

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 404**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2009 E 09727193 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2274611**

54 Título: **Disolución en gradiente de auto-calibración en un ensayo de constituyentes y aparato de disolución en gradiente realizado en una muestra de película delgada**

30 Prioridad:

02.04.2008 US 41784 P
02.04.2008 US 41791 P
02.04.2008 US 41790 P
02.04.2008 US 41794 P
02.04.2008 US 41797 P
09.04.2008 US 43571 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2013

73 Titular/es:

ABBOTT POINT OF CARE, INC. (100.0%)
400 College Road East
Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

WARDLAW, STEPHEN C. y
LEVINE, ROBERT A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 416 404 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

Disolución en gradiente de auto-calibración en un ensayo de constituyentes y aparato de disolución en gradiente realizado en una muestra de película delgada

Antecedentes de la invención

5 1. Campo técnico

Esta descripción se refiere a métodos y aparato para medir titers de anticuerpos en un sistema automatizado que no requiere múltiples disoluciones. El sistema proporciona un método sencillo para crear una disolución in-situ dentro de una cámara de análisis de muestras sin el uso de cualesquiera componentes de manipulación de fluidos de precisión y, además, para usar los mismos principios para proporcionar una amplia gama de disoluciones de muestras dentro de la cámara de manera que se evite la necesidad de operaciones adicionales de disolución cuando se trata con muestras que contienen posiblemente amplias gamas de concentraciones de analito.

2. Información básica

En la mayoría de los ensayos es necesario proporcionar una disolución exacta de la muestra que se ha de analizar para que la concentración del analito pueda ser llevada al intervalo útil del ensayo, y, puesto que esta disolución afecta a la concentración del analito, la precisión y la exactitud de la prueba dependen en gran medida de la precisión y de la exactitud de la disolución. Una razón para esta disolución es que los inmuno ensayos son afectados por un fenómeno conocido como el efecto prozona. El término "prozona", según se utiliza en esta descripción, se referirá a condiciones de exceso de anticuerpos en las que generalmente en inmuno ensayos basados en precipitación o aglutinación se inhiben o impiden las reacciones; el aplazamiento, en el que condiciones de exceso de antígenos en un inmuno ensayo en el que se inhiben reacciones de aglutinación o precipitación; y el "efecto de gancho" en el que condiciones de exceso de antígenos dan lugar a resultados falsamente bajos. Las condiciones en las que ocurren efectos de prozona pueden dar lugar a resultados falsamente negativos y falsamente bajos, con resultados catastróficos para el paciente.

Cada combinación de ensayos tiene un intervalo de trabajo empíricamente definido y los ensayos deben ser realizados con muestras y reactivos en las diluciones apropiadas. Este tipo de disolución ha sido lograda tradicionalmente por medio del uso de componentes de manipulación de fluido de precisión o repetición manual del ensayo en diluciones mayores del anticuerpo para ver si el negativo es un verdadero negativo. Aunque estas pueden ser muy precisas, requieren calibración cuidadosa y se suman en gran medida a la complejidad de la instrumentación automatizada. Además, el intervalo de analito presente en la muestra puede exceder del intervalo dinámico del ensayo y puede requerir dilución adicional de la muestra para conseguir resultados exactos.

Los ensayos serológicos, tales como para anticuerpos para enfermedades patógenas infecciosas, son importantes porque informan de cualquier inmunidad existente debida a inmunización o a exposición previa o actual, dependiendo de la clase de inmunoglobulina presente, al agente infeccioso. Similarmente, aquellos pueden ser usados para detectar auto-inmunidad y similares. Existen un cierto número de tipos de ensayos realizados, incluyendo aglutinación, fijación de complementos, precipitación, etc. Una característica casi universal de tales pruebas es la necesidad de disolver la muestra cierto número de veces con el fin de detectar el punto en el que los anticuerpos ya no son efectivos para originar una prueba positiva. A esto se hace referencia como el "titer", siendo el titer la dilución más elevada del suero o plasma del paciente que produce reacción detectable de aglutinación o medida con el antígeno de prueba. Esto requiere, en efecto, la realización de muchas pruebas separadas para llegar al resultado. Otro problema de tales ensayos es que los puntos finales son a veces difíciles de determinar, añadiendo así un error significativo a la determinación del titer. La automatización puede aumentar la eficacia y la exactitud de la prueba, pero es muy difícil realizar las disoluciones mediante un instrumento, y el consumo de tiempo, incluyendo la necesidad de definir primeramente la dilución deseada, que puede variar de prueba a prueba y los múltiples pasos de dilución son muy complejos.

