



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 998**

51 Int. Cl.:
G01N 33/86 (2006.01)
C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04010893 .8**
86 Fecha de presentación : **02.06.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1484615**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2004**

54 Título: **Procedimientos para la detección de fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno.**

30 Prioridad: **04.06.2003 DE 103 25 173**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

73 Titular/es: **Thomas Stief**
Limesstrasse 15
35415 Pohlheim, DE

72 Inventor/es: **Stief, Thomas**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Procedimientos para la detección de fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la detección de fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno. En estos procedimientos se determina la turbidez.

10 La determinación de la actividad y/o de la concentración de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno en la sangre y/o en el plasma de la sangre es muy importante clínicamente. Derivados de fibrinógeno de acuerdo con la presente invención son derivados de fibrinógeno, como nacen por la acción de enzimas, especialmente por la acción de la trombina y/o plasmina, o por la acción de los oxidantes, en contra de fibrinógeno.

15 Las pruebas que se sabe de acuerdo con el presente estado de la técnica de detección de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno son bastante difíciles y/o las condiciones de los ensayos no son fisiológicas, por ejemplo, se añade la trombina en concentraciones altas (EP-B-0137269, DE-A-4133946, US-B-6448024, DE 4133946, US 5.292.664); aquí los resultados de las pruebas no reflejan la verdadera actividad de fibrinógeno en la sangre del paciente y/o no reflejan la verdadera concentración de los derivados del fibrinógeno en la sangre del paciente.

20 El más cercano estado de la técnica es la determinación de la función de fibrinógeno con el método modificado de Clauss (DE-A-4133946) y el PT-Fbgen-método (que determina la concentración de fibrinógeno en el desempeño de la PT (tiempo de protrombina), por ejemplo Con Thromborel-S[®], DadeBehring, Marburg, Alemania). En el método de Clauss la muestra de plasma es aproximadamente 10 veces diluida, después de la adición de trombina el momento de la coagulación se determina.

25 Este tiempo de coagulación correlaciona indirectamente con la concentración de fibrinógeno activa en la muestra.

30 En un método modificado de Clauss (DE-A-4133946) 100 μ l de muestra se mezclan con 200 μ l de 50 UI/ml de trombina bovina, 0.15 g/l de inhibidor de la polimerización Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-amida, 1.5 g/l de CaCl₂, 15 μ g/ml de Polybrene[®], 0.8 g/l de polyethylene glycol 6000, 6.4 g/l de NaCl, 50 mM de Tris, 1% de albúmina (bovina) y el tiempo de coagulación es determinado por el aumento de la turbidez ($\Delta A = \Delta A$).

35 En la determinación de la concentración de fibrinógeno por el tiempo de protrombina (PT-Fbgen) el contenido de fibrinógeno de la muestra se determina por la turbidez de los coágulos generados (Thromborel – S[®], DadeBehring). Un problema aquí es la actividad de la trombina, que en el PT provoca la coagulación de fibrinógeno; esta actividad de la trombina no es constante, es diferente de paciente a paciente, por lo que la fiabilidad de esta prueba es dudosa (Mackie *et al.* Thromb. Haemost., Volumen 87 (2002), páginas 997-1005; véase el ejemplo 1.1.3).

40 Tanto la dilución de 10 veces de la muestra en el método de Clauss como el uso de un inhibidor de la polimerización en el método modificado de Clauss y/o concentraciones extremadamente altas de trombina (EP-B-0137269, DE-A-4133946, US-B-6448 024) no son fisiológicas. Además, en todas estas pruebas no se considera que el fibrinógeno podría reaccionar patológicamente, si la matriz no es fisiológico-matriz se define como el líquido con todos sus componentes, en el que la sustancia (aquí: fibrinógeno) está incrustado (es decir, los alrededores del analito)- y/o si las actividades de trombina son patológicamente altas; esto se muestra en la presente invención (ver figuras 1a-d, 6a, b).

45 El objeto de la presente invención es, por tanto, a disponer de un procedimiento para la determinación de la actividad de fibrinógeno o de la concentración de fibrinógeno, que es muy fácil de realizar, lo que refleja las verdaderas actividades y/o concentraciones, y el cual es realizado rápidamente, y que no requiere la adición de altas concentraciones de trombina, que no son fisiológicos.

50 Esta tarea se resuelve por procedimientos que son independientes de la matriz y dependen de aumento de la turbidez, es decir, los procedimientos que determinan la actividad del fibrinógeno y/o la concentración de fibrinógeno y/o la concentración de los derivados de la determinación de fibrinógeno por el aumento de la turbidez de la solución de prueba. Estos procedimientos son llamados “Functional Fibrinogen Turbidimetric Assay (FIFTA)” y “Fibrinogen Antigenic Turbidimetric Assay (FIATA)”, el último procedimiento no es parte de la presente invención.

55 FIFTA es un procedimiento para la determinación de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno y, especialmente, para la determinación de la actividad del fibrinógeno, que tiene los siguientes pasos:

60 a) trombina disuelta y/o albúmina disuelta se mezcla con una solución que será analizado por el fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno; las concentraciones en la mezcla final de la reacción se encuentran a menos de 2 UI/ml de trombina, de preferencia menos de 1,5 o 1 UI/ml y/o menos de 150 mUI o 100 mUI por muestra de 50 μ l, especialmente menos de 0,8 o 0,5 UI/ml y/o menos de 80 ó 50 mUI por muestra de 50 μ l, y/o 1,7-10% (peso por volumen), de preferencia a más de 2,5% (peso por volumen), en especial a más de 4% (peso por volumen), de albúmina,

65 b) el aumento de la turbidez de la solución así obtenida se determina.

ES 2 302 998 T3

El FIFTA imita a la conversión del fibrinógeno en fibrina, como ocurre fisiológicamente en el plasma. El FIFTA es relativamente sencilla y se puede realizar incluso a temperatura ambiente (RT). Una simple fotómetro es suficiente, en especial un fotómetro que trabaja con placas microtiter, máquinas especiales o sistemas que detectan la coagulación, es decir, los sistemas de medición del tiempo de coagulación, no son necesarias.

Una forma preferida de la presente invención se caracteriza por el hecho de que no requieren la adición de un inhibidor de la polimerización.

La solución que se analiza es principalmente de sangre o plasma de la sangre, que se mezcla con citrato, EDTA, heparina y/o un compuesto con un grupo de guanidina como por ejemplo la arginina.

Por ejemplo, la solución puede utilizarse en un volumen de entre 0,1 y 100 μ l, preferiblemente entre 5 y 50 μ l, especialmente 25-50 μ l.

Preferiblemente, la albúmina y la trombina están juntos en un líquido, antes de ser mezclado con la solución que se analiza. La relación entre el volumen de la solución que se analiza y de la solución que contiene la trombina y/o la albúmina es preferentemente entre 1:1 y 1:5, especialmente preferido acerca de 1:2.

La solución que contiene la trombina y/o albúmina (reactivo de FIFTA) se utiliza por ejemplo en un volumen de entre 0,2 y 200 μ l, de preferencia en un volumen entre 10 y 100 μ l, especialmente 50-100 μ l.

La concentración óptima de la trombina en el reactivo de FIFTA es entre 50 y 1000 mUI/ml (suplemento de 5-100 mIU trombina por 50 μ l de la muestra), de preferencia entre 100 y 500 mUI/ml, especialmente preferido entre 200 y 400 mUI/ml, en especial unos 300 mUI/ml, en especial si se utiliza en una relación de 2:1 a la solución que se analiza. Las concentraciones de trombina en el reactivo de FIFTA de 200-450 mUI/ml se traducirá en un delta A/5 m (temperatura ambiente) de alrededor de 170-250 mA en plasma normal después de "pooling" (combinación) (100% del normal funcionamiento de fibrinógeno = 2,8 g/l de fibrinógeno activo) y se traducirá en 250-350 mA/5 m (temperatura ambiente) para el plasma de pacientes después de "pooling" (combinación) (144% de la función normal de fibrinógeno), si el reactivo de trombina se utiliza en una relación de 2:1 a la solución que se analiza. Alternativamente, se puede convertir el fibrinógeno por otra proteína y/o mezcla de proteínas, como por ejemplo, reptilasa o staphylocoagulasa. Si procede, el reactivo podría también contener los iones de calcio, especialmente 10-15 mM en una relación de 2:1 (reactivo de FIFTA a la muestra).

La óptima concentración de albúmina en el reactivo de FIFTA es 2 a 20%, sobre todo 4 a 8%, de preferencia sobre 6%, sobre todo si se utiliza en una relación de 2:1 a la solución que se analiza. Preferiblemente preferido es el uso de la albúmina sérica (bovina) o la albúmina humana.

Alternativamente, la albúmina podría ser sustituido por agentes, que son conocidos por el especialista, como las proteínas o las proteínas degradadas, por ejemplo, gelatina. La adición de albúmina inhibe un falso resultado por el plasma que contiene pocas proteínas, que de otro modo resultaría en valores de fibrinógeno, que son falsamente elevados (figura 6a, b).

Preferiblemente, Polybrene[®] se añade al reactivo de FIFTA. La concentración óptima de Polybrene[®] en el reactivo de FIFTA es de 0 a 30000 μ g/ml de preferencia entre 0 y 1000 μ g/ml en particular si el reactivo de FIFTA se utiliza en una relación de 2:1 a la solución que se analiza, y/o adición de 0-100 μ g de Polybrene[®] por 50 μ l de muestra, especialmente preferido 20-80 μ g de Polybrene[®] por 50 μ l de muestra, en especial unos 40 μ g de Polybrene[®] por 50 μ l de muestra.

Si se analiza un plasma, que contiene heparina (hasta 100 UI/ml heparina), la concentración de Polybrene[®] en el reactivo de FIFTA podría ser 1000-30000 μ g/ml si procede, y/o el importe agregado de Polybrene[®] podría ser 100-3000 μ g por 50 μ l de muestra. Alternativamente, un agente que neutraliza la heparina, por ejemplo, Polybrene[®] o heparinasa, puede agregarse primero y después la reacción de la trombina se puede iniciar. Por lo tanto, el plasma que contiene heparina es de primera incubado con 25 μ l 4-200 mg/ml de Polybrene, preferiblemente 10-100 mg/ml de Polybrene, en especial unos 50 mg/ml de Polybrene[®] en 40 mM de citrato de pH 7,4, por 50 μ l de plasma, es decir, además de 100-5000 μ g de Polybrene, de preferencia 250-2500 μ g de Polybrene, en particular acerca de 1250 μ g de Polybrene[®] por 50 μ l de muestra.

400 μ g/ml de Polybrene[®] inhibe hasta 20 UI/ml de heparina en plasma. Las concentraciones de heparina en la sangre son normalmente a 0.2 UI/ml, cuando se administra heparina terapéuticamente. En los pacientes, que se someten a cirugía cardíaca, la concentración de la heparina puede ser elevada hasta unos 10 UI/ml. Exactamente para estos pacientes, la determinación de fibrinógeno es muy importante, sobre todo porque para estos pacientes, el riesgo de desarrollar una patológica coagulación intravascular diseminada es muy elevado. Sin embargo, la alta concentración de la heparina perturba la determinación de fibrinógeno; para obtener resultados fiables, la adición de Polybrene[®] es obligatoria.

Por ejemplo, las concentraciones plasmáticas de heparina por encima o igual a 0,63 UI/ml inhiben completamente la trombina en el reactivo de FIFTA en la prueba descrita (Cuadro 1), si el reactivo de FIFTA no contiene Polybrene[®]. En este caso, la concentración que inhibe el 50% de trombina es 0,1 UI/ml de heparina.

ES 2 302 998 T3

Los componentes del reactivo de FIFTA, que han sido mencionados más arriba, son de preferencia junto con un pH - estabilizador, especialmente preferido un tampón de fosfato con NaCl (PBS-solución; 10 mM de Na₂HPO₄, 138 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, de pH 7,4).

5 El FIFTA se realiza preferentemente a una temperatura entre 0°C y 42°C, especialmente preferido a unos 37°C, o, a temperatura ambiente, este último es especialmente fácil de manejar. El tiempo de reacción es de preferencia entre 20 segundos y 60 minutos.

10 El tiempo óptimo de reacción de FIFTA a temperatura ambiente es 1 a 20 minutos, especialmente preferido 2 a 10 minutos, en particular 3 a 7 minutos, sobre todo en 5 minutos. Los correspondientes tiempos de 37°C son 2,5 veces menor.

15 La turbidez es determinado de preferencia por determinación de la absorción en una longitud de onda entre 280 y 650 nm, especialmente preferido en alrededor de 405 nm.

La determinación está normalizado en comparación con una solución de una concentración conocida de fibrinógeno funcional, de preferencia en comparación con una alícuota de un pool de plasma normal, que es 100% de lo normal (valor medio del rango normal = 2,8 g/l).

20 El FIFTA es un procedimiento, que determina con precisión las actividades de fibrinógeno que son muy altos y muy bajos. Se miden las concentraciones por encima de 200%, de preferencia por encima de 220%, sobre todo por encima del 240% de lo normal, y los valores por debajo de 50%, preferiblemente por debajo de 40%, sobre todo por debajo de 30% de lo normal.

25 El bajo límite de detección es inferior al 10% de lo normal en una forma preferida de ejecución de FIFTA.

El aumento de la absorbancia después de unos 15 minutos a temperatura ambiente es casi el valor máximo de aumento de la absorbancia (por 100% plasma normal = aproximadamente 420 mA). El aumento de absorbancia que es el 50% del máximo de absorbancia se produce después de unos 4 minutos a temperatura ambiente. El aumento de la absorbancia, que es de aproximadamente 60% de la máxima absorbancia se produce después de unos 5 minutos a temperatura ambiente. El optimizado FIFTA es lineal hasta una actividad de fibrinógeno de aproximadamente 250% de lo normal. El bajo límite de detección es 25% de lo normal, cuando el plasma se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. El bajo límite de detección es 7% de lo normal (0,2 g/l), si se mide el aumento de absorbancia/15 minutos (temperatura ambiente, $\Delta A/5-6$ minutos 37°C).

35 Los coeficientes de variación (intra e interinstitucionales assay ensayo) están por debajo de 4%. El rango normal de fibrinógeno funcional es 100% + -20% (valor medio más, menos de una desviación estándar) en el FIFTA. El FIFTA se correlaciona con un método modificado de Clauss con $r = 0,843$ (en $n = 334$ plasmas de los pacientes). El FIFTA se utiliza preferentemente con fines de diagnóstico, en especial para la patológica coagulación intravascular diseminada y para el diagnóstico de los pacientes con riesgo de desarrollar una enfermedad que es ateroesclerótica o una trombosis como la isquemia/infarto de corazón o de cerebro. Por lo tanto, la presente invención se refiere también al uso de un agente de diagnóstico que contiene la trombina y/o albúmina y Polybren[®], en su caso. Los componentes pueden ya existir en estado líquido, como se ha descrito anteriormente, o que existan en estado sólido y se transforman en la forma líquida para realizar el procedimiento. De acuerdo con la invención son las concentraciones y las soluciones, como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente se trata de un agente de diagnóstico para detectar la patológica coagulación intravascular diseminada y/o un agente de diagnóstico para determinar el riesgo de los pacientes de desarrollar trombosis ateroesclerótica o enfermedades como la isquemia cerebral o de miocardio/infarto.

50 De acuerdo con la invención y preferido son las concentraciones y las soluciones que se describen antes.

La presente invención es también el uso de un sistema de ensayo y "kits" para la determinación de fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno, que se caracteriza por el hecho de que comprende una solución que contiene la trombina y/o la albúmina y, en su caso, una solución que contiene Polybrene[®], en donde la trombina, albúmina y/o Polybrene[®] pueden existir en el mismo o en diferentes soluciones. De acuerdo con la invención y preferido son las concentraciones y las soluciones que se describen antes.

La presente invención es también el uso de un agente de diagnóstico, de un sistema de prueba o de "kits" para determinar la concentración y/o la actividad de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno.

60 Sorprendentemente se ha constatado, además, que el habitual antibiótico vancomicina interactúa de tal manera con fibrinógeno y/o con los derivados de fibrinógeno, que la concentración de fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno puede ser determinado por el aumento de la turbidez. La unión del fibrinógeno a la vancomicina y/o de los derivados de fibrinógeno en forma soluble transforma esta molécula en una forma insoluble. Esta forma de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno no es soluble y, por lo tanto, se precipita. La turbidez generada es directamente proporcional a la concentración de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno en la muestra. Esta reacción es la base de una simple prueba para el antígeno de fibrinógeno o de los derivados de fibrinógeno, llamado el "Fibrinogen Antigenic Turbidimetric Assay (FIATA)".

ES 2 302 998 T3

FIATA es, por tanto, un procedimiento para detectar el fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno, que comprende las siguientes etapas:

5 a) la solución que se analiza se mezcla con una solución que contenga la vancomicina, de preferencia de tal manera, que entre 0,05 y 1 μmol , especialmente preferido entre 0,1 y 0,5 μmol , en particular entre 0,15 y 0,3 μmol , en especial acerca de 0,22 μmol vancomicina son junto con 25 μl de plasma,

b) el aumento de la turbidez se determina.

10 Preferiblemente sangre o plasma de la sangre es la solución que se analiza, se analiza sobre todo el plasma que contiene citrato, heparina o EDTA, y/o plasma que contiene un compuesto de guanidina como por ejemplo el plasma que contiene arginina (por ejemplo: 9 partes de la sangre más 1 parte de 106 mM de citrato, 15 UI heparina/ml de sangre, 1,6 mg potassium-EDTA/ml sangre, y/o 50-1000 mM de arginina (de pH 8,7)/ml de sangre). También para FIATA un simple fotómetro es suficiente, en especial un fotómetro que trabaja con placas microtiter.

15 En la FIATA una parte de la muestra con un volumen entre 0,1 y 100 μl , especialmente preferido con un volumen entre 5 y 50 μl , en particular con un volumen de aproximadamente 25 μl se incuba preferentemente con dos partes de PBS (NaCl en fosfato, podría contener, en su caso, la albúmina, especialmente 6% de albúmina) en un volumen de entre 0,2 y 200 μl , especialmente preferido entre 10 y 100 μl , en particular con un volumen de aproximadamente 50 μl . Esta mezcla es la primera solución cuya turbidez se mide. El PBS-búfer que diluye la muestra también podría ser reemplazado por otro fluido (por ejemplo, 0,9% de NaCl o H_2O). Esto sirve para detectar la absorbancia antes del aumento de la absorbancia, que es causada por la vancomicina. Si el fotómetro es capaz de medir pequeñas cantidades de manera precisa, esta dilución también puede ser omitido.

25 La solución que contiene la vancomicina (reactivo de la FIATA) se añade a la solución que se analiza preferentemente en una relación de los volúmenes de alrededor de 2:3, es decir, en relación con los volúmenes antes mencionados, en un volumen de entre 0,2 y 200 μl , especialmente preferido en un volumen entre 10 y 100 μl , en particular en un volumen de aproximadamente 50 μl .

30 La concentración de vancomicina en el reactivo de FIATA es elegido de tal forma que la concentración final de la vancomicina es 0,4 a 20 mM, especialmente preferido entre 0,8 y 4 mM, en particular entre 1 y 3 mM, en especial acerca de 1,76 mM, cuando el reactivo de la FIATA se agrega a la solución que se analizan, es decir, sobre todo acerca de 0,22 mol vancomicina se añaden por 25 μl de plasma.

35 Por lo general, la concentración de vancomicina en el reactivo de la FIATA está entre 1 y 20 mM, preferido 2 y 7 mM, en especial acerca de 4,4 mM, para dar, después de la dilución, las concentraciones, que se mencionaron antes. Vancomicina se disuelve en H_2O o en PBS (solución de NaCl con fosfato, que contiene, en su caso, la albúmina, especialmente 6% de albúmina). Alternativamente, otros habituales tampones son útiles para producir el reactivo de la FIATA. La solución que contiene vancomicina podría ser estabilizado por un detergente como TritonX®, en especial 40 0,1% (peso/volumen), y/o una proteína, como la albúmina, especialmente 1-7% (peso/volumen).

FIATA se realiza preferentemente a una temperatura entre 0°C y 42°C, especialmente preferido a unos 37°C, o a temperatura ambiente, que es muy fácil de manejar.

45 El tiempo óptimo de reacción de la FIATA es 2 segundos a 10 minutos a temperatura ambiente, preferido 5 segundos a 5 minutos, especialmente preferido 10 segundos y 3 minutos, en particular 1 a 3 minutos. Los tiempos de reacción son reducido a la mitad, si el ensayo se realiza a 37°C.

50 La turbidez es determinado de preferencia por determinación de la absorbancia del espectro en una longitud de onda entre 280 y 650 nm, especialmente preferido en una longitud de onda de aproximadamente 405 nm.

La determinación se calibra por comparación con una solución de concentración conocida de fibrinógeno, de preferencia en comparación con una alícuota de un pool de plasma normal, que corresponde al 100% de lo normal (valor medio del rango normal = 2,8 g/l).

55 El límite de linealidad de FIATA es más del 100% de lo normal, especialmente preferido más de 120% de lo normal, sobre todo más de 140% del normal; el bajo límite de detección es inferior al 20% de lo normal, especialmente preferido menos del 10% de lo normal, en particular, menos del 5% de lo normal.

60 FIATA, cuando se lleve a cabo en forma preferible, es casi lineal hasta una concentración de fibrinógeno de aproximadamente 150% de lo normal (4,2 g/l), lo que resulta en deltaA de 400-800 mA; especialmente 600 mA. El bajo límite de detección es 4% de lo normal (0,1 g/l).

65 Una muestra con las concentraciones de fibrinógeno > 150% debe ser diluido, en especial con el 6% de albúmina-PBS, mezclado suero, PBS o 0,9% de NaCl, especialmente preferido con 6% de albúmina-PBS.

Alternativamente, la cantidad de muestra utilizada podría ser reducido de 25 μl a 5-15 μl , especialmente 10-12,5 μl , sin cambio en la cantidad de vancomicina que se añade.

ES 2 302 998 T3

Los coeficientes de variación de las pruebas (intra y día a día) están por debajo de 4%. El rango normal de la FIATA es 100% + -20% (valor medio +/- de una desviación estándar). Hubo una correlación de FIATA (valor medio = 130%, desviación estándar = 52% o 43%) con las pruebas funcionales de fibrinógeno a) método modificado de Clauss (valor medio = 4.1 g/l, desviación estándar = 1.7 g/l), $r = 0.755$ y b) FIFTA (valor medio = 124%, desviación estándar = 40%), $r = 0.813$, en $n = 321$ o $n = 344$ plasmas de pacientes.

FIATA no sólo es adecuado para la detección de fibrinógeno, sino también para determinar la fibrina en solución y/o moléculas de fibrinógeno que son desnaturalizados. Por lo tanto, la FIATA es adecuado como prueba de cribado para dysfibrinógenos o fibrinógeno que no es funcional. Para determinar la cantidad total de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno, la conversión del fibrinógeno en fibrina no es necesario, es decir, no es necesario añadir trombina.

FIATA es tan fácil de realizar, que la determinación de la concentración de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno se puede realizar en segundos, incluso fuera de un hospital. Por lo tanto, la FIATA ayuda a diagnosticar el riesgo de los pacientes para desarrollar una isquemia/infarto de corazón y/o del cerebro también fuera de un hospital.

Además, un agente de diagnóstico se describe, en el que figura la vancomicina. La vancomicina puede existir en forma disuelta, como se describe más arriba, o en forma sólida, en la que tiene que ser transformado en la forma disuelto con el fin de realizar el ensayo. Las concentraciones y las soluciones que se han descrito antes son preferibles. Es de preferencia un agente de diagnóstico para detectar una patológica coagulación intravascular diseminada y/o un diagnóstico para diagnosticar el riesgo de un paciente a desarrollar una enfermedad aterosclerótica o una trombosis como la isquemia/infarto de corazón o de cerebro. Preferencia por el uso de FIATA son las concentraciones y las soluciones que se describen antes. Especialmente el cálculo del coeficiente de FIATA/FIFTA podría ayudar a diagnosticar la activación de la hemostasia, como por ejemplo, en una coagulación intravascular diseminada y/o la aparición de dysfibrinógeno en la sangre: los valores mayor o igual a 1,1, en especial los valores mayor o igual a 1,3, indican una coagulación intravascular diseminada y/o la presencia de un dysfibrinógeno en sangre.

Además se publica una prueba del sistema o "kit" para la determinación de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno, que se caracteriza por lo tanto, que comprende una solución que contiene la vancomicina. Son preferibles las concentraciones y las soluciones que se describen antes.

Formas de FIATA y FIFTA que han sido optimizados están representadas en los cuadros 1 y 2.

CUADRO 1

Optimización de los parámetros de la FIFTA

50 μ l de plasma o estándar (por ejemplo, 100% estándar = mixto plasma normal)

100 μ l 300 mUI/ml e trombina, 6% de albúmina-PBS, 400 μ g/ml Polybrene[®] en PBS

A (405 nm)

5 minutos (temperatura ambiente) o 2 minutos (37°C)

deltaA (405 nm)

El optimizado FIFTA se realiza de la siguiente manera:

A 50 μ l de plasma con citrato (9 partes de sangre + 1 parte de 106 mM de citrato) 100 μ l reactivo de FIFTA se añaden, que contiene 300 mUI/ml de trombina, 6% de albúmina-PBS, 400 μ g/ml de Polybrene[®] en PBS. La absorción a 405 nm se mide inmediatamente (valor base) y después de 5 minutos, si la reacción se realiza a temperatura ambiente. Si la reacción se realiza a 37°C, el segundo valor se mide después de 2 minutos. Un fotómetro que trabaja con placas microtiter se utiliza (Milenia, DPC, Los Angeles, EE.UU.). El aumento de la absorción (deltaA) se determina; los resultados son calibrados con un plasma con la actividad conocida de fibrinógeno, de preferencia un plasma con 100% de la actividad normal de fibrinógeno (Cuadro 1).

ES 2 302 998 T3

CUADRO 2

Optimización de los parámetros de FIATA

5 25 μ l de plasma o estándar (por ejemplo, 100% estándar = mixto plasma normal)

50 μ l PBS

10

A (405 nm)

15

50 μ l 4,4 mM vancomicina en PBS

2 minutos (temperatura ambiente) o 1 minuto (37°C)

20

deltaA (405 nm)

El FIATA optimizado se realiza de la siguiente manera:

25

A 25 μ l de plasma 50 μ l de PBS se añaden y la absorción (405 nm) y se mide (valor base). A continuación, 50 μ l 4,4 mM de la vancomicina en PBS se añade. La absorción a 405 nm se determina de inmediato (valor base), y de nuevo después de 2 minutos, si la reacción se realiza a temperatura ambiente. Si la reacción se realiza a 37°C, el segundo valor se mide después de 1 minuto. Un fotómetro que trabaja con placas microtiter se utiliza (Milenia, DPC Biermann, Krefeld, Alemania). El aumento de la absorbancia (deltaA) se determina, y los resultados son calibrados con una mezcla de plasma con una concentración de antígeno de fibrinógeno que se conoce, de preferencia 100% de la normalidad y con 0,9% de NaCl (valor cero de la turbidez) (Cuadro 2).

30

Ejemplos

35

1. FIFTA

1.1. Optimización de la prueba

1.1.1. Concentración de la trombina

40

La concentración de trombina en la prueba debe ser lo más fisiológica posible, ni demasiadas moléculas de trombina ni demasiado pocas moléculas de trombina son convenientes para un ideal ensayo de la función de fibrinógeno. 50 μ l plasma de pacientes (mezcla = P-Pool; 144% del normal = 4,04 g/l de fibrinógeno activa) y 1:2 diluido P-Pool (con 6% de suero de bovino de albúmina en PBS) fueron incubadas con 100 μ l 0-1519 mUI/ml trombina bovina de 0-15 minutos (a temperatura ambiente) en placas microtiter con fondo plano y el aumento de la turbidez a 405 nm fue determinada.

45

Dentro de los primeros 5 minutos de tiempo de reacción a temperatura ambiente, el aumento de la absorbancia de P-Pool y para 1:2 diluido P-Pool son casi lineal, si el reactivo de la trombina contiene 200-450 mUI/ml de trombina (Figura 1a, B). La relación correcta entre el deltaA del 50% de P-Pool y P-Pool es 0,5; esta relación se produce en las actividades de la trombina en el reactivo de la trombina de 200-450 mUI/ml (Figura 1c). El máximo aumento de la turbidez de P-Pool es de unos 450 mA;

50

cerca del 70% del máximo del aumento de la turbidez se produce con 300 mUI/ml de trombina en el reactivo de la trombina, y con un tiempo de reacción de 5 minutos a temperatura ambiente (figura 1d). Por lo tanto, la concentración óptima de la trombina en el reactivo de FIFTA es 200-450 mUI/ml, lo que resulta en una deltaA/5 minutos (temperatura ambiente) de 250-350 mA para P-Pool. 300 mUI/ml fue elegida como la mejor concentración de trombina en el reactivo de la trombina, es decir, la concentración final de la trombina (IIa) es 200 mUI/ml, lo que resulta en una deltaA/5 minutos de unos 300 mA para P-Pool. La absorción (basal) de los 100%-Pool de plasma es de unos 150 mA; la absorción aumenta por unos 100 mA, cuando 100 μ l 6% de la albúmina de suero bovino (BSA)-PBS se añade.

60

1.1.2. Concentración de Polybrene®

P-Pool se completó con 0-80 UI/ml heparina y se analizó en el FIFTA. El reactivo de FIFTA tenía 200 mUI/ml de trombina, 6% BSA-PBS y 0, 50, 100, 200, 400, 800 o 1600 μ g/ml de Polybrene® (PB, hexadimethrinbromide).

65

Las cifras 2a-g muestran la inhibición de la heparina por Polybrene®. Si el reactivo de FIFTA contiene 400 μ g/ml de Polybrene®, las concentraciones plasmáticas de heparina de hasta 20 UI/ml están inhibidos.

ES 2 302 998 T3

Polybrene[®] se añadió al plasma que contiene heparina

25 μ l 0-75 mg/ml de Polybrene[®] en H₂O se mezclaron con 50 μ l P-Pool o de 50 μ l P-Pool con 100 UI/ml de heparina. Luego, 100 μ l 200 mUI/ml trombina, 400 μ g/ml PB, 6% BSA-PBS se añadieron; la deltaA a 405 nm se midió.

25 μ l mayor o igual a 50 mg/ml de Polybrene[®] inhibe completamente 100 UI/ml de heparina en 50 μ l de plasma (figura 3). El reactivo de FIFTA contiene 400 μ g/ml PB; por lo tanto, 1 parte 100 UI heparina/ml de plasma son neutralizados por 1 parte 26 mg/ml de PB. Complejos de PB-heparina en el plasma no cambian la cinética de la turbidez en la reacción entre el fibrinógeno y trombina.

Aumento de la turbidez por complejos de heparina/Polybrene[®]

50 μ l P-Pool con 0-80 UI/ml heparina fueron incubadas con 100 μ l de reactivo de FIFTA sin trombina, que contenía 0, 400, 800, o 1600 μ g/ml de PB. El aumento de la turbidez se determinó a 405 nm.

El primer incremento de la turbidez en el plasma con heparina depende de la concentración de la heparina en el plasma y depende de la concentración de PB en el reactivo de FIFTA (figura 5). El primer incremento de la turbidez por 25 μ l 50 mg/ml de PB que se añadió a 50 μ l P-Pool fue unos 200 mA (figura 4).

1.1.3. La concentración de albúmina

P-Pool o P-Pool, que fue diluido 1:2 con PBS o con 6% BSA-PBS, se analizaron en el FIFTA, utilizando el reactivo de la trombina, 200 mUI/ml, sin albúmina.

Determinaciones de la función de fibrinógeno, que basan en la turbidez, dependen de la concentración de albúmina en la muestra. En contrario, la FIFTA no depende de la concentración de albúmina en la muestra. Sin embargo, el FIFTA dependerá de la concentración de albúmina en la muestra, si no habría albúmina en el reactivo de FIFTA: si el P-Pool se diluye 1:2 con PBS, el fibrinógeno medido es de aproximadamente 70% de la de sin diluir el plasma, en lugar de 50%, lo que quiere decir, que para los pacientes, que tienen sólo 50% de la albúmina en la sangre, el fibrinógeno funcional se determinaría en un 40% falsamente demasiado alto. Si el P-Pool se diluye 1:2 con 6% de albúmina-PBS, el fibrinógeno medido es, en efecto, el 50% del fibrinógeno de P-Pool sin dilución (figuras 6a, b). Si 6% de albúmina se añade al reactivo de FIFTA, la correcta 50% de valor se obtiene en todos los plasmas, que se han diluido con PBS o con 6% de albúmina.

Comparación de los procedimientos de determinación de fibrinógeno de acuerdo con la invención con el estado de la técnica

Para la comparación, P-Pool (de n = 32 plasmas de sujetos individuales, los valores normales de tiempo de pro-trombina y del tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT)) y 1:2, 1:4 y 1:8 diluciones de este P-Pool con 0,9% de NaCl se pusieron a prueba con los siguientes métodos de fibrinógeno:

A) FIFTA (cuadro 1)

B) FIATA (cuadro 2)

C) El método modificado de Clauss (DadeBehring, las condiciones en la página 2, líneas 1-6)

D) PT-Fbgen (DadeBehring, las condiciones en la página 2, líneas 8-10)

Resultados

Método	Plasma 1:1	Plasma 1:2	Plasma 1:4	Plasma 1:8	Plasma
1:16					
A)	128%	64%	32%	16%	8%
B)	129%	65%	32%	16%	8%
C)	3,7 g/l	2,0 g/l	2,0 g/l	sin resultado	sin
resultado					
D)	3,5 g/l	2,1 g/l	2,1 g/l	0,8 g/l	sin
resultado					

Se ve, que las concentraciones de fibrinógeno en FIFTA y en FIATA están correctamente reflejados. En contrario, el valor de fibrinógeno que se mide en el método modificado de Clauss es 8% demasiado alto en 1:2 diluido P-Pool y es 35% demasiado bajo en 1:4 diluido P-Pool, en comparación con el valor que se esperaba. En el método de PT-Fbgen el valor de fibrinógeno en 1:2 el diluido P-Pool es 20% elevada, en el 1:4 diluido P-Pool el valor de fibrinógeno es 49% elevada, y en el 1:8 diluido P-Pool el valor de fibrinógeno es 83% elevada, en comparación con el valor que se esperaba.

Algunos pacientes, especialmente los pacientes en las unidades de cuidados intensivos, tienen concentraciones de albúmina plasmática de unos 10 g/l, es decir, por debajo de 25% de lo normal. Si en los plasmas de estos pacientes la función de fibrinógeno es analizada con los métodos de acuerdo con el estado de la técnica, esto puede dar lugar a falsos valores de fibrinógeno.

1.1.4. Reacción cinética

FIFTA se realizó con P-Pool y con 6% BSA-PBS diluciones de P-Pool. El deltaA fue determinada después de 0-15 minutos y después de 25 minutos, 75 minutos, 17 horas a temperatura ambiente. Por otra parte, el FIFTA se realizó con un 100% pool de plasma normal y un P-Pool con 200% de fibrinógeno (256% Fbgen-Pool-Plasma diluido con 100% Fbgen-pool de plasma normal). El 256% Fbgen-Pool-Plasma, el 256% Fbgen-Pool-Plasma, que se había diluido con 6% BSA-PBS al 120% o al 63% fueron analizados en el FIFTA con 0-17 minutos el tiempo de reacción (temperatura ambiente). Las proporciones de la turbidez 120%/256% y 63%/256% se calcularon. A 300% Fbgen-Pool-Plasma, que se generó a partir de la adición de fibrinógeno activa purificada a los 256% Fbgen-Pool-Plasma, y el 300% Fbgen-Pool-Plasma, diluido 1:2 (con 6% BSA-PBS) fueron analizados en el FIFTA. Las figuras 7a,b muestran la reacción cinética de FIFTA. En unos 15 minutos de tiempo de reacción a temperatura ambiente, el ensayo llega a cerca de su valor máximo. En aproximadamente 5 minutos de tiempo de reacción a temperatura ambiente, alrededor de 60% del valor máximo ha sido alcanzado. Figura 7b muestra la linealidad de las curvas de calibración en FIFTA. Existe una relación lineal entre el fibrinógeno activo y el aumento de la turbidez en el tiempo de reacción ≥ 5 minutos, temperatura ambiente, si la función del fibrinógeno es $<150\%$ de lo normal. Figura 7c demuestra la reacción de 200% y 100% Pool. El 100%/200% coeficiente de turbidez es estable en el 0,5, en un tiempo de reacción > 4 minutos a temperatura ambiente. En la figura 7d se muestra la reacción de 256% Fbgen-Pool-Plasma, 120% de plasma y 63% de plasma. La mitad de aumento de turbidez máxima se alcanza en 4 minutos (temperatura ambiente), a 5 minutos de incubación el 60% de la máxima deltaA aparece.

La proporción de 120% y 256%, o la proporción de 63%/256% alcanza el valor correcto de 0,47 o 0,25, respectivamente, después de unos 5 minutos el tiempo de reacción; tiempos de reacción > 8 minutos (temperatura ambiente) se han traducido en coeficientes, que son falsamente elevados, lo que indica la pérdida de la linealidad de la FIFTA (figura 7e).

Las reacciones de 300% Fbgen-Pool-de plasma y de 300% Fbgen-Pool-Plasma después de 1:2 dilución (con BSA-PBS) se muestran en cifras 7f, g. Las proporciones de deltaA 150%/300% son correctos con 0,5 sólo en un tiempo de reacción de unos 2 minutos a temperatura ambiente. En ≥ 5 minutos (temperatura ambiente), la proporción aumenta a valores $\geq 0,7$. Esto significa, que funcional fibrinógeno $> 250\%$ de lo normal puede medirse linealmente al disminuir el tiempo de reacción (2 minutos a temperatura ambiente o 50 segundos a 37°C) o por previa 1:2 dilución de la muestra.

Reacción cinética a 37°C

El FIFTA se realizó con 256% Fbgen-Pool-Plasma y con 256% Fbgen-Pool-Plasma, que se había diluido 1:2 con 6% BSA-PBS. Después de los tiempos de reacción de 30-370 segundos, en intervalos de 10 segundos, y después de 20 y 60 minutos en un 37°C baño de agua, deltaA a 405 nm fue determinada. La proporción de turbidez 128%/256% se calcula para cada tiempo de reacción.

Figura 8 muestra el deltaA en dependencia del tiempo de reacción a 37°C. El 50% de la máxima deltaA se produce en un momento de reacción de 100 segundos (37°C) para el 256% Fbgen-Pool-Plasma y en el momento de la reacción de 190 segundos (37°C) para el 128% de dilución de la Fbgen-Pool-Plasma. La proporción de deltaA del 128%/256% alcanza el valor correcto de 0,5 en un período de tiempo de reacción de 2-4 m (37°C) (figura 8b). Por lo tanto, el tiempo óptimo de reacción en FIFTA es 5 minutos a temperatura ambiente o 2 minutos a 37°C.

1.1.5. Longitud de onda de absorción de turbidez

El FIFTA se realizó con P-Pool y con 256% Fbgen-Plasma-Pool; tiempo de reacción = 30 minutos a temperatura ambiente. El resultado de absorbancia se determinó a 405 nm, 450 nm, 595 nm, y 650 nm por fotómetro que trabaja con placas microtiter. La turbidez es mejor medido a 405 nm. El aumento de la longitud de onda da una disminución en la turbidez (Fig. 9).

1.2. Calibración con fibrinógeno que fue purificado

250 mg de liofilizado de fibrinógeno humano purificado (Haemochrom - Enzyme Res., Essen, Alemania) se reconstituye con 12,5 ml 6% BSA-PBS o con P-Pool (que contiene 4,04 g/l de fibrinógeno). Estas muestras de fibrinógeno se han diluido 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 con 6% BSA-PBS o con P-Pool, y la FIFTA fue realizado. El resultado de esta calibración por adición era, que sólo el 46% de fibrinógeno purificado es funcionalmente activo, por

ES 2 302 998 T3

lo que 0-9.3 g/l de fibrinógeno funcional en el 6% BSA-PBS o 4.04-13.3 g/l de fibrinógeno funcional en el P-Pool fueron generados.

