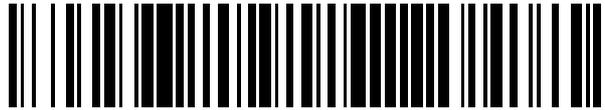


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 247**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2012 PCT/US2012/040925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170428**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2012 E 12727976 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2718717**

54 Título: **Ensayos de unión ligando biológico-receptor utilizando el análisis de imágenes digitales con iluminación dual resueltas espacialmente para eliminar una etapa de lavado**

30 Prioridad:

**06.06.2011 US 201113153934**

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

**13.07.2017**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)  
100 Abbott Park Road  
Abbott Park, IL 60064-3500, US**

72 Inventor/es:

**QIAOQIAO, RUAN;  
SALDANA, SILVIA C.;  
SKINNER, JOSEPH P. y  
TETIN, SERGEY Y.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 624 247 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

**Ensayos de unión ligando biológico-receptor utilizando el análisis de imágenes digitales con iluminación dual resueltas espacialmente para eliminar una etapa de lavado**

5

**Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere a la determinación de la concentración de un ligando en una muestra, más particularmente, un ligando que se une específicamente a un receptor.

**2. Discusión de la técnica**

15 Durante las últimas décadas, se han realizado inmunoensayos utilizando fluorescencia, quimioluminiscencia u otros medios para generar una señal en respuesta a un analito. Actualmente, muchos inmunoensayos se realizan midiendo la intensidad de una señal luminosa generada en el volumen total de una mezcla de reacción. La señal luminosa generada se puede medir mediante un medio óptico, en donde la señal luminosa generada es emitida por un gran número de moléculas. En una realización típica, estos inmunoensayos se pueden llevar a cabo combinando una muestra que se sospecha que contiene un antígeno con un reactivo que comprende un primer anticuerpo fijado a un soporte sólido, p. ej., una esfera, una micropartícula, para formar una mezcla de reacción. El antígeno, si está presente en la muestra, se une específicamente al primer anticuerpo. Un producto conjugado, que comprende un segundo anticuerpo que tiene una marca unida a él, se introduce en la mezcla de reacción y se une específicamente al antígeno, que está específicamente unido al primer anticuerpo, que, como se ha indicado anteriormente, está fijado al soporte sólido. Dicho inmunoensayo se denomina inmunoensayo sándwich o ensayo inmunométrico. Este tipo de inmunoensayo se muestra esquemáticamente en la FIG. 1. La señal atribuible a la marca se mide después de que el producto conjugado no unido se elimine de la mezcla de reacción, típicamente realizando una etapa de lavado. La señal que se obtiene del volumen total de la mezcla de reacción se mide y a continuación se compara con una curva de calibración para establecer la concentración de antígeno presente en la muestra.

30

Otro tipo de inmunoensayo se denomina inmunoensayo competitivo. En una realización típica, un antígeno no marcado y un antígeno marcado compiten por el mismo sitio del anticuerpo. Alternativamente, un anticuerpo y un anticuerpo marcado compiten por el mismo sitio del antígeno. En un ejemplo de la primera, se utilizan un antígeno marcado y un antígeno no marcado. Se recubre un soporte sólido con un anticuerpo que se puede unir específicamente al antígeno marcado o al antígeno no marcado. Se combinan el soporte sólido, el antígeno marcado y la muestra de un paciente que se sospecha que contiene el antígeno. Por supuesto, cualquier antígeno de la muestra del paciente no está marcado. El antígeno marcado y el antígeno no marcado compiten por los sitios del anticuerpo en el soporte sólido. Sólo cuando el antígeno marcado se ancla al anticuerpo sobre el soporte sólido se puede producir una señal, porque sólo el antígeno marcado puede generar una señal. La cantidad de antígeno en la muestra del paciente es inversamente proporcional a la cantidad de señal producida. Este tipo de inmunoensayo se muestra esquemáticamente en la FIG. 2.

40

Al realizar inmunoensayos utilizando diferentes métodos ópticos, se deben considerar varios parámetros. Estos parámetros incluyen el tiempo necesario para realizar el inmunoensayo, la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo el inmunoensayo, la cantidad de reactivos adicionales necesarios para llevar a cabo el inmunoensayo, el número de etapas necesarias para completar el inmunoensayo, la sensibilidad del inmunoensayo, y el rango dinámico del inmunoensayo. El rango dinámico puede cubrir a menudo tres o más órdenes de magnitud. Durante muchas décadas, se ha demostrado que los inmunoensayos que utilizan micropartículas magnéticas proporcionan valores adecuados para la mayoría de los parámetros mencionados anteriormente. Las micropartículas magnéticas permiten la separación del analito unido al producto conjugado del no unido al producto conjugado y otros reactivos de una manera simple. Otra propiedad atractiva de las micropartículas magnéticas es que pueden ser controladas fácilmente en una solución para permitir la unión del analito o producto conjugado en la fase sólida en un tiempo relativamente corto. Mediante el uso de la atracción magnética, las micropartículas magnéticas se pueden mover y lavar con el fin de proporcionar información solamente sobre el analito unido a las micropartículas magnéticas.

55

Un inconveniente principal con el uso de cualquier micropartícula como soporte sólido es la falta de uniformidad de micropartícula a micropartícula con respecto a la cantidad de anticuerpo que recubre la micropartícula. Otro inconveniente es la interacción no deseada del producto conjugado con las micropartículas. Tal interacción no deseada puede afectar a los resultados del inmunoensayo y, en consecuencia, puede requerir un estudio extenso de una serie de micropartículas diferentes, elaboradas por diferentes fabricantes, para su uso en un analizador de inmunoensayo. Otro inconveniente se presenta cuando se realizan inmunoensayos en un recipiente de reacción. El producto conjugado se puede unir a las superficies del recipiente de reacción, lo que es indeseable. Estos inconvenientes no sólo limitan la sensibilidad de un inmunoensayo, sino que pueden proporcionar resultados falsos tras la medición del analito.

60

Otros problemas que pueden surgir en los inmunoensayos implican (a) unión no específica del producto conjugado al soporte sólido y (b) agregación de reactivos. Estos problemas son una gran preocupación para los diseñadores de un ensayo. Típicamente, los métodos para reducir la unión no específica implican no sólo adaptar los reactivos, sino también mezclarlos en proporciones apropiadas para proporcionar los resultados deseados. Estos métodos, que implican una cantidad significativa de prueba y error, a menudo dan como resultado que la elaboración del diseño de un ensayo sea un proceso largo, así como hacer que el desarrollo de un ensayo sea un proceso empírico, con el resultado de que los reactivos varían a menudo de un lote a otro lote. Por otra parte, una señal resultante de la unión no específica del producto conjugado puede ser mayor que la señal resultante de la unión específica del producto conjugado a un analito, limitando de este modo la sensibilidad del inmunoensayo. Sólo mediante el uso de la calibración utilizando muestras libres de cualquier analito se pueden estimar los efectos de la unión no específica durante un ensayo real.

Otro inconveniente potencial de un inmunoensayo típico es que después de realizar el ensayo, el único registro del ensayo es el valor de la señal. No hay oportunidad de volver a examinar la muestra en busca de defectos o de obtener más información si se dispone de nuevos métodos de análisis. No sólo no habrá registro de las propiedades de la fase sólida, tampoco habrá forma de revisar los datos registrados utilizando un algoritmo recientemente desarrollado. No es posible utilizar datos históricos para extraer nueva información.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar instrumentos analíticos y métodos para abordar la unión no específica y el rendimiento no deseado de la fase sólida en un ensayo dado, al mismo tiempo que se adquieren datos del ensayo para mejorar la sensibilidad del ensayo. Existe la necesidad de reducir el uso de reactivos y proporcionar la medición en un tiempo adecuado para su uso tanto en un entorno de laboratorio como en un entorno de diagnóstico inmediato. En principio, un método de este tipo también proporcionaría un control de calidad en tiempo real a medida que se realice el ensayo. Además, se desea aliviar la necesidad de generar nuevas curvas de calibración y reducir la variación de los reactivos de un lote a otro. También sería deseable mantener un registro del ensayo de tal manera que pueda ser revisado en una fecha posterior mediante el uso de diferentes métodos a medida que estos métodos estén disponibles.

Se pueden acoplar nuevos métodos de detección con dispositivos de los campos emergentes de la nanotecnología y los microfluidos para proporcionar ensayos más pequeños, más eficaces y más sensibles para detectar y medir analitos en muestras biológicas.

De Rosales et al. European Biophysics Journal 2007, 36, 153-161 se conoce la detección de la interacción dependiente del ligando entre el receptor de andrógenos (AR) y Tif2 en células vivas, utilizando espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia de dos colores por dos fotones (DC-FCCS) para examinar la unión de un anticuerpo y un ligando de proteína al AR y/o Tif2.

### **Compendio de la invención**

El alcance de la invención y diversas realizaciones de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, esta invención proporciona un método para determinar la concentración de un analito en un inmunoensayo que comprende las etapas de:

(a) realizar un inmunoensayo que implica un receptor fijado a un soporte sólido, en donde el inmunoensayo implica la etapa de combinar un anticuerpo de captura unido a una micropartícula, un producto conjugado que comprende un anticuerpo de detección fijado a una marca fluorescente y una muestra que se sospecha que contiene un antígeno en un recipiente de reacción y permitir la formación de un complejo, comprendiendo el complejo la micropartícula anclada al anticuerpo de captura, el analito y el producto conjugado;

(b) adquirir una imagen de luz blanca de la mezcla de reacción con el fin de determinar la ubicación de la micropartícula en el inmunoensayo de la etapa (a) y una imagen de fluorescencia de la mezcla de reacción con el fin de determinar la ubicación del producto conjugado en el inmunoensayo de la etapa (a);

(c) seleccionar al menos una región de interés a partir de las imágenes adquiridas en la etapa (b), en donde la al menos una región de interés es una región a partir de la cual emanan señales luminosas del complejo formado en la etapa (a);

(d) seleccionar píxeles en la al menos una región de interés para el análisis;

(e) calcular y registrar la media y la varianza de los recuentos por píxel para los píxeles seleccionados en la etapa (d), en donde los recuentos por píxel son el número de fotones contados por píxel por unidad de tiempo;

(f) omitir los píxeles que tienen un recuento mayor o menor que una varianza especificada;

(g) calcular los recuentos medios por píxel de los píxeles restantes; y

(h) determinar la concentración del analito a partir de los datos en la etapa (g).

Más concretamente, el ensayo de unión antígeno-anticuerpo implica combinar reactivos apropiados en los que los

anticuerpos fijados a un soporte sólido, que es una micropartícula, una muestra que se sospecha que contiene un analito, y un producto conjugado que comprende una marca forman un complejo en el que está presente la marca a una concentración que es directamente proporcional a la cantidad de ligando presente en la muestra. La marca del producto conjugado está anclada a un segundo anticuerpo, que es diferente del anticuerpo fijado al soporte sólido.

5 Con el fin de mejorar la sensibilidad del inmunoensayo, se pueden emplear una etapa de reacción opcional y una etapa de lavado opcional para reducir la unión no específica y eliminar cualquier exceso de producto conjugado. Otra alternativa es un inmunoensayo homogéneo de una sola etapa, que no requiere una etapa de separación.