45 Sería deseable proporcionar un aparato para medir titers de anticuerpos en un sistema automatizado que no requiera múltiples diluciones y que elimine el riesgo de negativos falsos debido al efecto de prozona.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método según se reivindica en la reivindicación 1. Se utiliza un marcador sensible para permitir la medición de la concentración de los reactivos añadidos a la cámara in vitro en la zona de la reacción que está siendo analizada. Un marcador sensible significa, en esta descripción, un tinte o substancia detectable que no interfiere con la reacción que está siendo analizada y que se difunde a una velocidad próxima a los reactivos a los que se añade. Marcadores sensibles pueden ser un tinte o tintes que puedan ser medidos por medios ópticos tales como absorción o emisión fluorescente. El marcador sensible está homogéneamente presente ya sea estando en disolución o en suspensión coloidal con al menos uno de dos o más líquidos que se han de añadir a continuación a, y permitidos mezclarse en, la delgada cámara de análisis que está siendo utilizada.

Puesto que a la altura de la cámara es menor que 100 micrómetros (100 μm), y preferiblemente menor que 20 micrómetros (20 μm), y las dimensiones laterales de la cámara son preferiblemente de varios centímetros, la diferencia mayor que 1.000 veces en las dimensiones vertical y horizontal dará lugar a que se alcance un equilibrio en la dimensión vertical de manera extremadamente rápida, mientras que el equilibrio en la dimensión lateral tomará cientos o miles de veces más. Si se analizan la imagen completa formada o escaneada de la cámara de reacción y las pequeñas zonas discretas de la imagen o escaneo, donde los aspectos laterales de las zonas de análisis discretas están en el intervalo de 1 a 3 veces la altura de la cámara, el volumen que está siendo sometido al análisis estará en equilibrio aproximado. Zonas tomadas a distancias de milímetros o mayores, laterales a la primera zona, tendrán diferentes condiciones de equilibrio. La señal procedente del marcador sensible añadido se mide antes, y después de la subsiguiente mezclado o difusión con los reactivos adicionales, para permitir el cálculo de la concentración final del marcador sensible medido, refleja la relativa dilución de los componentes. En casos en los que hay más de dos líquidos presentes en una cámara, puede ser utilizado más de un marcador sensible que pueda ser distinguido de los otros marcadores sensibles, cada uno añadido a uno de los componentes añadidos, para permitir el cálculo de las proporciones relativas de cada uno de los componentes. Si la concentración inicial de los constituyentes de los componentes es conocida, las concentraciones relativas pueden ser utilizadas para calcular la concentración absoluta de los componentes añadidos en masa por unidad de volumen. De ese modo las concentraciones relativas de reactivos añadidos en cualquier zona pequeña analizada pueden ser tratadas como reacción discreta visual en recipiente o cámara cuyas concentraciones de reactivos añadidos son calculables y los resultados de la unión sobre libertad o aglutinación u otra señal empleada en el inmuno ensayo que está siendo realizado pueden ser medidos y representados gráficamente como la señal obtenida por dilución calculada de muestra o nivel por concentración de anticuerpo añadido o antígeno añadido.

Es, por lo tanto, un objeto de esta invención proporcionar un método en el que se usen mezclado y difusión para crear un gradiente de concentración entre dos o más líquidos miscibles en una muestra de película delgada en una cámara de manera que el equilibrio en la dimensión pequeña de la cámara es muy rápido y las diferencias de concentraciones en el eje largo de la cámara no alcanzan el equilibrio durante el tiempo del ensayo, y siendo la inter-dilución relativa final medida mediante la concentración relativa de un marcador sensible que no participa en cualquiera de las reacciones químicas deseadas y cuyas propiedades son tales que permiten su medición exacta en cualquier punto de la cámara de reacción.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista esquemática en planta de una cámara que se utiliza en la realización del método de esta invención;

La figura 2 es una vista en sección transversal de la cámara de la figura 1;

La figura 3 es una vista ampliada en sección transversal de la cámara de la figura 1 mostrando un bombeo de la disolución en la cámara por deflexión de la superficie superior de la cámara para facilitar el establecimiento de diferentes concentraciones en todos los aspectos laterales de la cámara;

La figura 4 es una vista en planta de la cámara de la figura 1 después de haber sido completada la operación de bombeo;

La figura 5 muestra una traza de lecturas de emisión fluorescente desde la cámara de la figura 1 según se ha tomado a lo largo de la línea a-a de la figura 4, en la que un marcador sensible es un tinte fluorescente;

La figura 6 es una vista en planta de la cámara de la figura 1 en la que la cámara tiene deflectores internos que originarán la mezclado de la muestra cuando la muestra es primeramente introducida en la cámara, con lo que no es necesaria la manipulación física de la muestra;

La figura 7 es una vista esquemática en planta similar a la figura 1, pero con una muestra relativamente pequeña en la cámara;

La figura 8 es una vista en planta similar a la figura 7, pero mostrando la muestra después de la mezclado;

La figura 9 es una vista esquemática en planta de la cámara de la figura 1, pero mostrando el resultado de añadir tres líquidos a la cámara;

La figura 10 es una vista esquemática en sección transversal de una cámara de prueba formada de acuerdo con esta invención;

La figura 11 es una vista de la cámara de prueba similar a la figura 10, mostrando la aglutinación de partículas después de añadir una muestra de prueba a la cámara;

