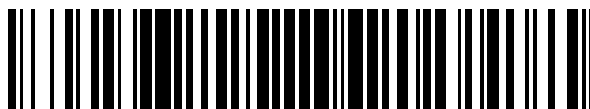


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 602**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)
G06T 7/00 (2007.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G06K 9/00 (2006.01)
G06K 9/46 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016** **PCT/EP2016/058367**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16166295**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016** **E 16716580 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019** **EP 3283879**

54 Título: **Procedimiento para la detección delimitada por espacios de reacción de uno o varios analitos en una muestra**

30 Prioridad:

15.04.2015 EP 15163773

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2019

73 Titular/es:

**ATTOMOL GMBH MOLEKULARE DIAGNOSTIKA
(100.0%)
Schulweg 6
03205 Lipten, DE**

72 Inventor/es:

LEHMANN, WERNER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 723 602 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección delimitada por espacios de reacción de uno o varios analitos en una muestra

- 5 La presente invención describe un procedimiento para la detección de analitos en una muestra, preferentemente para aplicaciones bioanalíticas, de diagnóstico (humano y veterinario), analíticas del medio ambiente o forenses, en el formato singleplex como también en el formato multiplex.

10 La determinación de trazas de un analito en muestras correspondientes es necesaria por ejemplo cuando se trata de registrar estadios tempranos de procesos fisiopatológicos. Esto es cierto en particular cuando los analitos en el estado normal en personas sanas no deben hallarse en absoluto en la muestra o en personas enfermas después de terapia ya no deben encontrarse. El diagnóstico temprano de enfermedades o de recidivas está relacionado con frecuencia con una mejor intervención terapéutica y mejora por lo tanto el pronóstico del paciente.

- 15 Para la determinación de antígenos de proteína en muestras biológicas se describieron procedimientos que en cambio son en parte muy costosos, no corresponden al estándar técnico en el trabajo del usuario, permiten una cuantificación absoluta solo por medio de estándares o únicamente un análisis singleplex.

20 Schmidt et al. describen un procedimiento con el que puede detectarse la unión de moléculas individuales en una matriz con ayuda de una cámara sensible (Ronny Schmidt, Jaroslav Jacak, Christopher Schirwitz, Volker Stadler, Gerd Michel, Nicole Marmé, Gerhard J. Schütz, Jörg D. Hoheisel, y Jens-Peter Knemeyer, "Single-Molecule Detection on a Protein-Array Assay Platform for the Exposure of a Tuberculosis Antigen." J. Proteome Res. 2011, 10, 1316-1322). Con este procedimiento era posible detectar aproximadamente 600 moléculas de analito en una mancha de moléculas captadoras inmovilizadas, lo que corresponde a una concentración de analito total en la muestra de aproximadamente 10^{-14} M. Con este procedimiento pueden determinarse al mismo tiempo varias manchas para diferentes analitos. La unión de moléculas individuales pudo mostrarse con reflexión interna total (TIRF) con el uso de una óptica de fluorescencia de moléculas individuales. La sensibilidad del sistema se limitó por la fluorescencia de fondo en imperfecciones en la matriz de superficie o por moléculas unidas de manera no específica. Dado que el sistema se basa en TIRF, las pruebas pueden llevarse a cabo como inmunoensayos

30 homogéneos sin cualquier tipo de etapa de lavado. Los autores consideran este procedimiento especialmente adecuado para pruebas rápidas sensibles, presuponiendo el análisis de moléculas individuales el empleo de un caro escáner de fluorescencia.

35 Rissin et al. describen un sistema (Simoa, Quanterix), que mediante el uso de cavidades de femtolitros delimita el volumen de reacción de reacciones enzimáticas. Con ello es posible determinar 10-20 moléculas de enzima por muestra "añadida" y aproximadamente 10^{-15} M de antígenos de proteína por medio de inmunoensayo en suero, de una matriz de muestra habitual en el trabajo del usuario (Rissin et al., "Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations." Nature Biotechnology 28, 595-599, 2010). Este sistema se empleó por Wilson et al. con éxito para la determinación de antígeno específico de próstata (PSA) en el suero de pacientes tras prostatectomía con una sensibilidad de <1pg de PSA/ml (Wilson et al., "Fifth-Generation Digital Immunoassay for Prostate-Specific Antigen by Single Molecule Array Technology", Clinical Chemistry 57:12, 1712-1721, 2011). De esta manera fue posible detectar en algunos pacientes la recidiva de un carcinoma de próstata más temprano que con inmunoensayos convencionales.

45 Todd et al. describen un inmunoensayo sensible (Erena) para el recuento de moléculas individuales, en el que nanopartículas magnéticas portan los anticuerpos de captura para la unión del analito de la muestra sobre la superficie (Todd et al., "Ultrasensitive Flow-based Immunoassays Using Single-Molecule Counting." Clinical Chemistry 53:11, 1990-1995, 2007). Los analitos unidos se marcaron con fluorescencia a través de un anticuerpo de detección y a continuación se analizaron en un sistema de medición basado en láser, métrico de flujo. Con ello se

50 logró detectar 10-100 pg de troponina I/ml de muestra de paciente. Concentraciones elevadas troponina I (>10 ng/ml) en el plasma son válidas como factor de riesgo para cardiopatías. El documento US 2006/105352 A1 divulga un procedimiento multiplex para la detección de analitos en una muestra, en el que antes de llevarse a cabo una reacción de amplificación de señal sobre un soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, inmovilizándose tras la aplicación de la muestra y antes de la aplicación de la solución de reacción

55 micropartículas en la capa de capa de gelatina del soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción.

60 El estado de la técnica muestra que con las más diversas técnicas es posible ya una detección sensible de analitos en muestras de paciente en el marco del diagnóstico de infección, el diagnóstico de tumor o diagnóstico cardiovascular. Todos los métodos presentan ventajas y desventajas especiales, tales como por ejemplo aparatos de detección caros, una necesidad estricta de detectores altamente sensibles (Krishnaswami et al., Optical Nanoscopy 2014, o Schmidt et al. 2011), el empleo de materiales de consumo menos aptos para la rutina que las matrices de TIRF planas o recipientes de reacción con cavidades de femtolitros o el empleo de sistemas de flujo, cuyo modo de trabajo solo puede paralelarse difícilmente. En conjunto, la capacidad multiplex no se da con la excepción del sistema que se describe por Schmidt et al. Todos estos sistemas se describieron para la aplicación en inmunoensayos, en cambio, es evidente para el experto en la materia que pueden emplearse igualmente para otros

65

analitos tales como por ejemplo la detección de ácidos nucleicos. El límite de detección para muestras reales tales como suero se encuentran en aproximadamente 10^{-14} M. La sensibilidad se delimita principalmente por la cinética de la interacción de las biomoléculas que participan como componente de unión, que depende, entre otras cosas, de la unión no específica, de las constantes de unión de los componentes de reacción o difusión, de modo que nunca

5 pueden detectarse todas las moléculas en una muestra.

En el caso de la PCR digital pueden detectarse todas las moléculas diana de ácido nucleico de una muestra, dado que la muestra se transfiere por completo a una pluralidad (hasta 10×10^6) de microespacios de reacción (con frecuencia emulsiones de aceite/agua), de modo que visto en gotas con un diámetro de aproximadamente 50 μ m solo puede localizarse una molécula (Vogelstein, B. y Kinzler, K.W. "Digital PCR." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9236-9241, 1999; Fan <http://purl.stanford.edu/cw095xw9265>, Dissertation, Stanford University, 2011). Después de la PCR de moléculas individuales se cuentan las gotas que contienen producto de PCR específico para calcular así el número de moléculas por muestra. La PCR digital puede emplearse en todos los ámbitos de la analítica de ácidos nucleicos y tiene la ventaja de la cuantificación absoluta. Este procedimiento es tan engorroso, dado que la producción de gotas es un proceso microfluídico complicado y hasta la fecha no se ha obtenido en un formato estándar (microplaca de ensayo de 96 pocillos u 8 tiras) para la rutina de laboratorio.

Es objetivo de la presente invención reducir o evitar una o varias desventajas del estado de la técnica. En particular es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento con el que pueden detectarse analitos en una muestra.

La detección del analito en una muestra tiene lugar de acuerdo con la invención en espacios de reacción separados espacialmente. La configuración de estos espacios de reacción separados espacialmente tiene lugar mediante el empleo de micropartículas. Micropartículas inmovilizadas sobre la superficie de un soporte están cubiertas por una solución de reacción. A continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas adyacentes que no están en contacto ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción. A este respecto, las micropartículas actúan como puntos de nucleación alrededor de los que queda un círculo de líquido que forma un espacio de reacción separado espacialmente. Mediante fuerzas capilares en las interfases entre micropartículas y soporte se forman así espacios de reacción separados espacialmente, en los que a continuación puede tener lugar por separado una reacción de amplificación de señal, pudiendo usarse la cantidad de producto de reacción formado en un espacio de reacción separado espacialmente como medida para la cantidad de analitos que van a medirse en estos espacios de reacción.

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende preferentemente las etapas: a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible; b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal; c) medir ópticamente los productos de reacción; y d) dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra, en donde antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción;

45 **caracterizado**, porque la retirada de la solución de reacción tiene lugar de tal manera que la superficie del soporte permanece cubierta con solución de reacción únicamente en una zona, que rodea directamente un sitio de contacto entre micropartículas y soporte, mientras que zonas de superficie del soporte, que están alejadas al menos $\geq 0,1$ veces el diámetro de partícula de un sitio de contacto entre una micropartícula y el soporte, ya no están cubiertas por solución de reacción.

Con la presente invención se pone a disposición del usuario un sistema de medición escalable, que combina opcionalmente las ventajas de los procedimientos descritos en el estado de la técnica de manera correspondiente al planteamiento mencionado del usuario. El procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza en particular por que funciona con reactivos convencionales dado el caso en el formato de 96 pocillos, registra prácticamente todas las moléculas de analito en la muestra, puede realizarse en formato multiplex, permite la evaluación digital o el recuento de moléculas individuales y puede evaluarse de manera económica por medio de un microscopio convencional pero también con un sistema de lector de microplacas.

Con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención es posible tanto encontrar una declaración cualitativa sobre la presencia o la ausencia de los analitos en la muestra como llevar a cabo una determinación cuantitativa de la cantidad de analitos dentro de esta muestra.

Siempre que a continuación, el contexto no indique inequívocamente lo contrario, en el caso del uso de formas en singular o formas en plural comprende siempre tanto la individualidad como también la pluralidad.

El procedimiento de acuerdo con la invención se refiere a un procedimiento para la detección *in vitro* de analitos en

una muestra. Como “*in vitro*” se entiende cualquier entorno que no se encuentra dentro de un organismo vivo, por ejemplo un cuerpo humano o animal. Es decir, el procedimiento de detección *in vitro* de acuerdo con la invención no comprende expresamente ningún procedimiento que se efectúa en el cuerpo humano o animal.

5 Analito

En el caso de un analito que tiene que detectarse en una muestra, puede tratarse de un analito de cualquier tipo u origen. De este modo, en el caso del analito puede tratarse por ejemplo de un analito natural de una fuente animal, vegetal, bacteriana o una fuente similar o puede ser de origen sintético. El analito puede ser un analito orgánico o inorgánico. En el caso del analito puede tratarse de un péptido, proteína, enzima, lectina, anticuerpo, antígeno, aptámero, polisacárido, lípido, un ácido nucleico o similar. Preferentemente, el analito que va a detectarse presenta una actividad enzimática, que al contacto con la solución de reacción en una reacción de amplificación de señal lleva a un producto de reacción medible. De manera especialmente preferente en el caso de la actividad enzimática se trata de la actividad de una enzima de la clase de las ADN polimerasas, ARN-polimerasas, transcriptasas inversas, ligasas, oxidasas, reductasas, transferasas, peroxidasas, fosfatasas, proteasas, peptidasas, lipasas, glicosidasas y/o luciferasas.

El ácido nucleico puede ser ácido desoxirribonucleico (DNA, abreviatura para ácido desoxirribonucleico en inglés) o ácido ribonucleico (RNA, abreviatura para ácido ribonucleico en inglés) tal como por ejemplo microARN. Se prefieren ácidos nucleicos que se generan en las reacciones de amplificación, tales como por ejemplo reacciones de PCR o amplificación isotérmica. Mediante el uso de cebadores con extremo 3' terminal específico de diana y con una región de secuencia en sentido de 5' inespecífica de diana pueden introducirse durante una reacción de multiplicación secuencias de marcaje en los ácidos nucleicos, que permite una unión selectiva a una fase sólida tal como por ejemplo preferentemente a micropartículas codificadas con fluorescencia. En el caso de los analitos puede tratarse también de análogos de ácido nucleico no naturales o análogos de aminoácido así como de compuestos que contienen estos análogos. Un analito puede componerse por ejemplo de nucleótidos, ADN, aminoácidos, péptidos o una composición de estas sustancias.

Muestra

El término “muestra” designa una composición que va a examinarse, que puede usarse para el examen *ex vivo* o *in vitro*. En el caso de la muestra se trata preferentemente de material biológico o médico, es decir, material que se obtiene de un organismo, de constituyentes de un organismo o de células. El material puede, antes de emplearse como muestra en el procedimiento de acuerdo con la invención, someterse a etapas de tratamiento adicionales, por ejemplo para pasar el material a un estado en el que es especialmente adecuado como muestra para el procedimiento de acuerdo con la invención. Para el procesamiento pueden usarse métodos habituales, que son conocidos por el experto en la materia. De este modo pueden purificarse por ejemplo determinadas sustancias o clases de sustancias, tales como por ejemplo proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, a partir del material, que entonces pueden emplearse como muestra en el procedimiento de acuerdo con la invención.

En el caso de la muestra puede tratarse de material que se obtuvo de un fluido corporal o que comprende un fluido corporal. “Fluido corporal” puede representar cualquier fluido del organismo, por ejemplo suero, sangre, plasma, líquido amniótico, sudor, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, esperma, condensados respiratorios etc. y en forma de líquidos extraídos por punción, frotis o similares. La muestra puede proceder también de un tejido corporal que va a examinarse o comprender un tejido corporal. Preferentemente se trata a este respecto de un tejido corporal de una persona de prueba, pudiendo ser la persona de prueba un animal, preferentemente un mamífero, de manera especialmente preferente un ser humano. En el caso del tejido corporal puede tratarse también de una muestra de una planta. La muestra puede obtenerse también de una suspensión de cultivo celular o un sobrenadante de cultivo celular o comprender una suspensión de cultivo celular o un sobrenadante de cultivo celular. Igualmente la muestra puede obtenerse de una muestra de suelo o agua o comprender una muestra de suelo o agua. Preferentemente la muestra comprende una mezcla de distintos analitos.

Etapas a): Aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte

En la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención se aplican una muestra y una solución de reacción sobre un soporte. A este respecto, la muestra y la solución de reacción pueden aplicarse o bien sucesivamente o bien al mismo tiempo sobre el soporte. Preferentemente la muestra se aplica antes de la solución de reacción sobre el soporte. Asimismo preferentemente, la muestra se aplica simultáneamente con la solución de reacción sobre el soporte, pudiendo por ejemplo mezclarse entre sí la muestra y la solución de reacción antes de aplicarse sobre el soporte.

Solución de reacción

La expresión “solución de reacción” designa un medio esencialmente líquido. La solución de reacción presenta un sustrato que durante la reacción de amplificación de señal se convierte por una actividad enzimática y de esta manera se genera el producto de reacción medible. De manera correspondiente, la solución de reacción en una

reacción de amplificación de señal en función de la presencia del analito, es adecuada para permitir generar un producto de reacción medible. El sustrato se transforma mediante la actividad enzimática del analito y/o del sistema de amplificación de señal, mediante lo cual se genera un producto de reacción medible.

- 5 Si en el caso de la actividad enzimática del sistema de amplificación de señal se trata de la actividad de una enzima por ejemplo de una peroxidasa, entonces pueden emplearse sustratos en la solución de reacción, que dan como resultado un producto de reacción, que puede medirse debido a su absorción (véanse por ejemplo las Figuras 1 y 2). Entre estos figuran por ejemplo tetrametilbenzidina (TMB), ortofenilendiamina o ácido 2,2'-azino-di-(3-etilbenztiazolin-6-sulfónico) (ABTS). Preferentemente se emplea TMB como sustrato. Mediante la reacción con
10 ayuda de la peroxidasa, TMB se convierte en un producto de reacción de color azul, que puede medirse ópticamente debido a su absorción en el intervalo entre 600-700 nm (Gallati y Pracht, "Bestimmung von Peroxidase mit H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin." J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 4453-460, 1985). Como alternativa o en paralelo pueden usarse también otros picos de absorción del mismo colorante que por ejemplo los picos de absorción del producto de reacción de TMB-POD a 370 nm o 450 nm en combinación con pireno, que se excita a 340 nm y emite a
15 370 nm.

- Quando el sistema de amplificación de señal presenta la actividad de una enzima, por ejemplo de una peroxidasa (POD), entonces pueden emplearse sustratos en la solución de reacción, que dan como resultado un producto de reacción, que puede medirse ópticamente debido a su fluorescencia. Entre estos figuran por ejemplo ácido
20 hidroxifenilacético (HPA), ácido hidroxifenilpropionílico (HPPA) o Ampliflu Red (Sigma) o un kit de Amplificación de Señal de Tiramida (Tyramide Signal Amplification) (TSA) (Perkinelmer). TSA se une a este respecto tras la activación mediante la POD en proximidad espacial directa a grupos tirosina de polipéptidos. De esto resulta la ventaja de que la señal de analito también se mantiene después de abrirse los espacios de reacción o con el uso de espacios de reacción parcialmente cerrados o también de espacios de reacción cerrados de manera semipermeable
25 (véase por ejemplo la Figura 3). Espacios de reacción semipermeables se consiguen por ejemplo por que se emplea preferentemente del 0,5-2 % solución de gelatina para la estabilización de los espacios de reacción. Para esto se cubren las micropartículas, después de la retirada de la solución de reacción, con solución de gelatina caliente a 30-50 °C, que después del enfriamiento, rodea los espacios de reacción. Mediante el cierre semipermeable pueden difundirse preferentemente nutrientes pero también sustratos de enzima para la reacción de detección a los espacios
30 de reacción, cuando la gelatina por su parte se cubre con estas sustancias. Como alternativa, los espacios de reacción semipermeables pueden diseñarse de tal manera que se emplee un soporte semipermeable, tal como es conocido por el experto en la materia para recipientes de cultivo celular de doble cámara. De esta manera se hace posible iniciar la reacción de detección por ejemplo para inmunoensayos sensibles solo después de cerrarse los espacios de reacción, lo que sirve preferentemente para reducir contaminaciones de espacios de reacción
35 adyacentes por el sustrato ya convertido por la reacción de amplificación de señal antes del cierre/estabilización de los espacios de reacción, y de esta manera evitar señales de fondo no específicas.

- Quando el sistema de amplificación de señal presenta la actividad de una enzima, por ejemplo de una peroxidasa, entonces es asimismo posible emplear sustratos en la solución de reacción que dan como resultado un producto de
40 reacción, que puede medirse ópticamente debido a su luminiscencia. Entre estos figuran sustratos quimioluminiscentes, tales como por ejemplo Luminol o Lumigen ECL Ultra (Diarect).

- Quando el sistema de amplificación de señal presenta la actividad de una enzima, por ejemplo de una fosfatasa, entonces es asimismo posible emplear sustratos en la solución de reacción que dan como resultado un producto de
45 reacción, que puede medirse ópticamente debido a su luminiscencia o fluorescencia. Entre estos figuran sustratos quimioluminiscentes, tales como por ejemplo CSPD (Thermo Scientific) o sustratos fluorescentes tales como por ejemplo DDAO-Fosfato o 4-MUP (véase por ejemplo la Figura 4).

- Quando el analito que va a detectarse en la reacción de amplificación de señal puede multiplicarse por una enzima, entonces pueden usarse como sustrato preferentemente sondas TaqMan, Hybprobe, Scorpion, LoopTag, balizas
50 moleculares o cebadores Amplifluor, que se usan junto con cebadores correspondientes, tampones de reacción y nucleótidos trifosfato en la solución de reacción para por ejemplo una PCR en tiempo real en el espacio de reacción. En este sentido, con la amplificación progresiva en función de la cantidad formada de producto de reacción se genera una señal de fluorescencia.

- 55 Preferentemente la solución de reacción comprende, además del sustrato, otras sustancias. En el caso de estas sustancias puede tratarse por ejemplo de colorantes, preferentemente de colorantes fluorescentes. De manera especialmente preferente, en el caso de estos colorantes fluorescentes se trata de aquellos cuya excitación y/o emisión se extinguen por el producto de reacción resultante de la reacción de amplificación de señal. Los colorantes fluorescentes pueden encontrarse asimismo en las micropartículas, sobre la superficie de micropartícula. Igualmente
60 es posible unir los colorantes fluorescentes antes de la adición de la solución de reacción en la densidad/intensidad deseada a la superficie del soporte o al recubrimiento sobre la superficie del soporte, tal como por ejemplo un recubrimiento de polilisina. Si se usa por ejemplo TMB como sustrato en la solución de reacción, entonces la solución de reacción o las micropartículas o el soporte pueden comprender colorantes fluorescentes, que se excitan
65 y emiten entre 600-700 nm tal como por ejemplo Atto 590, Atto 647N, Cy5 y sus derivados, que se extinguen por el producto de reacción.

La separación espacial de los espacios de reacción de micropartículas individuales se mejora adicionalmente mediante el uso de soluciones de reacción libres de detergente.

Soporte

5 El soporte usado en el procedimiento de acuerdo con la invención ofrece una superficie sobre la que pueden configurarse los espacios de reacción separados espacialmente. El soporte puede estar diseñado como portaobjetos, blíster, placa de microtitulación, capilares o tubo. Preferentemente, en el caso del soporte se trata de un soporte plano o de un soporte esencialmente plano. De manera especialmente preferente, en el caso del soporte
10 plano se trata de una cavidad de una placa de microtitulación.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en forma de una micromatriz por ejemplo por medio de un portaobjetos o de una placa de microtitulación.

15 El soporte puede componerse de distintos materiales o materiales de trabajo tales como por ejemplo metales, cerámica, vidrio y transparente o plásticos no transparentes tales como por ejemplo policarbonato, poliestireno, polipropileno, siloxano, policarbonato. Soportes preferidos son membranas de nailon, siloxano, vidrio de epóxido y vidrio de borofluorato.

20 La superficie de soporte puede encontrarse en forma no modificada o en forma modificada. La superficie de soporte puede funcionalizarse mediante modificación con grupos funcionales.

Grupos funcionales preferidos son por ejemplo grupos carboxi, azida, alquino, sulfhidrilo, epoxi, amino, hidroxilo, ácido sulfónico, pegililo, acrílico, o fosfato.

25 La separación espacial de los espacios de reacción de micropartículas individuales se mejora adicionalmente mediante el empleo de soportes con superficies hidrófobas.

30 Los soportes y/o micropartículas usados en el procedimiento de acuerdo con la invención presentan preferentemente sobre su superficie aglutinantes, que son específicos para los analitos que van a detectarse. El término "aglutinante" se explica en mayor detalle a continuación.

Los aglutinantes en los soportes pueden imprimirse en disposición bidimensional preferentemente mediante técnica de impresión piezoeléctrica, pulverización o impresión matricial en manchas discretas, es decir, separadas entre sí sobre la superficie del soporte. Preferentemente, mediante el acoplamiento de los aglutinantes se produce un aumento de la hidrofilia en la zona de las manchas en comparación con la superficie del soporte circundante, no impresa. Estas diferencias en la hidrofilia facilitan la formación de espacios de reacción completamente separados entre sí. Las manchas pueden tener un diámetro de 0,5 µm a 500 µm, preferentemente de 1 µm a 400 µm, de manera especialmente preferente de 2 µm a 200 µm, de manera muy especialmente preferente de 5 µm a 50 µm. El
40 soporte puede estar asimismo recubierto de manera homogénea con aglutinantes. Una ventaja de un recubrimiento homogéneo con aglutinantes es que puede unirse una cantidad especialmente grande de moléculas de analito de la muestra.

Delimitación del espacio de reacción: Espacios de reacción separados espacialmente

45 Antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal en etapa b) sobre el soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente. Esto sucede por que en primer lugar antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción (etapa i). Preferentemente en primer lugar se aplica la muestra sobre el soporte, a continuación se inmovilizan las micropartículas sobre el soporte y entonces se aplica la solución de reacción sobre el soporte. Como alternativa se inmovilizan en primer lugar las micropartículas sobre el soporte y entonces se aplica la muestra antes de la solución de reacción sobre el soporte. Como alternativa adicional, se aplica la muestra con las micropartículas al mismo tiempo sobre el soporte y se inmovilizan las micropartículas, mezclándose la muestra y las micropartículas por ejemplo previamente entre sí, y a continuación se
50 aplica la solución de reacción sobre el soporte. Como alternativa adicional se aplican las micropartículas al mismo tiempo con la muestra y la solución de reacción sobre el soporte y allí se inmovilizan, pudiendo mezclarse por ejemplo en primer lugar la muestra con la solución de reacción, antes de agregarse las micropartículas. De manera especialmente preferente, primero se inmovilizan las micropartículas sobre el soporte y después al mismo tiempo se aplica la solución de reacción en mezcla con la muestra sobre el soporte.

60 Siempre que la muestra se aplique antes de la solución de reacción sobre el soporte, pueden retirarse opcionalmente antes de aplicarse la solución de reacción constituyentes de muestra en exceso de la preparación de reacción, para garantizar por ejemplo una retirada considerable de analitos no unidos o unidos de manera no específica. Esto tiene lugar por ejemplo mediante decantación o aspiración y puede intensificarse adicionalmente mediante etapas de lavado o limpieza adicionales. Si se usan micropartículas que se inmovilizaron permanentemente sobre el soporte, entonces la retirada de los constituyentes de muestra en exceso puede tener
65

lugar por medio de centrifugación. En el caso de partículas magnéticas que no se inmovilizaron permanentemente sobre el soporte, puede aplicarse además un campo magnético, de modo que está garantizado que con la retirada de los constituyentes de muestra en exceso tampoco se retiran conjuntamente las partículas magnéticas.

- 5 Después de la inmovilización de las micropartículas y dado el caso de aglutinantes como manchas impresas sobre el soporte se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas adyacentes que no están en contacto y dado el caso manchas ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción (etapa ii). La retirada de la solución de reacción puede tener lugar también de manera que esta se desplaza por otras micropartículas porosas o no porosas preferentemente no codificadas por fluorescencia tales como por ejemplo Sepharose o nanocelulosa, que disminuye la difusión entre dos espacios de reacción de micropartículas adyacentes en una medida tal que no puede tener lugar ningún intercambio perturbador de constituyentes que reaccionan entre estos espacios de reacción (véase por ejemplo la Figura 5).

- 15 Como medio para delimitar los espacios de reacción pueden funcionar también resinas de curado. Por ejemplo, en disolventes muy volátiles pueden usarse resinas sintéticas solubles, que se emplean con frecuencia en la microscopía electrónica para revestir (recubrir con película) los portaobjetos, tales como polivinilformales o polivinilbutirales, que pueden obtenerse comercialmente con los nombres comerciales Formvar o también Vinytec, Butvar y Pioloform.

20 Etapas i): Cobertura de las micropartículas inmovilizadas con solución de reacción

La cobertura de las micropartículas con solución de reacción tiene lugar mediante su inmovilización sobre el soporte, concretamente antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción sobre el soporte.

- 25 La cobertura tiene lugar preferentemente de tal manera que tiene lugar una humectación esencialmente uniforme de todas las micropartículas inmovilizadas sobre el soporte. Preferentemente la solución de reacción se deja durante ≥ 1 segundo sobre la superficie del soporte, antes de retirarse en la etapa ii) del soporte. Preferentemente, la solución de reacción se deja durante 1 segundo a 5 minutos, de manera especialmente preferente de 1 segundo a 10 minutos, de manera muy especialmente preferente de 1 segundo a 1 minuto sobre la superficie del soporte.

30 Micropartículas

- Por "micropartículas" se entienden en el sentido de la presente invención partículas particuladas con un diámetro medio inferior a un 1 milímetro. Preferentemente las micropartículas presentan un diámetro medio de 0,01 a 100 μm , de manera especialmente preferente de 0,05 a 50 μm , de manera muy especialmente preferente de 1 a 30 μm , en particular preferentemente de 2 a 20 μm . Si las micropartículas presentan un diámetro medio en el intervalo de nanómetros, entonces se denominan también nanopartículas.

- 40 Las micropartículas pueden presentar diferentes formas, por ejemplo pueden ser esféricas, elípticas, cilíndricas o cuboides. Las micropartículas pueden estar conformadas de manera regular o irregular. Preferentemente las micropartículas son esféricas. Las micropartículas pueden ser discos triangulares, circulares o de otra forma, tal como se generan con el desprendimiento de virutas de una barra con superficie de sección transversal correspondiente.

- 45 Las micropartículas usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención pueden comprender uno o varios materiales o componerse de los mismos y representar por consiguiente micropartículas homogéneas o heterogéneas. Las micropartículas se componen preferentemente de un material polimérico tal como por ejemplo poliestireno, poli(ácido acrílico), poli(acrilonitrilo), poliamida, poli(acrilamida), poli(acroleína), polibutadieno, policaprolactona, policarbonato, poliéster, polietileno, poli(tereftalato de etileno), polidimetilsiloxano, polisopreno, poliuretano, poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), polivinilpiridina, poli(cloruro de vinilbencilo), poliviniltolueno, poli(cloruro de vinilideno) polidivinilbenceno, poli(metacrilato de metilo), polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida), polianhídrido, polioctoéster, polisulfona, poliéter o combinaciones de los mismos. Igualmente las micropartículas pueden componerse de otros materiales poliméricos, tales como por ejemplo hidratos de carbono tales como carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa, agar, gel, polipéptidos, pero también otros materiales de células eucariotas y procariotas, lípidos, metal, resinas, látex, caucho, silicona tal como polidimetildifenilsiloxano, vidrio, melamina, sílice, carbón vegetal, caolinita, bentonita. De manera especialmente preferente, las micropartículas se componen de melamina, sílice, polisulfona, poliestireno y/o poliéter, de manera muy especialmente preferente de poli(metacrilato de metilo).

- 60 Los polímeros en la superficie de micropartícula pueden encontrarse en forma no modificada o en forma modificada. Son funcionalidades posibles por ejemplo grupos carboxi, sulfhidrido, epoxi, amino, hidroxilo, ácido sulfónico, pegililo, acrílico o fosfato. Los polímeros de superficie pueden modificar sus propiedades en función de las condiciones del entorno (por ejemplo pH, temperatura) y de esta manera pueden hacerse por ejemplo fluorescentes o reactivos. La funcionalización de la superficie de las micropartículas puede conseguirse por ejemplo también mediante matrices de tipo hidrogel, tal como se forman por poli(ácido acrílico), poli(etilenglicol)metacrilatos (PEGMA), dextrano, dextransulfato o polietilenglicol (PEG). Funcionalizaciones de este tipo garantizan que no se reduzca la especificidad

de los aglutinantes y se minimice la unión de analitos no específicos.

