

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 223**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2017 PCT/EP2017/051868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17129803**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2017 E 17702082 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3408401**

54 Título: **Procedimiento y aparato de electroquimioluminiscencia para detectar un analito en una muestra líquida**

30 Prioridad:

29.01.2016 EP 16153257
01.03.2016 EP 16158014

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2020

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

QUINT, STEFAN y
BAUER-ESPINDOLA, KLAUS ANDREAS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 770 223 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 y aparato de electroquimioluminiscencia para detectar un analito en una muestra líquida

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento de electroquimioluminiscencia para detectar un analito en una muestra líquida y a un aparato para detectar un analito en una muestra líquida, así como a un producto de programa informático.

10

Antecedentes y técnica relacionada

Las técnicas de ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) son bien conocidas para la detección y cuantificación de analitos de interés en sustancias bioquímicas y biológicas. En general, los procedimientos y sistemas que pueden medir cantidades mínimas de microorganismos, productos farmacéuticos, hormonas, virus, anticuerpos, ácidos nucleicos y otras proteínas son de gran valor para los investigadores y médicos.

15

Las técnicas de ensayo ECL proporcionan una medición sensible y precisa de la presencia y concentración de un analito de interés. En dichas técnicas, la muestra incubada se expone a un electrodo de trabajo controlado potencioestática o galvanostáticamente para provocar la luminiscencia. En el entorno químico apropiado, dicha electroquimioluminiscencia está provocada por un voltaje o una corriente aplicados sobre un electrodo de trabajo en un momento particular y de una manera particular. La luz producida por el marcador se mide e indica la presencia o la cantidad del analito. Para una descripción más completa de dichas técnicas de ECL, se hace referencia, por ejemplo, a la patente de EE. UU. n.º 5.238.808 y al documento WO86/02734.

20

25

En el documento WO 2014/202298 A1, conjuntamente con un sistema de análisis adecuado, se describe un procedimiento de electroquimioluminiscencia de detección de un analito en una muestra líquida, donde las micropartículas magnéticas recubiertas de proteína se agitan dentro de un receptáculo para evitar que se depositen en el fondo y se agreguen entre sí. El documento WO 90/11511 divulga un procedimiento y un aparato para realizar mediciones de electroquimioluminiscencia usando una forma de onda de voltaje con una velocidad de exploración decreciente aplicada a un electrodo de trabajo voltamétrico para mejorar la precisión y exactitud de las mediciones. En el documento WO 99/39206 se describe un procedimiento para analizar una muestra de prueba por medio de una prueba de reacción de enlace por electroquimioluminiscencia, en el que un complejo que contiene un marcador de quimioluminiscencia, que es característico para el análisis, se forma a través de una reacción de enlace bioquímico y se une a una micropartícula magnética durante una secuencia de reacción. En "Tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Electrogenerated Chemiluminescence in Analytical Science", Microchim. Acta 127, 19-39, W.-Y. Lee describe cómo la quimioluminiscencia electrogenerada por tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) se puede usar como un procedimiento de detección para la determinación de oxalato y una variedad de analitos que contienen amina sin derivatización en corrientes de flujo tales como inyección de flujo y HPLC. El documento US 6.599.473 B1 divulga un análisis de reacción de unión por electroquimioluminiscencia (ECL-BBA).

30

35

40

De acuerdo con el ECL-BBA, se produce un complejo detectable cuya concentración constituye una medida del resultado analítico buscado. Una sustancia marcadora (marcador) que puede efectuar una reacción de ECL se acopla a un reactivo de unión específico para el analito, por ejemplo, un anticuerpo. La especie que comprende la sustancia marcadora y el reactivo de unión se designa como conjugado marcador.

