes, como por ejemplo heparina, juega un importante papel en la profilaxis o terapia de incidentes tromboembólicos. La eficacia de la anticoagulación se mide por el número de incidentes tromboembólicos no deseados en la clínica. Efectos secundarios no deseados de la anticoagulación pueden ser las complicaciones hemorrágicas. El rango terapéutico de los valores de un ensayo, adecuado para el control de una terapia anticoagulante, es por lo tanto el rango de los valores de medida del ensayo en el cual, en un estudio clínico, se observó un mínimo de complicaciones tromboembólicas, así como hemorrágicas.

Es conocido que los resultados de los ensayos hemostáticos están sujetos a una varianza y, por lo tanto, no son comparables sin más. Esta varianza radica entre otras cosas en la utilización de diferentes reactivos y en diferencias técnicas en la obtención del tiempo de coagulación. Así por ejemplo, para la obtención del tiempo de protrombina (PT) se dispone de un gran número de tromboplastinas tisulares. El PT de una misma muestra de plasma se puede diferenciar hasta en un factor 2 según la tromboplastina tisular empleada. Incluso en caso de la utilización de una tromboplastina tisular especial varía el tiempo de coagulación de una muestra según el fabricante, según la carga de un fabricante o, en circunstancias, según el frasco de una sola carga. Además, en el caso de la determinación automática de un tiempo de coagulación el propio aparato de medida y el modo de detectar el coagulo ejerce una influencia sobre el tiempo de coagulación. La medición de una misma muestra con la misma tromboplastina tisular con diferentes aparatos proporciona diferentes resultados del ensayo.

En la práctica, para un ensayo de coagulación utilizado, cada laboratorio establece rangos terapéuticos y rangos de referencia locales, internos del laboratorio. Para hacer posible al médico de tratamiento el enjuiciamiento del resultado de un ensayo, junto al propio resultado del ensayo se tienen que proporcionar también al mismo tiempo información sobre los rangos de referencia locales o, respectivamente, los rangos terapéuticos de un ensayo.

En el estado actual de la técnica se conocen diferentes procedimientos de estandarización que tienen como fin compensar las diferencias de los resultados del ensayo que dependen de los reactivos, del fabricante, de la carga y del aparato. La estandarización de los resultados de ensayo o, respectivamente, la capacidad de comparación de los resultados de ensayos es particularmente ventajosa por diferentes motivos. Por un lado, se hace posible por ello equiparar globalmente entre sí los resultados de ensayo que se obtuvieron en diferentes laboratorios en el marco de estudios clínicos y, por otro lado, se simplifica sensiblemente la interpretación de los resultados de ensayo de los pacientes.

Los procedimientos de estandarización habituales se basan en diluciones de plasmas normales (estandarización en % de la norma, por ejemplo en un ensayo Quick), obtención de la relación (estandarización relativa), así como obtención de la relación normalizada (relación normalizada internacional INR en el caso del ensayo de protrombina.

En el caso de la utilización de diluciones de plasma normal, se prepara primeramente una mezcla de plasma de referencia (mezcla de plasma normal) a partir del plasma de por lo regular al menos 20 donantes aparentemente sanos. La actividad o respectivamente el potencial hemostático de este estándar se define con 100% de la norma. Se preparan diluciones de este plasma estándar en una matriz adecuada. Por ejemplo, una parte de la mezcla de plasma normal se mezcla con dos partes de un tampón adecuado (dilución 1:2) y se define con una actividad del 33,33% de la norma. Por medición de la mezcla de plasma normal y la serie de diluciones de esta mezcla se traza una curva de referencia (curva de calibración) con ayuda del sistema de ensayo a estandarizar, relacionando las actividades definidas en % de la norma con los valores en bruto medidos. Para las muestras de los pacientes se puede medir después en el sistema de ensayo estandarizado el valor en bruto y finalmente, con ayuda de la curva de referencia, se puede transformar en un valor calibrado o, respectivamente, en un resultado estandarizado del ensayo, a saber en % de la norma.

En los procedimientos de estandarización que se basan en la obtención de una relación, en principio hay que diferenciar dos modos de proceder. En el primer caso, para cada muestra se realizan dos ensayos diferentes y los resultados se disponen en forma de proporción (relación) uno de otro. Para esta relación se pueden determinar rangos de referencia y rangos terapéuticos. En el segundo caso, en el mismo sistema de ensayo se obtienen el resultado de una muestra del paciente y el resultado de una mezcla de plasma normal, y se establece la relación. Un procedimiento de este tipo existe, por ejemplo, para la estandarización del tiempo de protrombina (PT), en el cual la proporción de protrombina (PR) indica la relación del PT de una muestra del paciente al PT de un plasma normal ($PR = PT_{paciente} / PT_{normal}$).

