

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 074**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05772105 .2**

96 Fecha de presentación: **20.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1779112**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54

Título: **Procedimiento para medir curvas de respuesta de dosis verdadera de calibración interna dinámica**

30

Prioridad:

**20.07.2004 CA 2475240**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

**18.12.2012**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**18.12.2012**

73

Titular/es:

**SQI DIAGNOSTICS SYSTEMS INC. (100.0%)  
36 METEOR DRIVE  
TORONTO, ON M9Q 1A4, CA**

72

Inventor/es:

**LEA, PETER;  
DE LEO, DOMENICA y  
LIU, JUN**

74

Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 393 074 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para medir curvas de respuesta de dosis verdadera de calibración interna dinámica

5 **Campo de la invención**

**[0001]** La invención se refiere a dispositivos de ensayo y a procedimientos de fabricación de dispositivos de ensayo para detectar la presencia de un analito en una muestra biológica y la cantidad del mismo.

10 **Antecedentes de la invención**

**[0002]** Las normas de calidad de los inmunoensayos se han establecido tradicionalmente mediante normas de referencia de calibración externa. Los procedimientos de análisis actuales de los ensayos de inmunodiagnóstico típicos proporcionan resultados de prueba de diagnóstico basados en mediciones de referencia estándar externa generalmente aceptadas. Se tiene constancia de algunas discrepancias conocidas, como los errores de cuantificación inducidos cuando se llevan a cabo los ensayos, dando lugar a variaciones en los resultados de las pruebas. Por ejemplo, el concepto de sensibilidad del ensayo tiene como objetivo caracterizar la sensibilidad mediante un análisis estadístico clásico basado en mediciones repetitivas de muestras de baja concentración para confirmar que el resultado de la muestra no es estadísticamente diferente de cero. Puesto que el error estándar producido es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del número de mediciones reales, este procedimiento no mide realmente la sensibilidad del ensayo intrínseca. Un mayor refinamiento ha producido algunas mejoras. Conocida en la técnica como sensibilidad analítica, el estándar cero se mide varias veces y el límite de sensibilidad pasa a ser una concentración igual a desviaciones típicas (SD) de entre 2 y 3 con respecto a la media (M). Sin embargo, la precisión de esta determinación teórica puede ser incorrecta en un orden de magnitud. El ajuste concomitante de cualquier curva de calibración externa derivada no crea una curva de respuesta de dosis dinámica de valor verdadero que pueda dar lugar a un error considerable en la sensibilidad real.

**[0003]** Para medir adicionalmente la precisión de tal medición analítica, la precisión se utiliza para definir el grado de aproximación del valor medido medio con respecto al valor verdadero. La diferencia en la medición se conoce como el sesgo o grado de precisión. El sesgo puede variar en el intervalo del ensayo. Existe una necesidad en la técnica de desarrollar procedimientos para medir este valor verdadero.

**[0004]** La repetibilidad de un ensayo o el error estimado en un ensayo analítico se conoce en la técnica como el coeficiente de variación porcentual (%CV). Las máquinas de análisis de ensayo automáticas pueden verse afectadas por variaciones en la concentración de la muestra, por los efectos de temperatura, calor y borde, por la suspensión incompleta de partículas y por la precipitación en fase sólida. Los efectos en la precisión también se deben a la separación en fracciones y a errores de cálculo. En los sistemas ópticos, el error se debe a los efectos de turbidez, a la presencia de fluoróforos, al deterioro de las lámparas y de los detectores y al deterioro, en el tiempo, de los reactivos. Generalmente, estos factores dan lugar a importantes reducciones en la relación de señal a ruido. Los errores de manipulación mecánica pueden deberse a un mal pipeteado y a periodos de inactividad de los instrumentos.

**[0005]** Como resultado directo, la evaluación de la precisión de cualquier procedimiento analítico requiere la medición de la variabilidad resultante en concentraciones conocidas y relevantes utilizando disoluciones de control definidas o estándar para crear normas de calibración de línea de base. La determinación precisa de tales calibradores se basa en mediciones de concentraciones conocidas en series de diluciones a intervalos predeterminados, las cuales se interpolan posteriormente. Existen disoluciones de referencia o normas de referencia disponibles comercialmente, así como preparadas en laboratorios, pero normalmente calibradas con matrices estándar o combinadas, las cuales pueden variar considerablemente con respecto a muestras de prueba de pacientes reales. Parte de la solución para vencer estos errores es representar gráficamente la precisión contra un amplio intervalo de concentraciones para obtener un perfil de precisión, o calibración, del ensayo.