La figura 12 es una vista en sección transversal similar a la figura 10, mostrando anticuerpos presentes en la cámara de prueba antes de añadir la muestra de prueba a la cámara;

La figura 13 es una vista similar a la figura 11, mostrando la aglutinación de partículas después de añadir una muestra de prueba a la cámara;

La figura 14A es una vista compuesta en planta de una cámara de prueba que muestra la presencia de partículas aglutinadas en la muestra; y

- 5 La figura 14B es un gráfico de las partículas aglutinadas en la muestra, tomado a partir de un escaneo a lo largo de la línea a-a, y que muestra la supresión por corte del lugar T de la ausencia de aglutinación de partículas en la muestra.

Descripción detallada de la invención

- 10 La figura 1 es una vista esquemática superior de una cámara 1, en este caso un cuadrado cuya sección transversal está mostrada en la figura 2. La cámara está compuesta de placas superior e inferior relativamente delgadas, al menos una de las cuales debe ser transparente. En la cámara se han introducido dos o más líquidos, siendo uno la muestra 3 que se ha de analizar y siendo el otro el reactivo 4 requerido para el análisis. Al menos uno de estos líquidos tiene un marcador disuelto que puede ser fluorescente, tal como tinte fluorescente o uno absorbente, tal como fenol rojo o similares. El marcador debe ser tal que no interfiera químicamente con la señal analítica deseada ni la señal del marcador debe ser afectada por cualquier señal o productos de reacción del análisis de una manera que no puede ser compensada.

- 15 En el caso mostrado, el líquido 4 es el reactivo de análisis que contiene un marcador fluorescente, y el líquido 3 es la muestra que se ha de analizar. Si los líquidos son introducidos en la cámara en cantidades iguales, en las direcciones indicadas, se encontrarán aproximadamente en la región 5. La figura 3, que es también una vista ampliada en sección transversal de la cámara, demuestra cómo pueden ser parcialmente mezclados los líquidos. Si una de las superficies de la cámara es "bombeada" arriba y abajo, ocurrirá la mezcla de los líquidos, aproximadamente a lo largo de la línea 6, dando lugar al gradiente de disolución mostrado en la figura 4, que es una vista superior de la cámara.

- 20 Después de un periodo de mezcla apropiado, se le permite a la cámara reposar durante un periodo variable con el fin de permitir la difusión vertical para completar la mezcla de los líquidos dentro de un segmento vertical dado. En este punto, los líquidos de las regiones 7 y 8 están todavía completamente sin disolverse y representan el estado original de los líquidos antes de la mezcla. Si se toman entonces lecturas de fluorescencia del marcador a lo largo de la línea a-a, el resultado se puede ver en la figura 5, que es una vista en sección transversal de la cámara a lo largo de la línea a-a, mostrando un gráfico superpuesto la fluorescencia de la cámara en cada posición relativa y mostrando un segundo gráfico la absorbencia óptica a partir del analito.

- 25 Puesto que el nivel 9 de señal representa el procedente del reactivo marcado no disuelto, y el nivel 10 de señal representa el nivel de fondo o básico de la muestra, la región de la cámara que corresponde al nivel 11 de señal contiene una muestra que ha sido disuelta exactamente en la mitad. De ese modo, la concentración de analito inferida de la señal de la reacción deseada puede ser multiplicada por dos para obtener la concentración exacta. Si, en este caso, se sabe que la señal de analito es demasiado elevada debido a la presencia de demasiado analito en la muestra en esa región, se necesita sólo encontrar una región con una señal de marcador equivalente a la de la región 12, que es una disolución mayor, y después multiplicar correspondientemente el resultado de absorbencia de analito.

- 30 Similarmente, en condiciones en que está presente el efecto de prozona, el instrumento informa del resultado más elevado del analito obtenido después de tomar todas las disoluciones en cuenta e informa también de que este cálculo ha sido realizado.

La muestra puede ser mezclada por otros medios que "bombeando" la cámara. Por ejemplo, la figura 6 es una vista esquemática superior de una cámara con deflectores 13 que sirven para causar la mezcla de la muestra cuando se introducen líquidos como se muestra.

- 45 No es necesario que alguna porción ya sea de la muestra o del reactivo permanezca sin disolver. Por ejemplo, en la figura 7, que es otra vista esquemática superior de una cámara con una muestra 14 relativamente pequeña, en la que en este caso la muestra es el líquido que contiene el marcador, y una gran área 15 de reactivo que no contiene el marcador. Antes de la mezcla, se toman lecturas de referencia sobre regiones 16 y 17 y, después de la mezcla (figura 8), no queda muestra sin disolver, pero los valores de referencia originales pueden ser utilizados para los mismos cálculos como se ha descrito anteriormente. Este caso particular, en el que un marcador es mezclado uniformemente con la muestra, es particularmente apropiado para casos en que se requiere una relación de dilución relativamente elevada.