Figuras 10a,b muestran la cinética de la reacción del fibrinógeno puro en BSA-PBS en la FIFTA en dependencia del tiempo de reacción a temperatura ambiente o en la dependencia de la concentración de fibrinógeno funcional. En 15 minutos, a temperatura ambiente, alrededor de 75% del máximo de turbidez se logra. No hay ningún nuevo aumento, si el tiempo de reacción es prolongado de 48 minutos a 158 minutos, o 18 horas.

Figuras 10c,d muestran la cinética de la reacción de P-Pool, que se complementó con fibrinógeno puro, en dependencia del tiempo de reacción a temperatura ambiente o en la dependencia de la consiguiente concentración de fibrinógeno funcional. A 15 minutos a temperatura ambiente alrededor de 80% de la turbidez máxima se alcanza. Prolongar el tiempo de reacción de 48 minutos a 158 minutos o 18 horas da un 5-10% de disminución en la final de la turbidez. Fig.10e muestra la comparación entre el fibrinógeno en BSA y fibrinógeno en el plasma.

1.3. Linealidad

256% Fbgen-Plasma-Pool y 256% Fbgen-Plasma-Pool, que se complementó con fibrinógeno puro a 277% o 300% de la función normal, se analizaron en FIFTA y en una versión de FIFTA con reducido a la mitad los volúmenes de ensayo. 225% Fbgen-Plasma-Pool se complementó con fibrinógeno funcional al 300% Fbgen-Plasma-Pool y fue diluido con 0,9% NaCl. Estas muestras de plasma con 0-300% fibrinógeno se midieron en el FIFTA.

El FIFTA es casi lineal en el rango de actividad de fibrinógeno de alrededor de 25-250% del valor medio de plasma normal. 100% de plasma normal da una deltaA de unos 250 mA (figuras 11 a-c). El FIFTA también se puede realizar con 25 μ l de plasma y 50 μ l de reactivo, lo que da un deltaA de unos 125 mA en la placa de microtiter (figura 11 bis).

Variación de los volúmenes de prueba

256% Fbgen-Pool-Plasma y 256% Fbgen-Pool-Plasma, que se ha diluido 1:2 con 6% BSA-PBS, se analizaron en el FIFTA (50 μ l de muestra + 100 μ l de reactivo de la trombina). 67 μ l 256% Fbgen-Pool-Plasma o Fbgen-Pool-Plasma, que se ha diluido 1:2, fueron incubados con 83 μ l de reactivo de trombina. 100 μ l 256% Fbgen-Pool-Plasma o Fbgen-Pool-Plasma, que fue diluido 1:2, fueron incubados con 50 μ l de reactivo de la trombina, que había 600 mUI/ml de trombina; los coeficientes de deltaA 128%/256% se calcularon.

Figuras 12 a,b muestran que sólo la versión de FIFTA con 50 μ l + 100 μ l - en contraste con la versión con 67 μ l + 83 μ l o a la versión con 100 μ l + 50 μ l - da a la correcta proporción de deltaA 128%/256% de 0,5 a 5 minutos la temperatura ambiente.

1.4. Sensibilidad

Para determinar el límite inferior de detección de la FIFTA, 6% BSA-PBS o una mezcla de muestras de suero que son normales (fibrinógeno funcional = 0%) se analizaron diez veces, y la desviación estándar se determinó. El límite inferior de detección es 3 veces la desviación estándar del valor "0". El límite inferior de detección de la FIFTA es 25% de lo normal (0,7 g/l) si el tiempo de reacción es 5 minutos (temperatura ambiente); cuando el tiempo de reacción se aumenta a 15 minutos (temperatura ambiente) el límite de detección inferior disminuye al 7% de lo normal (0,2 g/l).

1.5. Precisión

El 144% P-Pool ha sido analizado 10 veces dentro de ensayo y entre ensayos. Los valores medios se han medido y los coeficientes de variación se calcularon.

El 144% estándar (P-Pool) tuvo un coeficiente de variación dentro de ensayo de 1,8% y un coeficiente de variación entre ensayos del 3,4%.

1.6. Rango normal

n = 39 muestras de plasma con citrato fueron analizados en el FIFTA para obtener el valor medio y la desviación estándar, que dan el rango normal (valor medio $\pm$ 1 desviación estándar) de fibrinógeno funcional en el plasma. La prueba fue calibrada con plasma normal, y con plasma normal, que se había congelado, que contiene 2,8 g/l de fibrinógeno activo, y que fue comprado a Haemochrom, Essen, Alemania.

El rango normal de FIFTA es 100% $\pm$ 20% (valor medio $\pm$ 1 desviación standar); 100% = 2,8 g/l.

1.7. Correlación con el método de Clauss

En = 334 plasmas de los pacientes ($\leq$ 6 horas de edad, en el momento en que las muestras se suelen tirar a la basura) la FIFTA se realizó y los resultados fueron comparados con las concentraciones de fibrinógeno que se han medido sistemáticamente (método modificado de Clauss (Multifibren U[®]) en un BehringCoagulationTimer, DadeBehring,

Marburg, Alemania: 100 μ l de muestra + 200 μ l 50 UI/ml de trombina bovina, 0,15 g/l de gly-pro-arg-pro-ala-amida, 1,5 g/l de CaCl_2 , 15 μ g/ml de Polybrene[®], 0,8 g/l de Glicol-polietileno 6000, 6,4 g/l de NaCl, 50 mM de Tris, 1% albúmina bovina; determinación del tiempo de coagulación por determinación del aumento de la turbidez).

- 5 En $n = 334$ plasmas de los pacientes la FIFTA (valor medio = 132%, desviación estándar = 41%) se realizó y los resultados fueron comparados con el método modificado de Clauss (valor medio = 4,18 g/l, desviación estándar = 1,65 g/l); el factor de correlación fue de $r = 0,843$; $y = 20,9 x + 44,528$ (figura 13 a). Los resultados de FIFTA de los pacientes son normalmente distribuidos según Gauss (gráfico 13b).

10

1.8. Inhibición de la generación de fibrina por heparina

1.8.1. Concentración inhibitoria del 50% de la heparina en contra de la trombina

- 15 50 μ l de 100% Pool se añadieron a 10 μ l 0-160 UI/ml heparina. 100 μ l 200 mUI/ml de trombina en 6% BSA-PBS (sin Polybrene[®]) se han añadido, y el aumento de la absorbancia a 405 nm fue determinada. La heparina inhibe la deltaA en dependencia de la concentración de la heparina (figura 14a). Una concentración de la heparina $\geq 0,63$ UI/ml inhibe completamente la trombina en el sistema de ensayos descritos. La concentración que inhibe el 50% es de unos 0,1 UI/ml de heparina (gráfico 14b). 1.8.2. El punto de tiempo de 50% de la inhibición de la interacción entre
20 10 UI/ml de heparina y trombina: 50 μ l P-Pool fueron incubados con 100 μ l 200 mUI/ml de trombina en 6% BSA-PBS (sin Polybrene[®]). En 0 minutos (antes de la adición de trombina) y en 0.5-11 minutos el tiempo de reacción (a temperatura ambiente) 10 μ l 160 UI/ml de heparina en 6% BSA-PBS han sido añadidos (concentración final de la heparina en plasma + trombina reactivo = 10 UI/ml; esta concentración de la heparina ha causado un deltaA de 20 mA, y todos los resultados de las pruebas fueron corregidas por el presente deltaA). El deltaA a 405 nm se determinó
25 inmediatamente después de cada momento, en que la heparina se añadió, y en función del tiempo de incubación. Para determinar el momento en que la heparina se añade (a temperatura ambiente), que es necesaria para disminuir el deltaA de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos o 20 minutos por 50%, 50 μ l P-Pool fueron incubados con 100 μ l 200 mUI/ml de trombina en 6% BSA-PBS (sin Polybrene[®]). Después de 0 s (antes de la adición de trombina) y después de 10-140 s (en intervalos de 10s) 10 μ l 60 UI/ml de heparina en 6% BSA-PBS se añadió. El deltaA a 405 nm en función
30 del tiempo de incubación (3-20 min) fue determinado. La heparina sólo puede evitar la generación de fibrina dentro de los primeros 2 minutos (temperatura ambiente) (figuras 15 bis c). A pesar de la adición de una concentración final de la heparina de 10 UI/ml en un tiempo de incubación de 30 segundos (temperatura ambiente), todavía hay un 50% de conversión de fibrinógeno en fibrina 133 mUI/ml, es decir 133 mIU/ml de trombina son capaces de convertir un 50% de fibrinógeno de plasma en aproximadamente 30 segundos. El deltaA de 15 minutos es $> 80\%$ de la máxima deltaA,
35 como se observó anteriormente. Sin embargo, el deltaA en presencia de 10 UI/ml heparina dentro de los primeros 5 minutos de tiempo de reacción es mayor que en ausencia de la heparina.

El momento de la adición de heparina que da una disminución de 50% de deltaA a un tiempo de incubación de 5-20 minutos (temperatura ambiente) es de aproximadamente 30 segundos.

40

1.9. Inhibición de la generación de fibrina por arginina

- a) 10 ml de reactivo de FIFTA se han añadido a 5 ml de P-Pool; la mezcla se dio en un Multipette[®], y de inmediato
45 100 μ l de esta mezcla se dio en una placa de microtítulo, cuyos pozos se han cubierto con 200 μ l 0-1500 mM de arginina, de pH 8,7, que dio al final las concentraciones de arginina de 0, 16, 31, 62,5, 125, 250, 500, 1000 mM. El deltaA a 405 nm se determinó en función del tiempo de incubación a temperatura ambiente. b) 10 ml de reactivo de FIFTA se han añadido a 5 ml de P-Pool; la mezcla se dio en un Multipette[®], y después de 0-4 minutos (temperatura ambiente), 100 μ l de esta mezcla se dio en una placa de microtítulos, cuyos pozos previamente se han cubierto con
50 200 μ l 0-1500 mM de arginina, de pH 8,7. La turbidez a 405 nm fue medido inmediatamente después de cada paso de adición de la mezcla de reacción a la arginina en la placa. La absorbancia inicial de control se determinó a través de la adición del reactivo de FIFTA, sin la trombina, a el plasma y luego la mezcla se añadió a 0-1500 mM de arginina. El deltaA fue calculado por resta de la primera absorbancia de la absorbancia que fue generada por la trombina (adición de 100 μ l reactivo de FIFTA sin trombina da una deltaA de unos 100 mA en comparación con la absorbancia de 50 μ l de muestra).
55

- c) 50 μ l P-Pool fueron incubados con 100 μ l de reactivo de FIFTA. Después de 0-30 minutos (temperatura ambiente) 0-70 μ l 1,5 M arginina, de pH 8,7, se han añadido y después del último punto de tiempo (30 min) el deltaA se determinó a 405 nm. Una concentración de ≥ 125 mM de arginina (final), inhibe completamente la deltaA, si la arginina reacciona desde el inicio de la acción de la trombina (figuras 16 a-c). El 50% de la máxima deltaA se produce a 62,5 mM de arginina. 16 mM de arginina incrementa la deltaA en alrededor de 20%. Las concentraciones de arginina ≥ 250 mM de (final), completamente inhiben deltaA, si arginina reacciona dentro de los primeros 4 minutos (temperatura ambiente), de la interacción de la trombina con fibrinógeno. 125 mM de arginina sólo puede inhibir deltaA, si arginina reacciona dentro de los primeros 100 segundos (temperatura ambiente).
65

La adición de arginina en un momento de reacción de la trombina con fibrinógeno de 2,5 minutos da una disminución de deltaA, que depende de la concentración de la arginina. Dado que un gran coágulo se genera en el Multipette[®], los valores en los momentos de reacción > 3 minutos (temperatura ambiente) no son válidas. Figura 16d muestra, que

las concentraciones de arginina ≥ 250 mM (final), sólo pueden inhibir deltaA, si se añade la arginina en los 3 primeros minutos (temperatura ambiente) de la interacción de la trombina con fibrinógeno. 50% del máximo deltaA aparece en los puntos de reacción de 7 minutos o 15 minutos con 94 mM o con 477 mM arginina, respectivamente.

5 1.10. *Disolución de la fibrina por arginina*

50 μ l P-Pool fueron incubados con 100 μ l de reactivo de FIFTA. Después de 30 minutos (temperatura ambiente) 10 μ l o 70 μ l 1,5 M arginina, de pH 8.7 (concentración de arginina 94 mM de o 477 mM (final)) se agregaron, y deltaA se determinó a 405 nm después de 0-132 minutos (temperatura ambiente).

Las concentraciones de arginina de 477 mM (final), que se han añadido en el punto de tiempo de reacción entre la trombina y fibrinógeno de 12 minutos o 30 minutos pueden reducir la deltaA en función del tiempo de incubación: 50% de la disminución máxima se produce después de otros 30 minutos (temperatura ambiente) (figura 17). Cuando la incubación con la arginina se aumenta a > 100 minutos, alrededor de 30% de la máxima deltaA, que anteriormente se había generado, sigue siendo refractaria a la disolución.

2. FIATA

2.1. *Inactivación de fibrinógeno por la vancomicina*

200 μ l de 256% del normal funcionamiento de fibrinógeno en P-Pool fueron incubados con 25 μ l 0-100 mM de la vancomicina o con 0-100 mM de cloramina-T[®] en H₂O durante 15 minutos (37°C). 50 μ l de muestras de estas mezclas de reacción fueron retiradas y se mezclaron con 100 μ l 200 mUI/ml de trombina, 400 μ g/ml de Polybrene[®], 6% BSA-PBS. Los resultados fueron normalizados por el análisis simultáneo de 144% del normal funcionamiento de fibrinógeno en el P-Pool.

Vancomicina inactiva fibrinógeno en el plasma en la dependencia de la concentración de vancomicina: aproximadamente 1 mM de la vancomicina inactiva el 50% de fibrinógeno en el plasma humano (50% concentración inhibitoria (IC₅₀) = 1 mM). Por comparación, el IC₅₀ de cloramina-T[®] contra el fibrinógeno plasmático es aproximadamente 2 mM (figura 18).

2.2. *¿Antioxidantes inhiben la reacción entre la vancomicina y el fibrinógeno plasmático?*

750 μ l 256% de la normalidad fibrinógeno funcional en P-Pool fueron suplementados con 250 μ l de a) los inhibidores de ¹O₂ metionina (200 mM) o ascorbato (200 mM), b) el inhibidor de radicales de $\cdot$ OH manitol (200 mM), o c)

H₂O. 25 μ l muestras fueron incubadas con 25 μ l 0-2.5 mM de la vancomicina o 0-5 mM de cloramina-T[®] en PBS durante 15 minutos a 37°C. Luego, 100 μ l 200 mUI/ml de trombina, 400 μ g/ml de Polybrene[®] en 6% BSA-PBS se agregaron, y la mezcla se incubó durante 3, 5, 9, y 17 minutos (temperatura ambiente). La actividad de fibrinógeno en el momento de 5 minutos se calculó contra el control (100% = 0 mM de la vancomicina o cloramina-T[®]).

La interacción entre la vancomicina y el fibrinógeno en el plasma no puede ser apagado por metionina, ascorbato, o manitol (figura 19a). El 100% de control de la metionina o H₂O dio 386 $\pm$ 11 mA/5 minutos (temperatura ambiente), de con ascorbato de 360 $\pm$ 14 mA; y el control con el manitol fue 435 $\pm$ 12 mA. El control de los experimentos con cloramina-T[®] en lugar de la vancomicina mostraron que la reacción del fibrinógeno plasmático con cloramina puede ser apagado por metionina o por ascorbato (gráfico 19b).

Por lo tanto, el mecanismo de reacción de la interacción de la vancomicina con fibrinógeno, a diferencia de los que entre el fibrinógeno y cloraminas, parece no involucrar a las especies reactivas de oxígeno del tipo de oxígeno singlete (¹O₂).

2.3. *Optimización de FIATA*

La concentración de vancomicina

50 μ l P-Pool o P-Pool, que se había diluido 1:2 o 1:4 (con 6% BSA-PBS), se incubaron con 50 μ l 0-6.8 mM de la vancomicina en PBS. El deltaA a 405 nm fue determinada después de 1 m (RT).

25 μ l Fbgen-Pool (300% de lo normal; 8,4 g/l) se incubaron con 125 μ l 0,55 mM, 1,1 mM, o 2,2 mM de la vancomicina en PBS por 1 minuto (temperatura ambiente). A continuación, el aumento de la turbidez a 405 nm fue determinada.

Un aumento de la concentración de vancomicina da un aumento de la turbidez de la mezcla de reacción. Este aumento proporcional puede observarse en P-Pool y en P-Pool, que fue diluido 1:2 o 1:4. La turbidez del 4,4 mM de la vancomicina en PBS (0% fibrinógeno en BSA) es <50 mA a 405 nm (figura 20a). El deltaA que se obtiene en la FIATA se produce en segundos y es estable durante al menos 10 minutos.

Figura 20b muestra, que la vancomicina (68,8 μ moles) que se había dado a 25 μ l 300% Fbgen-Pool da una saturación de deltaA en alrededor de 4 g/l de fibrinógeno. Con 137.5-275 μ moles de la vancomicina esta saturación se

produce a 6-8 g/l de fibrinógeno. La concentración óptima de la vancomicina en el reactivo de la vancomicina de la FIATA es 3-6 mM.

5 2.4. Calibración de FIATA con fibrinógeno que fue purificado

250 mg de fibrinógeno, que fue purificado y liofilizado, se han reconstituido con 12,5 ml de 6% BSA-PBS o de P-Pool. Las muestras de fibrinógeno, que se obtuvieron, se han diluido 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 con PBS-BSA o P-Pool, respectivamente; por lo tanto, las muestras tenían 0-20 g/l de fibrinógeno en PBS-BSA o 4-24 g/l de fibrinógeno en P-Pool.

Figura 21 muestra la reacción de fibrinógeno puro en FIATA. Una concentración de fibrinógeno de 10 g/l, da una deltaA de unos 1000 mA, tanto para el fibrinógeno en el 6% de albúmina y el fibrinógeno en P-Pool. FIATA es lineal hasta alrededor de 8 g/l, (286% del normal) fibrinógeno en la muestra, lo que da un deltaA de unos 800 mA.

15 2.5. Linealidad de FIATA

0-55 µl 300% de lo normal (8,4 g/l fibrinógeno) P-Pool fueron incubados con a) 50 µl de PBS y 50 µl de 4,4 mM vancomicina en PBS o b) 100 µl de PBS y 100 µl de 4,4 mM vancomicina en PBS. 0-35 µl 300% Fbgen-Pool fueron incubados con 35-0 µl PBS (para compensar el volumen) y a) 50 µl de PBS y 50 µl 4,4 mM vancomicina en PBS o b) 100 µl de PBS y 100 µl de 4,4 mM vancomicina en PBS.

FIATA es casi lineal hasta una concentración de fibrinógeno de aproximadamente 150% de lo normal (4,2 g/l) (figura 22a,b). Si los FIATA - volúmenes se duplicaron, los obtenidos deltaA a 405 nm también son elevados a dos veces (figura 22c). La turbidez inicial de 50 µl de plasma podría ser > 500 mA (pacientes con concentraciones elevadas de triglicéridos o de bilirrubina), por lo que la versión de 25 µl/50 µl/50 µl de FIATA es la preferida (figura 22d). FIATA, que es modificado, con 50 µl de muestra y 50 µl de reactivo es lineal sólo hasta alrededor de 100% del normal de fibrinógeno (figura 22e).

30 2.6. Sensibilidad de FIATA

Para determinar el límite de detección inferior de FIATA, un pool de suero normal, (0% del normal fibrinógeno) se analizaron 10 veces, y la desviación estándar (SD) fue calculada. El límite inferior de detección se define como 3 veces la SD del valor "0".

El límite inferior de detección de FIATA - tal como se define como 3 veces la SD del valor 0% - es 4% de lo normal (0,1 g/l).

40 2.7. Precisión de la FIATA

El P-Pool (143% de lo normal = 4,0 g/l de fibrinógeno) fue 10 veces analizado dentro de ensayo y entre ensayos. Los valores medios se han determinado y los coeficientes de variación se han calculado.

Para 143% de la normal de fibrinógeno (P-Pool-estándar) el coeficiente de variación en el ensayo fue 1,9% y el coeficiente de variación entre ensayos fue 3,5%.

50 2.8. Los valores normales de la FIATA

n = 39 muestras de plasma con citrato fueron analizadas en FIATA para obtener valor medio y la desviación estándar, que permite obtener el rango normal (valor medio ± 1 desviación estándar) de fibrinógeno plasmático, si se mide por FIATA. El ensayo se calibra con un pool de plasmas normales de estudiantes y con 100% plasma normal, que contiene 2,8 g/l de fibrinógeno, que había sido congelado sin aditivos de liofilización (Haemochrom, Essen, Alemania).

El rango normal de la FIATA es 100% + - 20% (valor medio + - 1 SD), 100% de lo normal = 2,8 g de/l.

60 2.9. Correlación de FIATA con determinaciones de fibrinógeno funcional

En n = 321 plasmas de pacientes (≤ 6 horas de edad; en el punto de tiempo, cuando el plasma se descarta) se realizó la FIATA, y la FIATA se comparó con la forma rutinaria de medir las concentraciones de fibrinógeno (método modificado de Clauss (Multifibren U[®]) en un BehringCoagulationTimer (DadeBehring, Marburg, Alemania). En n = 344 muestras de pacientes, FIATA se comparó con FIFTA: 50 µl de plasma + 100 µl 300 mUI/ml de trombina, 6% de albúmina-PBS, 400 µg/ml, Polybrene[®]; determinación de deltaA/5 minutos (temperatura ambiente).

En $n = 321$ plasmas de los pacientes, los plasmas elegidos por casualidad, FIATA

(valor medio ± 1 SD = $130 \pm 52\%$) se correlaciona con un método modificado de Clauss (valor medio = $4,1 \pm 1$ SD = $1,7$ g/l) con $r = 0,755$; $y = 19,521x + 49,165$

(figura 23a). En $n = 344$ plasmas de pacientes, FIATA (valor medio ± 1 SD = $130 \pm 43\%$) corresponde a la determinación de fibrinógeno funcional en el FIFTA (valor medio ± 1 SD = $124 \pm 40\%$) con $r = 0,813$; $y = 0,861x + 22,993$ (gráfico 23b). Los resultados del FIATA de los pacientes ($n = 344$) se distribuyen habitualmente de acuerdo con Gauss (figura 23c).

2.10. Precipitación de fibrinógeno en el plasma por la vancomicina

25 μ l de 143% (4,0 g/l), P-Pool fueron incubados con 25 μ l 0-50 mM de la vancomicina en PBS, 50 μ l PBS, 0,1% Triton X 100[®] y 50 μ l 850 mM de KCl en H₂O de 1 minuto (23°C). La turbidez a 405 nm fue determinada. Para invertir la precipitación, 0-110 μ l 1 M NaHCO₃, pH 8,6, o H₂O se añadieron a 50 μ l P-Pool, que había reaccionado con 50 μ l 4,4 mM vancomicina en PBS para 1 minuto (temperatura ambiente). Para estudios de pH, 5 ml de P-Pool se mezclaron con 5 ml de PBS y 0-1750 μ l 1 M NaHCO₃, el pH 8,6. 5 ml de P-Pool fueron incubados con 5 ml 4,4 mM vancomicina en PBS para 3 minutos (temperatura ambiente). A continuación, la mezcla de reacción fue centrifugada a 2500g (4000 vueltas por minuto) durante 10 minutos.

El sobrenadante se separó del precipitado. El precipitado no ha sido lavado o se ha lavado 3 veces con H₂O, y la resuspensión ha sido centrifugada cada vez. Precipitados, que no han sido lavados, han sido solubilizados por adición de 500 μ l

1 M NaHCO₃, pH 8,6, y 4500 μ l PBS; precipitados, que han sido lavados, han sido solubilizados por adición de 300 μ l 1 M NaHCO₃ a 1700 μ l de resuspensión en H₂O. 3 preparativos de precipitado, que se han lavado, también se han secado a temperatura ambiente, y estos precipitados secos fueron pesados. Resuspensiones de precipitados y sobrenadantes han sido analizados para la función de fibrinógeno. 100 μ l 1 M NaHCO₃, pH 8,6, se añadieron a 400 μ l precipitados solubilizados, que no han sido lavados; estas soluciones, y las muestras de precipitados después de la resuspensión, que han sido lavadas, y los sobrenadantes, fueron analizados para el total de proteínas, la concentración de la albúmina, y la actividad de la pseudocolin-esterasa con Hitachi 917 analizador, Roche, Basilea, Suiza y se analizó la vancomicina con un Integra 800 (FPIA). Se realizó la electroforesis en gel de agarosa (HydrasysLC, Sebia, Fulda, Alemania). Para control, 1 ml de suero de Pool se incubaron con 1 ml de 4,4 mM de la vancomicina en PBS, y la concentración de vancomicina fue determinada. Vancomicina aumenta la turbidez de plasma con citrato en la dependencia de su dosis. La turbidez aumenta hasta alrededor de 20 veces (figura 24a). Esta precipitación puede ser revertido por NaHCO₃; 30 μ l 1 M NaHCO₃, pH 8,6, es capaz de disminuir la turbidez generada hasta el valor de la PBS de control (sin vancomicina). Si se añade H₂O en lugar de NaHCO₃, no hay cambios en la turbidez, que se había generado por la reacción de la vancomicina con el plasma (gráfico 24b). La turbidez también está disminuyendo por adición de arginina, pH 7,5, pero no por PBS y sólo ligeramente por PBS, que es 20 veces concentrado (figura 24c). Dar de ≥ 10 μ l 1 M NaHCO₃, pH 8,6, a 50 μ l de plasma y 50 μ l de PBS da un valor de pH $\geq 8,5$ (figura 24d). 2.11. Electroforesis de las muestras de plasma, que habían sido incubadas con vancomicina: 950 μ l P-Pool fueron incubados con 50 μ l 0-200 mM (0-10 mM final) vancomicina durante 5 min (temperatura ambiente). Luego estas muestras y muestras de los precipitados que han sido solubilizados (véase el 2.10.) fueron sometidas a electroforesis, y la concentración de proteínas totales en estas muestras se ha determinado.

Fibrinógeno en el plasma se encuentra en la $\beta 2$ -fracción de electroforesis.

Un aumento de la conc. de vancomicina en plasma da una disminución proporcional de la $\beta 2$ -fracción (figura 25.1-9). A 5 mM de la vancomicina en el plasma sólo el $\beta 2$ -pico desaparece completamente. Las conc. de proteína fueron: 59,0, 59,1, 58,6, 59,1, 58,4, 57,0, 57,8, 56,1, 55,7, 49,4 g/l para las concentraciones de vancomicina de 0, 0,29, 0,44, 0,66, 0,99, 1,48, 2,22, 5, 10 mM, respectivamente. El control de la electroforesis (0 mM de la vancomicina) ha tenido los siguientes picos de proteínas: 52,8% de albumina, 3,4% $\alpha 1$, 12,0% $\alpha 2$, 10,2% $\beta 1$, 10,9% $\beta 2$, y 10,7% gamma para 0 mM, 0,29 mM, 0,44 mM, 0,66 mM, 0,99 mM, 1,48 mM, 2,22 mM, 5 mM, 10 mM de la vancomicina. La concentración de fibrinógeno en el sobrenadante de 1 parte de plasma y 1 parte 4,4 mM vancomicina en PBS, fue 0,32 g/l, es decir, 0,64 g/l de fibrinógeno quedaba de inicial 4,0 g/l. Así, 16% de fibrinógeno en el plasma se mantuvo, mientras que 84% de fibrinógeno ha sido precipitado por medio del 4,4 mM vancomicina. Figura 25.10. muestra la electroforesis del precipitado que ha sido disuelto y que no haya sido lavado. 77% de la proteína se puede encontrar en la fracción β , alrededor de 23% es albúmina. La concentración total de proteínas es 6,1 g/l, la concentración de albúmina fue 0,82 g/l y la PCHE actividad fue 136 U/l. P-Pool tenía 27 g/l de albúmina y una actividad de la pseudocolinesterasa (PCHE) de 3340 U/l. Después de lavar el precipitado 3 veces con H₂O $> 95\%$ de la proteína en el precipitado se encuentran en la fracción β como un único pico (figura 25.11). En esta fracción de 2 ml hubo 7 g/l de proteína (= 2,8 g/l en 5 ml), la albúmina no fue detectable, PCHE tenía 13 U/l, y la concentración de la vancomicina ha sido 583 mg/l (0,4 mM), es decir, de 2,2 mM de la vancomicina en la mezcla de reacción de plasma+vancomicina 80 μ M de vancomicina adjuntan a 5 μ M de fibrinógeno, que precipita (16 moléculas de vancomicina per molécula de fibrinógeno). En Pool de suero hubo 2,1 mM vancomicina después de una incubación 1 +1 con 4,4 mM de vancomicina en PBS, en el sobrenadante de P-Pool hubo 0,17 mM de vancomicina. El peso de las muestras de los precipitados después de secado fue 13+2 mg, es decir, alrededor de 2,6 g/l (76%) de 3,4 g/l de fibrinógeno plasmático que precipitó fue purificada, alrededor de 24% del fibrinógeno se perdió durante el proceso de lavado.

2.12. Reactividad de fibrinógeno que ha sido precipitada por la vancomicina y se ha vuelto a disolverse

50 μ l P-Pool o 50 μ l 300% Fbgen-Pool-Plasma fueron incubados con 50 μ l 4,4 mM vancomicina en PBS por 1 minuto (temperatura ambiente). A continuación, 20 μ l o 40 μ l 1 M NaHCO_3 , pH 8,6 y 200 μ l 300 mUI/ml trombina, 400 μ g/ml Poly-brene®, 6% BSA-PBS (reactivo de FIFTA) se han añadido, y la deltaA a 405 nm fue determinada. Control 1 = vancomicina después (en vez de antes) del NaHCO_3 . Control 2 = sustitución de la vancomicina del control 1 por PBS. Control 3 = sustitución de la vancomicina y NaHCO_3 de control 1 por PBS. Experiment of control = 50 μ l P-Pool + 0-50 μ l 1 M NaHCO_3 , pH 8,6 + 50 μ l PBS + 200 μ l reactivo de FIFTA.

El fibrinógeno que ha sido precipitada por la vancomicina, y que se ha vuelto a disolver recupera la actividad (figuras 26a,b); esta forma de fibrinógeno parece ser más reactivo que el fibrinógeno normal: el 50% de la máxima deltaA de fibrinógeno, que reacciona con la vancomicina, se alcanza después de 2 minutos (RT), mientras que fibrinógeno normal necesita unos 4 minutos para ello. La máxima deltaA en el control 1 y control 3 es ligeramente superior; control 2 muestra, que la FIFTA a pH fisiológico da casi el doble de deltaA que a pH 8,6. El experimento con NaHCO_3 muestra una disminución en el máximo deltaA por el aumento de la cantidad de NaHCO_3 . Adición de 10-20 μ l NaHCO_3 parece acelerar la generación de fibrina dentro de los primeros 5 minutos a temperatura ambiente (RT) (figura 26c).

2.13. Estimulación de t-PA por el fibrinógeno que fue precipitada por la vancomicina

Sistema purificada

0-100 μ l del precipitado de 2.4. que se ha disuelto (en 500 μ l 1 M NaHCO_3 , pH 8,6, + 4500 μ l PBS, pH 7,4) y 100-0 μ l de PBS (por compensación de los volúmenes) se incubaron con 50 μ l 0,1 mg/ml de Glu-plasminógeno en PBS, 1% BSA, 50 μ l 0,6 M de fosfato de sodio, pH 7,4, o 50 μ l 1 M NaHCO_3 , pH 8,6, y 50 μ l 1000 UI/ml de t-PA en PBS, 0,1% Triton X 100® durante 30 minutos (RT). A continuación, 25 μ l 2,7 mM de Val-Leu-Lys-pNA, 1,7 M KCl se añadieron y deltaA/h se midió a 405 nm a temperatura ambiente, mediante un fotómetro de placas microtiter.

33....Sistema de plasma

25 μ l P-Pool fueron incubados con 25 μ l 0-50 mM vancomicina en PBS y 50 μ l 1000 UI/ml de t-PA en PBS, 0,1% Triton X 100® y 25 μ l 0 mM o 15 mM de cloramina-T® por 30 minutos (RT). A continuación, 25 μ l 2,7 mM Val-Leu-Lys-pNA, 1,7 M KCl se añadieron. La actividad de la plasmina, que se generó, se determinó por medio de lineal deltaA por minuto (RT) en un fotómetro de placas microtiter.

A pH 7,4 el precipitado, que se ha vuelto a disolverse, estimula t-PA en dependencia de la dosis. 100 μ l precipitado, que se ha vuelto a disolverse, estimula t-PA unas 6 veces, incluso en presencia de una fuerza anormal de iones (> 600 mM de Na^+), a pH 8,6 esta estimulación es sólo 2,5 veces (figura 27a). En el sistema plasmático, la máxima actividad de plasmina se mide, cuando 1 parte de plasma se incuba con 1 parte de 1.5-5 mM vancomicina en PBS, y cuando las mezclas se oxidan con 1 parte 15 mM cloramina-T®; aquí, t PA es estimulado hasta alrededor de 20 veces (figura 27b). Sin oxidación, la actividad de t-PA aumenta 2,5 veces, si la muestra se incuba con 2 mM vancomicina, y si el último momento de la incubación se incrementa a 158 minutos (RT) (figura 27c).

2.14. Reactividad plasmática de vancomicina con polímeros solubles de fibrina (SFP) o suero

1 ml de pool de plasma normal se complementó con 50 μ l 100 mg/ml de fibrinógeno purificado (Haemocomplettan®), lo que da 260% SFP en el plasma. 50 μ l de muestras de plasma que se han complementado con SFP o que no fueron completados, se analizaron en FIFTA y en FIATA. Pool de suero también fue analizado en FIFTA y en FIATA.

Plasma normal con 260% SFP tiene 271% FIATA y 171% FIFTA. A pool de suero, que ha sido centrifugada, tiene 0% FIFTA y FIATA.

2.15. Reactividad de la vancomicina con el plasma que se ha oxidado

25 μ l P-Pool o P-Pool, que se ha complementado con 8,6 mM (3,2 g/l) EDTA, fueron incubados con 25 μ l 0-89 mM cloramina-T® en PBS durante 60 minutos (RT). Luego, FIATA y FIFTA se realizaron. En FIATA, 25 μ l PBS se agregaron, y la absorbencia a 405 nm se determinó (valor inicial). 50 μ l 4,4 mM de la vancomicina en PBS se añadieron, y después de 1 minuto (RT) la absorbencia a 405 nm se determinó de nuevo. En el FIFTA, 100 μ l reactivo de FIFTA se añadieron, y deltaA a 405 nm fue determinada. 100% de control = P-Pool sin oxidante.

Plasma con citrato o con EDTA reacciona con vancomicina. La reactividad aumenta en un 40% del valor del control de citrato, en caso de los plasmas con EDTA han sido oxidados a 10-20 mM de cloramina-T® (figura 28). En cambio, cloramina-T® inactiva fibrinógeno en el FIFTA: 2 mM de cloramina-T® inactiva 50% de fibrinógeno. Esta inactivación se produce en P-Pool y en P-Pool con EDTA. 8,6 mM EDTA da una disminución de FIFTA de alrededor de 50%, independiente de la concentración de oxidantes.

2.16. Reactividad de la vancomicina con el plasma que contiene EDTA

25 μ l P-Pool se incubó con 25 μ l PBS o con 25 μ l 2 mM cloramina-T[®] en PBS. Después de 60 minutos (RT), 25 μ l 0-172 mM de EDTA en PBS se añadió. Después de 5 minutos (RT) el FIATA, y el FIFTA se realizaron como en 2,7.

50-100 mM de EDTA están disminuyendo FIATA por sólo 10-20%. En contraste, EDTA en concentraciones > 5 mmol/l da una disminución de la actividad de FIFTA de alrededor de 50%, en muestras oxidadas con 0 mM de con 2 mM de cloramina (figura 29).

2.17. Reactividad de la vancomicina con productos de degradación del fibrinógeno o con fibrinógeno, que ha sido escindida con BrCN

25 μ l P-Pool fueron incubados con 25 μ l 0 mM o 15 mM de cloramina-T[®] en PBS durante 60 minutos (RT). A continuación, 50 μ l 1000 UI/ml t-PA, 0,1% Triton X 100[®] en PBS se añadieron. Después de 0-8 horas (RT) 25 μ l 4,4 mM de la vancomicina en PBS fueron añadidos, y la deltaA a 405 nm fue determinada. Además, 10 mg/ml de fibrinógeno, que ha sido escindida por BrCN, en 6% BSA-PBS o en pool de suero, fueron ensayadas en el FIATA.

t-PA disminuye la reactividad de plasma con citrato con vancomicina. Una incubación de 3 h de 25 μ l de plasma con citrato, que se ha oxidado con 15 mM (final) de cloramina-T[®], con 50 μ l 1000 UI/ml de t-PA da una completa pérdida de reactividad con la vancomicina, una pérdida de reactividad de 50% se produce en aproximadamente 1 hora, mientras que en plasma normal 6 h son necesarias para una 50%-pérdida de reactividad con la vancomicina; y esto es debido a la ausencia de α 2-antiplasmina activa en plasma que ha sido oxidado con 15 mM chloramina (figura 30).

Fibrinógeno, que fue escindida con BrCN, no reacciona en el FIATA.

Figuras

Figuras 1a-d

Optimización de la concentración de trombina

50 μ l P-Pool (figura 1a) o P-Pool, que se ha diluido 1:2 con 6% BSA-PBS (figura 1b) se incubaron con 100 μ l 0-1519 mUI/ml trombina bovina durante 0-15 m (RT), y el aumento de turbidez (deltaA) a 405 nm se determinó; las concentraciones de trombina en el reactivo de la trombina fueron: 0 mUI/ml (○), 26 mUI/ml (■), 39 mUI/ml (–), 59 mUI/ml (X), 89 mUI/ml (*), 133 mUI/ml (□), 200 mUI/ml (+), 300 mUI/ml (●), 450 mUI/ml (◇), 675 mUI/ml (◆), 1013 mUI/ml (Δ), 1519 mUI/ml (▲).

Ratios de deltaA 50%P-Pool/P-Pool (Fig. 1c). Tiempos de incubación (RT) de P-Pool: 2,5 minutos (◆), 5 minutos (●), 10 minutos (▲), 15 minutos (■); tiempos de incubación (RT) de 50%P-Pool: 2,5 minutos (◇), 5 minutos (○), 10 minutos (Δ), 15 minutos (□) (figura 1d).

Figuras 2a-d

Optimización de la concentración de Polybrene[®] (PB)

P-Pool se ha complementado con 0-35 UI/ml heparina, y ha sido analizado en FIFTA. El reactivo de FIFTA tenía 200 mUI/ml de trombina, 6% BSA-PBS y 0 μ g/ml Polybrene[®] (figura 2a), 50 μ g/ml PB (figura 2b), 100 μ g/ml PB (figura 2c), 200 μ g/ml PB (figura 2d); concentraciones de heparina en la muestra: 0 UI/ml (●), 0,14 UI/ml (■), 0,27 UI/ml (▲), 0,55 UI/ml (X), 1,09 UI/ml (*), 2,19 UI/ml (●), 4,38 UI/ml (+), 8,75 UI/ml (Δ), 17,5 UI/ml (○), 35 UI/ml (□).