**[0006]** Se ha comprobado que la reactividad cruzada, la especificidad del ensayo, las interferencias que provocan sesgos, alteraciones en los antígenos, los anticuerpos, los sitios de unión, los efectos de gancho de baja dosis (ensayo competitivo) y de alta dosis (ensayo sándwich), las interferencias de anticuerpos heterófilos, los autoanticuerpos perturbadores endógenos, el factor de complemento, el factor reumatoide, las interferencias en las uniones de anticuerpos en fase sólida, las sustancias que generan señales endógenas, los inhibidores de enzimas, los catalizadores y los cofactores tienen una actividad perturbadora en los ensayos, incluyendo reactividad cruzada, efectos matriciales y el arrastre de la muestra en instrumentos y muestreadores de inmunoensayos automatizados.

**[0007]** Para aplicaciones de diagnóstico, las muestras de control de calidad pueden no reflejar las concentraciones clínicas reales del paciente, y pueden no reflejar el espectro de los analitos presentes y las interferencias con la matriz de muestras hasta no reflejar más el contenido de las muestras del paciente. Las muestras de control de calidad pueden medir el rendimiento en intervalos de concentración discrepantes que pueden no reflejar puntos de decisión clínicos.

**[0008]** El documento WO03/025573 desvela un dispositivo de ensayo en fase sólida para determinar los analitos de una muestra acuosa, utilizándose el dispositivo en ensayos inmunocromatográficos. El dispositivo comprende una matriz de flujo alargada que permite el transporte lateral de fluido a través de la misma, presentando la matriz una zona de aplicación de muestras y, aguas abajo de la misma, una zona de detección de múltiples puntos con agentes de captura inmovilizados que pueden unirse directa o indirectamente a los analitos.

**[0009]** El documento WO99/36777 desvela un dispositivo de matriz de flujo y un procedimiento asociado para determinar un analito en una muestra utilizando reacciones de afinidad bioespecíficas. El procedimiento incluye determinar una señal detectable de un reactivo unido al analito y comparar la señal con uno o más valores de calibrador, cada uno de los cuales corresponde a una cantidad de analito estándar. El dispositivo de matriz de flujo incluye una o más zonas a las que está unido el calibrador.

**[0010]** El documento "Frontiers in Bioscience 7: c13-32 de Stoll et al, 2002, es un análisis de la tecnología de micromatriz de proteínas. El documento desvela en la Figura 5 que diferentes proteínas marcadas de manera fluorescente pueden detectarse y cuantificarse en paralelo utilizando ensayos basados en micromatrices. Las moléculas de captura específicas inmovilizadas en un formato de micromatriz unen sus respectivas proteínas objetivo presentes en la disolución circundante. Varios tipos de puntos de control, tales como puntos de control positivos y negativos, y/o puntos de calibración internos, pueden estar incluidos en cada micromatriz.

**[0011]** >

**[0012]** Por lo tanto, existe la necesidad de un inmunoensayo que pueda calibrarse de manera fiable.

### **Resumen de la invención**

**[0013]** La invención se refiere a un procedimiento para determinar una cantidad de un analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar un dispositivo de ensayo de chip que presenta una superficie, teniendo impresa dicha superficie en la misma una micromatriz, comprendiendo dicha micromatriz una pluralidad de puntos de calibración y al menos un punto de prueba, incluyendo los puntos de calibración diferentes cantidades predeterminadas del analito, proporcionando dichas cantidades predeterminadas del analito una concentración de analito en los puntos de calibración que corresponde a un intervalo dinámico del analito, incluyendo el punto de prueba una pluralidad de anticuerpos de captura que se unen a dicho analito, estando separados dichos anticuerpos de captura por una proteína no reactiva;

- proporcionar una única disolución premezclada que incluye un anticuerpo que se une específicamente al analito, marcándose dicho anticuerpo con un marcador detectable;

- introducir la muestra en dicha disolución para formar una disolución de muestra;

- introducir dicha disolución de muestra en dicho dispositivo de ensayo de chip;

- medir una intensidad de marcador detectable en dichos puntos de calibración;

- preparar una curva de calibración que correlaciona la cantidad de analito en dichos puntos de calibración con dicha intensidad de marcador detectable;

- medir una intensidad de marcador detectable en dicho al menos un punto de prueba; y

- calcular una cantidad de analito presente en dicho al menos un punto de prueba comparando la intensidad del marcador detectable con la cantidad de analito correspondiente a dicha intensidad en dicha curva de calibración.