Para otra estandarización de la relación de protrombina (PR) se creó por la Organización Mundial de la Salud (WHO) una tromboplastina de referencia con la cual se pueden comparar las relaciones de protrombina obtenidas con otras tromboplastinas, de manera que la PR obtenida se podía transformar por cálculo en una relación internacional normalizada (INR). Como medida de la sensibilidad de un reactivo de tromboplastina en comparación con la sensibilidad del reactivo de tromboplastina del WHO se introdujo un factor de corrección, el índice internacional de sensibilidad (ISI), de manera que la INR se podía calcular según la fórmula $INR = PR^{ISI}$. Para el reactivo de tromboplastina del WHO, el valor de ISI se define con 1,0, de modo que INR = PR. Para todas las demás tromboplastinas se indican los valores ISI por los fabricantes.

A pesar de estos esfuerzos, en una serie de ensayos de coagulación, por ejemplo en el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA), en el tiempo de trombina (TT), en el tiempo de batroxobina (BT) o en el tiempo de ecarina (ECT) no es posible hasta el momento una estandarización convincente. Ciertamente que en el pasado hubo intentos de estandarizar el TTPA, análogamente al tiempo de protrombina, estableciendo una relación entre el TTPA de una muestra del paciente y el TTPA de un plasma normal, y se trató de definir el rango terapéutico para la relación de TTPA en 1,5-2,5. No obstante, el procedimiento no se consolidó nunca, puesto que también los valores estandarizados (relación de TTPA) presentaban una varianza demasiado grande como para garantizar una capacidad de comparación aceptable de los resultados de las mediciones [Brill-Edwards, P. *et al*., (1993) Establishing a therapeutic range for heparin therapy. Ann. Intern Med. 119 (2), 104-109). De forma alternativa, análogamente al cálculo de la INR, se intentó establecer para el tiempo de protrombina una estandarización del TTPA a través de un reactivo de referencia [Reed, S. V. *et al*. (1994) An attempt to standardize the TTPA for heparin monitoring, using the P.T. ISI/INR system of calibration. Results of a 13 centre study. Thromb Res. 74 (5) 515-522; van der Velde, E. A. & Poller, L. (1995) The TTPA monitoring of heparin - the ISTA/ICSH collaborative study. Thromb Haemost. 73(1), 73-81]. Sin embargo, los resultados fueron ampliamente desalentadores, puesto que, de igual modo, no se pudo conseguir ninguna posibilidad de comparación aceptable de los resultados de medición.

Particularmente problemática es la ausencia de estandarización de los ensayos de coagulación en el control de terapias con anticoagulantes. La problemática se va a exponer aquí a modo de ejemplo, en el ejemplo del control de un tratamiento con herparina con ayuda del TTPA.

La heparina inhibe inmediatamente y en función de la dosis el sistema de coagulación. Se utilizan heparina no fraccionada (UFH) así como heparinas de bajo pero molecular (LMWH). Una terapia con heparina se efectúa en el caso de incidentes tromboembólicos que ya han tenido lugar o que se presentan de forma aguda. Una profilaxis con heparina debe impedir la aparición de incidentes trombóticos. Como rangos terapéuticos tanto para la terapia con heparina, así como también para la profilaxis con heparina se indican habitualmente los niveles de heparina a ajustar (en UI/ml). Así, para la terapia con heparina es válido un rango terapéutico de 0,3 - 0,7 UI/ml y para la profilaxis con heparina, un rango terapéutico de aproximadamente 0,05 - 0,25 UI/ml.

La terapia y profilaxis con heparina, especialmente con heparina no fraccionada se puede controlar, por un lado, con métodos que miden directamente el nivel de heparina y también, por otro lado, con ensayos de coagulación que miden la influencia de la heparina sobre la capacidad de coagulación de la sangre.

La determinación directa del nivel de heparina se efectúa, por ejemplo, a través de métodos denominados en base del factor Xa o de métodos anti-Xa, en los que se mide la actividad inhibidora del factor Xa de una muestra del paciente. Este ensayo se puede estandarizar con ayuda de estándares internacionales de heparina y proporciona, por lo tanto, un resultado estandarizado comparable, en forma de un valor de la concentración en unidades internacionales por mililitro (UI/ml). Sin embargo, este método para la determinación del nivel de heparina no se ha impuesto en el diagnóstico rutinario, puesto que el sistema de ensayo necesario es caro y no se dispone de él en muchos laboratorios.