Las micropartículas pueden encontrarse en forma de micromateriales compuestos. Los micromateriales compuestos comprenden dos o más materiales poliméricos distintos, que pueden encontrarse mezclados entre sí y representan así partículas de matriz con una distribución principalmente homogénea de los materiales poliméricos a lo largo de la sección transversal de partícula. Los micromateriales compuestos pueden encontrarse también en forma de microcápsulas que presentan un núcleo como capa interior y una o varias capas adicionales. En el caso de las microcápsulas los distintos materiales poliméricos se encuentran esencialmente en capas diferentes. El núcleo de microcápsulas puede encontrarse en forma sólida, líquida o gaseosa (esferas huecas). Los micromateriales compuestos polimerizables de este tipo en forma de microcápsulas o partículas de matriz son conocidos en el estado de la técnica (Ch. A. Finchand R. Bodmeier: "Microencapsulation" en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª Ed. 2001, versión electrónica).

Preferentemente las micropartículas se encuentran en forma de microcápsulas. Preferentemente comprenden o se componen de un núcleo como capa interior y dos capas adicionales, en concreto una capa central y una capa exterior. Preferentemente, al menos la capa exterior se compone de un material resistente a la temperatura tal como por ejemplo melamina. De manera especialmente preferente la capa exterior, la capa central y la capa interior de las micropartículas se componen de un material resistente a la temperatura, de modo que estas micropartículas son adecuadas para emplearse en el procedimiento de acuerdo con la invención, en el que etapas individuales o varias etapas se llevan a cabo a temperaturas elevadas. Las micropartículas pueden ser porosas o parcialmente porosas con el fin de aumentar la superficie.

Aglutinante

Tal como ya se expuso, tanto los soportes y/o las micropartículas usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención pueden presentar preferentemente sobre su superficie aglutinantes, que son específicos para los analitos que van a detectarse. El término "específico" o "unión específica" significa que el aglutinante, en las condiciones seleccionadas puede unirse preferentemente de manera selectiva a los analitos que van a detectarse.

El experto en la materia conoce aglutinantes adecuados como también procedimientos para su preparación. En el caso de los aglutinantes puede tratarse de sustancias naturales o sintéticas. Los aglutinantes pueden ser a base de (poli) péptidos, ácidos poli- u oligonucleicos, polisacáridos, lípidos o similares. Preferentemente en el caso del aglutinante se trata de un polipéptido tal como por ejemplo una molécula de adhesión celular del grupo de las integrinas, caderinas, selectinas o de miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Preferentemente en el caso del polipéptido se trata de un anticuerpo, pudiendo estar comprendidos tanto anticuerpos policlonales y monoclonales con respecto de anticuerpos clásico como derivados o fragmentos procedentes de los mismos. Fragmentos de este tipo son conocidos con la denominación Fab, F(ab)2, fragmentos dsFv, fragmentos scFv y anticuerpos monocatenarios. Preferentemente en el caso del aglutinante se trata de un anticuerpo.

Asimismo preferentemente en el caso del aglutinante puede tratarse de un ácido nucleico tal como por ejemplo ADN o ARN. Preferentemente se trata de oligonucleótidos monocatenarios, de manera especialmente preferente de aptámeros. Asimismo son posibles análogos de ácido nucleico sintéticos como aglutinante.

Los aglutinantes pueden presentar modificaciones tales como por ejemplo un marcaje con fluorescencia. El experto en la materia conoce tanto marcajes adecuados como métodos con los que pueden modificarse moléculas de unión.

El acoplamiento de los aglutinantes con las micropartículas puede tener lugar de manera covalente o no covalente. Un acoplamiento covalente puede tener lugar por ejemplo mediante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida de grupos carboxi funcionales sobre la superficie de las micropartículas. Un acoplamiento no covalente puede tener lugar por ejemplo mediante interacción hidrófoba o iónica de los aglutinantes con las micropartículas, pudiendo estar o no las micropartículas funcionalizadas en superficie.

Los aglutinantes pueden también estar biotiniladas y por lo tanto unidos a la superficie con micropartículas recubiertas con avidina. Igualmente es posible unir oligonucleótidos de captura acoplados de manera covalente o no covalente a la superficie de micropartícula, hibridar de manera reversible con los aglutinantes correspondientes, que presentan secciones de secuencia complementarias con el oligonucleótido de captura o están unidos a los oligonucleótidos complementarios correspondientes.

Poblaciones de micropartículas

Preferentemente en el procedimiento de acuerdo con la invención se usa más de una población de micropartículas para detectar más de un analito en una muestra (detección multiplex). A este respecto las distintas poblaciones de micropartículas se diferencian en al menos una característica entre sí.

Preferentemente en el procedimiento de acuerdo con la invención se usa más de una población de micropartículas, en donde las distintas poblaciones de micropartículas se diferencian al menos en que portan aglutinantes, que se

diferencian en su especificidad de unión. Preferentemente las diferentes poblaciones de micropartículas presentan aglutinantes, que son específicas para analitos diferentes. Es decir, esto significa, cuando por ejemplo una población de micropartículas presenta aglutinantes con una especificidad para una primera proteína, entonces otra población de micropartículas puede presentar cualquier otra especificidad aparte de aquella para la primera proteína. Las poblaciones de micropartículas pueden diferenciarse entre sí además de sus especificidades de unión diferentes adicionalmente también debido a otras características.

Preferentemente las micropartículas o poblaciones de micropartículas están codificadas por fluorescencia y/o por tamaño, de modo que diferentes micropartículas o poblaciones de micropartículas pueden diferenciarse entre sí por medio de su fluorescencia y/o tamaño. Estas pueden tener en cambio también códigos de barras en forma de patrones específicos, tal como orificios en el caso de micropartículas en forma de disco. Estos discos pero también varillas pueden tener orificios dispuestos de manera definida, en caso de que la barra de la que se desprenden, presente en el interior canales huecos de distinta forma o una colocación constante a lo largo de toda la longitud de la barra. Los patrones de orificios que se generan de este modo, que son específicos para cada barra, pueden usarse para la codificación de diferentes poblaciones, que se cortan por diferentes barras. Los discos pueden producirse también por ejemplo en el procedimiento de fundición inyectada. A este respecto, los discos pueden experimentar en una o ambas superficies de sección transversal una abolladura o una curvatura a modo de caperuza, cuyo espacio contribuye al tamaño del espacio de reacción. Los discos pueden estar diseñados también de forma anular, presentando en el centro un orificio que participa esencialmente en el tamaño y la disposición del espacio de reacción. El diámetro de los discos asciende preferentemente a de 5 µm a 1 mm y de manera especialmente preferente de 10 µm a 30 µm. Los orificios contenidos en el mismo pueden presentar un diámetro de 1 µm a 0,9 mm y preferentemente un diámetro de 1 a 25 µm. La altura de los discos asciende a de 0,5 µm a 1 mm y preferentemente de 1 µm a 100 µm. Las micropartículas en forma de disco pueden codificarse con fluorescencia igualmente como micropartículas esféricas y de esta manera usarse preferentemente para la detección multiplex. La ventaja del uso de micropartículas en forma de disco se basa en que el espacio de reacción puede alojar fácilmente un mayor volumen de solución de reacción o de muestra, lo que aumenta la sensibilidad de las pruebas como también el intervalo de medición dinámico. Preferentemente, las micropartículas en forma de disco pueden caracterizarse porque la altura de disco es mayor que el diámetro de disco y puede ascender a de 1-1000 µm, preferentemente de 10-100 mm, de modo que se genera un cilindro hueco.

Las micropartículas pueden presentar propiedades fluorescentes, magnéticas, paramagnéticas y/o funcionalizadas en superficie.

Propiedades fluorescentes de las micropartículas

Las micropartículas pueden presentar propiedades fluorescentes. Las micropartículas pueden presentar por un lado una fluorescencia propia. Una fluorescencia propia de las micropartículas puede generarse por ejemplo porque las micropartículas incluyen el mineral fluorita en una o varias de sus capas. Como alternativa o adicionalmente a la presencia de materiales autofluorescentes, las micropartículas pueden presentar también una codificación con fluorescencia.

Las micropartículas codificadas con fluorescencia son conocidas por el experto en la materia y se describen por ejemplo en los documentos DE 699 07 630 T2 y DE 10054382 A1. Con la expresión "codificación con fluorescencia" se entiende en el contexto de la presente invención que las micropartículas presentan colorantes fluorescentes, estando depositados estos colorantes fluorescentes o bien en una o varias capas de las micropartículas o acoplándose los colorantes fluorescentes directa o indirectamente con la superficie de las micropartículas. Colorantes fluorescentes, que están unidos a la superficie de las micropartículas, pueden tener por lo tanto la función de una codificación de color como la función del indicador de la cinética de unión o de reacción. Cuando por ejemplo su excitación y/o emisión se extinguen por el producto de reacción de la reacción de amplificación de señal. El experto en la materia conoce colorantes fluorescentes adecuados. Colorantes fluorescentes o fluoróforos son todos los compuestos inorgánicos y/u orgánicos gaseosos, líquidos o sólidos, que tras la excitación emiten de nuevo la energía absorbida en forma de radiación de longitud de onda igual, más larga o más corta. Los colorantes fluorescentes pueden emitir señales de luminiscencia o fluorescencia o fosforescencia detectables.

Como colorantes fluorescentes pueden emplearse por ejemplo: cloruro de dansilo, isotiocianato de fluoresceína, 7-cloro-4-nitrobenzoxadiazol, anhídrido de ácido pirenbutirilacético, N-yodoacetil-N'-(ácido 5-sulfónico-1-naftil)-etilendiamina, 1-anilino-naftalen-8-sulfonato, 2-toluidino-naftalen-6-sulfonato, 7-(p-metoxibencilamino)-4-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazol, formicina, 2-aminopurinribonucleósido, etenoadenosina, benzoadenosina, ácido α- y β-parinárico, Δ9,11,13,15 ácido octaecaetetraenoico y/o cristales de cadmio-selenita de uno o diferentes tamaños etc. Como colorantes fluorescentes pueden emplearse asimismo por ejemplo complejos de metal de transición, las siguientes sustancias contienen: rutenio (II), renio (I) u osmio e iridio como átomo central y ligandos de diimina; porfirinas fosforescentes con platino, paladio, lutecio o estaño como átomo central; complejos fosforescentes de las tierras raras tales como europio, disprosio o terbio; cristales fosforescentes tales como rubí, Cr-YAG, alexandrita u óxidos mistos fosforescentes tales como fluorogermanato de magnesio o cristales de cadmio-selenita, fluoresceína, aminofluoresceína, aminometilcumarina, cumarina 6, rodamina, rodamina 6G, rodamina B, tetrametilrodamina, bromuro de etidio, naranja de acridina y/o puntos cuánticos.

Como colorantes fluorescentes pueden emplearse por ejemplo las siguientes sustancias en combinación: rutenio(II)-(tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)/HPTS, rutenio(II)-(tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)/fluoresceína, rutenio(II)-(tris-4,7-difenil-1,10-phenanthro-lin)/rodamina B, rutenio(II)-(tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)/rodamina B-octadecil éster, rutenio(II)-(tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina)/Hexadecil-naranja de acridina, europio(III)-tris-teonil-trifluorometilacetato/hidroximetilcumarina, platino(II)-tetrafenilporfirina/rodamina B-octadecil éster, platino(II)-tetrafenilporfirina/rodamina B, platino(II)-tetrafenilporfirina/naftofluoresceína, platino(II)-tetrafenilporfirina/sulforrodamina 101, platino(II)-octaetilporfirina/eosina, platino(II)-octaetilporfirina/tionina, platino(II)-octaetilcetoporfirina/azul del Nilo, Cr(III)-YAG/azul del Nilo, Cr(III)-YAG/naftofluoresceína, aminocumarina/aminofluoresceína, aminocumarina/rodamina 6G, aminocumarina/tetrametilrodamina, aminocumarina/naranja de acridina, aminofluoresceína/rodamina 6G, aminocumarina/Atto647N, aminofluoresceína/tetrametilrodamina, aminofluoresceína/bromuro de etidio y DAPI/rodamina. En cambio pueden emplearse también combinaciones con tres colorantes fluorescentes para la codificación de las micropartículas tales como por ejemplo aminocumarina, rodamina y Atto 647N, DAPI/aminocumarina/rodamina, aminocumarina/rodamina/Atto647N o aminocumarina, fluoresceína y rodamina.

Preferentemente las micropartículas se encuentran en forma de microcápsulas. Preferentemente comprenden o se componen de un núcleo (capa interior) y dos capas adicionales, en concreto una capa central y una capa exterior. Preferentemente las capas se diferencian mediante óptica de fluorescencia.

Existe también la posibilidad de una formación de estructura dentro de las micropartículas, incorporándose por polimerización micropartículas fluorescentes y/o codificadas con fluorescencia en una o varias capas de las micropartículas. De esta manera pueden generarse patrones de manera dirigida en las micropartículas, tal como por ejemplo de manera gruesa o granulada fina o el número de gránulos por capa, que pueden usarse para la codificación con fluorescencia de numerosas poblaciones de micropartículas.

Si se usan varios colorantes fluorescentes diferentes para la codificación de varias poblaciones de micropartículas distintas, entonces se seleccionan preferentemente de tal manera que los diferentes colorantes fluorescentes tienen espectros de emisión esencialmente distintos. Preferentemente, los diferentes colorantes fluorescentes presentan máximos de emisión respectivos que están separados entre sí más de 10 nm, preferentemente más de 25 nm, de manera especialmente preferente más de 50 nm. Los colorantes pueden seleccionarse para presentar bandas de emisión que se adaptan a los filtros o filtros multibanda que pueden obtenerse en el mercado, o para la detección de fluoróforos múltiples con distintas bandas de excitación y emisión.

La fluorescencia medida en la superficie de las micropartículas se denomina "fluorescencia superficial". La fluorescencia superficial se genera o bien mediante colorantes fluorescentes, que están depositados en la capa más exterior de las micropartículas o, cuando se encuentran aglutinantes sobre la superficie de micropartícula, que están en sí marcados con fluorescencia, mediante la fluorescencia de estos aglutinantes. La fluorescencia superficial puede tener lugar en cambio también mediante marcaje con fluorescencia de las funcionalizaciones necesarias para la inmovilización de los aglutinantes. Tales funcionalizaciones pueden ser por ejemplo matrices de tipo hidrogel, tal como se forman por poli(ácido acrílico), poli(etilenglicol)metacrilatos (PEGMA) o polietilenglicol (PEG).

En una variante preferida, para la codificación de micropartícula se incorporan por polimerización uno o varios colorantes de las clases cumarina, rodamina o derivados de azul del Nilo en las micropartículas y un derivado de Atto 647N o Cy5 como fluorescencia superficial.

Si se codifica con cumarina, fluoresceína y rodamina, pueden usarse preferentemente Cy5 y colorantes fluorescentes de longitudes de onda de emisión mayores para la fluorescencia superficial tal como por ejemplo Atto647N. Pero también es posible realizar la fluorescencia superficial a través de un par de FRET tal como por ejemplo fluoresceína y rodamina. Entonces se encuentran disponibles para la codificación colorantes de cumarina y ciano y sus derivados etc. Las posibilidades de codificación aumentan enormemente por que puede emplearse uno y el mismo colorante en varias capas de micropartículas en concentraciones diferentes. De esto resulta para cada capa y entre distintas capas de diferente intensidad de fluorescencia, una multitud de posibilidades de relación-unión, que pueden usarse para la codificación/decodificación de las poblaciones de micropartículas.

Propiedades magnéticas y/o paramagnéticas de las micropartículas

Las micropartículas pueden presentar propiedades magnéticas y/o paramagnéticas. Las micropartículas pueden contener en una o en varias de sus capas un imán o un material que reacciona a un imán. Las micropartículas de este tipo se denominan en el presente caso partículas magnéticas. El material que reacciona a un imán, puede presentar propiedades superparamagnéticas, paramagnéticas o ferromagnéticas. Preferentemente, en el caso del material que reacciona a un imán se trata de un metal, preferentemente de un óxido de metal. Mediante el imán o el material que reacciona al imán dentro de las capas de micropartículas está garantizado una inmovilización y/o transporte seguros de las micropartículas en el espacio de reacción durante la medición o durante la realización de la prueba.

Propiedades funcionalizadas en superficie de las micropartículas

Las micropartículas pueden presentar sobre su superficie grupos funcionales, mediante lo cual las micropartículas obtienen propiedades funcionalizadas en superficie. Grupos funcionales preferidos son por ejemplo carboxilatos, ésteres, alcoholes, carbamidas, aldehídos, aminas, óxidos de azufre, grupos mercapto, óxidos de nitrógeno, epóxidos, acrilatos o haluros. Con ayuda de grupos funcionales en la superficie de las micropartículas puede facilitarse o mejorarse por ejemplo la unión del analito a las micropartículas. También mediante la presencia de grupos funcionales puede inhibirse, facilitarse o mejorarse la unión entre las micropartículas.

Preferentemente las micropartículas y el soporte presentan diferentes funcionalizaciones en superficie. Preferentemente las micropartículas y soporte presentan grupos funcionales con diferentes propiedades, preferentemente afinidades opuestas con respecto a la misma materia o el mismo compuesto, tal como por ejemplo hacia el agua. Diferentes funcionalizaciones en superficie de este tipo de las micropartículas y del soporte repercuten ventajosamente en la delimitación de los espacios de reacción y provocan que espacios de reacción adyacentes se separen más adecuadamente uno de otro. Por ejemplo, micropartículas con grupos funcionales hidrófilos pueden inmovilizarse sobre soportes con grupos funcionales hidrófobos.

Procedimientos para la producción de micropartículas por medio de procesos de formación de micropartículas reactivas y no reactivas son conocidos en el estado de la técnica. En la formación de micropartículas reactiva, la formación de la pared o de la matriz tiene lugar en paralelo a un proceso de polimerización, policondensación o poliadición. En el procedimiento no reactivo se emplean directamente polímeros filmógenos que de manera termodinámica, se llevan a la separación de fases y a la formación de micropartículas. En procedimientos para la encapsulación de materiales de núcleo sólidos o líquidos se emplean por ejemplo resinas de melamina-formaldehído. En particular, las resinas de melamina-formaldehído pueden emplearse de diversas formas y sin problemas y pueden aplicarse a la formación de micropartículas a partir de fase acuosa. El tamaño de microcápsula puede ajustarse en función de las condiciones de reacción, por ejemplo la adición de emulsionante o el método de dispersión. Otra posibilidad es la reticulación hidrotérmica de hidroximetil-melamina.

Inmovilización de las micropartículas

Las micropartículas pueden inmovilizarse sobre una superficie del soporte. La inmovilización de las micropartículas sobre una superficie de soporte simplifica las etapas siguientes del procedimiento de acuerdo con la invención, En particular cuando estas se llevan a cabo de manera automatizada y con ayuda de aparatos de laboratorio convencionales. La inmovilización impide que las micropartículas, en las etapas de procedimiento siguientes, se retiren por error de la preparación de reacción. La inmovilización puede ser permanente o no permanente. Una inmovilización permanente puede tener lugar por ejemplo mediante unión covalente o no covalente de las micropartículas al soporte. Una inmovilización no permanente, es decir, temporal, puede tener lugar por ejemplo mediante centrifugación o mediante aplicación de un campo magnético cuando se usan partículas magnéticas.

Micropartículas en forma de disco o de cilindro hueco pueden inmovilizarse de manera no dirigida, es decir con la superficie lateral o la superficie de sección transversal sobre el soporte. Las micropartículas en forma de disco o de cilindro hueco pueden inmovilizarse preferentemente de manera dirigida, de tal manera que el material de la superficie de sección transversal no puede unirse de manera específica y fija al soporte y la superficie lateral no se cubriera o modificara químicamente, dado que las propiedades de unión específicas no están presentes. La producción de diferentes propiedades de unión de superficie de sección transversal y superficie lateral puede conseguirse por que antes de que los discos o cilindros huecos se corten de barras huecas, solo las superficies exteriores de la barra hueca se modifican químicamente o se cubren tal como por ejemplo mediante siliconización, revestimiento polimérico o vaporización, de modo que no es posible ninguna unión de esta superficie al soporte.

Igualmente es posible modificar por completo la superficie preferentemente de discos, de modo que puede tener lugar una unión óptima al soporte. Mediante la aplicación de oscilaciones por ejemplo mediante ultrasonidos se consigue entonces de manera los discos caen en su mayoría sobre la superficie de sección transversal y entonces se unen. Siempre que se inicia una unión covalente por ejemplo por radiación electromagnética, esta radiación solo se emplea después de que los discos se han apoyado en su mayoría con su superficie de sección transversal sobre el soporte.

Es igualmente posible modificar químicamente la superficie lateral de las barras huecas de las que se cortan los cilindros huecos o dotarla de un revestimiento protector, de modo que a diferencia de la superficie de sección transversal después del corte ya no pueden modificarse para la unión al soporte o la unión de aglutinantes.

Para el corte de discos y cilindros huecos es posible incrustar haces de barras huecas en un medio que puede cortarse y cortar el mismo con un micrótopo transversalmente a la dirección de la fibra. Como alternativa es posible recubrir microfibras con un polímero y retirar las microfibras después del corte, de modo que queden los discos y cilindros huecos. Preferentemente, las propiedades fisicoquímicas de microfibras y el polímero empleado para el revestimiento se diferencian por ejemplo por diferente solubilidad en disolventes, la estabilidad térmica o en ácidos y bases, de modo que pueden retirarse las microfibras lábiles. Es igualmente posible ensamblar haces de microfibras, revestirlos con polímero, cortarlos y a continuación retirar las microfibras.

La inmovilización de las micropartículas sobre una superficie de soporte tiene lugar antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción. De esta manera, las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción. Si a continuación de esto se retira la solución de reacción, entonces las micropartículas inmovilizadas que no están en contacto ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción. Preferentemente la inmovilización de las micropartículas sobre una superficie del soporte tiene lugar antes de que las micropartículas se pongan en contacto con la muestra y la solución de reacción.

Etapa ii): Retirada de la solución de reacción

Micropartículas inmovilizadas sobre una superficie de soporte están cubiertas por una solución de reacción. La configuración de una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente sobre una superficie ocupada con micropartículas del soporte tiene lugar mediante retirada de la solución de reacción, de modo que micropartículas adyacentes que no están en contacto ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción.

Mediante la retirada de la solución de reacción, micropartículas preferentemente adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas en su mayoría por una capa continua de solución de reacción.

De acuerdo con la invención, la retirada de la solución de reacción tiene lugar de tal manera que la superficie del soporte permanece cubierta con solución de reacción únicamente en una zona, que rodea directamente un sitio de contacto entre micropartículas y soporte, mientras que zonas de superficie del soporte, que están alejadas al menos $\geq 0,1$ veces el diámetro de partícula de un sitio de contacto entre una micropartícula y el soporte, ya no están cubiertas por solución de reacción. Preferentemente, zonas de superficie del soporte, que están alejadas al menos $\geq 1,0$ veces el diámetro de partícula, preferentemente ≥ 2 veces el diámetro de partícula, de manera especialmente preferente ≥ 5 veces el diámetro de partícula de un sitio de contacto entre una micropartícula y el soporte, ya no están cubiertas por solución de reacción. La solución de reacción puede retirarse también en una medida tal que solo permanece en la hendidura entre partículas y base del recipiente y el espacio de reacción puede ser por lo tanto menor que el diámetro de partícula. Esta zona cubierta con solución de reacción del soporte representa el denominado espacio de reacción. Es decir, las micropartículas actúan como puntos de nucleación alrededor de los que queda un círculo de líquido, que forma un espacio de reacción separado espacialmente. Mediante fuerzas capilares en las interfases entre micropartículas y soporte se forman así los espacios de reacción separados espacialmente. Las micropartículas usadas como puntos de nucleación para la configuración de espacios de reacción separados espacialmente pueden presentar sobre su superficie aglutinantes o ningún aglutinante. En el caso del uso de micropartículas porosas o micropartículas anulares o en forma de cilindro hueco, la solución de reacción permanece también en las micropartículas, de modo que el espacio de reacción también se delimita por la superficie interior de estas partículas.

Preferentemente, las micropartículas se encuentran esencialmente individualizadas sobre el soporte (véase por ejemplo la Figura 6), preferentemente con una distancia promedio que corresponde a 1 a 20 veces el diámetro de partícula, de manera especialmente preferente de 2 a 10 veces el diámetro de partícula, de manera muy especialmente preferente de 3 a 5 veces el diámetro de partícula. Cuanto mayor es la distancia entre las micropartículas individuales, más completa es la separación lateral de los espacios de reacción respectivos, hasta que se supera una distancia crítica que lleva a una separación completa de los espacios de reacción de micropartículas adyacentes. Una separación completa significa que no tiene lugar intercambio de material alguno entre los espacios de reacción, que enmascara o inhibe de manera perturbadora la reacción de amplificación de señal respectiva o la detección de analito respectiva en otros espacios de reacción.

Una inmovilización permanente o no permanente de las micropartículas impide que las micropartículas que se encuentran preferentemente individualizadas por la tensión superficial de la solución de reacción que atrae a las micropartículas, se junten después de su retirada formando aglomerados de micropartículas de mayor tamaño.

En el espacio de reacción separado espacialmente tiene lugar la reacción de amplificación de señal (etapa b). En un espacio de reacción separado espacialmente pueden estar presentes una única micropartícula, pero también dos o más micropartículas en contacto.

Preferentemente la retirada de la solución de reacción tiene lugar por medio de aspiración, evaporación o centrifugación o dado el caso en combinación de estas etapas de procedimiento. Mediante la retirada de la solución de reacción se generan los espacios de reacción mediante fuerzas capilares en la interfase entre micropartículas y soporte. Preferentemente la solución de reacción se retira por centrifugación, apuntando las fuerzas centrífugas en diagonal o en perpendicular con respecto a la superficie del soporte hacia fuera, sobre la que se inmovilizaron permanentemente las micropartículas. A este respecto, la fuerza centrífuga que actúa tiene que adaptarse a la resistencia de la inmovilización de las micropartículas, de modo que si bien la solución de reacción se retira de manera óptima, en cambio las micropartículas permanecen sobre el soporte.

Preferentemente la aspiración tiene lugar con una pipeta. La retirada de la solución de reacción puede conseguirse también mediante evaporación. Igualmente es posible, mediante una fuerza centrífuga que actúa esencialmente en perpendicular hacia la superficie del soporte, enfocar los espacios de reacción más intensamente a las

micropartículas, dado que con ello puede empujarse más solución de reacción en el borde del recipiente de reacción y hacia las micropartículas. De manera correspondiente, solo una pequeña área del soporte, que rodea la interfase entre micropartículas y soporte, permanece humedecida con solución de reacción, en concreto con una delimitación claramente más aguda que sin centrifugación. Este modo de proceder tiene además la ventaja de que las micropartículas no tienen que inmovilizarse en el soporte durante la retirada de la solución de reacción permanentemente o por medio de la aplicación de un campo magnético, dado que se presionan por la fuerza centrífuga contra el soporte y por lo tanto no se inmovilizan permanentemente. El efecto de concentración de la solución de reacción cerca de las micropartículas es proporcional a la fuerza centrífuga o a la inclinación del soporte contra la fuerza centrífuga, a la hidrofobia del soporte y a la hidrofilia de la superficie de micropartícula. Es igualmente posible dejar actuar la fuerza centrífuga alejándose de o acercándose a la superficie del soporte, sobre el que se inmovilizaron las micropartículas. Como alternativa es posible dejar actuar la fuerza centrífuga alternativamente alejándose de y acercándose a superficie del soporte, sobre el que se encuentran las micropartículas. De esta manera se retiran de manera especialmente efectiva restos excesivos del líquido de reacción, que no se necesitan para los espacios de reacción, en particular de las cavidades de una microplaca de ensayo.

En el caso de la centrifugación, el soporte presenta dado el caso una abertura en la superficie ocupada con micropartículas a través de la que puede descargarse la solución de reacción centrifugada. Si el soporte está diseñado en forma de una placa de microtitulación, entonces sus cavidades pueden estar dotadas preferentemente en la zona del borde de un talado o un orificio. La abertura en el fondo de las cavidades asciende preferentemente a de 0,1 a 1,0 mm. Mediante aplicación de una fuerza centrífuga puede retirarse la solución de reacción en exceso más completamente de la cavidad sin que tenga que llevarse a cabo una etapa de aspiración adicional. Como alternativa es suficiente dado el caso aspirar desde el líquido y centrifugar los restos de líquido restantes hacia las zonas de borde de la cavidad de la microplaca de prueba.

Debido a la delimitación en los espacios de reacción individuales puede tener lugar una detección con resolución espacial de las señales de los productos de reacción. Además, para la detección de analitos individuales puede alcanzarse de manera rápida y segura la concentración crítica necesaria de los productos de reacción de la reacción de amplificación de señal en el espacio de reacción individual. Además, la delimitación de espacio de reacción puede usarse para delimitar reacciones de distinto tipo en diferentes espacios de reacción, para minimizar interferencias mutuas de las reacciones de distinto tipo tal como se conocen por ejemplo en la PCR multiplex. Además, la delimitación de espacio de reacción puede usarse para distribuir estadísticamente analitos en el sentido de un formato de ensayo digital en distintos espacios de reacción.

Estabilización de los espacios de reacción

Dado el caso, después de configurar los espacios de reacción separados espacialmente puede tener lugar una estabilización de los espacios de reacción separados. Preferentemente, esta estabilización de los espacios de reacción separados tiene lugar cubriendo las micropartículas inmovilizadas sobre el soporte con un líquido de separación (véase por ejemplo la Figura 4). El líquido de separación no es miscible con la solución de reacción. Preferentemente en el caso de la solución de reacción se trata de una solución acuosa y en el caso del líquido de separación se trata de una composición oleosa. Como alternativa a esto, en el caso de la solución de reacción puede tratarse de una composición oleosa y en el caso del líquido de separación puede tratarse de una solución acuosa. Preferentemente, en el caso de la composición oleosa puede tratarse de un aceite, preferentemente de un aceite mineral o aceite de silicona. El líquido de separación oleoso puede contener en cambio también detergentes y emulsionantes tales como por ejemplo Triton X-100, ABIL EM 90 (Degussa), Span 80, Tween 80 en concentraciones del 0,1-10 % y preferentemente del 1-5 %.

