

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 133**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2009 E 09730905 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2281197**

54 Título: **Método de detección de niveles muy bajos de analito en una muestra fluida de película delgada contenida en una cámara de pequeño espesor**

30 Prioridad:

09.04.2008 US 43571

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

14.10.2015

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:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 548 133 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

Método de detección de niveles muy bajos de analito en una muestra fluida de película delgada contenida en una cámara de pequeño espesor

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**1. Campo técnico**

Esta invención se refiere a un método y a un aparato para la detección y cuantificación de niveles muy bajos de un analito diana utilizando un sistema de imagen tal como el divulgado en la patente US-6.929.953. El documento WO 95/17675 describe un método de ensayo. El documento WO2005/012505 describe la detección basada en nanopartículas y micropartículas de productos celulares. En el caso de algunos analitos tales como ciertas hormonas, por ejemplo TSH, sus niveles pueden ser tan bajos como varias decenas de miles de moléculas por microlitro. Estos niveles extremadamente bajos pueden ser medidos mediante el uso de la presente invención para contar las moléculas individuales del analito. La invención también tiene la ventaja de ser un método cuantitativo primario, y por lo tanto, no necesita normalización.

10

15

RESUMEN DE LA INVENCION

20

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método como se reivindica en la reivindicación 1.

25

El método es para la detección y cuantificación de un analito diana definido dispuesto, por ejemplo, como una muestra de fluido biológico de película delgada contenida en una cámara plana de espesor delgado de generalmente aproximadamente dos micras (2 μ) a diez micras (10 μ) de espesor. El analito diana tiene al menos dos epítopos. El método funciona mediante la unión de moléculas individuales del analito diana definido a un sustrato inmóvil aunque en un ensayo se pueden emplear aglutinantes dirigidos contra más de un epítipo. El sustrato tiene un anticuerpo de captura o ligando unido al mismo. Los anticuerpos o ligandos se dirigen contra un primer epítipo o epítopos del analito diana, y son operables para inmovilizar el analito y prevenir su difusión; es decir, para enlazar el analito diana al sustrato. El analito diana unido se detecta a continuación mediante el uso de una sonda marcada. La sonda contiene uno o más anticuerpos o ligandos unidos a su superficie, cuyo anticuerpo o ligando está dirigido contra un segundo epítipo o epítopos del analito diana.

30

35

El primer y segundo epítopos tipo deben estar espacialmente situados en los analitos diana de manera que la unión de un epítipo no impide la unión del segundo epítipo. El término "anticuerpo" y "ligando" se referirá a cualquier sustancia capaz de unirse fuertemente y específicamente a un epítipo diana e incluirán inmunoglobulinas, aptámeros y cualesquiera agentes de unión biológicos de alta afinidad de unión similar.

40

Este método es adecuado para detectar e identificar cualquier analito diana que tenga al menos dos epítopos accesibles. Un ejemplo de un analito diana tal es la TSH (hormona estimulante del tiroides). Una muestra de espécimen de fluido biológico, preferiblemente plasma o suero sanguíneo, se introduce en una cámara cuyas dimensiones superficiales se eligen para permitir el número contable máximo de moléculas del analito diana por unidad de área de la muestra como se describe a continuación.

45

La superficie inferior o superior de la cámara está formada por una lámina de plástico a la que están unidos anticuerpos anti-alfa-TSH, en una cantidad en exceso de la necesaria para capturar la mayor cantidad del analito diana que se desea medir. Los anticuerpos de captura deben estar unidos de manera irrevocable al sustrato inmóvil, de forma que durante el ensayo, los anticuerpos no dejan la superficie a la que están unidos. Esta zona se llama el área de captura.

