

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 669**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01975112 .2**

96 Fecha de presentación: **08.10.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1325329**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

54 Título: **Procedimiento de ensayo**

30 Prioridad:

11.10.2000 SE 0003662

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73 Titular/es:

**PHADIA AB (100.0%)
BOX 6460
751 37 UPPSALA, SE**

72 Inventor/es:

**MENDEL-HARTVIG, IB y
ODELSTAD, LENA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 669 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 de ensayo.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de determinación de manera cuantitativa o semicuantitativa de un analito en una muestra, especialmente una alta concentración de analito.

Antecedentes de la invención

10 Para la determinación cualitativa y cuantitativa de un analito en una muestra, se usa a menudo un ensayo denominado de sándwich, en el que dos receptores dirigidos contra diferentes epítomos del analito se incuban con una muestra que contiene el analito, siendo uno de los receptores detectable, por ejemplo, mediante un marcador conjugado a él. En un formato de ensayo heterogéneo, el segundo receptor está inmovilizado (por ejemplo, acoplado) a una fase sólida o provisto de un componente de unión, tal como biotina, capaz de unirse a la fase sólida, tal como una fase sólida recubierta con avidina o estreptavidina.

15 Especialmente en el caso que el analito esté presente en la muestra en alta concentración, es habitual diluir la muestra antes de realizar el ensayo para evitar el uso de grandes y a menudo costosas cantidades de receptor inmovilizado y receptor marcado, respectivamente, o para evitar dificultades técnicas cuando no se pueden usar grandes cantidades de receptores. Tal dilución no es laboriosa pero también introduce una fuente adicional de error en el ensayo.

Por lo tanto existe una necesidad de un procedimiento de ensayo que evite la necesidad de dilución.

Sumario de la invención

20 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de realización de un ensayo heterogéneo de sándwich que permita la determinación de incluso una alta concentración de analito en una muestra sin la necesidad de diluir la muestra.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de realización de un ensayo heterogéneo de sándwich que reduzca las cantidades de reactivos de captura y detección usadas.

25 En un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de determinación de un analito en una muestra, especialmente una alta concentración de analito encontrada en concentraciones > 1 nmol/litro, que comprende las etapas de:

30 a) poner en contacto la muestra con una cantidad especificada de un receptor que se une de manera específica al analito formando un complejo analito/receptor, estando dicha cantidad especificada de receptor en exceso de la requerida para unirse a todo el analito de la muestra,

b) aislar sobre una matriz sólida tal como una cinta de membrana, una fracción menor de la cantidad de receptor que está en contacto con el analito, en la que dicha fracción comprende tanto complejo analito/receptor como receptor sin reaccionar,

c) detectar la cantidad de complejo analito/receptor en dicha fracción aislada, y

35 d) a partir de la cantidad detectada de complejo analito/receptor, determinar la concentración de analito en la muestra.

Aunque se prefiere usar el procedimiento de determinación cuantitativa de analitos de interés, también se puede usar para determinaciones semicuantitativas y cualitativas.

Descripción detallada de la invención

40 La esencia de la presente invención reside en la unión de todo el analito presente en una muestra a un receptor específico de analito, aislar una fracción menor del complejo analito-receptor formado en una fase sólida, detectar la cantidad de complejo analito-receptor aislada, y a partir de esta cantidad de analito detectada sobre la fase sólida determinar la cantidad total de analito en la muestra. De acuerdo con la invención, esto se puede llevar a cabo de diversas formas.

45 En una realización del procedimiento de la invención, todo analito se une poniendo en contacto la muestra que contiene el analito con una solución que contiene un exceso de primer receptor (R1) que además de afinidad al analito tiene afinidad al ligando (L), con lo cual una fracción menor del complejo analito-receptor se une a una fase sólida que tiene el ligando (L) inmovilizado en ella. Esta unión de la fracción menor se puede lograr mediante o bien (i) usando una cantidad de ligando (L) limitada (especificada) para extraer una fracción del complejo analito-receptor (y receptor sin reaccionar), o (ii) usando de un primer receptor (R1) solamente una fracción menor (especificada) de

50

la que es capaz de unirse al ligando (L) para extraer la fracción deseada del complejo analito-receptor (y receptor sin reaccionar). En el último caso (ii), la cantidad de ligando (L) inmovilizado usualmente está en exceso de la cantidad del primer receptor capaz de unirse al ligando (L). La cantidad del complejo analito/receptor unido a la fase sólida se detecta después, usualmente poniendo en contacto la fase sólida con un agente de detección en la forma de un ligando para el analito, tal como un segundo receptor (R2) marcado.