De forma alternativa, hoy en día el control de una terapia con heparina se lleva a cabo a través de la medición del TTPA. En el caso del control de una terapia con heparina con ayuda del TTPA se trata de dirigir la administración de heparina de tal modo que se obtenga un resultado del TTPA en el rango terapéutico. Puesto que en virtud de la varianza de los valores del TTPA, dependiente del sistema de ensayo, no existe ningún rango terapéutico estandarizado para los valores del TTPA, es necesario determinar el rango terapéutico para cada sistema de ensayo. Para la determinación del rango terapéutico del ensayo de TTPA para la heparina no fraccionada existen fundamentalmente dos posibilidades [Nelson, D. E. (1999) Current considerations in the use of the TTPA in monitoring unfractionated heparin. Clin. Lab Sci. 12 (6), 359-64; Olson, J. D. *et al* (1998) College of American Phatologists Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy: laboratory monitoring of unfractionated heparin therapy. Arch Pathol Lab Med. 122 (9), 782-98]:

En el denominado procedimiento *ex-vivo* se toman muestra de plasma de un grupo de pacientes tratados con heparina. De cada muestra se determina el nivel de heparina en UI/ml en un ensayo de factor Xa y se determina el TTPA con un sistema de ensayo. A continuación, se lleva a cabo una regresión lineal entre las dos tandas de datos (nivel de heparina en UI/ml y TTPA en s). El rango terapéutico en el sistema de ensayo del TTPA es el rango de valores que corresponde al rango de concentraciones de heparina de 0,3 - 0,7 UI/ml (véase también Ejemplo 1). El procedimiento *ex vivo* es relativamente complejo y también caro. Presupone un mayor número de muestras de pacientes y muestras normales disponibles, así como la disponibilidad de un método basado en el factor Xa para la determinación del nivel de heparina.

En virtud de la desventaja del método *ex vivo*, anteriormente citada, se ha impuesto en la práctica de laboratorio un denominado método *in vitro*. En este procedimiento, para la determinación del rango terapéutico de un ensayo del TTPA se añade a una mezcla de plasma normal (se adereza con) cantidades estandarizadas de heparina y se determina el TTPA de las muestras, así preparadas. Sin embargo, es imprescindible tener en cuenta que una muestra *in vitro* (por ejemplo plasma normal "aderezado" con heparina) comparada con una muestra *ex vivo* con igual nivel de heparina puede conducir a otros tiempos de coagulación. Por lo tanto, para la determinación del rango terapéutico de un ensayo de TTPA con ayuda de un procedimiento *in vitro* se tienen que tener en cuenta otros límites para el contenido de heparina de las muestras de calibración. En las publicaciones, un rango de concentraciones de heparina *ex vivo* de 0,3 - 0,7 UI/ml se corresponde con un rango *in vivo* de 0,2 - 0,4 UI/ml. El procedimiento *in vitro* para la determinación del rango terapéutico del TTPA para la terapia de heparina es un procedimiento aproximado con limitada fuerza de expresión.

Hasta el momento, los ensayos para determinar los TTPA, TT, BT y ECT proporcionan un tiempo de coagulación que sólo se evalúa en segundos, dependiendo siempre el resultado del sistema de ensayo local, es decir del reactivo, carga de los reactivos, varianza de frasco a frasco, realización del ensayo, automatización, aparatos de medida, procedimiento de medida y procedimientos de evaluación. Por lo tanto, apenas existe una capacidad de comparación de los resultados del ensayo.

La presente invención tenía por objeto, por lo tanto, poner a disposición un procedimiento *in vitro* que hiciera posible la estandarización de los ensayos de coagulación y garantizara por consiguiente la capacidad de comparación global de los valores de ensayo que se obtuvieron con ayuda de sistemas de ensayo diferentes (locales).

La solución conforme a la invención consiste en la puesta a disposición de los objetivos y procedimientos descritos en las reivindicaciones.

Bajo la expresión "tiempo de coagulación" se debe entender en el sentido de la presente invención el resultado de un ensayo de coagulación *in vitro*, en el cual se mide el espacio de tiempo desde la adición a la muestra o a una mezcla de muestras de un reactivo activador y/o de iones Ca^{2+} hasta la formación perceptible de un coagulo de fibrina en segundos (s) o, siempre que se utilice un sustrato cromógeno, el espacio de tiempo desde la adición a la muestra de un reactivo activador y/o de iones Ca^{2+} hasta alcanzar una variación definida de la velocidad de absorción. La utilización de un sustrato cromógeno se conoce, por ejemplo, en el caso de métodos para la determinación del PT (véase por ejemplo documento EP 14 039 A1).