50

La muestra de plasma sanguíneo o suero se añade a la cámara y todas las moléculas de TSH de la muestra se unirán al sustrato inmóvil que contiene los anticuerpos de captura, inmovilizando de ese modo todas las moléculas presentes en la muestra. El espesor de la cámara delgada (generalmente menos de diez micras (10 μ m)) permite la difusión molecular vertical rápida, de modo que la difusión entre las dos capas de la cámara delgada se produce rápidamente, permitiendo así que todas las moléculas del analito entren en contacto con la superficie del anticuerpo de captura. Idealmente, el plasma, u otro fluido biológico a examinar, debe ser transparente y estar libre de partículas tales como las células que podrían interferir con la unión del analito o la detección de la señal en el ensayo.

55

60

Al mismo tiempo, o después de un breve período de incubación inicial, se añaden las nanopartículas fluorescentes que se unen a anticuerpos, tales como anticuerpos anti-beta-TSH, que son específicos de un segundo epítipo del analito, a la muestra, también en cantidad en exceso de la necesaria para unir el número máximo de moléculas a ser contadas. Las nanopartículas son preferiblemente de diez a 100 nanómetros (10 a 100 nm) de diámetro y consisten en un material fluorescente de europio, o cualquier nanopartícula detectable, tales como las llamadas puntos cuánticos u otras nanopartículas fluorescentes (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU. es un proveedor). Estas

65

nanopartículas fluorescentes deben ser lo suficientemente pequeñas y de tal densidad que permanezcan en suspensión coloidal a menos que su anticuerpo unido a la superficie se una a un analito inmovilizado.

5 Una sola nanopartícula fluorescente que contiene un anticuerpo/ligando dirigido contra el segundo epítipo de los analitos de TSH se unirá a cada molécula de TSH que está unida al sustrato. Esas nanopartículas fluorescentes que no están inmovilizados en virtud de su adhesión al analito inmovilizado seguirán estando en suspensión coloidal y se moverán debido al movimiento browniano. Para distinguir las nanopartículas unidas de las nanopartículas no unidas, se toma una imagen de la cámara de prueba con iluminación fluorescente adecuada, en el plano focal de las partículas unidas, después de la incubación durante un periodo de tiempo que es el tiempo suficiente para conseguir un aumento medible en la señal debido a las nanopartículas que emiten luz inmóvil, en comparación con las nanopartículas que emiten luz en movimiento, lo cual provocará una luz de fondo debido a las nanopartículas que generan una señal no unida. Este tiempo de exposición se puede determinar de forma adaptativa con el instrumento de medición, pero limitado en su extensión superior ya que es posible que las áreas no tengan nanopartículas unidas. Esas nanopartículas que permanecen en un solo lugar, ya están fijas al sustrato, pondrán todos sus fotones en tan sólo unos pocos píxeles, mientras que las que "bailan" alrededor debido a movimiento browniano distribuirán su brillo sobre un área mucho más grande, de modo que es posible la detección de partículas inmóviles. Un área superficial de la cámara que está libre de anticuerpos de captura puede servir como el área de control.