La estabilización de los espacios de reacción separados puede conseguirse también por que la película de líquido de la solución de reacción se cubre con un cubreobjetos.

Asimismo es posible que se emplee otra población de micropartículas para estabilizar los espacios de reacción entre las micropartículas, mediante lo cual esta otra población de micropartículas, por así decirlo, se emplea como una especie de separador o como barrera de difusión entre distintos espacios de reacción. Esta otra población de micropartículas puede presentar en comparación con las micropartículas, que se usan para la configuración de los espacios de reacción separados espacialmente, otras propiedades con respecto por ejemplo al tamaño, propiedades fluorescentes, magnéticas, paramagnéticas y/o funcionalizadas en superficie. En función del tamaño de las micropartículas de la otra población de micropartículas, que se emplean como separadores, puede agrandarse o reducirse la distancia de los espacios de reacción entre las micropartículas, que se usaron para la configuración de estos espacios de reacción, para poder adaptar la difusión y la disponibilidad de solución de reacción para la aplicación respectiva. Tales micropartículas pueden componerse preferentemente de Sepharose o nanocelulosa pero también de vidrio o materiales poliméricos similares, tal como se describieron también para la producción de micropartículas codificadas con fluorescencia. De manera especialmente preferente pueden emplearse también mezclas de micropartículas y nanopartículas, para reducir de manera especialmente efectiva la difusión en los huecos estructurales entre los espacios de reacción. Estas otras micro- o nanopartículas se usan preferentemente para diseñar los espacios de reacción, pudiendo alojarse por ejemplo en su estructura de poros interior componentes

de reacción, productos de reacción o moléculas de muestra y pudiendo emitirse de nuevo también por difusión. Mediante el uso de otras micropartículas o nanopartículas con tamaño de poro adaptado pueden alojarse, almacenarse y emitirse de manera dirigida productos de partida de la reacción de amplificación de señal, tales como nucleótidos trifosfato, siendo demasiado grandes por ejemplo los productos de reacción de mayor peso molecular, tales como moléculas de amplicón de una PCR, para penetrar en los poros de las partículas y por lo tanto permanecer en el espacio de reacción cerca de las micropartículas, que se usan para la configuración de los espacios de reacción. Los productos de reacción de bajo peso molecular, que se conocen como inhibidores de PCR, pueden difundirse por el contrario sin problemas desde el espacio de reacción, en cuyo interior se difunden las partículas porosas circundantes. La superficie de las otras micropartículas puede encontrarse también químicamente activada, tal como en el caso de bromociano-Sepharose o por oxidación en el caso de nanocelulosa. De esta manera pueden unirse a la superficie de estas partículas antes, durante o después de la reacción de amplificación de señal componentes de reacción o productos de reacción de la reacción de amplificación de señal, para influir en la reacción de amplificación de señal. Tales sustancias pueden ser preferentemente analitos de la muestra, moléculas estándar similares o idénticas al analito para fines de referencia, enzimas, anticuerpo pero ácidos nucleicos u oligonucleótidos. De este modo, sobre la superficie de las micropartículas para la configuración de los espacios de reacción pueden estar unidos todos los oligonucleótidos para una PCR y sobre la superficie de las otras partículas las moléculas de analito. A este respecto tiene lugar la unión de las moléculas de analito.

Mediante la estabilización de los espacios de reacción separados mediante por ejemplo cobertura con un líquido de separación, pueden protegerse los espacios de reacción a lo largo de periodos de tiempo más largos, por ejemplo a lo largo de varias horas o días, frente a influencias medioambientales tales como desecación. La desecación, en particular, cuando la reacción de amplificación de señal requiere temperaturas más altas, se reduce adicionalmente cuando en el líquido de separación usado para la cobertura están contenidas otras micropartículas con un diámetro entre preferentemente 1-100 μm . Las micropartículas contenidas en el líquido de separación se hunden después de la cobertura del espacio de reacción y forman de este modo una capa de sedimento. De esta manera se evita un contacto directo del flujo de convección en el líquido de separación con la solución de reacción.

Si en el caso de la solución de reacción se trata de una solución acuosa, entonces es asimismo posible que la solución de reacción se proteja por sustancias que se unen al agua frente a la evaporación y de manera correspondiente pueda suprimirse una cobertura con una composición oleosa como líquido de separación.

Si por ejemplo los espacios de reacción separados no se estabilizan mediante la cobertura con un líquido de separación, entonces la solución de reacción puede evaporarse parcialmente o por completo. La evaporación lleva a que los espacios de reacción se reduzcan y espacios de reacción adyacentes, confluentes, se separen unos de otros por ejemplo entre micropartículas situadas demasiado juntas. Una evaporación completa de la solución de reacción se consigue preferentemente mediante adición del 0,5 - 10 % de glicerol, 1-30 % de sacarosa y/o mediante adición de betaína 0,001-6 M y preferentemente betaína 1-3 M. Esta variante de procedimiento puede usarse también para detener de manera dirigida la reacción de amplificación de señal durante el secado de la solución de reacción.

Mediante la estabilización es posible tanto una delimitación del grosor de capa de los espacios de reacción en perpendicular a la superficie del soporte como una delimitación lateral de los espacios de reacción en paralelo a la superficie del soporte. El grosor de capa de los espacios de reacción puede ajustarse mediante el uso de micropartículas con diámetro definido. Preferentemente, el grosor de capa, en función de la aplicación se encuentra entre 10 nm y 100 μm , preferentemente entre 50 nm y 100 μm , de manera muy especialmente preferente entre 1 μm y 30 μm , en particular preferentemente entre 2 μm y 20 μm .

Etapas b): Llevar a cabo la reacción de amplificación de señal

En la siguiente etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo la reacción de amplificación de señal. Esta tiene lugar en los espacios de reacción separados espacialmente en función de la presencia del analito que va a detectarse.

Durante la reacción de amplificación de señal se genera con ayuda del sustrato presente en la solución de reacción, que se convierte por una actividad enzimática, el producto de reacción medible. A este respecto, la cantidad de producto de reacción formado en un espacio de reacción separado espacialmente puede usarse como medida para la cantidad de analitos que van a medirse en este espacio de reacción.

En la reacción de amplificación de señal se intensifica la señal medible del producto de reacción. Cuanto mayor es la duración de la reacción de amplificación de señal, más producto de reacción se produce y más intensa se vuelve la señal medible del producto de reacción.

Preferentemente la reacción de amplificación de señal tiene lugar durante más de 30 segundos, de manera especialmente preferente durante más de 5 minutos, de manera muy especialmente preferente el periodo de tiempo asciende a de 5 minutos a 48 horas. En particular se prefiere una reacción de amplificación de señal de 1 minuto a 3 horas.

La reacción enzimática de un sustrato durante la reacción de amplificación de señal comprende preferentemente una detección inmunológica. Preferentemente en el caso de la detección inmunológica puede tratarse de un ELISA (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)). Si la reacción enzimática de un sustrato comprende un ELISA como detección inmunológica, entonces el soporte puede presentar sobre su superficie aglutinantes, siendo los aglutinantes preferentemente de manera específica para los analitos que van a detectarse. En este caso las micropartículas usadas para la configuración de los espacios de reacción separados no presentan aglutinantes sobre su superficie, que son específicos a los analitos que van a detectarse.

La reacción enzimática de un sustrato durante la reacción de amplificación de señal comprende preferentemente una detección basada en ácido nucleico, por ejemplo una amplificación por medio de PCR (PCR = polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)). Si la reacción enzimática de un sustrato comprende una PCR como detección y se van a detectar por ejemplo uno o varios ácidos nucleicos como analitos, entonces por ejemplo las micropartículas pueden estar recubiertas con estreptavidina y sonda y cebadores individuales, varios o todos ellos, que se encuentran por ejemplo en la solución de reacción, pueden estar biotinilados en el extremo 5' o internamente. Si las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción, las sondas y cebadores se unen a las micropartículas a través de unión de avidina-biotina. Durante la fase de desnaturalización de PCR se desnaturaliza la estreptavidina, de modo que las sondas se emiten parcialmente o por completo al espacio de reacción. La liberación de los cebadores desde la superficie de micropartícula mejora la cinética de hibridación con el ácido nucleico de analito como molde, y aumenta así las intensidades de señal y la sensibilidad del sistema de prueba. Como alternativa es posible unir a la superficie de micropartículas recubiertas con avidina sondas de oligonucleótido biotiniladas como aglutinante, con las que hibridan los cebadores y sondas de un sistema de PCR antes o después de la inmovilización de las micropartículas. Después de haberse cerrado los espacios de reacción, deshibridar durante la fase de desnaturalización de PCR inicial todos los cebadores y sondas por el aglutinante y pueden difundirse por lo tanto en la solución de reacción para dar el ácido nucleico de analito, que se introdujo con la muestra en la solución de reacción. La PCR adicional tiene lugar preferentemente de manera exclusiva en la fase líquida, es decir la solución de reacción, lo que puede acortar el tiempo de difusión y por lo tanto la duración de la PCR en comparación con la PCR en fase sólida en proximidad directa de la superficie de micropartícula. Los aglutinantes pueden estar formados preferentemente por secuencias de ácido nucleico repetitivas, que son complementarias a la sección específica de analito de cebadores y sondas. Especialmente tienen sin embargo secuencias de ácido nucleico complementarias con las secuencias no específicas de analito de los cebadores y sondas. El uso de secuencias repetitivas como aglutinante permite unir una mayor cantidad de moléculas de cebador y de sonda sobre la superficie de las micropartículas y entonces liberarla en la solución de reacción. Preferentemente, con el objetivo de la detección multiplex, los cebadores y sondas de distintos sistemas de PCR se hibridan con la superficie de micropartículas de diferentes poblaciones de micropartículas. De esta manera se consigue llevar a cabo distintos sistemas de PCR en paralelo pero separados espacialmente en distintos espacios de reacción.

Mediante el uso de sistemas de cebador/sonda diferentes que están unidos en cada caso a distintas poblaciones de micropartículas, por ejemplo codificadas con fluorescencia de manera diferente, se generan en los espacios de reacción separados entre sí diferentes reacciones de PCR que no se afectan esencialmente entre sí. Influencias de este tipo, que pueden reducirse o evitarse mediante el procedimiento de acuerdo con la invención, son por ejemplo artefactos de cebador, inhibición competitiva o falso cebado. Estas influencias repercuten negativamente sobre la sensibilidad y la especificidad de las distintas reacciones de PCR y representan por lo tanto limitaciones importantes de PCR multiplex. Además se reduce drásticamente la necesidad de optimización que es necesaria en la mayoría de PCR multiplex debido a las influencias negativas expuestas.

Si se usan por ejemplo micropartículas codificadas con fluorescencia y sondas marcadas con fluorescencia como sustrato en la solución de reacción para una detección a base de ácido nucleico de este tipo, entonces, al comienzo de la PCR, debido a la extinción, no puede medirse ninguna señal de fluorescencia. Con la amplificación progresiva se genera en función de la cantidad formada de producto de reacción una señal de fluorescencia en este espacio de reacción. Una condición para ello es que las moléculas de oligonucleótido o polinucleótido modificadas con agentes de extinción y/o fluoróforo pueden hibridar entre sí a lo largo del intervalo de tiempo de reacción, lo que puede usarse también sin PCR para detección de hibridación multiplex (véanse por ejemplo las Figuras 7 y 8). En combinación con una PCR, es posible la realización de por ejemplo PCR en tiempo real en los espacios de reacción.

Una variante de realización de distintas PCR, separadas entre sí en distintos espacios de reacción sobre un soporte consiste en que se unen cebadores de sonda sobre la superficie de micropartículas codificadas con fluorescencia de manera reversible a través de avidina-biotina o sondas de captura. Los cebadores de sonda son oligonucleótidos y se componen de una sección en sentido 3' específica de molde con una longitud de preferentemente 10-30 nucleótidos y una sección en sentido 5' inespecífica de molde con una longitud de preferentemente 20-30 nucleótidos. Las zonas en sentido 5' de los cebadores de sonda de un amplicón se diferencian preferentemente uno de otro en que no se produce ningún cebado cruzado dentro del amplicón. Los cebadores de sonda permiten inicialmente la hibridación del extremo 3' en el molde y el alargamiento enzimático de manera complementaria al molde. Después de formarse los primeros amplicones, que comprenden ambos cebadores de sonda de un amplicón de PCR, se amplifican a través de los cebadores universales, que se añaden conjuntamente a la mezcla madre en una concentración de preferentemente 0,05-3 μM junto con la polimerasa y los nucleótidos y preferentemente con

las sondas, en una concentración de sonda de 0,01-3 M. Los cebadores universales corresponden preferentemente a la secuencia de la sección inespecífica de molde de los cebadores de sonda. Estos permiten una amplificación efectiva, incluso cuando los cebadores de sonda están contenidos en una concentración relativamente baja en el espacio de reacción. Es también posible que los cebadores universales y la sección en sentido 5' correspondiente a los mismos del cebador de sonda, tengan una secuencia que durante la PCR lleva a la formación de concatámeros de amplicón. Estas moléculas de amplicón formadas de manera repetitiva a partir de varias secuencias de amplicón están limitadas en su difusión en el espacio de reacción debido a su tamaño. En una forma de realización preferida, los cebadores universales están estructurados como cebadores de Amplifluor o Scorpion y sirven para todas las PCR que transcurren en la preparación de reacción como componente emisor de señal universal. La multiplexación en cada espacio de reacción es posible en la que distintas sondas que se emplean con diferentes colorantes fluorescentes para la detección de diferentes colorantes. Igualmente es posible diferenciar diferentes amplicones por que debido a su número diferente de pares de bases pueden unirse a cantidades específicas de colorantes de unión a ADN o de intercalación, tales como SybrGreen o EvaGreen. Mediante análisis de curvas de fusión pueden asignarse en la aplicación de estos procedimientos, picos de curvas de fusión a distintas temperaturas de fusión e intensidades de señal específicas a las distintas dianas.

Sistema de amplificación de señal

Preferentemente, la muestra o las micropartículas inmovilizadas sobre el soporte antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal en etapa b) se ponen en contacto con un sistema de amplificación de señal. El sistema de amplificación de señal presenta un primer y un segundo elemento. El primer elemento se une específicamente al analito que va a detectarse que puede estar unido preferentemente a un aglutinante de la micropartícula o del soporte o puede encontrarse no unido en la solución de reacción. El segundo elemento presenta una actividad enzimática que es adecuada para, al contacto con una solución de reacción en una reacción de amplificación de señal, permitir generar un producto de reacción medible. Mediante la incubación con el sistema de amplificación de señal, en la etapa b) posterior del procedimiento de acuerdo con la invención, puede conseguirse una cantidad elevada de producto de reacción medible.

Por la expresión "poner en contacto" se entiende un estado físico del contacto, que se lleva a cabo en condiciones que permiten la puesta en contacto de la muestra o de las micropartículas inmovilizadas sobre el soporte con el sistema de amplificación de señal. Las condiciones adecuadas para la puesta en contacto de la muestra o de las micropartículas inmovilizadas sobre el soporte con el sistema de amplificación de señal son conocidas en el estado de la técnica. Estas condiciones comprenden preferentemente un medio líquido y/o la humectación/puesta en contacto a una temperatura de $>0^{\circ}\text{C}$ a $<95^{\circ}\text{C}$.

Sustancias, que entran en la expresión "primer elemento" se unen en las condiciones seleccionadas preferentemente de manera selectiva a los analitos o a los aglutinantes ocupados con el analito. El primer elemento puede ser a base de (poli)péptidos, ácidos poli- u oligonucleicos o similares. Preferentemente en el caso del primer elemento se trata de un polipéptido, preferentemente de un anticuerpo, pudiendo estar comprendidos tanto anticuerpos policlonales y monoclonales con espectro de anticuerpos clásico como derivados o fragmentos procedentes de los mismos. En el caso del primer elemento puede tratarse también de un ácido nucleico, preferentemente de un ácido oligonucleico, de manera especialmente preferente de un ADN-ácido oligonucleico.

En el caso del "segundo elemento" puede tratarse de una sustancia con propiedades catalíticas tal como por ejemplo una enzima, DNAzimas, MNAzimas o anticuerpos catalíticas (catmab). Preferentemente en el caso del segundo elemento se trata de una peroxidasa, en particular de una peroxidasa del rábano picante (HRP, abreviatura de horseradish peroxidase en inglés).

Preferentemente el analito y/o el sistema de amplificación de señal presenta una actividad enzimática. Preferentemente el sistema de amplificación de señal presenta una actividad enzimática que al contacto con la solución de reacción en una reacción de amplificación de señal lleva a un producto de reacción medible. Preferentemente en el caso de la actividad enzimática se trata de la actividad de una enzima de la clase de las ADN polimerasas, ARN-polimerasas, transcriptasas inversas, ligasas, oxidasas, reductasas, transferasas, peroxidasas, fosfatasas, proteasas, peptidasas, lipasas, glicosidasas y/o luciferasas. Preferentemente el sistema de amplificación de señal puede comprender como primer elemento un polipéptido, por ejemplo un anticuerpo, que está marcado con una enzima, tal como por ejemplo peroxidasa, como segundo elemento. Asimismo preferentemente el sistema de amplificación de señal puede comprender como primer elemento un ácido nucleico, por ejemplo un ADN-ácido oligonucleico, que está marcado con una enzima, tal como por ejemplo peroxidasa, como segundo elemento. A este respecto es posible que por ejemplo un conjugado de peroxidasa-avidina se una a oligonucleótidos biotinilados como primer elemento.

La detección del analito con ayuda del sistema de amplificación de señal puede tener lugar o bien directamente o bien indirectamente. Si la detección tiene lugar directamente, entonces el primer y el segundo elemento están unidos directamente entre sí. De este modo por ejemplo el primer elemento puede ser un anticuerpo que está unido con por ejemplo una peroxidasa como segundo elemento. Si la detección tiene lugar indirectamente, entonces el segundo elemento no está unido directamente con el primer elemento, sino que se encuentra en un elemento adicional. Este

elemento adicional puede ser a base de (poli) péptidos, ácidos poli- u oligonucleicos, micropartículas o similares. De este modo por ejemplo el primer elemento puede ser un anticuerpo al que se une un anticuerpo secundario específico para este anticuerpo como elemento adicional. Este anticuerpo secundario puede comprender por ejemplo una peroxidasa como segundo elemento. Cuando el primer elemento comprende por ejemplo un marcaje con biotina, entonces el elemento adicional puede comprender un marcaje con avidina y un marcaje con el segundo elemento. De este modo es por ejemplo posible que el primer elemento pueda ser un anticuerpo biotinilado, al que se une una micropartícula marcada con avidina o un anticuerpo secundario marcado con avidina como elemento adicional. Esta micropartícula marcada con avidina o el anticuerpo secundario marcado con avidina comprende por ejemplo una peroxidasa como segundo. Si en el caso de este ejemplo se trata de micropartículas marcadas con avidina como elementos adicionales, entonces estas micropartículas marcadas con avidina preferentemente no son aquellas micropartículas que se usan para la configuración de los espacios de reacción separados espacialmente. Preferentemente el primer elemento del sistema de amplificación de señal está unido directamente con el segundo elemento del sistema de amplificación de señal. Preferentemente la detección del analito tiene lugar con ayuda del sistema de amplificación de señal directamente.

Siempre que el analito se detecte con ayuda de un aglutinante, el sistema de amplificación de señal puede unirse a los analitos antes, durante o después de que este se una a su aglutinante.

El tipo de señal medible ópticamente generada del producto de reacción depende del sistema de amplificación de señal usado y del sustrato usado de manera correspondiente de la solución de reacción. El experto en la materia conoce tanto sistemas de amplificación de señal adecuados como sustratos adecuados para ello de manera correspondiente para las soluciones de reacción.

Si en el caso de la actividad enzimática del sistema de amplificación de señal se trata de la actividad de una enzima, por ejemplo de una peroxidasa, entonces pueden emplearse sustratos en la solución de reacción, que dan como resultado un producto de reacción, que puede medirse mediante su absorción, fluorescencia o luminiscencia.

Es posible usar en un espacio de reacción más de un sistema de amplificación de señal. Por ejemplo pueden usarse dos sistemas de amplificación de señal distintos para detectar dos analitos en una preparación de reacción. A este respecto los dos productos de reacción generados pueden presentar máximos de absorción diferentes, que pueden extinguir dos colorantes fluorescentes distintos.

La detección del analito por medio de un sistema de amplificación de señal puede suprimirse cuando el analito que va a detectarse presenta en sí una propiedad enzimática, que al contacto con la solución de reacción en una reacción de amplificación de señal lleva a un producto de reacción medible. Cuando el analito que va a detectarse presenta la actividad de una enzima, por ejemplo de una peptidasa, entonces pueden emplearse sustratos en la solución de reacción, que dan como resultado un producto de reacción, que puede medirse ópticamente debido a su fluorescencia. Entre estos figuran por ejemplo secuencias peptídicas que comprenden un colorante fluorescente y un agente de extinción y que pueden escindirse por la peptidasa. Si se escinde la secuencia peptídica, entonces se aumenta la proximidad espacial entre colorante fluorescente y agente de extinción y el colorante fluorescente como producto de reacción generado puede emitir tras excitación con luz de longitud de onda adecuada, que puede medirse.

Igualmente puede suprimirse la detección por medio de un sistema de amplificación de señal, cuando el analito que va a detectarse en la reacción de amplificación de señal puede multiplicarse por una enzima y en la reacción de amplificación de señal se usa además un sustrato que se convierte mediante la actividad de la enzima para dar un producto de reacción medible. Preferentemente esta variante de realización del procedimiento de acuerdo con la invención se emplea la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) u otras, también procedimientos de amplificación en tiempo real isotérmicos, tales como amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de la recombinasa y polimerasa (RPA), amplificación dependiente de helicasa (HDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA). Como enzimas se emplean preferentemente ADN polimerasas termoestables, tales como la Taq-polimerasa en forma modificada o forma no modificada con una actividad exonucleasa o sin una actividad exonucleasa. Asimismo pueden emplearse transcriptasas inversas o polimerasas con actividad de desplazamiento de cadena o ARN-polimerasas. Como sustrato se usan preferentemente sondas TaqMan, Hybprobe, Scorpion, LoopTag, balizas moleculares o cebadores Amplifluor, que junto con cebadores correspondientes, tampones de reacción y nucleótidos trifosfato se usan para la PCR en tiempo real en el espacio de reacción. Con la amplificación progresiva se forma o se extingue en función de la cantidad formada de producto de reacción una señal de fluorescencia.

Etapa c): Medir ópticamente los productos de reacción

En la etapa c) del procedimiento de acuerdo con la invención tiene lugar la medición óptica de los productos de reacción. Preferentemente en el caso del producto de reacción se trata de un producto de reacción medible ópticamente. Preferentemente se trata de un producto de reacción que puede medirse ópticamente mediante su absorción, luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia. El producto de reacción puede ser medible ópticamente también mediante la extinción de la fluorescencia.

El efecto de la “extinción de fluorescencia” (en inglés quenching) designa procesos que tienen como consecuencia la disminución en la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo, sin que se descomponga el fluoróforo. El experto en la materia conoce distintos efectos que pueden llevar a la extinción de fluorescencia tales como por ejemplo formación de complejo, conversión interna, transferencia de energía a otras moléculas, que son los denominados agentes de extinción. Ha de diferenciarse de la extinción la disminución de la fluorescencia debido a altas intensidades de excitación o cambios químicos del colorante fluorescente, por ejemplo mediante oxidación en presencia de oxígeno. Este tipo de disminución de fluorescencia se denomina degradación del fluoróforo, descomponiéndose el fluoróforo de manera irreversible. Por el contrario, la extinción de fluorescencia de un fluoróforo por un agente de extinción es reversible: en cuanto el agente de extinción se retira, aumenta de nuevo la fluorescencia.

Medir ópticamente los productos de reacción se realiza preferentemente de tal manera que los espacios de reacción separados espacialmente del soporte se registran de manera individualizable, de modo que pueden asignarse valores de medición a espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales.

Etapas d): Proporcionar dado el caso los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra

En la etapa d) del procedimiento de acuerdo con la invención tiene lugar dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra. A este respecto se usan preferentemente los datos de medición de la medición óptica para el reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales. Preferentemente para el reconocimiento y/o individualización se emplea un algoritmo matemático, tratándose preferentemente de un algoritmo Ranking-booster, Dual-Octagon, Inverted-Dual-Area, Intensity-Vector o de una combinación de los mismos.

Las zonas en las que se ha generado una señal de analito, que se registró mediante el proceso de medición, se asocian por el algoritmo adecuado en cada caso a las micropartículas individuales y/o espacios de reacción individuales.

Para la separación de las micropartículas se usa preferentemente un procedimiento de segmentación basado en bordes, por ejemplo el conocido algoritmo de Canny (John Francis Canny, "Finding Edges and Lines in Images", AI Technical Reports 1964-2004, 1 de junio de 1983). Este puede detectar micropartículas individualizadas y detectar zonas de situadas estrechamente unas junto a otras como tal. Las micropartículas ya reconocidas como individualizadas (aglomerados de micropartículas) se suministran directamente a las etapas de procesamiento de imágenes posterior para la determinación de las intensidades de señal. Las zonas de micropartículas estrechamente unas junto a otras se separan en micropartículas individuales con ayuda del algoritmo Ranking-Booster.

Algoritmo Ranking-booster

Las micropartículas usadas en el procedimiento de acuerdo con la invención pueden encontrarse individualmente y/o en parte situadas estrechamente unas junto a otras sobre el soporte. Si las micropartículas se encuentran estrechamente unas junto a otras sobre el soporte, entonces se emplea preferentemente el algoritmo Ranking-booster para la separación virtual de micropartículas que están en contacto mutuamente.

Las micropartículas empleadas en el procedimiento de acuerdo con la invención son preferentemente esféricas o discos circulares. En el caso del uso de este algoritmo para la determinación de la concentración de analito se pierde la micropartícula como estructura individual, preferentemente esférica para el reconocimiento de micropartículas, dado que micropartículas adyacentes están en contacto y por lo tanto aparecen en primer lugar en la imagen como una estructura confluyente. En el caso del uso de por ejemplo micropartículas con superficie de base triangular, los algoritmos descritos a continuación tienen que adaptarse de manera correspondiente a la geometría válida a priori de estos objetos.

Toma de la imagen

En primer lugar se genera una imagen digital de las micropartículas que se encuentran sobre el soporte, preferentemente se crea mediante un procedimiento de toma de imágenes completamente automático. Las micropartículas esféricas usadas preferentemente aparecen en la imagen capturada como objetos circulares. Deberá evitarse una sobreexposición de las micropartículas durante la creación de la imagen, dado que con ello se limitaría la aplicabilidad de este algoritmo. Preferentemente se usa un sistema automático de exposición que compensa una posible sobreexposición de las micropartículas.

Procesamiento de la imagen tomada

La imagen tomada se procesa preferentemente en primer lugar con un algoritmo de reconocimiento de objetos convencional, que reconoce micropartículas individualizadas y aglomerados de micropartículas como tal (véanse por ejemplo las Figuras 9 y 10). Solo los aglomerados de micropartículas se suministran a un procesamiento adicional

mediante el Ranking-Booster. Preferentemente pueden tomarse imágenes de nuevo de los recortes de imagen que comprenden los aglomerados de micropartículas con una mayor resolución. Los límites exteriores de los aglomerados de micropartículas se determinan en esta etapa.

5 Creación de una "imagen de rango relativo"

En la etapa siguiente se examina una máscara de píxeles circunferencial preferentemente en esencia circular concéntricamente alrededor de cada píxel de aglomerado, cuyo diámetro corresponde al diámetro de micropartícula mínimo. El rango relativo del píxel examinado actualmente o su máscara de píxeles circunferencial se determina y este valor de coordenadas XY correspondientes se almacena en una imagen intermedia, la imagen de rango relativo (véase por ejemplo la Figura 11). Esta imagen de rango relativo puede procesarse opcionalmente antes del procesamiento de imágenes adicional con por ejemplo un filtro de alisado, por ejemplo un filtro de mediana de 3x3 o 5x5, para eliminar posibles interferencias locales.

15 Creación de una imagen binaria a partir de la "imagen de rango relativo"

En una etapa adicional se binariza la imagen de rango relativo preferentemente con un valor umbral, dado que las claridades absolutas de las micropartículas según Ranking-Booster ya no desempeñan ningún papel (véase por ejemplo la Figura 12). Preferentemente los valores umbral se encuentran en un intervalo de 0,1 a 0,9, preferentemente de 0,25 a 0,8, de manera especialmente preferente de 0,3 a 0,7, de manera muy especialmente preferente de 0,4 a 0,5. Como consecuencia de la binarización, puede reconocerse la región central de cada micropartícula en la imagen binaria generada como disco central circular, porque el punto central de una micropartícula (en la imagen original) es siempre su píxel más claro y las claridades de píxel decrecen radialmente. Preferentemente los discos centrales incluyen preferentemente una superficie que es menor que la superficie de una micropartícula, de modo que no entran en contacto los discos centrales de las micropartículas que están en contacto mutuamente.

Por medio del reconocimiento de objetos se identifican los discos centrales. Otros objetos pequeños en los espacios intermedios de micropartículas que están en contacto, que parecen por ejemplo falciformes o triangulares, son artefactos, que pueden reconocerse en su forma no redondeada y superficie demasiado pequeña. Estos artefactos preferentemente se cancelan y no se tienen en cuenta en el cálculo adicional.

Detección de los puntos de contacto entre las micropartículas

Para obtener de nuevo la superficie original de las micropartículas, se amplían los discos centrales etapa a etapa, de modo que los discos centrales ampliados representan marcas para las micropartículas halladas. Alrededor del borde de cada disco central identificado se agrega en cada caso una capa de píxeles por etapa de iteración (véase por ejemplo la Figura 13). En cuanto un píxel recién agregado de un disco central limita con un píxel original o ya agregado de otro disco, está identificado un punto de contacto entre micropartículas (véase por ejemplo la Figura 14). La detección de un punto de contacto finaliza la inflación de los dos discos centrales implicados, los píxeles de la última capa incompleta se eliminan de nuevo. Para discos centrales, para los que no se detectó aún ningún punto de contacto, se llevan a cabo iteraciones de inflación adicionales. La inflación de los discos centrales se limita sin embargo al objeto de aglomeración original, es decir las iteraciones para un disco se detienen en cuanto debiera agregarse un píxel que no pertenece al objeto total de partida.

Opcionalmente puede prescindirse de la detección de los puntos de contacto entre micropartículas y solo limitar la inflación el objeto de aglomeración original, es decir a los discos centrales pueden agregarse también capas incompletas, sin embargo sin a este respecto solapar discos centrales crecientes de micropartículas adyacentes y de esta manera dañarlos (véase por ejemplo la Figura 15). Los discos centrales ampliados marcan las superficies que pertenecen a las micropartículas en la imagen.