El procedimiento conforme a la invención posibilita la determinación de un tiempo de coagulación estandarizado de una muestra, transformando el tiempo de coagulación de la muestra (resultado primario del ensayo, valor real) en un tiempo de coagulación estandarizado (resultado estandarizado del ensayo, valor nominal) mediante una curva de calibración (curva de referencia).

Se prefiere particularmente un procedimiento para la determinación de un tiempo de coagulación estandarizado del grupo del tiempo de protrombina (PT), tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPA), tiempo de trombina (TT), tiempo de batroxobina (BT) y tiempo de ecarina (ECT).

Para el trazado de la curva de calibración es necesaria la disponibilidad de al menos dos calibradores, habiéndose fijado antes para cada calibrador un tiempo de coagulación estándar en segundos (s). El número de calibradores que se puede emplear no está limitado hacia arriba.

La fijación del tiempo de coagulación estándar de un calibrador se puede hacer de diferentes maneras. Una posibilidad es determinar el tiempo de coagulación estándar de un calibrador en una sola pasada de un ensayo de coagulación, efectuándose esta pasada del ensayo bajo las condiciones definidas de un sistema de ensayo de coagulación específico, local, es decir que el tiempo de coagulación estándar se mide utilizando un reactivo activador específico, una carga específica de reactivo en un aparato de medida específico. Por ejemplo, es posible la utilización de una carga específica del reactivo del TTPA para determinar el TTPA de un calibrador y la correspondencia del TTPA, medido bajo estas condiciones específicas, como tiempo de coagulación estándar TTPA. Otra posibilidad es determinar el tiempo de coagulación estándar de un calibrador hallando el promedio de un gran número de resultados de un ensayo de coagulación. De forma preferida, se utilizan para ello diferentes cargas de activador. Pero también se pueden utilizar tipos alternativos de cargas del activador tales como, por ejemplo, diferentes activadores del TTPA (caolín o ácido elágico o sílice, etc.) A partir de los tiempos de coagulación medidos en las pasadas individuales del ensayo se calcula después, por ejemplo, el valor medio y se le asigna al calibrador como tiempo de coagulación estándar. Preferentemente, los tiempos de coagulación estándar de todos los calibradores que se han de utilizar para el trazado de una curva de referencia se fijan y se asignan de la misma manera.

Para el trazado de la curva de referencia se utiliza preferentemente un equipo (kit) de calibradores que se distinguen por los diferentes potenciales hemostáticos y, con ello, por diferentes tiempos de coagulación estándar. Otro "kit" preferido contiene un único calibrador (calibrador patrón) con un tiempo de coagulación estándar, fijo, definido, el cual se diluye con diferentes volúmenes de un líquido de dilución, por ejemplo una solución tampón, por lo que se pueden preparar una serie de calibradores que se distinguen igualmente por diferentes potenciales hemostáticos. Preferentemente, el líquido de dilución está contenido junto con el calibrador patrón en un "kit" conforme a la invención.

El trazado de la curva de calibración tiene lugar determinando los tiempos de coagulación de los calibradores en el mismo sistema de ensayo local que el tiempo de coagulación de una muestra que se ha de determinar. Por la correspondencia de los tiempos de coagulación de los calibradores, determinados con anterioridad, con los respectivos tiempos de coagulación medidos, e interpolación o, respectivamente, extrapolación, se traza una curva de referencia en la que, por ejemplo, en el eje X se indica el tiempo de coagulación estándar (valor nominal) y en el eje Y el tiempo de coagulación medido (valor real). Con ayuda de la curva de referencia el tiempo de coagulación medido de una muestra se transforma en un tiempo de coagulación estandarizado.