20 Usando esta técnica, la concentración de las nanopartículas en el área de la imagen debe ser lo suficientemente pequeña para que no se superpongan por completo y disminuyan la capacidad del sensor para distinguir las partículas inmóviles. El número de partículas fluorescentes distinguibles inmóviles individuales es, por lo tanto, igual al número de moléculas del analito diana contenidas en el volumen de la cámara por encima o por debajo de los anticuerpos de captura dentro del área de captura. Dado que el volumen del fluido por encima del área de control es relativamente pequeño en comparación con el volumen por encima del anticuerpo de captura inmovilizado o ligando, este puede ser ignorado a efectos de calcular el volumen total de la cámara o paso estrecho, actuando como una barrera de difusión que separa el área de control del área de captura, que puede usarse para obtener un volumen de cámara exacto sobre el área de captura. Como alternativa, puede emplearse una barrera impermeable real para separar el área de captura del área de control. El número máximo de moléculas que se pueden medir en la muestra contenida está definido por el área de captura de la cámara y el aumento de píxeles. La concentración del analito diana será el número de moléculas detectadas dividido por el contenido de la muestra en la cámara por encima del área de captura. El volumen de la cámara se define por la altura conocida de la cámara y el área de la muestra, que puede definirse por el número de píxeles dentro del área de la muestra/factor de aumento de píxel. Por lo tanto, si se conocen la altura de la cámara y el aumento, la cantidad de volumen de la muestra también se puede determinar por el instrumento de análisis. Es necesario que las moléculas unidas estén unidas a una distancia suficiente entre sí de modo que se evite la coincidencia de la señal de las nanopartículas marcadas capturadas. Por ejemplo, si se puede detectar la fluorescencia de una señal contenida en una nanopartícula en un área de 3 a 10 píxeles y la separación de la imagen deseada de las nanopartículas es al menos dos veces esa distancia, o alrededor de 15 píxeles de separación, produciendo el aumento un tamaño de imagen de 0,5 micras/píxel, un cm cuadrado de área de muestra contendría suficiente resolución para la detección de un máximo de aproximadamente uno a dos millones de moléculas por cámara. El límite inferior de la cantidad de moléculas detectadas en la cámara está, en teoría, limitado por supuesto, por el recuento estadístico. Un experto en la materia sabrá que cuanto más delgada sea la cámara, mayor será la discriminación entre el ligando analito unido y el ligando analito diana marcado, pero menor es el volumen de la muestra contenida en la cámara. Cuanto mayor sea el área de la cámara, mayor será el rango dinámico, pero mayor será el tiempo necesario para obtener las imágenes de la cámara para el análisis.

45 Una cámara de 2 cm², 10 micras (10 μ) de altura, que contiene 2 microlitros en el área de captura, sería capaz de detectar la presencia de unas pocas moléculas en este volumen. Esto corresponde a una sensibilidad de una concentración de aproximadamente 10 attomolar en la fuente de la muestra.

50 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método como se reivindica en la reivindicación 11. La sensibilidad del aparato y el método se puede aumentar linealmente al aumentar el volumen de la muestra haciendo fluir lentamente una muestra de 10 microlitros a 1.000 microlitros a través de la cámara delgada, capturando así la mayor parte o la totalidad de las moléculas en ese volumen. La velocidad de flujo estaría en el intervalo de aproximadamente uno a varios microlitros por segundo. El ensayo se realiza como anteriormente, pero la cámara de análisis se coloca entre el depósito que sostiene la muestra y la adición de la detección de las nanopartículas no se haría hasta la finalización del flujo y los resultados notificados por volumen que fluye a través de la cámara. El aumento de volumen de la muestra puede ser empujado a través de la muestra, aunque el uso de un material absorbente en la cámara de recogida podría automatizar el flujo. La muestra fluiría tanto sobre las áreas de captura como de control.

60 Es, por lo tanto, un objeto de esta invención proporcionar un método para cuantificar la cantidad de analitos diana de una sola molécula en plasma o suero sanguíneo colocados en una cámara de análisis.

65 Es un objeto de esta invención proporcionar un método del carácter descrito que implica la captura de las moléculas de analito diana en una superficie de una cámara de muestra de película delgada plana que tiene al menos una

superficie transparente y que ópticamente destaque las moléculas capturadas de manera que puedan ser contadas fotométricamente.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 Este y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán más evidentes a la luz de la descripción detallada de la misma, como se ilustra en las figuras adjuntas.

10 La FIG. 1 es una vista esquemática en planta de una porción de una cámara de prueba de la muestra de película delgada para su uso en el ensayo de una muestra de plasma o suero para la detección de un analito diana, en este caso TSH.

La FIG. 2 es una vista similar a la FIG. 1, pero que muestra la cámara de prueba después de que se ha llenado con la muestra de plasma o suero y una pluralidad de indicadores fluorescentes de presencia del analito.

15 La FIG. 3 es una vista similar a la FIG. 2 pero que muestra una imagen electrónica de la cámara de prueba cuando esta última está siendo fotografiada para determinar la presencia del analito diana.