Determinación de la intensidad de señal del producto de reacción

Después de haber tenido lugar la identificación de las micropartículas individuales en un aglomerado de micropartículas así como dado el caso la asociación de estas micropartículas individuales a una población de micropartículas, se determina la señal dependiente de la concentración de analito del producto de reacción.

Algoritmo Dual-Octagon

Para la detección de analitos unidos a la superficie de micropartícula (fluorescencia anular o para la detección de fluorescencia de analito en los espacios de reacción es adecuado el algoritmo Dual-Octagon descrito a continuación.

En determinadas circunstancias, las coordenadas de imagen de un objeto de imagen, por ejemplo de las micropartículas codificadas por fluorescencia, no pueden determinarse de manera precisa. El motivo de ello puede ser por ejemplo la falta de nitidez o el movimiento del objeto durante la toma de imagen, tal como por ejemplo en el caso de micropartículas no inmovilizadas permanentemente, que se mueven en el espacio de reacción. Otro motivo

puede encontrarse en las propiedades ópticas de la trayectoria de rayo usada en el sistema de medición (véase por ejemplo la Figura 16).

No obstante, para poder determinar de manera precisa la claridad total del analito unido a la micropartícula y marcado, puede aplicarse el algoritmo de procesamiento de imágenes divulgado en la presente invención "Dual-Octagon". Este necesita únicamente las coordenadas XY aproximadas del objeto. El procedimiento se basa en que, por regla general, alrededor del objeto que va a evaluarse, está presente una claridad de fondo detectable en el espacio de reacción.

Para la aplicación del algoritmo Dual-Octagon tienen que garantizarse las siguientes condiciones previas: El tamaño del objeto en píxeles tiene que ser conocido. Esta información puede estar presente por ejemplo mediante el cálculo a partir del tamaño de objeto real, ampliación y resolución de la cámara o especificaciones disponibles de las micropartículas, o puede obtenerse de información adicional. Las coordenadas XY aproximadas del objeto en el espacio de reacción tienen que poder determinarse con una precisión de 1-10 μm . Tienen que encontrarse suficientemente pocos objetos extraños en el entorno directo del objeto de imagen examinado, de modo que las micropartículas se encuentran individualmente y no se ven afectados los campos de medición necesarios para el algoritmo.

En el caso de la aplicación del algoritmo Dual-Octagon, el número real de los píxeles que pertenecen al objeto N_{Or} e igualmente las coordenadas XY-centro del objeto se determinan con tanta precisión como sea posible. Estas coordenadas determinadas se denominan además como coordenadas supuestas X_a , Y_a , dado que pueden desviarse de las coordenadas reales no conocidas X_r , Y_r del objeto en una distancia de desplazamiento máxima $\pm D_x$, $\pm D_y$.

Alrededor de las coordenadas XY supuestas del objeto se centra un campo de medición M_O para el objeto con número de píxeles definido N_O colocado (véase por ejemplo la Figura 17). El tamaño de este campo de medición de objeto puede dimensionarse preferentemente de modo que el objeto está contenido por completo en el campo de medición también en un desplazamiento $D_x D_y$ que aparece como máximo entre coordenadas reales y supuestas. La forma del campo de medición de objeto puede ser circular, elíptica, un polígono convexo u otra forma geométrica adecuada. En particular es adecuado un polígono octogonal, dado que este tiempo de cálculo puede realizarse con ahorro. La suma de los valores acromáticos de todos los píxeles en campo de medición de objeto ΣM_O se determina.

Además del campo de medición de objeto M_O se define un segundo campo de medición M_H para el fondo con número de píxeles definido N_H . Este campo de medición de fondo rodea el campo de medición de objeto, es decir M_H tiene que contener un orificio suficientemente grande para M_O . En particular es adecuado un polígono octogonal concéntricamente alrededor del campo de medición de objeto M_O . Entre los dos campos de medición puede quedar opcionalmente una distancia.

Opcionalmente los píxeles del campo de medición de fondo M_H se someten a una corrección de valores atípicos, es decir un número de los píxeles más oscuros y un número preferentemente de igual tamaño de los píxeles más claros se excluye de la evaluación. El número de píxeles N_H del campo de medición de fondo se reduce hasta el número de píxeles que queda después del filtrado. El número de píxeles que van a descartarse dependerá de la probabilidad con la que se encuentran objetos extraños en el campo de medición de fondo. Opcionalmente pueden emplearse también otros procedimientos adecuados para la corrección de valores atípicos, por ejemplo procedimientos que tienen en cuenta la dispersión realmente presente de los valores acromáticos.

La suma de los valores acromáticos de todos los píxeles que quedan después del filtrado en el campo de medición de fondo ΣM_H se determina.

El valor acromático de fondo medio cerca del objeto GW_H se calcula mediante:

$$GW_H = \Sigma M_H / N_H$$

La claridad del objeto GW_O , es decir su valor acromático medio, se calcula:

$$GW_O = (\Sigma M_O - (GW_H \cdot (N_O - N_{Or}))) / N_{Or} = (\Sigma M_O - ((\Sigma M_H / N_H) \cdot (N_O - N_{Or}))) / N_{Or}$$

La fórmula anterior tiene en cuenta que el campo de medición de objeto es mayor que el objeto real y por lo tanto va acompañado de muchos valores acromáticos del fondo en la adición. Se parte de que el fondo en la zona del campo de medición de objeto es exactamente tan alto como en el campo de medición de fondo circundante. Si se multiplica el valor de fondo por la diferencia entre número de píxeles del campo de medición de objeto y número de píxeles del objeto, se obtiene la suma de los valores acromáticos demasiado aceptados y puede restarse estos de la suma de los valores acromáticos en el campo de medición de objeto. La claridad así calculada del objeto GW_O no está aún en sí corregida con respecto al fondo. El método preferido de la corrección con respecto al fondo es la obtención de la diferencia del valor acromático medio del objeto (GW_O) y el valor acromático medio del fondo (GW_H):

$$GW_{O, \text{corregido con respecto al fondo}} = GW_O - GW_H$$

Opcionalmente pueden usarse otros procedimientos para la corrección con respecto al fondo final del objeto.

Ejemplo de cálculo por medio de la representación esquemática:

- 5 $N_{Or} = 21$... número real de los píxeles que pertenecen al objeto
 $N_o = 69$... número de píxeles del campo de medición de objeto
 $\Sigma M_o = 1098$... suma de los valores acromáticos de todos los píxeles en el campo de medición de objeto
 $N_H = 60$... número de píxeles que queda después del filtrado del campo de medición de fondo (exclusión de los 8 píxeles más claros y los 8 píxeles más oscuros del campo de medición de fondo)
- 10 $\Sigma M_H = 215$... suma de los valores acromáticos de todos los píxeles que quedan después del filtrado en el campo de medición de fondo
 $GW_H = 3,583$... valor acromático de fondo medio cerca del objeto
 $GW_o = 44,10$... con claridad determinada con Dual-Octagon del objeto
- 15 para la comparación:
 $GW_{Or} = 31,2$... claridad media en la zona de la capa de objeto supuesta

- 20 La comparación entre GW_o y GW_{Or} muestra que mediante la aplicación del algoritmo Dual-Octagon se mejora la relación señal-ruido en el presente ejemplo en aproximadamente un 30 %.

Algoritmo Inverted-Dual-Area

- 25 Para la detección de analitos en el entorno líquido de micropartículas, en particular en micropartículas que se encuentran juntas sobre el soporte, se prefiere el algoritmo Inverted Dual-Area.

- 30 En el caso de espacios de reacción que están en contacto, en el caso de solapamiento de fondo / campo de medición demasiado intenso (solapamiento octogonal) los espacios de reacción adyacentes no se evalúan con el algoritmo Dual-Octagon, dado que ningún campo de medición de fondo para la corrección de la señal del producto de reacción puede definirse con tamaño suficiente y los campos de medición de micropartículas adyacentes pueden solapar demasiado. El algoritmo Dual-Octagon puede llevar así con una densidad creciente del empaquetamiento de micropartículas sobre el soporte a resultados falseados.

- 35 El algoritmo Inverted-Dual-Area usa la zona central de las micropartículas para la calibración de fondo, que presenta preferentemente solo en pequeña medida una señal del producto de reacción. La señal está formada normalmente como estructura anular, cuando se genera directamente sobre la superficie de la micropartícula, es decir, disminuye hacia el punto medio de la micropartícula. Si la señal se genera en el entorno directo de la micropartícula en la fase líquida del espacio de reacción, entonces esta señal permanece en la zona de la superficie de contacto de la micropartícula con el soporte prácticamente libre por completo. Cuanto más grande es la micropartícula, más píxeles se encuentran disponibles para la calibración de fondo. Preferentemente los píxeles se usan para la calibración de fondo (área 1), cuya desviación estándar de la media de las intensidades de la escala de grises de la señal de analito se diferencia en al menos un factor de 3 de la desviación estándar de la media de las escalas de grises de la señal de analito en la zona de la fila de píxeles exterior de la micropartícula (área 2).

- 45 Los procedimientos matemáticos del algoritmo Dual-Octagon pueden adaptarse por el experto en la materia fácilmente al algoritmo Inverted-Dual-Area. Dado que las superficies usadas para la calibración de fondo y la señal dependen de la distribución de la señal sobre la micropartícula respectiva, se usan preferentemente superficies que pueden variar en el caso de mediciones múltiples y de micropartícula a micropartícula para la optimización de la relación de señal / ruido. Para acortar el tiempo de medición es como alternativa igualmente posible usar el conocimiento previo y por ejemplo emplear superficies circulares u octógonos de tamaños fijos para la población de micropartículas respectiva.

- 55 Preferentemente el algoritmo Inverted-Dual-Area se usa para mediciones cinéticas o para la evaluación de reacciones controladas de manera termocíclica.

- Una condición previa para la aplicación del algoritmo Inverted Dual-Area en el registro y superposición de tomas de imágenes de color de diferentes canales de color es que se use una trayectoria de rayo corregida cromáticamente para el sistema de medición o que el cambio de coordenadas de objetos multicolor se corrige por el software de evaluación teniendo en cuenta la aberración cromática. Este requisito resulta preferente en sistemas de medición de fluorescencia multicolor, tal como pueden emplearse por ejemplo en la evaluación de pruebas de micropartículas codificadas con fluorescencia.

Análisis

- 65 Mediante la delimitación de los espacios de reacción es posible atribuir los analitos preferentemente unidos al soporte a señales de analito individuales. Cuanto más se desplaza la relación del número de espacios de reacción y

analitos en la muestra en la dirección de los espacios de reacción, más probable es que solo se encuentre una molécula de analito en un espacio de reacción. Esto permite en el intervalo de concentración de analito inferior una cuantificación absoluta, es decir digital, dado que el número de espacios de reacción positivos corresponde al número de analitos en la muestra o al número de analitos unidos a partir de la muestra. Esto supone que ninguna o

- 5 solo hay una unión inespecífica muy pequeña de constituyentes de la solución de reacción al soporte. Si se unen moléculas de analito y constituyentes de la solución de reacción en pequeña medida de manera inespecífica al soporte, puede despreciarse el error resultante de ello o determinarse y calcularse experimentalmente con referencia a muestras de control negativo para los analitos.
- 10 Si la muestra se distribuye por completo en los espacios de reacción, entonces puede extrapolarse el número de analitos preferentemente de manera directa a partir del volumen de espacio de reacción al volumen de muestra. El volumen de espacio de reacción puede calcularse preferentemente en el caso del uso de micropartículas a partir de la geometría esférica, dado que es directamente proporcional al volumen esférico de las micropartículas. Como alternativa, en el caso del uso de un colorante fluorescente para la generación de una señal inicial, que se extinguirá
- 15 en el transcurso de la reacción de amplificación de señal, puede usarse la intensidad de fluorescencia o la caída de intensidad de la señal inicial radialmente alejándose desde el centro de la micropartícula, para calcular el volumen de espacio de reacción con aproximación suficiente. La intensidad de fluorescencia como también la caída de la intensidad de fluorescencia durante la reacción de amplificación de señal son proporcionales al volumen del espacio de reacción respectivo. A partir de la suma del volumen de todos los espacios de reacción resulta el volumen total
- 20 del espacio de reacción del que se calcula el volumen total de la muestra empleada.

Si durante la reacción de amplificación de señal se extingue o genera una fluorescencia superficial o una fluorescencia muy cerca de la superficie, entonces es preferente incluir únicamente las micropartículas situadas en el espacio de reacción con su fluorescencia superficial, la fluorescencia situada muy cerca o su fluorescencia de

- 25 codificación en la medición y evaluación, sin tener en cuenta el espacio de reacción colocado periféricamente para ello.

Algoritmo Intensity-Vector

- 30 Para la detección de analitos en el entorno líquido de micropartículas, en particular en el caso de micropartículas que se encuentran estrechamente empaquetadas sobre el soporte, se prefiere el algoritmo Intensity-Vector.

Otra posibilidad es el cálculo de los vectores de caída de intensidad radiales, que es especialmente adecuada para la evaluación de espacios de reacción no completamente cerrados lateralmente, dado que estos permiten una descripción de espacios de reacción no circulares. Cuanto más juntos se colocan los vectores, con mayor precisión puede describirse el espacio de reacción por algoritmos correspondientes. El registro de los vectores de intensidad tiene lugar mediante el registro concéntrico de la señal del producto de reacción de la reacción de amplificación de

- 35 señal en el espacio de reacción mediante lectura de los píxeles con distancia angular correspondiente en el mismo radio. En el caso de un espacio de reacción concéntrico de manera circular, las intensidades de píxel en todo el radio son iguales con mayor aproximación. El centro de la alineación concéntrica de los vectores de intensidad puede ser una micropartícula pero también un elemento de un sistema de amplificación de señal, que se encuentra por ejemplo sobre una molécula de analito inmovilizada unida indirectamente al soporte.

Si los espacios de reacción están en contacto parcialmente, entonces a través de algoritmos adecuados se calcula la mezcla de producto de reacción de la reacción de amplificación de señal de espacios de reacción adyacentes.

- 45

Analitos unidos al soporte en espacios de reacción lateralmente no separados por completo o solo parcialmente pueden registrarse mediante una medición cinética de la actividad catalítica del sistema de amplificación de señal, siempre que el analito no sea en sí una enzima que puede detectarse directamente mediante su actividad enzimática. Por ejemplo, partiendo del sitio del elemento unido sobre el soporte del sistema de amplificación de

- 50 señal, puede describirse la propagación del producto de reacción en el espacio de reacción por vectores de intensidad, que se hacen mayores a medida que avanza la reacción, siempre que la enzima no pierda su actividad enzimática.

Dado que la intensidad de la extinción o generación de fluorescencia en la solución de reacción es la máxima directamente en el sistema de amplificación de señal activo, preferentemente mediante la descripción de los patrones de distribución de intensidad y su variación se asignan zonas confluentes de la extinción de fluorescencia a diferentes sistemas de amplificación de señal. De esta manera pueden identificarse de manera segura moléculas de sistemas de amplificación de señal con una distancia menor que 10 μm entre sí y contarse en el marco de una

- 60 cuantificación absoluta.

Para la normalización del procedimiento de medición se determina el grosor de capa, que es proporcional a la intensidad de fluorescencia de la solución de reacción en el espacio de reacción en el instante t_0 , preferentemente para cada recorte de imagen.

- 65 Del grosor de capa, la viscosidad o composición de la solución de reacción y la termoconvección depende de

manera decisiva de la rapidez con la que el producto de la reacción de amplificación de señal se difunde al espacio de reacción. La difusión del producto de reacción puede verse afectada también considerablemente mediante el uso de sustratos de precipitación o de sustratos cuyo producto de reacción se une al soporte o a micropartículas en proximidad directa.

5 Para el cálculo de la concentración de analito es posible determinar el número de moléculas del sistema de amplificación de señal identificadas, el número de micropartículas de señal intensificada, los espacios de reacción de señal intensificada o "agujeros negros". En cambio es también posible de manera correspondiente al procedimiento de acuerdo con la invención, registrar el producto de reacción que se generó por los sistemas de amplificación de
10 señal, como señal total a lo largo de todos los distintos tipos de espacios de reacción, en particular con mayor concentración de analito en la muestra. Esta señal total puede calibrarse con respecto a una referencia externa. El tiempo en el que se extingue la actividad enzimática en los espacios de reacción, como también la medida de la extinción, son proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

15 Muestras de referencia externas, que tienen diferentes concentraciones de analito, se arrastran preferentemente para la creación de curvas de calibración en la preparación paralela.

A continuación se representa a modo de ejemplo la aplicación del algoritmo Intensity-Vector para la detección de analitos. Los productos de reacción de la reacción de amplificación de señal se determinan a partir de moléculas de
20 enzima individuales, que se extinguen o se unen al analito en el espacio de reacción de manera difundible o por ejemplo pueden encontrarse unidos a micropartículas o al soporte. Preferentemente se realizan las siguientes etapas de procedimiento:

25 Formación de N vectores de perfil de igual longitud a partir del punto medio de reacción de la solución de sustrato de enzima en todas las direcciones con ángulos equidistantes. Se forman preferentemente 8 vectores, preferentemente en un ángulo de 45°, preferentemente ≥ 12 vectores. La longitud de los vectores L se selecciona de modo que también se registra con la intensidad máxima de la señal de analito por completo hasta que se alcanza el nivel de señal del fondo.

30 Después tiene lugar la determinación de los perfiles de intensidad en cada vector con remuestreo mediante algoritmo de Bresenham inverso. Los perfiles pueden alisarse opcionalmente. Como alternativa puede llevarse a cabo un ajuste de función frente a una función adecuada, que comprende la evolución de perfil habitual. El procedimiento puede emplearse en el caso de evoluciones de señal positivas (aumento de señal en el caso de presencia del analito) y también en el caso de evoluciones de señal invertidas (caída de señal/extinción en el caso
35 de presencia de analito).

La detección de la caída final de la señal en cada vector de perfil da como resultado la extensión del analito para esta dirección, mediante lo cual puede determinarse la forma de extensión del producto de reacción de sustrato.

40 La detección del valor final de la señal en cada vector de perfil da como resultado el valor de fondo en esta dirección. Una obtención de valor medio corregido con respecto a valores atípicos a través de los valores de fondo de todos los vectores de perfil es adecuada para cuantificar todo el objeto. Si uno o varios vectores alcanzan no el valor de fondo total (en medida suficiente) puede repetirse el procedimiento con vectores de perfil más largos. Como alternativa puede detectarse de manera iterativa de este modo una reunión con un objeto extraño. Evoluciones de señal que
45 transcurren de manera no monótona hacia el final del vector de perfil, indican una confluencia de los productos de reacción de la reacción de amplificación de señales de moléculas de amplificación de señal adyacentes de espacios de reacción lateralmente no delimitados o confluentes.

Un aumento de señal o caída de señal escalonado al comienzo del vector de perfil puede deberse por ejemplo a uno o varios sólidos en el espacio de reacción, tal como por ejemplo una micropartícula en la que se inmovilizó el sistema de amplificación de señal en el transcurso del procedimiento de detección, y que preferentemente en sí no emite ninguna señal en el intervalo de longitud de onda de señalización. La medida de este paso puede usarse como
50 señal de referencia.

55 Cálculo de valores:

N ... número de todos los vectores de perfil
L ... número de los elementos en cada vector de perfil tras remuestreo
 $I_{p,k}$... intensidad del vector de perfil p en el punto k
60 H_p ... valor de fondo del vector de perfil p
 H_0 ... valor de fondo del objeto es una función de todos los valores de fondo H_p , $H_0 = f(H_p)$
 I_0 ... intensidad de analito del objeto, calculada mediante

$$I_o = \frac{1}{N} \cdot \sum_{p=1}^N \sum_{k=1}^L I_{p,k} - H_o$$

Algoritmo de perfil radial

- 5 Para la detección de señales de analito muy débiles directamente sobre la superficie de micropartículas esféricas se usa preferentemente el algoritmo de perfil radial.

Partiendo del punto medio de cada micropartícula se calcula un perfil radial. Para ello se forma a distancias de radio que crecen píxel a píxel el valor medio de todos los píxeles dispuestos en forma de círculo, que corresponden al
10 radio respectivo. Normalmente los píxeles, que se encuentran cerca del borde de micropartícula, generan un pico de intensidad claro en la evolución de perfil. La señal resulta de la altura de este pico de intensidad. Opcionalmente los valores pueden incluirse los radios vecinos directamente junto a los picos de intensidad en la evaluación de señal.

Formas de realización del procedimiento de acuerdo con la invención

- 15 En una forma de realización, los aglutinantes, que son específicos para los analitos que van a detectarse se encuentran sobre la superficie del soporte.

En esta forma de realización preferida el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la detección de un
20 analito en una muestra (preferentemente detección singleplex) y comprende las etapas a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte que porta preferentemente aglutinantes en su superficie siempre que el analito no sea una enzima, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible; b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal; c) medir ópticamente los productos de reacción; y d) dado el
25 caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra, y se caracteriza por que antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación la solución de reacción se retira preferentemente por
30 centrifugación, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción.

Las micropartículas actúan como puntos de nucleación para la formación de los espacios de reacción separados
35 espacialmente y preferentemente no presentan sobre su superficie ningún aglutinante. La muestra se aplica preferentemente antes de la solución de reacción sobre el soporte. Preferentemente antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal en la etapa b) tiene lugar una puesta en contacto de la muestra con un sistema de amplificación de señal, en donde el sistema de amplificación de señal presenta un primer elemento y un segundo elemento y en donde el primer elemento se une específicamente a los analitos que van a detectarse y el segundo elemento presenta una actividad enzimática. Preferentemente el primer elemento del sistema de amplificación de
40 señal está unido directamente con el segundo elemento del sistema de amplificación de señal. Tras la configuración de los espacios de reacción separados espacialmente mediante la retirada de la solución de reacción, por ejemplo mediante aspiración, y antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal tiene lugar preferentemente una estabilización de estos espacios de reacción.

45 Preferentemente el sistema de amplificación de señal presenta la actividad de una enzima. Preferentemente en el caso del primer elemento del sistema de amplificación de señal se trata de un anticuerpo en el que está presente unida la enzima, por ejemplo una peroxidasa, como segundo elemento. La solución de reacción presenta preferentemente un sustrato que mediante la reacción por la enzima da como resultado un producto de reacción, que puede medirse ópticamente debido a su absorción, en donde se trata preferentemente de TMB como sustrato o
50 que fluoresce, en donde se trata preferentemente de AmplifluRed o TSA.

En el caso de una concentración de analito baja en la muestra se ocupa solo aún un bajo número de los aglutinantes sobre la superficie del soporte durante la incubación con la muestra. Si se ocupan por ejemplo 500 aglutinantes por
55 moléculas de analito, entonces en el caso de 1000 espacios de reacción formados, que cubren tomados juntos sobre este soporte el 50 % de la superficie del soporte, aproximadamente 250 espacios de reacción contienen únicamente una molécula de analito que antes de la configuración de los espacios de reacción se ha unido a un sistema de amplificación de señal. Esta relación puede usarse para en el caso de muestras débilmente positivas determinar el número de moléculas de analito por muestra y de esta manera aumentar la precisión de la prueba:

$$60 \quad \text{Na-FR}_{\text{total}} / \text{FoR} \times \text{NR}_{\text{pos}}$$

FR_{total} superficie de todos los espacios de reacción sobre el soporte

FoR superficie del soporte sin espacios de reacción

NR_{pos} número de espacios de reacción positivos, que contienen un analito

5 Cuantas más moléculas de analito hay en la muestra, mayor es la densidad de moléculas de analito unidas / sistemas de detección sobre el soporte. Esto aumenta la probabilidad de que se suprima más de un analito/sistema de detección en un espacio de reacción. La intensidad de la reacción de detección por espacio de reacción se usa preferentemente para determinar el número de moléculas de analito por espacio de reacción. Para la calibración de la intensidad del sistema de detección se emplean preferentemente micropartículas de referencia preferentemente de otra población codificada de micropartículas con número estadísticamente distribuido prefabricado de sistemas de detección sobre su superficie. Esta referencia puede tener lugar de manera interna sobre el mismo soporte o también sobre soportes negativos de toda la serie de muestras o del control negativo. El intervalo de medición dinámico del sistema de prueba se amplía preferentemente mediante el aumento del número de espacios de reacción por soporte, lo que se consigue preferentemente mediante el empleo de micropartículas más pequeñas con un diámetro preferido de 1-10 µm y de manera especialmente preferente de 1-3 µm. Preferentemente la zona del sistema de prueba, en la que puede contarse el número de moléculas de analito, se coloca en el intervalo de límite de corte requerido para la aplicación de la prueba. Este ajuste del límite de corte tiene lugar mediante la variación de la sensibilidad de prueba preferentemente mediante la variación del número de aglutinantes por superficie del soporte.

20 En una forma de realización adicional, los aglutinantes, que son específicos para los analitos que van a detectarse se encuentran sobre las micropartículas.

25 En esta forma de realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la detección de un analito en una muestra (detección singleplex) y comprende las etapas a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible; b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal; c) medir ópticamente los productos de reacción; y d) dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra, y se caracteriza por que antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción.

40 Preferentemente en primer lugar se aplica la muestra sobre el soporte y a continuación las micropartículas, que presentan los aglutinantes específicos de analito sobre su superficie, se inmovilizan sobre el soporte, antes de aplicarse la solución de reacción sobre el soporte. Preferentemente antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal en la etapa b) tiene lugar una puesta en contacto de la muestra con un sistema de amplificación de señal, en donde el sistema de amplificación de señal presenta un primer elemento y un segundo elemento y en donde el primer elemento se une específicamente a los analitos que van a detectarse y el segundo elemento presenta una actividad enzimática. Preferentemente el primer elemento del sistema de amplificación de señal está unido directamente con el segundo elemento del sistema de amplificación de señal. Tras la configuración de los espacios de reacción separados espacialmente mediante la retirada de la solución de reacción, por ejemplo mediante aspiración y posterior centrifugación, y antes o durante llevar a cabo la reacción de amplificación de señal tiene lugar preferentemente una estabilización de estos espacios de reacción.

50 Preferentemente el sistema de amplificación de señal presenta la actividad de una enzima. Preferentemente en el caso del primer elemento del sistema de amplificación de señal se trata de un anticuerpo en el que está presente unida la enzima, por ejemplo una peroxidasa, como segundo elemento. La solución de reacción presenta preferentemente un sustrato que mediante la reacción por la enzima da como resultado un producto de reacción, que puede medirse ópticamente debido a su absorción, en donde se trata preferentemente de TMB como sustrato o que fluoresce, en donde se trata preferentemente de AmplifluRed o TSA.

55 En una forma de realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la detección de un analito en una muestra (detección singleplex) y comprende las etapas a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible; b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal; c) medir ópticamente los productos de reacción; y d) dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra, caracterizado por que antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de

solución de reacción.

Preferentemente el analito presenta una actividad enzimática, preferentemente la actividad de una enzima tal como por ejemplo una peptidasa, que al contacto con la solución de reacción en una reacción de amplificación de señal lleva a un producto de reacción medible. La solución de reacción presenta preferentemente un sustrato que mediante la actividad enzimática del analito da como resultado un producto de reacción que puede medirse debido a su fluorescencia. Preferentemente en el caso del sustrato se trata de una secuencia peptídica que comprende un colorante fluorescente y un agente de extinción.

En una forma de realización preferida adicional, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la detección de varios analitos en una muestra (detección multiplex) y comprende las etapas a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible; b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal; c) medir ópticamente los productos de reacción; y d) dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra, caracterizado por que antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan distintas poblaciones de micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción.

Las poblaciones de micropartículas presentan sobre su superficie de manera específica de la población diferentes aglutinantes, que son específicos para los analitos que van a detectarse. Preferentemente, las poblaciones de micropartículas están codificadas con fluorescencia, de manera especialmente preferente las poblaciones de micropartículas presentan una codificación con fluorescencia diferente.

Preferentemente en primer lugar las micropartículas se inmovilizan sobre el soporte, a continuación se aplican primero la muestra y entonces la solución de reacción sobre el soporte. Preferentemente antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal en la etapa b) tiene lugar una puesta en contacto de la muestra con un sistema de amplificación de señal, en donde el sistema de amplificación de señal presenta un primer elemento y un segundo elemento y en donde el primer elemento se une específicamente a los analitos que van a detectarse y el segundo elemento presenta una actividad enzimática. Preferentemente el primer elemento del sistema de amplificación de señal está unido directamente con el segundo elemento del sistema de amplificación de señal. Tras la configuración de los espacios de reacción separados espacialmente mediante la retirada de la solución de reacción, por ejemplo mediante aspiración, y antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal tiene lugar preferentemente una estabilización de estos espacios de reacción.

Preferentemente el sistema de amplificación de señal presenta la actividad de una enzima. Preferentemente en el caso del primer elemento del sistema de amplificación de señal se trata de un anticuerpo en el que está presente unida la enzima, por ejemplo una peroxidasa, como segundo elemento. La solución de reacción presenta preferentemente un sustrato que mediante la reacción por la enzima da como resultado un producto de reacción, que puede medirse ópticamente debido a su absorción, en donde se trata preferentemente de TMB como sustrato o que fluoresce, en donde se trata preferentemente de AmplifluRed o TSA.

En una forma de realización preferida adicional, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la detección de varios analitos en una muestra (detección multiplex) y comprende las etapas a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible; b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal; c) medir ópticamente los productos de reacción; y d) dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra, caracterizado por que antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan distintas poblaciones de micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción.

Las poblaciones de micropartículas presentan sobre su superficie de manera específica de la población diferentes aglutinantes, que son específicos para los analitos que van a detectarse. Preferentemente, las poblaciones de micropartículas están codificadas con fluorescencia, de manera especialmente preferente las poblaciones de micropartículas presentan una codificación con fluorescencia diferente.

Preferentemente en primer lugar las micropartículas se inmovilizan sobre el soporte, a continuación se aplican primero la muestra y entonces la solución de reacción sobre el soporte. Preferentemente antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal en la etapa b) tiene lugar una puesta en contacto de la muestra con un sistema

de amplificación de señal, en donde el sistema de amplificación de señal presenta un primer elemento y un segundo elemento y en donde el primer elemento se une específicamente a los analitos que van a detectarse y el segundo elemento presenta una actividad enzimática. Preferentemente el primer elemento del sistema de amplificación de señal no está unido directamente con el segundo elemento del sistema de amplificación de señal. El segundo elemento está preferentemente unido directamente con un elemento adicional. Tras la configuración de los espacios de reacción separados espacialmente mediante la retirada de la solución de reacción, por ejemplo mediante aspiración, y antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal tiene lugar preferentemente una estabilización de estos espacios de reacción.