De modo particularmente preferido, se utilizan calibradores que disponen de la misma matriz que la muestra, cuyo tiempo de coagulación ha de ser estandarizado. El presente procedimiento se adecua especialmente para la estandarización de los tiempos de coagulación de muestras de plasma, de origen humano o animal, las cuales pueden estar mezcladas con citrato. Por este motivo, se prefieren calibradores que se fundamentan igualmente en base de plasma, preferentemente en base de una mezcla de plasma, pudiendo tratarse en este caso, por ejemplo, de mezclas de plasma humano y plasma no humano. Por mezcladura de plasma humano con diferentes proporciones de, por ejemplo, plasma de conejo y/o plasma bovino y medición del tiempo de coagulación de una mezcla de plasma de este tipo, el experto en la materia puede preparar calibradores para su utilización en el procedimiento conforme a la invención. Los calibradores de plasma pueden contener, además, sustancias que se utilicen habitualmente en la preparación de calibradores o controles de plasma. A ellas pertenecen, por ejemplo, sustancias tampón tales como, por ejemplo, TRIS o HEPES, sustancias anticoagulantes tales como citrato, y estabilizantes tales como, por ejemplo, dextrano, y conservantes tales como, por ejemplo, azida sódica. Para su utilización en el procedimiento conforme a la invención los calibradores se pueden preparar en estado líquido, congelado o liofilizado.

Una forma de ejecución especial del procedimiento conforme a la invención se refiere a la determinación de un tiempo de coagulación estandarizado de una muestra que contiene una sustancia que influye sobre el sistema de coagulación. En este tipo de sustancias se puede tratar de sustancias que inhiban la coagulación, las cuales le son administradas a un paciente en el transcurso de una terapia anticoagulativa o, respectivamente, que se ensayan en el marco de un examen clínico o en un trabajo de investigación comparable para su empleo en una terapia anticoagulativa. En este caso, puede tratarse, por ejemplo, de medicamentos o sustancias activas como anticoagulantes tales como las heparinas que abarcan heparinas de alto peso molecular (UFH) no fraccionadas, heparinas de bajo peso molecular (NMH) fraccionadas, heparinoides semi- o totalmente sintéticos (tales como, por ejemplo, danaparoid u Orgaran®) o pentasacáridos tal como fondaparinux; antagonistas de la vitamina K tales como, por ejemplo, derivados de cumarina, o tromboinhibidores directos tales como hirudina, argatroban o melagatran. Además, se puede tratar de inhibidores del factor Xa, naturales o sintéticos, pudiendo utilizarse también en el caso de muchos inhibidores naturales del factor Xa las variantes recombinantes. Ejemplos de inhibidores naturales del factor Xa, que por lo demás se aíslan frecuentemente de la saliva de animales hematófagos, son antistasin, un polipéptido de la sanguijuela mejicana *Haementeria officinalis,* el péptido anticoagulante Tick, un polipéptido de la garrapata blanda *Ornithodorus moubata,* Yagin, un polipéptido de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* o draculin del murciélago vampiro *Desmodus rotundus*. Los inhibidores sintéticos del factor Xa pertenecen a distintas clases y se diferencian en inhibidores diamidínicos e inhibidores dibásicos de FXa, inhibidores mono-benzamidínicos de FXa e inhibidores no-benzamidínicos de FXa. En la determinación del tiempo de coagulación de muestras de pacientes tratados con anticoagulantes se trata, entre otras cosas, de determinar si la concentración del anticoagulante en sangre o plasma del paciente se encuentra en el rango terapéutico.

Para la estandarización del tiempo de coagulación de estas muestras anticoaguladas se recomienda la utilización de un calibrador, el cual contiene una cantidad definida de una sustancia anticoagulante, que manifiesta *in vitro* una función anticoagulante. Para la estandarización del tiempo de coagulación de muestras de, por ejemplo, pacientes tratados con heparina se recomienda la utilización de un calibrador al que se ha "aderezado" con una cantidad definida de heparina. Preferentemente, un calibrador de este tipo presenta una concentración de heparina comprendida entre 0,1 y 1,0 UI/ml.

Los siguientes ejemplos de ejecución sirven para ilustrar el procedimiento conforme a la invención y no se deben entender como una limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Determinación del rango terapéutica de la heparina en un sistema de ensayo TTPA (método ex vivo)

Se utilizaron muestras de plasma de pacientes tratados con heparina y una mezcla de plasma normal. Para cada muestra se determinó un nivel de heparina en UI/ml frente a un adecuado estándar de heparina, en un ensayo de factor Xa (Heparina Berichrom®, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). Además, se determinó el TTPA de cada muestra utilizando un reactivo activador (fosfolípidos y ácido elágico, reactivo Dade® Actin® FSL, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania) de la misma carga. Los resultados de estas mediciones se exponen en la Tabla 1.