La FIG. 4 es una vista en planta esquemática de una realización alternativa de un conjunto de cámara de prueba de muestra de película delgada que incluye un área fuente de muestra de mayor volumen, un área de cámara de prueba de película delgada y un área de recepción de la muestra de mayor volumen.

20 La FIG. 5 es una vista en planta esquemática similar a la FIG. 4, pero que muestra la muestra que se mueve a través del área de la cámara de prueba de película delgada.

La FIG. 6 es una vista en planta esquemática similar a la FIG. 5, pero que muestra la formación de imágenes del área de la cámara de prueba de película delgada después de que la muestra se ha movido a su través.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Con referencia ahora a la FIG. 1 se muestra una porción de una cámara de muestreo de prueba de película delgada que se indica generalmente con el número 2. La muestra de prueba a ensayar en este caso es plasma o suero sanguíneo y se va a ensayar para determinar la presencia de TSH (hormona tiroidea específica). La cámara 2 tiene una superficie o pared 4 a la que está fijada una pluralidad de ligandos 6. En este caso los ligandos 6 serán específicos para un primer epítipo de superficie de las moléculas de TSH que se está ensayando.

30 La FIG. 2 muestra la cámara 2 después de que ha sido llenada con una mezcla del plasma a ensayar y las partículas 8 indicador fluorescentes. Las partículas 8 incluyen ligandos que son específicos de un segundo epítipo del analito diana de manera que algunas de las partículas se unirán con moléculas de analito diana antes de ser colocadas en la cámara de prueba 2. Las partículas indicador fluorescentes que se unen a las moléculas de analito diana 12 están indicadas por el número 10. Las partículas indicador fluorescentes no unidas libres se designan con el número 8 en la FIG. 2. Los analitos diana, en este caso TSH, se designan con el número 12 en la FIG. 2. La FIG. 2 muestra varios de los analitos 12 capturados y varias partículas 8 indicador fluorescentes no unidas. Las partículas 8 no unidas tienden a moverse en la muestra 4 como se indica esquemáticamente por las flechas 14. Siendo este el caso, cuando se forme la imagen de la cámara de prueba 2 como se muestra esquemáticamente en la FIG. 3, la señal fluorescente de las partículas indicador capturadas (en los analitos diana) será relativamente brillante en la muestra, como se indica por el número 10' en la FIG. 3 y la señal fluorescente de las partículas indicador libres será relativamente débil o borrosa, según lo indicado por el número 8' en la FIG. 3.

45 Por lo tanto, el número de analitos diana capturados en la muestra 4 se puede determinar fácilmente obteniendo una imagen de la muestra 4. Dado que el volumen de la cámara de prueba 2 se controla, el volumen de la muestra 4 en la cámara 2 es conocido y el recuento de analito diana se puede medir en unidades de volumen de analito/muestra.

50 Con referencia ahora a las FIGS. 4-6, se muestra una realización del dispositivo de la presente invención que es capaz de muestrear un mayor volumen de la muestra a ensayar. Esta forma de realización incluye un depósito 16 de la muestra en el que se coloca una muestra más grande del plasma o suero a ensayar. El depósito 16 puede almacenar hasta 1 ml, por ejemplo, de la muestra. El depósito 16 puede tener una superficie superior flexible que puede ser presionada para comprimir la muestra y bombearla a través del componente 2 de la cámara de prueba de la muestra del conjunto. La cámara de prueba 2 incluye un área de control 20 que está desprovista de ligandos 6 de captura y el área de muestreo 2'. Este área de control no se muestra a escala y es mucho menor que el área de captura o si se desea puede estar conectada con una barrera de difusión desde el área de captura, que incluye los ligandos 6 de captura del analito. Cuando el depósito 16 se comprime, la muestra se moverá en la dirección de las flechas A a través del área de muestreo 2' y el área de control 20 al mismo tiempo. Después de pasar a través de las áreas 2' y 20, la muestra se depositará en un depósito 18 de recepción que puede contener una muestra absorbente, si así se desea.