10 Las micropartículas que portan anticuerpos sobre su superficie, una muestra que se sospecha que contiene un analito y un producto conjugado que comprende una marca unida a un segundo anticuerpo, en el que el segundo anticuerpo difiere de los anticuerpos fijados a las micropartículas, se introducen en un recipiente de reacción y se permite que reaccionen, por lo que se forma un complejo que comprende una marca que emite una señal luminosa. El recipiente de reacción es capaz de permitir que los complejos que comprenden las marcas que emiten señales luminosas se registren en una imagen. La imagen resultante se puede almacenar para su uso en un momento posterior.

15 La señal luminosa de la imagen se califica antes de ser utilizada como medida de la concentración de un analito. La imagen incluye un número de píxeles, y la imagen se califica y cuantifica sobre una base de píxel por píxel.

20 La calificación implica restringir el análisis a aquellas porciones de la imagen donde se encuentran los complejos y medir el valor de la intensidad de la luz que emana de los complejos en la imagen. Un algoritmo que es adecuado para calificar una señal luminosa de un complejo en una imagen comprende las etapas de:

(a) obtención de una imagen de luz blanca de la mezcla de reacción para determinar la ubicación de los complejos fijados a un soporte sólido y la adquisición de una primera imagen de fluorescencia para determinar la ubicación de un primer producto conjugado en el complejo;

(b) selección de píxeles en la imagen para el análisis;

(c) cálculo y registro de la media y la varianza de recuentos por píxel para los píxeles seleccionados en la etapa (b);

(d) omisión de los píxeles de análisis que tienen recuentos mayores o menores que un nivel especificado de varianza; y

(e) cálculo de la media de recuentos por píxel de los píxeles restantes.

A partir de los datos obtenidos en la etapa (e), se puede determinar la concentración de un analito en una muestra.

35 En una etapa opcional, se puede adquirir una segunda imagen de fluorescencia para determinar la ubicación de un segundo producto conjugado en el complejo. La segunda imagen de fluorescencia se puede utilizar para aumentar la sensibilidad con respecto a la determinación de la concentración de un analito en una muestra.

40 En los inmunoensayos sándwich anteriores, el anticuerpo fijado al soporte sólido es referido a menudo como un anticuerpo de captura. El segundo anticuerpo, que está fijado a la marca, se denomina anticuerpo de detección. El recipiente de reacción puede ser un micro-pocillo de una placa de micropocillos. En un inmunoensayo sándwich típico, después de dejar incubando la mezcla de reacción durante un periodo de tiempo estipulado prescrito, la mezcla de reacción se lava típicamente para eliminar cualquier exceso de anticuerpo de detección y otras sustancias no unidas. A continuación, se toman imágenes del complejo que permanece en el recipiente de reacción, por ejemplo, con un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara digital. A continuación se determina el valor medio de la intensidad luminosa por píxel. El valor así determinado se puede utilizar después para determinar la concentración de antígeno en la muestra.

50 Un método alternativo para proporcionar información adicional relacionada con los ensayos de unión de analito-anticuerpo anteriormente mencionados implica el recuento del número de micropartículas o manchas fluorescentes que satisfacen o exceden al menos un criterio seleccionado para el cálculo de la intensidad. Este método alternativo puede proporcionar un control interno para indicar el funcionamiento adecuado del ensayo. En principio, se puede realizar la comparación de los resultados de ensayo a ensayo para asegurar que cada ensayo es fiable, es decir, suficientemente sensible y suficientemente preciso. El valor medio de la intensidad de fluorescencia por micropartícula se puede utilizar para determinar la concentración de un analito, en contraste con el valor de intensidad por píxel. Los dos valores deben estar de acuerdo con los valores del calibrador, obteniéndose así dos medidas estadísticas que se pueden utilizar para determinar la concentración de un analito.

60 El método descrito en la presente memoria también permite mantener un registro del ensayo de una manera similar a aquellos en los que se mantienen registros de rayos X y de la patología de tejido. Debido a que las imágenes son adquiridas y almacenadas fuera de línea, es decir, a través de almacenamiento de datos informáticos que no están disponibles para su uso inmediato a demanda por el sistema sin intervención humana, se pueden emplear diferentes procedimientos de análisis en una fecha posterior. Un beneficio de esta característica es la habilitación de la comparación directa de los resultados del ensayo de muestras tomadas del mismo paciente en diferentes

momentos. De esta manera, la información sobre una muestra real y sus ensayos no se pierde y se puede compartir o revisar en un momento posterior.

5 El método descrito en la presente memoria aborda problemas inherentes a la medición de la señal total mediante la generación de imágenes de fluorescencia de complejos que comprenden micropartículas después de realizar un ensayo de unión ligando-receptor. En el método descrito en la presente memoria, la medición de la intensidad de la luz emitida a partir del volumen total de una muestra se reemplaza por el análisis de imágenes del complejo que comprende un analito de la muestra con el fin de mejorar la sensibilidad del ensayo. Mediante la incorporación de información espacial que no está contenida en los ensayos de unión ligando-receptor convencionales, se pueden eliminar de la señal generada la agregación de reactivos y la unión no específica y el analito de la muestra puede ser calificado y simultáneamente o posteriormente cuantificado. Por ejemplo, con respecto a la calificación, los artefactos no deseados asociados con una fase sólida, tales como, por ejemplo, micropartículas, pueden ser examinados y eliminados antes del uso de la información de la intensidad. Alternativamente, si se desea medir el grado de agregación de proteínas, se puede medir la información espacial antes mencionada relativa a la agregación, en vez de eliminarla de la señal generada. Por ejemplo, la agregación de amiloides es un indicador de la enfermedad de Alzheimer. Además, con respecto a la cuantificación, el método descrito en la presente memoria permite la omisión de la información de la intensidad de reactivos y productos conjugados que se han unido no específicamente a la pared de un recipiente de reacción y de reactivos y productos conjugados que se difunden en la mezcla de reacción. La información espacial se puede utilizar para definir con precisión la región en una imagen a partir de la cual se debe medir la intensidad para realizar un ensayo de unión ligando-receptor preciso y exacto.

Los ensayos convencionales requieren una gran cantidad de muestra y una gran cantidad de reactivo para proporcionar una señal suficiente. El método descrito en la presente memoria requiere solamente una pequeña cantidad de un material de soporte sólido, tal como, por ejemplo, sólo unos pocos cientos de micropartículas recubiertas, p. ej., hasta aproximadamente doscientas (200) micropartículas, o menos. El método descrito en la presente memoria permite volver a comprobar si hay defectos en las muestras u obtener más información si se dispone de nuevos métodos de análisis.

#### Breve descripción de los dibujos

30 La FIG. 1 es un diagrama esquemático que ilustra un inmunoensayo sándwich.  
 La FIG. 2 es un diagrama esquemático que ilustra un inmunoensayo competitivo.  
 La FIG. 3 es una imagen de fluorescencia de un anticuerpo de captura marcado con un fluoróforo rojo.  
 La FIG. 4 es una imagen de fluorescencia de un anticuerpo de detección unido a una micropartícula.  
 35 La FIG. 5 es una imagen que muestra regiones de interés a partir de las cuales se puede calcular la intensidad media por píxel.  
 La FIG. 6 es una imagen de luz blanca de micropartículas que tienen complejos de un anticuerpo:analito: producto conjugado (es decir, anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE) unido a ellas.  
 40 La FIG. 7 es una imagen de fluorescencia de micropartículas que tienen complejos de un anticuerpo:analito: producto conjugado (es decir, anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE) unido a ellas.  
 La FIG. 8 es una imagen de la región de interés basada en las imágenes de la FIG. 6 y la FIG. 7. La FIG. 8 fue generada por un programa de soporte lógico.  
 45 La FIG. 9 es una superposición de la imagen de fluorescencia de la FIG. 7 sobre la imagen de la región de interés de la FIG. 8.  
 La FIG. 10 es una curva de calibración que muestra el aumento de la sensibilidad de un inmunoensayo resultante del uso de un algoritmo de formación de imágenes descrito en la presente memoria. Para esta curva de calibración, los calibradores del analito (es decir, la troponina) oscilan entre 10 pg/mL y 50.000 pg/mL.  
 50 La FIG. 11 es una curva de calibración que muestra el aumento de la sensibilidad de un inmunoensayo resultante del uso de un algoritmo de formación de imágenes descrito en la presente memoria. Para esta curva de calibración, los calibradores del analito (es decir, la troponina) oscilan entre 0 pg/mL y 200 pg/mL. En la FIG. 11, se muestra también el valor medio de la intensidad de fluorescencia por píxel del área total de la imagen para cada calibrador.  
 55 La FIG. 12 es una curva de calibración que muestra la intensidad de fluorescencia media por píxel para calibradores de un analito (es decir, lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos, denominada alternativamente en la presente memoria "NGAL"). Para esta curva de calibración, los calibradores del analito NGAL oscilan entre 0 pM y 94 pM.  
 60 La FIG. 13 es una curva de calibración que muestra la intensidad de fluorescencia media por píxel para calibradores de un analito (es decir, lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos, denominada alternativamente en la presente memoria NGAL). Para esta curva de calibración, los calibradores del analito NGAL oscilan entre 0 pM y 6 pM.  
 La FIG. 14 es una imagen de luz blanca de micropartículas que tienen complejos de un anticuerpo:analito:

producto conjugado (es decir, anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE) fijados a ellas.

La FIG. 15 es una imagen de una región de interés basada en la imagen de la FIG. 14. La FIG. 14 fue generada por un programa de soporte lógico.

La FIG. 16 es una imagen de fluorescencia de micropartículas que tienen complejos de anticuerpo:analito: producto conjugado (es decir, anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE) fijados a ellas.

La FIG. 17 es una curva de calibración generada a partir del valor de la intensidad media por píxel para cada concentración de la troponina calibradora.

## Descripción detallada

Las siguientes descripciones que se refieren a los términos utilizados en la técnica hacen referencia a la invención sólo en la medida en la que son compatibles con el alcance de la invención como se define en el anterior Compendio de la invención y en las reivindicaciones adjuntas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "analito" representa un compuesto o composición que se va a medir, que puede ser un ligando, que es monoepitópico o poliepitópico, antigénico o hapténico, un solo compuesto o una pluralidad de compuestos que comparten al menos un sitio epitópico común o un receptor.