En el primer caso (i) anterior, la cantidad de ligando (L) inmovilizado que se puede unir al receptor específico de analito (R1) es una fracción especificada de la cantidad de receptor específico de analito (R1) puesta en contacto con la muestra, y por lo tanto la relación de analito detectado en la fase sólida a la cantidad total de analito en la muestra se corresponderá con la relación de ligando (L) de unión a analito inmovilizado a la cantidad total de receptor (R1) añadido, permitiendo por lo tanto que la concentración de analito en la muestra se calcule.

En un segundo caso (ii) anterior, la cantidad de receptor específico de analito (R1) que se puede unir al ligando (L) inmovilizado es una fracción especificada de la cantidad total de receptor (R1), y por lo tanto la relación de analito detectado en la fase sólida a la cantidad total de analito en la muestra se corresponderá con la relación de receptor específico de analito (R1) capaz de reaccionar con el ligando (L) a la cantidad total de receptor (R1), permitiendo por lo tanto que la concentración de analito en la muestra se calcule.

El término "receptor" como se usa en el presente documento se refiere a receptor de unión a analito activo, y, cuando es conveniente, receptor de unión a ligando activo, respectivamente, y no significa que incluya tal receptor en un estado inactivo o de no unión. Del mismo modo, el término ligando de unión al receptor se refiere al activo ligando de unión al receptor y no significa que incluya tal ligando en un estado inactivo o de no unión.

El término "cantidad" como se usa en el presente documento usualmente significa capacidad de unión. De este modo, por ejemplo, cuando se establece que la cantidad de receptor específico de analito está en exceso de la cantidad de analito, significa que existe más receptor específico de analito que el necesario para unirse a todo el analito. Usualmente, existe una relación de reacción 1:1 entre por ejemplo, el analito y el receptor específico de analito, o entre el receptor específico de analito y el ligando de unión al receptor inmovilizado. En tal caso, las capacidades de unión de las especies respectivas corresponden a sus cantidades molares. Sin embargo, otras relaciones de reacción son también posibles. Por ejemplo, el ligando inmovilizado puede ser capaz de unirse a más de un receptor específico de analito.

En otra realización del procedimiento de la invención, la muestra se pone en contacto con el receptor específico de analito (R1) siempre que ambos estén en solución y, en una fracción menor, inmovilizado en una fase sólida, permitiendo por lo tanto que una fracción menor de analito presente en la muestra se una a la fase sólida. Si se conoce la relación de la cantidad de receptor (R1) en solución a la cantidad de receptor (R1) inmovilizado, la concentración de analito en la muestra se puede calcular a partir de la cantidad de analito detectada unida a la fase sólida.

Es fácil observar que el procedimiento anterior proporciona el mismo efecto que la dilución de la muestra. Además de la etapa de dilución que se está evitando, que, de hecho, es ventajosa para el operador, se obtiene un considerable ahorro de reactivos, es decir, tanto el reactivo para capturar el analito sobre la fase como el agente de detección, siendo este último costoso. A este respecto, también se puede indicar que en el ensayo de la invención, la reacción entre el analito y el receptor tiene lugar en solución donde casi todos los receptores son activos en lugar de en una superficie de fase sólida como en un ensayo convencional correspondiente donde solamente aproximadamente 10 - 20% de receptor inmovilizado reaccionará (Butler, J. E., et al, Molecular Immunology, Vol. 30, No. 13, p. 1165 - 1175, 1993).

La relación requerida entre la capacidad de unión total del receptor específico de analito puesto en contacto con la muestra y (i) la capacidad de unión del ligando de unión al receptor que está inmovilizado en la fase sólida cuando ésta está limitada, o (ii) la capacidad de unión al ligando del receptor específico de analito cuando esta está limitada, se determina fácilmente por el experto en la técnica dependiendo entre otros del analito particular a determinar y del formato de ensayo particular usado y se puede elegir dentro de amplios límites. Usualmente, esta relación está entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1000:1, especialmente entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 100:1, preferiblemente más de aproximadamente 10:1, más preferiblemente más de aproximadamente 20:1.

El exceso de receptor de analito con relación a la cantidad de analito en la muestra también se determina fácilmente por el experto en la técnica para cada caso específico.