36... Figuras 2e-g

Optimización de la concentración de Polybrene[®]

P-Pool fue complementado con 0-100 UI/ml heparina, y se analizó en FIFTA. El reactivo de FIFTA tenía 200 mUI/ml de trombina, 6% BSA-PBS y 400 μ g/ml, PB (figura 2e), 800 μ g/ml, PB (figura 2f), 1600 μ g/ml, PB (figura 2g); concentraciones de heparina en la muestra: 0 UI/ml (◆), 11 UI/ml (■), 13 UI/ml (▲), 17 UI/ml (X), 21 UI/ml (*), 26 UI/ml (●), 33 UI/ml (+), 41 UI/ml (Δ), 51 UI/ml (◇), 64 UI/ml (○), 80 UI/ml (□), 100 UI/ml (–).

Figura 3

Neutralización de 100 UI/ml de heparina en plasma por medio de Polybrene[®]

25 μ l 0-75 mg/ml Polybrene[®] en H₂O se ha añadido a 50 μ l P-Pool (●) o PB se ha añadido a 50 μ l P-Pool que tenía 100 UI/ml heparina (■). Luego, 100 μ l 200 mUI/ml trombina en 6% BSA-PBS, 400 μ g/ml PB se añadieron y deltaA (ΔA) a 405 nm fue determinada.

Figura 4

FIFTA para el plasma con heparina, que había sido neutralizada por Polybrene[®]

- 5 25 μ l 0-75 mg/ml Polybrene[®] en H₂O se añadieron a 50 μ l P-Pool (●), o a 50 μ l P-Pool con 100 UI/ml heparina (■). Luego, 100 μ l 200 mUI/ml trombina, 400 μ g/ml PB, 6% BSA-PBS se añadieron y deltaA a 405 nm se midió.

Figura 5

- 10 *Aumento de deltaA por complejos de heparina/Polybrene[®]*

50 μ l de plasma con 0-80 UI/ml heparina fueron incubados con 100 μ l de reactivo de FIFTA sin la trombina, pero con 0 μ g/ml (○), 400 μ g/ml (■), 800 μ g/ml (▲), o 1600 μ g/ml (●) PB, y deltaA a 405 nm fue determinado.

- 15 Figura 6a, b

El aumento de la turbidez depende de albúmina

- 20 P-Pool (●), P-Pool que se ha diluido 1:2 con PBS (■) o con 6% BSA-PBS (○) fueron analizados en FIFTA, con un reactivo de la trombina con 200 mUI/ml de trombina sin albúmina (gráfico 6a). Las proporciones de deltaA diluido/no diluido se calcularon (figura 6b).

Figuras 7a,b

- 25 *Cinética de la reacción de FIFTA*

- 30 FIFTA se realizó con P-Pool y con P-Pool, que se ha diluido con 6% de albúmina- PBS. ΔA se determinó después de 0-15 minutos, y después de 25 minutos, 75 minutos, 17 horas (RT); actividad de fibrinógeno [% del normal] en la maestra: 0% (○), 2,5% (□), 3,9% (-), 5,7% (◇), 8,6% (●), 19% (+), 29% (Δ), 43% (*), 65% (◆), 98% (■), 146% (▲) (gráfico 7a). ΔA después de 2 minutos (◆), 5 minutos (■), 10 minutos (▲), 15 minutos (□), 25 minutos (*), 75 minutos (●), 17 horas (○) (figura 7b).

Figuras 7c-e

- 35 *Cinética de reacción de FIFTA*

- 40 FIFTA se realizó con 100% Normal-Pool (●), 200% Pool-Plasma (■) (figura 7c), 256% Plasma-Pool (■), 120% Plasma-Pool (●), y 63% Plasma-Pool (▲) (figura 7d); coeficientes de ΔA 120%/256% (●) y 63%/256% (▲) (figura 7e).

Figuras 7f,g

Cinética de la reacción de FIFTA

- 45 FIFTA se realizó con 300% Fbgen-Pool (●), Fbgen-Pool que fue diluido 1:2 con 6% BSA-PBS (■), y un 120% calibrador de Plasma-Pool (Δ) (figura 7f); coeficientes ΔA 150%/300% (figura 7g).

Figuras 8a,b

- 50 *Cinética de reacción a 37°C*

- 55 FIFTA se realizó con 256% Fbgen-Pool (■) y con 256% Fbgen-Pool que se había diluido 1:2 con 6% BSA-PBS (●). Después de los tiempos de reacción de 30-370 segundos en intervalos de 10 segundos y después de 20 y 60 minutos en un 37°C baño de agua, el aumento de la turbidez a 405 nm se determinó (figura 8a). Las proporciones de ΔA 125%/250% se calcularon (figura 8b).

Figura 9a

Linealidad de ensayo

- 60 FIFTA se realizó con 300% Fbgen-Pool y diluciones de 300% Fbgen-Pool (con 6% BSA-PBS), 50 μ l + 100 μ l versión de ensayo (●), 25 μ l+ 50 μ l versión de ensayo (○).

65

Cifras 9b; c

Linealidad de ensayo

5 FIFTA se realizó con 300% Fbgen-Pool y diluciones de 300% Fbgen-Pool (con 0,9% NaCl); actividad de fibrinógeno en las muestras: 0% (-), 17% (□), 23% (Δ), 30% (◇), 40% (*), 53% (●), 71% (+), 95% (X), 127% (○), 169% (+), 225% (▲), 300% (◆), aumento de la turbidez en dependencia del tiempo de reacción (figura 9b);

10 ΔA en dependencia de la actividad de fibrinógeno (figura 9c): tiempos de incubación a RT: 2,5 minutos (○), 5 minutos (●), 10 minutos (■), 15 minutos (▲).

Figuras 10a,b

Variación de los volúmenes de ensayo

15 250% Fbgen-Pool (●) y 250% Fbgen-Pool que se había diluido 1:2 con 6% BSA- PBS (○) se ha ensayado en FIATA (50 μl de muestra + 100 μl de reactivo de trombina). 67 μl 250% Fbgen-Pool (■) o 50% Fbgen-Pool fueron incubadas con 83 μl reactivo de trombina. 100 μl 250% Fbgen-Pool (▲) o Fbgen-Pool que se había diluido 1:2 (50%Fbgen-Pool; Δ) se incubó con 50 μl reactivo de trombina con 600 mUI/ml trombina (figura 10a); coeficientes de
20 ΔA 125%/250% (gráfico 10b).

Figura 11

Longitud de onda de absorbancia de la turbidez

25 FIFTA se realizó con P-Pool y con 256% Fbgen-Pool. Tiempo de reacción = 30 minutos RT. La absorbancia al final de la reacción se determinó a 405 nm, 450 nm, 595 nm, y 650 nm por medio de un fotómetro de placas microtiter.

Figura 12a-e

30 *Calibración por medio de adición de FIFTA con fibrinógeno purificado*

6% BSA-PBS (figura 12a,b) o P-Pool (con 144% de la actividad normal de fibrinógeno) (figura 12c) se complementó con las siguientes concentraciones de fibrinógeno purificado: 20 g/l (Δ), 10 g/l (□), 5 g/l (◇), 2,5 g/l (*), 1,25 g/l (X), 0,63 g/l (▲), 0,31 g/l (■), 0 g/l (◆). El FIFTA se realizó; aumento de la turbidez a tiempos de incubación (RT) de
35 2,5 minutos (Δ), 5 minutos (□), 10 minutos (*), 15 minutos (○), 48 minutos (▲), 158 minutos (■), 18 h (●) (figuras 12b,d). Figura 12c muestra que 46% del fibrinógeno purificado es funcional; 6% BSA-PBS (●) o P-Pool (■) (figura 12e).

40 Figura 13a,b

Correlación con el método de Clauss

45 En n = 334 los plasmas, no seleccionados, de pacientes (≤ 6 horas de edad, cuando los plasmas con citrato son tirar a la basura) el FIFTA (valor medio = 132%, SD = 41%) se realizó y los valores se compararon con el método modificado de Clauss (valor medio = 4,18 g/l, SD = 1,65 g/l) (figura 13a).

Los FIFTA-valores de pacientes dan una distribución normal de Gauss (gráfico 13b).

50 Figura 14a,b

Concentración del 50% de inhibición (IC50) de la heparina en FIFTA

55 50 μl P-Pool se añadieron a 10 μl 0-160 UI/ml heparina. Una cantidad de 100 μl 200 mUI/ml de trombina en 6% BSA-PBS (sin Polybrene®) se añadió, y Δ A a 405 nm se determinó; concentraciones de heparina: 0 UI/ml (●), 0,04 UI/ml (■), 0,08 UI/ml (▲), 0,16 UI/ml (Δ), 0,31 UI/ml (□), 0,63 UI/ml (○) (figura 14a). Δ A después de tiempos de incubación de 5 minutos (●), 10 minutos (■), 15 minutos (▲), 20 minutos (Δ) (RT) (figura 14b).

Figura 15a

60 *Punto de tiempo de 50% de inhibición de 10 UI/ml de heparina en FIFTA*

50 μl P-Pool fueron incubados con 100 μl 200 mUI/ml de trombina en 6% BSA-PBS (sin Polybrene®). En los momentos de incubación de 0 minutos (antes de la adición de trombina) (○), 0,5 minutos (■), 1 minutos (▲), 1,5 minutos (◆), 2 minutos (*), 2,5 minutos (●), 3 minutos (+), 3,5 minutos (Δ), 4 minutos (X), 5 minutos (-Δ-), 6 minutos (-■-), 7 minutos (-), 8 minutos (-*-) 9 minutos (-X-), 10 minutos (◇), 11 minutos (-□-) 10 μl 160 UI/ml de heparina en 6% BSA-PBS han sido agregados (concentración final de la heparina en plasma + trombina reactivo = 10 UI/ml), y ΔA a 405 nm fue determinado.

Figura 15bc

Punto de tiempo de 50% inhibición de 10 UI/ml de heparina en FIFTA

50 μ l P-Pool fueron incubados con 100 μ l 200 mUI/ml de trombina en 6% BSA-PBS (sin Polybrene®). Después de los tiempos de incubación de 10 s (◆), 20 s (■), 30 s (▲), 40 s (X), 50 s (*), 60 s (●), 70 s (+), 80 s (◇), 90 s (-), 100 s (-◆-), 110 s (□), 120 s (-▲-), 130 s (-x-), 140 s (-*-) en RT 10 μ l 160 UI/ml de heparina en 6% BSA-PBS se añadieron; control: 10 μ l 0 UI/ml heparina (Δ) se agregaron. ΔA a 405 nm fue determinado (Fig. 15b); los valores de ΔA en tiempos de incubación de 5 minutos (●), 10 minutos (■), 15 minutos (▲), 20 minutos (Δ) (RT) (figura 15c).

Figura 16a,b

Inhibición de la generación de fibrina por arginina

10 ml de reactivo de FIFTA se añadieron a 5 ml de P-Pool, y 100 μ l de esta mezcla se añadió de inmediato en placas de microtítulos, que habían sido previamente rellenas con 200 μ l 0-1500 mM arginina, pH 8,7, por lo que las concentraciones de arginina en la reacción fueron: 0 mM (●), 16 mM (■), 31 mM (▲), 62,5 mM (○), 125 mM (*), 250 mM (◇), 500 mM (+), 1000 mM (□).

ΔA se midió durante los primeros 9 minutos (RT) (figura 16a) o durante los primeros 75 minutos (RT) (figura 16b).

Figura 16c

Inhibición de la generación de fibrina por arginina

10 ml de reactivo de FIFTA se añadieron a 5 ml de P-Pool, y en 0-4 minutos (RT) 100 μ l de esta mezcla se dió en una placa de microtítulo, cuyos pozos se habían rellenado previamente con 200 μ l 0-1500 mM arginina, pH 8,7. ΔA a 405 nm se determinó; las concentraciones de arginina en la reacción fueron: 0 mM (●), 16 mM (■), 31 mM (▲), 62,5 mM (○), 125 mM (*), 250 mM (◇), 500 mM (+), 1000 mM (□).

Figura 16d

Inhibición de la generación de fibrina por arginina

50 μ l P-Pool fueron incubados con 100 μ l de reactivo de FIFTA. En 0-30 minutos (RT) 0-70 μ l 1,5 M arginina, pH 8,7, se añadió, y en el último punto de tiempo (30 min) el ΔA a 405 nm se determinó; las concentraciones de arginina en la reacción se fueron: 0 mM (●), 94 mM (■), 176 mM (▲), 250 mM (○), 316 mM (*), 375 mM (◇), 429 mM (+), 477 mM (□).

Figura 17

Disolución de la fibrina por arginina

50 μ l P-Pool fueron incubados con 100 μ l de reactivo de FIFTA. En 30 minutos (RT) 10 μ l o 70 μ l 1,5 M arginina, pH 8,7 (concentración final de la arginina 94 mM (■) o 477 mM (●)) se han añadido, y ΔA a 405 nm se determinó en 0-132 minutos (RT).

Fig. 18

Inactivación de fibrinógeno por la vancomicina

200 μ l de 300% (8,4 g/l), Fbgen-Pool fueron incubados con 25 μ l 0-100 mM vancomicina (■) o 0-100 mM cloramina-T® (●) por 15 minutos (37°C). Muestras de 50 μ l de estas mezclas de reacción se retiraron y fueron incubadas con 100 μ l 200 mUI/ml trombina, 400 μ g/ml Polybrene®, 6% BSA-PBS. ΔA a 405 nm fue determinada.

Fig. 19ab

¿Antioxidantes inhiben la reacción entre la vancomicina y el fibrinógeno plasmático?

750 μ l 300% (8,4 g/l) Fbgen-Plasma-Pool se complementaron con 250 μ l 200 mM de a) los inhibidores de ¹O₂ metionina (▲) o ascorbato de sodio (■), b) el inhibidor de los radicales ·OH manitol (●), o c) H₂O (○).

Muestras de 25 μ l de ellos fueron incubadas con 25 μ l 0-2,5 mM vancomicina (gráfico 7a) o 0-5 mM cloramina-T® (figura 7b) en PBS durante 15 minutos a 37°C. Entonces, 100 μ l 200 mUI/ml trombina, 400 μ g/ml Polybrene® en 6% BSA-PBS se añadieron; la ΔA/5 minutos (RT) se comparó con el 100% control (0 mM vancomicina o 0 mM cloramina T®).

Figura 20a

ΔA en la dependencia de la concentración de vancomicina

- 5 50 μl del Paciente-Pool (P-Pool; ●) o el P-Pool que se ha diluido 1:2 (▲) o 1:4 (■), o 6% BSA-PBS (○) fueron incubados con 50 μl 0-6,8 mM vancomicina en PBS. ΔA a 405 nm fue determinado después de 1 minuto (RT).

Figura 20b

- 10 ΔA en la dependencia de la concentración de fibrinógeno

25 μl 300% Fbgen-Pool fueron incubados con 125 μl 0,55 mM (▲), 1,1 mM (■), o 2,2 mM vancomicina (●) en PBS por 1 minuto (RT). Entonces ΔA a 405 nm fue determinada.

- 15 Figura 21

Calibración de FIATA con fibrinógeno purificado

- 20 Una cantidad de 250 mg de fibrinógeno, purificado y liofilizado, se ha reconstituido con 12,5 ml 6% BSA-PBS (●) o P-Pool (■). Estas muestras con fibrinógeno, que se ha añadido, se han diluido 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 con PBS-BSA o P-Pool, respectivamente, dando muestras con 0-20 g/l de fibrinógeno en PBS-BSA o muestras con 4-24 g/l de fibrinógeno en el P-Pool. La FIATA se realizó.

Figura 22a-e

- 25 *Linealidad de FIATA*

- 30 250% Fbgen-Pool fue diluido con 6% BSA-PBS y fue ensayado en FIATA (figura 22 bis). 300% Fbgen-Pool fue diluido con suero normal y fue ensayado en FIATA (gráfico 22b). Los volúmenes en el ensayo de la figura 22b se han duplicado, y se realizó el FIATA (figura 22c). 0-55 μl 250% Fbgen-Pool fueron incubados con 50 μl PBS y 50 μl 4,4 mM vancomicina en PBS. ΔA a 405 nm fue determinada (figura 22d).

El FIATA se realizó con 50 μl de muestra (0-300% del normal) y 50 μl 4,4 mM vancomicina en PBS (figura 22e).

- 35 Figura 23a-c

Correlación de FIATA con las pruebas de la función de fibrinógeno

- 40 En n = 321 plasmas, no seleccionados, de pacientes, se realizó el FIATA, y los valores se compararon con el método modificado de Clauss (Multifibren U[®]; Behring Coagulation Timer), r = 0,755; y = 19.521x + 49.165 (figura 23a). En n = 344 plasmas, no seleccionados, de pacientes se realizó el FIATA, y los valores se compararon con el FIFTA, r = 0,813; y = 0.861x + 22.993 (figura 23b), los resultados del FIATA están dando una distribución normal de Gauss (figura 23c).

- 45 Figura 24a

Precipitación de fibrinógeno en plasma por vancomicina

- 50 25 μl de 143% (4,0 g/l), P-Pool fueron incubados con 25 μl 0-50 mM de la vancomicina en PBS, 50 μl PBS, 0,1% Triton X 100[®] y 50 μl 850 mM KCl en H₂O durante 1 minuto (RT). ΔA a 405 nm fue determinada.

Figura 24b

Inversión de precipitaciones de fibrinógeno que fueron inducidos por la vancomicina por medio de NaHCO₃

- 55 50 μl P-Pool han reaccionado con 50 μl 4,4 mM vancomicina en PBS por 1 minuto (RT). Para invertir la tendencia a la precipitación de fibrinógeno que fue inducida por la vancomicina, 0-55 μl 1 M NaHCO₃, pH 8,6 (■), o H₂O (●) han sido agregados. La absorbancia a 405 nm fue determinada después de 1 minuto (RT). Absorbancia de control (○) sin vancomicina, pero con NaHCO₃.

- 60 Figura 24c

Determinación del pH de la prueba de la figura 24b

- 65 5 ml de P-Pool se mezclaron con 5 ml de PBS y 0-1750 μl 1 M NaHCO₃, pH 8,6, y el pH se determinó.

Fig. 24d

Inversión de la precipitación de fibrinógeno que fue inducida por la vancomicina por medio de arginina

- 5 50 μ l P-Plasma han reaccionado con 50 μ l 4.4 mM vancomicina en PBS durante 1 minuto (RT). Para invertir la tendencia a la precipitación de fibrinógeno que fue inducida por la vancomicina, 0-55 μ l PBS ($\blacktriangle$), 20 veces concentrado PBS ($\bullet$), o 1 M arginina, pH 7,5 ($\bullet$) han sido agregados. La absorbancia a 405 nm fue determinada después de 1 minuto (RT).

10 Figura 25

Electroforesis de las muestras de plasma que han sido incubadas con vancomicina

- Muestras de P-Pool han sido incubadas con 0-10 mM (concentración final) vancomicina durante 5 minutos (RT).
15 Luego, las muestras fueron sometidas a electroforesis ($\oplus$ = ánodo a la izquierda de la figura)

- Carril 1: 0 mM de la vancomicina en 143% de la norma del fibrinógeno antigénico P-Pool (gráfico 25.1)
Carril 2: 0,29 mM de la vancomicina en P-Pool (gráfico 25.2)
20 Carril 3: 0,44 mM de la vancomicina en P-Pool (gráfico 25.3)
Carril 4: 0,66 mM de la vancomicina en P-Pool (gráfico 25.4)
25 Carril 5: 0,99 mM de la vancomicina en P-Pool (gráfico 25.5)
Carril 6: 1,48 mM de la vancomicina en P-Pool (gráfico 25.6)
Carril 7: 2,22 mM de la vancomicina en P-Pool (gráfico 25.7)
30 Lane 8: 5 mM de la vancomicina en P-Pool (gráfico 25.8)
Lane 9: 10 mM de la vancomicina en P-Pool (gráfico 25.9)
35 Lane 10: precipitado que se vuelve a disolver, sin lavar, de 5 ml de plasma y 5 ml de 4,4 mM vancomicina en PBS (figura 25.10)
Lane 11: precipitado de la figura 25.10, que fue 3 veces lavado (figura 25.11)

40 Figura 26a-c

Reactividad de fibrinógeno en el plasma que fue precipitado por la vancomicina

- 50 50 μ l P-Pool o 300% Fbgen-Pool fueron incubados con 50 μ l 4,4 mM de la vancomicina en PBS por 1 minuto (RT). A continuación, 20 μ l 1 M NaHCO_3 , pH 8,6, y 200 μ l 300 mUI/ml trombina, 400 μ g/ml Polybrene[®], 6% BSA-PBS (reactivo de FIFTA) se agregaron, y ΔA a 405 nm se determinó (plasma/vancomicina/ NaHCO_3 = $\blacktriangle$). Control 1 consistió en la adición de la vancomicina después de NaHCO_3 (Plasma/ NaHCO_3 /vancomicina = Δ).

- Control 2 consistió en la sustitución de la vancomicina de control 1 por PBS (Plasma/PBS/ NaHCO_3 = $\bullet$). Control 3 consistió en la sustitución de la vancomicina y NaHCO_3 de control 1 por PBS (Plasma/PBS/PBS = $\circ$) (figura 26a). En lugar de 20 μ l NaHCO_3 , 40 μ l NaHCO_3 se utilizaron (gráfico 26b). 50 μ l P-Pool fueron incubados con 0 μ l ($\circ$), 10 μ l ($\blacksquare$), 20 μ l ($\blacktriangle$), 30 μ l ($\blacklozenge$), 40 μ l (*), 50 μ l ($\bullet$) 1 M NaHCO_3 , pH 8,6, 50 μ l PBS y 200 μ l reactivo de FIFTA; ΔA a 405 nm se determinó (figura 26c).

55 Figura 27a

Estimulación de t-PA por el fibrinógeno que ha sido precipitado por la vancomicina

- 60 0-100 μ l del precipitado, que se vuelve a disolver, de la figura 25 y 100-0 μ l de PBS (por compensación de los volúmenes) se incubaron con 50 μ l 0,1 mg/ml de Glu-plasminógeno en PBS, 1% BSA, 50 μ l 0,6 M PO_4^{3-} , pH 7,4($\bullet$), o 50 μ l 1 M NaHCO_3 , pH 8,6 ($\blacksquare$), y 50 μ l 1000 UI/ml t-PA en PBS, 0,1% Triton X 100[®] durante 30 minutos (RT). A continuación, 25 μ l 2,7 mM de Val-Leu-Lys-pNA, 1,7 M KCl se añadieron, y ΔA a 405 nm/h, (RT) se midió.

65

Figura 27b,c

Estimulación de t-PA por el plasma que se ha precipitado por la vancomicina

25 μ l P-Pool fueron incubados con 25 μ l 0-22 mM vancomicina en PBS y 50 μ l 1000 UI/ml de t-PA en PBS, 0,1% Triton X 100[®] y 25 μ l 0 mM (O) o 15 mM cloramina T[®] (●) durante 30 minutos (RT). A continuación, 25 μ l 2,7 mM Val-Leu-Lys-pNA, 1,7 M KCl se agregaron, y la actividad de la plasmina generada fue determinada por la medición de ΔA /minuto (RT) (figura 27b). Prolongación del tiempo de incubación a 158 m (RT) para la muestra que no se ha oxidado (figura 27c).

Figura 28

Reactividad de la vancomicina con plasma oxidado

25 μ l P-Pool, sin EDTA (●) o con 8,6 mM (3,2 g/l) EDTA (O), se incubaron con 25 μ l 0-89 mM cloramina-T[®] en PBS durante 60 minutos (RT). Luego, la FIATA (—) o la FIFTA (- - -) se realizaron.

Figura 29

Reactividad de vancomicina con plasma que se complementó con EDTA

25 μ l P-Pool fueron incubados con 25 μ l de PBS (○) o con 25 μ l 2 mM de cloramina- T[®] en PBS (●). Después de 60 minutos (RT) 25 μ l 0-172 mM de EDTA en PBS se añadió. Después de 5 minutos (RT), el FIATA (—) y el FIFTA (- - -) se realizaron.

Figura 30

Reactividad de la vancomicina con el plasma que se ha incubado con t-PA

25 μ l 300% Fbgen-Pool fueron incubados con 25 μ l de PBS (○) o con 15 mM de cloramina-T[®], PBS (●) durante 60 minutos (RT). A continuación, 50 μ l 1000 UI/ml t-PA, 0,1% Triton X 100[®], PBS se añadieron. Después de 0-8 horas (RT) 25 μ l 4,4 mM vancomicina, PBS se añadieron, y ΔA a 405 nm fue determinada.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno, con las características, que es un procedimiento que funciona con aumento de la turbidez, que es independiente de la matriz y/o independiente de un tiempo de coagulación, en el que

a) trombina en forma disuelta se añade a una solución que será analizada, resultando en concentraciones finales de menos de 2 UI/ml de trombina,

b) el aumento de la turbidez la mezcla así obtenida se determina.

2. Un método según la reivindicación 1, que comprende los siguientes pasos:

a) trombina y albúmina en forma disuelta se añaden a una solución que será analizada para fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno, resultando concentraciones finales de menos de 2 UI/ml de trombina, y más de 1.7-10% (peso/volumen) de albúmina.

b) el aumento de la turbidez de la mezcla así obtenida se determina.

3. Un método según la reivindicación 1 o 2, según el cual se realiza una determinación de comparación con un estándar conocido, en particular un estándar normal, que contiene fibrinógeno y/o derivados de fibrinógeno.

4. Un método según la reivindicación 1 o 2, según el cual la solución que se analiza es sangre o plasma de sangre.

5. Un método según la reivindicación 4, según el cual el plasma de sangre es plasma con citrato, plasma con EDTA, plasma con heparina y/o plasma con un compuesto que tiene un grupo de guanidina.

6. Un método según la reivindicación 1 o 2, según el cual la concentración de trombina en la solución que contiene trombina o que contiene trombina y albúmina es entre 50 y 1000 mUI/ml, y/o la cantidad de trombina, que se añade, es 5-100 mUI por 50 μ l de plasma.

7. Un método según la reivindicación 2, según el cual la concentración de albúmina en la solución que contiene trombina y albúmina es 2-20% (peso/volumen).

8. Un método según la reivindicación 1 o 2, según el cual trombina o albúmina se disuelve en una solución, que contiene un búfer.

9. Un método según la reivindicación 8, según el cual el búfer es un búfer de fosfato con cloruro sódico (PBS).

10. Un método según la reivindicación 1 o 2, según el cual la solución que contiene trombina y albúmina además contiene Polybrene.

11. Un método según la reivindicación 10, según el cual la concentración de Polybrene es hasta 1000 μ g/ml y/o la cantidad de Polybrene es de hasta 100 μ g por 50 μ l de plasma.

12. Un método según la reivindicación 10, según el cual para el análisis de los plasmas con heparina la concentración de Polybrene es 1000-30000 μ g/ml y/o la cantidad de Polybrene que se añadirá es 100-3000 μ g por 50 μ l de plasma.

13. Un método según la reivindicación 1 o 2, según el cual el método se realiza a una temperatura entre 0 y 42°C.

14. Un método según la reivindicación 1 o 2, según el cual el tiempo de reacción es de entre 20 segundos y 60 minutos.

15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, con las características, que el aumento de la turbidez se determina por medio de la trombina que se añade a una muestra, que es analizada por el fibrinógeno que es disfuncional (FIATA), y que el aumento de la turbidez se determina por medio de la vancomicina que se añade a una nueva muestra (FIATA), y que los valores de ambas determinaciones se dividen para determinar la concentración de fibrinógeno, que es disfuncional.

16. Uso de un sistema de ensayo para la determinación de fibrinógeno y/o de los derivados de fibrinógeno y/o de fibrinógeno que es disfuncional por medio de un procedimiento con arreglo a una de las reivindicaciones 1 a 15, con las características, que contiene un componente que es una solución que contiene trombina o una solución que contiene albúmina y trombina, para generar una concentración final de trombina en la mezcla de reacción de la prueba de menos de 2 UI/ml de trombina.

ES 2 302 998 T3

17. Uso de un sistema de prueba con arreglo a la reivindicación 16, con las características, que contiene un componente que es una solución que contiene Polybrene, por el cual trombina y/o albúmina y Polybrene pueden ser partes de la misma solución.

5 18. Uso de un sistema de prueba de acuerdo con una de las reivindicaciones 16 ó 17 para determinar la coagulación intravascular diseminada patológica y/o para el diagnóstico de los pacientes con riesgo de desarrollar enfermedades aterotrombóticas, como la isquemia o el infarto de corazón o del cerebro y/o para la diagnóstico de la presencia de fibrinógeno, que es disfuncional, en sangre.

10 19. Uso de un diagnóstico para fibrinógeno, que contiene un máximo de 2 UI/ml de trombina, para el diagnóstico de fibrinógeno por medio de un procedimiento con arreglo a una de las reivindicaciones 1 a 14 y/o para el diagnóstico de fibrinógeno, que es disfuncional, por medio de un procedimiento con arreglo a la reivindicación 15.

15 20. Uso de un diagnóstico según reivindicación 19, con las características, que contiene también 2 a 20% de albúmina.

21. Uso de un diagnóstico según reivindicación 19 o 20, con las características, que contiene también Polybrene.

20 22. Uso de un diagnóstico de acuerdo a uno de los reivindicaciones 19 a 21, con las características, que se trata de un diagnóstico para determinar la coagulación intravascular diseminada patológica y/o un diagnóstico para determinar el riesgo de un paciente a desarrollar enfermedades aterotrombóticas, como la isquemia/infarto de corazón o del cerebro y/o un diagnóstico para determinar fibrinógeno, que es disfuncional, en sangre.

25 23. Uso de un diagnóstico de acuerdo a una de las reivindicaciones 19 a 21 para determinar la patológica coagulación intravascular diseminada y/o para determinar el riesgo de un paciente a desarrollar enfermedades aterotrombóticas, como la isquemia/infarto de corazón o del cerebro y/o para el diagnóstico de fibrinógeno, que es disfuncional, en sangre.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1a: Optimización de la concentración de trombina