**[0014]** Características adicionales de la invención se describen en las reivindicaciones adjuntas.

**[0015]** El procedimiento proporciona un análisis cuantitativo que se lleva a cabo rápidamente utilizando un único dispositivo de ensayo con la capacidad de contener un volumen mínimo conocido de fluido de prueba y que también tiene la capacidad de hacer fluir el fluido a través del dispositivo con el fin de obtener una concentración de analito conocida en función de la concentración de analito por volumen probado. Tanto los puntos de calibración como los puntos de prueba están impresos en un único dispositivo de ensayo, el cual solo necesita posteriormente la aplicación de una única disolución premezclada que contiene el analito y un exceso de reactivo de detección, el cual es un anticuerpo.

**[0016]** La invención contempla un procedimiento para obtener curvas de respuesta de dosis verdadera dinámica imprimiendo muestras de calibrador y de prueba en un dispositivo de plataforma de pruebas común. La

plataforma de pruebas tiene como mínimo un punto de prueba. Cada punto de prueba presente múltiples puntos de calibración correspondientes. La señal obtenida a partir del número total de puntos de calibración dinámica de concentración comparativa, en coordenadas X/Y indexadas, se integra para formar la curva de respuesta de dosis verdadera de calibración interna dinámica. En un proceso similar, la lectura de respuesta de marca de punto de pruebas desconocida también se integra en todas las lecturas obtenidas. La utilización de múltiples disposiciones o matrices de prueba en el formato de la plataforma implica un límite de confianza que se aproxima al cien por ciento si se obtiene el resultado de prueba correcto. La plataforma de pruebas común está expuesta al mismo fluido de prueba y, puesto que el calibrador y las muestras de prueba están expuestos simultáneamente al mismo fluido de prueba, se determina una medición precisa de la concentración de analito presente en la muestra de prueba mediante la curva de calibración de respuesta de dosis verdadera resultante. La invención proporciona el sorprendente resultado de que los diversos errores que se producen utilizando los procedimientos de la técnica anterior no se generan cuando una muestra de prueba se procesa con el procedimiento y dispositivo desvelados.

### **Breve descripción de los dibujos**

15

#### **[0017]**

La Figura 1 es una vista desde arriba de un dispositivo de ensayo de la presente invención para llevar a cabo una prueba con una matriz fija;

20

la Figura 2 es un gráfico que muestra una verificación de que puede cuantificarse un único y un grupo de complejos inmunológicos;

la Figura 3 es un gráfico que muestra que la concentración de antígenos en la muestra de prueba no afecta a la intensidad de fluorescencia de los puntos de calibración;

25

la Figura 4 es una ilustración de una impresión de matrices de puntos minúsculos, en la que se muestra el tamaño de los puntos y la disposición de las matrices;

la Figura 5 es un gráfico que muestra una correlación de una concentración de analitos con fluorescencia utilizando una medición de respuesta de dosis verdadera dinámica; y

30

la Figura 6 es una vista desde arriba de un dispositivo de ensayo para probar la presencia de una respuesta de anticuerpos respectivos a microorganismos que han estado presentes en un plasma humano.

35

### **Descripción detallada de la invención**

**[0018]** El presente procedimiento es para calibrar un dispositivo de ensayo. Un dispositivo de ensayo preferido se muestra en la Figura 1. El dispositivo de ensayo tiene una superficie de ensayo 10 que incluye preferentemente un área de carga 18 y un área de lectura 16. El área de lectura 16 tiene impresa en la misma al menos uno y preferentemente al menos dos puntos de prueba 20. Más preferentemente, una pluralidad de puntos para detectar la presencia del analito están impresos en el área de lectura 16. Los puntos de prueba 20 incluyen un reactivo que se une específicamente al analito de proteína. Preferentemente, el reactivo está unido a anticuerpos que se unen específicamente al analito. También pueden utilizarse otros reactivos conocidos en la técnica para unirse a un analito específico. En el ámbito de la presente descripción, el reactivo se denominará como un anticuerpo.

40

45

**[0019]** Los anticuerpos unidos se separan preferentemente para hacer que cada anticuerpo unido se una al antígeno de prueba libre de impedimentos estéricos de complejos de antígenos adyacentes. Una proteína no reactiva separa los anticuerpos unidos en los puntos de prueba.