Preferentemente el sistema de amplificación de señal presenta la actividad de una enzima. Preferentemente en el caso del primer elemento del sistema de amplificación de señal se trata de un anticuerpo que por ejemplo está biotinilado. En el caso del elemento adicional se trata preferentemente de un anticuerpo marcado con avidina o de una micropartícula marcada con avidina, en el que está presente unida la enzima, por ejemplo una peroxidasa, como segundo elemento. La solución de reacción presenta preferentemente un sustrato que mediante la reacción por la enzima da como resultado un producto de reacción, que puede medirse ópticamente debido a su absorción, en donde se trata preferentemente de TMB como sustrato o que fluoresce, en donde se trata preferentemente de AmplifluRed o TSA.

En una forma de realización preferida adicional, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la detección de varios analitos en una muestra (detección multiplex) y comprende las etapas a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible; b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal; c) medir ópticamente los productos de reacción; y d) dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra, caracterizado por que antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan distintas poblaciones de micropartículas sobre el soporte, de modo que las distintas poblaciones de micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción.

Preferentemente, las poblaciones de micropartículas están codificadas con fluorescencia, de manera especialmente preferente las poblaciones de micropartículas presentan una codificación con fluorescencia diferente. Preferentemente las poblaciones de micropartículas presentan un recubrimiento de estreptavidina sobre su superficie. De manera especialmente preferente las poblaciones de micropartículas presentan sobre su superficie adicionalmente también sondas de ácido nucleico-aglutinante biotiniladas, que son complementarias a los analitos que van a detectarse.

Preferentemente las poblaciones de micropartículas se aplican al mismo tiempo con la muestra sobre el soporte y se inmovilizan, preferentemente las poblaciones de micropartículas se mezclan con la muestra y entonces se aplican sobre el soporte. A continuación se aplica la solución de reacción sobre el soporte. Preferentemente antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal en la etapa b) tiene lugar una puesta en contacto de la muestra con un sistema de amplificación de señal, en donde el sistema de amplificación de señal presenta un primer elemento y un segundo elemento y en donde el primer elemento se une específicamente a los analitos que van a detectarse y el segundo elemento presenta una actividad enzimática. Preferentemente el primer elemento del sistema de amplificación de señal no está unido directamente con el segundo elemento del sistema de amplificación de señal. El segundo elemento está preferentemente unido directamente con un elemento adicional. Tras la configuración de los espacios de reacción separados espacialmente mediante la retirada de la solución de reacción, por ejemplo mediante aspiración, y antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal tiene lugar preferentemente una estabilización de estos espacios de reacción.

Preferentemente el sistema de amplificación de señal presenta la actividad de una enzima. Preferentemente en el caso del primer elemento del sistema de amplificación de señal se trata de un oligonucleótido de ADN, que por ejemplo está biotinilado. En el caso del elemento adicional se trata preferentemente de avidina, de manera especialmente preferente extravidina, en la que está presente unida la enzima, por ejemplo una peroxidasa, como segundo elemento. La solución de reacción presenta preferentemente un sustrato que mediante la reacción por la enzima da como resultado un producto de reacción, que puede medirse ópticamente debido a su absorción, tratándose preferentemente de Luminol o Lumigen ECL Ultra (Diarect) como sustrato.

En una forma de realización preferida adicional, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para la detección de varios analitos en una muestra (detección multiplex) y comprende las etapas a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible; b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal; c) medir ópticamente los productos de reacción; y d) dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra, caracterizado por que antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se

configura una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción.

Preferentemente, las poblaciones de micropartículas están codificadas con fluorescencia, de manera especialmente preferente las poblaciones de micropartículas presentan una codificación con fluorescencia diferente.

Preferentemente las poblaciones de micropartículas presentan un recubrimiento de estreptavidina sobre su superficie. De manera especialmente preferente las poblaciones de micropartículas presentan sobre su superficie adicionalmente también cebadores biotinilados, que son complementarios a las subzonas de los analitos que van a detectarse.

Preferentemente la muestra se aplica al mismo tiempo con la solución de reacción y las micropartículas sobre el soporte, preferentemente la muestra se mezcla con la solución de reacción y entonces se agregan las micropartículas, antes de aplicarse la mezcla sobre el soporte y de manera especialmente preferente primero se aplican las micropartículas sobre el soporte y se inmovilizan, antes de ponerse en contacto con la muestra y la solución de reacción conjuntamente o sucesivamente el soporte. Tras la configuración de los espacios de reacción separados espacialmente mediante la retirada de la solución de reacción, por ejemplo mediante aspiración y centrifugación, y antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal tiene lugar preferentemente una estabilización de estos espacios de reacción.

Preferentemente en el caso de la reacción de amplificación de señal se trata de una PCR, en la se multiplican los analitos. La solución de reacción presenta preferentemente un sustrato que mediante la polimerasa da como resultado un producto de reacción, que puede medirse debido a su fluorescencia. Preferentemente en el caso del sustrato se trata de una sonda marcada con fluorescencia, por ejemplo una sonda TaqMan.

Para el atemperado de PCR y análisis de curvas de fusión se emplea preferentemente un termociclador que presenta las siguientes propiedades:

- espacios de colocación adaptados para recipientes de reacción con un fondo plano como soporte, estando los espacios de colocación abiertos por abajo, de modo que es posible una evaluación con formación de imágenes simultánea o sin formación de imágenes con un sistema de medición óptico inverso,
- irradiación revertida o invertida de luz de longitud de onda adecuada para el atemperado selectivo de la solución de reacción desde la temperatura de hibridación hasta la temperatura de desnaturalización,
- atemperado a base de elementos de granulación o a base de corriente de aire de los recipientes de reacción, la solución de reacción y dado el caso la solución de separación a la temperatura de hibridación.

La presente invención se refiere también a un kit para su uso para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención. Para ello el kit puede contener micropartículas, soporte, dado el caso un sistema de amplificación de señal, una solución de reacción, dado el caso un líquido de separación e instrucciones de uso para el uso del kit y/o para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención. Las micropartículas pueden presentar dado el caso un aglutinante sobre su superficie. Dado el caso el kit puede contener constituyentes adicionales para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención. Tales constituyentes pueden comprender por ejemplo recipientes de reacción, filtros, soluciones y/u otros agentes.

Además la presente invención se refiere al uso de un kit para el diagnóstico *in vitro* de diversas enfermedades refiriéndose el término "diagnóstico" no solo a la determinación de si existe una enfermedad o no, sino que también comprende otros significados tales como el pronóstico general o específico, la determinación de la gravedad de la enfermedad, el estadio de la enfermedad o similar. El resultado del procedimiento de acuerdo con la invención puede usarse también como fundamento para la optimización del tratamiento, para descartar otras determinadas enfermedades, para decisiones sobre posibilidades de tratamiento adicionales, etc.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede usarse preferentemente para una amplificación y detección de ácidos nucleicos cualitativa y cuantitativa, ensayos de hibridación inversa ultrasensibles de ADN y ARN, un cribado de secuencia de ácido nucleico para la detección de variaciones de secuencia, inmunoensayos ultrasensibles, ensayos de células individuales multiplex en espacios de reacción miniaturizados *in vitro* en cada caso en formato singleplex o multiplex.

Ventajas adicionales del procedimiento de acuerdo con la invención

Dado que las micropartículas pueden recubrirse con cualquier aglutinante, es posible combinar diferentes tipos de aglutinantes en un ensayo. Por ejemplo, dentro de un ensayo, pueden inmovilizarse moléculas de ADN en una

población de micropartículas y moléculas de proteína en otra población de micropartículas.

Para la realización de la delimitación de los espacios de reacción como condición previa de la detección digital ultrasensible no es necesaria ninguna técnica de microfluidos y no son necesarios recipientes de reacción caros con nanocavidades.

La combinación de nanopartículas con espacios de reacción delimitados aumenta la velocidad de reacción de los analitos con los aglutinantes sobre los soportes y la inmovilización más completa posible de todas las moléculas de analito para una sensibilidad lo más alta posible también con mayores volúmenes de muestra.

Espacios de reacción separados y muy miniaturizados aumentan considerablemente la sensibilidad en la detección con resolución espacial de las reacciones de amplificación de señal tales como por ejemplo reacciones enzimáticas y limitan las interacciones perturbadoras de la reacción de amplificación de señal tales como por ejemplo en la PCR en tiempo real en distintos espacios de reacción.

La combinación de espacios de reacción de delimitados parcialmente o por completo con micropartículas codificadas con fluorescencia es un procedimiento sencillo para hacer disponibles sistemas de prueba multiplex ultrasensibles.

La combinación de recuento de moléculas individuales y registro de la señal total garantiza un intervalo de medición especialmente grande, mediante lo cual puede evitarse una titulación de muestras con mayores concentraciones de analito.

La combinación de detección de fluorescencia y extinción de absorción por un sustrato de enzima es extremadamente sensible, dado que la excitación y emisión de fluorescencia pueden extinguirse al mismo tiempo por un sustrato.

La detección de fluorescencia, absorción y luminiscencia sensible puede usarse en el caso del uso de reactivos convencionales del diagnóstico de laboratorio hasta el ámbito de moléculas individuales para la determinación paralela de diferentes analitos.

Es posible registrar cinéticas de reacción, mediante lo cual se aumenta la calidad del análisis.

Mediante el uso de materiales de consumo convencionales, tales como las microplacas de prueba de 96 pocillos, está garantizada la compatibilidad de los distintos sistemas de prueba con la automatización de laboratorio en el laboratorio de rutina.

Debido a la diversidad de posibles sistemas de indicador, el procedimiento puede adaptarse a los más diversos sistemas de detección.

La pequeñez de los espacios de reacción permite especialmente ciclos de atemperado rápidos y con ello protocolos de PCR cortos.

A continuación se explica en detalle la invención por medio de dibujos y ejemplos de realización, no limitándose a los mismos.

Figuras

Se tomaron en cada caso 3 imágenes de fluorescencia (codificación de micropartícula: azul, verde; reacción de amplificación de señal (por ejemplo anticuerpo marcado con fluorocromo : rojo) con el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100.

Figura 1 Producción de espacios de reacción separados espacialmente. Micropartículas (fluorescencia verde, flecha) se inmovilizaron sobre una microplaca de prueba como soporte plano mediante adsorción y se recubren después con solución de reacción, que contiene Cy5 (fluorescencia roja, círculo con línea discontinua). Después se aspiró minuciosamente la solución de reacción de las cavidades de la microplaca de prueba. El soporte plano se recubrió con aceite mineral (A) o se centrifugó durante 1 min a 1000 rpm con fuerza centrífuga que actúa en perpendicular a la superficie y entonces se recubre con aceite mineral (B). Mediante centrifugación se consigue concentrar la solución de reacción más en la proximidad directa de la micropartícula y de esta manera separar entre sí en su mayoría los espacios de reacción.

Figura 2 Sobre la superficie de micropartículas recubiertas con avidina se unió (A) o no se unió (B) un oligonucleótido biotinilado en 5' y marcado con FITC en 3'. Después del lavado del exceso no unido se incubaron ambas preparaciones de reacción con IgG anti-FITC-peroxidasa y después de lavar de nuevo se recubrieron con solución de reacción, que contiene TMB, H₂O₂ y Cy5. Tras un corto tiempo de acción se aspiró la solución de reacción y a continuación se separó por centrifugación de la cavidad y ambas

preparaciones de reacción se cubrieron con aceite. La medición en el aparato de obtención de imágenes FI100 tuvo lugar después de 7 min de reacción de amplificación de señal. Las intensidades de fluorescencia representadas de los canales de medición rojo y azul (A) o rojo (B).

En la preparación de reacción A se extinguió por completo la fluorescencia de Cy5, dado que el oligonucleótico a través de avidina en la partícula (punta de flecha) se marcó con IgG anti-FITC-peroxidasa. Después de la adición de la solución de reacción se convirtió la TMB incolora en producto de reacción azul. Dado que la preparación de reacción B no se incubó con el oligonucleótico, no tuvo lugar ninguna extinción, de modo que la extensión de los espacios de reacción permanecía adecuadamente visible debido a la fluorescencia de C5 intensa.

Flechas pequeñas: espacios de reacción confluentes, Flechas grandes: espacios de reacción separados.

Figura 3 sobre la superficie de las micropartículas de 2 poblaciones de micropartículas, que se diferencian en su tamaño y codificación con fluorescencia (Figura A) se unieron oligonucleótido biotinilado en 3' y marcado con FITC en 5' (población 1: partículas oscuras, recubiertas con avidina [flechas]) y albúmina de suero humano (población de micropartículas 2: partículas claras [puntas de flecha]) como control negativo, antes de inmovilizarse 500 micropartículas de la población 1 y 2 juntas en un pocillo de una microplaca de prueba. Después se incubó el pocillo con un conjugado anti-FITC-peroxidasa. Después del lavado del pocillo con PBS-T se aspiró la solución de lavado y se retiró el resto mediante centrifugación. Inmediatamente después tuvo lugar la cobertura con agarosa al 0,5 %, que asimismo se aspiró y se retiró mediante centrifugación. Después de enfriarse la agarosa se cubrió el pocillo con sustrato de TSA-Cy5-peroxidasa como solución de reacción y se incubó durante 1 h. Después se lavó varias veces para retirar el sustrato no unido.

El registro de obtención de imágenes de las fluorescencias de partícula se representó en la Figura A y las fluorescencias de analito en la Figura B. Estos valores de medición como también la representación en la Figura B prueban que el procedimiento para la configuración de espacios de reacción es adecuado para detectar sustratos fluorescentes, que se unen de manera covalente después de la activación específicamente para la detección de analitos en distintas poblaciones de micropartículas en la preparación multiplex. Los espacios de reacción en sí de micropartículas situadas muy juntas de distintas poblaciones están separados entre sí por completo (micropartículas en el círculo con línea discontinua).

Figura 4 sobre la superficie de las micropartículas de 2 poblaciones de micropartículas, que se diferencian en su tamaño y codificación con fluorescencia (Figura A) se unieron IgG humana (población 1: partículas grandes [flechas]) y un oligonucleótido de ADN (población de micropartículas 2: partículas pequeñas [puntas de flecha]) como control negativo, antes de inmovilizarse 500 micropartículas de la población 1 y 2 juntas en un pocillo de una microplaca de prueba. Después se incubó el pocillo con un conjugado de inmunoglobulina anti-ser humano-fosfatasa alcalina. Después de lavarse el pocillo con PBS-T se substituyó la solución de lavado por sustrato de DDAO-fosfato como solución de reacción y este se aspiró tras 15 s y se retiró el resto por centrifugación. Inmediatamente después tuvo lugar la cobertura con aceite mineral así como la medición por medio de exploración de vídeo tras 8 min de incubación de sustrato.

El registro de obtención de imágenes de las fluorescencias de partícula se representó en la Figura A y las fluorescencias de analito en la Figura B. La intensidad de fluorescencia relativa de la fluorescencia de analito ascendió de manera correspondiente a los valores de medición del software FastFluoscan 14,3 para la población de micropartículas 1 y 1,1 para la micropoblación 2. Mediante referencia de las fluorescencias de analito al diámetro de micropartícula pueden evitarse errores de medición. Estos valores de medición como también la representación en la Figura B prueban que el procedimiento para la configuración de espacios de reacción es adecuado para detectar sustratos fluorescentes, solubles, específicamente para la detección de analitos en distintas poblaciones de micropartículas en la preparación multiplex.

Figura 5 representación de la acción de la delimitación de espacios de reacción mediante Sephadex G30 como barrera de difusión entre micropartículas, que delimitan espacios de reacción diferentes. Se mezclaron micropartículas de diferentes poblaciones, teniendo unido una población (micropartículas en el centro de la imagen, flecha) un anticuerpo marcado con fluorocromo en su superficie y no teniéndolo otras poblaciones de micropartículas (punta de flecha). Mediante disociación por medio de detergente se separan los anticuerpos marcados con fluorocromo de la superficie de micropartícula y pueden difundirse así alejándose del espacio de reacción. A este respecto se colorean las esferas de Sephadex adyacentes con las que se cubrieron las micropartículas. También después de dos días, el frente de difusión no ha alcanzado aún las micropartículas situadas en las proximidades de otras poblaciones de micropartículas (puntas de flecha).

Figura 6 espacios de reacción separados (1 y 2), que están cargados con solución de sustrato enzimático y se cubrieron con aceite mineral (4). Soporte plano (3), aceite mineral (4), partícula (5).

Figura 7 las en cada caso aproximadamente 300 micropartículas de las poblaciones de micropartículas 1 y 2 se inmovilizaron en el pocillo A y la población de micropartículas 1 en el pocillo B de una microplaca de prueba. Las micropartículas portan en cada caso un aglutinante específico (población de micropartículas

1) o un aglutinante no específico (población de micropartículas 2) sobre su superficie y se incubaron con un analito marcado con Atto 647N, que se unen específicamente a micropartículas de la población 1. Después en el pocillo A se configuraron los espacios de reacción con el uso de solución tampón como solución de reacción alrededor de cada micropartículas y en el pocillo B no. Las micropartículas en el pocillo B se cubrieron con 50 µl de solución tampón. En el ciclador de exploración de vídeo se recorrió una curva de fusión de 40-95 °C para ambos pocillos. Por punto de medición en el diagrama A se midieron aproximadamente 300 espacios de reacción con el algoritmo de fluorescencia anular.

Figura 7A: los espacios de reacción alrededor de la población de micropartículas 1 muestran una fluorescencia de analito máxima en el pocillo A, mientras que la población de micropartículas 2 sin aglutinantes específicos no muestra fluorescencia de analito. Con el aumento de la temperatura se reduce la fluorescencia de analito de la población de micropartículas 1 inicialmente en aproximadamente el 30 % (extinción inespecífica mediada por estructuras secundarias) para alcanzar a partir de aproximadamente 50 °C de nuevo el valor máximo. A partir de aproximadamente 65 °C, la señal cae en total aproximadamente el 25 % hasta alcanzar la temperatura final de 95 °C. La población de micropartículas negativa sigue siendo negativa incluso cuando los espacios de reacción se encuentran en parte muy estrechamente uno junto a otro en el pocillo A (datos no mostrados). La reducción de la señal total en el pocillo A se provoca mediante blanqueo.

Figura 7B: En el pocillo B se reduce la señal hasta 55 °C por completo con una Tm de aproximadamente 48 °C, dado que el analito marcado con Atto 647N de deshibridación (fragmento de secuencia de ADN del plásmido pSNAP) puede diluirse demasiado en 50 µl de solución tampón. De esta manera puede mostrarse que se consigue configurar espacios de reacción que a pesar de la desnaturalización por calor de aglutinante y analito retienen el analito en el espacio de reacción.

Figura 8 para poder mostrar la funcionalidad de los espacios de reacción para reacciones termocíclicas, se añadieron a la solución de reacción dos oligonucleótidos complementarios en una concentración de 1 µM. Uno de los oligonucleótidos tiene unido en el extremo 3' un agente de extinción y el oligonucleótido complementario tiene unido en el extremo 5' Atto647N como fluoróforo. La solución tampón del híbrido se encuentra en 55 °C. Mediante la medición del punto medio de la fluorescencia de analito a 45 °C o 70 °C en condiciones de reacción termocíclicas puede mostrarse que los oligonucleótidos complementarios se hibridan o deshibridan. En el estado hibridado, el agente de extinción se lleva a espacialmente cerca del fluoróforo, de modo que este puede extinguir de manera efectiva la fluorescencia de Atto647N. En el estado deshibridado esto no es posible, de modo que puede medirse una señal de Atto647N. Este principio de reacción puede emplearse universalmente a una pluralidad de sistemas de detección diferentes.

Figura 9 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales por medio del algoritmo Ranking-booster. Imagen de partida con micropartículas de diferente claridad. Representación esquemática de las micropartículas (izquierda). Escena de imagen real de una toma en escala de grises con micropartículas aglomeradas (derecha).

Figura 10 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales por medio del algoritmo Ranking-booster, izquierda: representación esquemática del objeto sometido al algoritmo reconocido; derecha: los tres objetos reconocidos con el algoritmo convencional en escena real (marcados con patrones distintos).

Figura 11 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales por medio del algoritmo Ranking-booster. Imagen de rango relativo (izquierda: representación esquemática; derecha: escena de imagen de ejemplo real). La imagen de rango relativo se binariza preferentemente con un umbral fijo (por ejemplo valor umbral 0,5), dado que las claridades absolutas de las micropartículas según el algoritmo Ranking-Booster ya no desempeñan ningún papel. En la imagen binaria generada la región central de cada micropartícula puede reconocerse como disco circular discreto, porque el punto central de una micropartícula (en la imagen original) es siempre su píxel más claro y las claridades de píxel decrecen radialmente. Los discos incluyen, en función del valor umbral seleccionado, preferentemente de manera aproximada solo la mitad de una micropartícula y por lo tanto no pueden estar en contacto entre sí. Por medio del reconocimiento de objetos se identifican los discos centrales. Otros objetos pequeños falciformes o triangulares en los espacios intermedios son artefactos que pueden reconocerse en su forma no redondeada y superficie demasiado pequeña. Estos artefactos se cancelan.

Figura 12 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales por medio del algoritmo Ranking-booster. La imagen de rango relativo binarizada antes (arriba) y después (abajo) del filtrado de artefactos con discos centrales restantes (marcados con patrón de tablero de ajedrez). Representación esquemática (izquierda); imagen de ejemplo real con objetos reconocidos, que están marcados con patrones distintos (derecha).

Figura 13 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales por medio del algoritmo Ranking-booster. Respectivamente tres iteraciones de inflación completas (aún

sin contacto) (marcadas con distintos patrones de líneas) alrededor de cada disco central (marcado con patrón de tablero de ajedrez).

Figura 14 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales por medio del algoritmo Ranking-booster. El intento de una iteración de inflación adicional lleva al contacto (marcado con patrón de rombos) y así a la interrupción de la iteración para esta micropartícula.

Figura 15 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales por medio del algoritmo Ranking-booster. Resultado del algoritmo: representación esquemática de tres micropartículas discretizadas halladas, que están marcadas con distintos patrones (izquierda); micropartículas reales como objetos discretos, que están marcados con patrones distintos (derecha).

Figura 16 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales y determinación de la intensidad de señal por medio del algoritmo Dual-Octagon. Tomas de imágenes de fluorescencia multicanal de micropartículas (canal de detección de objetos):

A) toma de imágenes en el canal de detección de objetos con marcas del objeto detectado en este canal, B) toma de imágenes en el canal de claridad que va a detectarse: estado ideal sin desplazamiento (adicionalmente en la imagen están caracterizadas las marcas de la zona de detección de objetos),

B) toma de imágenes en el canal de claridad que va a detectarse: falta de nitidez en el canal de claridad mediante aberración cromática (adicionalmente en la imagen están caracterizadas las marcas de la zona de detección de objeto),

B) toma de imágenes en el canal de claridad que va a detectarse: desplazamiento lateral debido al movimiento de objeto o aberración cromática entre las tomas de imágenes en el canal de detección y de claridad (adicionalmente en la imagen están caracterizadas marcas de la zona de detección de objetos).

Figura 17 reconocimiento y/o individualización de espacios de reacción individuales y/o micropartículas individuales por medio del algoritmo Dual-Octagon. Representación píxel a píxel esquemática de un objeto con datos de valores acromáticos.

Ejemplos

Incubación de la muestra

La incubación de la muestra con el soporte recubierto con aglutinante o las micropartículas recubiertas con aglutinante tiene lugar preferentemente en un tampón de muestra, para que los aglutinantes se unan específicamente a los analitos. La unión inespecífica del analito lleva inevitablemente a un peor límite de detección inferior, de modo que aditivos tales como detergentes o proteínas de bloque, tienen que adaptar la variación de la fuerza iónica del tampón de incubación así como del valor de pH del tampón de muestra a los analitos respectivos, para minimizar uniones inespecíficas. Para, en este contexto, evitar una dilución demasiado intensa de la muestra, se emplean preferentemente tampones de muestra concentrados 10x. Preferentemente, la incubación de la muestra tiene lugar en cavidades de microplacas de prueba con un fondo de cavidad esencialmente plano, recubierto con aglutinante o con micropartículas recubiertas con aglutinante, inmovilizadas en el fondo de la cavidad.

Soporte

De manera especialmente preferente se emplean placas de microtitulación de polímero, tal como por ejemplo placas de NucleoLink (Nunc) para la amplificación de ácido nucleico, que portan un recubrimiento de superficie para la inmovilización covalente de biomoléculas, tienen un fondo de recipiente suficientemente plano y transparente y son termoestables. Pueden emplearse también recubrimientos de superficie, para reducir la unión inespecífica de moléculas de muestra o reactivos de detección. Una microestructura de la superficie de soporte, que no perjudica al enfoque óptico, es posible naturalmente. Las superficies de los soportes pueden presentar además de cavidades, estructuras adicionales con diferentes propiedades tales como preferentemente propiedades hidrófilas o hidrófobas.

Las micromatrices pueden encontrarse en forma de un portaobjetos o de una microplaca (denominada asimismo placa de microtitulación). En el caso de la microplaca se trata de un recipiente cóncavo (*dished*) con varias (al menos dos) cavidades. En el caso de las micromatrices a base de microplacas se trata de una microplaca con varias cavidades, en cuyos fondos está colocado el biochip de micromatriz. Un ejemplo de la microplaca es la placa de microtitulación de ELISA conocidas con 96 cavidades.

Además son adecuados soportes sólidos a base de sistemas de capas de autodisposición igualmente para la implementación de la presente invención. La aplicación puede tener lugar con el uso de procedimientos automáticos.

Aglutinante

Como aglutinante se emplean preferentemente aquellas sustancias que se unen específicamente a los analitos de la

muestra o a la muestra de referencia con alta sensibilidad y especificidad o que compiten con el analito por la unión de un análogo. Como alternativa pueden usarse también receptores de afinidad sintéticos, que se produjeron por ejemplo mediante impresión molecular (*Molecular Imprinting*). Todos los aglutinantes de una clase tienen la misma especificidad de unión para los analitos tal como por ejemplo anticuerpos monoclonales o se diferencian en su especificidad o especificidad de epítipo. Estos pueden ser específicos para los mismos analitos o para isoformas diferentes de los mismos analitos. Aglutinante y análogo o analito pueden portar marcas de fluorescencia. Preferentemente los distintos aglutinantes están marcados (con fluorescencia) de manera diferente o un aglutinante está marcado (con fluorescencia) por ejemplo y el otro aglutinante está no marcado. Sobre una micropartícula pueden encontrarse distintos aglutinantes, que en cada caso son adecuados para la detección de analitos específicos. Con ello es posible que sobre una micropartícula pueda tener lugar la detección de varios analitos.

Delimitación del espacio de reacción

El grosor de capa como extensión del espacio de reacción en perpendicular a la superficie del soporte y la homogeneidad de la película de líquido puede modificarse mediante la variación de la viscosidad de la solución de reacción por ejemplo mediante adición del 0,5-10 % de glicerol y o el 0,01-1 % de Tween 20, siempre que con ello no se inhiba demasiado la reacción de amplificación de señal. La homogeneidad del grosor de capa de la película de líquido puede verse afectada también de manera dirigida por la aplicación de micropartículas o zonas hidrófobas/hidrófilas de manera diferente sobre el soporte.

El grosor de capa del espacio de reacción corresponde aproximadamente al diámetro de las micropartículas. Una delimitación lateral del espacio de reacción en perpendicular al grosor de capa se provoca solo parcialmente por las micropartículas en sí y reduce las corrientes de líquido en el espacio de reacción. No obstante, los productos de la reacción de amplificación de señal se propagan en el espacio de reacción mediante difusión y corrientes. La difusión del producto de reacción puede verse afectada seleccionándose por ejemplo sustratos que precipitan o sustratos cuyo producto de reacción se activó químicamente mediante la reacción y se une al soporte o a micropartículas.

Si la concentración de analito es por ejemplo demasiado alta, de modo que cada micropartícula porta uno o varios analitos, entonces la señal del producto de reacción se distribuye de manera homogénea a lo largo de todo el espacio de reacción y aumenta o disminuye en función del principio de detección. Si la concentración de analito es baja, se tarda más tiempo hasta que todo el espacio de reacción se llena homogéneamente por la señal del producto de reacción.

La delimitación lateral completa del espacio de reacción se por una forma de realización preferida adicional, en la que las micropartículas se inmovilizan individualmente sobre el soporte, con una distancia promedio de las micropartículas, que corresponde preferentemente a 4 veces el diámetro de las micropartículas. Cuanto mayor es la distancia entre las micropartículas, más completa es la separación lateral del espacio de reacción de una micropartícula del espacio de reacción de micropartículas adyacentes, cuando la solución de reacción se aspira por medio de pipeta. Mediante la aspiración y dado el caso la centrifugación posterior cae la película de líquido entre las micropartículas y se retiran por las fuerzas capilares que actúan en su mayor parte a la hendidura entre micropartículas y soporte o en la micropartícula por arriba (véase la Figura 3). La separación lateral de los espacios de reacción de micropartículas individuales se mejora adicionalmente mediante el empleo de soportes con superficies hidrófobas y/o mediante el uso de soluciones de reacción libres de detergentes.

Pueden emplearse también como microcámaras de cultivo celular de acuerdo con la invención espacios de reacción parcial o completamente separados uno de otro, para caracterizar preferentemente las propiedades de células individuales o menos eucariotas o procariotas. A este respecto es posible introducir micropartículas y sistemas de amplificación de señal junto con las células en un espacio de reacción, para examinar en un formato de prueba homogéneo por ejemplo la secreción de citocinas al interior del espacio de reacción. Si, considerado estadísticamente, solo se distribuye una célula en un espacio de reacción, entonces el rendimiento de secreción puede registrarse a nivel de célula individual. Es importante que la solución de reacción tenga una composición que garantice una supervivencia lo más larga posible de las células en el espacio de reacción. Las células pueden añadirse como suspensión a la solución de reacción, adherirse de antemano en el soporte o en la micropartícula o cultivarse. La cobertura del espacio de reacción puede tener lugar mediante un líquido de separación o mediante un gel, tal como por ejemplo hidrogel o gel de colágeno. Un gel de este tipo puede estar enriquecido adicionalmente con nutrientes para garantizar una supervivencia lo más larga posible de las células en el espacio de reacción. Es igualmente posible emplear un sistema de cultivo de doble cámara, cuyo soporte es preferentemente microporoso y que desde un lado, preferentemente del lado luminal de la cavidad se baña con solución nutritiva para las células, de modo que los nutrientes pueden difundirse a través del soporte poroso hacia las células. Micropartículas, que pueden encontrarse con las células en los espacios de reacción, pueden por ejemplo estar codificadas con fluorescencia o pueden estar recubiertas por ejemplo de manera específica de población con por ejemplo diferentes factores de crecimiento, factores de matriz extracelular o células, tales como células de Feeder o células que van a analizarse. Células, que pueden encontrarse sobre las micropartículas pueden servir como sensores para factores de crecimiento de la muestra. Preferentemente se emplean marcadores fluorescentes expresados tales como por ejemplo la proteína fluorescente verde (GFP) y derivados de la misma o FURA-2 como marcador de Ca^{2+} en las células como indicadores para procesos celulares, de modo que estos procesos pueden medirse con ayuda del

sistema de medición de fluorescencia multicolor de acuerdo con la invención.