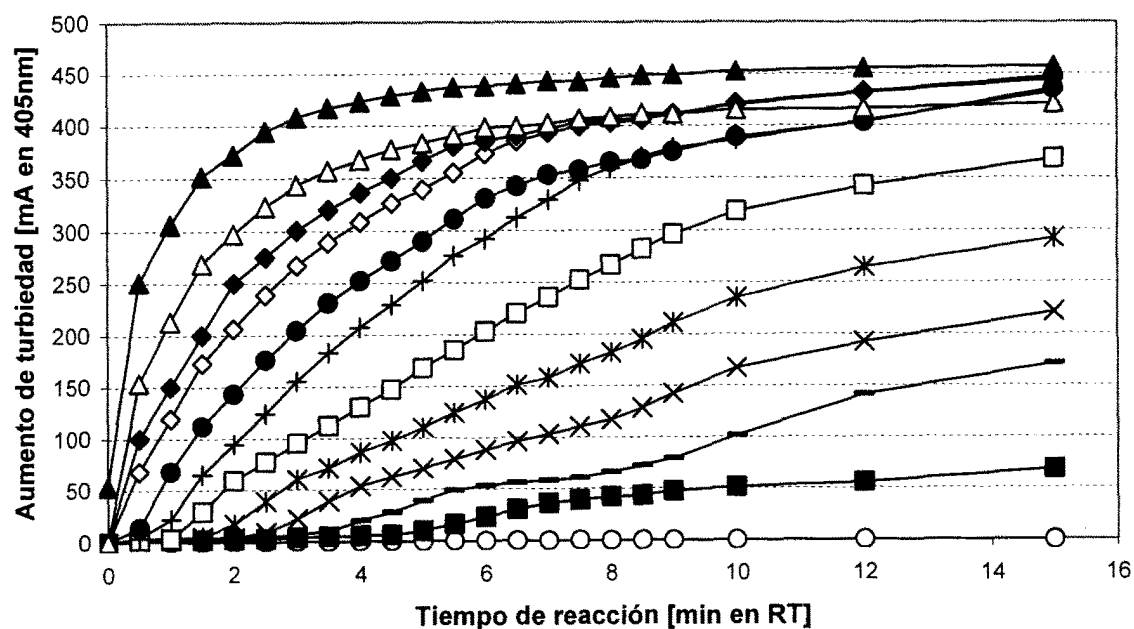


Fig. 1b: Optimización de la concentración de trombina

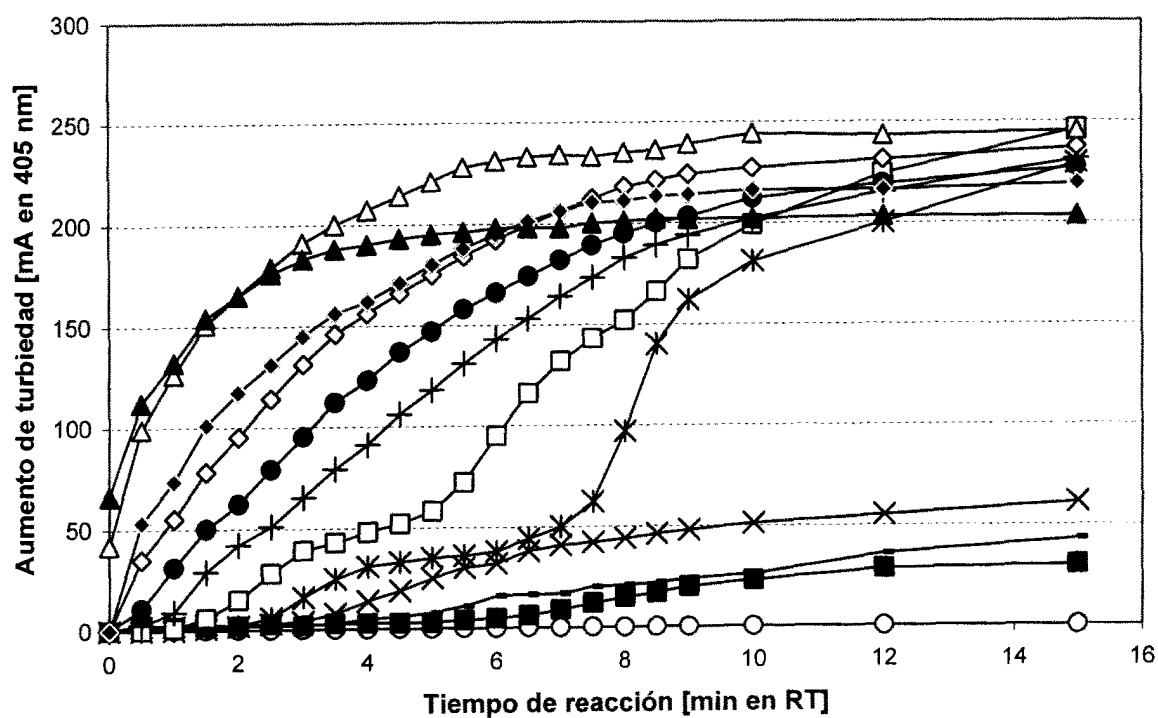


Fig. 1c: Optimización de la concentración de trombina

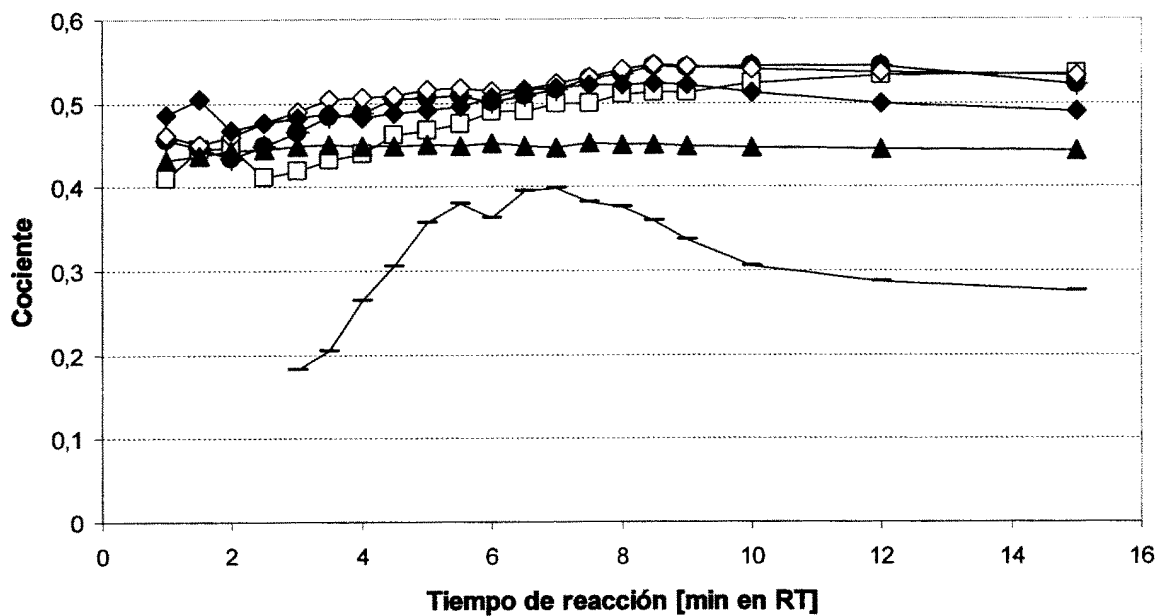


Fig. 1d: Optimización de la concentración de trombina

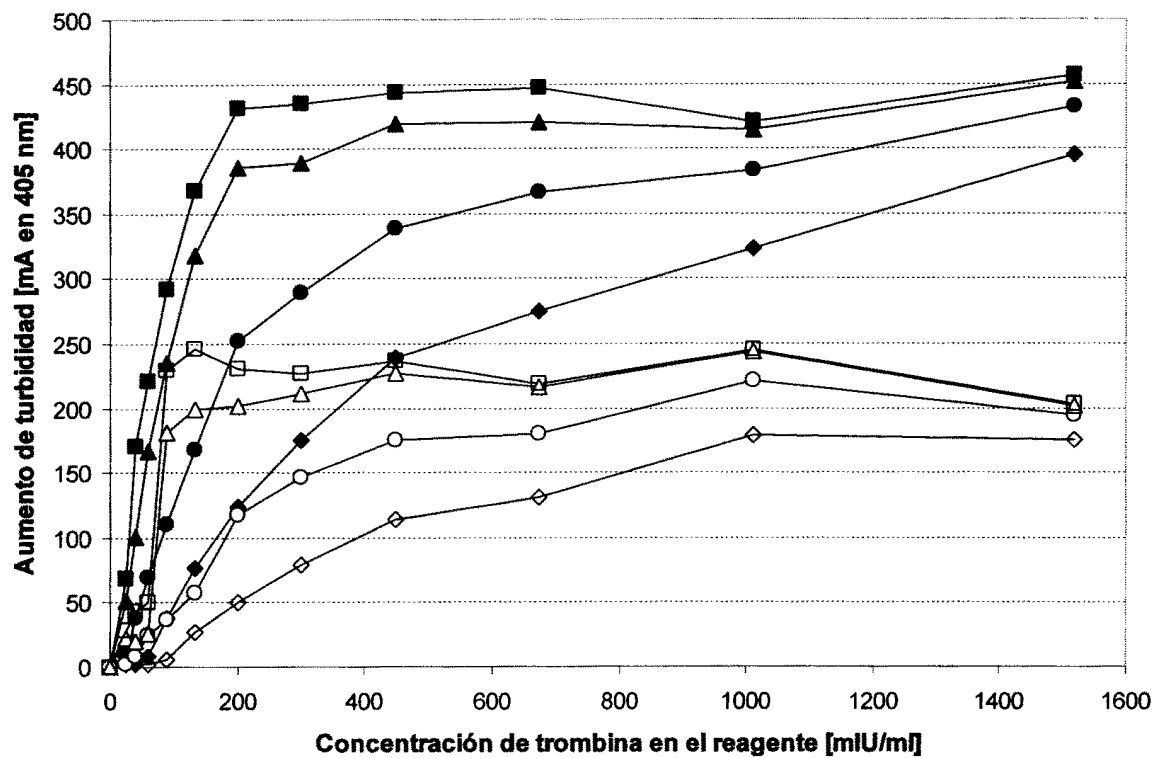


Fig. 2a: Optimización de la concentración de polybrene

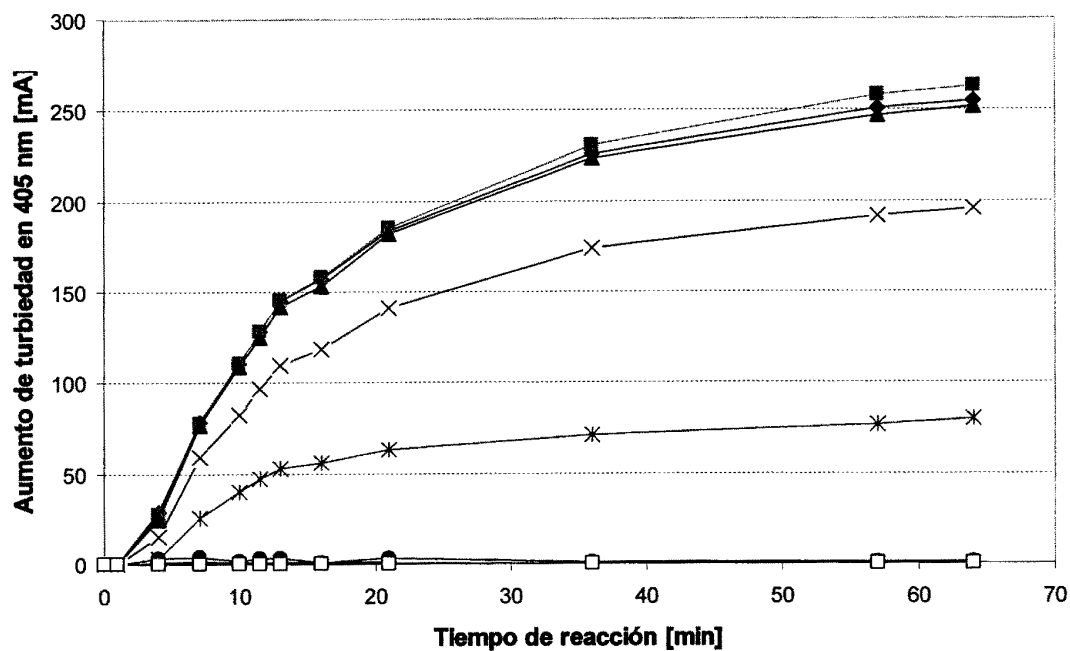


Fig. 2b: Optimización de la concentración de polybrene

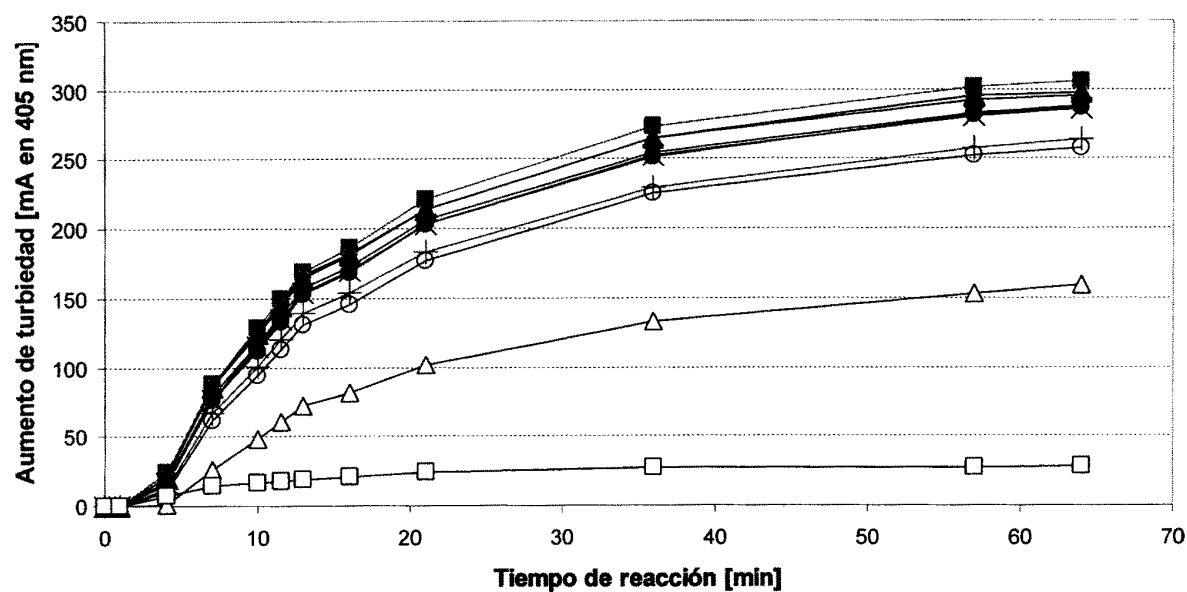


Fig. 2c: Optimización de la concentración de polybrene

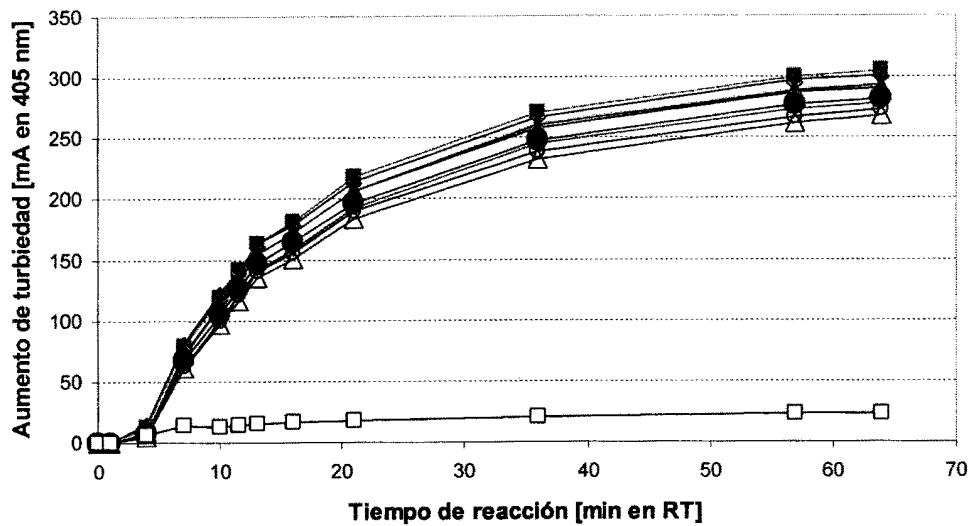


Fig. 2d: Optimización de la concentración de polybrene

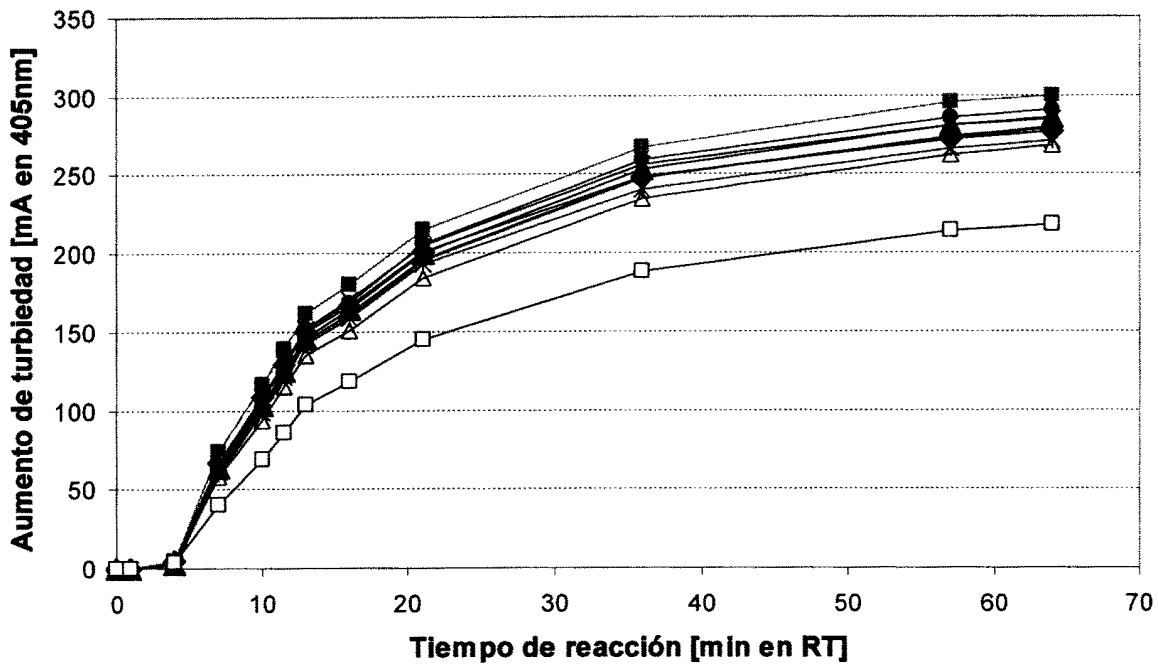


Fig. 2e: Optimización de la concentración de polybrene

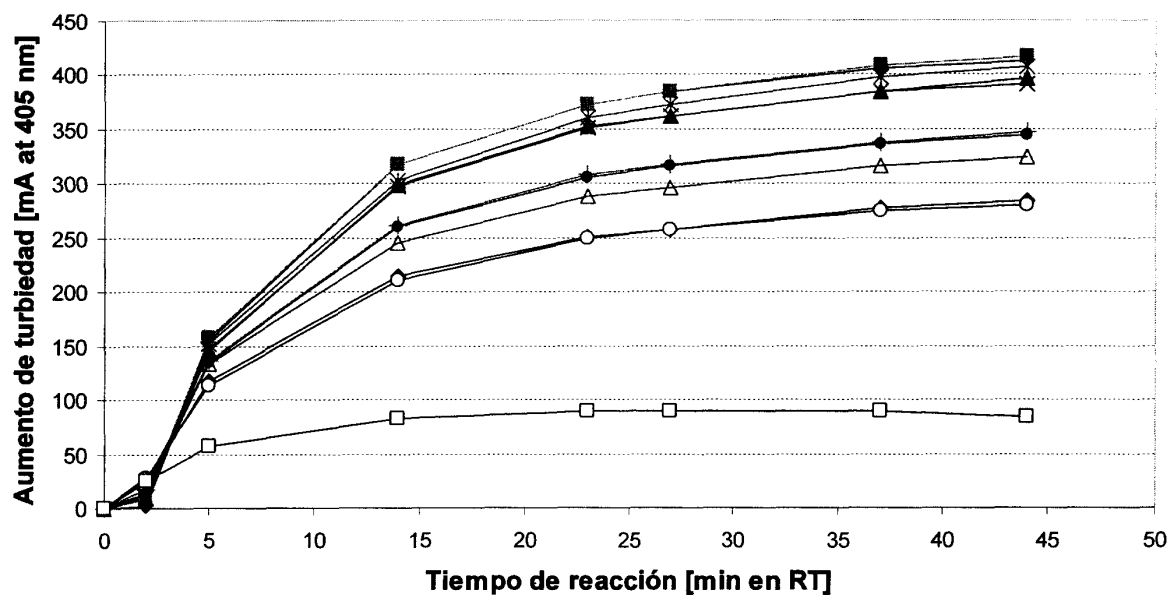


Fig. 2f: Optimization of the polybrene concentration

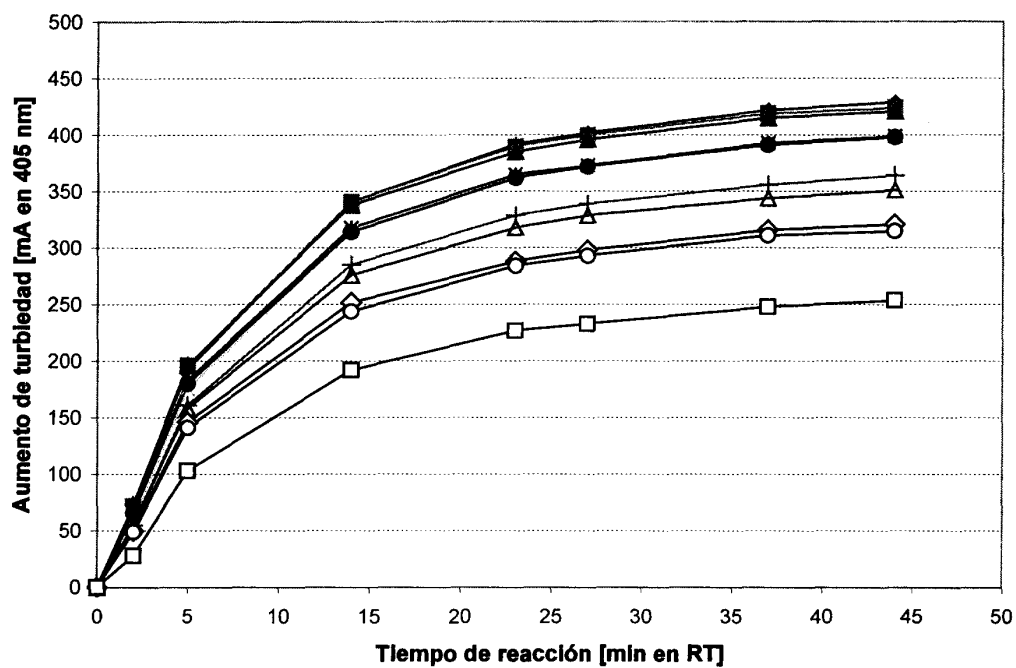


Fig. 2g: Optimización de la concentración de polybrene

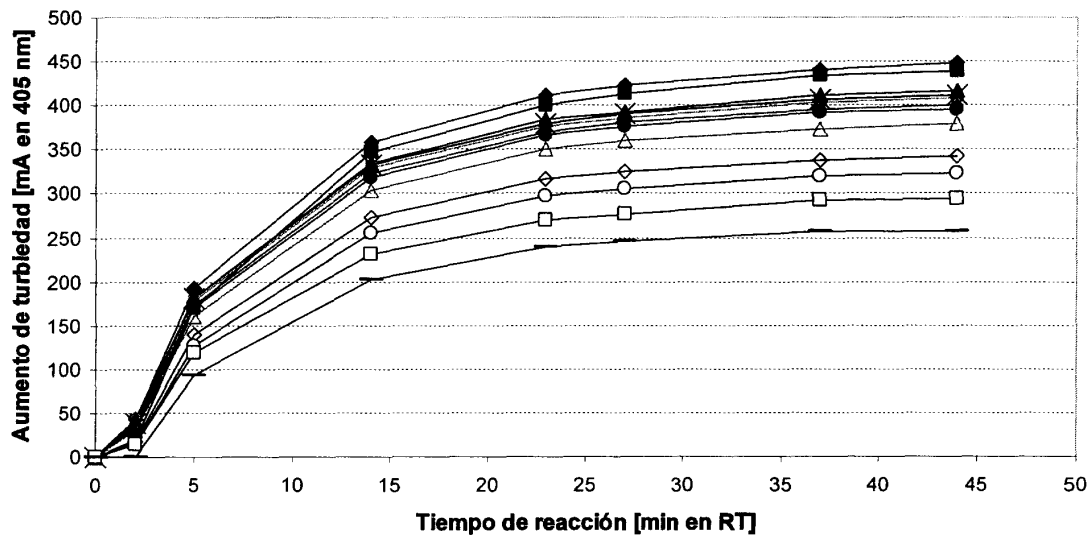


Fig. 3: Neutralización de heparina por polybrene

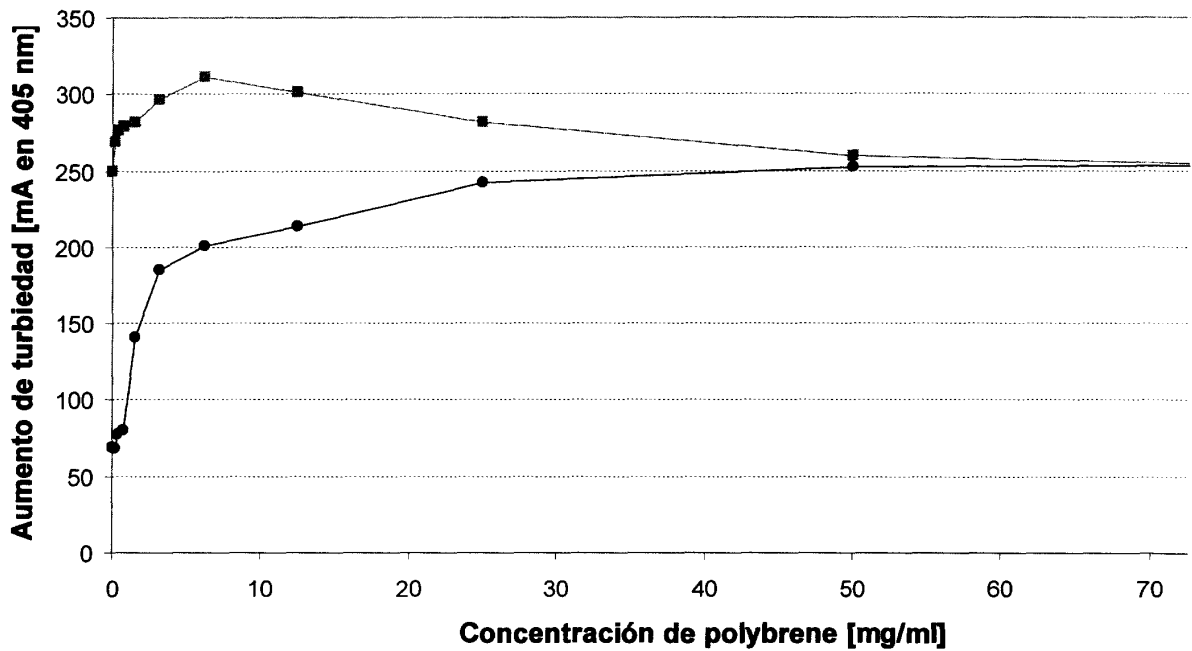


Fig. 4: FIFTA con plasma con heparina que fue neutralizado por PB

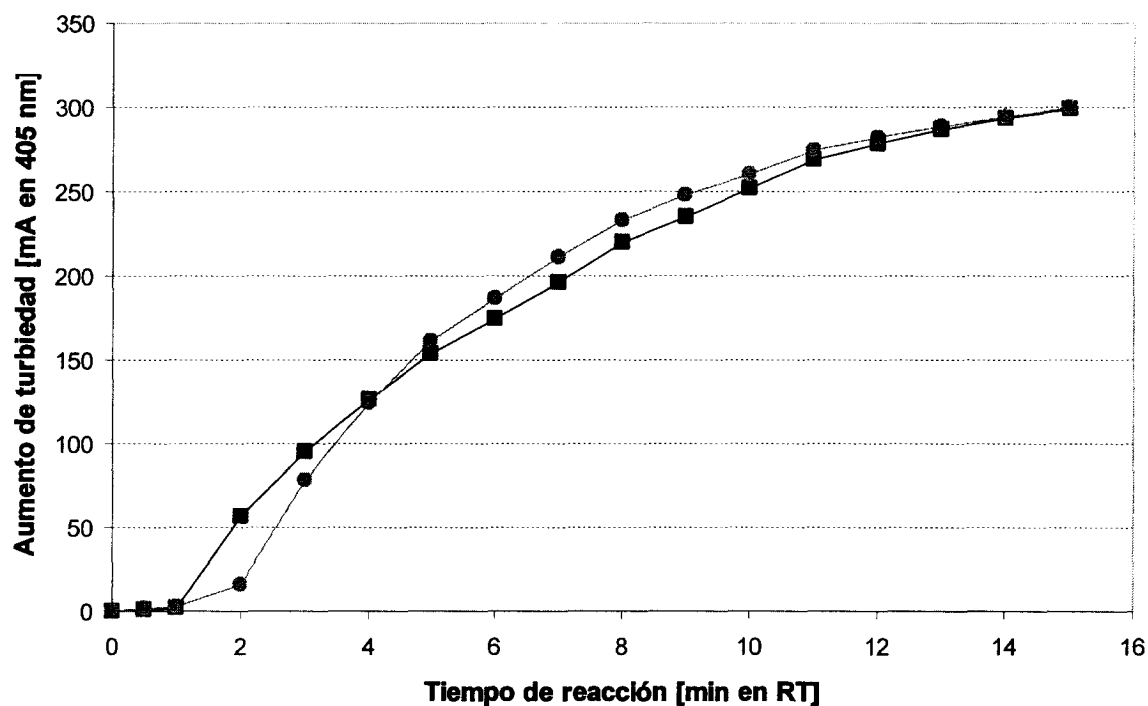


Fig. 5: Turbiedad-aumento por PB/heparina-complejos

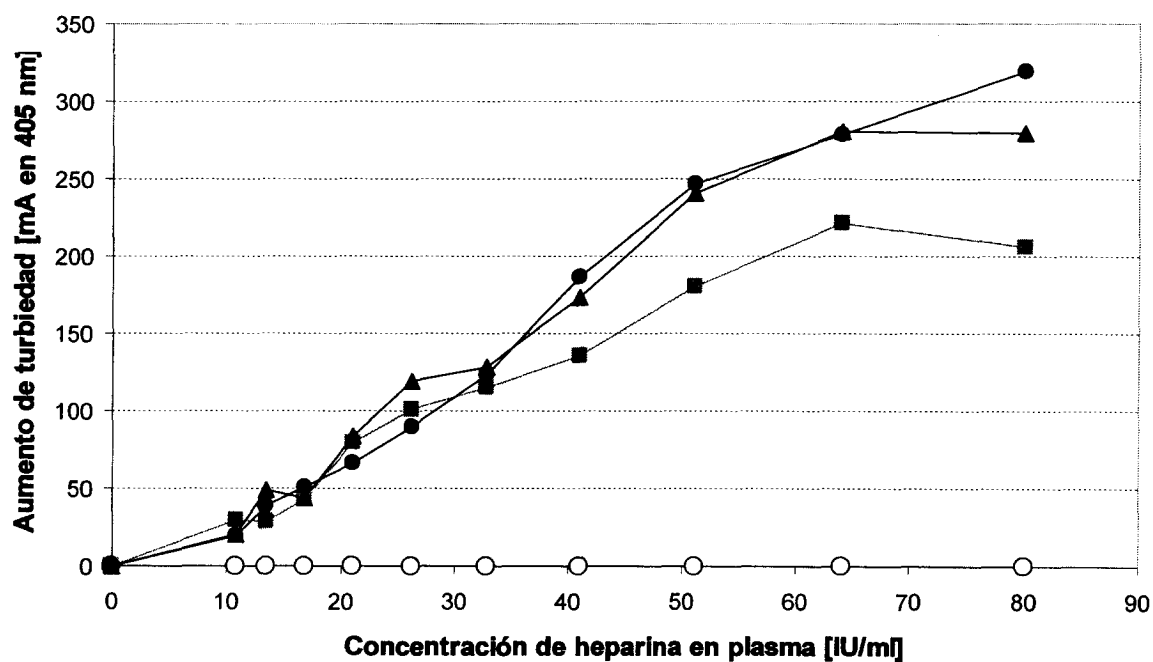


Fig. 6a: Dependencia de albumina

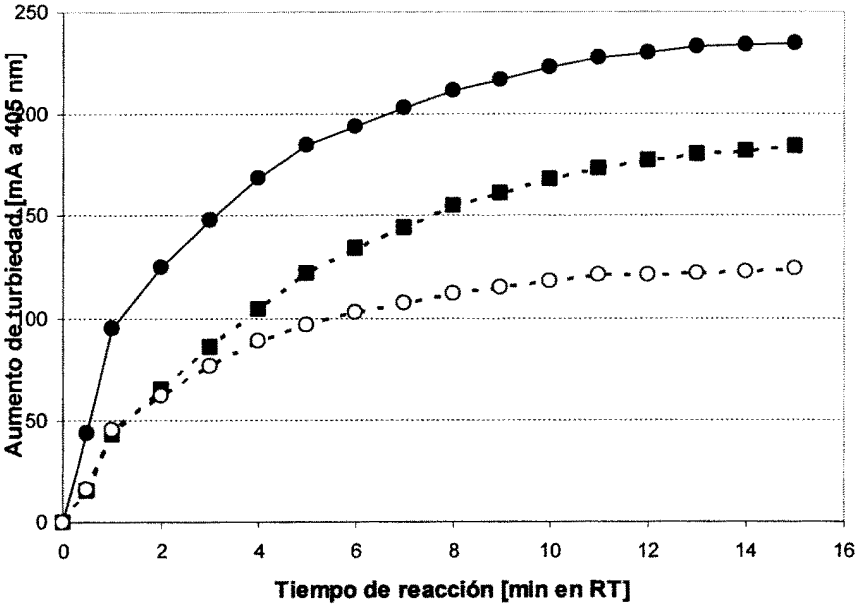


Fig. 6b: Dependencia de albumina

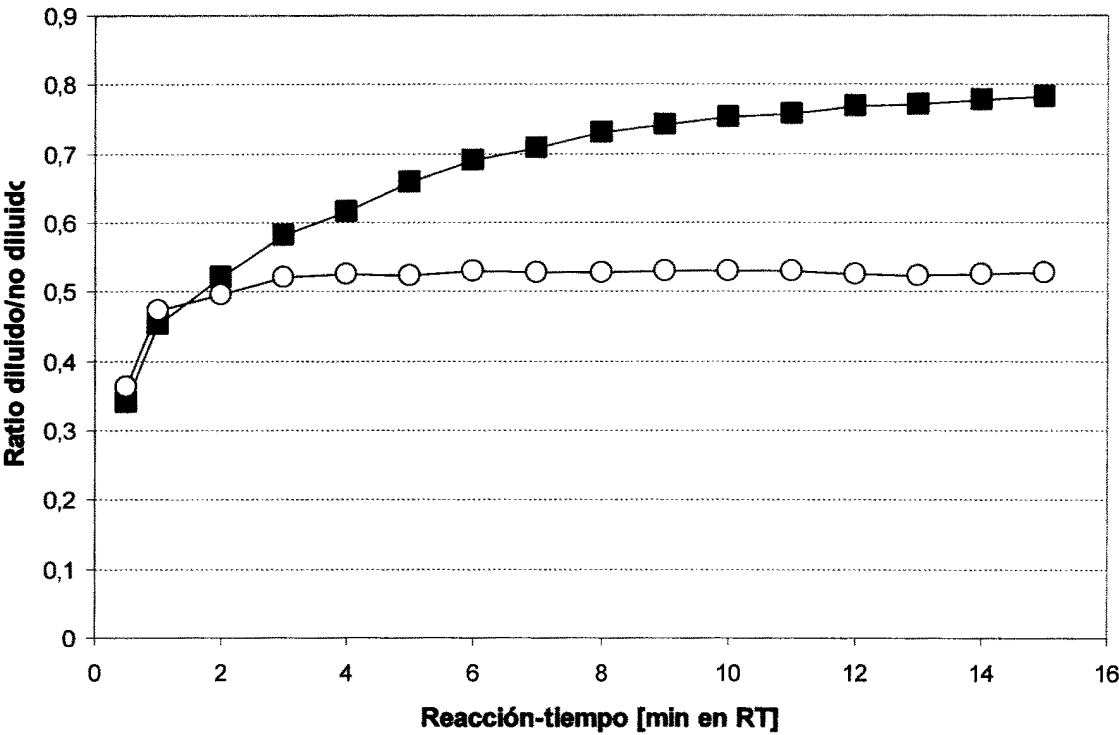


Fig. 7a: Curso de tiempo de reacción