Un inmunoensayo es una prueba bioquímica que mide la presencia o concentración de una sustancia en soluciones que frecuentemente contienen una mezcla compleja de sustancias. Los analitos en líquidos biológicos tales como suero o orina se someten a ensayo frecuentemente utilizando métodos de inmunoensayo. Tales ensayos se basan en la capacidad única de un anticuerpo para unirse con alta especificidad a uno o un grupo muy limitado de moléculas. Una molécula que se une a un anticuerpo se llama antígeno. Se pueden realizar inmunoensayos para cualquiera de los miembros de un par antígeno/anticuerpo. Además de la especificidad de unión, la otra característica clave de todos los inmunoensayos es un medio para producir una señal medible en respuesta a una unión específica. Históricamente esto se logró mediante la medición de un cambio en algunas características físicas tales como la dispersión de la luz o cambios en el índice de refracción. Sin embargo, la mayoría de los inmunoensayos actuales dependen del uso de un reactivo analítico que esté asociado con una marca detectable. Se ha demostrado una gran variedad de marcas incluyendo enzimas; colorantes fluorescentes, fosforescentes y quimioluminiscentes; partículas de látex y magnéticas; cristalitas colorantes, oro, plata y partículas coloidales de selenio; quelatos metálicos; coenzimas; grupos electroactivos; oligonucleótidos, radicales estables, y otros. Dichas marcas sirven para la detección y cuantificación de los eventos de unión ya sea después de separar reactivos marcados libres y unidos o para diseñar el sistema de tal manera que un evento de unión efectúe un cambio en la señal producida por la marca. Los inmunoensayos que requieren una etapa de separación, a menudo denominados inmunoensayos de separación o inmunoensayos heterogéneos, son populares debido a que son fáciles de diseñar, pero frecuentemente requieren múltiples etapas incluyendo el lavado cuidadoso de una superficie sobre la cual se ha unido el reactivo marcado. Los inmunoensayos en los que la señal se ve afectada por la unión a menudo se pueden ejecutar sin una etapa de separación. Tales ensayos se pueden realizar frecuentemente mezclando simplemente los reactivos y la muestra y realizando una medición física. Tales ensayos se denominan inmunoensayos homogéneos o menos frecuentemente inmunoensayos sin separación.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "inmunoensayo sándwich" significa un inmunoensayo que emplea al menos dos receptores que se unen específicamente al mismo ligando. En este tipo de inmunoensayo, el ligando es el analito. Uno de los receptores es capaz de unirse específicamente al ligando, por lo que el receptor permite que el ligando se ancle directa o indirectamente a un soporte sólido, tal como, por ejemplo, una micropartícula. El otro receptor es capaz de unirse específicamente al ligando, por lo que el receptor permite que el ligando se ancle directa o indirectamente a una marca para proporcionar una señal para detectar el ligando. Por ejemplo, uno de los receptores puede ser un anticuerpo de captura para unirse específicamente a un antígeno en una muestra, con lo que el antígeno se ancla directa o indirectamente a un soporte sólido, tal como, por ejemplo, una micropartícula, y el otro receptor puede ser un anticuerpo de detección para la unión específica al antígeno en la muestra, con lo que el antígeno se ancla directa o indirectamente a una marca para detectar el antígeno. Si una cantidad relativamente alta de ligando está presente en la muestra, se producirá una señal más alta. Si una cantidad relativamente baja de ligando está presente en la muestra, se producirá una señal más baja. La FIG. 1 es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo representativo de un inmunoensayo sandwich.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "inmunoensayo competitivo" significa un inmunoensayo que emplea un receptor que se une a un ligando. En este tipo de inmunoensayo, el ligando es el analito. El receptor es capaz de unirse específicamente al ligando, por lo que el ligando está fijado directa o indirectamente a un soporte sólido, tal como, por ejemplo, una micropartícula. Un ligando marcado compite por el mismo receptor que el analito. Por ejemplo, el receptor puede ser un anticuerpo de captura para unirse específicamente a un antígeno en una muestra, con lo que el antígeno se ancla directa o indirectamente a un soporte sólido, tal como, por ejemplo, una micropartícula. El antígeno de la muestra no está marcado. Un antígeno marcado compite por el mismo anticuerpo

- de captura que el antígeno no marcado. El antígeno marcado que se ancla al soporte sólido proporciona una marca para detectar el antígeno. Alternativamente, en el caso en el que el receptor es un antígeno para la unión específica a un anticuerpo en una muestra, por lo que el anticuerpo está fijado directa o indirectamente a un soporte sólido, tal como, por ejemplo, una micropartícula, un anticuerpo no marcado y un anticuerpo marcado pueden competir por el mismo antígeno. El anticuerpo marcado que se ancla al soporte sólido proporciona una marca para detectar el anticuerpo. Si una cantidad relativamente alta de ligando está presente en la muestra, se producirá una señal más baja. Si está presente una cantidad relativamente baja de ligando en la muestra, se producirá una señal más alta. La FIG. 2 es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo representativo de un inmunoensayo competitivo.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término complejo representa al menos dos moléculas que están específicamente unidas entre sí. Los ejemplos de complejos incluyen, pero no se limitan a, un ligando unido a un receptor, un ligando unido a una pluralidad de receptores, p. ej., un ligando unido a dos receptores, un receptor unido a una pluralidad de ligandos, p. ej., un receptor unido a dos ligandos.
- Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "fase sólida" significa el estado de un receptor en donde el receptor está fijado a una superficie de un soporte sólido de tal manera que el receptor no puede liberarse del soporte sólido en un medio líquido. Una fase sólida se puede separar fácilmente de un líquido en el que se dispersa la fase sólida. Un ejemplo de un soporte sólido al que se puede unir un receptor es una micropartícula, tal como, por ejemplo, una micropartícula magnética. La micropartícula se puede separar fácilmente de un líquido en el que está dispersada. La micropartícula se dispersa fácilmente en un medio acuoso.
- Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "soporte sólido" significa una sustancia que es instrumental en la creación de una fase sólida. Los ejemplos representativos de soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, micropartículas, micropocillos de placas de micropocillos, nanopartículas, geles, coloides, células biológicas.
- Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo de captura" significa un anticuerpo que une a un analito, es decir, un antígeno, a un soporte sólido, con el resultado de que el anticuerpo ancla el analito al soporte sólido, por lo que el analito está unido al sólido soporte directa o indirectamente a través de un radical intermedio o molécula intermedia.
- Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo de detección" significa un anticuerpo que está fijado a un radical o a una molécula que proporciona, o puede fabricarse para proporcionar, una señal detectable en una reacción química o biológica.
- Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "par de unión específica" significa dos moléculas diferentes, donde una de las moléculas tiene un área en la superficie o en una cavidad que se une específicamente a una organización espacial particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específica se denominan ligando y receptor.
- Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "unión no específica" significa la unión entre dos o más entidades, tales como, por ejemplo, dos moléculas, de una manera diferente a la que da como resultado un par de unión específico.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "ligando" significa cualquier sustancia para la cual existe naturalmente o se puede preparar un receptor. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, y elementos químicos, p. ej., cobre, litio.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término receptor significa cualquier compuesto o composición capaz de reconocer una organización espacial y polar particular de una molécula, es decir, sitio epitópico. Los receptores ilustrativos incluyen receptores de origen natural, p. ej., globulina de unión a tiroxina, anticuerpos, enzimas, fragmentos Fab, lectinas y similares.
- La unión de un ligando a un receptor implica una interacción no covalente entre dos especies moleculares. Típicamente, pero no necesariamente, un ligando más pequeño es una molécula soluble que se une a un receptor mayor. Los ejemplos de unión de un ligando a un receptor incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:
- un receptor de ADN de hebra sencilla larga que tiene una secuencia complementaria para un ligando de ADN de hebra sencilla corta;
  - cualquier receptor de anticuerpo que se une a su ligando de antígeno o receptor de antígeno complementario que se une a su ligando de anticuerpo complementario;
  - el receptor de proteína de factor intrínseco que se une al ligando de vitamina B<sub>12</sub>;
  - el receptor de hemoglobina para el ligando de la molécula de oxígeno.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "producto conjugado" significa una entidad que comprende un

miembro de par de unión y un miembro de un sistema productor de señal, p. ej., una marca. Según se utiliza en la presente memoria, el término "marca" significa un miembro de un sistema de producción de señal que está unido directa o indirectamente a un miembro de par de unión o a una micropartícula. Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "sistema de producción de señal" se refiere a un sistema que tiene uno o más componentes, estando al menos un componente conjugado con un miembro del par de unión específica. El sistema productor de señal produce una señal medible que es detectable por medios externos, usualmente la medición de radiación electromagnética, y dependiendo del sistema empleado, el nivel de señal variará en la medida en que el sistema productor de señal esté en el entorno del soporte sólido, p. ej., una micropartícula. En su mayor parte, el sistema productor de señal implicará cromóforos, donde los cromóforos incluyen colorantes que absorben luz en la región ultravioleta o visible, fósforescentes, fluorescentes, fluoróforos, luminóforos y quimioluminiscentes. Además, las enzimas se pueden emplear para producir una señal o para amplificar una señal o las dos cosas anteriores.

Según se utilizan en la presente memoria, los términos "calificar", "calificado" y similares se refieren a un procedimiento para eliminar esas señales de una imagen que no son atribuibles a un complejo que comprende el analito de interés. Tales señales que se eliminan incluyen, pero no se limitan a, señales que surgen de la unión no específica, de la agregación no deseada, o señales que emanan de ubicaciones que no están unidas al soporte sólido. En la mayoría de los casos, pero con algunas excepciones, esas señales que califican el análisis y la medición son el resultado de la unión específica de un producto conjugado que comprende una marca.

Según se utiliza en la presente memoria, y en el campo de la formación de imágenes digitales en general, el término "píxel", o "pel" (elemento de imagen), significa un único punto en una imagen digital, o el elemento de pantalla direccionable más pequeño en un dispositivo de visualización. Es la unidad más pequeña de la imagen que puede ser representada o controlada. Cada píxel tiene su propia dirección. La dirección de un píxel corresponde a sus coordenadas espaciales. Los píxeles se disponen generalmente en una rejilla bidimensional, y se representan a menudo utilizando puntos o cuadrados. Cada píxel es una muestra de una imagen original; más muestras típicamente proporcionan representaciones más exactas del original. La intensidad de cada píxel es variable. El número total de píxeles en una imagen puede variar. Un ejemplo representativo del número de píxeles en una imagen digital es 1024 x 1024.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "intensidad" significa la cantidad o el grado de resistencia de la electricidad, la luz, el calor o el sonido por unidad de área o volumen. Más particularmente, con respecto al método descrito en la presente memoria, el término "intensidad" se refiere al número de fotones contados por unidad de área por unidad de tiempo. Por ejemplo, 1.000 fotones por unidad de área se pueden registrar como 500 recuentos en un solo píxel, mientras que 80 fotones por unidad de área se registran como 40 recuentos en un solo píxel. La conversión en particular depende del sistema de la cámara utilizada. La intensidad es proporcional al número de fotones sometidos a recuento.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "región de interés" se refiere a los píxeles de una imagen que se seleccionan para un análisis posterior. En una imagen, los píxeles pueden ser contiguos o no contiguos.

Según se utiliza en la presente memoria, expresión "información espacial" significa la identificación de una ubicación desde la cual emana una señal.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "IgG" significa inmunoglobulina G.

En una declaración general de la invención descrita en la presente memoria, un ligando se une específicamente a un receptor para formar un complejo ligando-receptor. Se obtiene una imagen del complejo ligando-receptor. La imagen se almacena preferiblemente de modo que pueda utilizarse en un momento posterior, si se desea. Se selecciona una región de interés de la imagen de tal manera que sólo se estudian adicionalmente los complejos ligando-receptor. Esta característica de selección asegura que las señales de fondo y las señales de unión no específica se eliminen sustancialmente de un análisis posterior. Se calcula el número medio de recuentos de luz por píxel en la región de interés.