50

**[0020]** El área de lectura 16 presenta puntos de calibración 22 impresos en la misma. Los puntos de calibración incluyen una cantidad predeterminada de dicho analito para reaccionar con un reactivo no reaccionado en un recipiente, conjugado con un marcador detectable. Los puntos de calibración permiten correlacionar la intensidad de la marca con la cantidad del antígeno presente. La intensidad de la marca en los puntos de prueba puede utilizarse para obtener la cantidad de antígeno presente.

55

**[0021]** Los puntos de calibración tienen una concentración del analito correspondiente a un intervalo dinámico del analito. El intervalo dinámico es la concentración de analito hallada normalmente en el paciente. La cuantificación debe estar comprendida entre esta baja y alta concentración y estar relacionada con las concentraciones clínicamente relevantes.

60

**[0022]** Muchos de los problemas asociados a los procedimientos actuales típicos de los inmunoensayos se deben a que la calibración del ensayo se determina introduciendo muestras de referencia estándar externas para la calibración. El presente procedimiento proporciona resultados más precisos sin utilizar estas muestras de calibración externa estándar.

65

**[0023]** En el desarrollo de un dispositivo de plataforma para medir la cantidad de un analito respectivo, en lugar de utilizar normas externas para generar una calibración de línea de base, los puntos de calibración y los puntos de prueba en concentraciones desconocidas se imprimen en la misma plataforma de pruebas. Los puntos de prueba de calibración se imprimen en concentraciones de analito conocidas. Los puntos de prueba también se imprimen en ubicaciones X-Y predeterminadas, que contienen solamente un reactivo de captura que es preferentemente un anticuerpo específico para el analito que está investigándose. La muestra de prueba se conjuga después con un exceso de reactivo marcador, el cual es preferentemente un anticuerpo, y con el analito. El anticuerpo marcador se ha conjugado anteriormente con una marca fluorescente respectiva que emite una longitud de onda adecuada (por ejemplo, 650 nanómetros). El complejo anticuerpo/antígeno marcador, así como el anticuerpo marcador libre restante se hacen fluir después por la plataforma de pruebas mediante un flujo laminar. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que también pueden utilizarse otros dispositivos de ensayo que no se basen en un flujo laminar. Por ejemplo, para los fines de la presente invención también puede utilizarse un dispositivo de ensayo en forma de un recipiente en el que el complejo anticuerpo/antígeno, así como el anticuerpo marcador libre restante, se desplazan a través del dispositivo mediante cinética limitada de difusión.

**[0024]** De esta manera, el anticuerpo marcador y la concentración desconocida de complejos de antígeno se unen mediante los puntos de prueba de anticuerpos de captura, mientras que los anticuerpos marcadores libres se unen a los puntos de antígenos preimpresos en concentraciones conocidas. Tanto los puntos de prueba de concentración desconocida que va a medirse como los puntos de calibración de concentraciones conocidas que abarcan el intervalo dinámico del analito se exponen al mismo tiempo a la misma muestra de fluido de prueba. El flujo laminar acerca de manera eficaz los componentes de analito a los respectivos sitios de unión para favorecer una cinética de adhesión óptima para las constantes de asociación respectivas.

**[0025]** La plataforma de pruebas se examina en un lector para determinar las concentraciones respectivas de marcas fluorescentes acopladas a los puntos de la plataforma cuando se activan mediante una irradiación de longitud de onda adecuada. Los puntos de calibración, impresos originalmente de manera preferible hasta en diez concentraciones de analito diferentes, dan como resultado la producción de una curva de respuesta de dosis verdadera interna dinámica que proporciona una referencia de calibración muy precisa para el ensayo. La lectura de intensidad obtenida a partir de los puntos de prueba de concentración desconocida se compara con esta línea de calibración. Las concentraciones de prueba desconocidas se interpolan de manera precisa y eficiente en la calibración de respuesta de dosis verdadera interna dinámica obtenida a partir de los puntos de calibración conocida.