El receptor puesto en contacto con la muestra es usualmente del tipo de receptor dual o de ligando birreactivo que tiene una parte que se une específicamente al analito y otra parte que específicamente se une al ligando inmovilizado sobre la superficie de la fase sólida. La parte de unión al puede, por ejemplo, ser un anticuerpo (monoclonal o policlonal) o un fragmento activo del mismo (incluyendo anticuerpos y fragmentos recombinantes) o ácidos nucleicos mientras que la parte de unión al ligando puede ser un miembro de un par de unión específica. Los pares de unión específica ejemplares incluyen pares de unión inmunológicos, tal como antígeno-anticuerpo y hapteno-anticuerpo, biotina-avidina o -estreptavidina, lectina-azúcar, hormona-receptor de hormona, y dúplex de ácido nucleico. Por ejemplo, la fase sólida puede tener estreptavidina inmovilizada en ella, y el receptor para el

analito se puede biosintetizar. Para evitar la inmunoprecipitación a altas concentraciones de analito, puede ser preferible usar receptores monovalentes.

Mientras que el analito preferiblemente es una molécula presente en concentraciones > 1 nmol/litro en una muestra, el analito puede, de hecho, ser cualquier sustancia para la que existe un miembro de unión específica de analito de origen natural o para la que un miembro de unión específica de analito se puede preparar.

El analito que ha sido capturado por la fase sólida usualmente se detecta por la reacción con un ligando específico marcado para el analito. Tal ligando marcado puede ser un conjugado que comprende un marcador detectable unido de manera covalente o no covalente al miembro de unión específico, refiriéndose "marcador" a cualquier sustancia que es capaz de producir una señal que es detectable por medio visual o instrumental, particularmente un fluoróforo o cromóforo.

La muestra es usualmente de origen biológico, por ejemplo sangre (suero, plasma, sangre entera), saliva, fluido lagrimal, orina, fluido cefalorraquídeo, sudor, etc. La invención es, de hecho, también aplicable a otros tipos de muestras, tales como soluciones de fermentación, mezclas de reacción, etc. Especialmente, sin embargo, la muestra es una muestra de suero sin diluir o sangre entera.

Aunque la presente invención es aplicable en general, se pueden usar de manera ventajosa ensayos de fase sólida de tipo inmunocromatográfico. Tales ensayos usan un dispositivo que comprende una matriz de flujo en forma de placa de material absorbente, usualmente una tira de membrana, tal como de nitrato de celulosa o fibra de vidrio, en el que el líquido se puede transportar de manera lateral (es decir, en el plano de la tira) mediante fuerzas capilares en la membrana. La membrana usualmente tiene una zona de aplicación de la muestra, y una zona de detección (o de reacción) hacia debajo de la zona de aplicación de la muestra. En la zona de detección, es inmovilizado usualmente un reactivo de captura para el analito se inmoviliza. Para llevar a cabo un ensayo, la zona de aplicación se pone en contacto con la muestra líquida a ensayar para el analito de interés. El dispositivo se mantiene en condiciones para permitir la acción de capilaridad del líquido para transportar el analito de interés, si está presente en la muestra, a través de la tira de la membrana a la zona de detección donde se captura el analito. El flujo de líquido capilar está usualmente asegurado por un lecho absorbente o similares en el extremo corriente abajo de la tira. Un reactivo de detección, usualmente marcado, se añade después corriente arriba de la zona de detección e interactúa con el analito capturado en la zona de detección, y se mide la cantidad de analito capturado. A menudo, el reactivo de reacción se deposita previamente en o sobre la tira de la membrana, por ejemplo, en la forma de partículas que se pueden mover de manera difusiva que contienen grupos fluoróforos o cromógenos, o bien hacia arriba de la zona de aplicación de la muestra o entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de detección.

En un ensayo inmunocromatográfico que se puede usar en la invención, el receptor se añade a la muestra o bien antes de la aplicación de la muestra a la tira de la membrana, o se puede depositar previamente en o sobre la tira de la membrana corriente arriba de la zona de detección.

Un kit de ensayo para llevar a cabo el procedimiento de la invención puede comprender una membrana tal que tenga (i) inmovilizado en o sobre la membrana un ligando que se une específicamente al receptor, y (ii) depositada previamente en o sobre la membrana una cantidad especificada de receptor específico de analito que se puede disolver. La cantidad del ligando sobre el miembro de la fase sólida es menor, y usualmente considerablemente menor que la requerida para unirse a la cantidad especificada de la sustancia receptora.

En otra realización del kit de ensayo, solamente una fracción del receptor específico de analito es capaz de unirse al ligando inmovilizado. Tal kit puede comprender (i) inmovilizado en o sobre la membrana un ligando que se une específicamente al receptor, y (ii) depositada previamente en o sobre la membrana una cantidad especificada de receptor específico de sustancia de analito que se puede disolver, de la cual solamente una fracción especificada es capaz de unirse al ligando inmovilizado.