Los ligandos que son susceptibles del método descrito en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los mencionados en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.275.149. Los receptores que son susceptibles del método descrito en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los mencionados en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.275.149. Los complejos ligando-receptor que son susceptibles del método descrito en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los mencionados en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.275.149.

Los receptores están típicamente fijados a un soporte sólido. Un soporte sólido adecuado para su uso en la presente invención es una micropartícula. Las micropartículas que son adecuadas para su uso con el método descrito en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, micropartículas magnéticas. Los tamaños de las micropartículas varían típicamente desde aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas comercialmente disponibles están disponibles en una amplia variedad de materiales, incluyendo las de cerámica, vidrio, polímeros y metales. Las micropartículas magnéticas adecuadas para su uso en el método descrito en la

presente memoria están comercialmente disponibles en Polymer Laboratories, una filial de Agilent Technologies. Aunque la definición generalmente aceptada de 0,1  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$  complementa la definición de tamaño de nanopartículas, hay otras maneras de definir el tamaño. La aceptación general considera que las micropartículas de menos de 100 nm son nanopartículas. Cualquier micropartícula mayor de 0,5  $\mu\text{m}$  y cualquiera menor de 0,5 mm se considera una micropartícula. En general, el tamaño de las micropartículas adecuadas para su uso con el método descrito en la presente memoria debe ser suficientemente grande para que dos micropartículas puedan ser resueltas por el sistema de formación de imágenes seleccionado. Las propiedades de las micropartículas adecuadas para su uso con el método descrito en la presente memoria, tales como, por ejemplo, el color, son una cuestión de elección. Un experto en la técnica puede seleccionar las propiedades de las micropartículas para cumplir con los requisitos impuestos por las variaciones apropiadas del método.

Los recipientes de reacción que son adecuados para su uso con el método descrito en la presente memoria incluyen placas de micropocillos. Se prefiere que el recipiente de reacción tenga un carácter tal que se pueda elaborar una imagen del complejo ligando-receptor. Se prefiere que el recipiente de reacción sea transparente a la radiación electromagnética, típicamente en el intervalo ultravioleta y visible del espectro. Los materiales que son adecuados para fabricar un recipiente de reacción incluyen vidrio y materiales poliméricos. Se prefiere que el material del recipiente de reacción no sea auto-fluorescente. Sin embargo, la forma o conformación particular del recipiente de reacción no son críticas.

Las condiciones de reacción para los ensayos contemplados para su uso con el método descrito en la presente memoria no son críticas. Sustancialmente se pueden utilizar las mismas condiciones que se utilizan con inmunoensayos convencionales u otras reacciones de unión específicas convencionales. Tales condiciones incluyen, pero no se limitan a, la duración de la incubación, el intervalo de temperaturas de incubación, el número de etapas de lavado, los tampones y otras sustancias no reactivas en los ensayos, y similares. En principio, cualquier inmunoensayo diseñado para su uso como ensayo quimioluminiscente se puede llevar a cabo mediante el método descrito en la presente memoria mediante el uso de una marca fluorescente.

Los sistemas de formación de imágenes adecuados para su uso en el método descrito en la presente memoria pueden ser cualquier sistema capaz de adquirir imágenes de manera que se puedan resolver micropartículas individuales. Los dispositivos de formación de imágenes adecuados para su uso con el método descrito en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, microscopios ópticos, microscopios de barrido, escáneres de formación de imágenes de fluorescencia y similares. Los tipos de archivos de imagen que son adecuados para su uso con el método descrito en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, JPEG/JFIF, GIF, BMP, TIFF y FITS. Los formatos de archivo de imagen se describen en los formatos de archivo Image - Wikipedia, la enciclopedia libre, que es accesible por medio de Hypertext Transfer Protocol en el sitio web en.wikipedia.org/wiki/image\_file\_formats, y FITS se describe en FITS - Wikipedia, la enciclopedia libre, que es accesible por medio de Hypertext Transfer Protocol en el sitio web en.wikipedia.org/wiki/FITS.

La duración de la exposición durante la adquisición de la imagen no es crítica. Los tiempos de exposición adecuados para su uso con el método descrito en la presente memoria pueden ser cualquier tiempo de exposición que proporcione suficiente resolución para discernir detalles relevantes de la imagen.

La selección de la región de interés es importante. A través del uso de un programa informático adecuado, se determina la ubicación de las micropartículas individuales mediante contraste o algunos criterios alternativos. Los píxeles asociados con las micropartículas u otro soporte sólido se pueden considerar una región de interés. Con el fin de obtener un valor significativo de la concentración de un analito en una muestra, se prefiere que al menos aproximadamente 100 micropartículas, más preferiblemente al menos aproximadamente 200 micropartículas estén situadas en una imagen. Los programas informáticos comercialmente disponibles adecuados para su uso en el método descrito en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, aquellos programas que tienen las marcas registradas "SLIDEBOOK" y "METAMORPH" o soporte lógico de dominio público, tal como, por ejemplo, ImageJ.

Con el fin de llevar a cabo una forma simplificada del método, se puede utilizar un microscopio de epifluorescencia comercialmente disponible para formar imágenes de los complejos a través de una superficie transparente sobre la que están soportados. Un ejemplo representativo de dicho microscopio es un microscopio de fluorescencia invertido motorizado (OLYMPUS "IX81") acoplado con una cámara CCD de alta resolución (Hamamatsu Modelo C4742-80-12AG), que están comercialmente disponibles en numerosas fuentes.

En esta forma básica del método, se puede utilizar un enfoque de un solo color para proporcionar una sensibilidad mayor que un inmunoensayo convencional que emplea una señal luminosa del volumen total de una mezcla de reacción. Esta mayor sensibilidad puede ser evidenciada por una gráfica de una función lineal que tiene una pendiente mayor a concentraciones más bajas con respecto a la de una gráfica lineal empleada como una curva de calibración en un inmunoensayo convencional.

Las micropartículas que portan anticuerpos de captura, anticuerpos de detección fijados a fluoróforos y una muestra

que se sospecha que contiene un analito, se combinan en condiciones apropiadas para llevar a cabo un inmunoensayo. Después de realizar el inmunoensayo, se omite cualquier señal de fluorescencia que no emane de un complejo que comprende una micropartícula anclada a un anticuerpo de captura, un analito y un producto conjugado que comprende un anticuerpo de detección fijado a un fluoróforo. A continuación, los complejos restantes se califican adicionalmente basándose en la fluorescencia emitida por el fluoróforo del producto conjugado. Esta última etapa omite cualquier sección en la superficie de la micropartícula que no cumpla los criterios de selección. Basándose en un parámetro estadístico, tal como, por ejemplo, desviación típica, un ejemplo típico de un criterio de selección es que las micropartículas que se van a utilizar para la medición tienen un recubrimiento sustancialmente homogéneo, que elimina esencialmente la agregación excesiva de los productos conjugados, que puede ser el resultado de un alto grado de unión no específica. En general, los criterios de selección varían, dependiendo del ensayo particular. Un experto en la técnica del ensayo particular debería ser capaz de formular criterios de selección significativos para ese ensayo particular. Finalmente, se mide el valor medio de la intensidad por píxel de las partículas calificadas para comparar la intensidad con una curva de calibración que establece la concentración del analito en función de la intensidad. El valor medio de la intensidad por píxel de las partículas calificadas se puede determinar por medio de una cámara CCD, que es capaz de medir la intensidad de la luz. La medida de la intensidad se convierte en un parámetro, que se designa en unidades de recuento. Cada píxel tiene un número correspondiente a la intensidad de luz medida en ese píxel.

De acuerdo con la invención, se obtiene una imagen de luz blanca de la mezcla de reacción. La imagen de luz blanca se emplea para localizar la posición de cada micropartícula. Se forma una imagen de luz blanca utilizando todo el espectro electromagnético para la iluminación y la detección. Esta etapa se lleva a cabo porque es deseable localizar la posición de cada micropartícula. A continuación, se adquiere una imagen de fluorescencia para determinar la ubicación e intensidad de los anticuerpos de detección fijados a micropartículas. La imagen de fluorescencia utiliza un color, por ejemplo, rojo, verde. Se calculan los recuentos por píxel y se registran la media y la desviación típica de los recuentos por píxel. Los píxeles que tienen un recuento mayor o menor que, por ejemplo, dos veces la desviación típica antes mencionada, se omiten del análisis. Se calcula el número medio de recuentos por píxel para los píxeles restantes. La cantidad de señal medida desde la marca del anticuerpo de detección determina la concentración del analito.

Con el fin de llevar a cabo una medición más sofisticada que proporcione un mayor grado de sensibilidad, se puede utilizar un microscopio de epifluorescencia comercialmente disponible para formar imágenes de los complejos a través de una superficie transparente sobre la que están soportados. Un ejemplo representativo de dicho microscopio es un microscopio de fluorescencia invertido motorizado (OLYMPUS "IX81") acoplado con una cámara CCD de alta resolución (Hamamatsu Modelo C4742-80-12AG), que están comercialmente disponibles en numerosas fuentes.

En esta medición más sofisticada, se utiliza un enfoque de doble color para proporcionar una sensibilidad mayor que la de un inmunoensayo convencional que emplea una señal luminosa del volumen total de la mezcla de reacción y una medición realizada por el método de un solo color descrito anteriormente. Esta mayor sensibilidad se evidencia por un gráfico de una función lineal que tiene una mayor pendiente a concentraciones más bajas con respecto a la de una gráfica lineal empleada como una curva de calibración en un inmunoensayo convencional o un ensayo que utiliza el enfoque de un solo color.

Las micropartículas que portan anticuerpos de captura, anticuerpos de detección fijados a fluoróforos y una muestra que se sospecha que contiene un analito se combinan bajo condiciones apropiadas para llevar a cabo un inmunoensayo. Una vez realizado el inmunoensayo, se omite cualquier señal de fluorescencia que no emane de un complejo que comprende una micropartícula anclada a un anticuerpo de captura, un analito y un producto conjugado que comprende un anticuerpo de detección fijado a un primer fluoróforo. A continuación, se obtiene una imagen del anticuerpo de captura (caracterizado por un segundo fluoróforo, que es diferente del primer fluoróforo). Esta imagen omite cualquier píxel correspondiente a cualquier micropartícula que no esté recubierta con anticuerpo de captura de una manera homogénea. Si una micropartícula no está uniformemente recubierta, se omiten los píxeles de la porción que no está uniformemente recubierta. A continuación, el complejo se califica adicionalmente basándose en la fluorescencia emitida por el producto conjugado. Esta última etapa omite cualquier sección del complejo que no cumpla los criterios de selección. Un ejemplo típico de un criterio de selección es el recubrimiento homogéneo, que elimina esencialmente la agregación excesiva de los productos conjugados, que puede resultar de un alto grado de unión no específica. Como se ha indicado anteriormente, los criterios de selección varían, dependiendo del ensayo particular. Finalmente, se mide el valor medio de la intensidad por píxel de las partículas calificadas para comparar la intensidad con una curva de calibración que establece la concentración del analito.