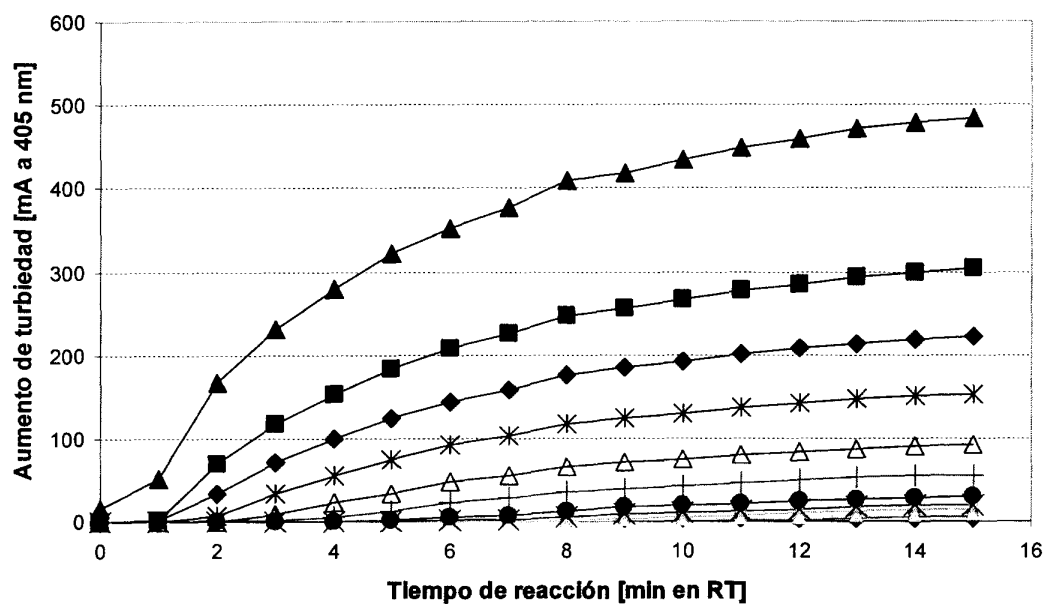


Fig. 7b: Curso de tiempo de reacción

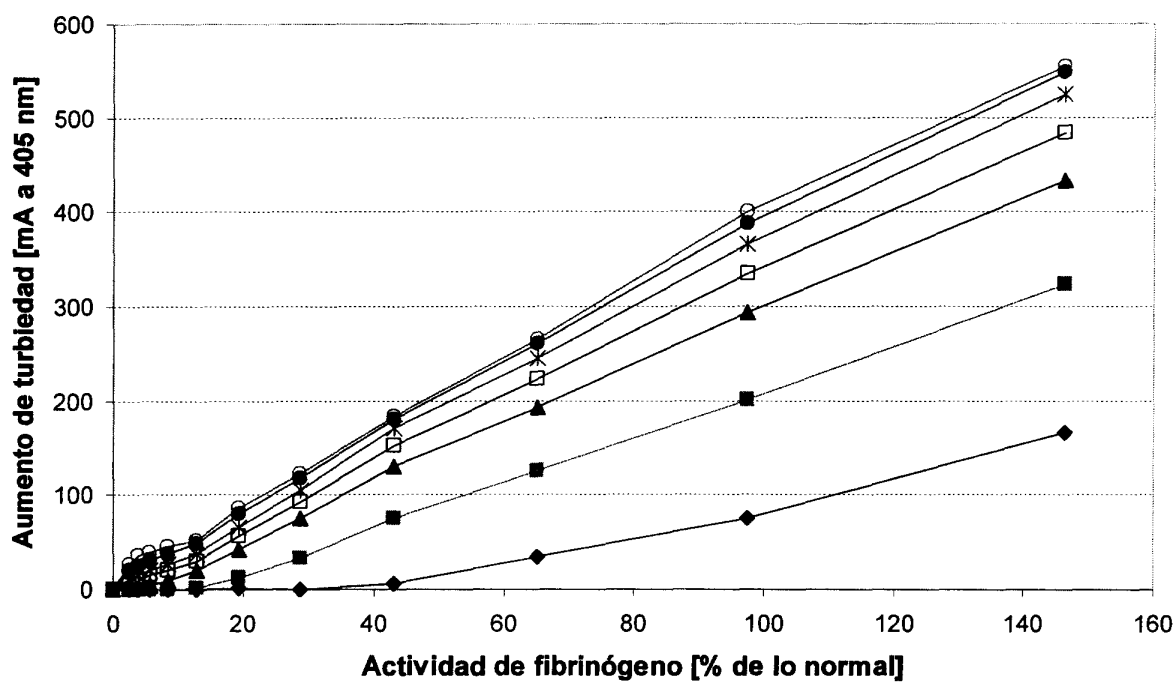


Fig. 7c: Curso de tiempo de reaccion

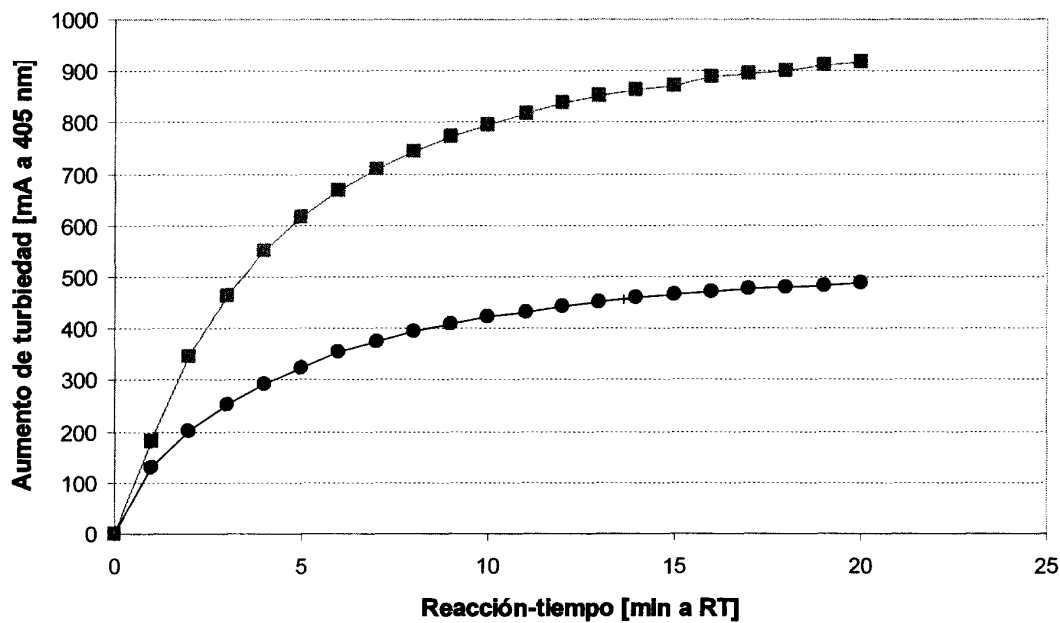


Fig. 7d: Curso de tiempo de reaccón

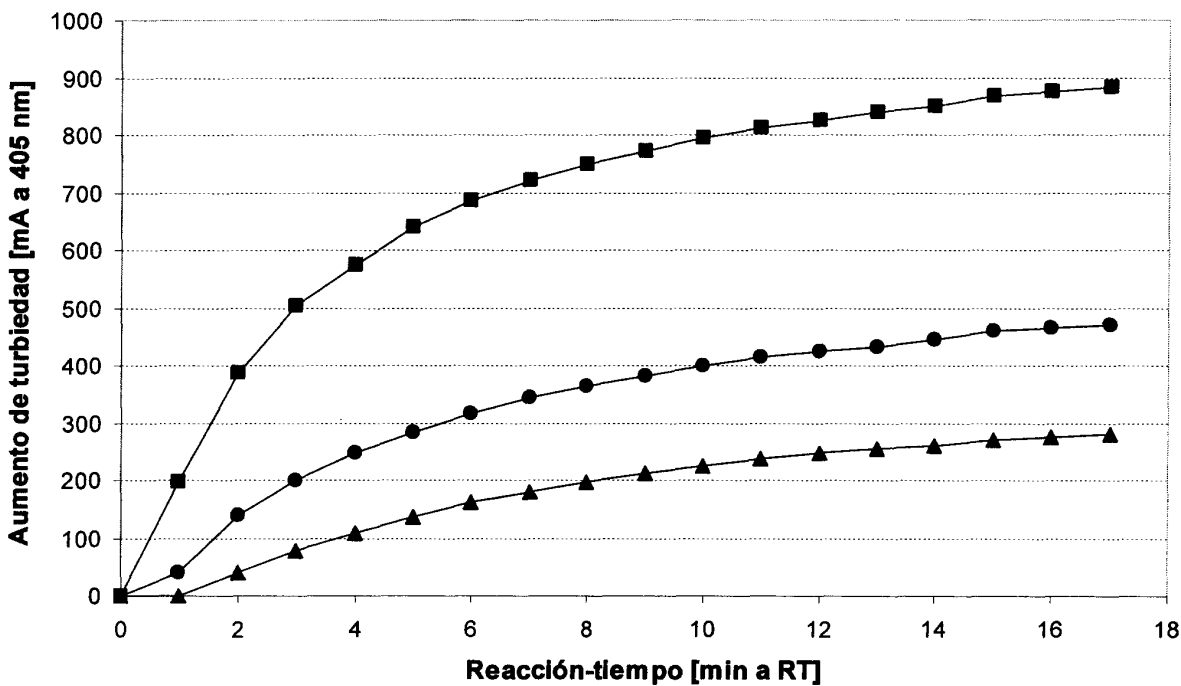


Fig. 7e: Curso de tiempo de reacción

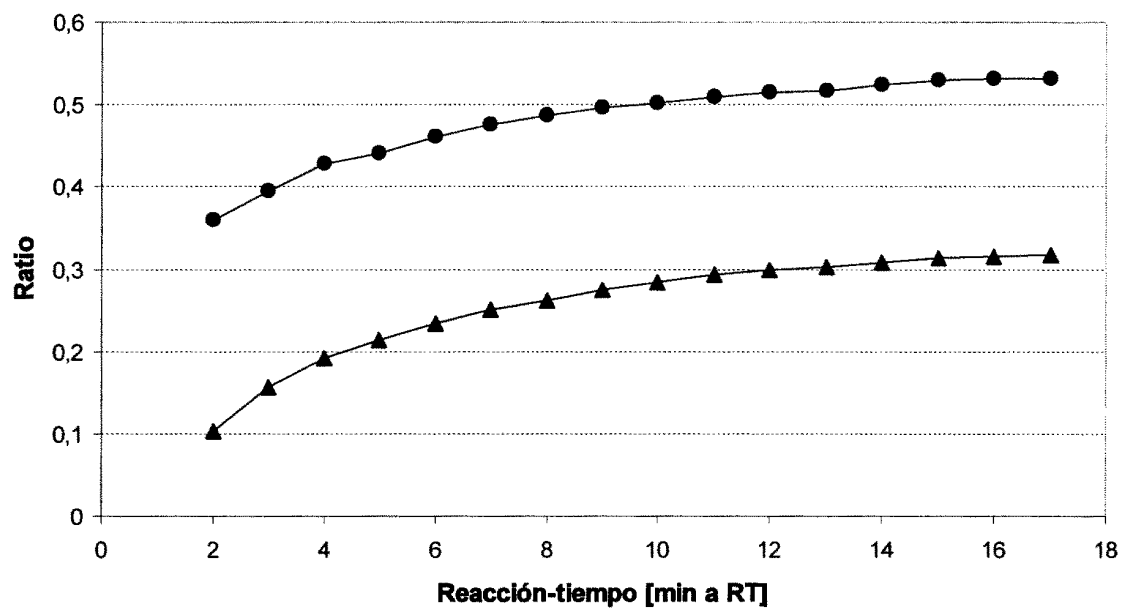


Fig. 7f: Curso de tiempo de reacción

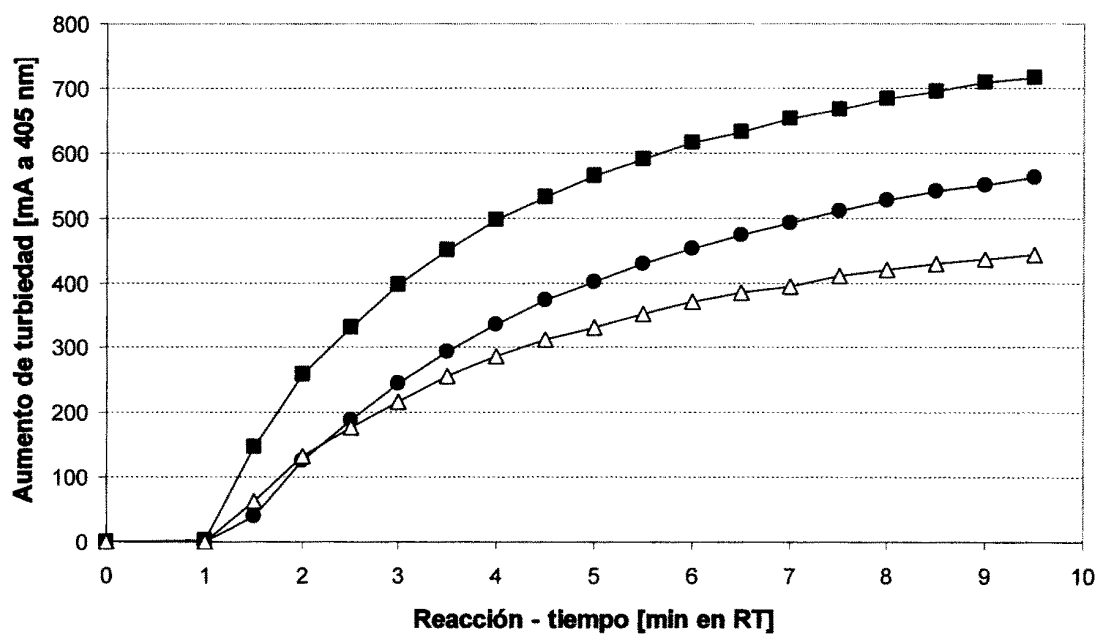


Fig. 7g: Curso de tiempo de reacción

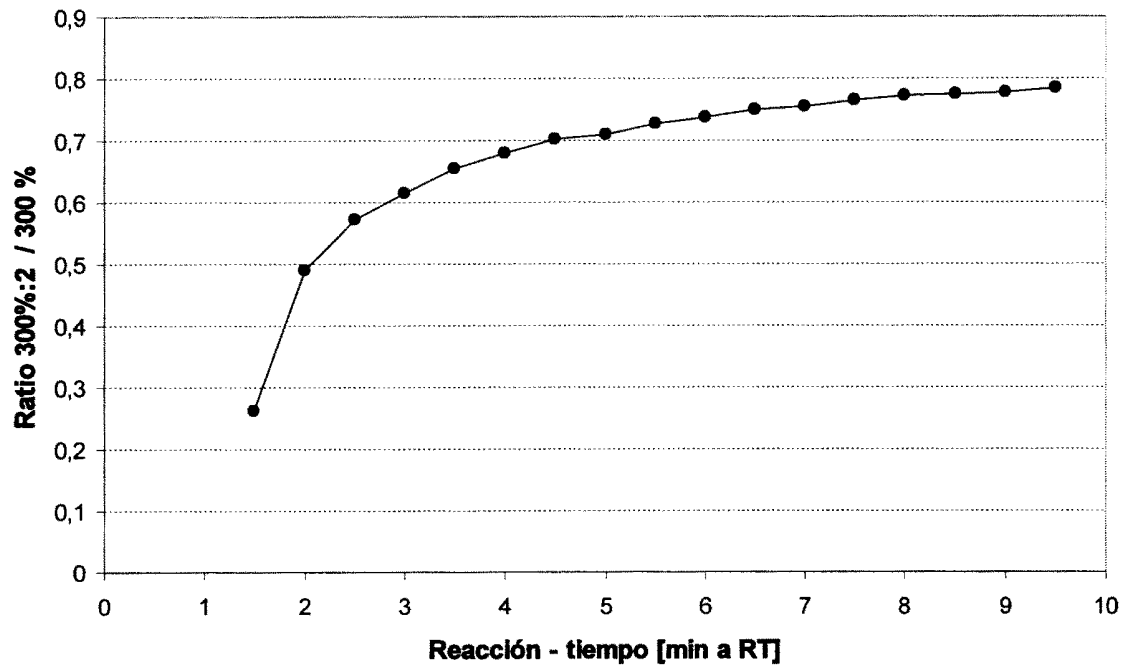


Fig. 8a: Curso de tiempo de reacción a 37°C

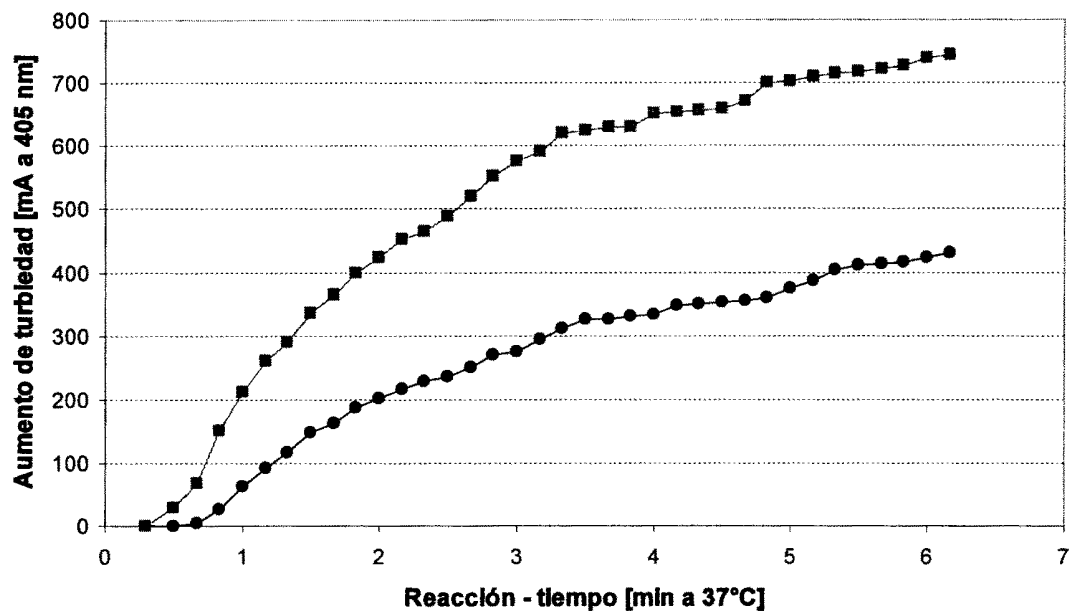


Fig. 8b: Curso de tiempo de reacción

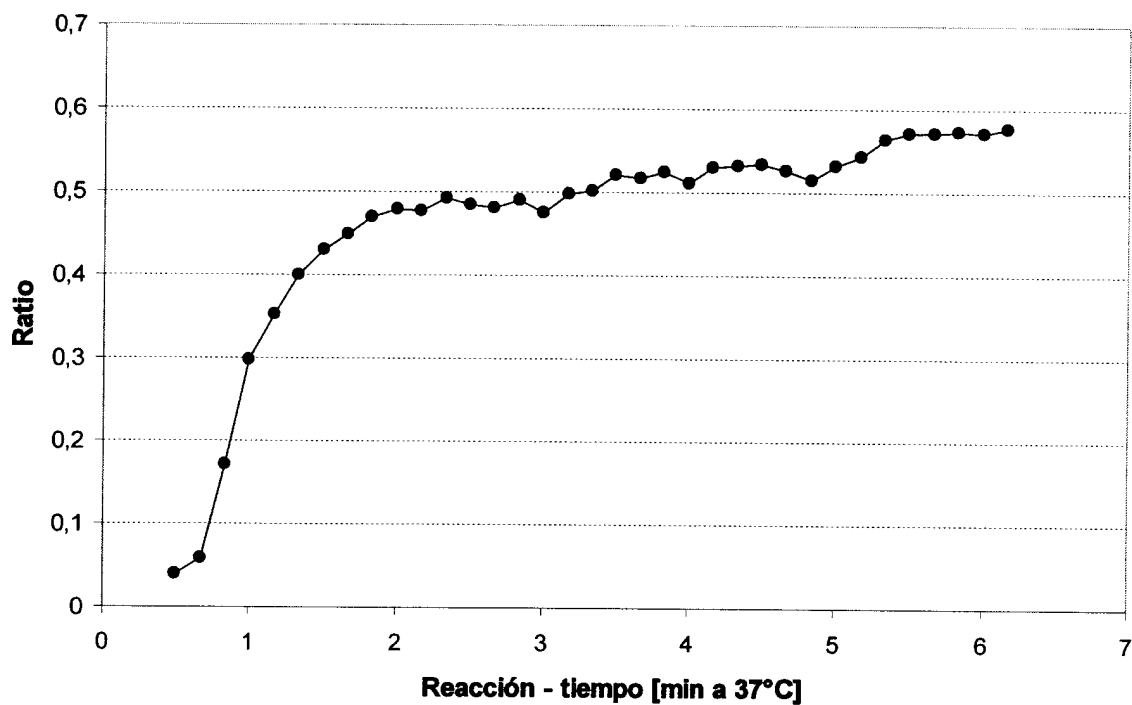


Fig. 9a: Linearidad de FIFTA

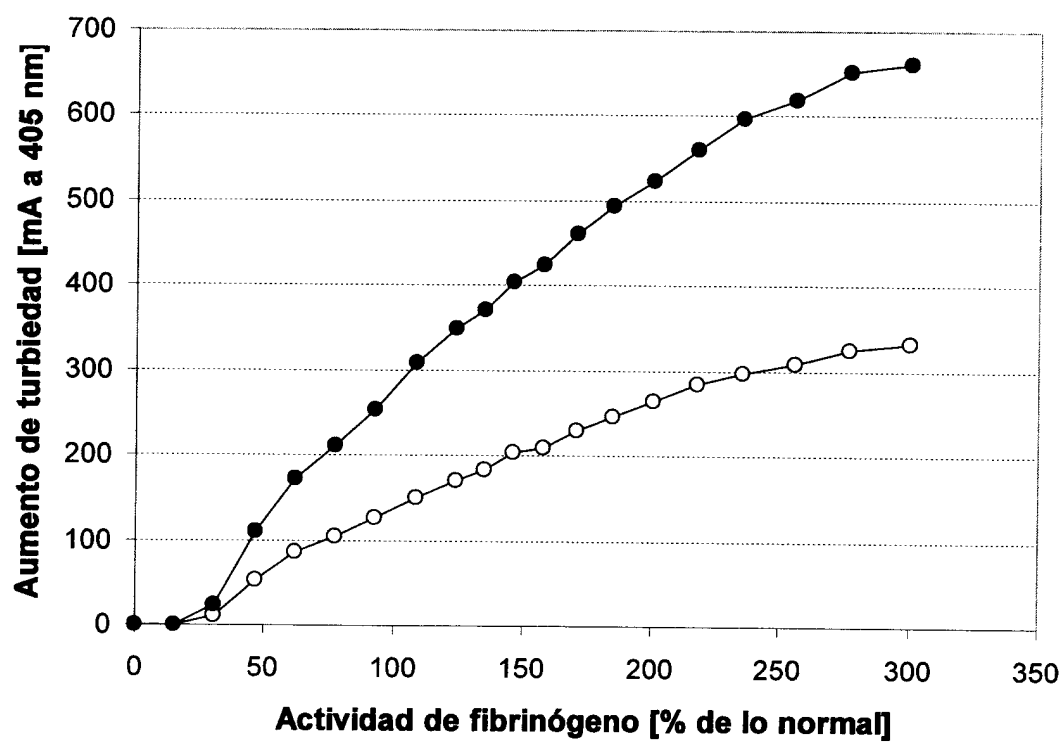


Fig. 9b: FIFTA-linearidad

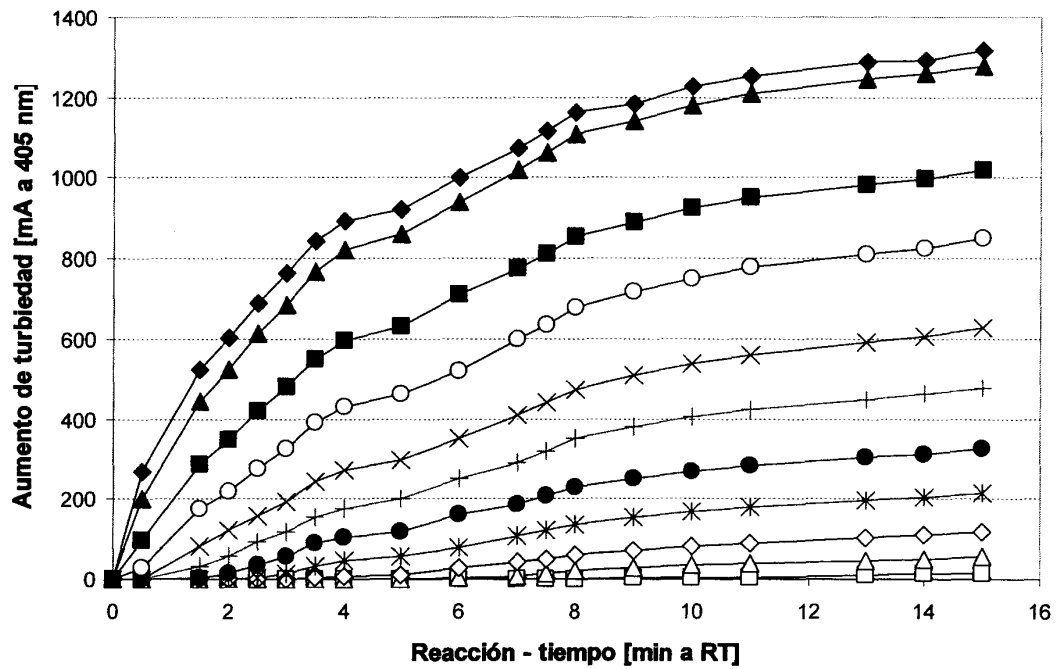


Fig. 9c: FIFTA-linearidad

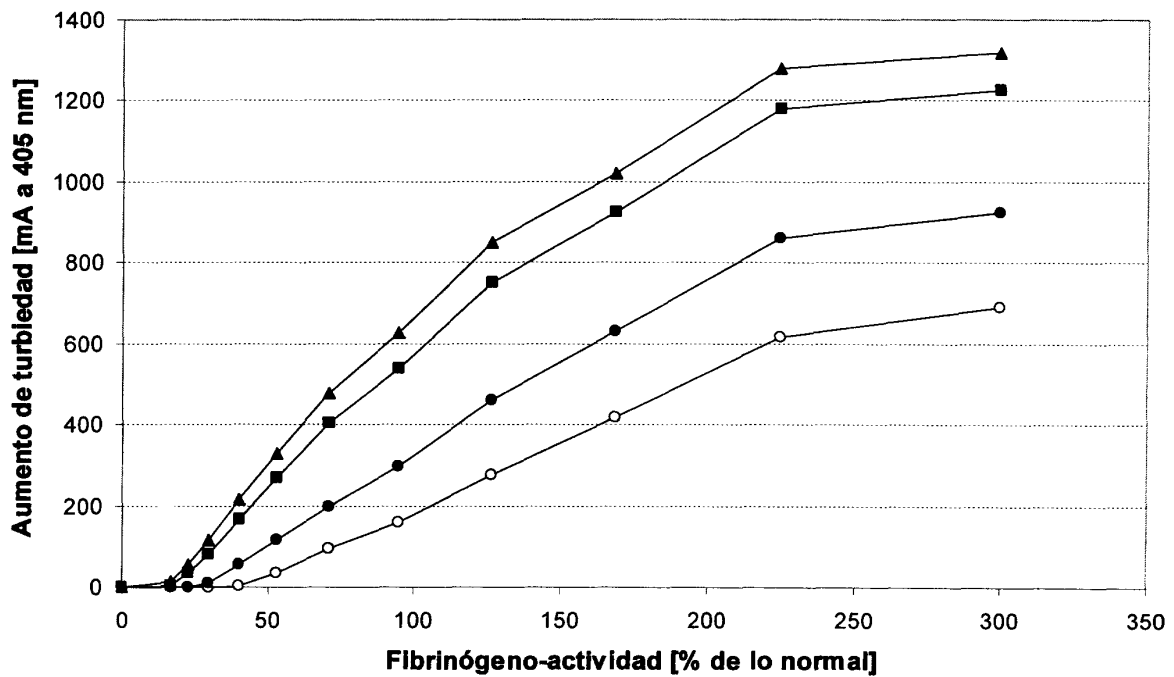


Fig. 10a: Variación de los volúmenes del test

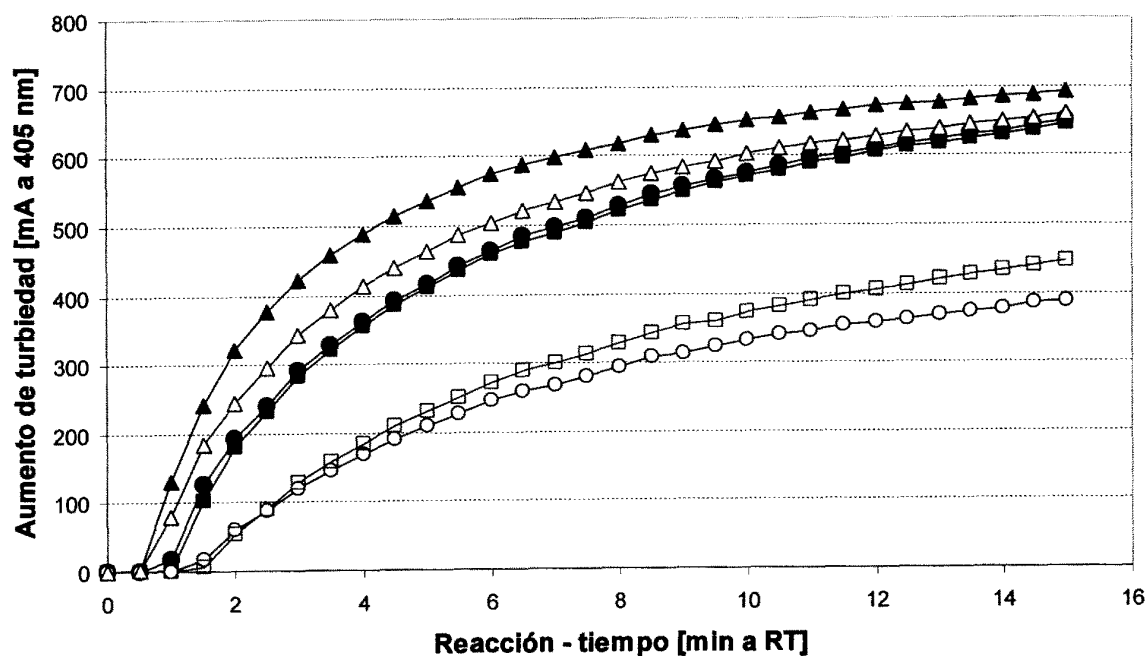


Fig. 10b: Variación de los volúmenes del test

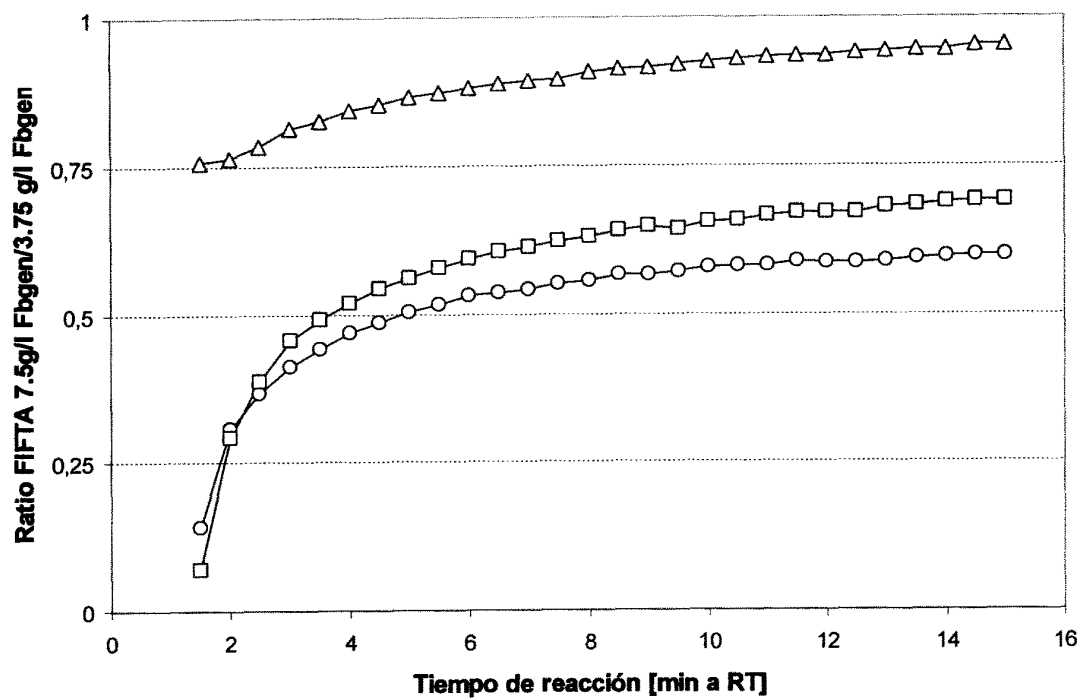


Fig. 11: Longitud de onda de absorción en la determinación de la turbiedad

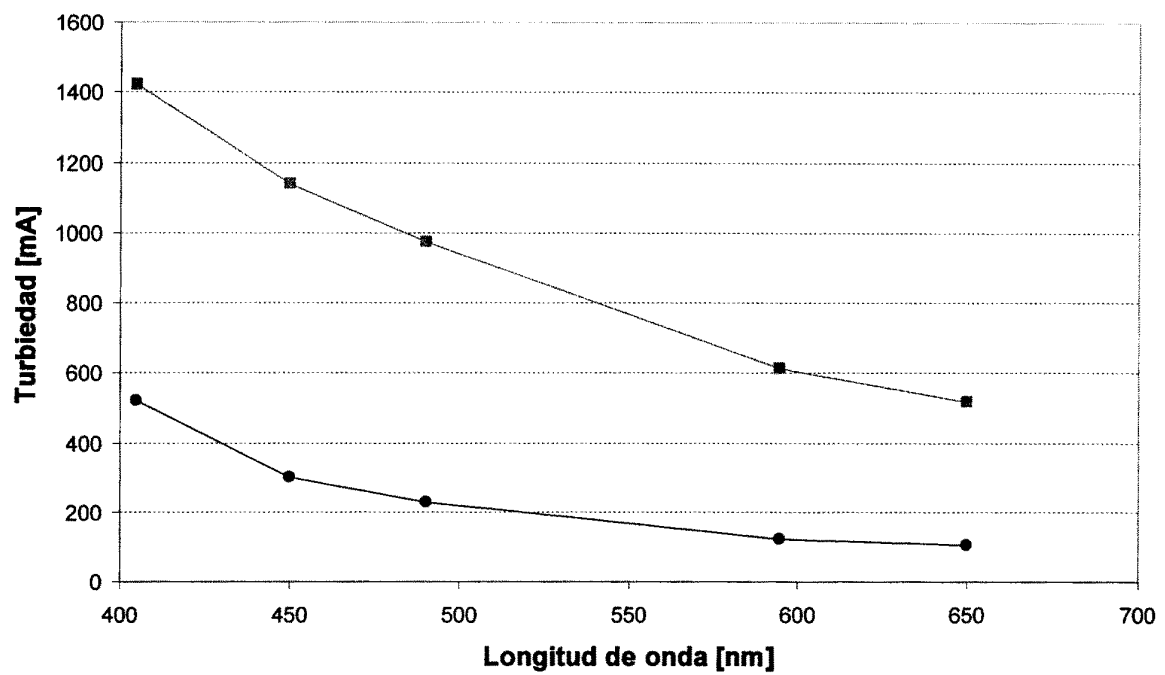


Fig. 12a: Calibración del FIFTA con fibrinógeno purificado

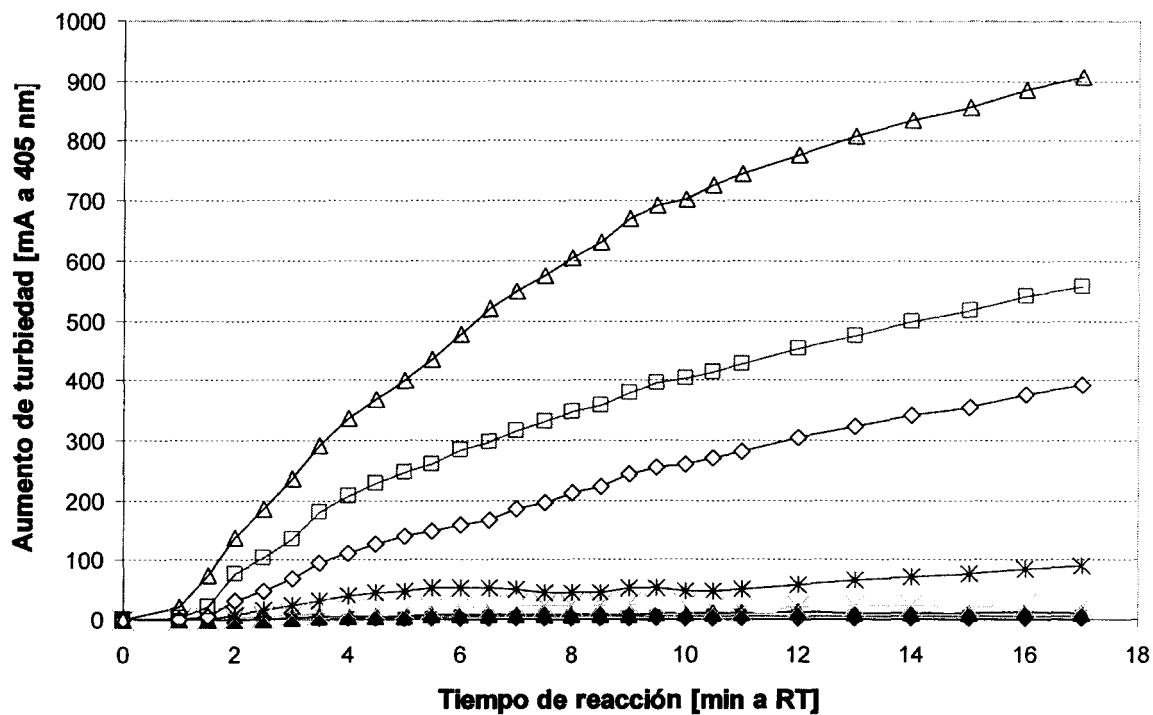


Fig. 12b: FIFTA-calibración con fibrinógeno purificado

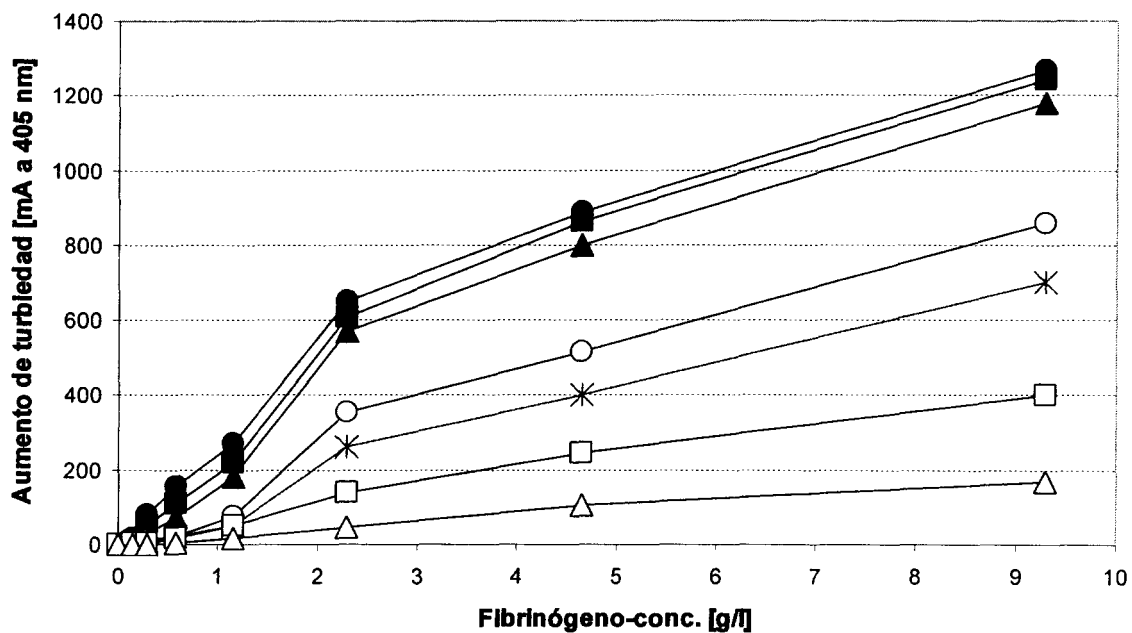


Fig. 12c: FIFTA-calibración con fibrinógeno purificado

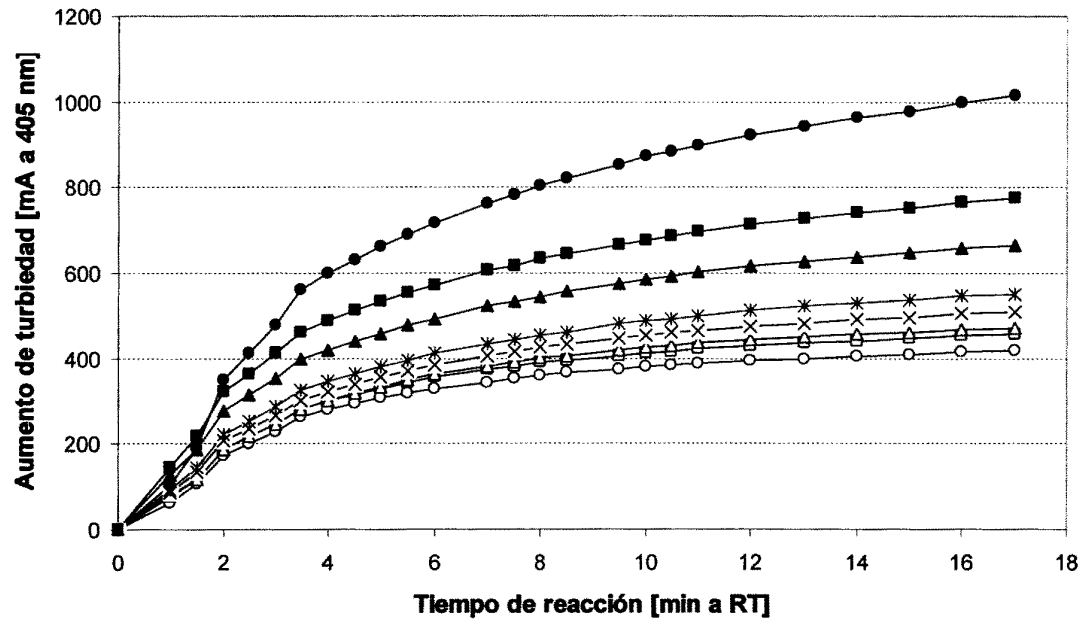