- 50 Todos los casos mostrados muestran la formación de un gradiente de dilución, pero esto puede no ser siempre necesario. En casos en que sea suficiente una única dilución aproximada, la muestra y el reactivo marcado (o muestra marcada) pueden ser mezclados hasta la uniformidad y ser tomada una lectura de cualquier región apropiada, usando igualmente la concentración del marcador para calcular la dilución real final.

5 En los casos anteriores, se supuso que el espesor de la cámara era uniforme, pero esto no se requiere absolutamente. Sería aceptable para una cámara que tenga un espesor en el punto de medición que sea conocido o pueda ser determinado a partir de otros medios; por ejemplo, la posición de lectura absoluta en el caso de una cámara de forma geométrica definida, o un espesor que pueda ser medido por medios independientes del marcador, tales como interferometría o mediante los sistemas descritos en las patentes de U. S. números 6.127.184, 6.723.290 y 6.929.953.

10 El espesor de la cámara debe ser suficientemente pequeño para que no se desarrollen células de convección, y también suficientemente pequeño para que pueda ocurrir la mezcladura vertical completa por difusión en un periodo razonable de tiempo. En la realización preferida, la cámara es de menos de 1 mm de espesor, y preferiblemente menor que 200 μm . El área de la cámara es ampliamente irrelevante, pero para la mayoría de las aplicaciones es adecuada un área de aproximadamente 4 cm^2 .

15 En casos en los que la cámara debe ser incubada durante un tiempo prolongado a continuación de la mezcladura con el fin de que prosiga una reacción, el gradiente puede tender a disminuir debido a la difusión más allá de límites deseados. En estos casos, puede ser utilizado un agente de aumento de viscosidad, tal como dextrano, polioxietileno o similares, o mediante un agente que pueda formar al menos un gel parcial, tal como gelatina o agar, para retardar más la difusión.

20 Una aplicación adicional particularmente importante de esta invención es los medios mediante los cuales puede ser utilizada para proporcionar una curva simultánea de valoración o nivel y disolución analítica. Se usan con frecuencia curvas de valoración para calibrar un análisis dado, en el que son analizados valores conocidos de concentraciones variables para generar una curva de respuesta de señal analítica en función de la concentración. Cuando es entonces medida la muestra que contiene la concentración desconocida de analito, la señal analítica se compara con la curva de referencia para dar la concentración del analito en la muestra. Esto necesita múltiples análisis, y si la reacción no es repetible a lo largo del tiempo, esto puede requerir una repetición de este proceso con cada ciclo analítico. Existe una situación similar con el uso de material de control, que son, en efecto, valores de concentración conocidos, que son analizados junto con la muestra en una tanda con el fin de asegurar que el análisis está funcionando apropiadamente. Estas dos situaciones se pueden evitar mediante un uso particular de la invención descrita.

30 La figura 9 muestra una célula 18 de muestra en la que se introducen tres líquidos, conteniendo la muestra la concentración desconocida de analito, el reactivo que contiene el marcador y un valor de concentración apropiado. Se pueden usar deflectores para evitar la mezcladura completa de los constituyentes. Cuando la cámara se ha equilibrado como se ha descrito anteriormente, se usan lecturas a lo largo de la línea 21 para generar una curva de valoraciones, usando el método descrito anteriormente, y las lecturas a lo largo de la línea 20 se usan para encontrar la disolución de muestra apropiada para el análisis. De ese modo, se pueden realizar una curva de valoraciones y análisis de muestra simultáneos en la misma cámara de reacción, lo que asegura que las condiciones de reacción para la muestra y valoración son idénticas. Se podría tratar más de una muestra en una cámara única alterando la geometría, siempre que ocurriera la mezcladura apropiada. Lo que se está midiendo es luz por píxel de la zona escaneada.

35 Se realiza un ensayo de aglutinación en la cámara de prueba como se ha descrito, con las siguientes características añadidas para afectar un ensayo serológico.

40 La figura 10 es una vista esquemática en sección transversal de una cámara de prueba que tiene al menos una superficie transparente 101 de la construcción general descrita anteriormente. A una superficie de la cámara están adheridas partículas 102 cuyas superficies expresan o contienen el antígeno 103 al que está dirigido el anticuerpo objetivo. Las partículas pueden ser artificiales, tales como látex, látex-estireno, estireno, policarbonato, o similares, con antígeno unido a la superficie por cualesquiera de diversos medios bien conocidos en la técnica, o pueden ser naturales, tales como polen, bacterias, levadura, moho u hongos. Las partículas deben ser de un tamaño tal que permita la determinación de que ha ocurrido la aglutinación de partículas, y tienen preferiblemente un tamaño en el intervalo de 0,2 μm a 20 μm . Las partículas están adheridas a, y preferiblemente cubiertas por, una capa soluble 104, que puede estar compuesta de azúcares, tales como trehalosa, que preserva la actividad del antígeno 103.