De acuerdo con la invención, se obtiene una imagen de luz blanca de la mezcla de reacción. La imagen de luz blanca se emplea para localizar la posición de cada soporte sólido, p. ej., una micropartícula. Se forma una imagen de luz blanca utilizando todo el espectro electromagnético para la iluminación y la detección. Esta etapa se lleva a cabo porque es deseable localizar la posición de cada micropartícula. A continuación, se adquiere una primera imagen de fluorescencia para determinar las ubicaciones de los anticuerpos de captura fijados a micropartículas. La primera imagen de fluorescencia utiliza un color, p. ej., rojo, verde. Se adquiere una segunda imagen de

fluorescencia para determinar las ubicaciones de los anticuerpos que están presentes como un componente de un producto conjugado. La segunda imagen de fluorescencia utiliza un color, p. ej., rojo, verde, pero el color de la segunda imagen de fluorescencia difiere del color de la primera imagen de fluorescencia. Los píxeles derivados tanto de un anticuerpo de captura de una micropartícula como de un anticuerpo en un producto conjugado se seleccionan para su análisis posterior. Se calculan los recuentos por píxel y se registran el promedio y la desviación típica de los recuentos por píxel. Los píxeles que tienen un recuento mayor o menor que, por ejemplo, dos veces la desviación típica antes mencionada, se omiten del análisis. Se calcula el número promedio de recuentos por píxel para los píxeles restantes. La cantidad de señal medida desde la marca del anticuerpo de detección determina la concentración del analito.

Las FIGS. 3, 4 y 5 ilustran las etapas requeridas para calificar los resultados de un ensayo de unión ligando-receptor. Se define un canal de fluorescencia con un conjunto de filtros que comprende un filtro de excitación y un filtro de emisión, que permite que la luz que tiene una longitud de onda específica alcance la muestra y una señal que tiene una longitud de onda específica alcance la cámara CCD. Por ejemplo, el fluoróforo R-ficoeritrina (alternativamente denominado en la presente memoria "PE") sólo se puede detectar en el canal de PE y no se puede detectar en ningún otro canal de fluorescencia. De forma similar, el fluoróforo indodicarbocianina (denominada alternativamente en la presente memoria "Cy5") sólo se puede detectar en el canal Cy5 y no se puede detectar en ningún otro canal de fluorescencia. En la FIG. 3, un canal del detector mide la imagen de fluorescencia de un anticuerpo de captura, que se marcó con fluoróforos rojos (canal Cy5). Sólo aparecen micropartículas que han sido recubiertas con anticuerpo de captura que tiene la marca roja fluorescente. Hay dos lugares (círculos blancos) que se pueden omitir porque no están fijados a la micropartícula. En la FIG. 4, otro canal del detector mide la imagen de fluorescencia de un anticuerpo de detección fijado a la micropartícula. Aparece un punto muy brillante que no es compatible con el perfil de intensidad de las otras micropartículas y se designa con un círculo blanco. Esta ubicación también se puede omitir en el análisis. La FIG. 5 indica la región de interés a partir de la cual se pueden calcular los valores de intensidad por píxel. Las áreas que no cumplieron con los criterios de selección dados pueden omitirse en este tipo de análisis.

Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran adicionalmente realizaciones de esta invención. En los siguientes ejemplos, todas las concentraciones son en peso (p/p) a menos que se indique lo contrario. En los siguientes ejemplos, los productos conjugados se prepararon por medios convencionales conocidos por los expertos en la técnica, a menos que se indique lo contrario. En el Ejemplo 1, a menos que se indique lo contrario, las micropartículas que portan un recubrimiento de anticuerpo monoclonal anti-troponina 19C7 pero que todavía no han reaccionado en un inmunoensayo se denominan "micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-troponina 19C7"; las micropartículas que han reaccionado en un inmunoensayo y que están presentes en un complejo sándwich se denominan "micropartículas ancladas al complejo de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina: producto conjugado M06-PE". En el Ejemplo 2, a menos que se indique lo contrario, las micropartículas que portan un recubrimiento de anticuerpo monoclonal anti-IgG humana pero que todavía no han reaccionado en un inmunoensayo se denominan "micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana"; las micropartículas que han reaccionado en un inmunoensayo y que están presentes en un complejo sándwich se denominan "micropartículas ancladas al complejo de producto conjugado 2322-Cy5:NGAL:producto conjugado 903-PE".

#### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra un inmunoensayo para troponina, mediante el uso de un solo colorante fluorescente como marca para el anticuerpo de detección.

Se prepararon micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-troponina 19C7. Se preparó un conjunto de calibradores para troponina (TnI (28-110aa)-TnC) a la siguiente concentración en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) (0,5%), agente tensioactivo ("STANDAPOL", 0,2%), y agente antimicrobiano ("PROCLIN" 300, 0,1%). La siguiente tabla enumera las concentraciones de Tn (28-110aa)-TnC en cada calibrador.

Tabla 1

	Concentración de TnI (28-110aa)-TnC (pg/mL)
Calibrador A	0
Calibrador B	10
Calibrador C	100
Calibrador D	500
Calibrador E	10.000

	Concentración de TnI (28-110aa)-TnC (pg/mL)
Calibrador F	50.000
Control Bajo	20
Control Medio	200
Control Elevado	15.000

Se preparó un producto conjugado que comprendía anticuerpo monoclonal anti-troponina M06 y ficoeritrina (PE) por medio de un kit de conjugación R-PE (PJ31 K, Prozyme Inc.) de acuerdo con el protocolo sugerido en el mismo. El producto conjugado se denomina en la presente memoria "producto conjugado M06-PE".

La R-ficoeritrina, o PE, es útil en el laboratorio como un indicador basado en fluorescencia para el marcaje de anticuerpos u otras moléculas en una variedad de aplicaciones. La R-ficoeritrina absorbe fuertemente a aproximadamente 566 nm con picos secundarios a 496 y 545 nm y emite fuertemente a 575 nm. La R-ficoeritrina se encuentra entre los colorantes fluorescentes más brillantes jamás identificados. Véase, por ejemplo, Ficoeritrina - Wikipedia, la enciclopedia libre, que es accesible por medio de Hypertext Transfer Protocol en el sitio web en.wikipedia.org/wiki/ficoeritrina y R-PHYCOERYTHRIN (PB31), ProZyme Inc., Hayward, CA.

Cada calibrador (100  $\mu$ L) se mezcló con micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-troponina 19C7 (2,5  $\mu$ L, 0,1%) y el producto conjugado M06-PE (2  $\mu$ L, 68 nM) en una placa de fondo de vidrio de 96 micropocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa de fondo de vidrio se utilizó para reducir el nivel de autofluorescencia. La placa de fondo de vidrio de 96 pocillos se colocó a continuación sobre un imán ("DYNAL" "MPC"-96B) para atraer las micropartículas ancladas a los complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE a los fondos de los micropocillos durante la etapa de lavado. En la etapa de lavado, se añadió solución salina tamponada con fosfato (100  $\mu$ L) a cada micro-pocillo y luego se eliminó rápidamente. Esta etapa se repitió dos veces. Se añadió solución salina tamponada con fosfato (50  $\mu$ L) a cada micro-pocillo después de la etapa de lavado final y la placa se colocó en un microscopio de fluorescencia invertido motorizado (OLYMPUS "IX81") acoplado con una cámara CCD de alta resolución (Hamamatsu Modelo C4742-80 -12AG). Después de que las micropartículas ancladas a los complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE se asentaron en el fondo de los micropocillos, se tomaron imágenes de las micropartículas ancladas a los complejos de anticuerpo monoclonal-antígeno-anticuerpo-anticuerpo monoclonal con un objetivo UPlanSApo 20X (OLYMPUS) en el canal de luz blanca y el canal para el fluoróforo de PE. El área de visión de cada imagen era de aproximadamente 400 micrómetros x 300 micrómetros y usualmente tenía aproximadamente 100 micropartículas ancladas a complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE. Se creó una pluralidad de localizaciones dentro de un micropocillo dado para mejorar el análisis estadístico.

La FIG. 6 muestra imágenes de luz blanca de las micropartículas unidas a los complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE. La FIG. 7 muestra imágenes de fluorescencia de las micropartículas unidas a los complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE. La imagen de luz blanca se utilizó para localizar la posición de cada micropartícula individual unida a un complejo de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE, basándose en el contraste de las micropartículas individuales unidas a los complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE con el fondo. La FIG. 8 muestra las ubicaciones de micropartículas individuales unidas a complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE, que se definieron como la región de interés. La región de interés comprende los puntos de luz de la FIG. 8. El valor medio de la intensidad de fluorescencia por píxel en la región de interés se calculó a continuación utilizando la imagen digital en el canal de PE. En la FIG. 9, había puntos sustancialmente más pequeños que las micropartículas que no se solapaban con la región de interés. Estos puntos de alta intensidad de fluorescencia emanaron de los productos conjugados M06-PE que no estaban específicamente unidos a la superficie de la placa de micropocillos. Estos puntos fueron excluidos del análisis. El enfoque de formación de imágenes y análisis descrito en la presente memoria redujo en gran medida las señales de fondo que no emanaron de las micropartículas unidas a complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE. Los valores de intensidad de todos los calibradores se utilizaron para generar una curva de calibración. Debido al limitado rango dinámico del detector, se utilizó un tiempo de exposición más corto para calibradores en donde las concentraciones de analito son más altas. La FIG. 10 muestra una curva de calibración ampliada de calibradores que varía de 10 pg/mL a 50.000 pg/mL. La FIG. 11 muestra una curva de calibración ampliada de calibradores que varía de 0 pg/mL a 200 pg/mL. En el gráfico ampliado, el valor promedio de la intensidad de fluorescencia por píxel del área total de la imagen para cada calibrador se representó también como comparación. Es evidente que el uso de información espacial de la imagen aumentó mucho la pendiente de la curva, mejorando así la sensibilidad del inmunoensayo.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra un inmunoensayo para la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (alternativamente denominada en la presente memoria como "NGAL"), mediante el uso de dos colorantes fluorescentes, uno como una marca para el anticuerpo de captura y el otro como una marca para el anticuerpo de detección.

Se prepararon micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana. Se preparó un conjunto de calibradores para la lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos que oscilaba entre 94 pM y 0,7 pM utilizando tampón HBS-EP.

Se preparó un producto conjugado que comprendía anticuerpo monoclonal anti-NGAL 2322 y un colorante fluorescente (Cy5) y un producto conjugado que comprendía anticuerpo monoclonal anti-NGAL 903 y R-ficoeritrina (PE). El anticuerpo monoclonal 2322 marcado con el fluoróforo Cy5 se denomina en la presente memoria "producto conjugado 2322-Cy5". El anticuerpo monoclonal 903 marcado con el fluoróforo PE se denomina en la presente memoria "producto conjugado 903-PE".

El anticuerpo monoclonal 2322 y el anticuerpo monoclonal 903 son anticuerpos monoclonales que se pueden unir específicamente a NGAL. El anticuerpo monoclonal 2322 es un anticuerpo quimérico humano, y el anticuerpo monoclonal 903 es un anticuerpo de ratón. Las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana se pueden unir directamente al anticuerpo monoclonal 2322.