Fig. 12d: FIFTA-calibración con fibrinógeno purificado

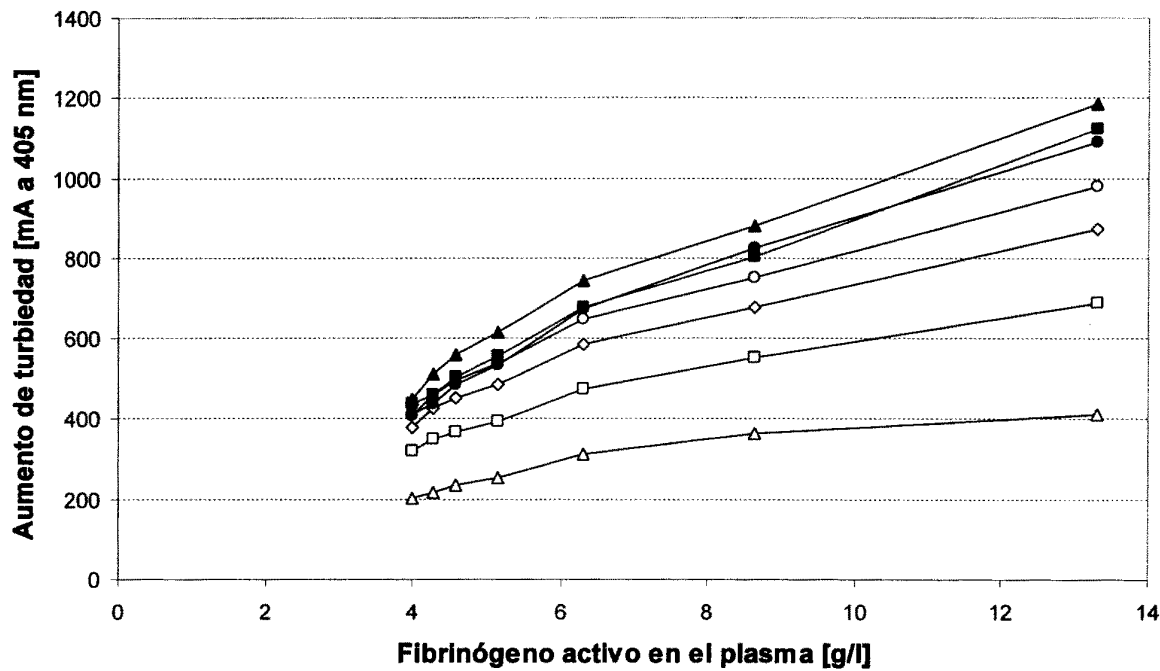


Fig. 12e: FIFTA-calibración con fibrinógeno purificado

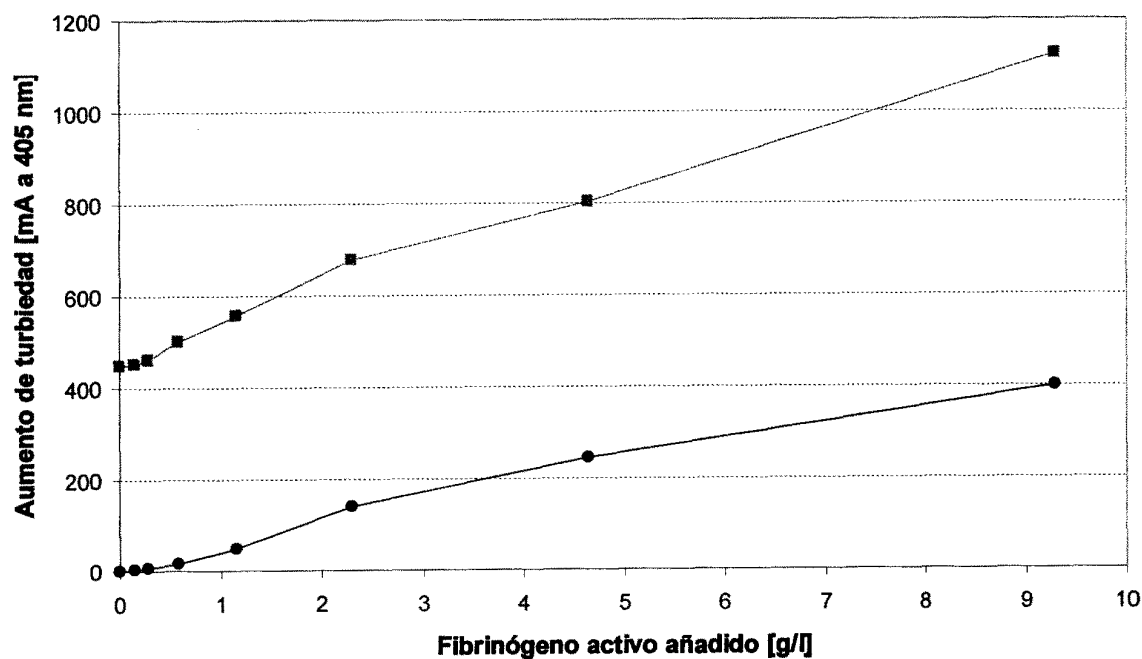


Fig. 13a: Correlación con el methodo modificado de Clauss

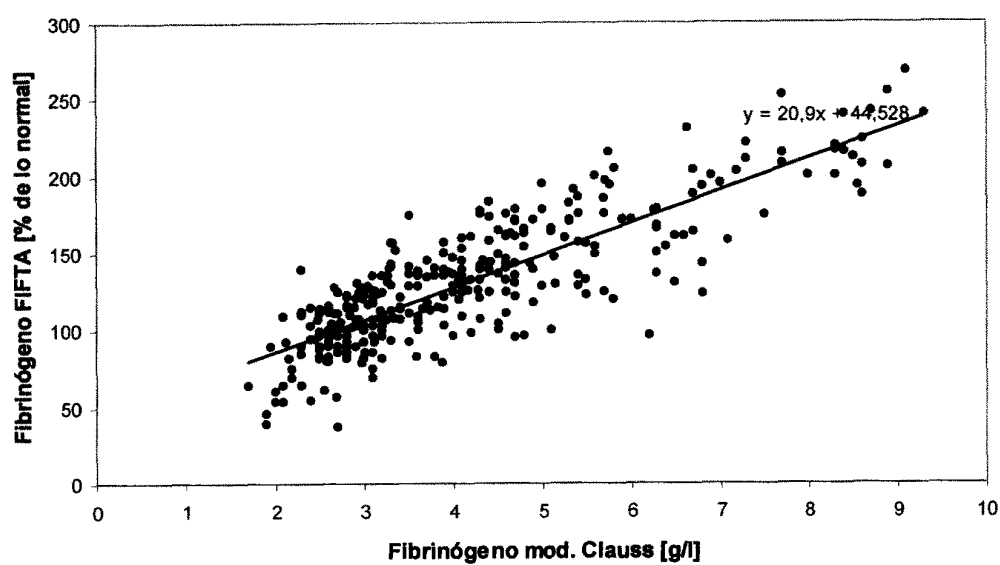


Fig. 13b: FIFTA-distribución en enfermos

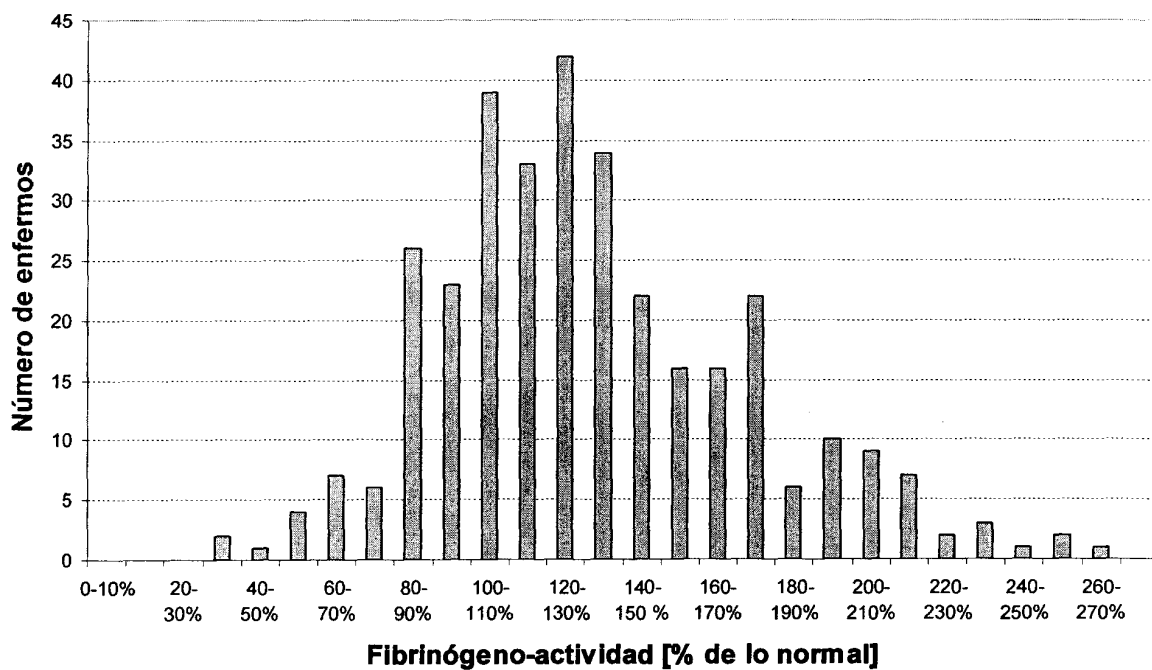


Fig. 14a: IC50 de heparina en el FIFTA

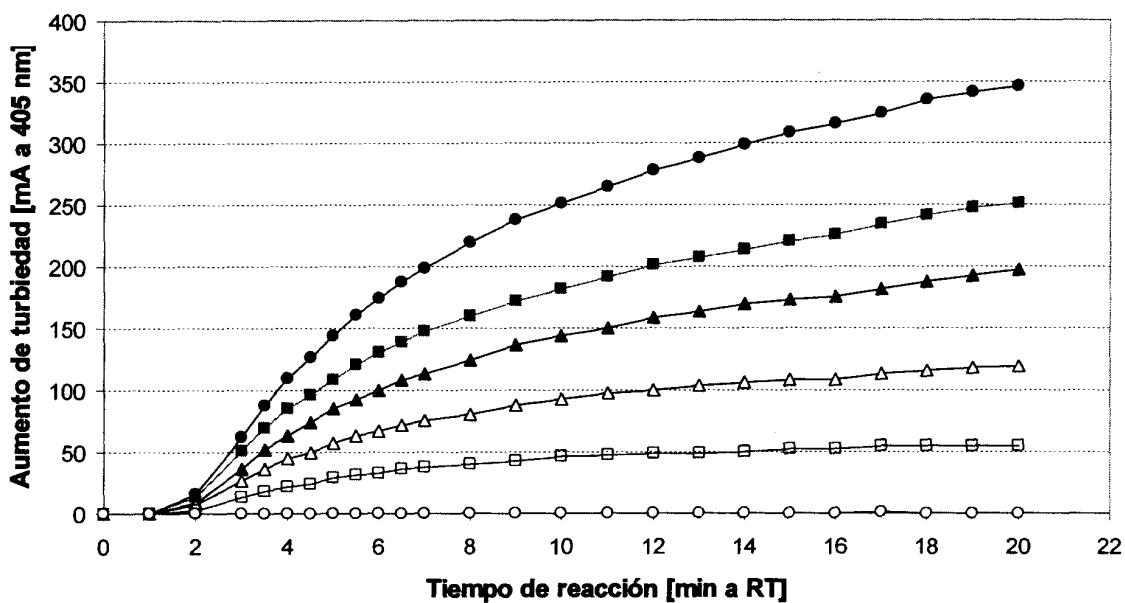


Fig. 14b: IC50 von Heparin im FIFTA

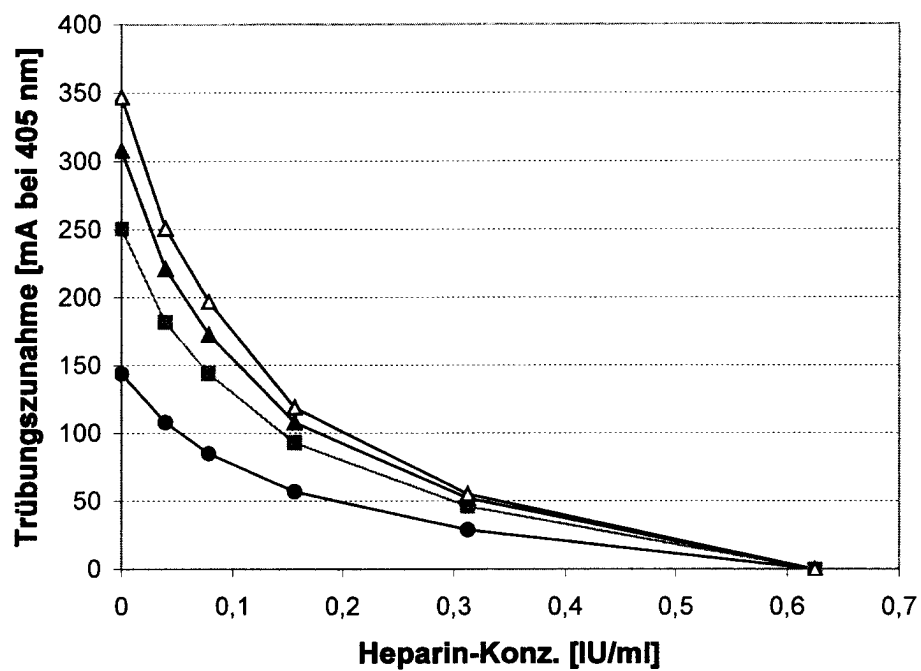


Fig. 15a: Punto de tiempo de 50 % inhibición para heparina en el FIFTA

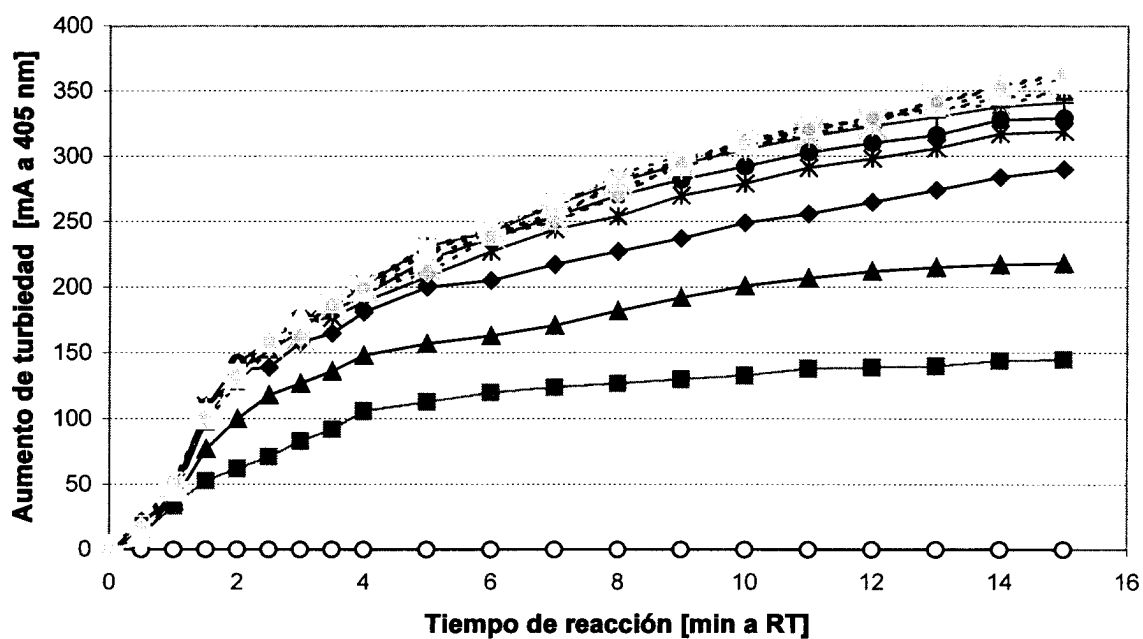


Fig. 15b: Punto tiempo de 50 % inhibición

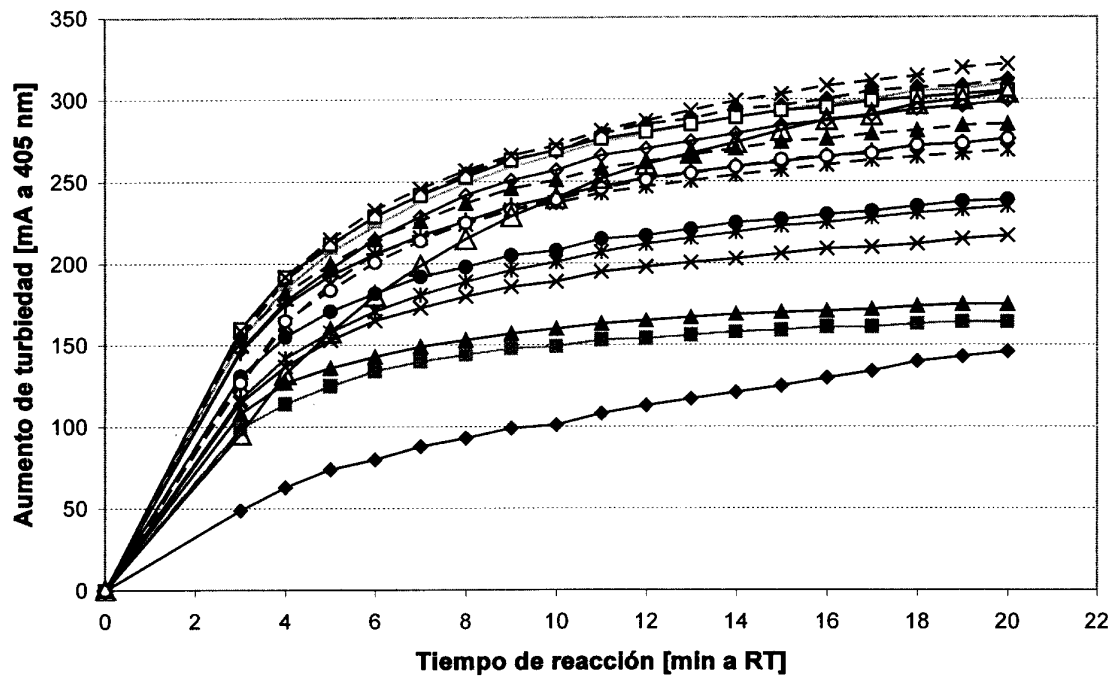


Fig. 15c: Punto de tiempo de 50 % inhibición

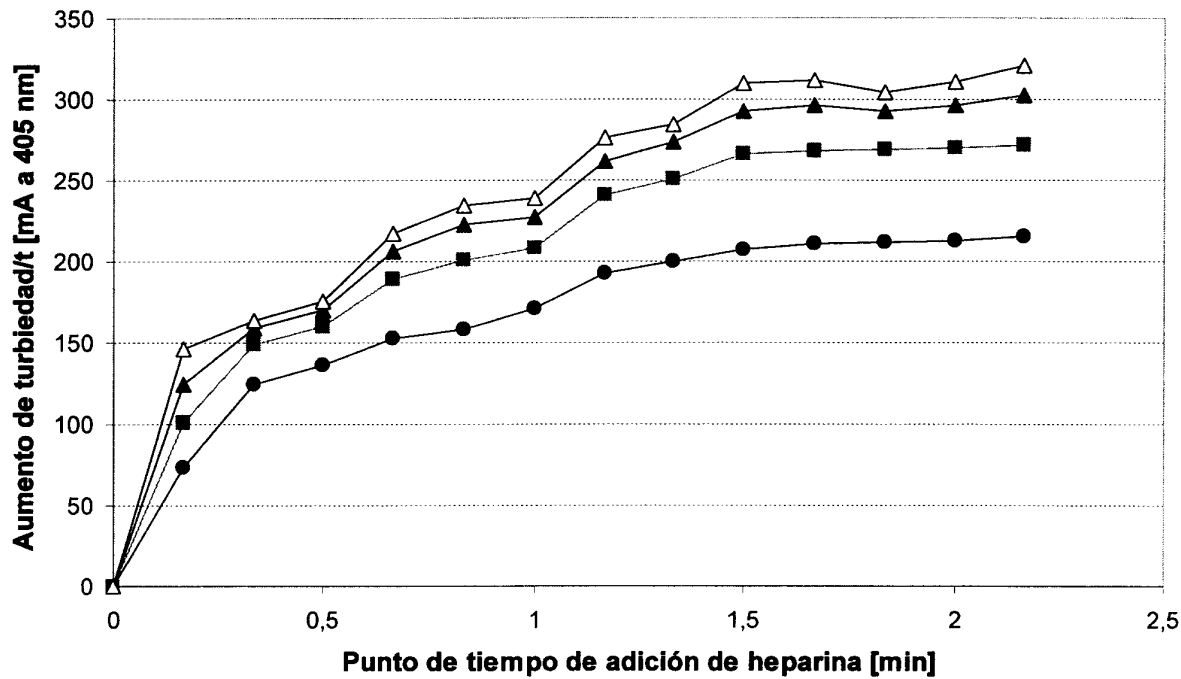


Fig. 16a: Inhibición de generación de fibrina por arginina

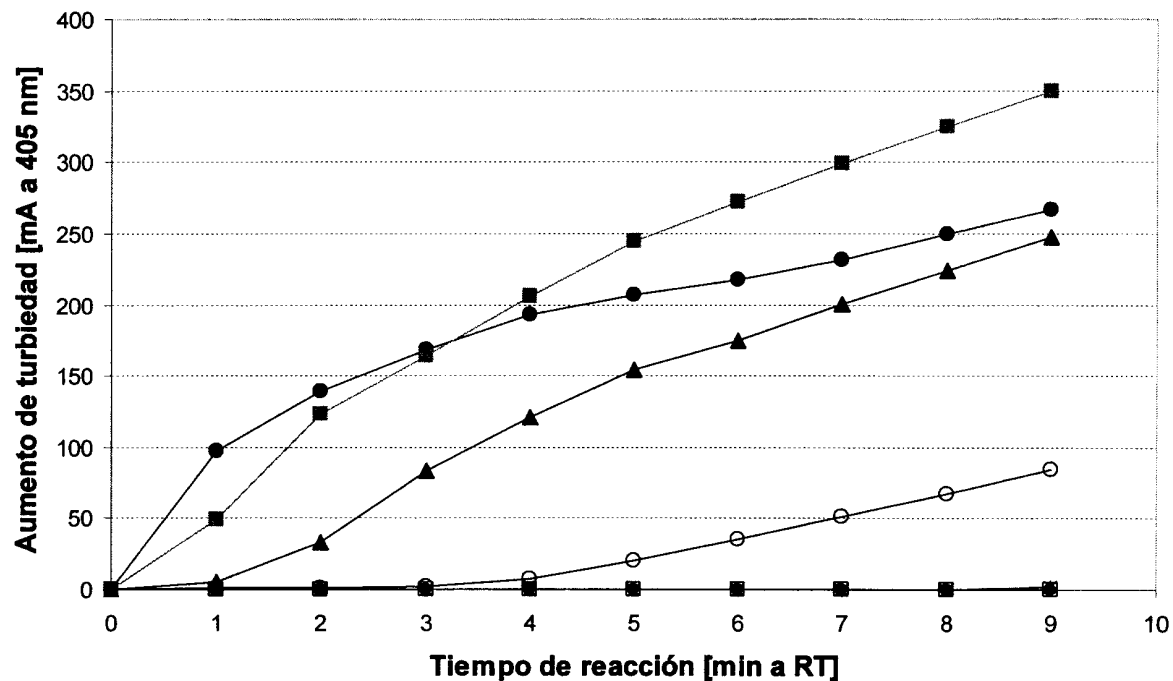


Fig. 16b: Inhibición de la generación de fibrina por arginina

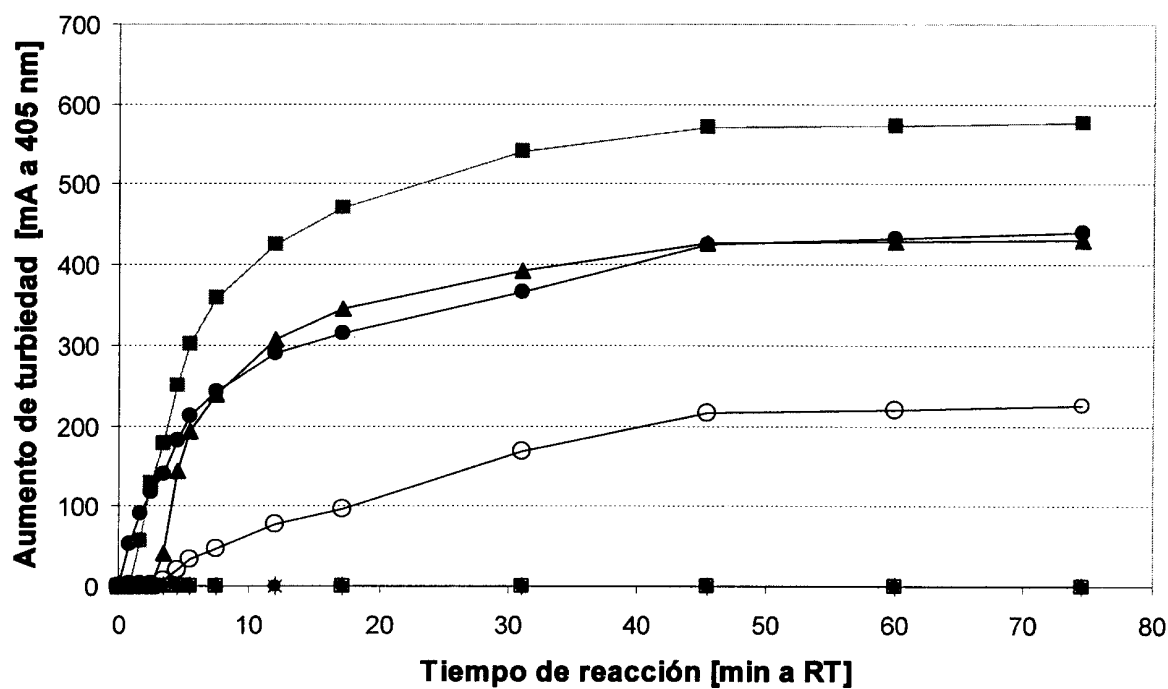


Fig. 16c: Inhibición de la generación de fibrina por arginina

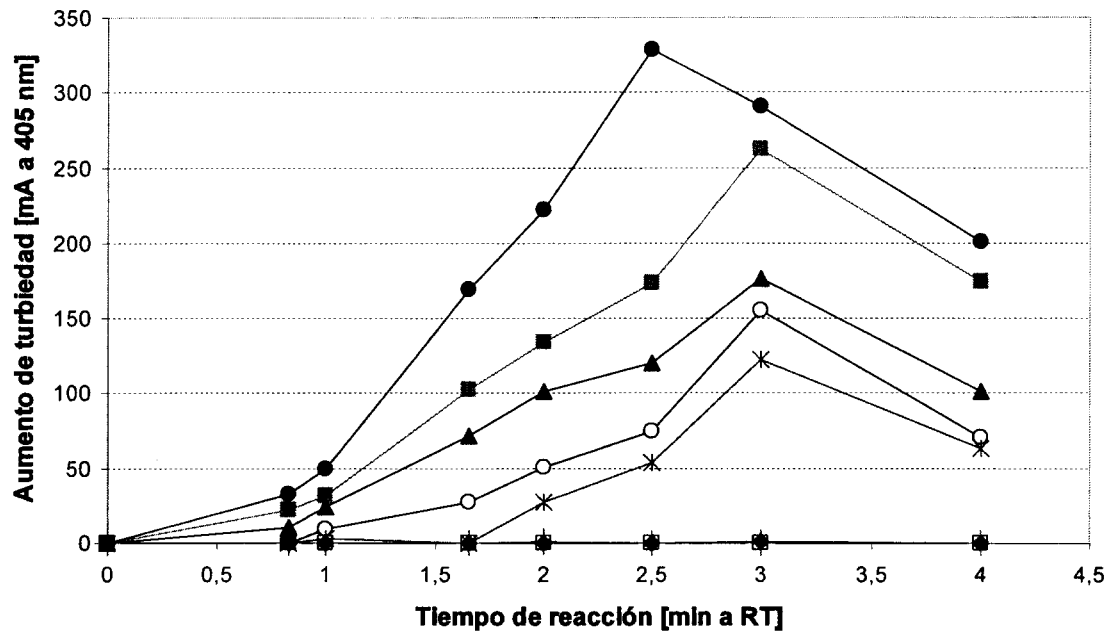


Fig. 16d: Inhibición de la generación de fibrina por arginina

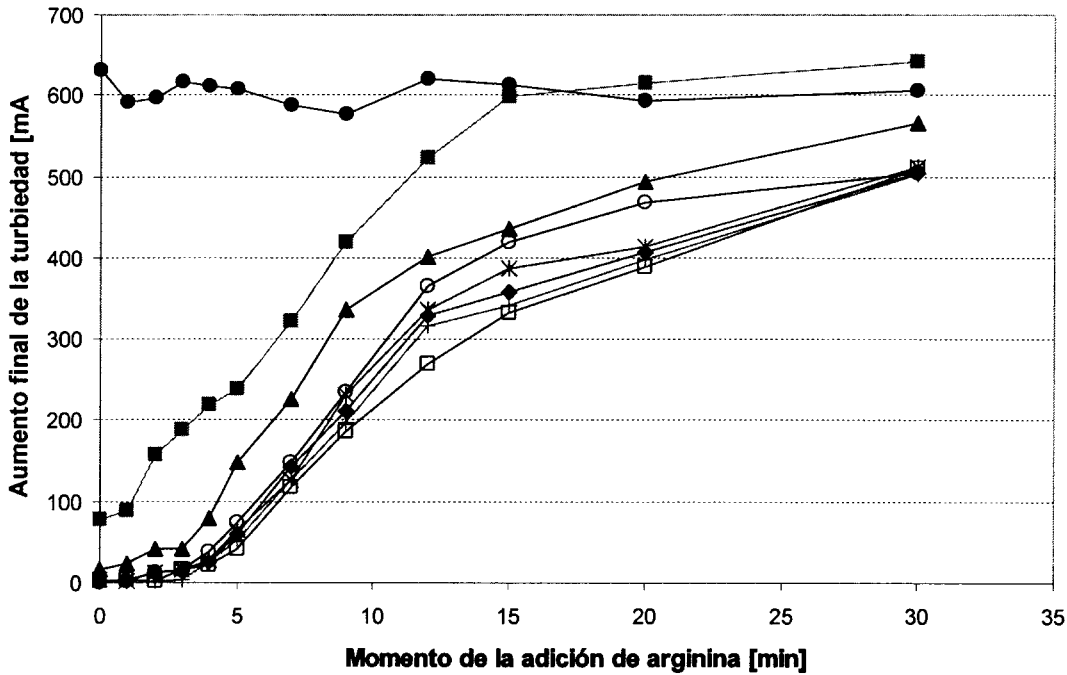


Fig. 17: Dissolución de fibrina por arginina

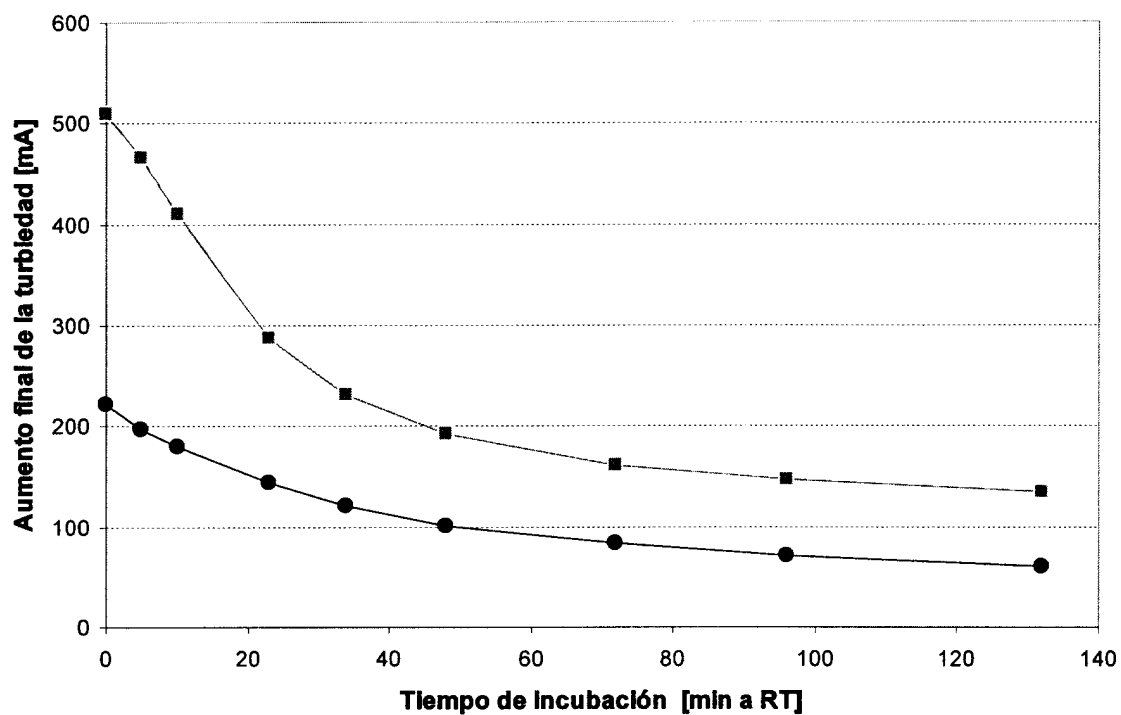


Fig. 18: Inactivación de fibrinógeno por vancomicina

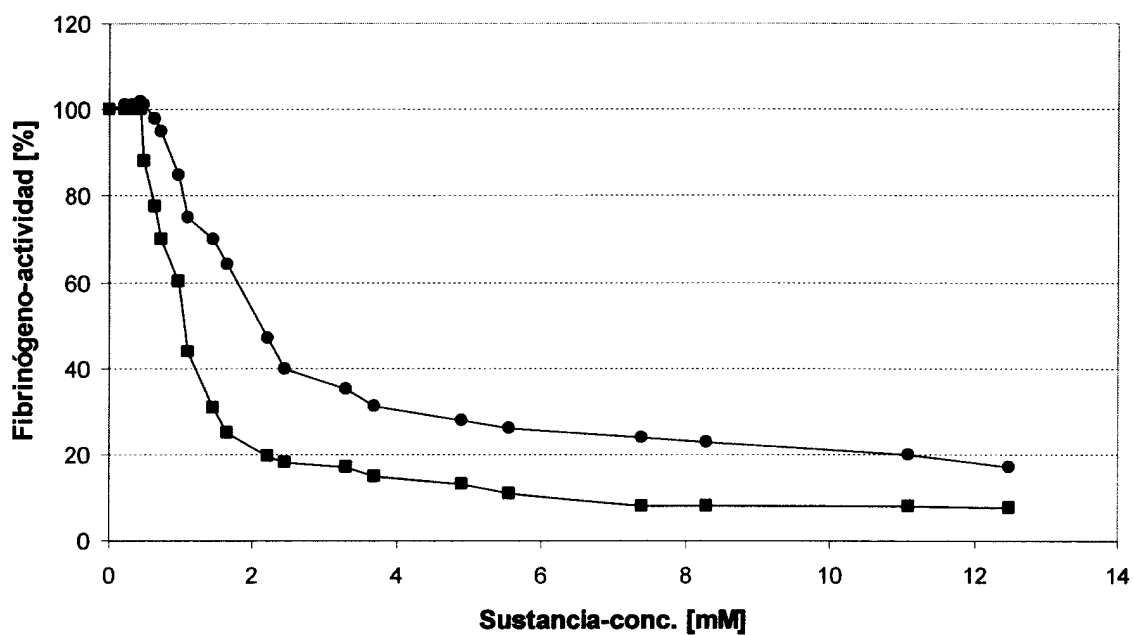


Fig. 19a: Se puede inhibir la reacción entre vancomicina y fibrinógeno por antioxidantes ?