50 Cuando se añade a la cámara una muestra de líquido 105 que contiene los anticuerpos 106 que se han de detectar, se disuelve la capa soluble 104, liberando las partículas 102 y exponiendo su antígeno adherido 103 al anticuerpo 106. Como se muestra en la figura 11, que muestra la cámara de la figura 10 cierto tiempo después de que haya sido añadida la muestra, el anticuerpo 106 de la muestra, si está presente en cantidad suficiente, hará que se aglutinen las partículas para formar al menos pares de partículas 107, o, si está presente en mayor concentración, para formar mayores agrupaciones 108. Es fácilmente evidente que la inspección de la cámara mediante un instrumento automatizado puede detectar la presencia de aglomeración de las partículas por cualquier número de algoritmos de tratamiento de imagen bien conocidos en la técnica.

55 En el ejemplo dado, se ha supuesto que el anticuerpo 106 era polivalente, tal como Ig-M, que es el anticuerpo formado en las primeras etapas de una respuesta a una infección. Sin embargo, si la respuesta inmune dura más, estará presente el anticuerpo Ig-G, que no es polivalente y es menos efectivo para causar la aglomeración. Para

5 efectuar una mejor aglomeración en ese caso, la capa soluble 104 ha de contener un anticuerpo polivalente anti-Fc activo para vincular los fragmentos de Fc del anticuerpo no polivalente 110 que se ha de detectar. De ese modo, cuando se disuelve la capa 104, el anticuerpo anti-Fc 109 es liberado y se une a los anticuerpos 110, en efecto, creando una forma de anticuerpo polivalente 110 que puede agrupar las partículas 102 como se muestra en las figuras 12 y 13.

10 La figura 14A es una vista esquemática superior de una cámara que combina las características de la descripción anteriormente citada y la presente descripción, y un gráfico que representa la presencia de partículas agregadas en función de la posición a lo largo de la línea a-a. La muestra 112, mezclada con un marcador como se ha descrito anteriormente y un diluyente 113 se introducen en una cámara de una manera que permita la formación de una disolución en gradiente. Después de un periodo de incubación apropiado, que dependerá de la naturaleza del antígeno y anticuerpo que está siendo detectado, se escanea la cámara a lo largo de la línea a-a y se localiza la región T, como se aprecia en la figura 14B, que representa la posición en la que ya no ocurre aglutinación o aglomeración. El recíproco de la dilución de la muestra en este punto, según es determinado por la concentración relativa del marcador en esta zona, es igual al titer del anticuerpo. Por ejemplo, si la concentración del marcador es 0,2 en comparación con la de la zona de muestra original 112, el titer es 5.

15 Se ha de observar que se pueden detectar otras reacciones inmunológicas además de la aglutinación o aglomeración, tales como precipitación, en las que el antígeno y anticuerpos forman un complejo visible en lugar de partículas en aglomeración. Se ha de observar también que los medios descritos en la presente invención pueden ser también utilizados en otros tipos de inmuno-ensayos, incluyendo aquellos en los que el método de análisis incluye la substracción virtual fuera de límite desde libre, el objeto de la Solicitud de Patente Provisional pendiente U. S., No. 61/041.784, presentada el 2 de abril de 2008 y Expediente No. 7564-0035-1, presentado en ese momento con la misma. En este último caso, con la presente invención no hay necesidad de evitar efectos de prozona, sino que la presente invención puede ser usada para optimizar el intervalo de trabajo en el ensayo y puede ser realizada sin desviación de las especificaciones contenidas en la presente descripción.

20
25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar la dilución relativa de una solución que contiene un ligando que está dirigido contra un analito objetivo, y una muestra de líquido que contiene el analito objetivo que se ha de analizar, cuya muestra de analito objetivo es miscible con dicha solución de ligando, conteniendo al menos uno de la citada solución y la citada muestra un marcador sensible detectable, comprendiendo dicho método los pasos de:
 - a) poner una cantidad de la citada solución en una zona de una cámara de reacción plana que tiene una dimensión pequeña a través del espesor;
 - 10 b) poner una cantidad de dicha muestra de analito objetivo en una zona adyacente a dicha cámara plana;
 - c) permitir o hacer que dicha solución y dicha muestra se mezclen entre sí hasta que se cree un gradiente de mezcla en una mezcla de solución-muestra en la citada cámara;
 - 15 d) formar imagen o explorar electrónicamente dicho gradiente de mezcla en la citada cámara entre un primer lugar que contiene una cantidad no diluida de la citada solución y un segundo lugar que contiene una cantidad no diluida de la citada muestra de analito objetivo; y
 - e) calcular una concentración o dilución relativa de cada una de la citada solución y la citada muestra midiendo la concentración de dicho marcador sensible detectable en la citada mezcla.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha solución contiene un marcador sensible detectable.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que la citada muestra de líquido contiene un marcador sensible detectable.
4. El método de la reivindicación 1, en el que tanto la citada solución como la citada muestra de líquido contienen marcadores sensibles detectables y en el que dichos marcadores sensibles producen diferentes señales detectables.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho paso de permitir o hacer que se produzca la mezcladura se realiza bombeando dicha solución y dicha muestra dentro de la citada cámara.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el citado paso de permitir o hacer que se produzca la mezcladura se realiza desviando el flujo de al menos una de las citadas solución y muestra de líquido hacia dentro de la citada cámara.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la citada cámara tiene un espesor menor que 1 mm.
- 30 8. El método de la reivindicación 6, en el que dicha cámara tiene un espesor menor que 200 μm .
9. El método de la reivindicación 1, que comprende el paso adicional de añadir un agente de aumento de viscosidad que puede formar al menos un gel parcial en la citada muestra de manera que permita que la muestra sea incubada durante un periodo de tiempo dilatado a continuación del citado paso de mezcladura con el fin de que prosiga una reacción retardada.
- 35 10. El método de la reivindicación 1, en el que se realiza una curva de calibración de valoración en la misma cámara que la de análisis de muestra.