TABLA 1

	Heparina [UI/ml]	TTPA [segundos]
Mezcla normal	0,00	29,4
Paciente	0,60	75,9
Paciente	0,60	75,9
Paciente	0,01	42,5
Paciente	0,02	57,4
Paciente	0,02	34,3
Paciente	0,04	36,2
Paciente	0,05	33,9
Paciente	0,05	34,4
Paciente	0,05	58,1
Paciente	0,05	34,5
Paciente	0,06	49,6
Paciente	0,06	27,1
Paciente	0,06	45,5
Paciente	0,07	27,1
Paciente	0,07	58,8
Paciente	0,07	84,2
Paciente	0,08	36,4
Paciente	0,10	46,5
Paciente	0,11	48,1
Paciente	0,12	52,3
Paciente	0,13	46,5
Paciente	0,17	39,5
Paciente	0,18	42,8
Paciente	0,19	62,8
Paciente	0,22	55,3
Paciente	0,22	67,9
Paciente	0,23	75,2

	Heparina [UI/ml]	TTPA [segundos]
Paciente	0,24	66,4
Paciente	0,25	49,1
Paciente	0,27	55,3
Paciente	0,27	25,8
Paciente	0,31	70,6
Paciente	0,31	41,0
Paciente	0,32	57,5
Paciente	0,32	37,3
Paciente	0,33	55,3
Paciente	0,34	40,1
Paciente	0,34	51,1
Paciente	0,34	72,4
Paciente	0,36	64,8
Paciente	0,36	51,3
Paciente	0,37	75,1
Paciente	0,38	53,7
Paciente	0,39	70,6
Paciente	0,40	51,4
Paciente	0,41	72,3
Paciente	0,43	83,6
Paciente	0,43	70,2
Paciente	0,45	116,4
Paciente	0,49	63,9
Paciente	0,51	64,4
Paciente	0,52	69,3
Paciente	0,54	59,0
Paciente	0,69	73,9

Con ayuda de Software Microsoft® Excel Versión 97 SR-2 (Microsoft Corporation, Redmond, EE.UU.) se llevó a cabo una regresión lineal de los dos conjuntos de datos:

$$TTPA\ [s] = a \times heparina\ [UI/ml] + b$$

a = 58,47

b= 40,39

Con ayuda de las rectas de igualación se determinó el rango de valores del TTPA que corresponde al rango terapéutico generalmente conocido del nivel de heparina *ex vivo* de 0,3 - 0,7 UI/ml:

TABLA 2

Heparina [UI/ml]	TTPA [s] conforme a la recta de regresión
0,3	57,9
0,7	81,3

Por lo tanto, el rango terapéutico de los valores de TTPA abarcaba desde 57,9 a 81,3 segundos.

Ejemplo 2

Preparación de calibradores de heparina y fijación de sus TTPA estándar discretos para la utilización en un procedimiento para la estandarización de los TTPA conforme a la invención

Calibrador 1

Mezcla de plasma normal

Se tomó el plasma de 20 pacientes sanos en 3,2% de citrato de sodio, se mezcló, se tamponó con tampón HEPES 50 mM (pH 7,5), se estabilizó con adecuados estabilizantes, se envasó en alícuotos de 1 ml y se liofilizó. Para su utilización, el calibrador se reconstituye con 1 ml de agua bidestilada.

Calibrador 2

Mezcla de plasma con heparina

A una solución de estabilizador adecuada se añadió una cantidad definida de heparina no fraccionada (Liquemin®, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Alemania) de manera que se alcanzó un concentración final de 0,6 UI/ml. Con ayuda de un ensayo de factor Xa, calibrado con heparina estándar internacional (Heparina Berichrom®, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania), se determinó la actividad de la heparina de la solución de heparina en un aparato de medidas de coagulación automático. El ensayo del factor Xa se calibró con un estándar internacional de heparina. La solución de heparina se envasó en alícuotos de 1 ml y se liofilizó. Para su utilización se reconstituyó el calibrador con 1 ml de agua bidestilada.

Para la determinación del TTPA estándar de los dos calibradores, se determinó el TTPA de cada plasma utilizando un reactivo activador (fosfolípidos y ácido elágico, reactivo Dade® Actin® FSL, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania) de la misma carga y en el mismo aparato de medidas de coagulación (analizador de coagulación BCS®, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). Se determinaron los siguientes valores de TTPA:

TABLA 3

Mezcla de plasma normal	29 s
Mezcla de plasma con heparina	80 2

El valor de TTPA se asignó entonces al respectivo calibrador como TTPA estándar discreto (valor nominal).

Ejemplo 3

Determinación de los valores de TTPA estandarizados con ayuda del procedimiento conforme a la invención

Los TTPA de los dos calibradores (véase Ejemplo 2) y de las muestras de plasma de pacientes tratados con heparina se determinaron utilizando un reactivo activador (fosfolípidos y ácido elágico, reactivo Dade® Actin® FSL, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania) con una carga arbitraria, en un aparato de medida de coagulación arbitrario.