**[0026]** Cada dispositivo de ensayo probado proporciona resultados similarmente precisos y reproducibles que confirman que el presente procedimiento de calibración dinámica en plataforma proporciona una determinación precisa, mejorada y sensible de un analito en ensayos cuantitativos y cualitativos con fines de diagnóstico y para la detección de analitos en un uso clínico para personas y animales. Este beneficio inmediato y significativo demuestra que estos ensayos, cuando se procesan utilizando el procedimiento descrito (*Dynamic Internal Calibration*<sup>TM</sup>), no reflejan los errores descritos relacionados con otros procedimientos actuales que llevan a cabo estos ensayos utilizando al mismo tiempo normas de calibración obtenidas de manera externa.

**[0027]** La capacidad de calibrar y probar de manera simultánea también mejora el nivel de confianza garantizando que las medidas obtenidas son verdaderas. La metodología de la presente invención permite llevar a cabo varias pruebas de analito diferentes en el mismo dispositivo de ensayo al mismo tiempo. Varios conjuntos de puntos de prueba o de matrices de prueba para probar diferentes analitos así como múltiples conjuntos de puntos de calibración o de matrices de calibración correspondientes para los diferentes analitos pueden hacerse funcionar en el mismo dispositivo de ensayo al mismo tiempo. Con el fin de superar el nivel de confianza del 99% para una prueba, la prueba debe llevarse a cabo un mínimo de tres veces. Múltiples paneles de diferentes pruebas también pueden utilizarse y hacerse funcionar, todas al mismo tiempo, en una única plataforma de pruebas. Los sorprendentes resultados de la presente invención prueban que los errores de las pruebas se eliminan, la reproducibilidad se mejora, el intervalo dinámico para cualquier prueba se extiende fácilmente para cubrir un intervalo de concentración de analito requerido, y la sensibilidad y el coeficiente de varianza se mejora considerablemente. La combinación de estas ventajas en comparación con el estado de la técnica anterior también da como resultado un considerable ahorro de tiempo cuando se comprueban los resultados. Una ventaja importante es que el formato de la presente invención es independiente del dispositivo y puede aplicarse por los expertos en la materia.

**[0028]** El dispositivo y el procedimiento de ensayo descritos representan de manera eficaz un procedimiento novedoso, cuantitativo y rápido para la determinación precisa de concentraciones de analito y/o de marcadores, normalmente para marcadores clínicos de diagnóstico asociados con procesos de enfermedades. El beneficio inmediato de la medición rápida y precisa de la concentración de marcadores permite una detección rápida y dinámica de concentraciones de marcadores como un indicador de un proceso de enfermedad tal como una concentración creciente, constante o decreciente, así como una supervisión rápida y cuantitativa de la eficacia de un fármaco en la modificación de expresiones de genes para la producción de proteínas marcadoras específicas para indicar la eficacia de un fármaco.

**Ejemplos****Ejemplo 1: Inmunoensayo fluorescente cuantitativo**

5 [0029] La matriz de inmunoensayo de sándwich incorpora un anticuerpo de captura específico para el antígeno de interés y un anticuerpo secundario conjugado fluorescente para la detección de analitos y complejos inmunológicos. La gonadotropina coriónica humana (HCG), un indicador de embarazo en personas, se utilizó como antígeno para probar este ensayo de plataforma. Actualmente, el intervalo analítico dinámico de esta prueba está  
10 comprendido entre 1 y 150 fmol/uL (entre 280 y 37.600 mIU/mL) con un volumen de ensayo de 5  $\mu$ L. La comparación entre la concentración de HCG calculada utilizando el dispositivo en comparación con concentraciones de HCG conocidas tiene una coherencia excelente entre los valores (Figura 2,  $y=1,0717x + 9,9313$ ) y una alta correlación entre valores promedio para cada concentración probada ( $r = 0,9786$ ). La Figura 2 es un gráfico que muestra la confirmación de que un único y varios complejos inmunológicos proporcionan una fluorescencia  
15 cuantificable cuando se unen a la plataforma del dispositivo.

**Ejemplo 2: Medición de fluorescencia de puntos de antígenos a varias concentraciones de antígeno de muestra**

20 [0030] El principio de ensayo se basa en inmunoensayos cuantitativos, no competitivos y heterogéneos. En primer lugar, los dispositivos de generación se imprimieron con una serie de puntos de antígeno en concentraciones decrecientes para una autocalibración de curva estándar seguidos de puntos de anticuerpos de captura. La muestra de prueba que contenía el antígeno se procesó con un anticuerpo de detección de liofilizado ya conjugado con el  
25 indicador o tinte respectivo. La muestra de prueba reaccionó con la marca durante 2 minutos y después se dispuso en el dispositivo de ensayo de chip para introducirse en el lector. Se midió la intensidad de fluorescencia de cada punto. El software del lector comparó la fluorescencia de los puntos de anticuerpos de captura que tenían una concentración de antígenos desconocida con los de la curva estándar de respuesta de dosis verdadera que tenía concentraciones conocidas y calculó la concentración del antígeno de prueba. La Figura 3 es un gráfico que muestra  
30 datos que confirman que la concentración de antígenos en la muestra de prueba no afecta a las intensidades de fluorescencia de los antígenos en los puntos de calibración.