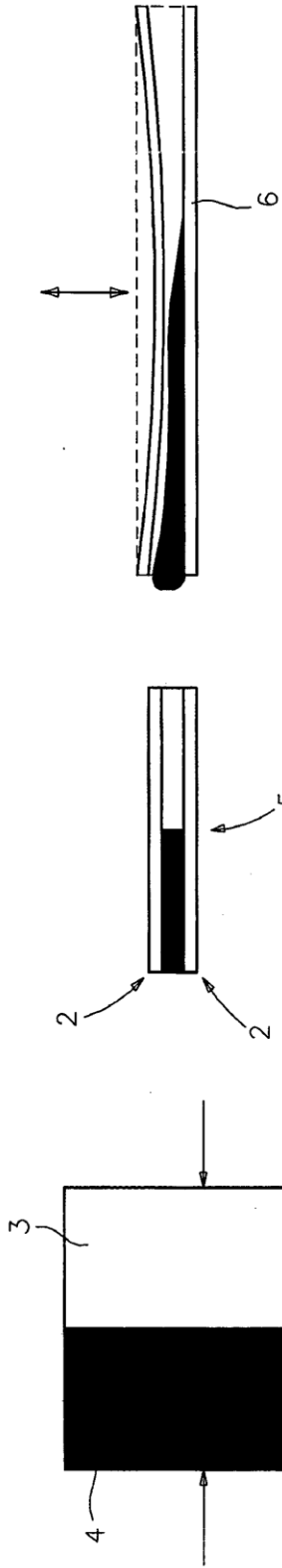


FIG. 3

FIG. 2

FIG. 1

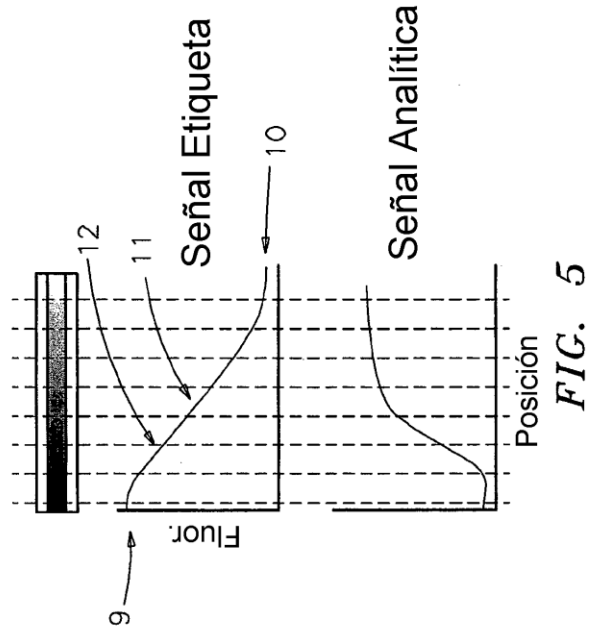


FIG. 5

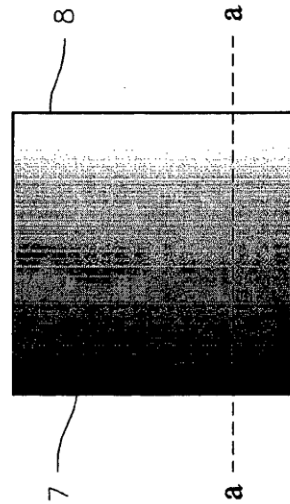
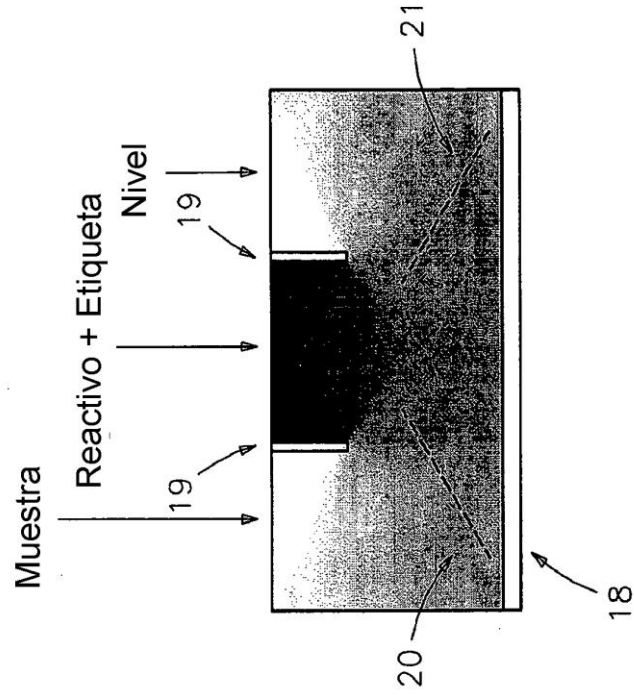
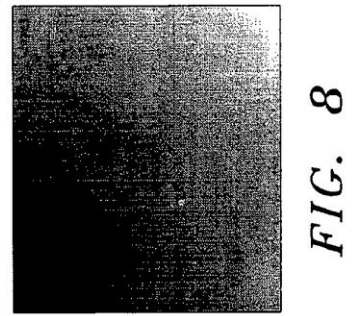
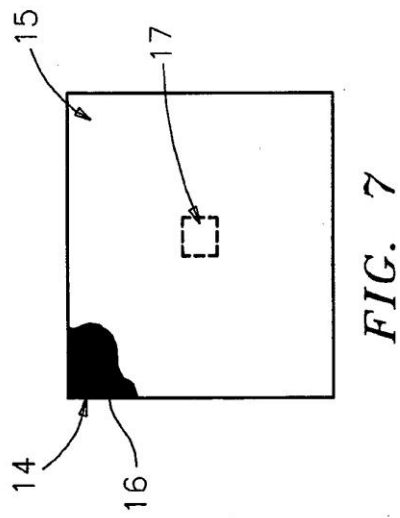
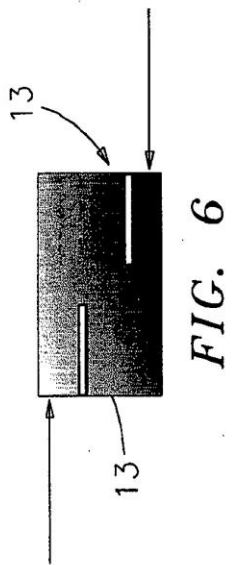