65 La Fig. 6 ilustra la imagen que se detectará en la cámara de muestra 2' después de que la muestra se haya movido a su través. La imagen mostrará las imágenes brillantes 10 de las partículas indicador capturadas y mostrará las señales 8 fluorescentes más tenues y borrosas de las partículas indicador libres o no capturadas. Si la prueba de la muestra ha demostrado ser válida, entonces el área de control 20 sólo incluirá las señales 8 fluorescentes borrosas. La inclusión de los depósitos 16 y 18 permitirá ensayar una mayor cantidad de la muestra a ensayar y, por lo tanto,

puede proporcionar resultados de la prueba más válidos. La línea discontinua 11 en las FIGS. 4-6 indica una barrera impermeable entre el área de muestreo 2' y el área de control 20 que impide que la muestra cruce entre las dos áreas.

- 5 Son posibles muchas modificaciones de esta invención con respecto a su construcción dentro de la descripción de la invención. Estas incluyen el área de la cámara de prueba que va desde 1 mm² hasta 400 mm², con una altura de 2 micras a 10 micras. Los anticuerpos unidos localizados se colocan preferiblemente en un patrón homogéneo, teniendo el área de control adyacente anticuerpos que no tienen ninguna afinidad por el analito deseado o no existiendo ningún anticuerpo en absoluto. Es el área de control la que es deseable para garantizar la ausencia de, o
- 10 para controlar la detección no específica de puntos de mayor intensidad que no corresponden a un analito marcado. Es preferible limitar la difusión de la muestra desde el área de control hasta el área de captura con el fin de obtener una determinación del volumen más precisa de la cantidad de muestra que se expone al anticuerpo de captura. También es posible, si se desea la determinación de una curva estándar donde se colocan múltiples
- 15 concentraciones de analito en la cámara de análisis y se analizan en condiciones similares. El número de señales discretas detectables por área fotografiada en el área de captura menos las señales discretas detectables por área fotografiada en el área de control se representan frente a las concentraciones conocidas de analito para obtener la curva estándar. Los resultados se pueden usar para calcular la concentración de analito en muestras desconocidas que se analizan en condiciones idénticas a la curva estándar.
- 20 La amplificación de la señal de la sonda, tal como la RCAT (tecnología de amplificación por círculo rodante) podría ser utilizada en lugar de las nanopartículas, ya que tiene el efecto de producir partículas fluorescentes localizadas.

Puesto que muchos cambios y variaciones de la realización divulgada de la invención pueden hacerse sin apartarse del concepto inventivo, no se pretende limitar la invención excepto cuando sea requerido por las reivindicaciones