45

Cuando dicha sustancia se somete a un potencial eléctrico adecuado en un electrodo de trabajo voltamétrico, emite luz que se puede medir fotométricamente. Una segunda sustancia electroquímicamente activa, designada como correactante, contribuye normalmente a esta reacción. En la práctica, se utiliza principalmente un complejo de rutenio (rutenio-tris[bipiridilo]) como marcador de ECL en combinación con tripropilamina (TPA) como correactante. Las dos sustancias electroquímicamente activas se oxidan tras la aplicación de voltaje al electrodo. La pérdida posterior de un protón convertirá la TPA en una especie fuertemente reductora. La reacción redox posterior lleva al marcador de ECL a un estado excitado desde el cual vuelve al estado fundamental con la emisión de un fotón. La reacción del marcador de ECL es preferentemente una reacción circular, de modo que una sola molécula de marcador emite una pluralidad de fotones después de la aplicación de un voltaje al electrodo.

50

55

Las moléculas complejas marcadas con ECL características para el análisis se fijan a micropartículas magnéticas (microesferas). En la práctica, se usan microesferas de poliestireno magnetizadas que tienen un diámetro de típicamente 2 a 3 micrómetros. La fijación se efectúa por medio de un par de socios de unión bioquímica específicos. El par estreptavidina-biotina ha resultado ser ventajoso en particular. Las microesferas están recubiertas con estreptavidina, a las que se unirá un anticuerpo biotinilado.

60

Las microesferas con el complejo marcado unido se introducen en la celda de medición de un aparato de medición. La celda está equipada con electrodos que son necesarios para generar el campo eléctrico requerido para provocar la reacción de ECL. Las microesferas se atraen sobre la superficie del electrodo de trabajo en el campo magnético de un imán dispuesto debajo del electrodo de trabajo. Puesto que esto se produce típicamente en celdas de flujo

65

continuo con fluidos de muestra que fluyen continuamente, la deposición magnética de las microesferas se designa como "captura". El potencial eléctrico requerido para provocar la reacción de ECL se aplica a continuación al electrodo de trabajo y la luz luminiscente resultante se mide usando un detector óptico adecuado. La intensidad de la luz luminiscente es una medida de la concentración del número de anticuerpos marcados acoplados a las microesferas en la superficie del electrodo de trabajo, lo que, a su vez, es una medida de la concentración del analito en la muestra. Una calibración permite el cálculo de la concentración buscada a partir de la señal de luminiscencia medida.

Sumario de la invención

De acuerdo con los modos de realización de la invención, se proporciona un procedimiento de electroquimioluminiscencia de detección de un analito en una muestra líquida usando una celda de medición. La celda de medición comprende un electrodo de trabajo para detectar el analito usando un ciclo de medición de electroquimioluminiscencia. El procedimiento comprende

a. llevar a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de calibración usando una muestra líquida que esté desprovista del analito y realizar una primera espectroscopia de impedancia electroquímica, EIS, en un punto dado del ciclo de medición, realizándose la primera EIS usando el electrodo de trabajo,

b. llevar a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de análisis usando la muestra líquida que contiene el analito y realizar una segunda EIS en el punto dado del ciclo de medición, realizándose la segunda EIS usando el electrodo de trabajo,

c. comparar el resultado de la primera EIS y la segunda EIS,

d. proporcionar una indicación de un estado de medición que indique si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede un umbral predefinido.

Un "analito" como se entiende en el presente documento es un componente de la muestra líquida que se va a analizar, por ejemplo, moléculas de diversos tamaños, proteínas, metabolitos y similares.

Una "muestra líquida" como se entiende en el presente documento engloba una muestra biológica, tal como cualquier tipo de tejido o líquido corporal que se haya derivado de un ser humano o de cualquier otro organismo. En particular, una muestra biológica puede ser una muestra de sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo o saliva o cualquier derivado de los mismos.

El término "luminiscencia" como se entiende en el presente documento engloba cualquier tipo de luminiscencia, tal como luminiscencia inducida por radiación, quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia, en particular ECL-BBA.

El término "inmunoensayo de luminiscencia" como se entiende en el presente documento engloba cualquier inmunoensayo que produce una señal óptica, es decir, una señal de luminiscencia que indica la presencia de un analito particular en una muestra líquida.