**Ejemplo 3: Impresión de matrices avanzada en la plataforma del dispositivo de ensayo**

[0031] En la Figura 4 se muestran cuatro matrices 10 x 10 que contienen 100 puntos de prueba, utilizando un  
35 área de plataforma de 2,6 mm x 2,6 mm. La separación entre los centros de cada punto es de 260  $\mu$ m. El número de gotitas dispensadas por punto aumenta de 1 a 4 gotitas por punto y por matriz. El área de lectura total del dispositivo de ensayo de chip fue de 8000  $\mu$ m x 10000  $\mu$ m. Este patrón de impresión permitió imprimir 1200 puntos en el área de lectura de la plataforma. Con un mínimo de 5 puntos por prueba, 3 para la calibración y 2 puntos de prueba, cada plataforma soporta 240 pruebas. Esta ventaja tecnológica permite una sensibilidad de detección de antígenos en  
40 fmol/ml y un mayor número de múltiples matrices de prueba para una confianza óptima en los resultados de diagnóstico al poder generar múltiples matrices de prueba necesarias para optimizar las curvas de calibración. La Figura 4 proporciona una ilustración de una tecnología de impresión avanzada de matrices de puntos minúsculos en la plataforma del dispositivo de ensayo de chip.

**Ejemplo 4: Correlación de la concentración de la hormona paratiroidea humana con la intensidad de fluorescencia calibrada utilizando una medición con matrices de respuesta de dosis verdadera**

[0032] Como se muestra en la Figura 5, se midieron concentraciones de la hormona paratiroidea humana para determinar la curva de calibración de respuesta de dosis verdadera interna dinámica. Las pruebas confirman  
50 que la respuesta de dosis verdadera se representó gráficamente de manera precisa en el intervalo dinámico probado.

**Ejemplo 6: Diseño de múltiples formatos cuando se prueba plasma humano con 12 anticuerpos diferentes como respuesta a haber quedado expuesto a 12 microorganismos**

55 [0033] Tal y como se muestra en la Figura 6, las matrices de prueba se imprimieron como matrices triplicadas en cuatro concentraciones para cada prueba, mientras que las matrices de calibración, en este caso para la inmunoglobulina IgG humana, se imprimieron en 6 concentraciones de manera triplicada. Se utilizó una matriz de 4 puntos x 5 puntos para medir la respuesta de la marca fluorescente (Dy647) en un formato de codificación binaria  
60 para confirmar la identidad de la plataforma de ensayo cuando se introdujo en un dispositivo de lectura.