Todavía otra realización del kit de ensayo puede comprender (i) depositada previamente en o sobre una membrana una primera cantidad especificada de sustancia de receptor específico de analito que se pueda disolver, y (ii) inmovilizado en o sobre la membrana una segunda cantidad especificada de sustancia de receptor específico de analito.

En una realización alternativa, la fase sólida es un pocillo de fase sólida, tal como un pocillo de placa de microvaloración. Tal kit de ensayo puede comprender un soporte sólido que tenga uno o más pocillos con la segunda cantidad de receptor de unión al analito inmovilizada en él y con la primera cantidad de receptor de unión al analito se puede disolver depositada previamente en el pocillo o en estrecho contacto con el pocillo.

En lo siguiente, la invención se ilustrará en más detalle mediante un Ejemplo no limitante específico.

Ejemplo 1

Inmunoensayo para la proteína C reactiva (CRP) en muestras de suero sin diluir. Intervalo de medición 10 - 200 mg/l

Principio

La muestra se mezcla con anti-CRP-fab biotinilado en exceso y la mezcla se aplica a una tira de ensayo que tiene una cantidad deficiente de estreptavidina en la zona de reacción. Después de un lavado intermedio, se añade conjugado de fluoróforo de anti-CRP y después de un lavado, se mide el conjugado que se ha unido a la zona de reacción. Ya que solamente una pequeña parte del anti-CRP-fab biotinilado se puede unir a la zona de reacción el consumo del conjugado de fluoróforo se reduce considerablemente.

Tiras de ensayo

Se usaron membranas de nitrocelulosa de 5 x 48 mm (Whatman, porosidad 8 µm) sobre un soporte de poliéster. Las tiras tenían una zona de aplicación de la muestra en un extremo y una zona de reacción corriente abajo de estreptavidina inmovilizada en una cantidad capaz de fijar aproximadamente el 6% de anti-CRP biotinilado añadido en el procedimiento de ensayo.

Muestras

Las muestras que contenían CRP de concentración de CRP variable se prepararon a partir de 200 mg/l de CRP recombinante (Fitzgerald) en suero sin hCRP.

Procedimiento

Se mezclaron 15 µl de anti-CRP-fab biotinilado (fragmento de fab monovalente de anticuerpo monoclonal) y 15 µl de suero que contenía CRP y la mezcla se aplicó a la zona de aplicación de la tira de membrana. La cantidad de anti-CRP-fab biotinilado era 3 µg por tira de ensayo, que es un exceso 2 veces molar de anti-CRP en relación al patrón de 200 mg/l de CRP. Después de un lavado intermedio con 15 µl de tampón de ensayo (tampón borato 50 mM pH 8,0, BSA al 3%, sacarosa al 5%, NaCl 0,15 M, CaCl₂ al 0,005%, NaN₃ al 0,05%), se añadieron 15 µl de solución de conjugado de detección [3 µg de anticuerpo monoclonal anti-CRP (Fitzgerald) acoplado a TransFluoSpheres de 0,1 µm -SO₄/CHO (633/720 nm) (Molecular Probes Inc.), el tampón de ensayo anterior], seguido de un lavado con 2 veces 15 µl de tampón de ensayo. Después se midió la fluorescencia de la tira. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Conc. de CRP (mg/l)	Área de pico obtenida (V x mm)
0	0,08
0	0,07
10	2,56
10	2,50
30	3,62
30	4,01
100	5,24
100	4,87
200	6,28
200	5,82

Ejemplo 2 (comparativo)

Inmunoensayo para CRP en muestras de suero diluidas 1/20. Intervalo de medición 10 - 200 mg/ml

Principio

La muestra se diluye en tampón de ensayo y se aplica a tiras de ensayo que tienen un exceso de anti-CRP en la zona de reacción. Después se añade el conjugado de fluoróforo de anti-CRP seguido de un lavado, después de lo cual se mide el conjugado que se ha unido a la zona de reacción. La dilución de la muestra es necesaria para evitar grandes cantidades no razonables de anti-CRP en la zona de reacción así como en el conjugado de detección.

Tiras de ensayo

Se usaron membranas de nitrocelulosa de 5 x 48 mm (Whatman, porosidad 8 µm) sobre un soporte de poliéster. Las tiras tenían una zona de aplicación de la muestra en un extremo y una zona de reacción corriente abajo con 2,6 µg de anticuerpo monoclonal anti-CRP inmovilizado (Fitzgerald), que es un exceso 13 x molar en relación a un patrón de 10 mg/ml de suero CRP.