Un "ciclo de medición" como se entiende en el presente documento engloba las etapas individuales que se requieren para realizar la detección por electroquimioluminiscencia del analito en la muestra líquida.

Un "punto dado del ciclo de medición" puede ser un punto dado en el tiempo, por ejemplo, después de haber iniciado el ciclo de medición. En este caso, el punto dado puede ser una determinada duración en el tiempo, medida directamente desde el punto de inicio del ciclo o bien después de iniciar o completar una determinada etapa del ciclo de medición. Una etapa de un ciclo de medición es, por ejemplo, el suministro de la muestra líquida, la captura de las micropartículas, el lavado de la celda de medición, la realización de la medición de ECL o la realización de la limpieza de la celda de medición. Un punto dado también puede ser una determinada ocasión bien definida del ciclo de medición, como, por ejemplo, dicho inicio de una de las etapas mencionadas.

Aunque solo se menciona un electrodo de trabajo, el experto en la técnica entenderá que esto también engloba la presencia de un contraelectrodo. Además, el experto en la técnica entenderá que esto también engloba una medición con cuatro electrodos, usándose el 4.^º electrodo con fines de compensación.

El resultado de la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se podría seleccionar del grupo que consiste en admitancia, impedancia, parte real, parte imaginaria o fase que es convertible entre sí.

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es un procedimiento que mide las propiedades dieléctricas de un medio, expresadas por la impedancia, como una función de la frecuencia. La impedancia Z de cualquier circuito es la proporción entre el voltaje en función del tiempo $V(t)=V_0 \cdot \text{sen}(\omega t)$ y la respuesta de la corriente en función del tiempo resultante $I(t)=I_0 \cdot \text{sen}(\omega t + \varphi)$:

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \text{ sen } (\omega t)}{I_0 \text{ sen } (\omega t + \varphi)}$$

5 Aquí, V_0 e I_0 son las señales de voltaje y corriente máximas, ω es la frecuencia radial, t es el tiempo y φ es el desplazamiento de fase. En general, la impedancia se determina a diferentes frecuencias para dar un espectro de impedancia $Z(\omega)$. La función Z se puede representar mediante un número complejo con el módulo $|Z|$, el desplazamiento de fase φ , la parte real Z' y la parte imaginaria Z'' . Con $j = \sqrt{-1}$, se puede escribir:

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + jZ''(\omega) \quad \tan(\varphi) = -\frac{Z''(\omega)}{Z'(\omega)} \quad |Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2}$$

10 La parte real de la impedancia está relacionada con todas las propiedades óhmicas de la muestra. La parte imaginaria describe principalmente el comportamiento capacitivo de la capacitancia de doble capa que se forma en la capa de Helmholtz muy cerca de la superficie del electrodo. La geometría de la celda y la geometría de los electrodos tienen una influencia significativa en la impedancia. Cualquier cambio en la superficie del electrodo tiene una influencia en la capacitancia de doble capa de un electrodo. Por lo tanto, la espectroscopia de impedancia electroquímica es una herramienta potente para evaluar la superficie del electrodo en dependencia de reacciones electroquímicas, efectos de adsorción, rugosidad o contaminación del electrodo. La EIS, por lo tanto, es una herramienta potente para el control de calidad dentro de un procedimiento.

20 A menudo, la admitancia se usa como una alternativa a la impedancia. La admitancia de un circuito se relaciona con la impedancia mediante la sencilla ecuación $|Y| = \frac{1}{|Z|}$. Está representada por las siguientes ecuaciones:

$$Y(\omega) = Y'(\omega) + jY''(\omega) \quad \tan(\varphi) = -\frac{Y''(\omega)}{Y'(\omega)} \quad |Y| = \sqrt{(Y')^2 + (Y'')^2}$$

25 Cuando se analizan los espectros de Z o Y , los diagramas de Bode y Nyquist se usan más comúnmente para la representación. En el diagrama de Bode, el logaritmo de $|Z|$ y φ se representan gráficamente como una función del logaritmo de $\omega/2\pi$, mientras que en el diagrama de Nyquist se representa gráficamente $-Z'$ frente a Z'' .