[0034] Los expertos en la materia reconocerán, o podrán obtener utilizando solamente una experimentación rutinaria, muchas equivalencias a las realizaciones de la invención descrita anteriormente. Tales equivalencias están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar una cantidad de analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) proporcionar un dispositivo de ensayo de chip que presenta una superficie, teniendo impresa dicha superficie en la misma una micromatriz, comprendiendo dicha micromatriz una pluralidad de puntos de calibración y al menos un punto de prueba, incluyendo los puntos de calibración diferentes cantidades predeterminadas del analito, proporcionando dichas cantidades predeterminadas del analito una concentración de analito en los puntos de calibración que corresponde a un intervalo dinámico del analito, incluyendo el punto de prueba un primer reactivo que se une a dicho analito;
- 10 (b) proporcionar una disolución que comprende un segundo reactivo que se une específicamente al analito, marcándose dicho segundo reactivo con un marcador detectable y proporcionado en exceso en comparación con la cantidad de analito presente en la muestra y en dichos puntos de calibración;
- 15 (c) introducir la muestra en dicha disolución para formar una disolución de muestra premezclada;
- (d) introducir dicha disolución de muestra premezclada en dicha micromatriz impresa en dicho dispositivo de ensayo de chip;
- 20 (e) medir una intensidad del marcador detectable en cada uno de dichos puntos de calibración;
- (f) preparar una curva de calibración que correlaciona la cantidad de analito en cada uno de dichos puntos de calibración con dicha intensidad del marcador detectable en cada uno de dichos puntos de calibración;
- 25 (g) medir una intensidad de marcador detectable en dicho al menos un punto de prueba; y
- (h) calcular una cantidad de analito presente en dicho al menos un punto de prueba comparando la intensidad del marcador detectable en dicho al menos un punto de prueba con la cantidad de analito correspondiente a dicha intensidad en dicha curva de calibración.
- 30 en el que en la etapa (a), dicho analito y dicho primer reactivo están inmovilizados en dicha superficie antes de la introducción de dicha disolución de muestra premezclada en la etapa (d).
- 35 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer reactivo es un anticuerpo de captura que se une específicamente a dicho analito y el segundo reactivo es un anticuerpo que se une específicamente a dicho analito.
- 40 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dispositivo de ensayo presenta una parte de carga para recibir la disolución de muestra y una parte de lectura, presentando la parte de lectura la pluralidad de puntos de calibración impresos en la misma y el punto de prueba impreso en la misma.
4. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los puntos de calibración se imprimen en un volumen que oscila entre 1 picolitro y 1 microlitro.
- 45 5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que el volumen oscila entre 1 picolitro y 4 picolitros.
6. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los puntos de calibración se imprimen en una longitud que oscila entre 1 picómetro y 12 milímetros.
- 50 7. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los puntos de calibración se imprimen en una longitud que oscila entre 25 micrómetros y 300 micrómetros.
- 55 8. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los puntos de calibración se imprimen en matrices en coordenadas X-Y predeterminadas.
9. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las matrices de calibración se imprimen en concentraciones predeterminadas.
- 60 10. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la superficie del dispositivo de ensayo de chip es sustancialmente plana.
11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que los puntos de calibración tienen una concentración del analito que corresponde a un intervalo dinámico del analito.
- 65 12. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que los puntos de calibración están dispuestos en al

menos tres matrices para llevar a cabo tres o más réplicas de una prueba.

13. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que los puntos de prueba están dispuestos en al menos tres matrices para llevar a cabo tres o más réplicas de una prueba.

5

14. El procedimiento según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que la prueba puede ser la misma u otra diferente.

15. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que un único analito en una única prueba se mide en el dispositivo de ensayo.

10

16. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que un único analito en una pluralidad de matrices para la misma prueba se mide en el dispositivo de ensayo.

15 17. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que diferentes analitos se miden al mismo tiempo en el dispositivo de ensayo.

18. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que una pluralidad de diferentes analitos en una pluralidad de pruebas diferentes se miden al mismo tiempo en el dispositivo de ensayo de chip.