Amplificación de señal

- 5 Si se combinan entre sí dos enzimas distintas, que son una parte componente de diferentes sistemas de amplificación de señal, que forman productos de reacción que absorben de manera diferente, entonces es posible usar la extinción de dos colorantes fluorescentes distintos para la detección dúplex. Como alternativa es posible que como primer sistema de amplificación de señal se emplee preferentemente HRP en combinación con TMB y como segundo sistema de amplificación de señal preferentemente una nucleasa. Mientras que la HRP extingue de manera
- 10 ultrasensible un colorante fluorescente rojo, por ejemplo mediante una nucleasa tal como la DNAsa I libre de RNAsa se neutraliza una extinción de fluorescencia de un colorante fluorescente que se excita o emite a una longitud de onda entre 450-550 nm. Esto sucede por que la nucleasa escinde preferentemente un oligonucleótido que en un extremo se ha unido con un extintor de fluorescencia, tal como por ejemplo dabcylo, y en el otro extremo tiene unido un colorante fluorescente tal como por ejemplo fluoresceína. Con ello es posible detectar en una preparación dos
- 15 analitos o un analito y un patrón interno al mismo tiempo en un espacio de reacción. Un patrón interno da información sobre si la detección ha funcionado debidamente en muestras que no contienen ningún analito. Si el patrón interno es un analito presente en cada muestra, tal como por ejemplo un gen de referencia (u otro gen constitutivo (*housekeeping gen*)), puede referenciarse al mismo la concentración del otro analito. Mientras que como medida para la detección del patrón interno en el espacio de reacción se genera una fluorescencia a una longitud de onda de 520 nm en esta variante de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la fluorescencia de un colorante fluorescente rojo como parte componente de la solución de reacción se extingue en la preparación de reacción como medida para otro analito. Conjugados de avidina-nucleasa para la unión a anticuerpos de detección biotinilados o sondas de captura biotinilados se emplean preferentemente en inmunoensayos o en ensayos de hibridación de ARN. Como alternativa se usan preferentemente peptidasas específicas de secuencia y los péptidos marcados con agente de extinción/fluorocromo específicos correspondientes o DNAsas específicas de secuencia y sus sustratos marcados en inmunoensayos y ensayos de hibridación de ADN, para generar una fluorescencia durante la reacción.

Sistemas de medición

- 30 Aparatos para llevar a cabo y medir de acuerdo con la invención variaciones de señal antes, durante o después de llevar a cabo las distintas formas de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, que pueden controlarse de manera completamente automática por medio de ordenador, para medir con resolución espacial o con obtención de imágenes, luminiscencias o absorciones, comprenden: un control completamente automático por medio de ordenador, un equipo de colocación para el soporte, un equipo de iluminación asociado a la zona de reacción con el que puede irradiarse luz de excitación de diferentes longitudes de onda definidas, un equipo óptico que es adecuado preferentemente para la detección de fluorescencia, absorción y/o luminiscencia revertida o invertida con filtros ópticos correspondientes o filtros multibanda, uno o varios equipo(s) de detector tales como por ejemplo CCD o CMOS), que genera imágenes en función de una intensidad de señal medida; y una unidad de evaluación que genera valores de medición a partir de las imágenes.

- Para el empleo de micropartículas, los aparatos pueden comprender adicionalmente equipos de inmovilización para por ejemplo micropartículas magnéticas o paramagnéticas. Los aparatos pueden contener opcionalmente un termociclador, que acoge el soporte plano y permiten la realización de la PCR en tiempo real o amplificaciones isotérmicas con análisis ópticos de fluorescencia revertidos o invertidos simultáneos de los soportes. El termociclador comprende preferentemente 1-384 y de manera especialmente preferente 8-96 espacios de colocación adaptados para recipientes de reacción. Mediante el modo de construcción compacto del termociclador y los espacios de colocación abiertos hacia abajo es preferentemente posible representar con obtención de imágenes o sin obtención de imágenes la zona de la superficie interna del fondo de los recipientes de reacción, en el que se encuentran los espacios de reacción, durante el proceso de atemperado y preferentemente durante fases isotérmicas de ciclos de PCR tales como por ejemplo al final de la fase de hibridación o fases isotérmicas de análisis de curvas de fusión, valores de medición. Adicionalmente el aparato puede complementarse mediante dispositivos de bombeo y pipeteado, con los que pueden suministrarse o extraerse de manera automatizada sustratos, material de muestra u otros componentes de reacción.

- 55 En una variante de realización preferida de la presente invención, el calentamiento termocíclico de los espacios de reacción tiene lugar mediante la energía de radiación preferentemente de un LED de alta potencia o de un láser de diodo, que emite preferentemente en el intervalo de longitud de onda rojo o ultrarrojo, sin la exclusión de otros intervalos de longitud de onda posibles, preferentemente sin a este respecto, sin embargo, calentar el material del soporte. La irradiación puede tener lugar de manera revertida o preferentemente invertida a través del objetivo de la unidad de evaluación. El soporte y dado el caso el líquido de separación se mantiene preferentemente de manera isotérmica en el intervalo o por debajo de la temperatura de reacción o de hibridación necesaria de preferentemente 45 °C - 70 °C mediante por ejemplo elementos de granulador, una corriente de aire o una corriente de líquido. Mediante impulsos de LED es posible hacer oscilar la temperatura durante por ejemplo una PCR entre la temperatura del soporte y la temperatura máxima deseada de preferentemente 95 °C. De esta manera pueden conseguirse ciclos de reacción muy rápidos, lo que lleva a una duración total de la PCR de menos de 10 min y de

manera especialmente preferente de menos de 3 min. Preferentemente la iluminación se selecciona de modo que solo la solución de reacción absorbe la radiación y ni el soporte ni el líquido de separación empleado dado el caso para delimitar el espacio de reacción. De esta manera permanece asimismo muy baja la entrada de energía necesaria para el calentamiento de los espacios de reacción pequeños, lo que limita a un mínimo el enfriamiento necesario por radiación térmica o conducción a través de la pared del recipiente de reacción o por ejemplo mediante convección en el caso de la cobertura de los espacios de reacción con un líquido de separación. Preferentemente para el calentamiento del espacio de reacción se emplea aquella longitud de onda de iluminación que se necesita de todos modos ya para la medición de los espacios de reacción, tal como por ejemplo 640 nm cuando se usa Cy5 como marcador para la fluorescencia de analito. De manera especialmente preferente se usa sin embargo una longitud de onda para calentar la solución de reacción que es mayor que la de la fluorescencia de analito y se irradia de manera revertida o invertida por ejemplo por óptica de microscopio invertida o externamente por la óptica de microscopio. La duración del impulso de luz para calentar los espacios de reacción puede determinarse empíricamente o mediante termografía y aplicarse para todas las reacciones siguientes. En cambio es también posible añadir una molécula de sensor de temperatura o varias moléculas de sensor de temperatura específicas para distintas temperaturas en la solución de reacción, que al alcanzarse una temperatura determinada emite una señal de fluorescencia. Esta podría ser por ejemplo una horquilla de ADN o una baliza molecular, que a ras con el extremo 3' híbrida con el extremo 5' propio y en un extremo porta un agente de extinción y en el otro extremo un fluoróforo, cuyo espectro de absorción o excitación está adaptado a la iluminación. Para mejorar la absorción de energía es igualmente posible añadir, en el intervalo de longitud de onda de la radiación electromagnética empleada para el calentamiento, agentes de extinción o nanopartículas a la solución de reacción, que absorben en el intervalo de longitud de onda correspondiente de la radiación electromagnética y convierten la energía en calor.

Mediante el uso de fondos de recipiente ópticamente transparentes como soporte y/o cubiertas de soporte con baja fluorescencia propia, que permiten la evaluación óptica de fluorescencia durante la realización termocíclica o isotérmica de la reacción de detección, son posibles mediciones con fluorescencia / luminiscencia de luz incidente y luz transmitida o la absorción. En el caso de la fluorescencia de luz incidente pueden emplearse placas de microtitulación comercialmente disponibles tal como por ejemplo NucleoLink o NucleoSorb pero también por ejemplo microplacas de prueba de fondo plano comercialmente disponibles, cavidades individuales o módulos de 8 cavidades (tiras F8). Los recipientes de reacción comercialmente disponibles usados pueden recubrirse para reducir la fluorescencia propia o pueden ser blancos para medir la luminiscencia.

Dado que en el caso del empleo de micropartículas permanentemente no inmovilizadas todas las fluorescencias de micropartícula tienen que medirse durante la toma de puntos de medición adicionales, se plantean requisitos especialmente altos en cuanto a la rapidez del hardware tal como por ejemplo el uso de una resolución lo más baja posible de los objetivos con alta intensidad luminosa, el uso de filtros multibanda para evitar cambios de filtro en combinación con una iluminación de LED multicolor, el uso de una cámara amplificadora electrónica, paralelización de las unidades de detector. De manera especialmente preferente se emplean LED con emisiones en el intervalo de 350 nm, 480 nm, 530 nm y 640 nm y se emplean preferentemente combinados con los filtros de excitación / emisión multibanda de cuatro colores. La ampliación del espectro de color al intervalo rojo o ultrarrojo puede usarse especialmente para el atemperado de los espacios de reacción. Unidades de detector pueden estar dispuestas en el sentido de una paralelización preferentemente en filas de 8 o reunidas en haz mediante conductores de fibras de vidrio o líquido en una cámara. Asimismo es posible medir varias cavidades al mismo tiempo mediante objetivos granangulares. Mediante partición de píxeles puede reducirse asimismo el tiempo de medición, dado que aumenta la sensibilidad, lo que acorta la exposición, y reduce la cantidad de datos.

Preferentemente en el caso del uso de micropartículas codificadas con fluorescencia con un diámetro de 5-20 μm la óptica se diseña de modo que el sistema tiene una resolución de píxeles de 0,5-2,5 μm . Si las micropartículas tienen un diámetro de 1-5 μm , entonces se emplea preferentemente una resolución de píxeles de la óptica desde el intervalo entre 0,1-1 μm , igualmente en la toma de "agujeros negros" con el fin del recuento de moléculas individuales.

Una posibilidad preferida para la toma de las señales cuando se empleen micropartículas en disposición multicapa, es el uso de una óptica confocal. Con ayuda de la óptica confocal pueden representarse por etapas varios planos de la multicapa, para registrar la mayor cantidad posible de micropartículas que emiten señal en diferentes niveles de nitidez. Preferentemente se selecciona una anchura de paso de 1-10 μm entre dos tomas.

En otro procedimiento preferido es igualmente posible llevar a cabo la medición sin resolución espacial (con obtención de imágenes), lo que tiene la ventaja de que puede emplearse una técnica de evaluación económica, que no se basa en técnica de microscopio. A este respecto pueden emplearse preferentemente lectores o escáneres de absorción, luminiscencia, fluorescencia convencionales. Debe garantizarse que el enfoque óptico de estos aparatos esté ajustado al espacio de reacción o los espacios de reacción, dado que debido a los bajos grosores de capa de los espacios de reacción delimitados, las intensidades de las señales de medición pueden ser relativamente bajas. Señales de medición pequeñas pueden compensarse preferentemente mediante el uso de fotodiodos o fotomultiplicadores muy sensibles o mediante el aumento de la concentración del colorante fluorescente que va a extinguirse en el espacio de reacción. Con esta preparación de medición sin resolución espacial no es posible llevar a cabo un recuento de moléculas individuales, de modo que solo puede registrarse la señal total a lo largo de todas

las moléculas de analito, sistemas de amplificación de señal / de molécula de analito o enzimas en los distintos espacios de reacción. Como alternativa es posible escanear de manera pulsada el objeto con un rayo láser que tiene una sección transversal puntiforme, y medir las señales con un fotomultiplicador. Después de la medición se combinan los puntos de medición individuales entonces para formar una imagen y se analizan.

5 Es igualmente posible aumentar el grosor de capa del espacio de reacción a de uno a varios milímetros, en particular, cuando en esta variante de realización se hace reaccionar preferentemente mediante peroxidasa TMB para dar un producto de reacción azul y de esta manera se extingue con alta sensibilidad un colorante fluorescente con excitación y emisión en el intervalo de longitud de onda entre 600 y 700 nm en la solución de reacción o sobre la
10 superficie de micropartículas o en el interior de micropartículas. El espacio de reacción preferentemente no subdividido lateralmente es en este caso preferentemente la cavidad completa de una microplaca de prueba.

Toma de puntos de medición

15 La invención prevé que en el transcurso de la reacción de amplificación de señal o al menos tras concluir la reacción se represente un punto de medición, para poder calcular con qué intensidad transcurre la reacción para los analitos individuales o en qué concentración se encuentra el analito en la muestra. Si pueden medirse antes de la medición ya señales de partida, que oscilan fuertemente entre distintos espacios de reacción o dentro de un espacio de reacción, entonces es posible representar ya antes o al comienzo de la reacción un primer punto de medición y usar
20 los valores de medición derivados de esto como punto cero o referencia. Este procedimiento es adecuado especialmente cuando se usan micropartículas que tienen una fluorescencia superficial, que pueden oscilar entre las distintas micropartículas entre el 1-50 %. En primer lugar puede descartarse de la evaluación preferentemente el 1 % - 10 % de las micropartículas que más se desvían, los denominados valores atípicos. Después se calcula por ejemplo una relación del valor de medición antes de la reacción y al menos un valor de medición posterior o todos
25 los valores de medición adicionales en el transcurso o después de la reacción o se resta el valor de partida del valor de medición. La representación y compensación de varios valores de medición del mismo espacio de reacción permite la representación de una serie de medición para el análisis de la cinética de reacción.

Los valores de medición pueden generarse debido a variaciones de señal o un aumento o disminución o extinción de
30 la señal del producto de reacción en el espacio de reacción. La variación de señal que va a medirse puede comprender preferentemente un aumento de la fluorescencia superficial sobre micropartículas y soporte, por ejemplo cuando una reacción de amplificación de señal descompone una sonda de agente de extinción en la solución de reacción, que es complementaria a una sonda de captura inmovilizada sobre el soporte, que porta el colorante fluorescente que provoca la fluorescencia superficial. Asimismo preferentemente, la variación de señal puede
35 comprender una disminución de la fluorescencia superficial sobre micropartículas y soporte, por ejemplo cuando una reacción de amplificación de señal forma un producto de reacción soluble o que precipita, por ejemplo un colorante, que extingue la fluorescencia superficial. También preferentemente la variación de señal puede comprender un aumento de la fluorescencia en el espacio de reacción respectivo, por ejemplo cuando un sistema de amplificación de señal convierte un colorante no fluorescente en un colorante fluorescente o por ejemplo se hidroliza una sonda
40 TaqMan, mediante lo cual se neutraliza la extinción del colorante fluorescente unido a la sonda. Además preferentemente la variación de señal puede comprender una disminución de la fluorescencia en el espacio de reacción respectivo, por ejemplo mediante la formación de un producto de reacción coloreado a partir de solución de sustrato sin color, tal como por ejemplo TMB, que absorbe en el intervalo de la excitación y/o emisión del colorante fluorescente. Asimismo preferentemente la variación de señal puede comprender un aumento de la luminiscencia en
45 el espacio de reacción respectivo, por ejemplo por que una reacción de amplificación de señal forma un producto de reacción luminiscente en el espacio de reacción. También preferentemente la variación de señal puede comprender un aumento de la intensidad y de la propagación espacial de la absorción a las zonas del espacio de reacción fluorescente, preferentemente sin delimitación lateral o sin delimitación lateral completa, en las que moléculas individuales de uno o varios sistemas de amplificación de señal están unidas al soporte y forman un producto de
50 reacción coloreado. Este producto de reacción absorbe en el intervalo de la longitud de onda de excitación y emisión del colorante fluorescente y por lo tanto la fluorescencia en el espacio de reacción se extingue de manera efectiva. De este modo, durante la reacción enzimática se generan manchas cada vez más oscuras, en la fluorescencia distribuida de manera principalmente homogénea a lo largo de todo el espacio de reacción. Es decir, los denominados "agujeros negros" se generan por que el colorante formado se difunde desde el sistema de
55 amplificación de señal en todas las direcciones al espacio de reacción.

En el caso del uso de micropartículas no codificadas por fluorescencia en espacios de reacción al menos delimitados en parte, es especialmente adecuada la representación de series de medición, para detectar "agujeros negros". Preferentemente los parámetros intensidad de extinción de fluorescencia y propagación espacial de la extinción de
60 fluorescencia por difusión se registran concéntricamente desde el sitio de la localización de la molécula de enzima hacia el interior del espacio de reacción. La propagación de la extinción depende de la difusión de los productos de reacción pero también de corrientes de la solución de reacción en particular en el caso de espacios de reacción no delimitados lateralmente en el espacio de reacción. Mediante corrientes se deforma la difusión concéntrica que tiene lugar a priori por ejemplo de manera aproximadamente elíptica, de modo que es necesario un cálculo de corrección
65 para la reducción al modelo concéntrico o a partir de la superficie calculada se calcula directamente la intensidad de la reactividad enzimática. Mediante el análisis matemático y corrección, que analiza la distribución de intensidad de

la actividad enzimática a lo largo del tiempo, para poder por ejemplo decidir si la actividad enzimática puede asociarse a una o varias moléculas de enzima inmovilizadas de manera adyacente. Dado que el número de moléculas de enzima inmovilizadas es proporcional al número de moléculas de analito en la muestra, mediante este análisis de datos puede aumentarse la precisión de la medición. Si los espacios de reacción se registran espacialmente mediante la representación de pilas Z, pueden representarse también los “agujeros negros” tridimensionalmente y por lo tanto usarse su volumen para los cálculos adicionales.

La precisión de la medición depende directamente de la resolución de píxeles usada del sistema de medición. Preferentemente se usa para esta variante de realización una resolución de píxeles de $<0,5\ \mu\text{m}$. Con ello pueden registrarse de manera segura “agujeros negros” con un diámetro lateral de $2\text{--}3\ \mu\text{m}$ con un grosor de capa de los espacios de reacción de $2\ \mu\text{m}$. La distancia entre dos enzimas o sistemas de amplificación de señal sobre el soporte preferentemente no quedará por debajo, de media, de $10\ \mu\text{m}$. Con esta densidad enzimática sobre el soporte, la cavidad de una microplaca de prueba con un diámetro de $6\ \text{mm}$, tiene la capacidad de aproximadamente 30 millones de moléculas de enzima. Con la densidad enzimática creciente sobre el soporte, se aumenta también el número de moléculas situadas estrechamente una junto a otra, que ya no pueden separarse ópticamente de manera segura. El registro de la intensidad de señal, de la propagación de señal en el espacio de reacción para el “agujero negro” respectivo o la cinética de ambos parámetros, se usan preferentemente para la evaluación de un “agujero negro”, si se provocó por una o varias enzimas. De manera adecuada, se puede proceder naturalmente cuando como alternativa se usa un sustrato de fluorescencia o luminiscencia.

La intensidad de la reacción de amplificación de señal y difusión del producto de reacción han de adaptarse para la aplicación respectiva, de modo que tiene lugar una medición tras $10\text{--}20\ \text{min}$ en la meseta de la reacción de amplificación de señal o varias veces tras $0,1\text{--}20\ \text{min}$. Parámetros para adaptar la reacción de amplificación de señal son por ejemplo la variación de la temperatura o la adición de glicerol a la solución de reacción.

Para registrar los puntos de medición es posible registrar por completo el soporte, lo que en el caso de una resolución de píxeles de $<0,5\ \mu\text{m}$ puede requerir la toma de varias a muchas imágenes. Cuando las moléculas de enzima unidas al analito se distribuyen por el soporte sin embargo de manera uniforme considerado estadísticamente, puede reducirse el número de tomas, midiéndose preferentemente al menos diez veces más moléculas que lo que asciende la unión inespecífica promedio. Si el número de moléculas registradas es menor, se registra automáticamente un número mayor de imágenes. Este modo de proceder permite optimizar de manera efectiva el tiempo de medición.

El experto en la materia puede apreciar fácilmente que en lugar de un producto de reacción de extinción por la enzima puede formarse un producto de reacción de iluminación, cuando por ejemplo se emplea Ampliflu Red como sustrato de enzima (Sigma-Aldrich). En este caso se registra la distribución de intensidad de la actividad enzimática de la peroxidasa como fluorescencia y no como extinción tal como en los “agujeros negros” y se compensa. Igualmente, el procedimiento con el uso de las enzimas y sustratos de enzima correspondientes puede transferirse a la detección de luminiscencia.

En el caso del uso de micropartículas codificadas con fluorescencia es necesario identificar todas las micropartículas que se tienen en cuenta para la evaluación registrándose las fluorescencias de codificación, para poder asociar todas las micropartículas a una población de micropartículas. Preferentemente se almacena la posición x/y necesaria para la evaluación de un número necesario de micropartículas identificadas por población, para encontrar los sitios de medición para la representación de la fluorescencia de superficie o de analito en el registro de varios puntos de medición. Además la fluorescencia de superficie o de analito se registra como referencia para la señal de superficie o de ligando representada en los siguientes puntos de medición y dado el caso se emplea también para la decodificación de la población de micropartículas. Es igualmente posible registrar, en lugar de la fluorescencia de analito una luminiscencia de analito. En función del sistema de amplificación de señal usado, el producto de reacción puede distribuirse en todo el espacio de reacción o precipitarse o unirse covalentemente a la superficie del soporte o de la micropartícula.

La representación de los puntos de medición adicionales puede tener lugar en amplios de tiempo regulares antes, durante y después de la reacción o también después de que se alcanzara una temperatura determinada o una sección determinada de un termociclo. Preferentemente las mediciones tienen lugar durante una sección isotérmica de la reacción, cuando por ejemplo se lleva a cabo una PCR, para minimizar influencias por oscilaciones de temperatura tales como dilatación de material y convección intensificada en la mezcla de reacción.

Puede ser ventajoso tomar durante la reacción de vez en cuando junto a la toma de las superficies o fluorescencia de ligando también una fluorescencia de micropartícula, dado que en el caso de fluorescencia superficial decreciente existe el riesgo de que no se encuentre correctamente una micropartícula. Para minimizar el blanqueo, puede efectuarse preferentemente en el caso del uso de LED en particular en la representación de puntos de medición adicionales una adaptación de la intensidad de iluminación a la fluorescencia superficial. La intensidad de iluminación variada ha de referenciarse dado el caso. Como referencia pueden usarse preferentemente micropartículas con propiedades de fluorescencia normalizadas. Una reducción del blanqueo tiene lugar mediante la delimitación de la iluminación al tiempo de la toma de imágenes. Además mediante la reducción de la ampliación de

objetivo puede representarse una mayor superficie de medición, mediante lo cual se necesitan menos imágenes por pocillo.

- 5 Evitar el reenfoque y la reexposición mediante algoritmos tales como "extended-depth-of-field" (aumento de la definición sumando varias imágenes en dirección Z) y "high-dynamic-range" (aumento de la dinámica de exposición sumando una imagen muy clara y una muy oscura) acortan asimismo el tiempo de medición y aumentan la precisión de la medición y mejoran el intervalo dinámico del valor de medición. Preferentemente pueden usarse micropartículas fluorescentes sobre la superficie del soporte como medio auxiliar de enfoque.
- 10 Por instante de medición se registran 1-10000 micropartículas codificadas por fluorescencia de una población, preferentemente 1-100 micropartículas, de manera especialmente preferente 1-10 micropartículas.

Asociación de los puntos de medición a micropartículas y poblaciones de micropartículas

- 15 Preferentemente para la decodificación de las poblaciones de micropartículas se emplean las fluorescencias de los colorantes incorporados por polimerización en las micropartículas en total o en las distintas capas. A partir de las distintas por ejemplo intensidades de fluorescencia se calculan relaciones (Ratios, PopID), que permiten para cada población de micropartículas una clara caracterización. Como característica distintiva secundaria pueden emplearse distintas clases de tamaños, formas y patrones de micropartículas.

- 20 De este modo puede reconocerse la intensidad de fluorescencia de una longitud de onda de emisión determinada, en la periferia de micropartícula como fluorescencia anular, antes del inicio de una reacción de nucleasa para la determinación de la población de micropartículas pero también para la determinación de la señal máxima de la fluorescencia superficial de la micropartícula en cuestión antes de la reacción. En el transcurso de la reacción disminuye esta señal máxima, dado que las biomoléculas se degradan enzimáticamente y por lo tanto se libera el colorante desde la superficie de micropartícula al espacio de reacción. Para la decodificación de las poblaciones de micropartículas ya no se encuentra entonces disponible el colorante. Dado que la micropartícula se inmovilizó permanentemente, ya no tiene que tener lugar tampoco la decodificación. Para el control de la recuperación de micropartícula correcta sin decodificación son en sí suficiente en este caso las fluorescencias de los colorantes
- 25 incorporados por polimerización en las micropartículas. La fluorescencia de codificación, superficie y/o ligando pueden usarse asimismo para referenciar micropartículas de diferentes tamaños con respecto a las intensidades de fluorescencia detectadas. Esto se usa preferentemente para minimizar errores, que pueden resultar de oscilaciones de tamaño de las micropartículas dentro de una población, dado que las intensidades de las fluorescencias de micropartícula y la fluorescencia superficial varían proporcionalmente con el diámetro de las micropartículas. Las distintas fluorescencias de micropartícula se usan en cambio asimismo para diferenciar poblaciones de micropartículas entre sí, que tienen el mismo PopID, pero se diferencian en el diámetro en preferentemente 2-50 μm . De manera especialmente preferente tales poblaciones de micropartículas se diferencian 3-15 μm en el diámetro de micropartícula medio.

Algoritmo Ranking-booster

- En una variante de realización se encuentran en parte varias de las micropartículas preferentemente fluorescentes o codificadas con fluorescencia en un espacio de reacción (véase la Figura 9). A este respecto pueden usarse preferentemente distintas codificaciones con fluorescencia, para proporcionar a través de aglutinantes específicos de la población de micropartículas pruebas multiplex. En cambio, es también posible que en el espacio de reacción se encuentre solo una población para tener disponibles para sistemas de prueba digitales suficientes puntos de medición. En esta forma de realización del procedimiento se pierde la micropartícula como estructura a priori esférica para el reconocimiento de micropartícula, dado que micropartículas adyacentes están en contacto y por lo tanto aparecen como estructura confluyente. Por lo tanto, para este procedimiento se lleva a cabo preferentemente el siguiente algoritmo de evaluación de acuerdo con la invención, el algoritmo Ranking-Booster:
- 50 las micropartículas tienen preferentemente una forma esférica prácticamente perfecta, es decir están representadas en la imagen tomada como objetos circulares. Su diámetro mínimo y máximo (en píxeles en la imagen) es a priori conocido en aproximadamente (+/- 25 %). Las claridades de las micropartículas entre sí varían preferentemente hasta 1:20, su diámetro en la relación 1:3. La sobreexposición de las micropartículas no debería ocurrir y se compensa por lo tanto por un sistema automático de exposición. Las micropartículas están distribuidas de manera estocástica hasta estrechamente empaquetadas preferentemente en un plano.

- La imagen se procesa preferentemente en primer lugar con un algoritmo de reconocimiento de objetos convencional, que reconoce micropartículas individualizadas físicamente y aglomerados como tal (véase la Figura 10). Solo los aglomerados se suministran a un procesamiento adicional mediante el Ranking-Booster. Preferentemente pueden tomarse imágenes de nuevo de los recortes de imagen en cuestión con una mayor resolución. Los límites exteriores de los aglomerados se determinan ya en este caso.

- Se examina una máscara de píxeles circunferencial prácticamente circular concéntrica alrededor de cada píxel de aglomerado, cuyo diámetro corresponde al diámetro de micropartícula mínimo conocido a priori. El rango relativo del píxel examinado actualmente o su máscara de píxeles circunferencial se determina y este valor de coordenadas

XY correspondientes se almacena en una imagen intermedia, la imagen de rango relativo (véase la Figura 11). Esta imagen de rango relativo puede procesarse opcionalmente antes del procesamiento de imágenes adicional con un filtro de alisado (por ejemplo un filtro de mediana de 3x3 o 5x5), para eliminar pequeñas interferencias locales.

- 5 La imagen de rango relativo se binariza preferentemente con un umbral fijo (por ejemplo valor umbral 0,5), dado que las claridades absolutas de las micropartículas según Ranking-Booster ya no desempeñan ningún papel (véase la Figura 12). En la imagen binaria generada la región central de cada micropartícula puede reconocerse como disco circular discreto, porque el punto central de una micropartícula (en la imagen original) es siempre su píxel más claro y las claridades de píxel decrecen radialmente. Los discos incluyen, en función del valor umbral seleccionado, preferentemente de manera aproximada solo la mitad de una micropartícula y por lo tanto no pueden estar en contacto entre sí.

15 Por medio del reconocimiento de objetos se identifican los discos centrales. Otros objetos pequeños falciformes o triangulares en los espacios intermedios son artefactos que pueden reconocerse en su forma no redondeada y superficie demasiado pequeña. Estos artefactos se cancelan.

Para obtener de nuevo la superficie original de las micropartículas, se amplían los discos centrales etapa a etapa. Alrededor del borde de cada disco central identificado se agrega en cada caso una capa de píxeles por etapa de iteración (véase la Figura 13). En cuanto un píxel recién agregado de un disco central limita con un píxel original o ya agregado de otro disco, está identificado un punto de contacto entre micropartículas (véase la Figura 14). La detección de un punto de contacto finaliza la inflación de los dos discos centrales implicados, los píxeles de la última capa incompleta se eliminan de nuevo. Para discos centrales, para los que no se detectó aún ningún punto de contacto, se llevan a cabo iteraciones de inflación adicionales. La inflación de los discos centrales se limita sin embargo al objeto de aglomeración original, es decir las iteraciones para un disco se detienen en cuanto debiera agregarse un píxel que no pertenece al objeto total de partida.

Determinación de cinéticas

30 Las cinéticas de la formación del producto de reacción de una reacción de amplificación de señal en los espacios de reacción para la descripción de la concentración de analito o de las propiedades de analito se representan preferentemente para por ejemplo aplicaciones para la PCR en tiempo real o para la determinación de la actividad enzimática de analitos.