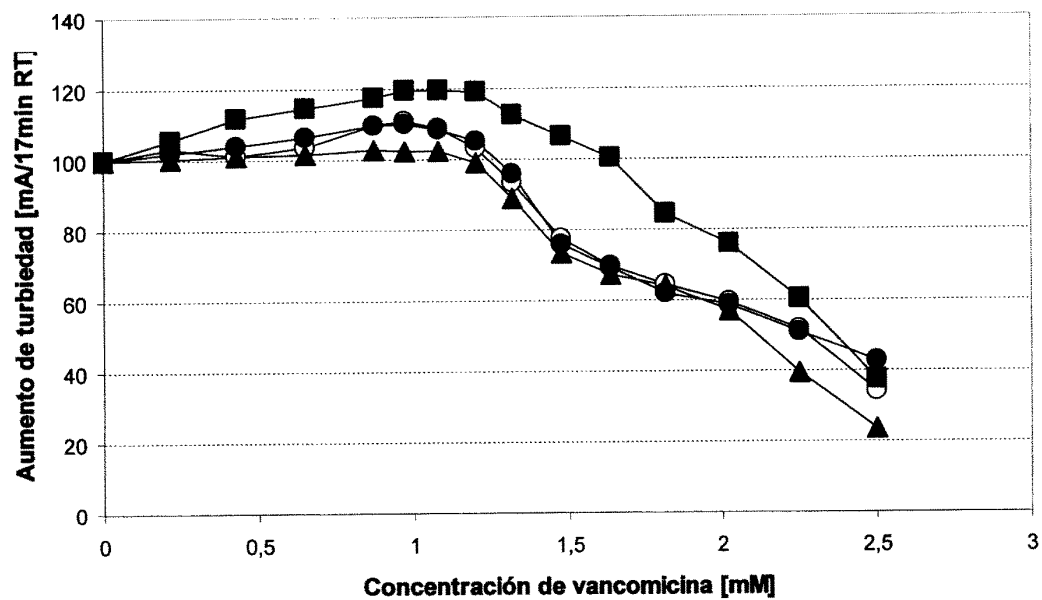


Fig. 19b: Inhibición de la reacción entre fibrinógeno y cloramina-T

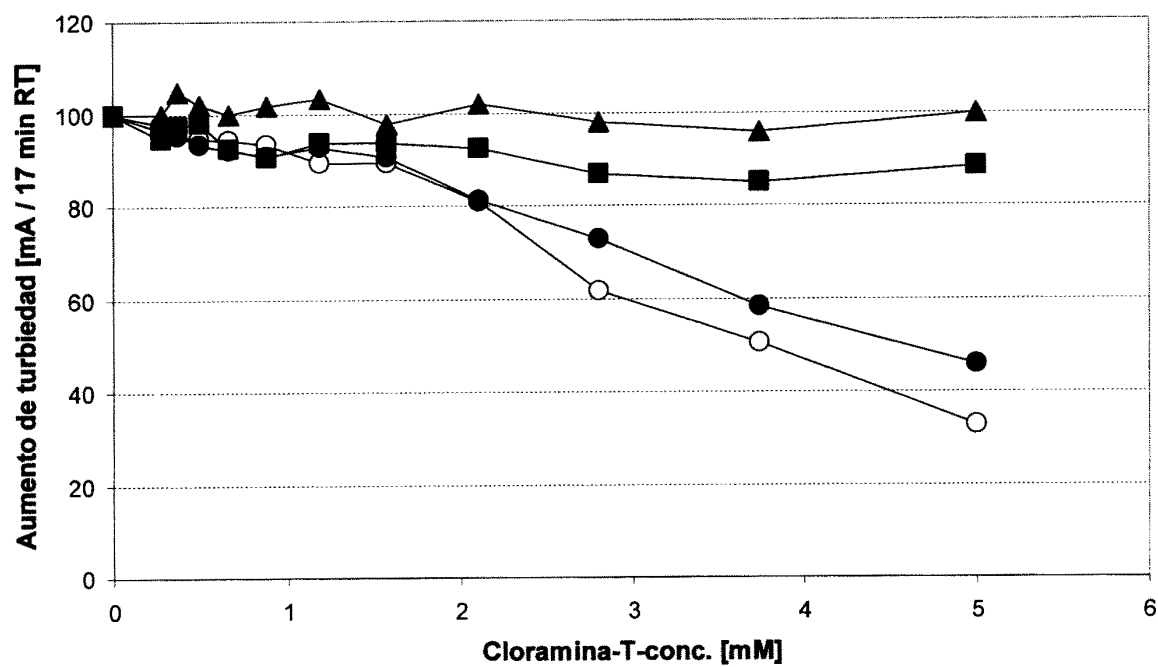


Fig. 20a: Turbiedad-aumento en dependencia de la concentración de vancomicina

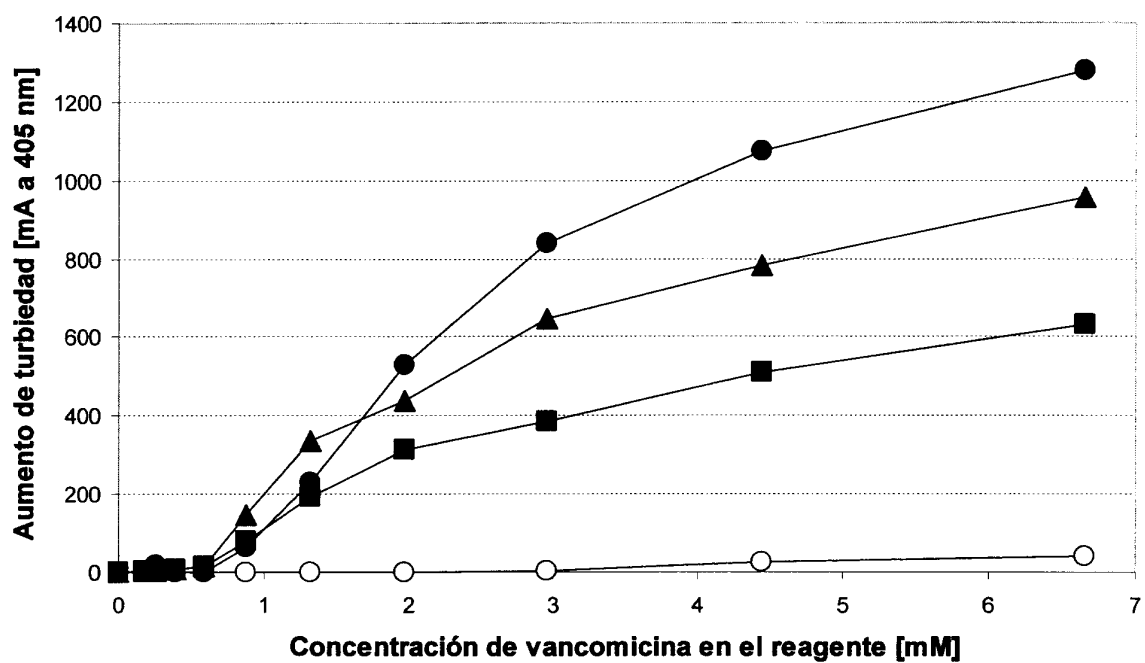


Fig. 20b: Aumento de turbiedad en dependencia de la concentración de fibrinógeno

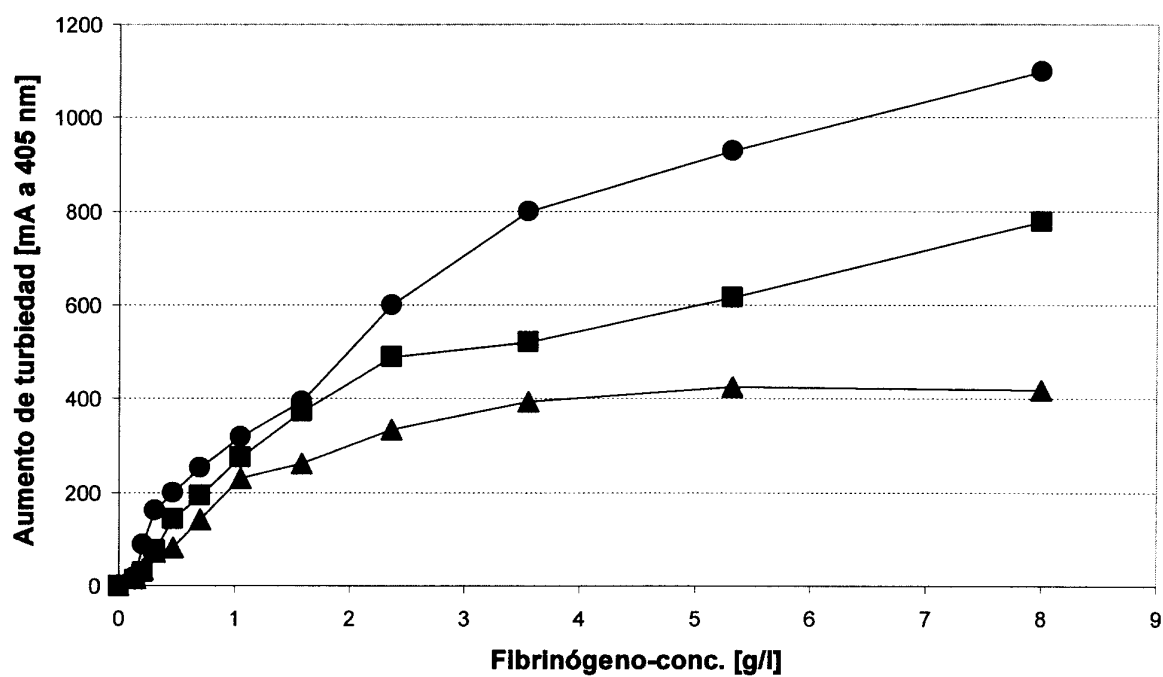


Fig. 21: FIATA-calibración con fibrinógeno purificado

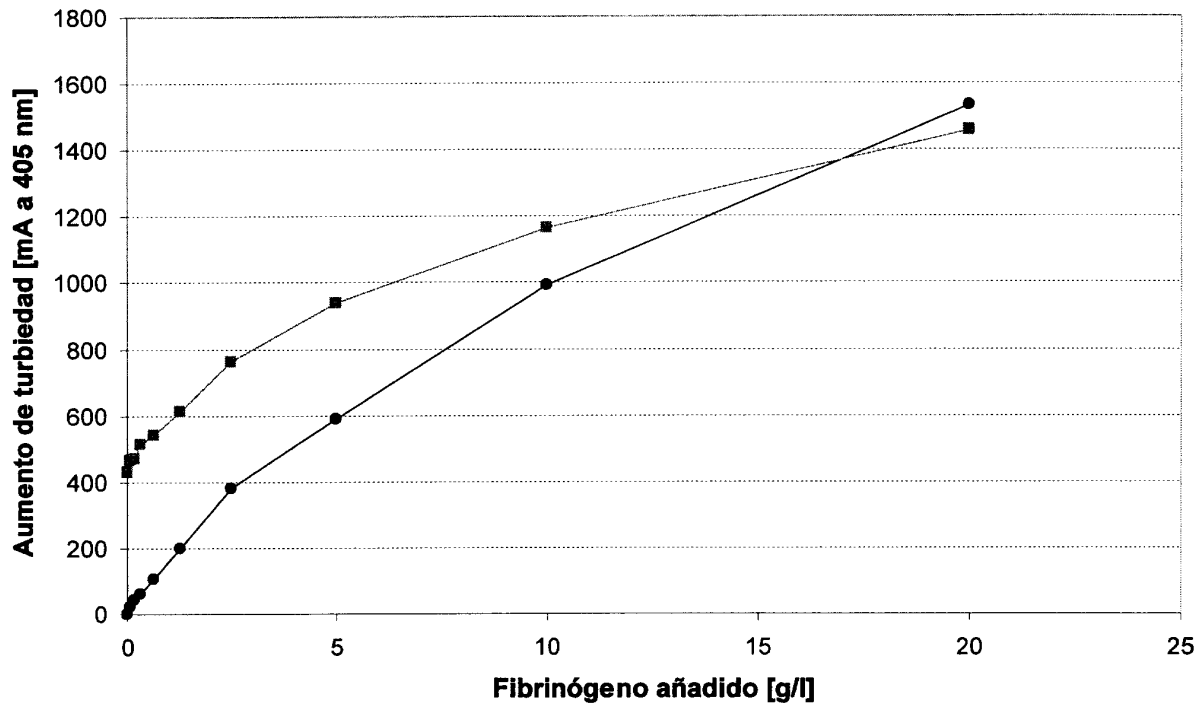


Fig. 22a: FIATA-linealidad

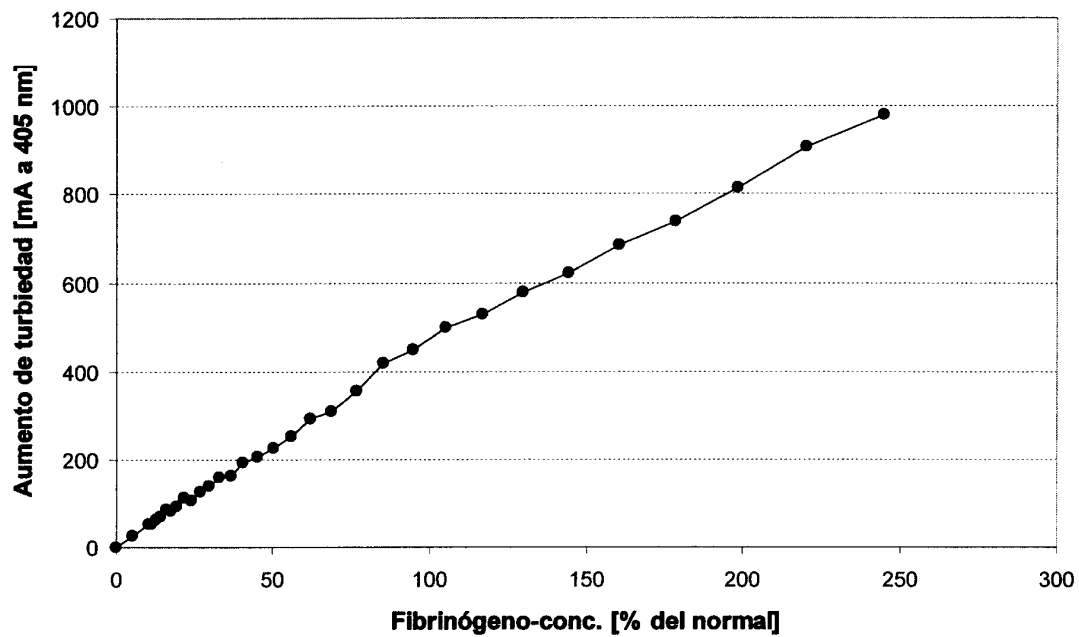


Fig. 22b: FIATA-Linealidad; diluciones con suero

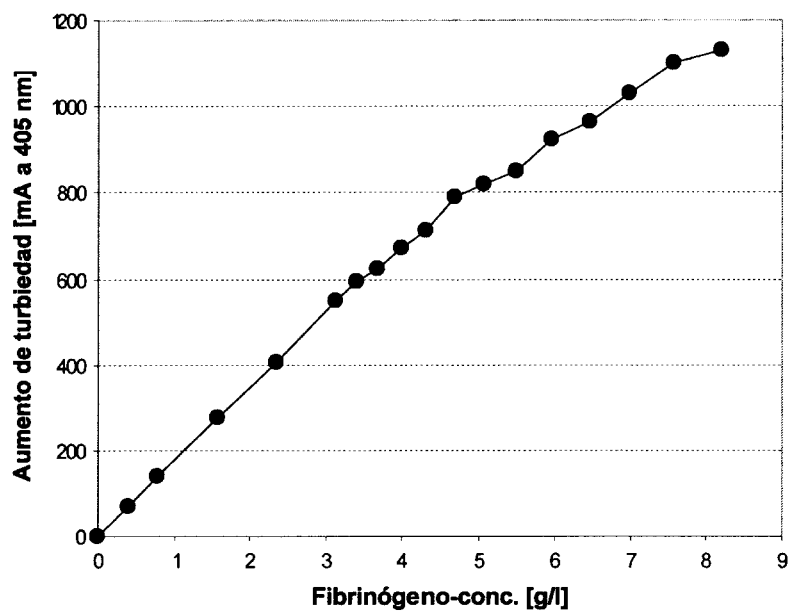


Fig. 22c: FIATA-Linealidad

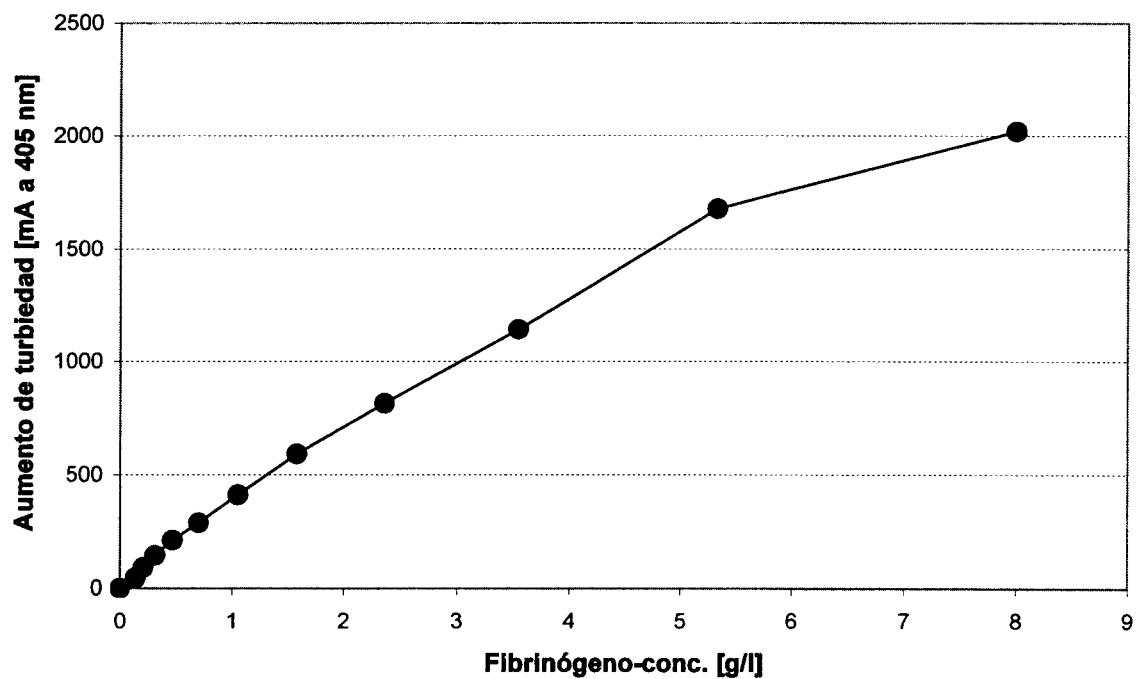


Fig. 22d: FIATA-Linealidad

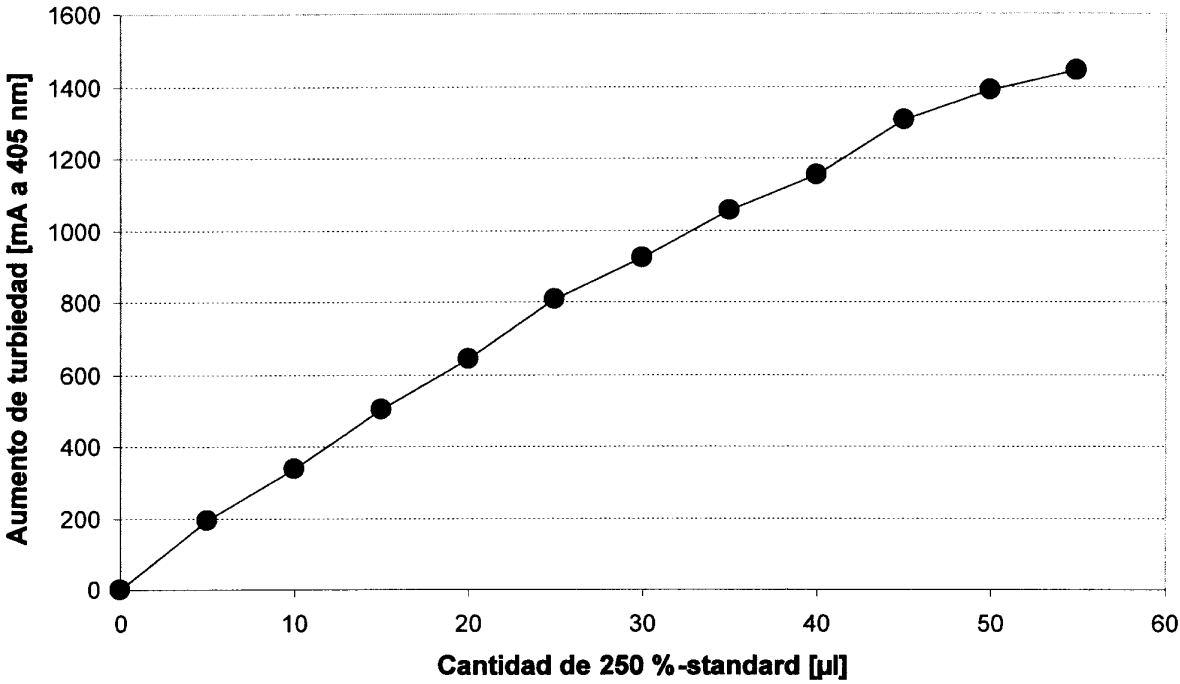


Fig. 22e: FIATA-Linealidad

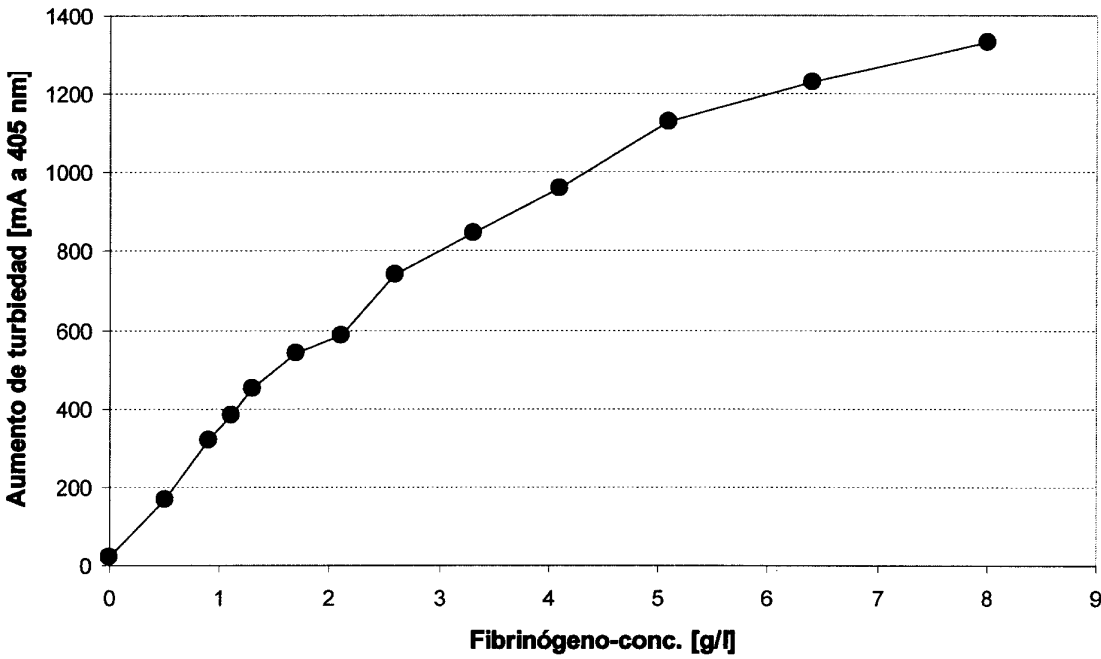


Fig. 23a: Correlación entre FIATA y método modificado de Clauss

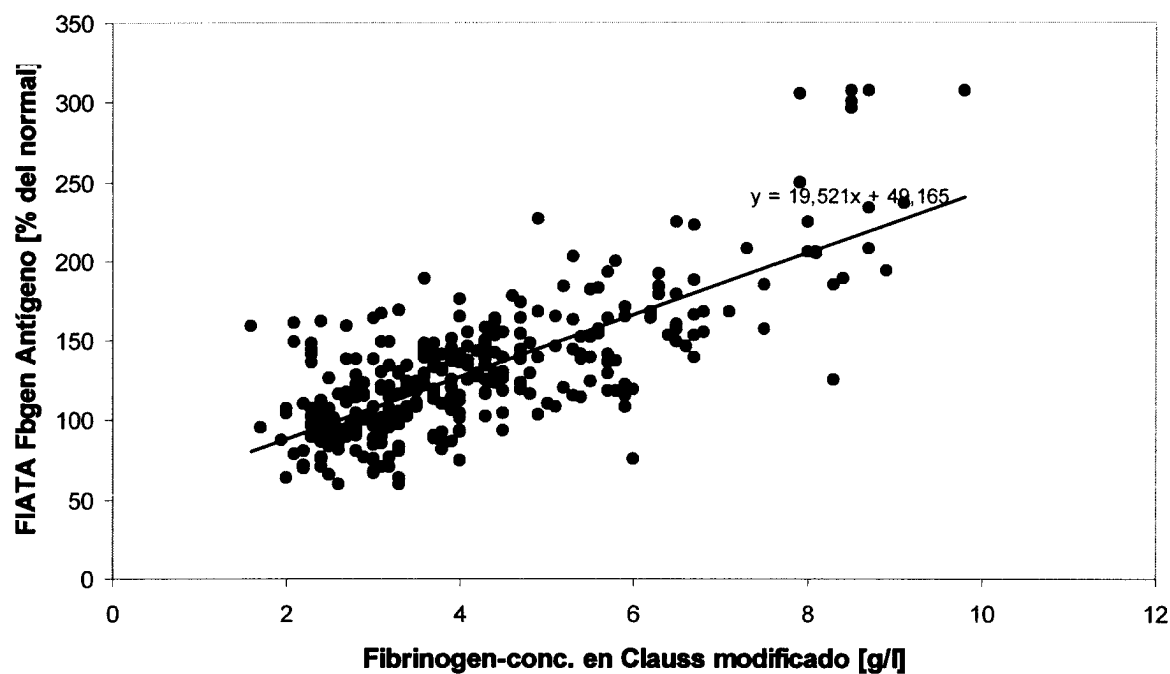


Fig. 23b: Correlación de FIATA con FIFTA

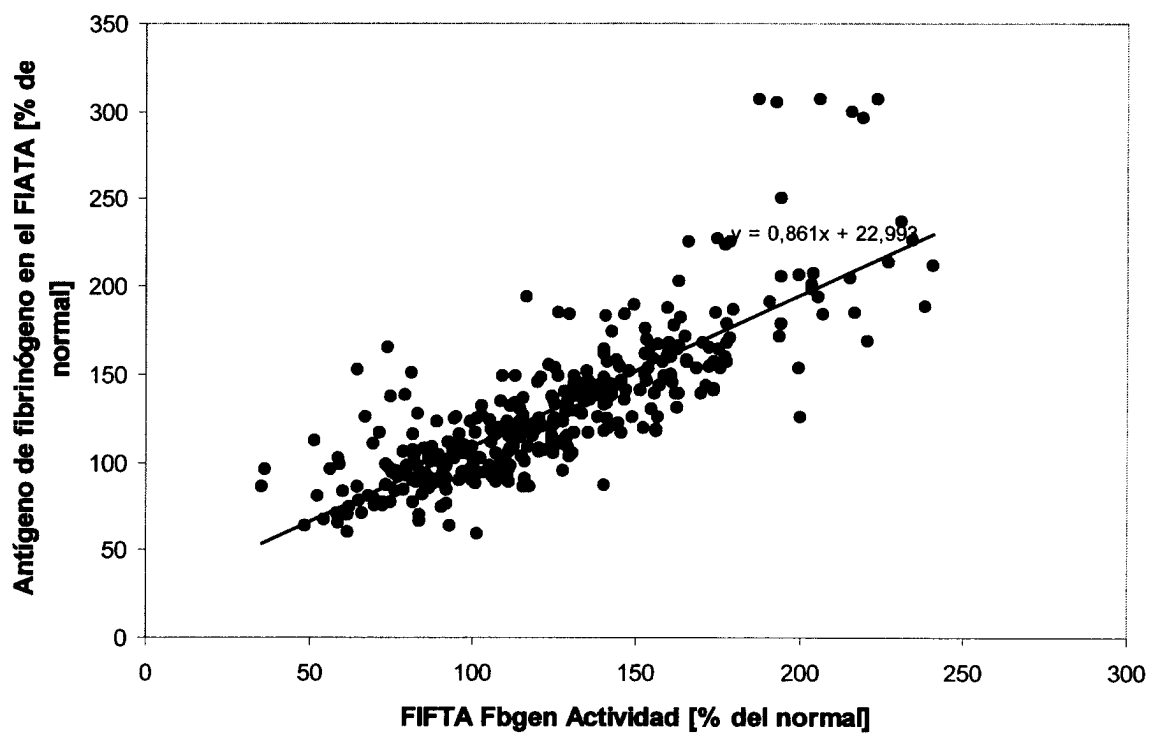


Fig. 23c: Distribución según Gauss de FIATA en enfermos

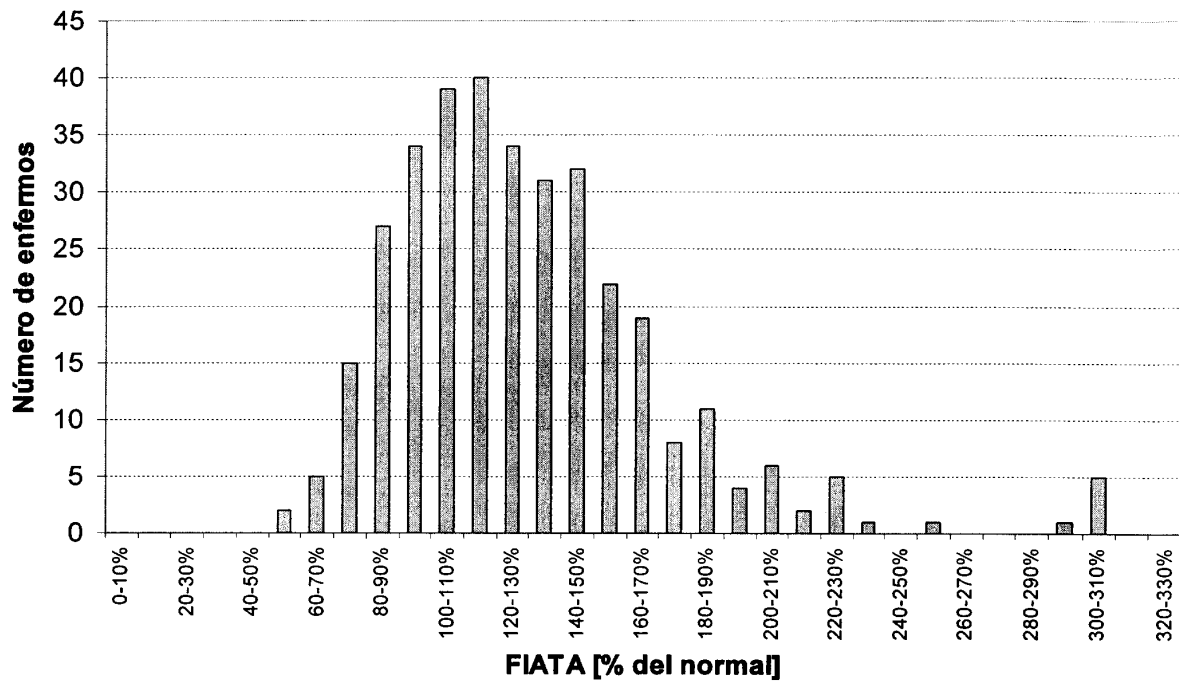


Fig. 24a: Precipitación de fibrinógeno plasmático por vancomicina

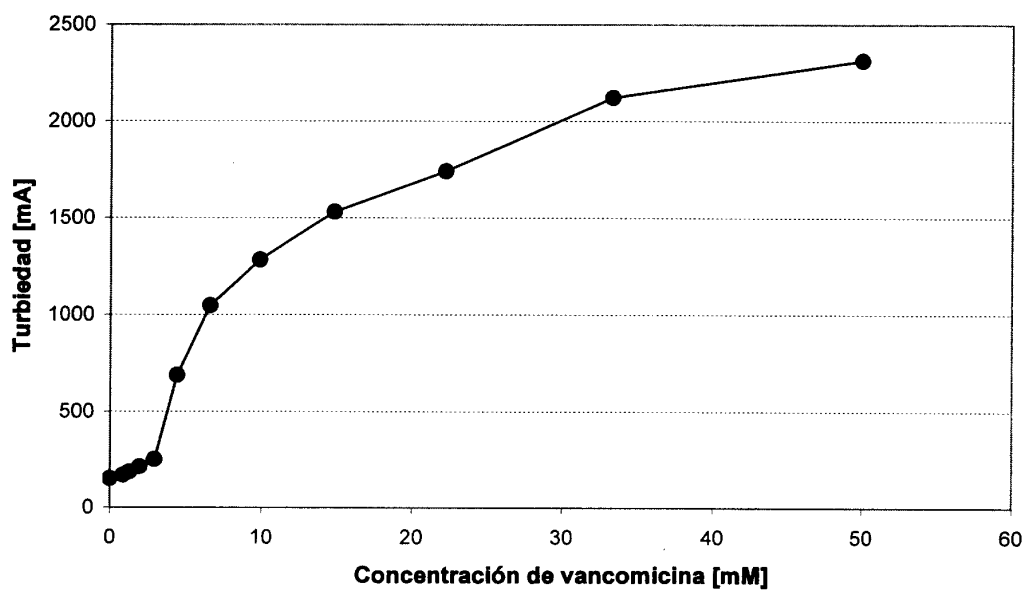


Fig. 24b: Inversión de la precipitación de fibrinógeno por vancomicina por medio de NaHCO_3

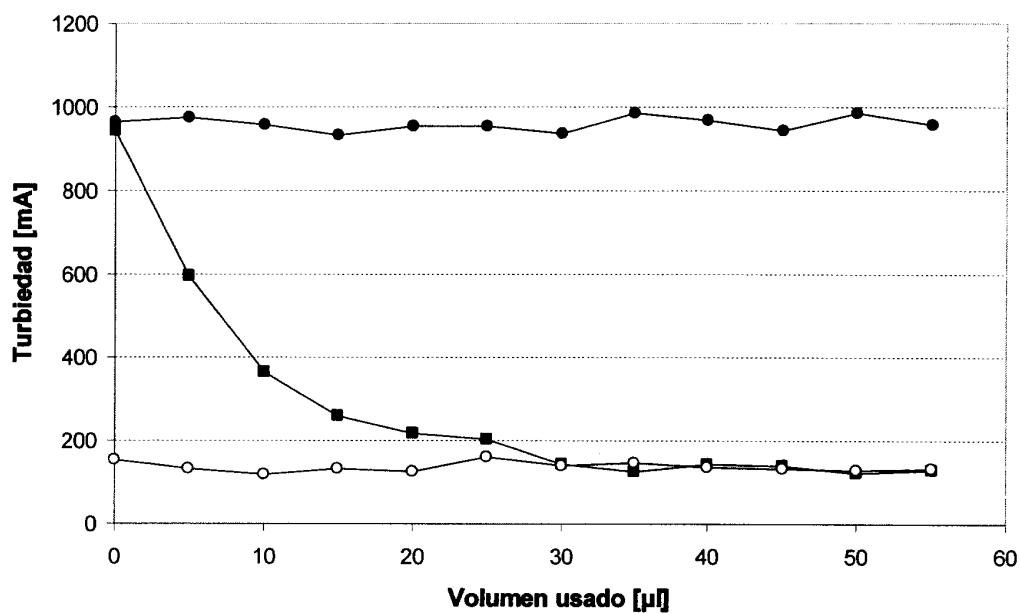


Fig. 24c: Determinación del pH del test

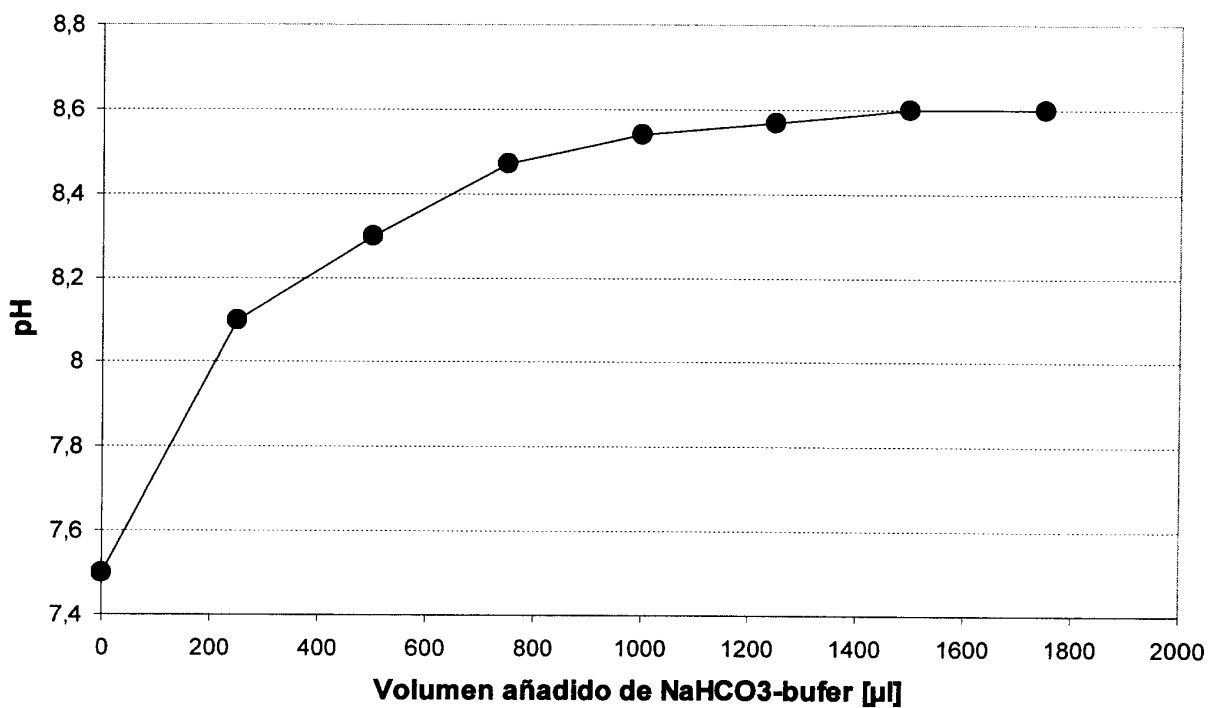


Fig. 24d: Inversión de la precipitación de fibrinógeno por vancomicina por medio de arginina