25 adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para realizar un inmunoensayo de una muestra de fluido biológico para la cuantificación de un analito diana en una cámara de muestra de película delgada en el que la cámara tiene un espesor de 10 μm o menos, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 proporcionar una pluralidad de anticuerpos o ligandos (6) de captura específicos del analito diana, suficiente para unir todo el analito (12) diana añadido, los cuales están fijos a una superficie (4) de una cámara de prueba (2) de la muestra de película delgada o a estructuras inmovilizadas en la cámara de análisis (2), siendo dichos anticuerpos o ligandos (6) de captura específicos de un primer epítipo o epítipos en las moléculas (12) de analito diana que están presentes en dicha muestra de fluido biológico;
- 15 llenar dicha cámara (2) de prueba de la muestra con una mezcla de dicha muestra de fluido biológico y nanopartículas fluorescentes (8, 8', 10, 10') acopladas a anticuerpos que se unen selectivamente a un segundo epítipo o epítipos de las moléculas (12) de analito diana, que están presentes en dicha muestra de fluido biológico; y
- 20 fotografiar dicha muestra quiescente en dicha cámara (2) de prueba de la muestra y contar las moléculas de analito diana (12) que son capturadas por dichos anticuerpos o ligandos (6) de captura inmóviles y haciéndolos detectables fotografiando las nanopartículas fluorescentes inmovilizadas (10, 10') acopladas a anticuerpos que están unidos a un segundo epítipo sobre el analito diana inmovilizado (12).
2. El método de la reivindicación 1 en el que dichas nanopartículas (8, 8', 10, 10') son puntos cuánticos.
3. El método de la reivindicación 1 en el que las nanopartículas fluorescentes (10, 10') que se han inmovilizado debido a la unión a moléculas de analito diana capturadas en la muestra pueden ser fotométricamente distinguidas de las nanopartículas libres (8, 8') en la muestra como resultado del movimiento de las nanopartículas libres (8, 8') debido al fenómeno de movimiento browniano en la muestra.
- 25 4. El método de la reivindicación 1 en el que las nanopartículas fluorescentes (10, 10') son puntos cuánticos que se han convertido en inmovilizados debido a la unión a las moléculas (12) de analito diana capturadas en la muestra y que pueden distinguirse fotométricamente de las nanopartículas libres (8, 8') en la muestra debido al movimiento de las nanopartículas libres (8, 8') que resultan del fenómeno de movimiento browniano en la muestra.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en el que el material ensayado está sin diluir.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en el que la cámara (2) contiene un área de control libre de anticuerpos o ligandos (6) de captura.
- 40 7. El método de la reivindicación 6, en el que el número de señales discretas detectables por área fotografiada en el área de captura es mayor que las señales discretas detectables por área fotografiada en el área de control y la diferencia por área multiplicado por el área del área de captura es igual al número de moléculas de analito diana capturadas.
- 45 8. El método de la reivindicación 6, en el que el número de señales discretas detectables por área fotografiada en el área de captura es mayor que el de las señales discretas detectables por área fotografiada en el área de control y es proporcional al número de moléculas de analito diana capturadas en el área de captura.
- 50 9. El método de la reivindicación 6 en el que el número de señales discretas detectables por área fotografiada en el área de captura es mayor que el de las señales discretas detectables por área fotografiada en el área de control y que es indicativo de la presencia del analito diana en la muestra.
- 55 10. El método de la reivindicación 1 en el que el volumen de la muestra aplicado es mayor que el volumen de la cámara de análisis (2).
11. Un método para realizar un inmunoensayo de una muestra de fluido biológico para la cuantificación de un analito diana en una cámara de la muestra de película delgada, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 60 proporcionar un suministro de una mezcla de dicha muestra de fluido biológico y nanopartículas fluorescentes (8, 8', 10, 10') acopladas a anticuerpos que se unen selectivamente a un segundo epítipo o epítipos de las moléculas (12) de analito diana (12) que están presentes en dicha muestra de fluido biológico, teniendo dicho suministro una capacidad de muestra que es mayor que la capacidad de la muestra de dicha cámara (2) de muestra de película delgada;
- 65 proporcionar una pluralidad de anticuerpos o ligandos (6) de captura específicos del analito diana, suficiente para unir todo el analito (12) diana añadido, estando dichos anticuerpos o ligandos (6) fijos a una superficie (2') de una cámara de prueba (2) de la muestra de película delgada o a estructuras inmovilizadas en la cámara de análisis (2), siendo dichos anticuerpos o ligandos (6) de captura específicos de un primer epítipo o epítipos de las moléculas (12) de analito diana que están presentes en dicha muestra de fluido biológico;

movilizar dicha mezcla de dicho suministro a través de dicha cámara (12) de prueba de la muestra dentro de un depósito de recepción de la muestra (18), donde dicho analito diana (12), si está presente en dicha muestra, se unirá a dichos anticuerpos o ligandos (6) de captura en dicha cámara de muestra (2); y

5 fotografiar dicha cámara (2) de prueba de la muestra y contar las moléculas (12) de analito diana que son capturadas por dichos anticuerpos o ligandos (6) de captura inmóviles y haciéndolos detectables fotografiando las nanopartículas fluorescentes inmovilizadas (10, 10') acopladas a anticuerpos que están unidos a dicho primer epítopo del analito diana inmovilizado (12).