35 Mediante el análisis de la variación de fluorescencia como consecuencia de la reacción del punto de medición a punto de medición resultan cinéticas de reacción de las que pueden calcularse concentraciones de los analitos o también constantes de unión. Si la evaluación tiene lugar con respecto a un ciclo de reacción, tal como por ejemplo en la reacción en cadena de la polimerasa, el dato del ciclo de rotura, en el que la señal o la variación de señal rompe el fondo, es decisivo como medida para la cantidad formada de producto de reacción. De esta manera es posible una cuantificación más precisa de los productos de PCR en una muestra que mediante la determinación de la intensidad de fluorescencia. Mediante combinación con una analítica de curvas de fusión es posible obtener información adicional sobre la secuencia y las propiedades de hibridación de analitos de ácido nucleico.

45 Mediante la referencia de todos los puntos de medición adicionales con respecto al primer punto de medición o uno de los puntos de medición subsiguientes antes o al comienzo de la reacción se reducen claramente los errores de medición, dado que la posible referencia preferentemente con respecto a una población de micropartículas como control positivo o con respecto a una muestra de referencia externa pueden minimizarse las influencias tales como diferente iluminación o tamaño de micropartícula. El procedimiento prevé asimismo que tiene que registrarse la influencia de magnitudes perturbadoras, para poder tenerla en cuenta en el cálculo de los valores de medición. Tales magnitudes perturbadoras pueden ser el blanqueo (Bleaching/Fading) de algunos colorantes fluorescentes al igual que las influencias de oscilaciones de temperatura con sobre la medición o la fluorescencia de fondo inespecífica.

Ejemplo 1: Inmunoensayo singleplex

55 El Ejemplo 1 representa una variante fácil de realizar preferentemente para inmunoensayos singleplex, en el que el antígeno PSA se detecta de manera sensible (10^{-13} - 10^{-14} M).

Etapas 1: Microplaca de prueba se recubre con anticuerpos como aglutinante

60 Una microplaca de prueba de fondo plano de poliestireno, cuyo fondo sirve como soporte plano, se recubre con 1 µg/ml de la fracción de IgG de un anticuerpo policlonal específico anti-próstata como anticuerpo de captura en tampón fosfato (PBS) durante la noche. Se retira el anticuerpo no unido mediante lavado múltiple en PBS con la adición del 0,1 % de Tween 20 (PBS-T). Se bloquean sitios de unión libres en la superficie del soporte plano mediante incubación con PBS-T con la adición de albúmina de suero humano al 2 % (HSA).

65 Etapas 2: Incubación de la muestra y unión del analito al anticuerpo

La dilución del suero de paciente tiene lugar 1:2 en PBS-T-HSA y 50 µl de esta dilución de cada muestra se pipetea en una cavidad, que recubrió con el anticuerpo, y se incuba durante 2 h.

Etapas 3: Lavado

- 5 Los constituyentes de muestra no unidos se retiran mediante lavado múltiple en PBS-T a partir de las cavidades.

Etapas 4: Incubación con el sistema de amplificación de señal

- 10 Un conjugado de HRP de la fracción de IgG mencionada anteriormente de un anticuerpo policlonal específico anti-próstata se diluye en PBS-T-HSA 0,1 µg/ml y se pipetea 50 µl en las cavidades de la microplaca de prueba y se incuba durante 2 h, de modo que el PSA unido previamente a partir de la muestra con HRP se ha marcado como sistema de amplificación de señal.

Etapas 5: Lavado

El reactivo de detección no unido del sistema de amplificación de señal se retira mediante lavado múltiple en PBS-T de las cavidades.

Etapas 6: Adición/aspiración parcial del sustrato de enzima de TMB/fluorocromo inclusive micropartículas de enfoque

- 20 Después de la retirada meticulosa de la solución de lavado mediante aspiración se pipetea una solución de sustrato acabada de TMB comercial con la adición de 100 ng de Cy5/ml de Tween 20 al 0,05 % y aproximadamente 5000 micropartículas de PMMA fluorescentes (excitación 480 nm/emisión 520 nm) con un diámetro de 2 µm en las cavidades y después de 30 s se aspiró en gran parte.

Etapas 7: Cobertura con aceite

- 30 Después se cubre el soporte plano mediante pipeteo de 50 µl de aceite mineral en las cavidades, de modo que el espacio de reacción comprende todo el fondo de las cavidades con un grosor de capa <10 µm.

Etapas 8: Medición en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100

- 35 La microplaca de prueba se evalúa en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100 (Attomol), representándose después del enfoque a 520 nm imágenes de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 640 nm y una longitud de onda de emisión de 660 nm con el enfoque óptico en el espacio de reacción y una resolución de píxeles de 0,65 µm cada 15 s. De una pila Z se selecciona la imagen más clara en cada caso y se suministra automáticamente al proceso de obtención de imágenes, después de lo cual se controla automáticamente la calidad de las imágenes y dado el caso se corrige.

Etapas 9: Obtención de imágenes de "agujeros negros"

- 45 En tiempo real, es decir casi con observación continua, del proceso de representación se seleccionan zonas con menor fluorescencia, que se desvían más de 3 veces la desviación estándar de la fluorescencia de partida o de la fluorescencia del entorno y cuya variación a lo largo de varias tomas se calcula mediante algoritmos de vector de intensidad y se evalúa cuántas moléculas del sistema de amplificación de señal se encuentran en la preparación de reacción. Si están inmovilizadas empaquetadas muy estrechamente demasiadas moléculas de amplificación de señal en la preparación de reacción, dado que la concentración de analito en la muestra es muy alta, se emite la muestra como positiva sin dato de concentración para los analitos. Una cuantificación del analito se consigue como alternativa a través de la cinética de la extinción de fluorescencia, es decir a través de la reducción de la señal total a lo largo de todo el espacio de medición, en comparación con una muestra de referencia. Los datos de concentración correspondientes se emiten automáticamente por el software.

Ejemplo 2: Inmunoensayo singleplex de moléculas individuales

- 55 El Ejemplo 2 se diferencia del Ejemplo 1 por que mediante el uso de nanopartículas que flotan libremente en la muestra como soporte de los anticuerpos como aglutinante pueden emplearse mayores volúmenes de muestra y de esta manera se aumenta la probabilidad de que en el caso de concentraciones muy bajas del analito en el espacio que va a someterse a prueba (por ejemplo suero de paciente o agua corriente) se registren en general moléculas de analito en la toma de muestras. Además mediante el uso de nanopartículas que flotan libremente en la muestra se acortan los recorridos de difusión desde las moléculas de analito hasta los aglutinantes sobre las nanopartículas, de modo que en el caso de un exceso de aglutinantes considerando las constantes de unión entre analito y aglutinante pueden transferirse casi todas las moléculas de analito al proceso de análisis. Dado que se tienen en cuenta en su mayor parte todos los analitos de la muestra total, esta variante de realización puede considerarse como cuantificada ("casi digital"). El siguiente protocolo permite la detección ultrasensible de troponina, un marcador temprano para el riesgo de infarto cardíaco:

Etapas 1:

- 5 Nanopartículas paramagnéticas comercialmente disponibles de polimetacrilato con recubrimiento de superficie de poli(ácido acrílico)-COOH (PolyAn) y un diámetro de 200 nm se incuban después de activación con EDC con 1 mg de anticuerpos anti-troponina / ml de PBS durante 2 h y por lo tanto se recubren. Anticuerpos no unidos se retiran por completo mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T.

Etapas 2:

- 10 Se mezclan 250 µl de muestra con 25 µl de PBS 0,5 M con la adición de Tween 20 al 1 % y se mezcla cuidadosamente de manera homogénea. Las cavidades ya preparadas de una microplaca de prueba de poliestireno se bloquearon con PBS-T y se llenaron ahora con la solución muestra preparada. Todas las cavidades llenadas se mezclan entonces con 10 µl de una suspensión con un número definido de nanopartículas, de modo que esta, con la sedimentación completa, da como resultado un grosor de capa de aproximadamente 10-20 µm, es decir
15 aproximadamente 5×10^{10} nanopartículas por cavidad con aproximadamente 6 mm de diámetro.

Etapas 3:

- 20 La solución de muestra mezclada con nanopartículas se incuba con sacudidas intensas durante 2 h.

Etapas 4:

- 25 A continuación se retiran constituyentes no unidos de la muestra mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T. Para ello se sedimentan las nanopartículas de manera magnética en la cavidad, antes de que se retire la solución de lavado y se retire mediante nueva solución de lavado.

Etapas 5:

- 30 Después de retirarse PBST, se incuba la cavidad con anti-troponina-POD (ensayo de intercalación directa) diluido en PBS-T durante 2 h con sacudidas intensas.

Etapas 6: Lavado

- 35 Lavado tal como en la etapa 4.

Etapas 7:

- 40 Después de la retirada minuciosa de la solución de lavado mediante aspiración se pipetea una solución de sustrato acabada de TMB comercial con la adición de 100 ng de Cy5/ml de Tween 20 al 0,05 % en las cavidades y se resuspenden las nanopartículas en la misma. Después de aproximadamente 30 s se sedimentan las nanopartículas de manera uniforme de manera magnética, y se separa por pipeteado la solución de sustrato. Solo después de la cobertura de la capa de nanopartículas en todas las cavidades con 50 µl de aceite mineral se retira el imán para la inmovilización de las nanopartículas. En la preparación se encuentran aproximadamente 500 micropartículas fluorescentes con un diámetro de 10 µm para el enfoque. En el caso del uso de un enfoque automático de hardware
45 adecuado puede suprimirse la adición de las micropartículas fluorescentes como orientación para el enfoque.

Etapas 8: Medición en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100

- 50 La microplaca de prueba se evalúa en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100 (Attomol), representándose imágenes de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 640 nm y una longitud de onda de emisión de 660 nm con el enfoque óptico en el espacio de reacción y una resolución de píxeles de 0,65 µm cada 15 s. De una pila Z se selecciona la imagen más clara en cada caso y se suministra automáticamente al proceso de obtención de imágenes, después de lo cual se controla automáticamente la calidad de las imágenes y dado el caso se corrige.

55

Etapas 9: Obtención de imágenes de "agujeros negros"

- 60 En tiempo real, es decir, sin interrupción de la observación del proceso de representación casi durante la observación continua, se seleccionan zonas con menor fluorescencia, que se desvían más de 3 veces la desviación estándar de la fluorescencia de partida o de la fluorescencia del entorno y cuya variación a lo largo de varias tomas se calcular mediante algoritmos de vector de intensidad y se evalúa cuántas nanopartículas que portan moléculas de enzima se encuentran en la preparación de reacción. Si están inmovilizadas empaquetadas muy estrechamente o unas sobre otras demasiadas nanopartículas en la preparación de reacción, dado que la concentración de analito en la muestra es demasiado alta, se emite la muestra como positiva sin dato de concentración para el analito PSA. Una
65 cuantificación del analito se consigue como alternativa a través de la cinética de la extinción de fluorescencia, es decir a través de la reducción de la señal total a lo largo de todo el espacio de medición, en comparación con una

muestra de referencia. Los datos de concentración correspondientes se emiten automáticamente por el software.

Ejemplo 3a: Inmunoensayo de anticuerpos multiplex sensible

- 5 En el caso de enfermedades complejas, tal como en muchas enfermedades autoinmunitarias puede ser importante registrar varios analitos al mismo tiempo y en particular en estadios tempranos de las enfermedades también de manera muy sensible y cuantitativa. Con la siguiente variante de realización es posible contar en 3-plex para tres analitos de manera muy sensible las moléculas de anticuerpo unidas tras la incubación con la muestra al soporte y así cuantificarlas, sin que se trate de una cuantificación absoluta o digital, es decir sin que se incluyeran todas las moléculas de analito obligatoriamente en el proceso de análisis:

Etapas 1:

- 15 Tres micropartículas de polimetacrilato modificadas con COOH, que portan poli(ácido acrílico), codificadas con fluorescencia con un diámetro de 2 µm se activan con EDC y se incuban con, en cada caso, 1 mg de polilisina, antígeno RoSS-A o SM por ml de PBS durante 2 h y por lo tanto se recubre de manera específica de población con antígeno. Antígenos no unidos se retiran por completo mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T. Para ello se sedimentan las micropartículas mediante centrifugación, antes de que se sustituya la solución de lavado y se retire mediante nueva solución de lavado. Opcionalmente pueden incluirse poblaciones de micropartículas adicionales con autoantígenos adicionales o antígenos de control en la preparación.

Etapas 2:

- 25 Después se incuba la población de micropartículas recubierta con ADNbc de igual manera con 1 mg de ADNbc/ml de PBS de esperma de arenque y se lava.

Etapas 3:

- 30 Una microplaca de prueba de poliestireno se incuba con 10 µg de polilisina / ml de PBS durante la noche y después se lava varias veces con PBS. Después se pipetea una suspensión con 5.000 micropartículas recubiertas, codificadas con fluorescencia de cada población individualmente una tras otra o como mezcla de las 3 poblaciones en las cavidades de la microplaca de prueba y se sedimenta por completo y de manera uniforme mediante centrifugación o hundimiento.

Etapas 4:

- 35 Después se aspira el sobrenadante y la muestra, 1:50 en PBS-T de suero de paciente diluido, se pipetea en las cavidades y se incuba durante 1 h, de modo que anticuerpos dado el caso contenidos en el suero, específicos para uno de los tres antígenos pueden unirse a la población de micropartículas respectiva. Igualmente es posible, titular la muestra a lo largo de varios pasos de dilución en distintas cavidades, para llegar a la zona de moléculas individuales en el soporte de analitos unidos para cada uno de los tres analitos para una cuantificación más precisa.

Etapas 5:

- 45 A continuación se retiran constituyentes no unidos de la muestra mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T.

Etapas 6:

- 50 Después de retirarse PBST, se incuba la cavidad con IgG anti-ser humano-POD como reactivo de detección diluido en PBS-T durante 1 h con sacudidas.

Etapas 7:

- 55 A continuación se retiran constituyentes no unidos del reactivo de detección mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T.

Etapas 8:

- 60 Después de la retirada minuciosa de la solución de lavado mediante aspiración se pipetea una solución de sustrato acabado de TMB comercial con la adición de 100 ng de Cy5/ml Tween 20 al 0,05 % en las cavidades y después de aproximadamente 30 s se retira de nuevo de la cavidad mediante aspiración y se cubre de inmediato con 50 µl de aceite mineral.

Etapas 9: Medición en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100

- 65 La microplaca de prueba se evalúa en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100 (Attomol),

representándose imágenes de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 480 nm, 530 nm y 640 nm y longitudes de onda de emisión correspondientes de 520 nm, 560 nm o 660 nm con el enfoque óptico en el espacio de reacción y una resolución de píxeles de 0,65 µm cada 15 s. La imagen enfocada automáticamente de manera óptima y expuesta se selecciona automáticamente y se suministra al proceso de obtención de imágenes por medio de software FastFluoscan (Attomol), después de lo cual se controla automáticamente la calidad de las imágenes y dado el caso se corrige.

Etapas 10: Obtención de imágenes y evaluación

El software FastFluoscan reconoce todas las micropartículas en la imagen y asocia estas después de la evaluación de las fluorescencias de codificación de las micropartículas (emisiones a 520 nm o 560 nm) a una de las tres poblaciones de micropartículas. Después se determina la variación de fluorescencia de Cy5 dependiente de la concentración de analito para las micropartículas individuales en el espacio de reacción respectivo y se calcula la cinética de la extinción de Cy5 porcentual. A partir de esto se calcula qué micropartículas de una población son positivas, en particular cuando estas se encuentran adyacentes más estrechamente con micropartículas de otras poblaciones o de la misma población en la cavidad, de modo que sus espacios de reacción no podrían separarse por completo entre sí. La medida para ello es el tiempo con el que una micropartícula correspondiente presenta una fluorescencia de Cy5 extinguida en relación con el tiempo promedio para esta población de micropartículas. Si la extinción es significativamente menor que el tiempo promedio y una población vecina muestra una fluorescencia de Cy5 extinguida, esta población será negativa. Si corresponde al tiempo promedio, se evalúa como positiva. Después se cuentan las micropartículas positivas y las micropartículas negativas de una población y su relación como medida para la concentración de analito se refiere a una serie de muestras de referencia con función de calibración, para indicar la concentración de analito en la muestra.

Ejemplo 3b: Inmunoensayo de anticuerpos multiplex sensible

Etapas 1 a 5:

Estas etapas corresponden a las etapas 1 a 5 del Ejemplo 3a.

Etapas 6:

Después de retirarse PBS-T, se incuba la cavidad con IgG anti-ser humano como reactivo de detección diluido en PBS-T durante 1 h con sacudidas.

Etapas 7:

A continuación se retiran constituyentes no unidos del reactivo de detección mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T.

Etapas 8:

Después de retirarse PBS-T, se diluye la cavidad con nano/micropartículas marcadas con estreptavidina y peroxidasa como reactivo de detección en PBS-T y se incuba durante 1 h con sacudidas.

Etapas 9 a 12:

Estas etapas corresponden a las etapas 7 a 10 del Ejemplo 3a.

Ejemplo 4

Moléculas de ARN de una longitud de aproximadamente 15-30 nucleótidos, las denominadas microARN(miARN) están directamente implicadas en la regulación de la expresión génica. Son conocidos más de 1500 miARN distintos de diferente secuencia, que están implicados en la regulación de distintos estados fisiológicos y fisiopatológicos. Especialmente la determinación de las concentraciones de miARN en el suero de pacientes sirve como procedimiento poco invasivo de alta relevancia clínica. El estándar de oro para la determinación cuantitativa de miARN en el suero es la PCR en tiempo real. PCR-Bias, es decir la alteración de las relaciones de cantidades entre PCR distintas por diferente eficiencia de PCR, o la falta de capacidad multiplex de la PCR o una sensibilidad demasiado baja de procedimientos de hibridación son sin embargo limitaciones importantes del estado de la técnica actual.

Mediante el ejemplo de aplicación descrito a continuación del procedimiento de acuerdo con la invención se consigue la detección de las moléculas de miARN debido a la alta sensibilidad sin multiplicación por PCR. El uso de la quimioluminiscencia como procedimiento de detección garantiza un intervalo de medición muy alto a través de 4-5 etapas log:

Etapas 1:

Suspensiones de tres suspensiones de micropartículas de polimetacrilato modificadas con COOH, codificadas con fluorescencia de manera diferente, que portan poli(ácido acrílico), cuyas micropartículas tienen un diámetro de 10 µm, se activan con EDC y después se incuban con, en cada caso, 1 mg de estreptavidina por ml de PBS durante 2 h y por lo tanto se recubren con estreptavidina. Estreptavidina no unida se retira por completo mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T. Para ello se sedimentan las micropartículas mediante centrifugación, antes de que se sustituya la solución de lavado y se retire mediante nueva solución de lavado. Opcionalmente pueden incluirse poblaciones de micropartículas adicionales para miARN adicionales o controles en la preparación.

Etapas 2:

Después se incuban de manera específica de población las poblaciones de micropartículas recubiertas con estreptavidina con sonda de miARN biotinilada 100 nM como aglutinante, es decir en cada caso oligonucleótidos de ADN biotinilados complementarios al miARN miR16, antisentido con respecto a miR16 así como con mutación doble con respecto a miR16 y se lavan. Con la inclusión de poblaciones de micropartículas adicionales puede extenderse el análisis a miARN adicionales en el planteamiento multiplex.

Etapas 3:

Una microplaca de prueba de poliestireno se incuba con 10 µg de polilisina / ml de PBS durante la noche y después se lava varias veces con PBS-T.

Etapas 4:

A partir de muestras de suero humano se aísla ARN (Li, Y y Kowdley, KV [2012] Method for microRNA isolation from clinical serum samples. Anal Biochem 431[1]: 69-75) y se sintetiza en el extremo 3' enzimáticamente una extensión de Poli-A (Shingara J, Keiger K, Shelton J, Laosingchai-Wolf W, Owers P, Conrad R, Brown D, Labourier E [2005] An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. RNA, 11: 1461 — 1470).

Etapas 5:

Una alícuota de 20 µl del Poli-A-miARN se mezcla con una mezcla de 20 µl de una suspensión de las poblaciones de micropartículas que portan sondas mencionadas anteriormente, que contienen aproximadamente 500 micropartículas de cada población, así como 2 µl de Poli-dT₂₅-Biotin-oligonucleótidos de ADN 400 nM y se incuba de manera correspondiente a Shingara et al (2012) con sacudidas en un recipiente de reacción Eppendorf a 42 °C durante 2 h, de modo que el miARN de las muestras de suero puede unirse a las sondas de captura y la sonda de Poli-dT₂₅-biotina puede unirse al extremo Poli-A del miARN.

Etapas 6:

A continuación se retiran constituyentes no unidos de la muestra mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T.

Etapas 7:

Entonces se pipetea 200 µl de PBS en la microplaca de prueba preparada y se añaden a esto 20 µl de la suspensión de micropartículas y se incuba durante 10 min, hasta que las micropartículas se han hundido hasta el fondo de la cavidad de la microplaca de prueba y están inmovilizadas en la polilisina.

Etapas 8:

Después de retirarse PBS, se incuba la cavidad de la microplaca de prueba con extravidina-POD (Sigma) como reactivo de detección diluido en PBS-T durante 1 h sin sacudidas.

Etapas 9:

A continuación se retiran constituyentes no unidos del reactivo de detección mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T y entonces se retira PBS.

Etapas 10:

Después de la retirada minuciosa de la solución de lavado mediante aspiración se retira una solución de sustrato acabada de quimioluminiscencia comercial (Lumigen ECL Plus, Diarect) y después de aproximadamente 30 s se retira de nuevo de la cavidad mediante aspiración y se cubre de inmediato con 50 µl de aceite mineral.

Etapas 11: Medición en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100

La microplaca de prueba se evalúa en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100 (Attomol), representándose en primer lugar imágenes de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 480 nm, 530 nm y longitudes de onda de emisión correspondientes de 520 nm, 560 nm con el enfoque óptico en el espacio de reacción y una resolución de píxeles de 2,16 µm de una cavidad. Después se desplaza la rueda de filtro hasta una posición sin filtro de fluorescencia, para representar automáticamente las imágenes de luminiscencia de estas cavidades con una resolución de píxeles de 0,3-0,65 y un tiempo de exposición de 1-10 s de manera correspondiente a la intensidad de luminiscencia. Después la imagen enfocada automáticamente de manera óptima y expuesta se selecciona automáticamente y se suministra al proceso de obtención de imágenes por medio de software FastFluocan (Attomol), después de lo cual se controló automáticamente la calidad de las imágenes y dado el caso se corrigió, por ejemplo mediante la eliminación de artefactos.

Etapas 12: Obtención de imágenes y evaluación

El software FastFluocan reconoce todas las micropartículas en la imagen y asocia estas después de la evaluación de las fluorescencias de codificación (emisiones a 520 nm o 560 nm) a una de las tres poblaciones de micropartículas. Después se determina la quimioluminiscencia dependiente de la concentración de analito para las micropartículas individuales en el espacio de reacción respectivo. A partir de esto se calcula qué micropartículas de una población son positivas, en particular cuando estas se encuentran adyacentes más estrechamente con micropartículas de otras poblaciones o de la misma población en la cavidad, de modo que sus espacios de reacción no podrían separarse por completo entre sí. La medida para ello es el tiempo con el que una micropartícula correspondiente presenta una quimioluminiscencia en relación con el tiempo promedio para esta población de micropartículas. Si la quimioluminiscencia de una micropartícula es significativamente menor que el tiempo promedio para la población de micropartículas y una población vecina muestra una quimioluminiscencia significativamente mayor, entonces esta población se evaluará como negativa. Si corresponde al tiempo promedio, se evalúa como positiva. Después los valores de medición, es decir la altura de la señal de luminiscencia media, para cada población de micropartículas se refiere a la serie de muestras de referencia con función de calibración, para indicar la concentración de analito del miARN en la muestra. El límite de corte para la evaluación positivo/negativo del miARN respectivo se calcula a partir de los controles negativos respectivos (antisentido, con mutación doble).

Ejemplo 5: Detección de PCR

Etapas 1:

Tres suspensiones de micropartículas de polimetacrilato modificadas con COOH, codificadas con fluorescencia de manera diferente, que portan poli(ácido acrílico), cuyas micropartículas tienen un diámetro de 10 µm, se activan con EDC y se incuban con, en cada caso, 1 mg de estreptavidina por ml de PBS durante 2 h y por lo tanto se recubren con estreptavidina. Estreptavidina no unida se retira por completo mediante lavado múltiple en un exceso de PBS-T. Para ello se sedimentan las micropartículas mediante centrifugación, antes de que se sustituya la solución de lavado y se retire mediante nueva solución de lavado. Opcionalmente pueden incluirse poblaciones de micropartículas adicionales para pares de cebadores adicionales en la preparación.

Etapas 2: Recubrimiento de las micropartículas con cebadores

Después se incuban las poblaciones de micropartículas recubiertas con estreptavidina con cebadores directos e inversos biotinilados 100 nM en cantidad equimolar de manera específica de la población y se lavan. Con la inclusión de poblaciones de micropartículas adicionales puede extenderse el recubrimiento con cebadores adicionales en el planteamiento multiplex.

Etapas 3:

Se asiló ADN de E. coli de manera correspondiente a Frömmel et al. (2013) y de manera correspondiente a la mezcla de PCR. En lugar de cebadores específicos de E.coli se pipetea los cebadores universales 1 y 2 en una concentración final de 400 nM y las sondas (véase a continuación) en cada caso en una concentración de 100 nM en la mezcla de PCR y se pipetea una alícuota de 5 µl de suspensión de micropartículas, que contiene 500 micropartículas de cada población de micropartículas recubierta con cebador directo e inverso y aproximadamente 100.000 micropartículas no codificadas con fluorescencia y no funcionalizadas en superficie de PMMA o sílice con un diámetro de 10 µm.

Etapas 4:

Después se pipetea la mezcla junto con micropartículas en la cavidad de una placa Nukleolink. Después de la deposición de las micropartículas en la mezcla de PCR se aspira con cuidado la mezcla, de modo que en el fondo de la cavidad solo permanece la capa con las micropartículas y la mezcla que se encuentra en los intersticios entre las micropartículas en la cavidad. Después se cubre la preparación de reacción con aceite mineral y se transfiere al termociclador del aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100 y se inicia el programa de termociclador. Se recorren 40 termociclos de la siguiente configuración: Inicial 5 min, 95 °C. después: 30 s, 95 °C; 1 min, 60 °C; 30

s, 72 °C.

Etapas 5: Medición en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100

- 5 Las tiras de Nukleolink se evalúan en el aparato de obtención de imágenes de fluorescencia FI100 (Attomol), representándose imágenes de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 480 nm, 530 nm y 640 nm y longitudes de onda de emisión correspondientes de 520 nm, 560 nm o 660 nm con el enfoque óptico en el espacio de reacción y una resolución de píxeles de 2,16 µm en la fase de hibridación de cada termociclo. La imagen enfocada automáticamente de manera óptima y expuesta se selecciona automáticamente y se suministra al proceso de obtención de imágenes por medio de software FastFluoscan (Attomol), después de lo cual se controla automáticamente la calidad de las imágenes y dado el caso se corrige.

Etapas 6: Obtención de imágenes y evaluación

- 15 El software FastFluoscan reconoce todas las micropartículas en la imagen y asocia estas después de la evaluación de las fluorescencias de codificación (emisiones a 520 nm o 560 nm) a una de las tres poblaciones de micropartículas. Después se determina la variación de fluorescencia de Atto 647N dependiente de la concentración de analito para las micropartículas individuales en el espacio de reacción respectivo para cada termociclo. A partir de esto se calcula qué micropartículas de una población son positivas, en particular cuando estas se encuentran adyacentes más estrechamente con micropartículas de otras poblaciones o de la misma población en la cavidad, de modo que sus espacios de reacción no están separados por completo entre sí. La medida para ello es el tiempo con el que una micropartícula correspondiente presenta una fluorescencia de Cy5 en relación con el tiempo promedio de la generación de señal de fluorescencia de Cy5 para esta población de micropartículas. Si la generación de señal de fluorescencia de Cy5 es significativamente menor que el tiempo promedio y una población vecina muestra una fluorescencia de Cy5, esta población se evaluará como negativa. Si corresponde al tiempo promedio, se evalúa como positiva. Si mediante este algoritmo sencillo no es posible ninguna asociación precisa de la señal de Cy5, se emplean algoritmos de vector de intensidad para calcular la cinética de la distribución de señales para la asociación de la señal de Cy5 a una micropartícula de dos micropartículas adyacentes. La caída de la intensidad de señal alejándose de la micropartícula es más pronunciada para una micropartícula positiva que para una micropartícula negativa. La cinética de los vectores de intensidad es especialmente útil, dado que la pendiente de la caída de intensidad para diferentes ciclos de reacción puede calcularse claramente de manera diferente. Es especialmente segura la asociación de las señales en la fase exponencial de la generación de señales en la PCR. En casos, en los que no es posible una asociación unívoca, pueden descartarse de la evaluación micropartículas codificadas con fluorescencia situadas estrechamente unas junto a otras. En 500 micropartículas de cada población siguen siendo evaluables en promedio más del 50 %, lo que en particular en el caso de muestras más fuertemente positivas >500 copias por analito permiten una evaluación segura. Muestras débilmente positivas <500 copias por muestra dan como resultado una señal casi digital, es decir ya no muestran todas las micropartículas de una población una señal de Cy5. En este caso puede efectuarse sin embargo una evaluación estadística de las micropartículas reactivas, dado que puede suponerse la tasa positiva igual de micropartículas individualizadas, que pueden evaluarse de manera unívoca y micropartículas situadas estrechamente unas junto a otras no evaluables de manera unívoca.

- Después se cuentan las micropartículas positivas y las micropartículas negativas de una población y su relación como medida para la concentración de analito se refiere a una serie de muestras de referencia con función de calibración, para indicar la concentración de analito en la muestra. Como alternativa, en el caso de muestras débilmente positivas es posible contar el número de micropartículas positivas y a lo largo del volumen de espacio de reacción referirse al volumen de muestra y por lo tanto cuantificar.

Se emplearon las siguientes secuencias de oligonucleótido para la síntesis de los cebadores y sondas:

- 50 Las secciones específicas para los factores de patogenicidad de *E. coli* de los cebadores y sondas se extrajeron de Frömmel et al. (2013) (Frömmel U, Lehmann W, Rödiger S, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, Groß J, Roggenbuck D Zinke O, Ansorge H, Vogel S, Klemm P, Wex T, Schröder C, Wieler LH, Schierack P (2013) Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 3-16). En cada cebador directo se fijó adicionalmente la secuencia de cebador universal 1 y se introdujo una marca de 5'-biotina. En cada cebador inverso se fijó adicionalmente la secuencia de cebador universal 2 y se introdujo una marca de 5'-biotina. Las sondas, que funcionan como sondas TaqMan, se dotaron adicionalmente con una marca de 5'-Cy5 y una marca de agente de extinción 3'-DeepDark II y se extendió algunos nucleótidos de manera correspondiente a la secuencia de GeneBank.