A partir de la correspondencia del TTPA estándar determinado con anterioridad (valor nominal) y del TTPA medido paralelamente a las muestras de plasma (valor real) resultaron para los dos calibradores los siguientes pares de valores:

TABLA 4

	Valor nominal [s]	Valor real [s]
Mezcla de plasma normal	29	29,6
Mezcla de plasma con heparina	80	103,0

Por expoliación de los dos pares de valores se trazó una curva de referencia (Fig. 1)

Entonces, con ayuda de esta curva de referencia se transformaron los valores del TTPA primarios, medidos, de las muestras de plasma, en valores de TTPA estandarizados (véase Tabla 5). El trazado de la curva de referencia, así como también la transformación de los valores de medida se llevó a cabo automáticamente por medio del aparato de medida de coagulación.

TABLA 5

TTPA [s] medidos	TTPA [s] estandarizados	TTPA [s] medidos	TTPA [s] estandarizados
29,6	29,0	93,8	73,6
103,0	80,0	59,8	50,0
103,0	80,0	66,1	54,4
50,2	43,3	27,9	27,8
67,2	55,1	84,7	67,3
44,8	39,6	44,9	39,6
46,6	40,8	80,2	64,2
41,2	37,1	41,5	37,3
35,3	33,0	63,9	52,8
58,3	48,9	41,2	37,1
35,3	33,0	58,8	49,3
59,7	49,9	100,4	78,2
28,8	28,4	82,6	65,8
51,4	44,1	64,1	53,0
28,7	28,4	83,7	66,6
68,2	55,8	69,3	56,6
79,0	63,3	90,0	71,0
42,0	37,6	66,1	54,4
57,8	48,6	94,7	74,2
57,6	48,5	106,6	82,5
63,9	52,8	88,2	69,7
65,4	53,9	122,4	93,5
47,8	41,6	83,5	66,5
59,9	50,1	74,1	59,9
81,8	65,3	108,5	83,8
63,6	52,6	106,7	82,6
76,5	61,6	98,5	76,9
105,9	82,0		

Ejemplo 4

Rangos terapéuticos para diferentes cargas de un reactivo de TTPA antes y después de la estandarización de los TTPA

Los TTPA de los dos calibradores (véase Ejemplo 2) y de las muestras de plasma de los pacientes tratados con heparina se determinaron utilizando cuatro cargas diferentes de un reactivo activador (fosfolípidos y ácido elágico, reactivo Dade® Actin® FSL, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania) en un aparato de medida de coagulación. Conforme al Ejemplo 3, cada valor de medida dependiente de la carga de una muestra se transformó en un valor de TTPA estandarizado con ayuda de la curva de calibración en función de la carga. Las concentraciones de heparina de las muestras de los pacientes se determinaron en un ensayo de factor Xa (véase Ejemplo 1).

Finalmente, tanto para los valores de TTPA medidos, como también para los valores de TTPA estandarizados se determinó el rango de valores de TTPA que corresponde al rango terapéutico del nivel de heparina *ex vivo* de 0,3 - 0,7 UI/ml (véase Ejemplo 1) generalmente conocido.

TABLA 6

	Rangos terapéuticos (0,3 -0,7 UI/ml de heparina ex vivo) Rangos de valores de TTPA en segundos			
	Carga 1	**Carga 2**	**Carga 3**	**Carga 4**
antes de la estandarización	58-81	72-109	66-99	66-96
después de la estandarización	66-96	64-95	67-99	66-96

Antes de la estandarización de los valores del TTPA los límites superiores de los rangos terapéuticos discrepan unos de otros, de carga a carga, hasta en un 35%. Después de la estandarización de los valores del TTPA los límites superiores de los rangos terapéuticos ya sólo discrepan unos de otros, de carga a carga, en un 4%. El procedimiento conforme a la invención hace posible una unificación de los rangos terapéuticos, por lo que los resultados de diferentes sistemas de ensayo después de la estandarización son comparables directamente entre sí.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación de un tiempo de coagulación estandarizado de una muestra, **caracterizado** porque

a) en el mismo sistema de ensayo local que el de la muestra a determinar se miden los tiempos de coagulación de al menos dos calibradores, para los cuales se fijaron antes tiempos de coagulación estandarizados, discretos, y

b) el tiempo medido de coagulación de la muestra se transforma en un tiempo de coagulación estandarizado con ayuda de una curva de calibración, que se trazó a partir de la correspondencia de los tiempos de coagulación estándar fijados con anterioridad y los tiempos de coagulación de los calibradores medidos en el sistema de ensayo local.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 para la determinación de un tiempo de coagulación estandarizado del grupo de tiempo de protrombina (PT), del tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPA), del tiempo de trombina (TT), del tiempo de batroxobina (BT) y del tiempo de ecarina (ECT).