Cy5 es un colorante fluorescente soluble en agua reactivo de la familia de colorantes de la cianina. Cy5 es fluorescente en la región roja del espectro electromagnético (aproximadamente 650 nm o 670 nm) pero absorbe en la región naranja del espectro electromagnético (aproximadamente 649 nm). Cy5 también se utiliza para marcar proteínas y ácido nucleico para diversos estudios, incluyendo la proteómica y la localización de ARN. Véase, por ejemplo, "Technical Information on Probes Conjugated to Affinity-Purified Antibodies and to Other Proteins: Cyanine Dyes (Cy2, Cy3, and Cy5)", que es accesible por medio de Hypertext Transfer Protocol en la Red en el sitio [jacsonimmuno.com/technical/f-cy3-5.asp](http://jacsonimmuno.com/technical/f-cy3-5.asp).

Las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana se bloquearon con el anticuerpo monoclonal 903. Dado que el anticuerpo monoclonal 903 es un anticuerpo monoclonal de ratón, éste no debe reaccionar de forma cruzada con micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana. Sin embargo, se encontró cierta reactividad cruzada cuando las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana se incubaron con el anticuerpo monoclonal 903 marcado con un fluoróforo de PE. Si las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana se tratan primero con el anticuerpo monoclonal 903 y luego se hacen reaccionar con el anticuerpo monoclonal 903 marcado con un fluoróforo PE, la reactividad cruzada de las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana con el anticuerpo monoclonal 903 marcado con un fluoróforo PE es muy reducida. El valor medio de la intensidad de fluorescencia por píxel calculado a partir de la región de interés en las imágenes fue de 336 para las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana cuando se trataron con el producto conjugado 903-PE y de 136 para micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana que se habían tratado primero con el anticuerpo monoclonal 903 y después se habían hecho reaccionar con el producto conjugado 903-PE. Los ensayos adicionales mostraron que el tratamiento de las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana con el anticuerpo monoclonal 903 no disminuye la señal generada a partir del analito NGAL. Cuando la concentración de NGAL es relativamente alta, el efecto de la señal en el fondo de la imagen no es significativo.

La Tabla 2 muestra la intensidad de fluorescencia de una muestra que contiene NGAL 0 pM utilizando (a) micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana que fueron tratadas con anticuerpo monoclonal 903 y (b) micropartículas no tratadas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana. La intensidad de las micropartículas tratadas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana es aproximadamente 40% de la de las micropartículas no tratadas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana.

Tabla 2

Sin NGAL en la muestra		
	Valor medio de la intensidad por píxel para micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana y tratadas con anticuerpo monoclonal 903 (recuentos por píxel)	Valor medio de la intensidad por píxel para las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana pero no tratadas con el anticuerpo monoclonal 903 (recuentos por píxel)
Imagen 1	121,5	302,8
Imagen 2	125,4	320,0

Sin NGAL en la muestra		
	Valor medio de la intensidad por píxel para micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana y tratadas con anticuerpo monoclonal 903 (recuentos por píxel)	Valor medio de la intensidad por píxel para las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana pero no tratadas con el anticuerpo monoclonal 903 (recuentos por píxel)
Imagen 3	143,4	350,6
Imagen 4	154,3	354,3
Imagen 5	136,2	355,0
Media	136,2*	336,5*
Desviación típica	13,3	23,8

\* Los recuentos de oscuridad de la cámara se restan de la intensidad

5 La Tabla 3 muestra la intensidad de fluorescencia medida para una muestra que contiene NGAL 300 pM utilizando las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana que fueron tratadas con el anticuerpo monoclonal 903 e intensidad de fluorescencia medida para una muestra que contiene NGAL 300 pM utilizando micropartículas no tratadas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana. El inmunoensayo realizado con el propósito de determinar la eficacia del uso del anticuerpo monoclonal 903 como un agente bloqueante se llevó a cabo de la misma manera que los inmunoensayos que se realizaron para verificar la concentración de NGAL. Las imágenes se midieron con un tiempo de exposición más corto que el utilizado para las imágenes caracterizadas en la Tabla 1.

Tabla 3

NGAL 300 pM en la muestra		
	Valor medio de la intensidad por píxel para micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana y tratadas con anticuerpo monoclonal 903 (recuentos por píxel)	Valor medio de la intensidad por píxel para las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana pero no tratadas con el anticuerpo monoclonal 903 (recuentos por píxel)
Imagen 1	1491,8	1463,6
Imagen 2	1513,7	1467,0
Imagen 3	1520,5	1493,2
Imagen 4	1521,2	1495,1
Imagen 5	1535,6	1538,4
Media	1516,6	1491,4
Desviación típica	16,0	30,0

15 Las micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana (1 mL, 0,01%) se incubaron con el anticuerpo monoclonal 903 (70 nM) durante 15 minutos. Las micropartículas así tratadas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana se separaron de la mezcla de reacción por medio de un imán y después se lavaron con tampón HBS-EP. Las micropartículas así tratadas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana se reconstituyeron a continuación hasta una concentración de 0,01% con tampón HBS-EP. En la primera fila de micropocillos de una placa de micropocillos que tenía 96 micropocillos, se prepararon diversas concentraciones de NGAL (94 pM, 47 pM, 23 pM, 12 pM, 6 pM, 3 pM, 1,5 pM, 0,7 pM, 0 PM). Cada micro-pocillo contenía 100 µL de líquido. Se añadieron el anticuerpo monoclonal 2322 marcado con fluoróforo Cy5 (25 µL, 2 nM) y el anticuerpo monoclonal 903 marcado con fluoróforo PE (8 µL, 20 nM) a la primera fila de micropocillos de la placa. Las mezclas de reacción se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgG humana (25 µL, 0,01%) a cada micropocillo de la primera fila. Las mezclas de reacción se incubaron durante 20 minutos más. Las micropartículas unidas a los complejos de producto conjugado 2322-Cy5:NGAL:producto conjugado 903-PE se atrajeron a un imán y luego se lavaron tres veces con tampón HBS-EP. Las muestras se transfirieron a una placa de micropocillos en la que los micro-pocillos tenían fondos de vidrio. La placa de micropocillos se colocó en el microscopio de fluorescencia (OLYMPUS IX81) y las imágenes se tomaron de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1 en el canal de luz blanca, en el canal de PE y en el canal de Cy5.

Se utilizó la imagen de luz blanca para localizar las posiciones de micropartículas individuales unidas a complejos de producto conjugado 2322-Cy5:NGAL:producto conjugado 903-PE basándose en el contraste entre las micropartículas individuales unidas a complejos de producto conjugado 2322-Cy5:NGAL:producto conjugado 903-PE y el fondo. Las ubicaciones de las micropartículas individuales unidas a complejos de producto conjugado 2322-Cy5:NGAL:producto conjugado 903-PE se definieron como regiones de interés. Las regiones de interés se analizaron adicionalmente estableciendo un umbral en el canal Cy5, con lo que sólo aquellas áreas en las micropartículas unidas a complejos de producto conjugado 2322-Cy5:NGAL:producto conjugado 903-PE con anticuerpo monoclonal 2322 marcado con fluoróforo Cy5 específicamente unido a las micropartículas ancladas a complejos de producto conjugado 2322-Cy5:NGAL:producto conjugado 903-PE se utilizan para el análisis posterior. El valor medio de la intensidad de fluorescencia por píxel de la región de interés en el canal PE se calculó por medio de un programa informático comercialmente disponible ("SLIDEBOOK").

La tabla siguiente enumera el valor medio de la intensidad por píxel del canal de PE para cada concentración de analito a la duración de exposición correspondiente. Se utilizaron tres duraciones de exposición diferentes para aumentar el rango dinámico del ensayo.

Tabla 4

Tiempo de exposición (ms)	Número de micropartículas	Concentración de NGAL (pM)	Intensidad media por píxel (recuentos por píxel)	Desviación típica (recuentos por píxel)
200	176	0	342	5
200	187	0,72	391	23
200	225	1,46	477	20
200	275	2,92	613	23
200	323	5,85	885	38
200	401	11,7	1625	90
200	342	23,4	2558	19
50	525	11,7	526	10
50	405	23,4	859	23
50	458	46,8	1294	95
50	342	93,75	1931	52

La FIG. 12 muestra curvas de calibración para NGAL generadas a partir de los datos de la Tabla 4. FIG. La FIG. 13 muestra la curva de calibración a concentraciones extremadamente bajas de calibrador. Se utilizaron tres algoritmos diferentes para demostrar los beneficios de la presente invención. El algoritmo 2 y el algoritmo 3 mejoraron en gran medida la sensibilidad del ensayo.

Los datos del Algoritmo 1 aparecen como círculos rellenos (●) en el gráfico. Se calculó el valor medio de la intensidad de toda la imagen en el canal de PE. No se utilizó información espacial. Este algoritmo es equivalente a una medida de intensidad total.

Los datos del Algoritmo 2 aparecen como cuadrados rellenos (■) en el gráfico. Todas las micropartículas se seleccionaron como regiones de interés utilizando la imagen de luz blanca basada en el nivel de contraste. Las dimensiones de las regiones de interés se redujeron fijando un umbral en el canal de PE. El punto de corte se seleccionó arbitrariamente y fue igual al valor medio de la intensidad de fluorescencia de la imagen desde el canal de PE más o menos tres desviaciones típicas. Sin embargo, podrían haberse utilizado otros valores de corte.

Los datos para el Algoritmo 3 aparecen como cuadrados vacíos (□) en el gráfico. Se seleccionó un área de las micropartículas unidas a complejos de anticuerpo monoclonal:antígeno:anticuerpo monoclonal con una intensidad por encima de un umbral en el canal de Cy5 y, a continuación, se calculó el valor medio de la intensidad de fluorescencia del canal de PE. Se redujeron las señales generadas por unión no específica. El punto de corte se seleccionó arbitrariamente y fue igual al valor medio de la intensidad de fluorescencia de la imagen desde el canal de PE más o menos tres desviaciones típicas. Sin embargo, podrían haberse utilizado otros valores de corte.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra un inmunoensayo homogéneo para la troponina, mediante el uso de un solo colorante fluorescente como marca para el anticuerpo de detección. En algunos inmunoensayos, donde la concentración de analito está en el intervalo de ng/mL, es posible realizar un inmunoensayo homogéneo utilizando el método descrito

en la presente memoria. Tales inmunoensayos se llevan a cabo simplemente mezclando los reactivos y la muestra y realizando una medición física. Los inmunoensayos homogéneos son deseables porque son fáciles de llevar a cabo.