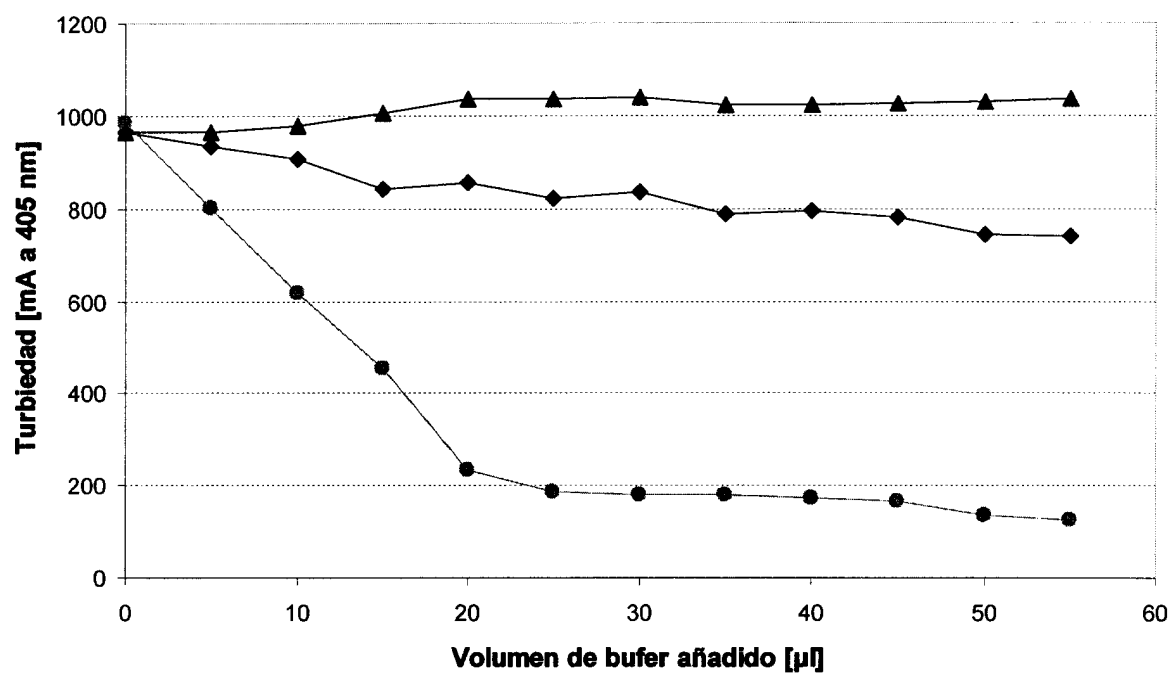


Fig. 25: Electroforesis of plasma que ha sido incubado con vancomicina

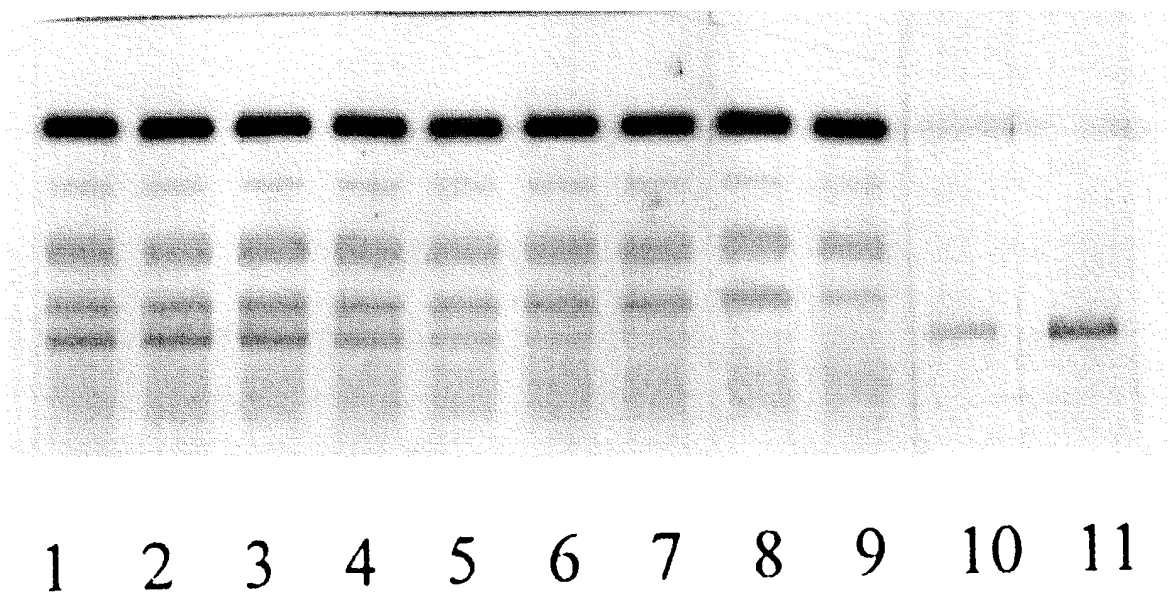


Fig. 25.1: 0 mM vancomicina en P-Pool

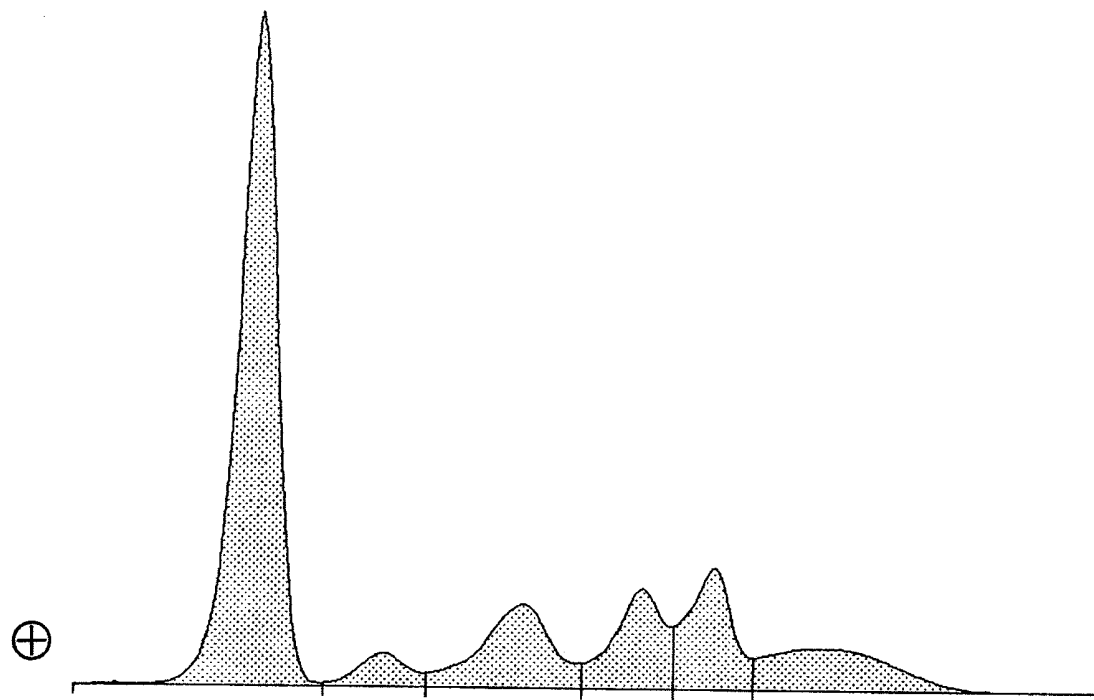


Fig. 25.2: 0,29 mM vancomicina en P-Pool

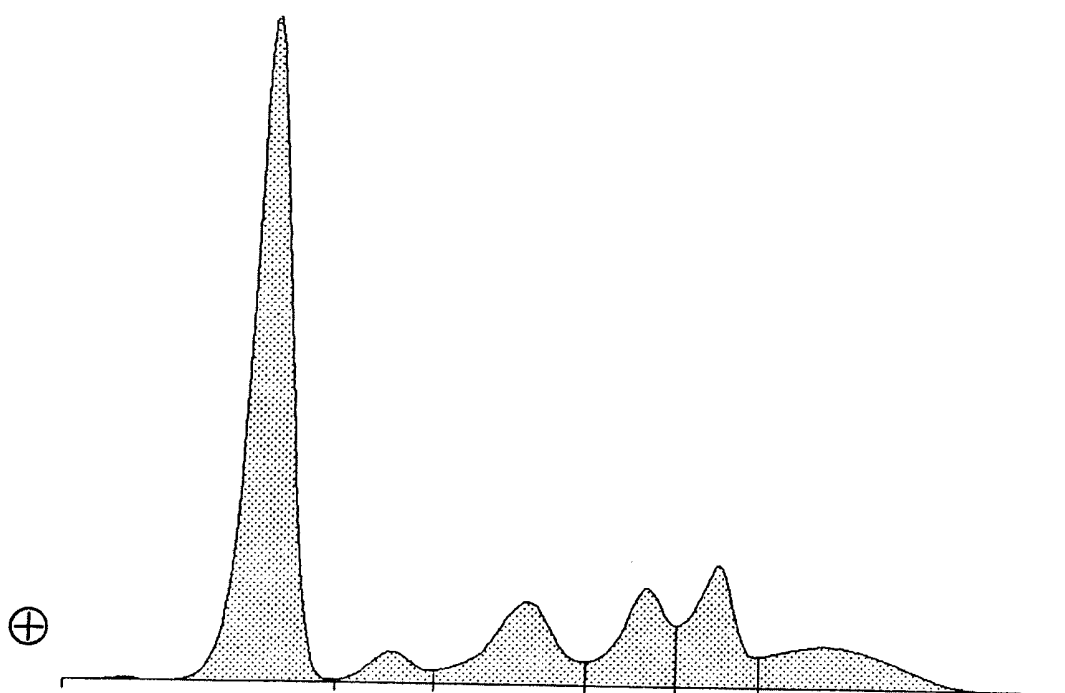


Fig. 25.3: 0,44 mM vancomicina en P-Pool

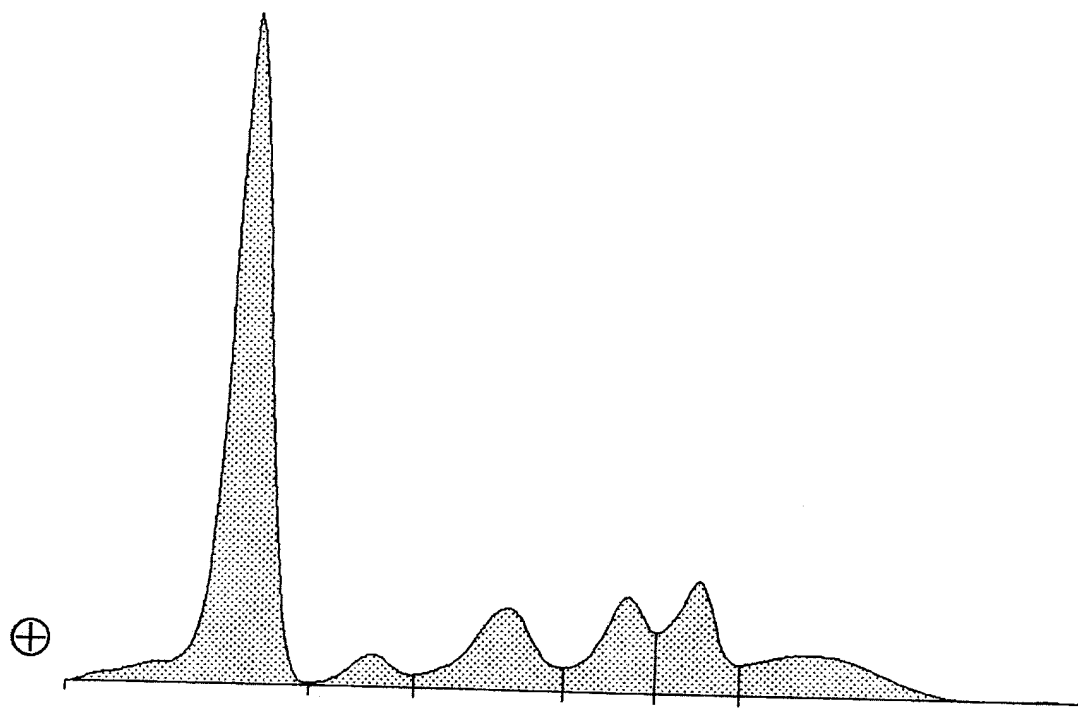


Fig. 25.4: 0,66 mM vancomicina en P-Pool

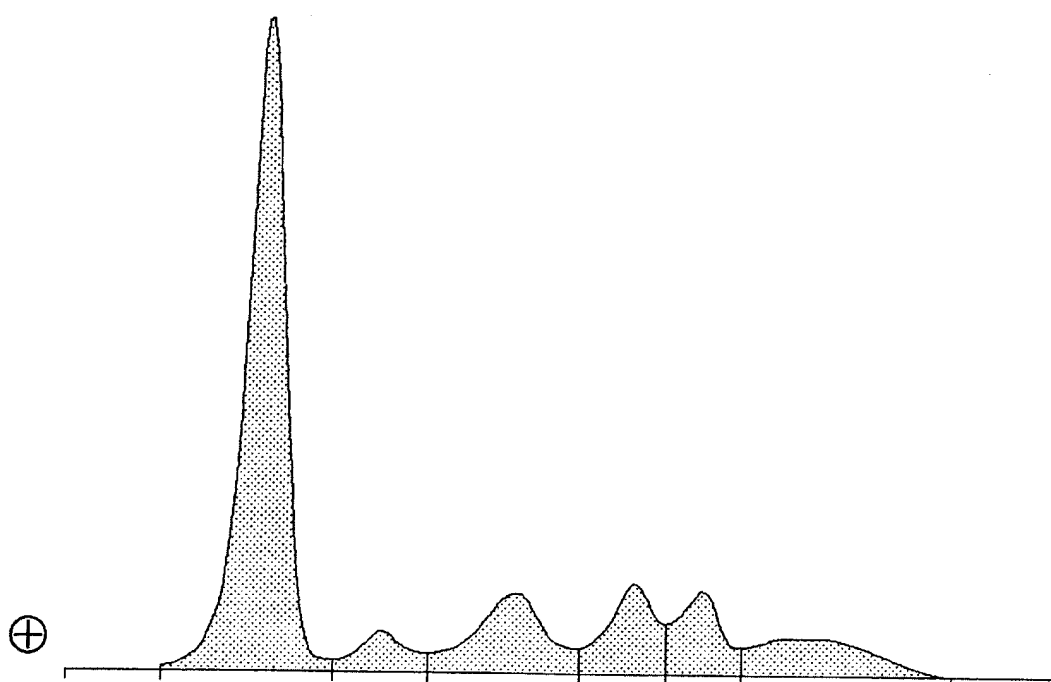


Fig. 25.5: 0,99 mM vancomicina en P-Pool

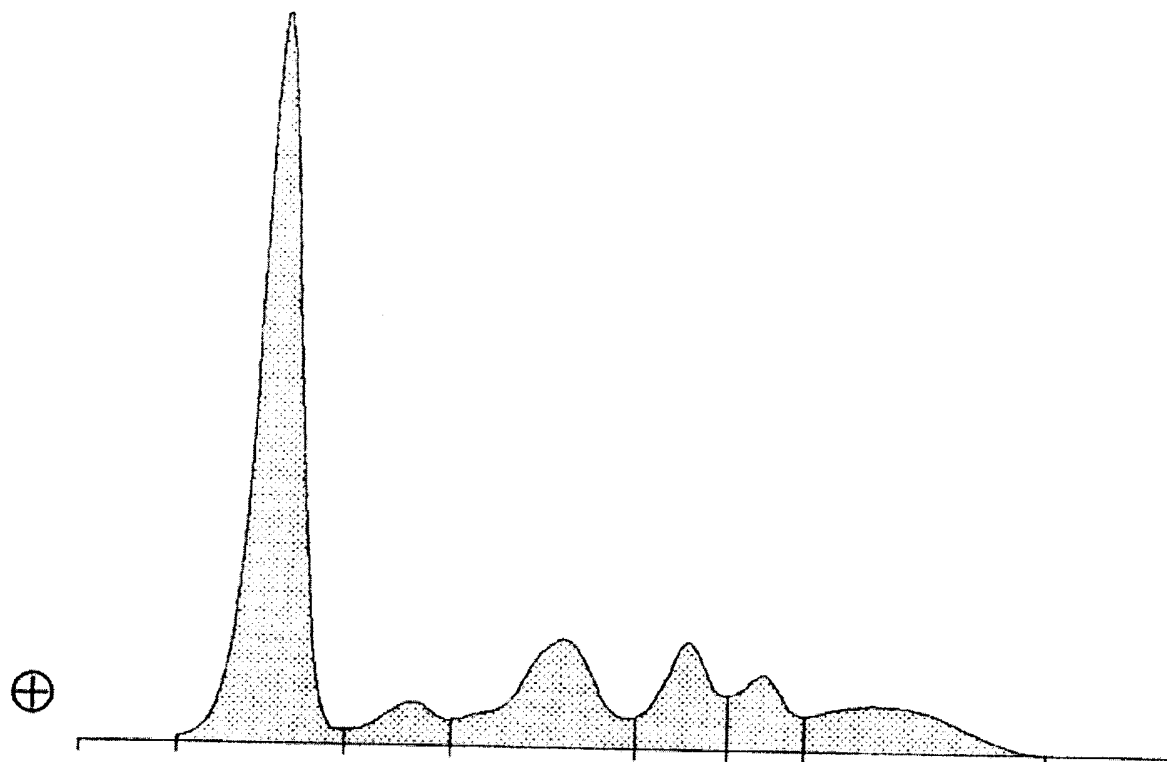


Fig. 25.6: 1,48 mM vancomicina en P-Pool

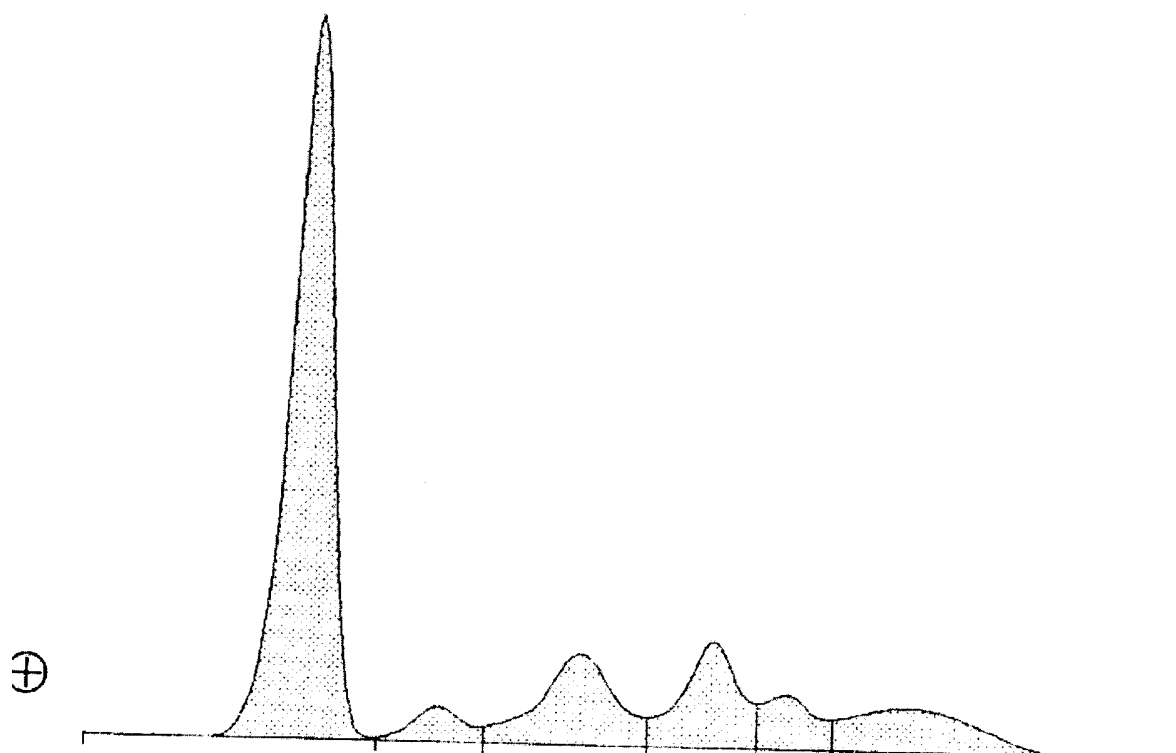


Fig. 25.7: 2,22 mM vancomicina en P-Pool

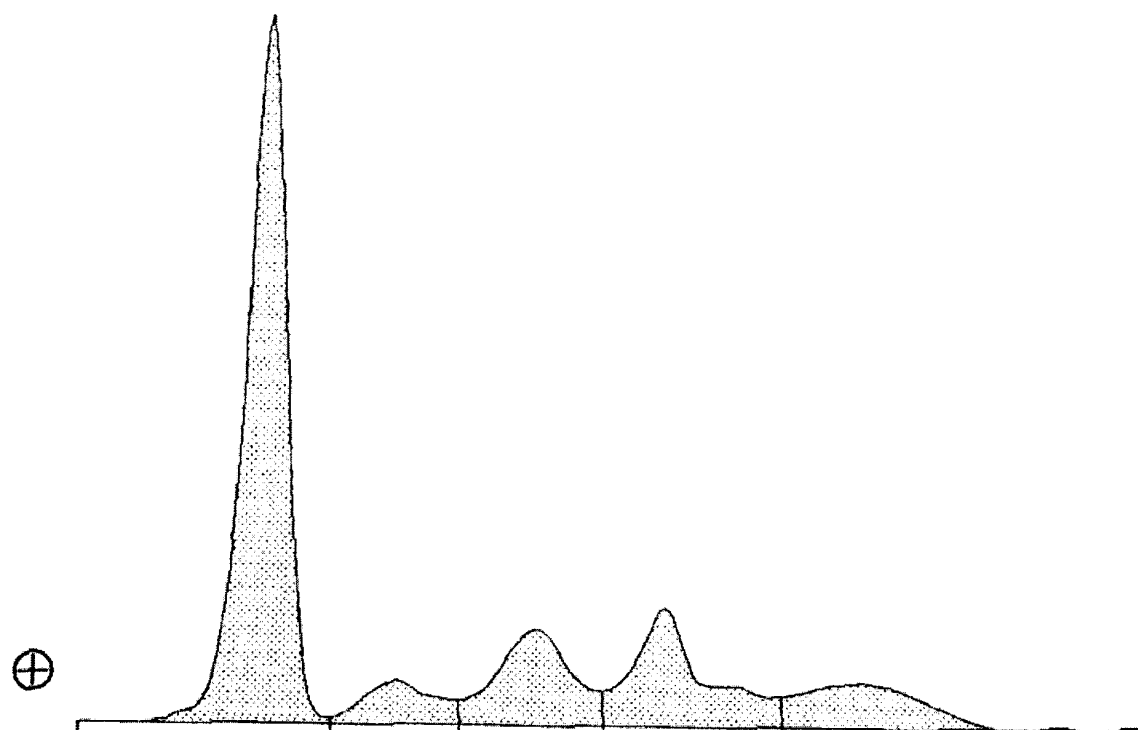


Fig. 25.8: 5 mM vancomicina en P-Pool

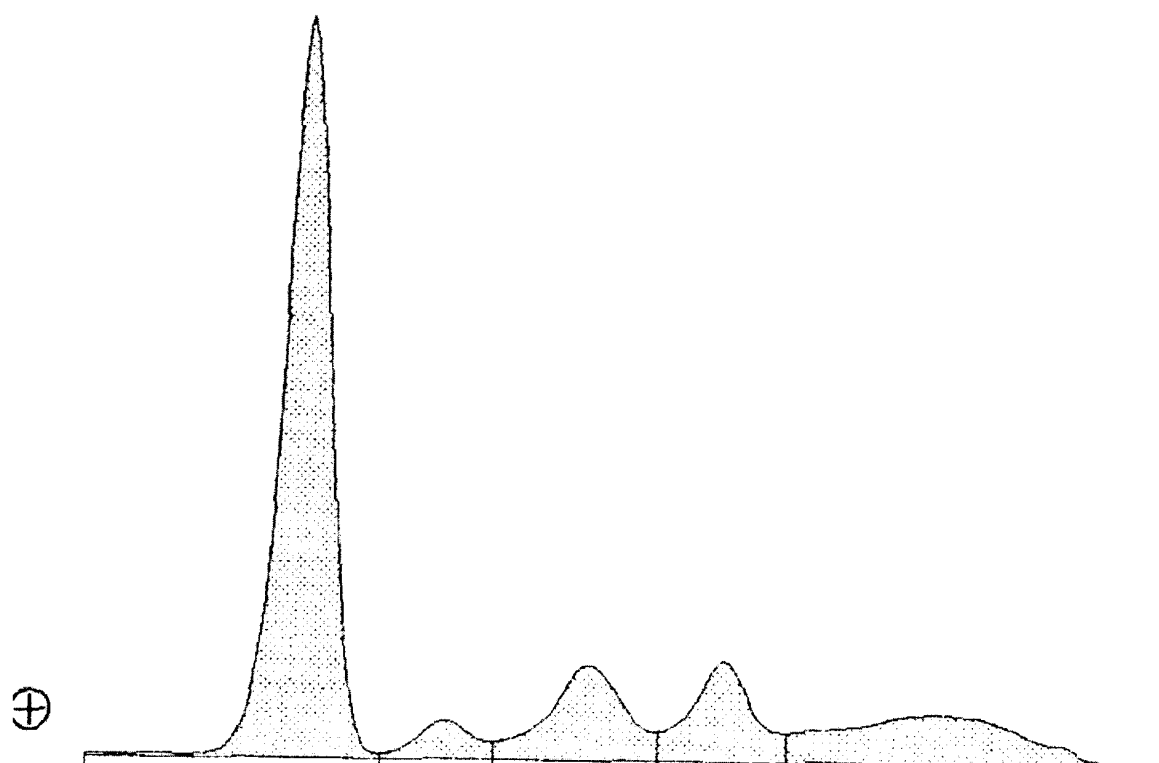


Fig. 25.9: 10 mM vancomicina en P-Pool

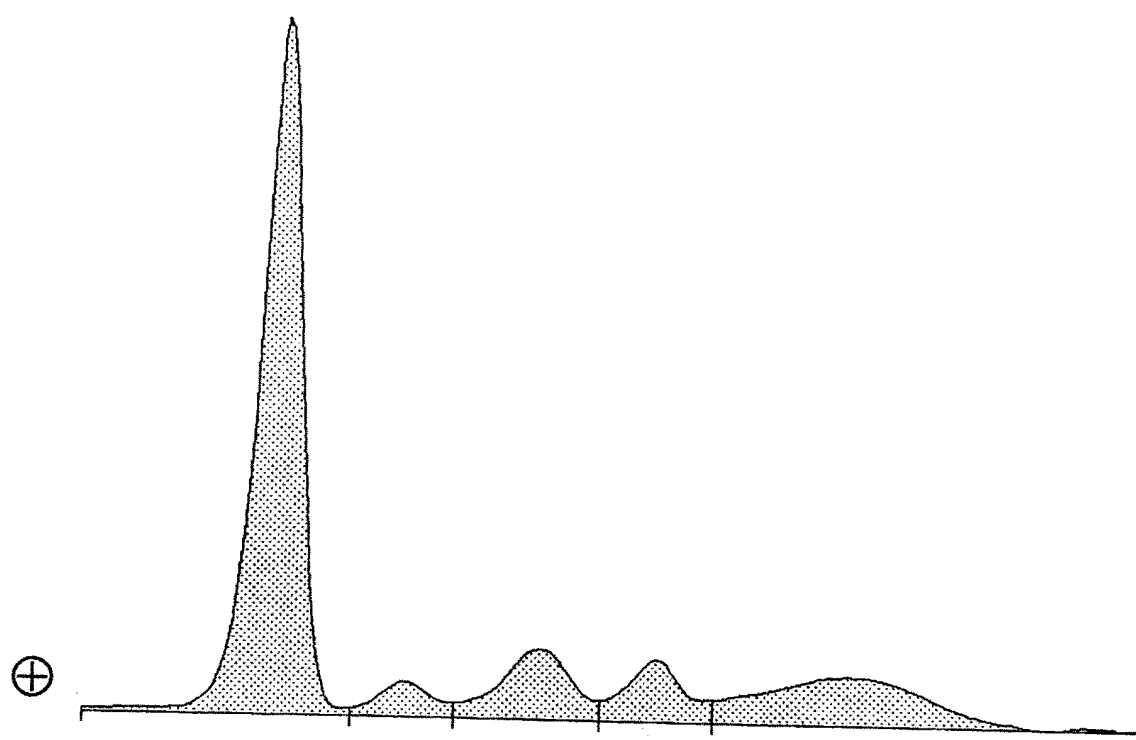


Fig. 25.10: Precipitado que ha sido disuolvido de nuevo; sin lavar

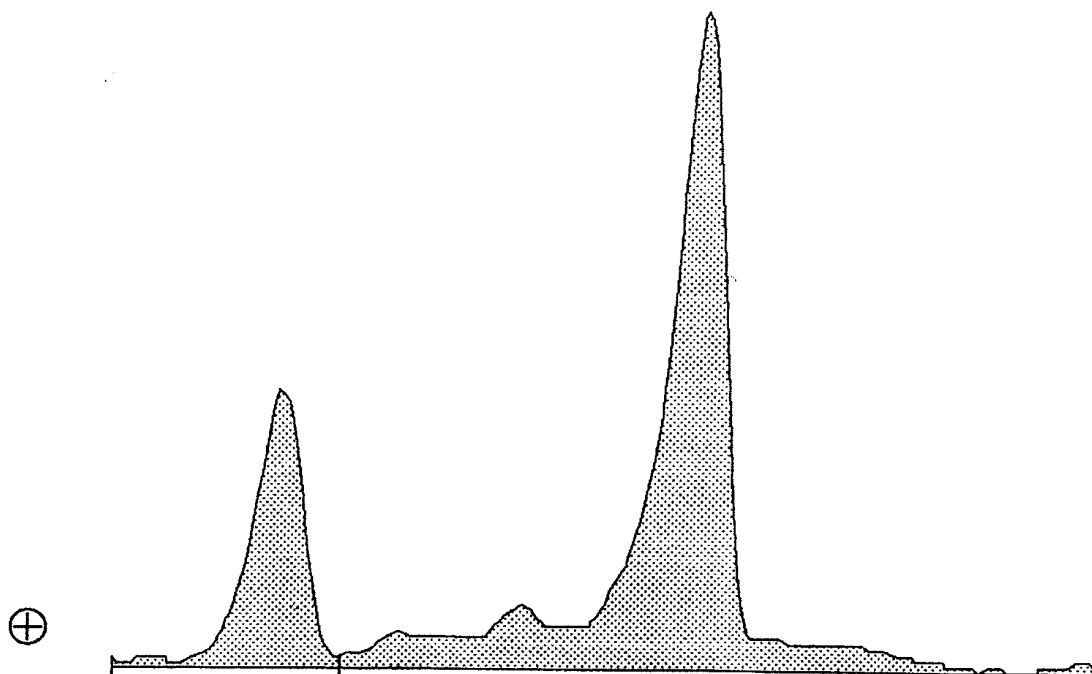


Fig. 25.11: Precipitado de Fig. 25.10 que ha sido lavado tres veces

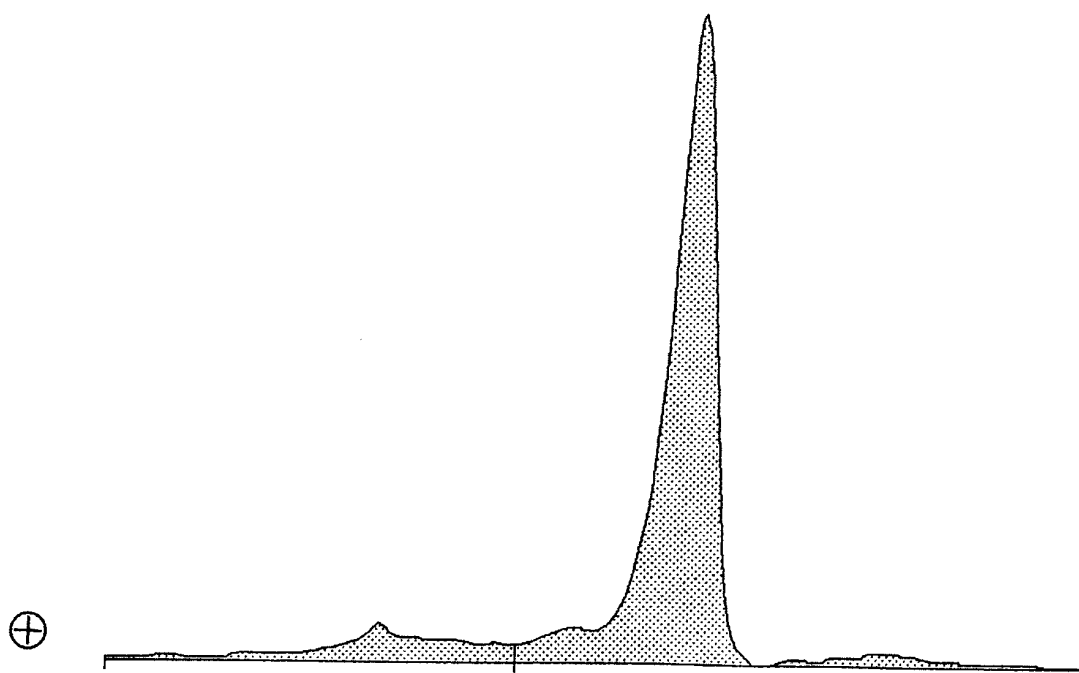


Fig. 26a: Fibrinógeno-reactividad en plasma precipitado por vancomicina

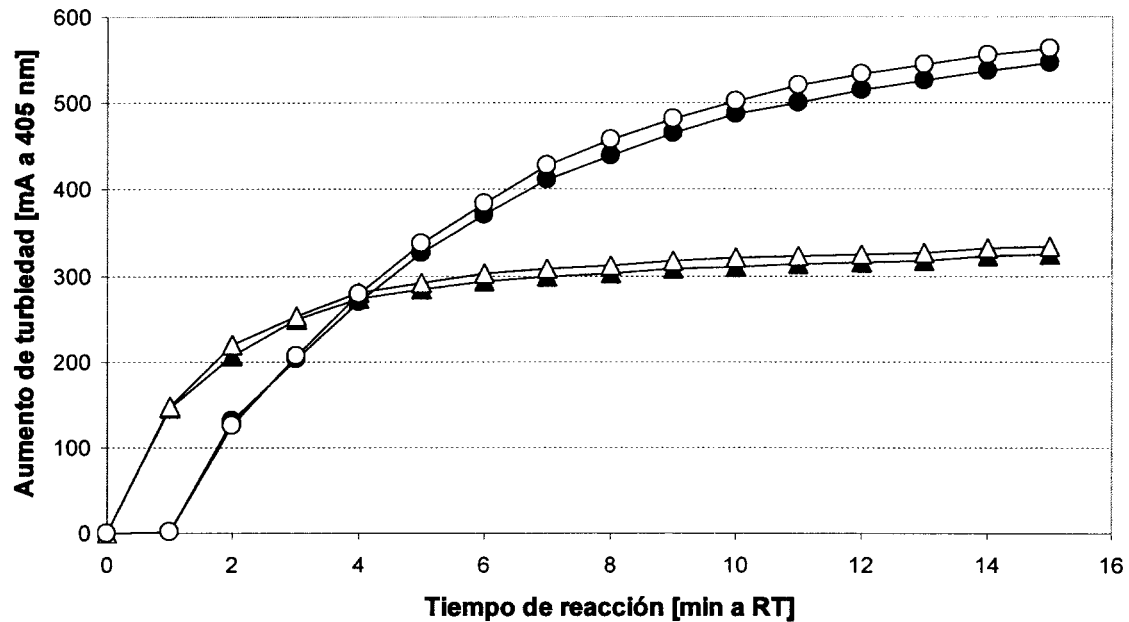


Fig. 26b: Fibrinógeno-reactividad en plasma precipitado por vancomicina

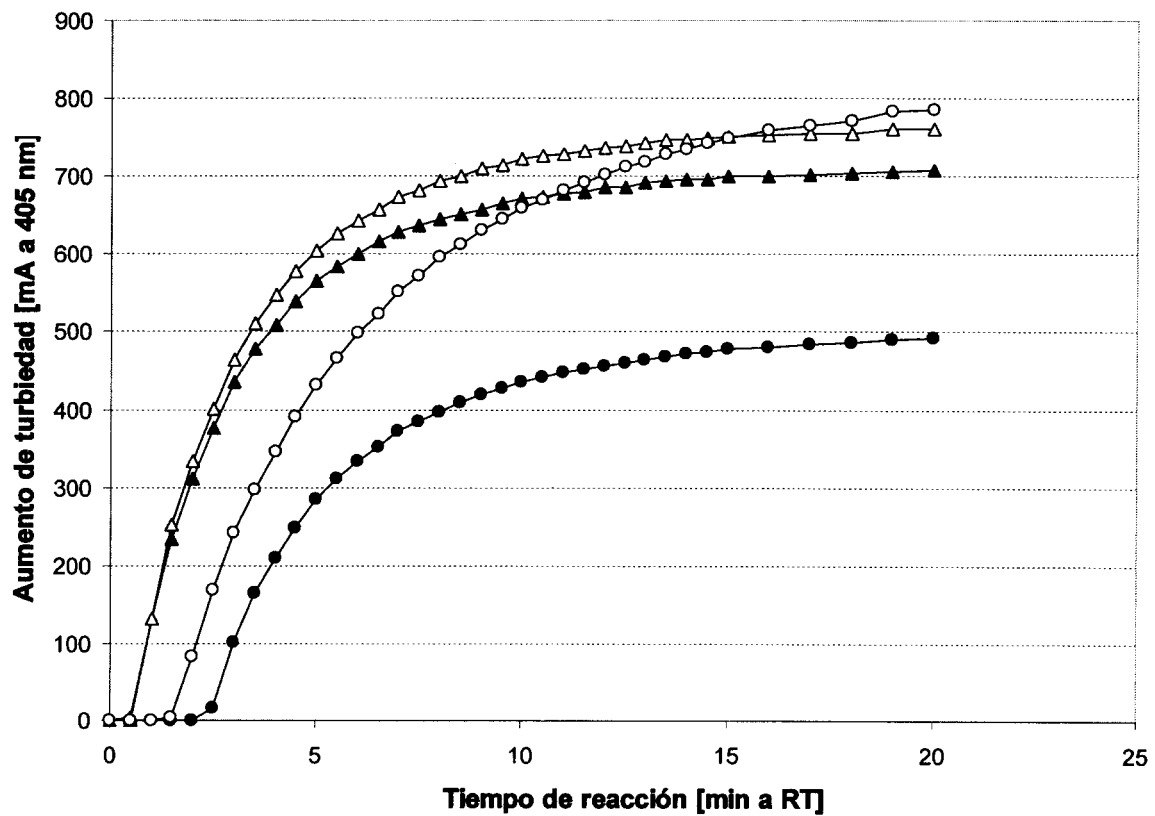


Fig. 26c: Fibrinógeno-reactividad en plasma precipitado por vancomicina

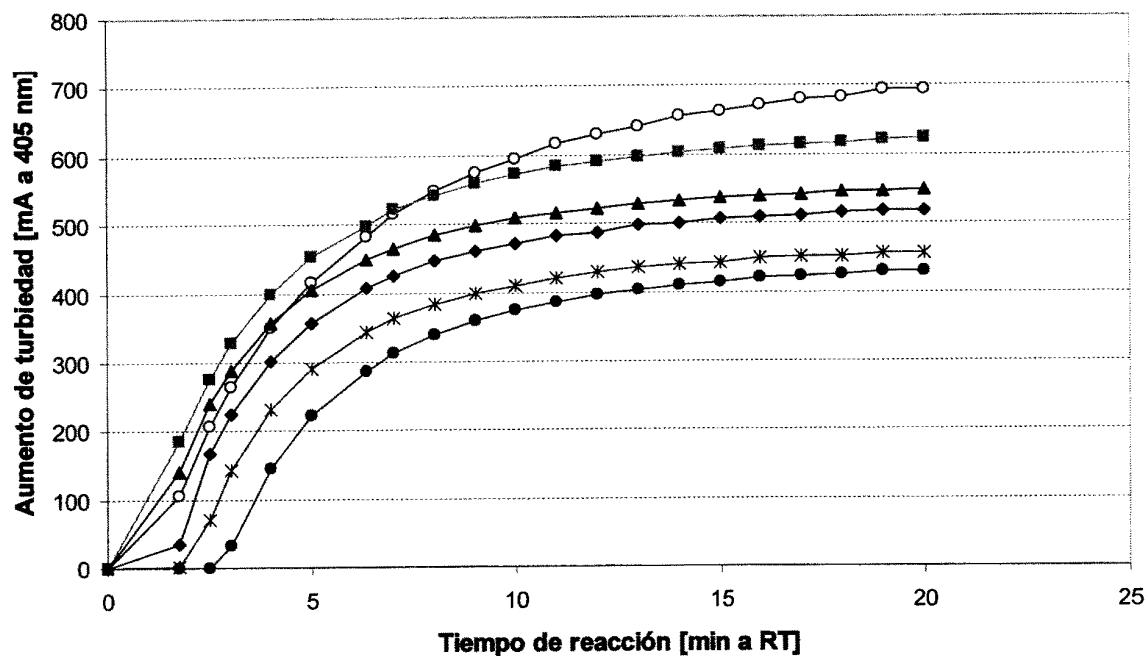


Fig. 27a: Estimulación de t-PA por fibrinógeno que fue precipitado por vancomicina

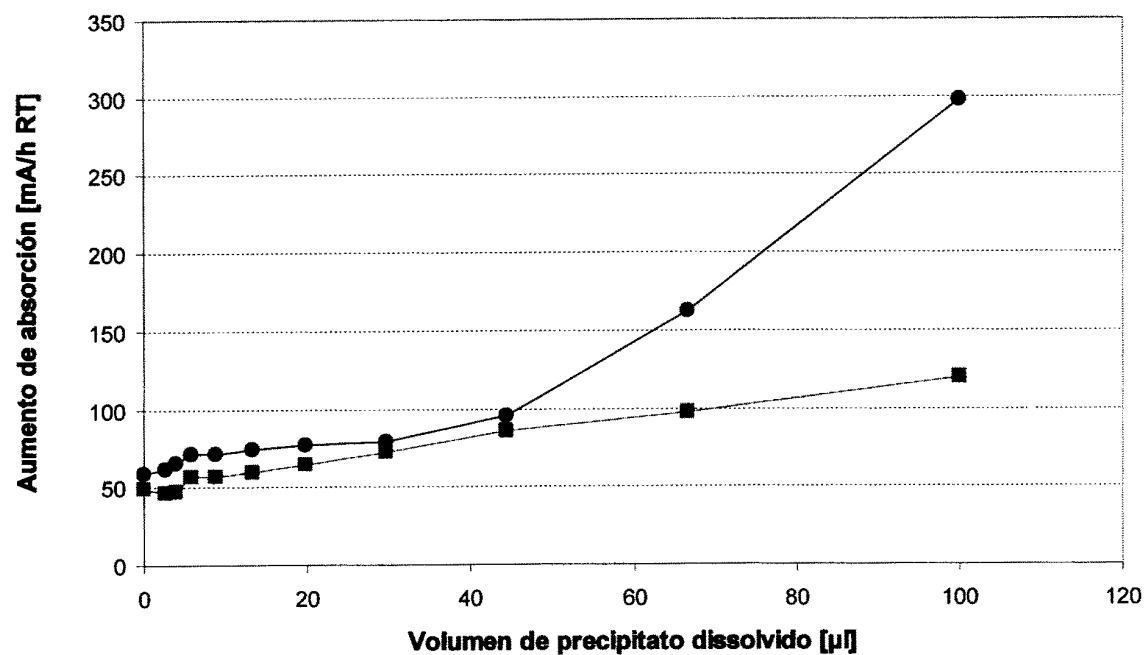


Fig. 27b: Estimulación de t-PA por plasma precipitado por vancomicina

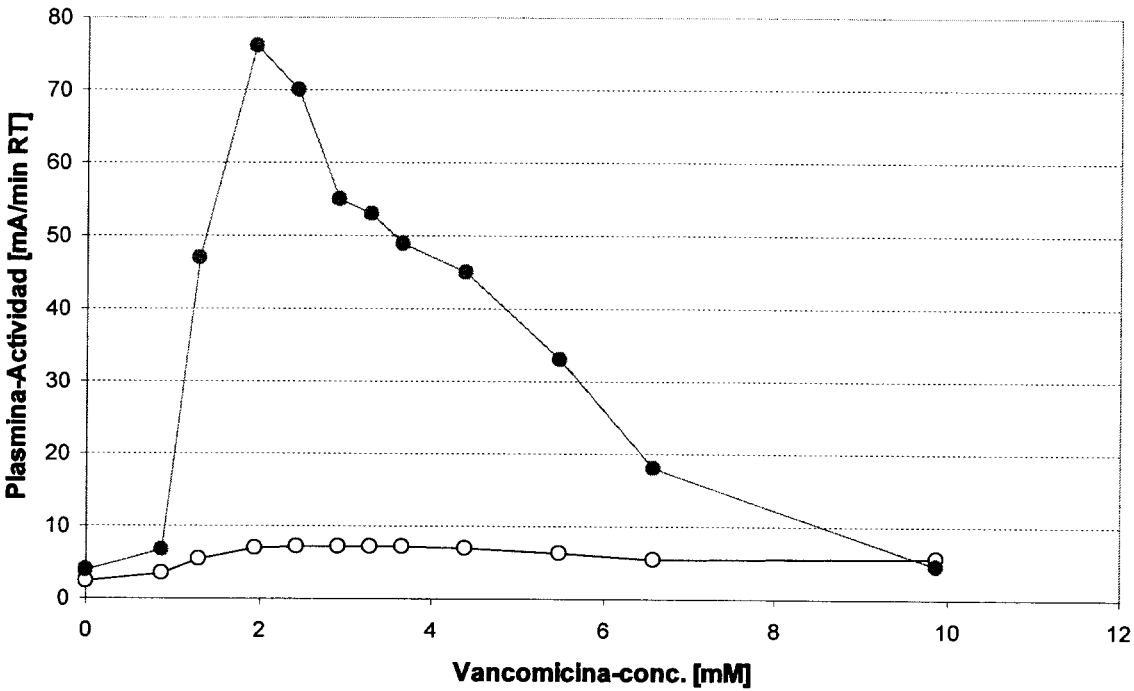


Fig. 27c: Estimulation de t-PA por plasma precipitado por vancomicina

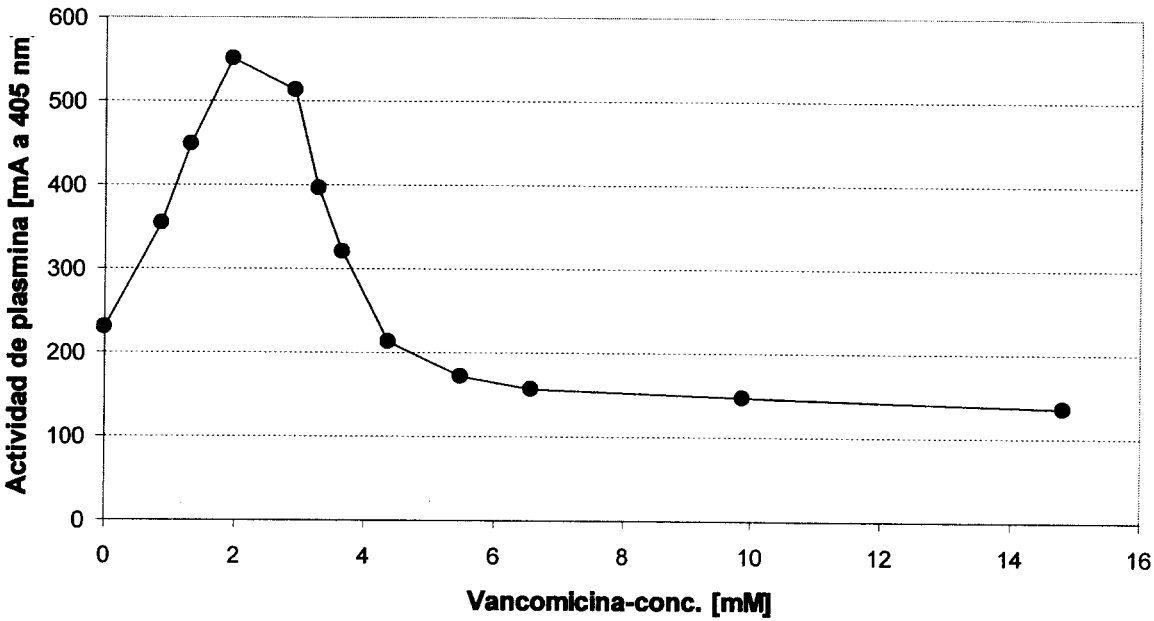


Fig. 28: Vancomicina-reactividad con plasma oxidado

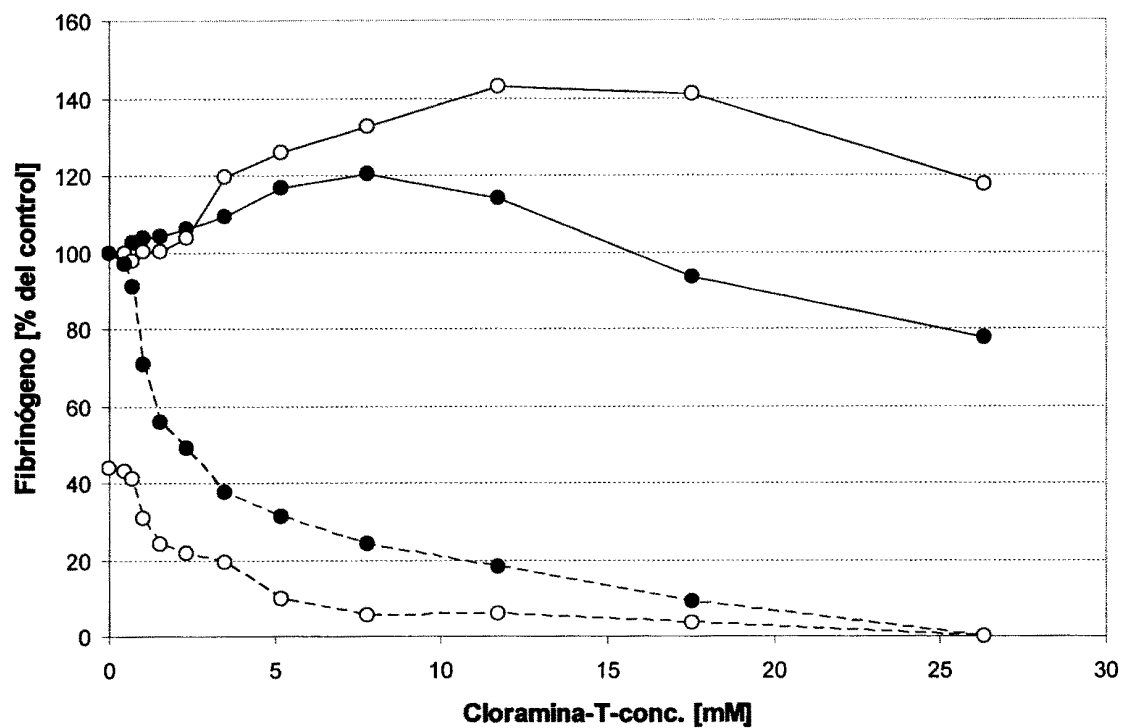


Fig. 29: Vancomicina-reactividad en EDTA-plasma

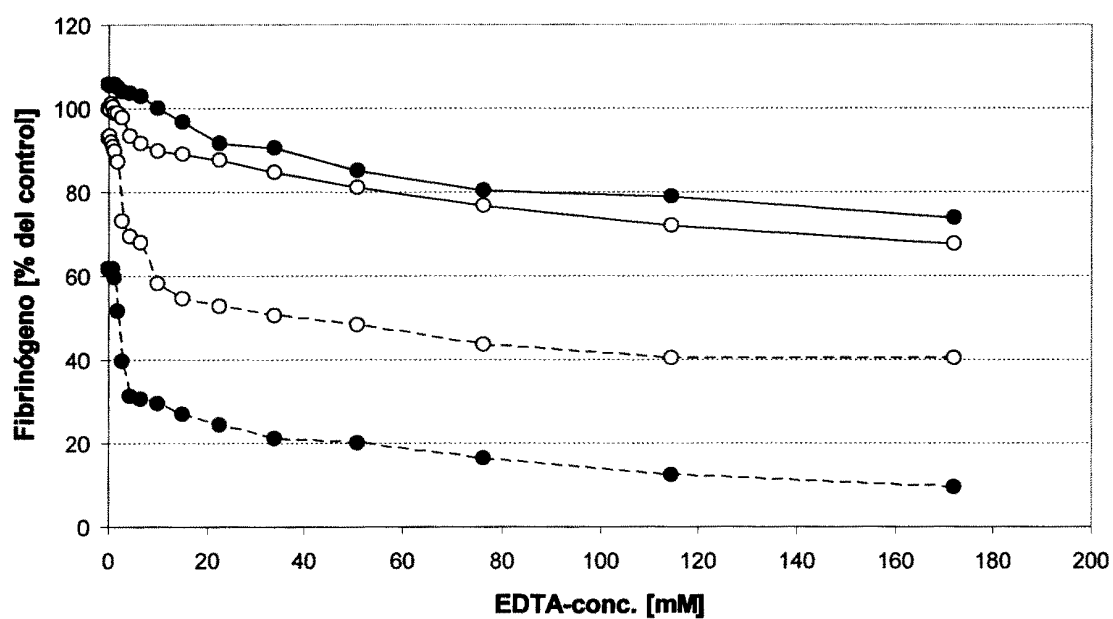


Fig. 30: Vancomicina-reactividad con plasma que fue incubado con t-PA