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 2 para la determinación de un tiempo de coagulación estandarizado de una muestra de plasma.

4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque los calibradores se utilizan en base de plasma.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque los calibradores se utilizan en base de una mezcla de plasma.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se utilizan calibradores que contienen plasma humano o una mezcla de plasma humano y plasma no humano.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6 para la determinación de un tiempo de coagulación estandarizado de una muestra que contiene una sustancia que influye sobre el sistema de coagulación.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 para la determinación de un tiempo de coagulación estandarizado de una muestra que contiene una sustancia inhibidora de la coagulación.

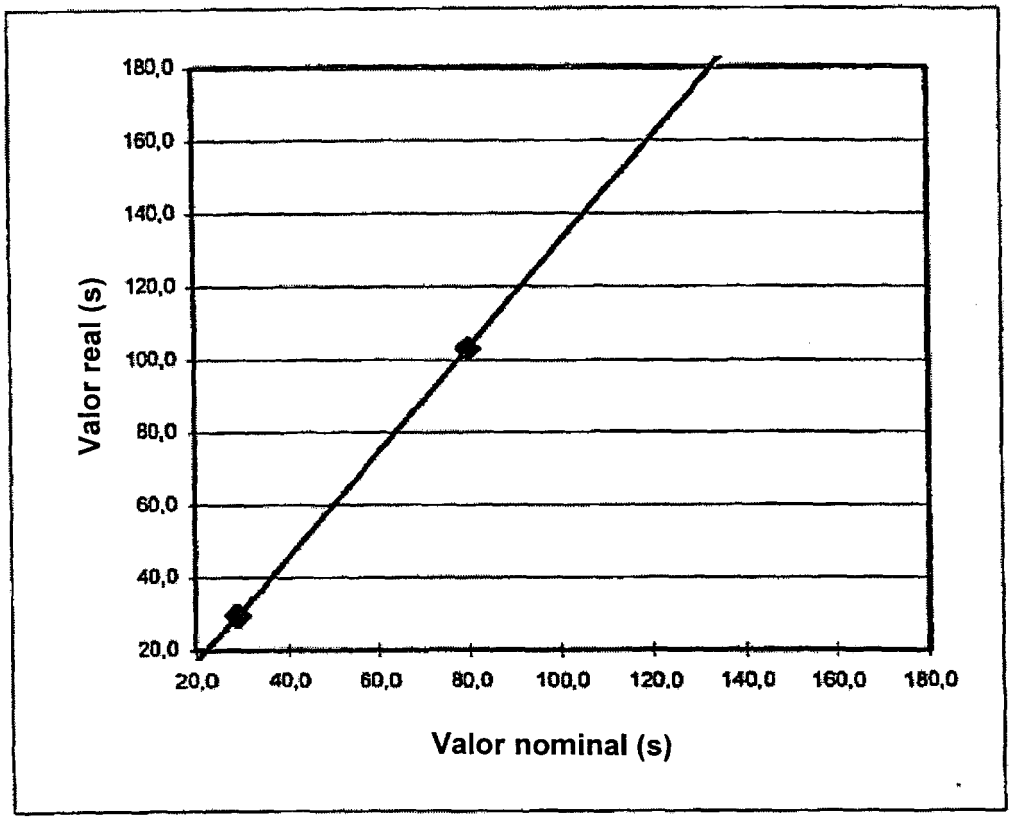
9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la muestra contiene una sustancia del grupo heparina, heparinoides, hirudina, argatroban, melagatran, e inhibidores naturales o sintéticos del factor Xa.

10. Procedimiento según las reivindicaciones 8 y 9, **caracterizado** porque al menos un calibrador contiene una cantidad definida de una sustancia inhibidora de la coagulación.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque después de la adición de heparina al menos un calibrador presenta una concentración de heparina de 0,1 a 1,0 UI por ml.

12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 11, **caracterizado** porque la curva de referencia se traza con ayuda de un procedimiento de interpolación o de extrapolación.

Figura 1


180,0
160,0
140,0
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
Valor real (s)
20,0
40,0
60,0
80,0
100,0
120,0
140,0
160,0
180,0
Valor nominal (s)