FIG. 4



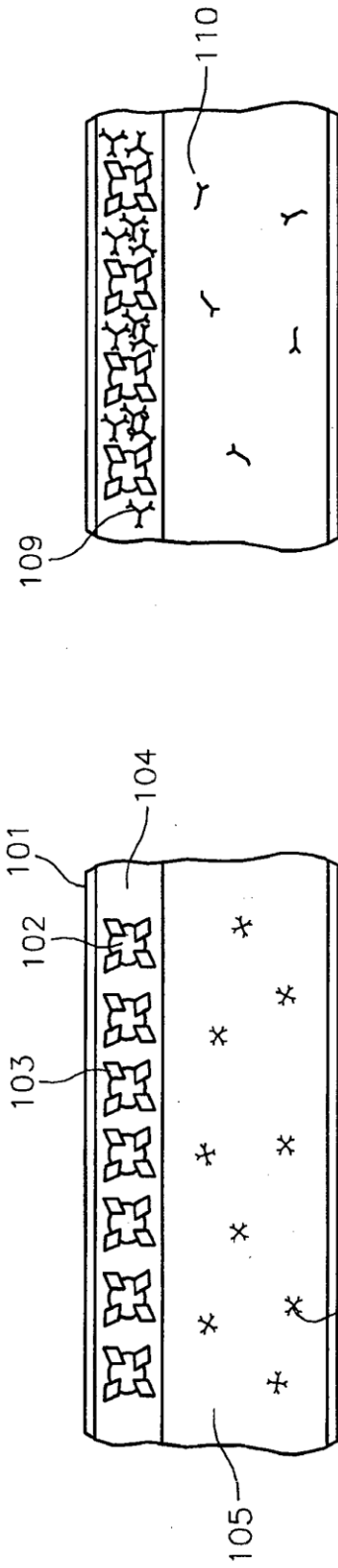


FIG. 10

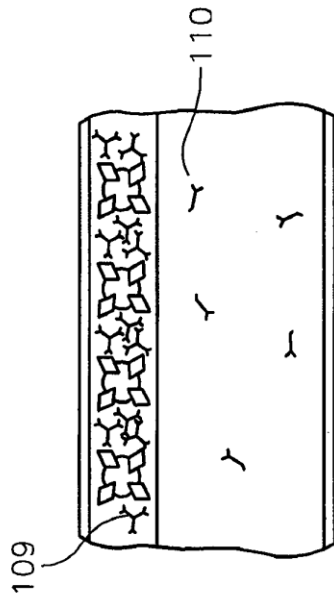
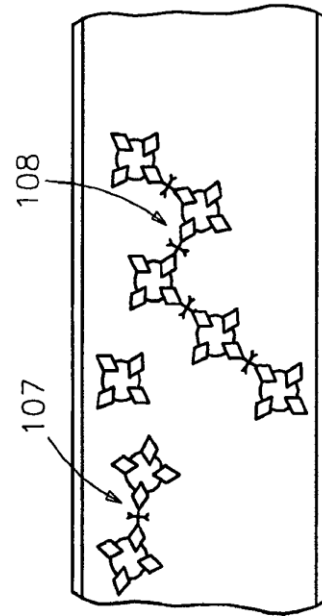