20

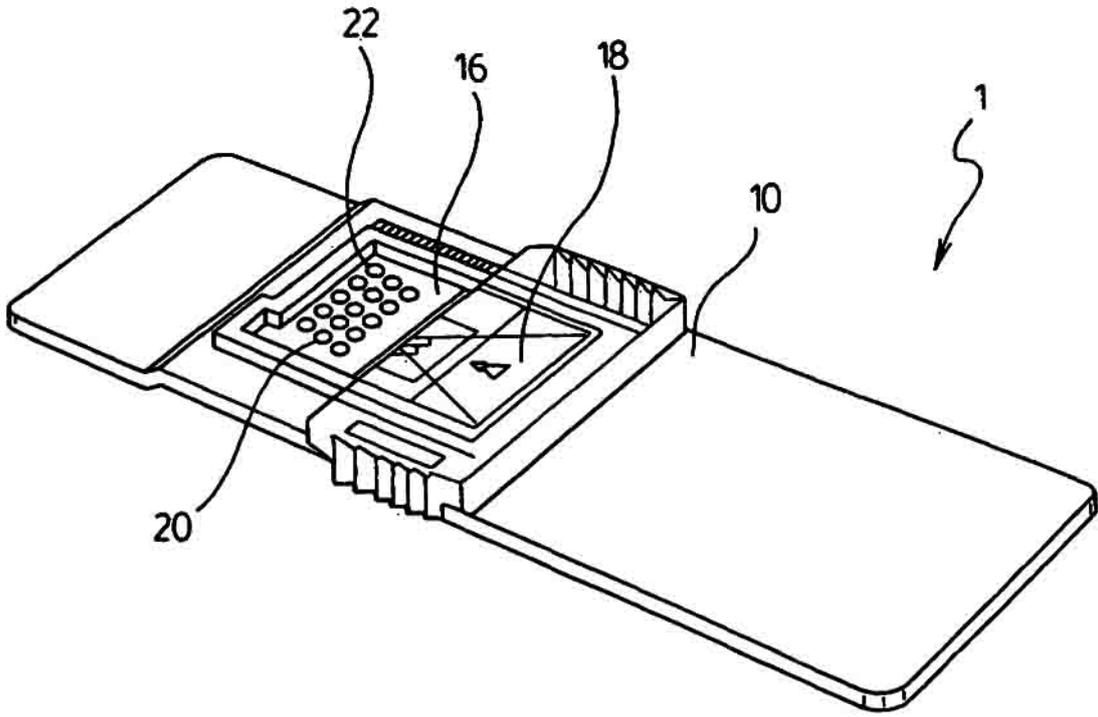


FIG.1.

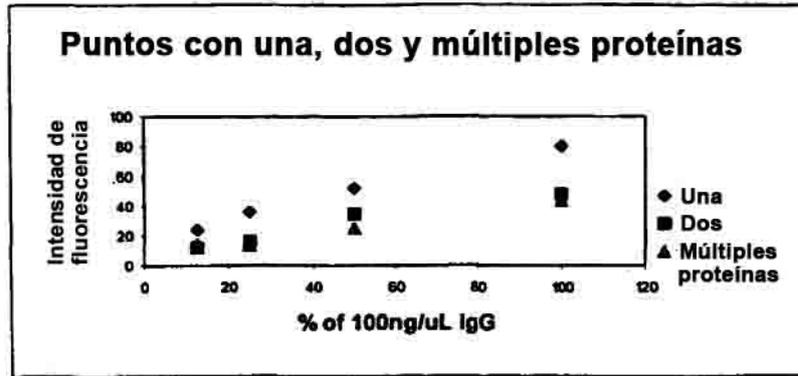
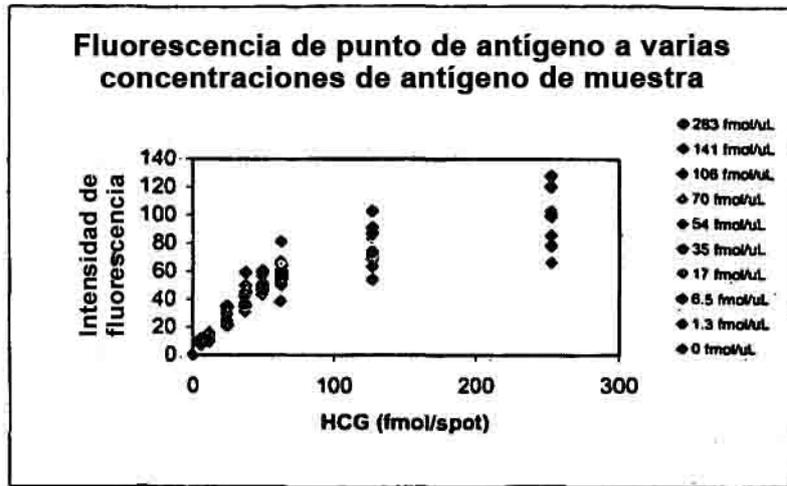
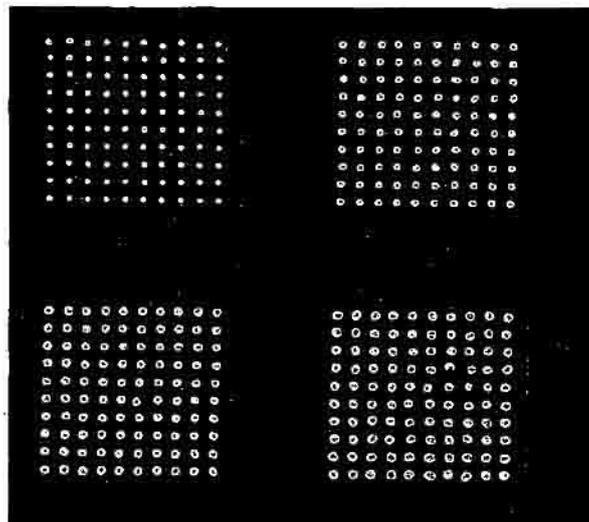


Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**