5 Todos los reactivos y parámetros de formación de imágenes utilizados en este ejemplo fueron los mismos que los utilizados en el Ejemplo 1. Cada calibrador (100  $\mu$ L) se mezcló con micropartículas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-troponina 19C7 (2  $\mu$ L, 0,1%) y el producto conjugado M06-PE (5  $\mu$ L, 20 nM) en una placa de 96 micropocillos de vidrio durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa de fondo de vidrio se utilizó para reducir el nivel de auto-fluorescencia. A continuación se añadió PBS (200  $\mu$ L) a cada micro-pocillo para reducir la concentración del producto conjugado y para reducir la intensidad de fluorescencia del fondo. La placa se colocó en un microscopio de fluorescencia invertido motorizado (OLYMPUS "IX81") acoplado con una cámara CCD de alta resolución (Hamamatsu Modelo C4742-80-12AG). Después de que las micropartículas fijadas a los complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE se asentaran en el fondo de los micropocillos, se tomaron imágenes de las micropartículas unidas a los complejos de anticuerpo monoclonales 19C7:troponina: producto conjugado M06-PE con un objetivo de 20 X UPlanSApo (OLYMPUS) en el canal de luz blanca y el canal de PE. La imagen de luz blanca, mostrada en la FIG. 14, se utilizó para localizar la posición de cada micropartícula individual unida a un complejo de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE, basándose en el contraste de las micropartículas individuales unidas a los complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina: producto conjugado M06-PE con el fondo. La FIG. 15 muestra las ubicaciones de las micropartículas individuales unidas a los complejos de anticuerpo monoclonal 19C7:troponina:producto conjugado M06-PE, cuyas ubicaciones se definieron como la región de interés. El valor medio de la intensidad de fluorescencia por píxel en la región de interés se calculó a continuación utilizando la imagen digital en el canal de PE, como se muestra en la FIG. 16. El uso de la información espacial de la imagen hizo posible eliminar una etapa de lavado y simplificar el ensayo a un ensayo homogéneo de una etapa. La FIG. 17 muestra la curva de calibración calculada en este ejemplo. Aunque en este ejemplo se utilizó un microscopio de epifluorescencia convencional, se prefiere un microscopio confocal o TIRF (fluorescencia de reflexión interna total), porque este tipo de microscopio tiene una mejor resolución en el plano z, que puede eliminar señales desde arriba del plano focal donde se colocan micropartículas, disminuyendo así la señal de fondo. Una etapa de dilución (adición de tampón directamente a la mezcla de reacción) justo antes de la medición puede reducir aún más el fondo de fluorescencia de los productos conjugados de anticuerpo excesivos y, de este modo, mejorar la sensibilidad de los ensayos.

30 Otro método para eliminar la etapa de lavado en el inmunoensayo implica el análisis por espectroscopia de correlación de imágenes (ICS). El análisis de espectroscopía de correlación de imágenes espacio-temporal (STICS) es una extensión de ICS en la que se adquiere una serie de imágenes de la muestra. Estas imágenes incluyen información tanto espacial como temporal; los productos conjugados unidos a las micropartículas mediante la formación de un complejo sándwich están inmóviles mientras que el exceso de productos conjugados no unidos se difunde libremente en la solución. El análisis STICS puede separar la población de productos conjugados inmóvil de la población de producto conjugado difusa. Hay otras extensiones de ICS, tales como Espectroscopia de Correlación de Imágenes en el espacio  $k$  (kICS) y también versiones de correlación cruzada de ICS (CCICS). Además, realizando el análisis de espectroscopia de correlación de imágenes (ICS) en las imágenes, se puede obtener información adicional sobre la muestra. Por ejemplo, en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, es posible utilizar ICS para cuantificar el tamaño de las placas amiloides en una imagen, así como eliminar las moléculas sometidas a difusión.

45 Diversas modificaciones y alteraciones de esta invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de esta invención, y se debe entender que esta invención no se debe limitar indebidamente a las realizaciones ilustrativas expuestas en la presente memoria.

50

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar la concentración de un analito en un inmunoensayo que comprende las etapas de:
  - 5 (a) realizar un inmunoensayo que implica un receptor fijado a un soporte sólido, en donde el inmunoensayo implica la etapa de combinar un anticuerpo de captura fijado a una micropartícula, un producto conjugado que comprende un anticuerpo de detección fijado a una marca fluorescente y una muestra que se sospecha que contiene un antígeno en un recipiente de reacción y permitir la formación de un complejo, comprendiendo el complejo la micropartícula fijada al anticuerpo de captura, el analito y el producto conjugado;
  - 10 (b) adquirir una imagen de luz blanca de la mezcla de reacción con el fin de determinar la ubicación de la micropartícula en el inmunoensayo de la etapa (a) y una imagen de fluorescencia de la mezcla de reacción con el fin de determinar la ubicación del producto conjugado en el inmunoensayo de la etapa (a);
  - 15 (c) seleccionar al menos una región de interés a partir de las imágenes adquiridas en la etapa (b), en donde la al menos una región de interés es una región a partir de la cual emanan señales luminosas del complejo formado en la etapa (a);
  - (d) seleccionar píxeles en la al menos una región de interés para el análisis;
  - (e) calcular y registrar la media y la varianza de los recuentos por píxel para los píxeles seleccionados en la etapa (d), en donde el recuento por píxel es el número de fotones sometidos a recuento por píxel por unidad de tiempo;
  - 20 (f) omitir píxeles que tienen recuentos mayores o menores que una varianza especificada;
  - (g) calcular los recuentos medios por píxel de los píxeles restantes; y
  - (h) determinar la concentración del analito a partir de los datos de la etapa (g).
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde las imágenes adquiridas en la etapa (b) son imágenes digitales.
3. El método de la reivindicación 1, en donde sólo se requieren hasta aproximadamente doscientas (200) micropartículas recubiertas.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, en donde las imágenes adquiridas en la etapa (b) se registran mediante un microscopio de fluorescencia equipado con una cámara digital.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el registro del ensayo se almacena en la memoria de datos informáticos.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en donde las imágenes adquiridas en la etapa (b) son adquiridas y almacenadas fuera de línea.
7. El método de la reivindicación 1, en donde se utiliza información espacial para calificar y cuantificar los resultados de un ensayo de unión ligando - receptor.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en donde la marca fluorescente es R-ficoeritrina o indodicarbocianina.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el analito es un anticuerpo de troponina o lipocalina asociado a gelatinasa de neutrófilos (NGAL).
- 45 10. El método de la reivindicación 1, en donde los píxeles omitidos de la etapa (f) tienen recuentos mayores o menores de dos veces la varianza.

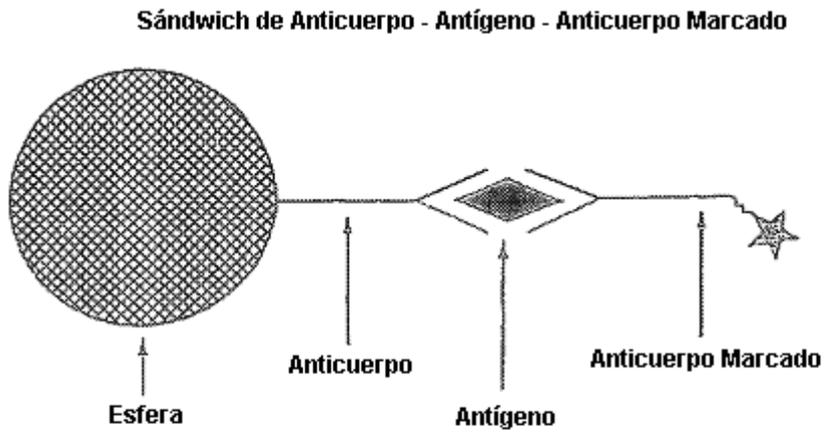
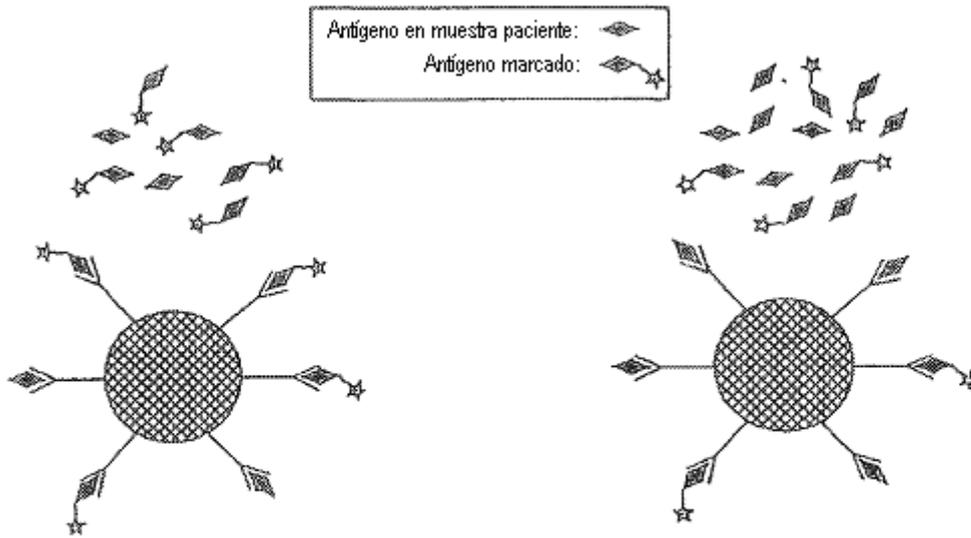