10 12. El método de la reivindicación 11, en el que dichas nanopartículas (8, 8', 10, 10') son puntos cuánticos.

13. El método de la reivindicación 11, en el que las nanopartículas (10, 10') fluorescentes que se han inmovilizado debido a la unión a moléculas (12) de analito diana capturadas en la muestra pueden distinguirse fotométricamente de las nanopartículas (8, 8') libres en la muestra como un resultado del movimiento de las nanopartículas (8, 8') libres debido al fenómeno de movimiento browniano en la muestra.

15 14. El método de la reivindicación 11, en el que las nanopartículas fluorescentes (10, 10') son puntos cuánticos que se han inmovilizado debido a la unión a moléculas (12) de analito diana capturadas en la muestra y que se pueden distinguir fotométricamente de las nanopartículas libres (8, 8') en la muestra debido al movimiento de las nanopartículas libres (8, 8') resultante del fenómeno de movimiento browniano en la muestra.

20 15. El método de la reivindicación 1, en el que el número de señales discretas detectables por área fotografiada en el área de captura es mayor que el de las señales discretas detectables por área fotografiada en el área de control (20) en comparación con una curva estándar realizada para calibrar la cámara de prueba con el fin de determinar la concentración de analito en la muestra.

25

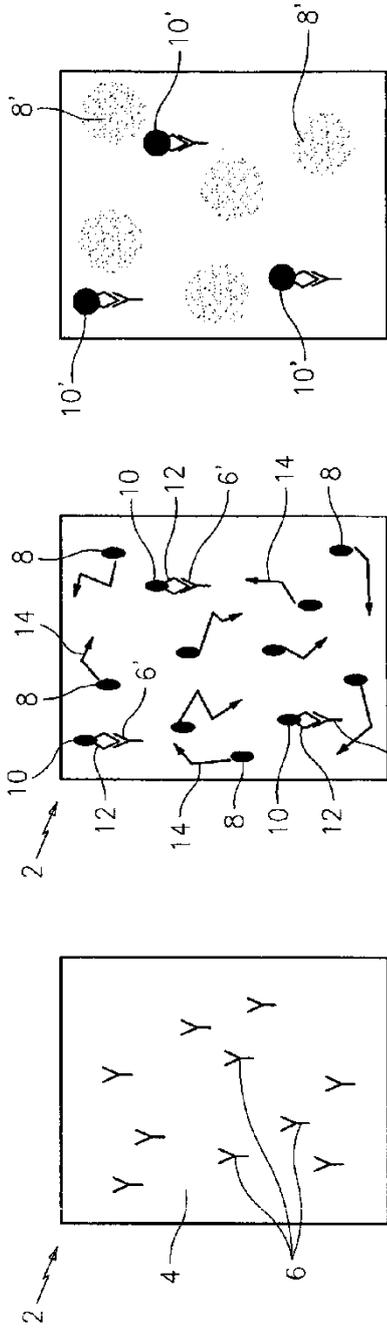


FIG. 1

FIG. 2

FIG. 3

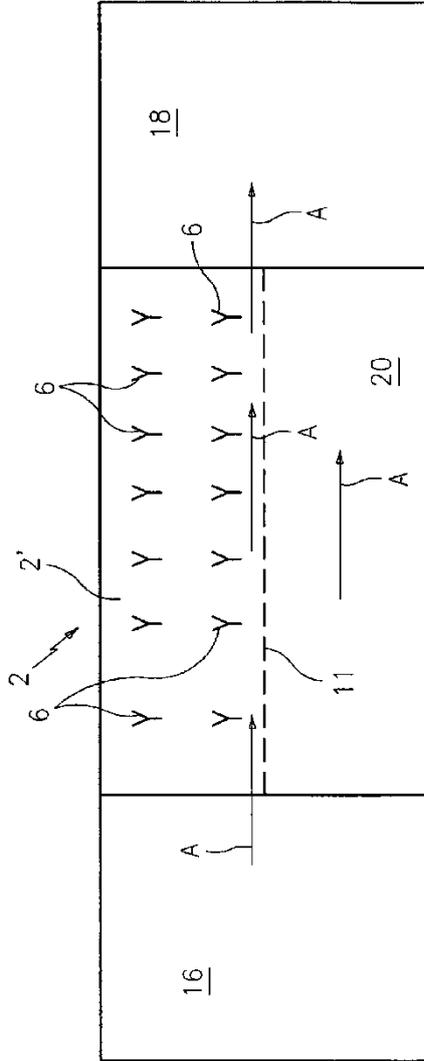


FIG. 4

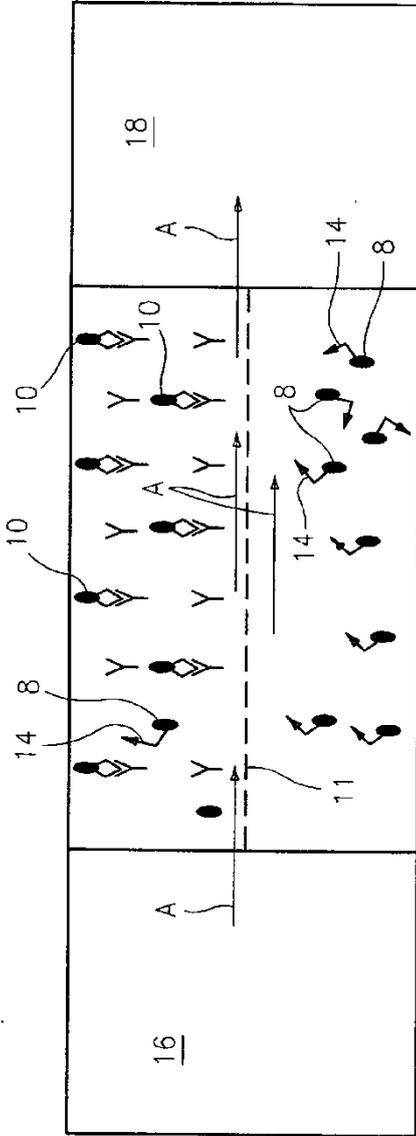


FIG. 5

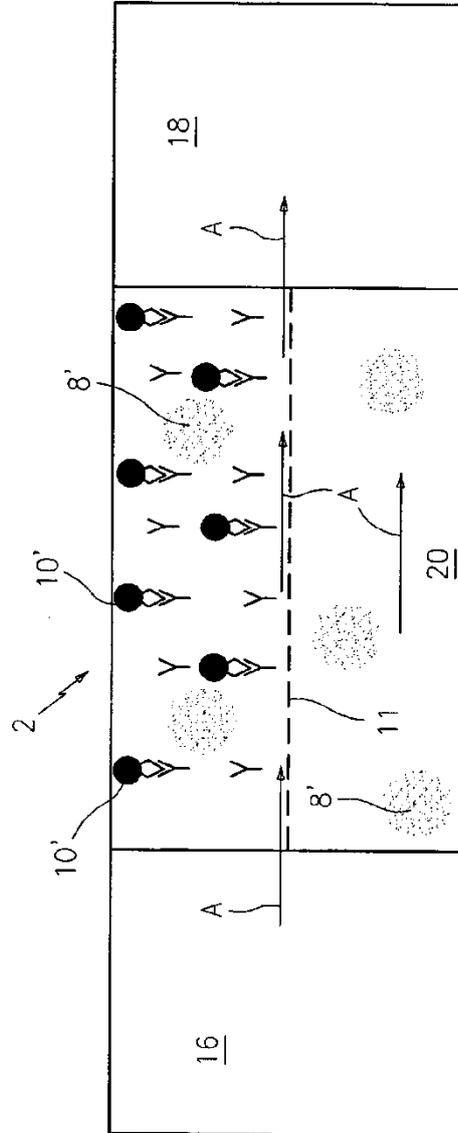


FIG. 6