Muestras

Las muestras que contenían CRP de concentración de CRP variable se prepararon a partir de 200 mg/l de CRP recombinante (Fitzgerald) en suero agotado de hCRP.

Procedimiento

- Se aplicaron mezclaron 15 µl de suero que contenía CRP diluido 1/20 en tampón de ensayo (tampón borato 50 mM pH 8,0, BSA al 3%, sacarosa al 5%, NaCl 0,15 M, CaCl₂ al 0,005%, NaN₃ al 0,05%), a la zona de aplicación de la tira de membrana. Después se añadieron 15 µl de solución de conjugado de detección [anticuerpo monoclonal anti-CRP (Fitzgerald) acoplado a TransFluoSpheres de 0,1 µm -SO₄/CHO (633/720 nm) (Molecular Probes Inc.), el tampón de ensayo anterior], siendo la cantidad de anti-CRP de conjugado de 3 µg por tira de ensayo que era un exceso 15 veces molar en relación al valor de patrón más alto. A la adición de conjugado siguió un lavado con 15 µl de tampón de ensayo. Después se midió la fluorescencia de la tira. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Conc. de CRP (mg/l)	Área de pico obtenida (V x mm)
0	0,41
0	0,60
10	7,51
10	7,130
20	8,86
20	9,42
40	11,97
40	10,67
80	12,91
200	14,27
200	14,16
80	12,91

- De este modo los Ejemplos anteriores 1 y 2 demuestran que es posible llevar a cabo un ensayo sobre muestras de alta concentración sin diluir sin usar cantidades enormes de reactivos cuando se usa la metodología de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de un analito en una muestra que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto la muestra con una cantidad especificada de un receptor que se une de manera específica al analito formando un complejo analito/receptor, estando dicha cantidad especificada de receptor en exceso de la requerida para unirse a todo el analito de la muestra,
 - b) aislar sobre una matriz sólida una fracción menor de la cantidad de receptor que está en contacto con el analito, en la que dicha fracción comprende tanto el complejo analito/receptor como receptor sin reaccionar,
 - c) detectar la cantidad de complejo analito/receptor en dicha fracción aislada, y
 - d) a partir de la cantidad detectada de complejo analito/receptor, determinar la concentración de analito en la muestra.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el analito en la muestra tiene una concentración > 1 nmol/litro.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la muestra está sin diluir.
4. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que el aislamiento de dicha fracción de la cantidad de receptor puesta en contacto con la muestra sobre la matriz sólida comprende proporcionar una matriz sólida que tiene sitios de unión para el receptor, y después poner en contacto la muestra, o una alícuota de la misma, con una fase líquida que contiene el receptor, uniéndose dicha fracción de receptor a la matriz sólida.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la cantidad total de receptor tiene reactividad hacia dichos sitios de unión sobre la matriz sólida, y la capacidad de unión al receptor de la matriz sólida es menor que la capacidad de unión de la matriz sólida del receptor puesta en contacto con la muestra.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que solamente una fracción de la cantidad de receptor puesta en contacto con la muestra tiene reactividad hacia dichos sitios de unión sobre la matriz sólida.
7. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que el aislamiento de dicha fracción de la cantidad de receptor sobre la matriz sólida comprende poner en contacto la muestra con una cantidad especificada de receptor, una fracción de dicha cantidad está inmovilizada en dicha matriz sólida y estando la cantidad de receptor remanente en una fase líquida.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el receptor comprende una primera parte que se une específicamente al analito, y una segunda parte que se une a la matriz sólida.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la matriz sólida que se une a parte del receptor comprende un miembro de un par de unión específica, y el otro par de unión está inmovilizado en la matriz sólida.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la etapa c) el complejo analito/receptor se detecta por un reactivo de detección marcado que se une específicamente al analito.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la relación entre dicha fracción aislada de la cantidad de receptor de unión al analito activo y la cantidad total de receptor de unión al analito activo puesta en contacto con la muestra está en el intervalo de entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:1000, preferiblemente entre aproximadamente 1:5 y aproximadamente 1:100, en particular no más de aproximadamente 1:20.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos sitios de unión a la matriz sólida para el receptor están inmovilizados en una zona de reacción de una matriz de flujo, preferiblemente una matriz de flujo lateral, tal como una tira de membrana.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el receptor es un anticuerpo o un fragmento inmunoactivo del mismo.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo de detección es un anticuerpo o un fragmento inmunoactivo del mismo.
15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el reactivo de detección está marcado por un fluoróforo o un cromóforo.
16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el par de unión específica es biotina-avidina o biotina-estreptavidina.

17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es una muestra de suero no diluida.

18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la muestra es una muestra de sangre entera sin diluir.