FIG. 1

**Ensayo competitivo**



**Paciente con baja concentración de antígeno**

**Paciente con alta concentración de antígeno**

**FIG. 2**

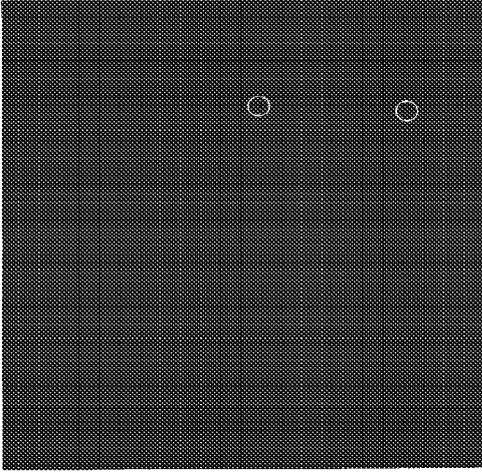


FIG. 3

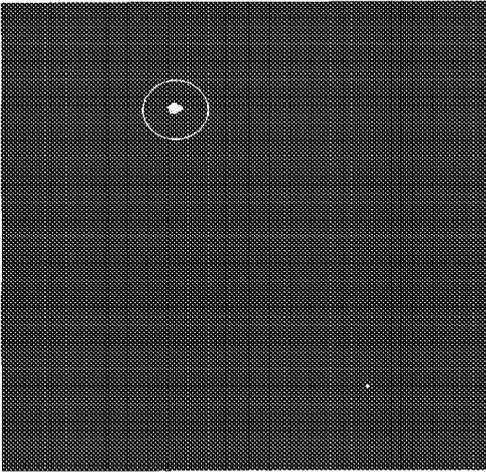


FIG. 4

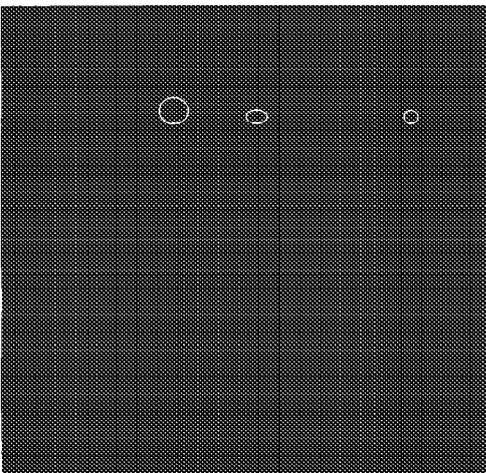


FIG. 5

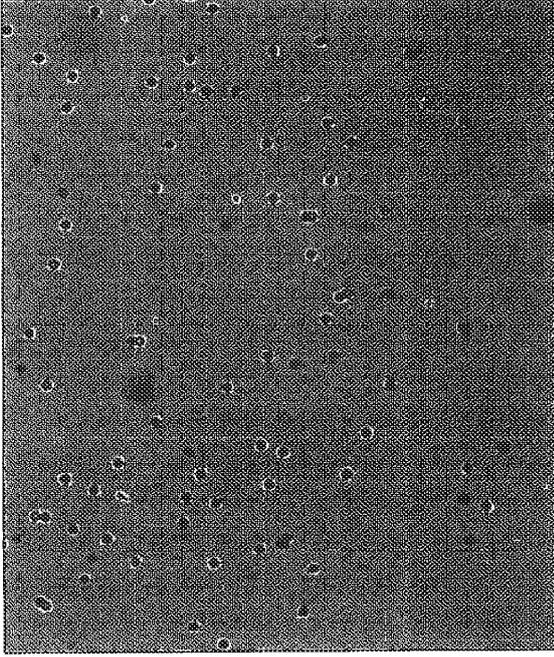


FIG. 6

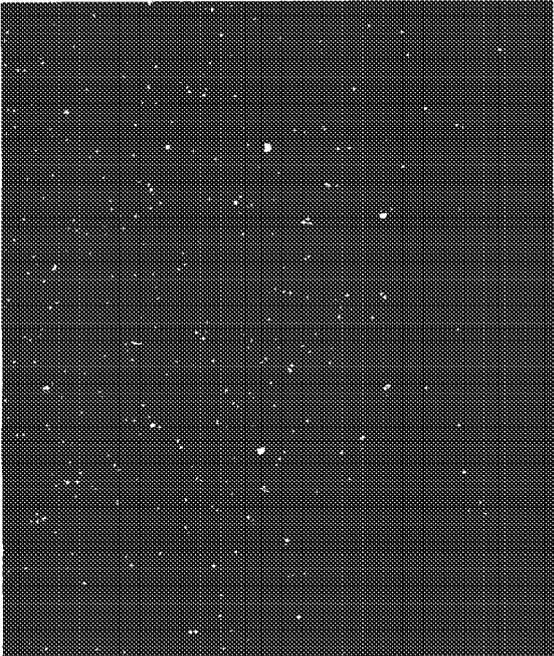


FIG. 7

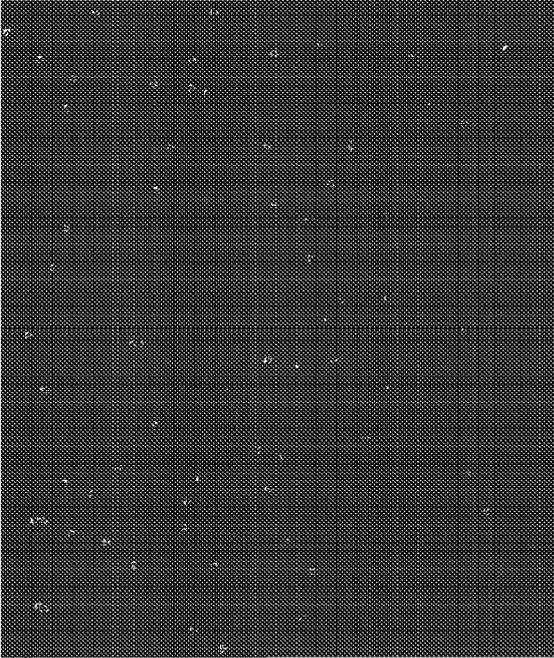


FIG. 8

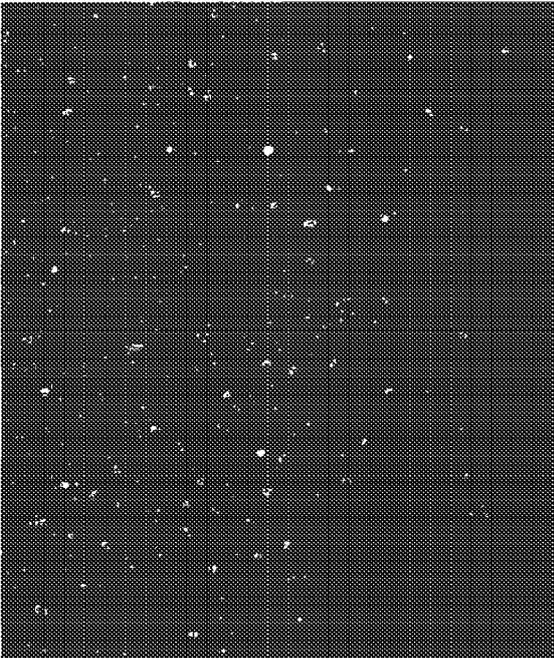


FIG. 9



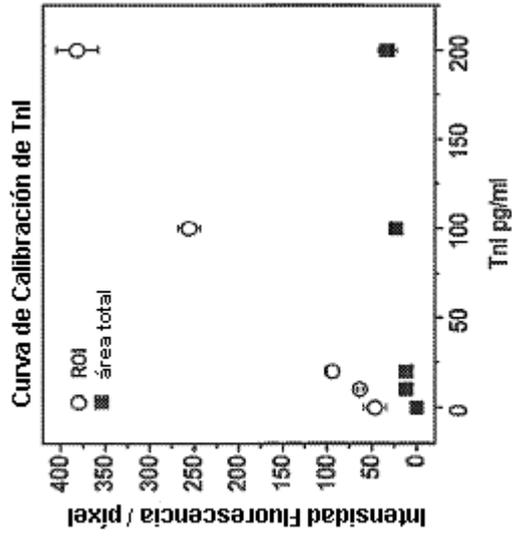


FIG. 11

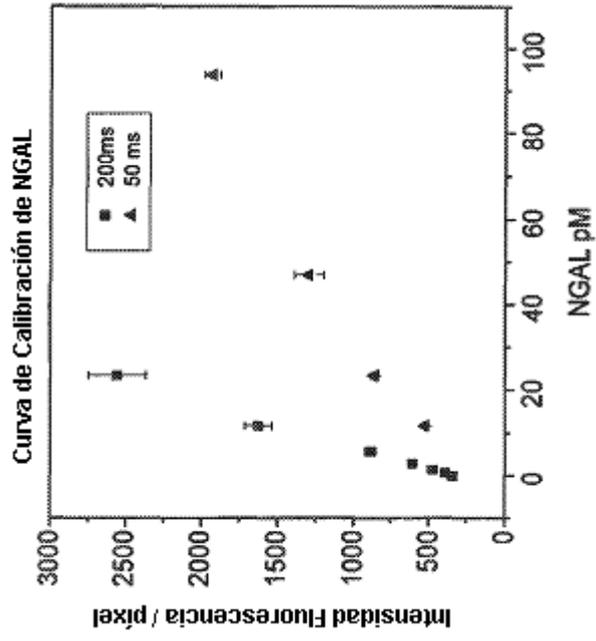


FIG. 12

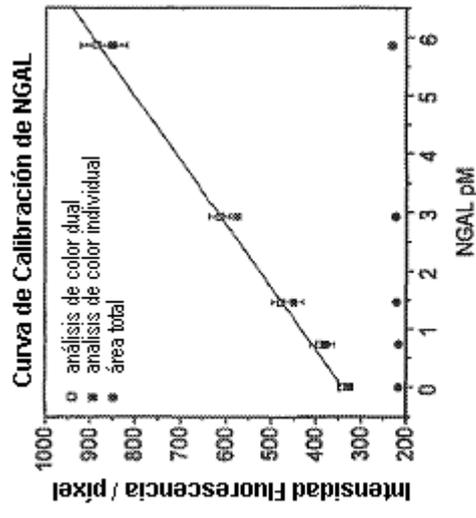


FIG. 13

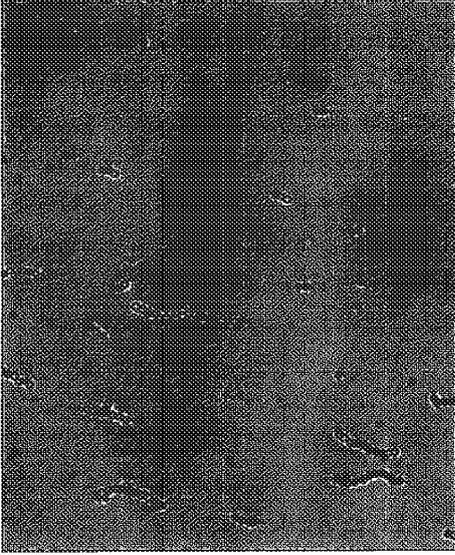


FIG. 14

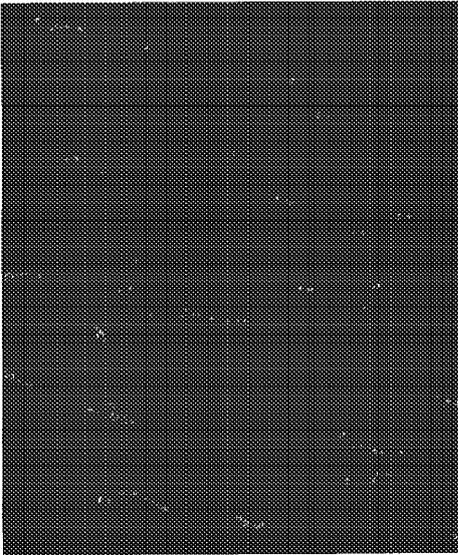


FIG. 15

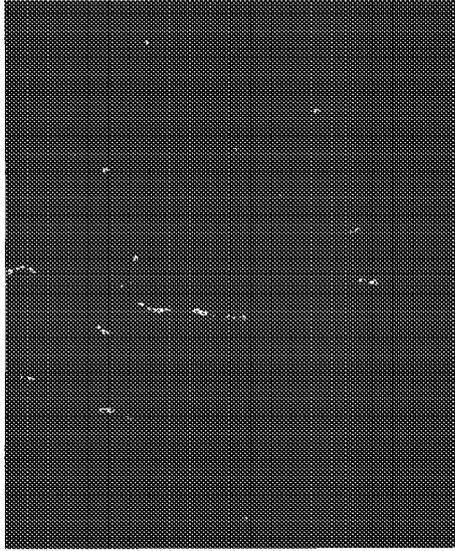


FIG. 16

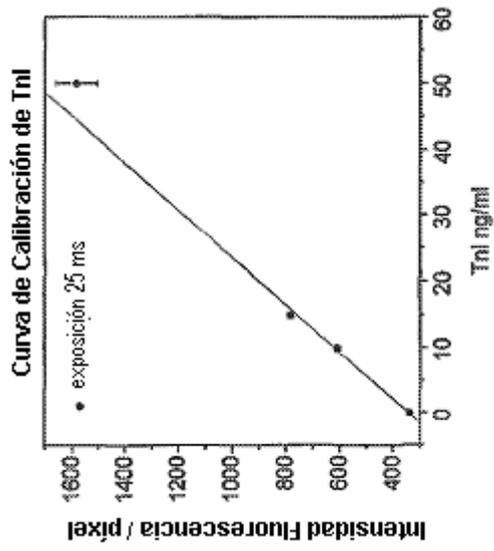


FIG. 17