Cebador universal 1: GCAGCGTCGATGGAGTCA

- 60 Cebador universal 2: ACTCAGCTCACACGGAC

stx2e

cebador directo con marca de 5'-biotina:

- 65 5'-GCAGCGTCGATGGAGTCAGGAGCGTTTTGACCATCTTC-3'

cebador inverso con marca de 5'-biotina:

5'-ACTCACGCTCACACGGACGCGCCAGATATGATGAAACCA-3'
sonda con modificación de agente de extinción 5'-Cy5- y 3'-DeepDark II:
5'-CCGGAATGCAAATCAGTCGTCCTCAC-3'

5 **stx1**

cebador directo con marca de 5'-biotina:
5'-GCAGCGTCGATGGAGTCACTGGATTAAATGTCGCATAGTG-3'

10 cebador inverso con marca de 5'-biotina:
5'-ACTCACGCTCACACGGACGAGAACGCCACTGAGATCATC-3'

sonda con modificación de agente de extinción 5'-Cy5- y 3'-DeepDark II:
5'-CGGCAAATACAGAGGGGATTTCGTACAACAC-3'

15 **eaeA**

cebador directo con marca de 5'-biotina:
5'-GCAGCGTCGATGGAGTCACTGGTTACAACATTATGGAACG-3'

20 cebador inverso con marca de 5'-biotina:
5'-ACTCACGCTCACACGGACGTGAAATAGTCTCGCCAGTATTTCG-3'

sonda con modificación de agente de extinción 5'-Cy5- y 3'-DeepDark II:
25 5'-ATGTTGGGCTATAACGTCTTCATTGATCAGG -3'

En el caso del uso de cebadores y sondas, que son específicas para otros patógenos y que se inmovilizan sobre otras poblaciones de micropartículas, puede usarse el procedimiento fácilmente en otros planteamientos de usuario tales como por ejemplo la detección y diferenciación de papilomavirus humanos, la detección de factores de resistencia de *Helicobacter pylori* o para la detección combinada de patógenos de septicemia. La detección casi digital de marcadores tumorales puede emplearse con el uso de secuencias de oligonucleótido específicos de tumor tales como por ejemplo marcadores de metilación también para la detección de células tumorales individuales de por ejemplo sangre u orina.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Attomol GmbH

<120> Procedimiento para la detección de uno o varios analitos en una muestra

40 <130> P13233WO

<160> 11

45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador universal 1

55 <400> 1
gcagcgtcga tggagtca

18

<210> 2

<211> 18

60 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador universal 2

65 <400> 2

	actcacgctc acacggac	18
5	<210> 3 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> stx2e: cebador directo con marca de 5'-biotina	
	<400> 3 gcagcgtcga tggagtcagg agcgtttttga ccatcttc	38
15	<210> 4 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> stx2e: cebador inverso con marca de 5'-biotina	
	<400> 4 actcacgctc acacggacgc gccagatatg atgaaacca	39
25	<210> 5 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> stx2e: sonda con modificación de agente de extinción 5'-Cy5- y 3'-DeepDark II	
35	<400> 5 ccggaatgca aatcagtcgt cactcac	27
40	<210> 6 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> stx1: cebador directo con marca de 5'-biotina	
	<400> 6 gcagcgtcga tggagtcact ggattttaatg tcgcatagtg	40
50	<210> 7 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> stx1: cebador inverso con marca de 5'-biotina	
	<400> 7 actcacgctc acacggacga gaacgcccac tgagatcatc	40
60	<210> 8 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> stx1: sonda con modificación de agente de extinción 5'-Cy5- y 3'-DeepDark II	

	<400> 8	
	cggcaaatac agaggggatt tcgtacaaca c	31
5	<210> 9 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> eaeA: cebador directo con marca de 5'-biotina	
	<400> 9	
	gcagcgtcga tggagtcacc tggttacaac attatggaac g	41
15	<210> 10 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> eaeA: cebador inverso con marca de 5'-biotina	
	<400> 10	
25	actcacgctc acacggacgt gaaatagtct cgccagtatt cg	42
	<210> 11 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> eaeA: sonda con modificación de agente de extinción 5'-Cy5- y 3'-DeepDark II	
	<400> 11	
35	atgttgggct ataacgtctt cattgatcag g	31

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de analitos en una muestra, que comprende las etapas:

- 5 a) aplicar una muestra y una solución de reacción sobre un soporte, siendo la solución de reacción adecuada para, en una reacción de amplificación de señal, en función de la presencia del analito que va a detectarse, permitir generar un producto de reacción medible;
- b) llevar a cabo la reacción de amplificación de señal;
- c) medir ópticamente los productos de reacción; y
- 10 d) dado el caso proporcionar los datos de medición para el cálculo de una concentración de analito en una muestra;

en donde antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal sobre el soporte se configuran una pluralidad de espacios de reacción separados espacialmente, en donde antes, durante o después de aplicar la muestra y la solución de reacción se inmovilizan micropartículas sobre el soporte, de modo que las micropartículas están cubiertas por la solución de reacción y a continuación se retira la solución de reacción, de modo que micropartículas inmovilizadas adyacentes, que no están en contacto, ya no están cubiertas por una capa continua de solución de reacción;

caracterizado por que

- 20 la retirada de la solución de reacción tiene lugar de tal manera que la superficie del soporte permanece cubierta con solución de reacción únicamente en una zona, que rodea directamente un sitio de contacto entre micropartículas y soporte, mientras que zonas de superficie del soporte que están alejadas al menos $\geq 0,1$ veces el diámetro de partícula de un sitio de contacto entre una micropartícula y el soporte ya no están cubiertas por solución de reacción.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde las micropartículas y/o el soporte presentan sobre su superficie aglutinantes que son específicos para los analitos que van a detectarse.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la solución de reacción presenta un sustrato que durante la reacción de amplificación de señal se transforma mediante una actividad enzimática y, de esta manera, se genera el producto de reacción medible o, sin reacción enzimática, un sustrato medible se une a la superficie de partícula.

4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra o las micropartículas inmovilizadas sobre el soporte antes de llevar a cabo la reacción de amplificación de señal se ponen en contacto con un sistema de amplificación de señal.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 3 o 4, en donde el analito que va a detectarse y/o el sistema de amplificación de señal presenta la actividad enzimática, en donde en el caso de la actividad enzimática se trata preferentemente de la actividad de una enzima de la clase de las ADN polimerasas, ARN-polimerasas, transcriptasas inversas, ligasas, oxidasas, reductasas, transferasas, peroxidasas, fosfatasas, proteasas, peptidasas, lipasas, glicosidasas y/o luciferasas.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 4 o 5, en donde el sistema de amplificación de señal presenta un primer elemento y un segundo elemento, en donde el primer elemento se une específicamente a los analitos que van a detectarse o a un aglutinante de la micropartícula ocupado con el analito, y el segundo elemento presenta la actividad enzimática.

7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde las micropartículas presentan un diámetro medio inferior a 1 mm, preferentemente de 0,01 a 100 μm , de manera especialmente preferente de 0,05 a 50 μm , de manera muy especialmente preferente de 1 a 30 μm .

8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde se usa más de una población de micropartículas, en donde las distintas poblaciones de micropartículas se diferencian al menos en que portan aglutinantes, que se diferencian en su especificidad de unión, preferentemente las diferentes poblaciones de micropartículas presentan aglutinantes que son específicas para analitos diferentes.

9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde después de configurar los espacios de reacción separados espacialmente tiene lugar una estabilización de los espacios de reacción separados cubriendo las micropartículas inmovilizadas sobre el soporte con un líquido de separación, que no es miscible con la solución de reacción.

10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde medir ópticamente los productos de reacción de la reacción de amplificación de señal se realiza de tal manera que los espacios de reacción separados espacialmente del soporte se registran de manera individualizable, de modo que pueden asignarse valores de medición a espacios de reacción individuales y/o a micropartículas individuales.

11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde la retirada de la solución de reacción tiene lugar de tal manera que la superficie del soporte permanece cubierta con solución de reacción únicamente en una zona, que rodea directamente un sitio de contacto entre micropartículas y soporte, mientras que zonas de superficie del soporte que están alejadas al menos ≥ 1 veces el diámetro de partícula de un sitio de contacto entre una micropartícula y el soporte ya no están cubiertas por solución de reacción.
12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde las micropartículas se inmovilizan de manera dirigida sobre el soporte.
13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde las micropartículas se encuentran aisladas sobre el soporte, preferentemente a una distancia promedio que corresponde a 1 a 20 veces el diámetro de partícula.
14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde después de configurar los espacios de reacción separados espacialmente por las micropartículas tiene lugar una estabilización de los espacios de reacción separados mediante inmovilización de otras poblaciones de micropartículas dado el caso en mezcla con nanopartículas como separadores, en donde el tamaño de poro de las otras micropartículas, y dado el caso de nanopartículas, se adapta al tamaño de poro de las micropartículas, que garantizan los espacios de reacción, para recibir, almacenar y emitir en los espacios de reacción de manera dirigida productos de partida de la reacción de amplificación de señal.
15. Uso del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14 para una amplificación y detección de ácidos nucleicos cualitativa y cuantitativa, ensayos de hibridación inversa ultrasensibles de ADN y ARN, un cribado de secuencia de ácido nucleico para la detección de variaciones de secuencia, inmunoensayos ultrasensibles, ensayos de células individuales multiplex en espacios de reacción miniaturizados *in vitro* en cada caso en formato singleplex o multiplex.

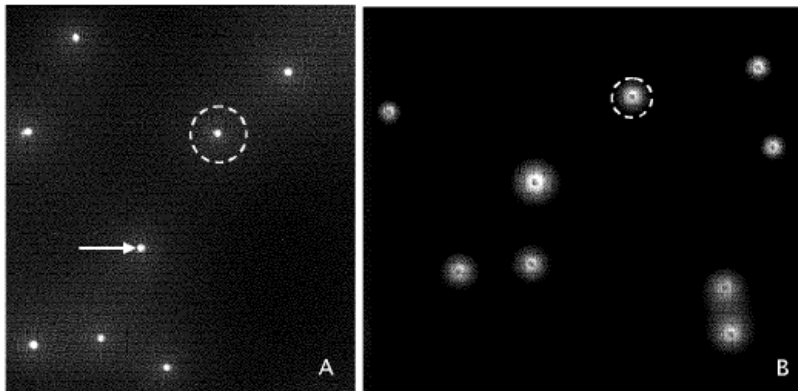


Figura 1

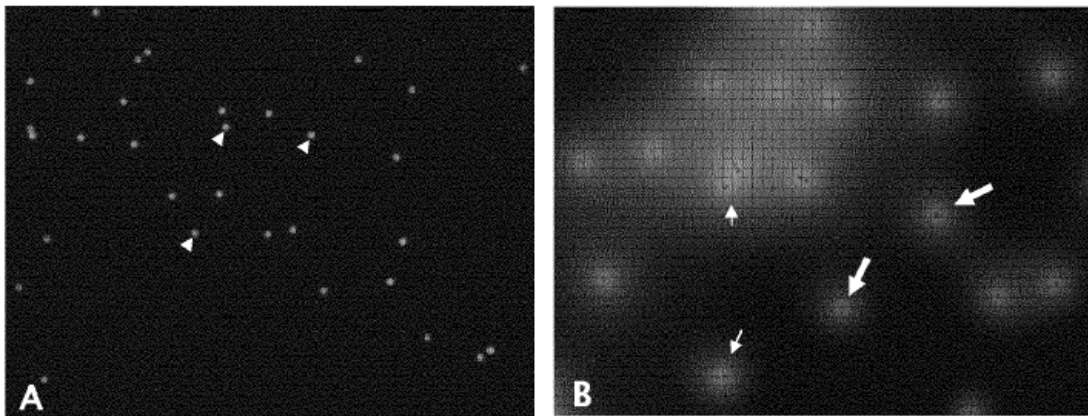


Figura 2

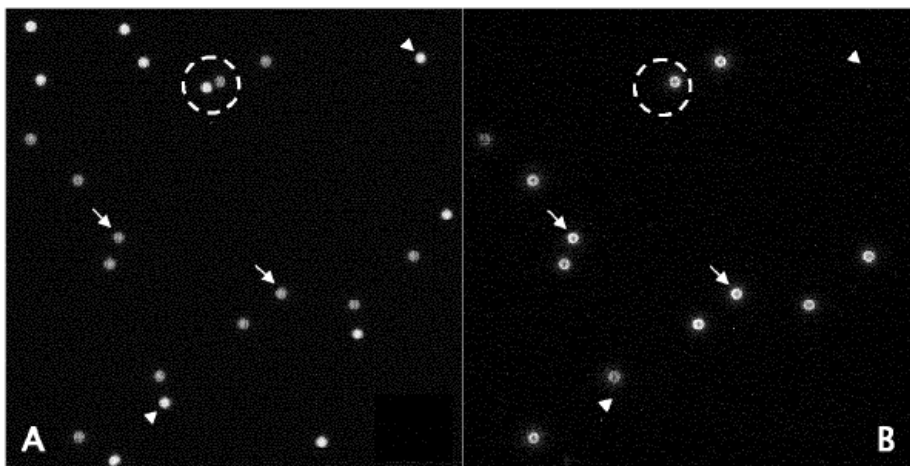


Figura 3

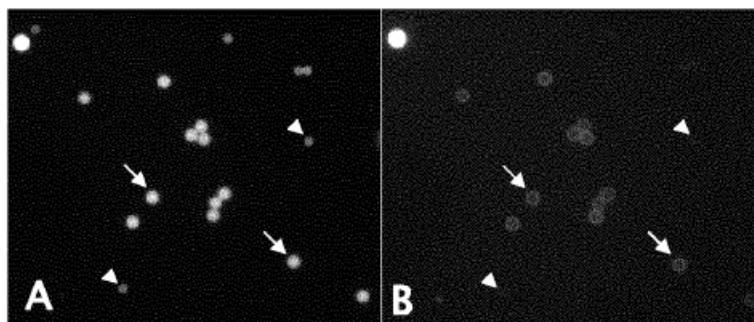


Figura 4

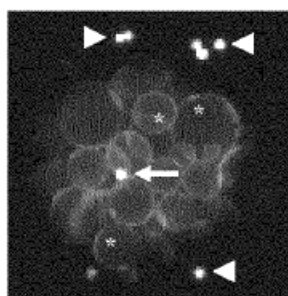


Figura 5

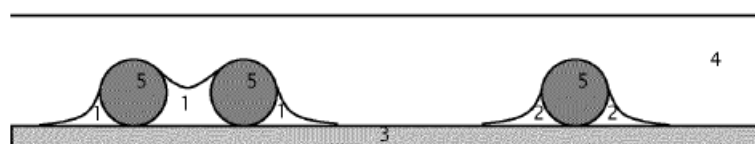


Figura 6:

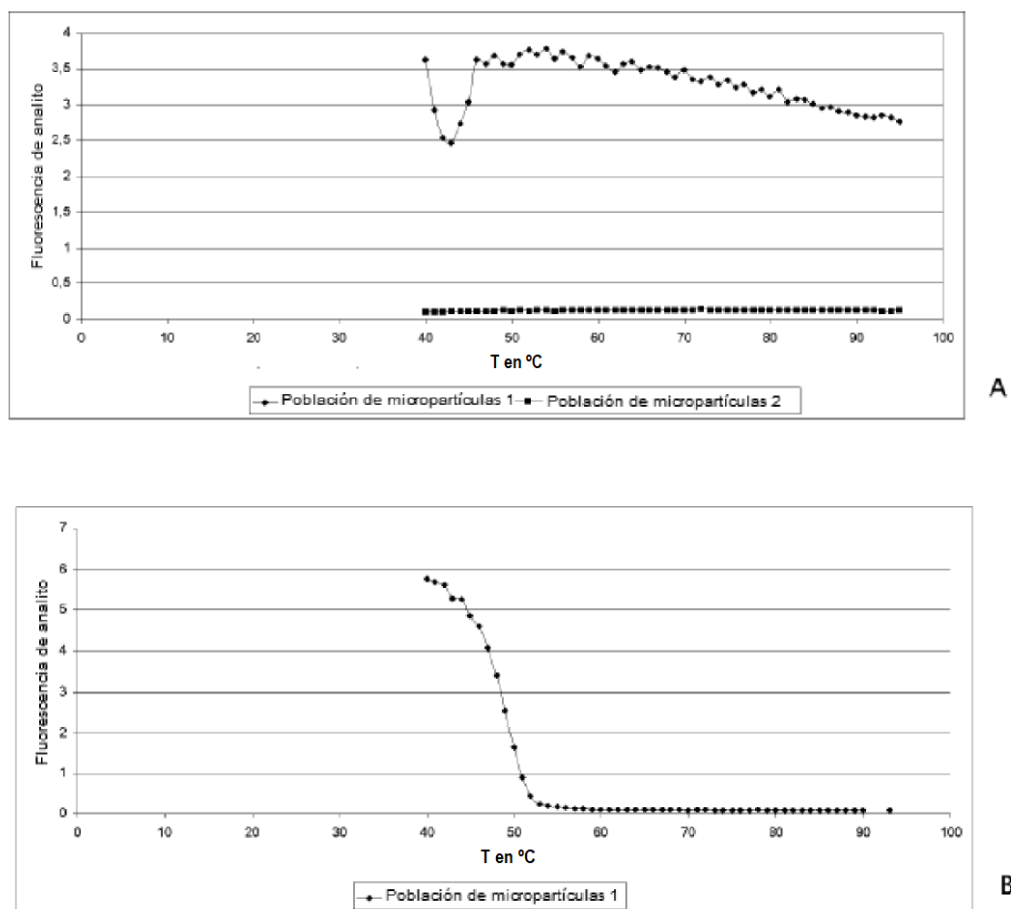


Figura 7

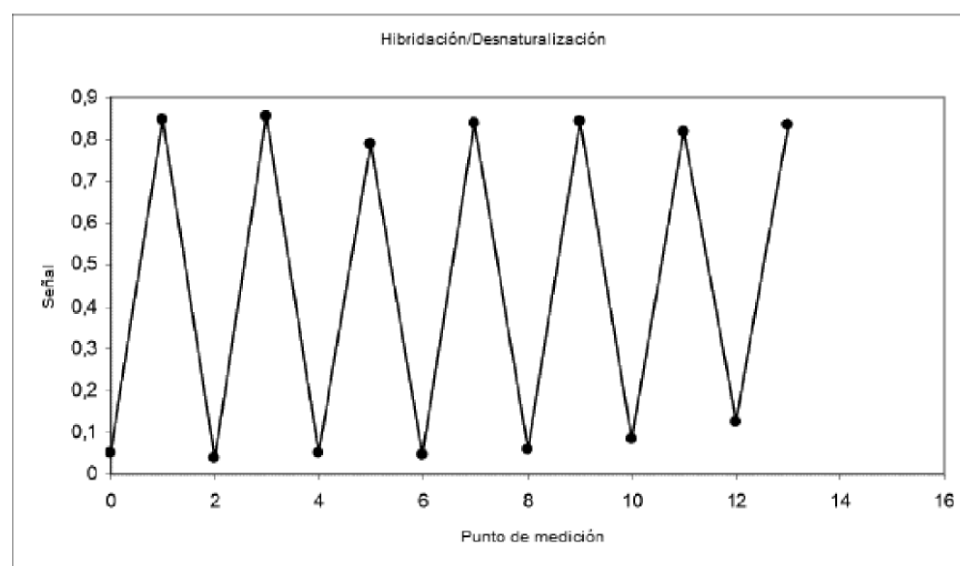


Figura 8

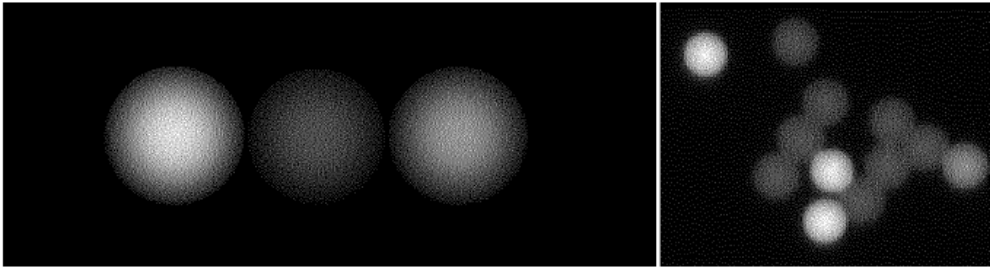


Figura 9

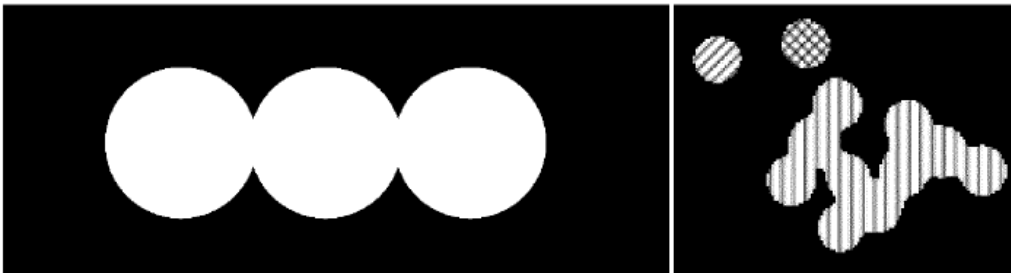


Figura 10

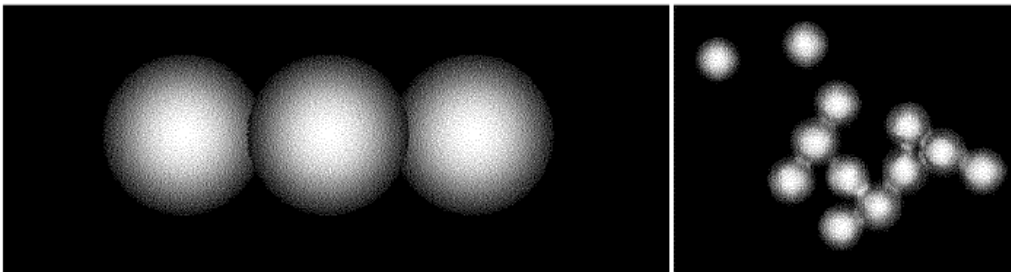


Figura 11

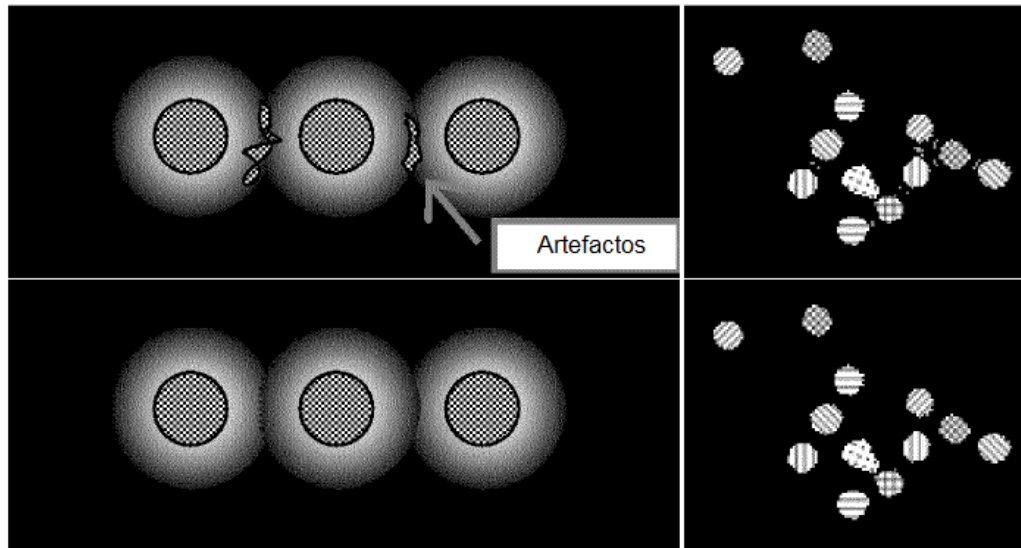


Figura 12

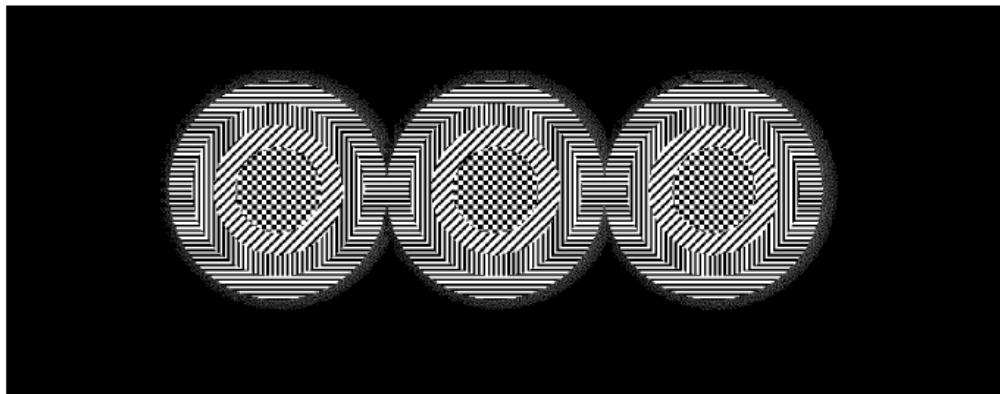


Figura 13

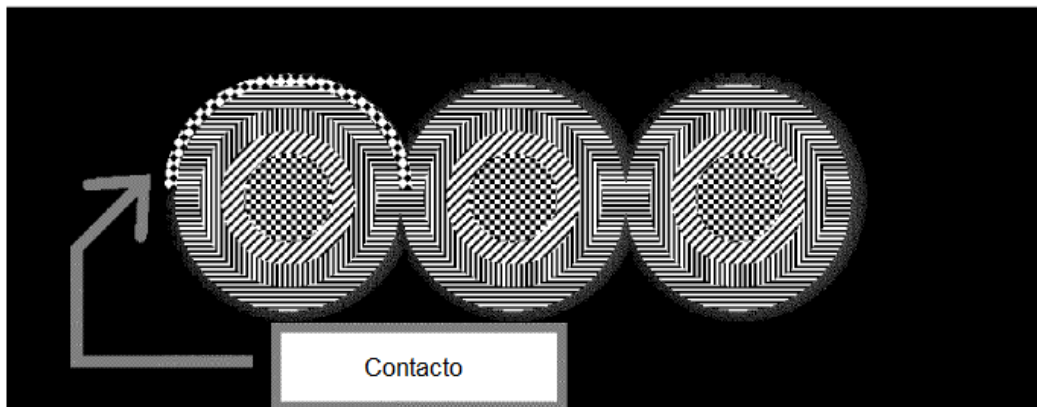


Figura 14

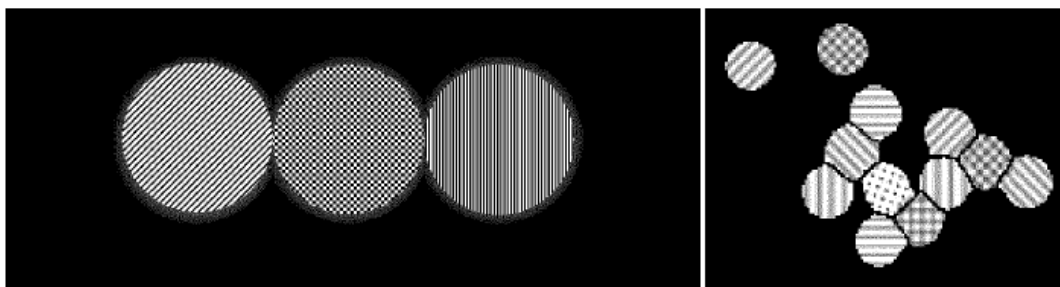


Figura 15

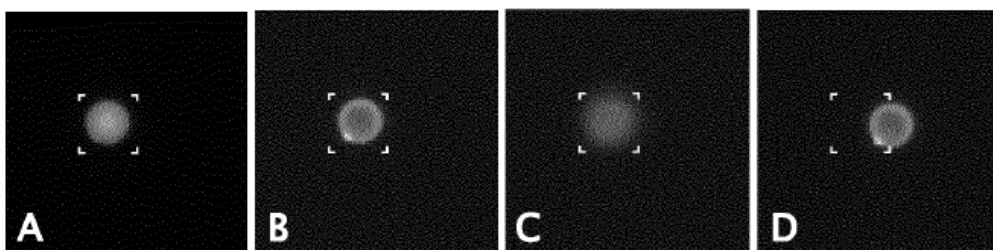


Figura 16

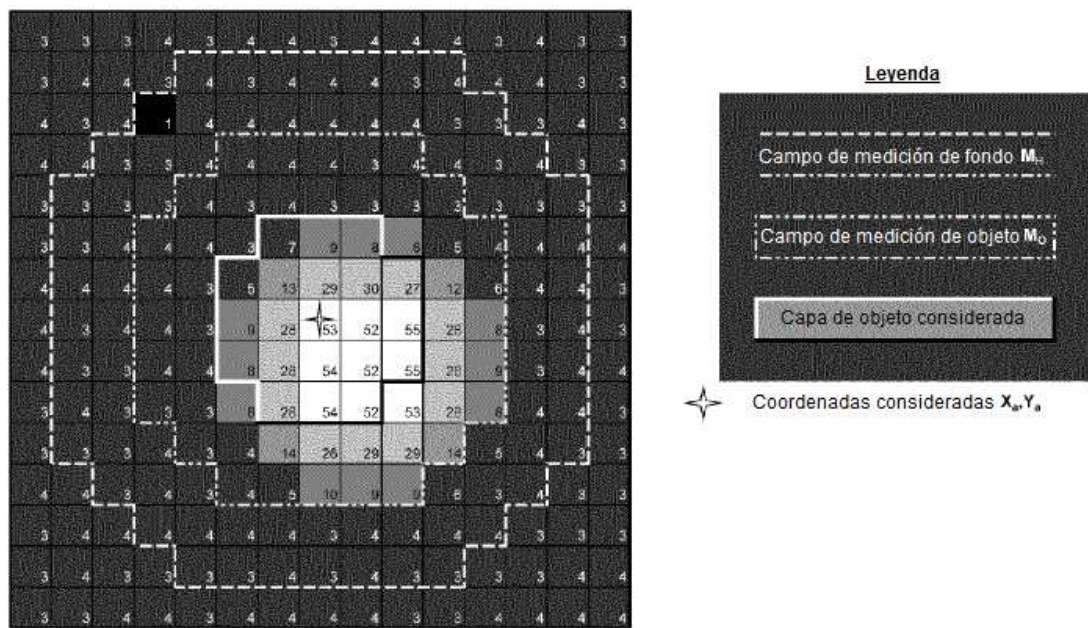


Figura 17