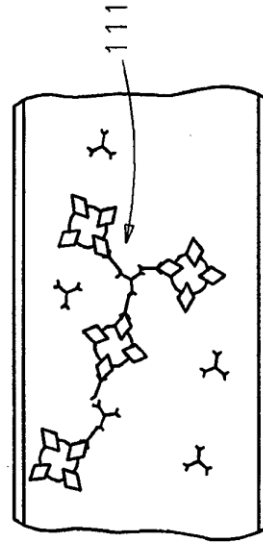


FIG. 12



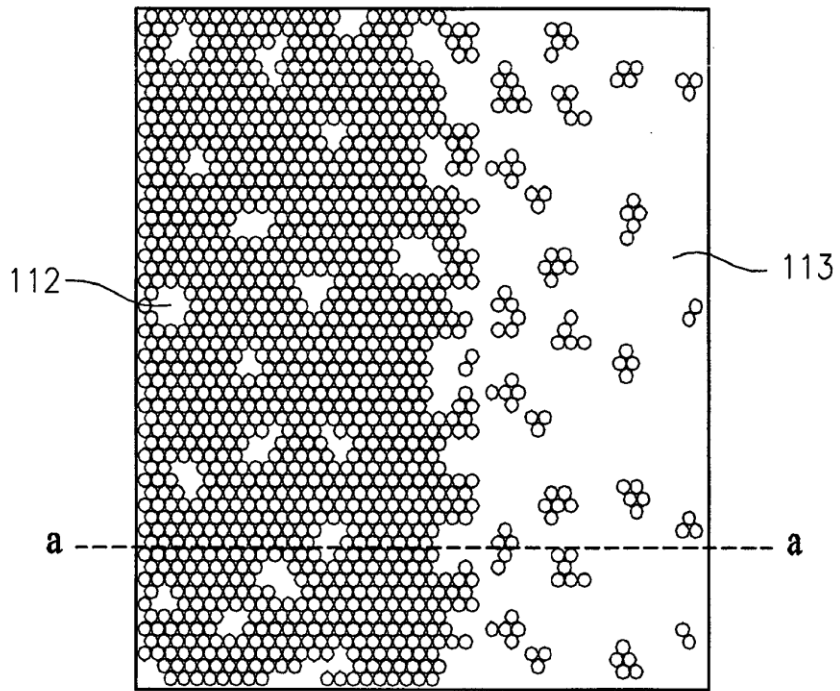


FIG. 14A

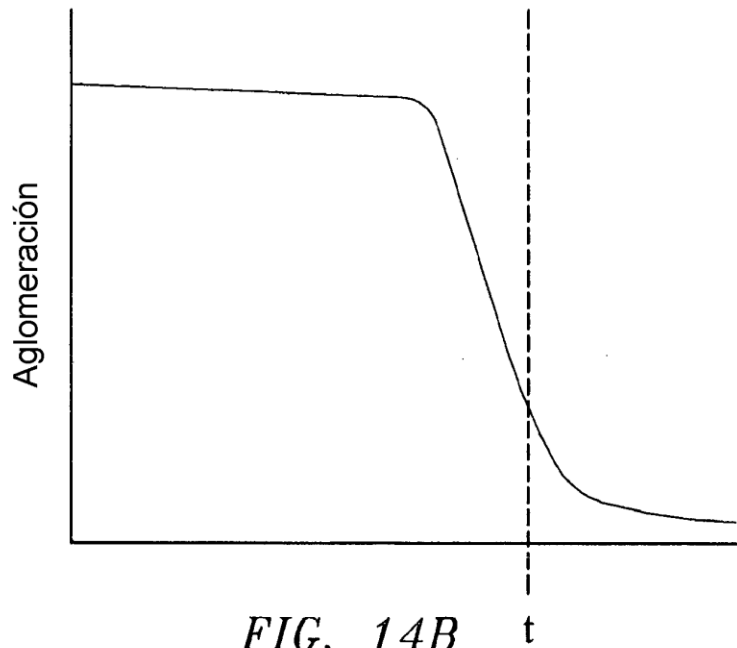


FIG. 14B