30 Los modos de realización de la invención pueden tener la ventaja de que es posible determinar *in situ*, es decir, durante el ciclo de medición sin interrupción del ciclo de medición, si la medición de ECL es fiable o no. Por ejemplo, el estado de medición puede indicar un fallo del ciclo de medición o un éxito del ciclo de medición. El fallo significa que el resultado de la medición de ECL no es fiable y el éxito significa que el resultado de la medición de ECL es fiable. Por tanto, los modos de realización pueden proporcionar una herramienta para evaluar la medición de ECL sin interrumpir o perturbar la medición. Por ejemplo, esto puede permitir identificar condiciones irregulares dentro de los reactivos o componentes del sistema, tales como la solución de correactante, la solución de limpieza y la celda de medición.

40 En el presente documento, el término "solución de correactante" (= CoS) se debe considerar un sinónimo del reactivo requerido como correactante de ECL. Por ejemplo, la "solución de correactante" puede comprender tripropilamina (TPA). Una composición adecuada como solución de correactante (CoS) comprende, por ejemplo, TPA 180 mM, fosfato 300 mM, detergente al 0,1 % (por ejemplo, polidocanol), pH de 6,8.

45 Además, el término "solución de limpieza" (= CIS) se debe considerar sinónimo de una solución de limpieza de la celda de medición que se usa para limpiar la celda después de haber realizado la medición de ECL. Por ejemplo, la "solución de limpieza" puede comprender hidróxido de potasio. Una composición adecuada como solución de limpieza (CIS) comprende, por ejemplo, KOH 176 mM y detergente al 1 % (por ejemplo, polidocanol).

50 De acuerdo con un modo de realización de la invención, la celda de medición es parte de un aparato de medición que comprende una unidad de control, proporcionándose la indicación a la unidad de control, en la que en caso de que la indicación indique que la comparación dio como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede el umbral predefinido, el procedimiento comprende además que la unidad de control controle el aparato para:

- 55 - seleccionar una contramedida con respecto al fallo de la medición,
- iniciar la contramedida,
- repetir las etapas b., c. y d.

Una "contramedida" se debe entender como cualquier acción que controla el aparato para corregir el fallo del ciclo de medición o bien que proporciona una información a un usuario del aparato sobre el fallo de la medición o las mediciones de EIS.

5 Por ejemplo, la contramedida corrige el fallo de la medición. Después de que se complete la corrección, la repetición de dichas etapas b., c. y d. se puede realizar automáticamente.

10 En otro ejemplo, el aparato de medición comprende además una unidad de visualización, comprendiendo la contramedida visualizar el estado de medición en la unidad de visualización. De acuerdo con un modo de realización, la visualización solo se puede realizar en caso de que la comparación haya dado como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede el umbral predefinido.

15 De acuerdo con un modo de realización de la invención, el ciclo de medición comprende cualquiera de los siguientes:

- una primera fase para el acondicionamiento del electrodo de trabajo sin la muestra líquida,

20 - una segunda fase para el suministro de la muestra líquida a la celda de medición y la captura de micropartículas magnéticas, comprendiendo dicha muestra líquida una sustancia marcadora que puede efectuar una reacción de electroquimioluminiscencia medida con la medición de electroquimioluminiscencia, estando además unido dicho complejo a las micropartículas magnéticas, en la que en caso de que la muestra líquida contenga el analito, el analito está contenido en la muestra líquida como un complejo, comprendiendo dicho complejo la sustancia marcadora, comprendiendo dicha captura atraer las micropartículas con un campo magnético depositando de este modo las micropartículas sobre la superficie de dicho electrodo de trabajo,

25 - una tercera fase para el lavado de la celda de medición después de la captura y antes de la medición de electroquimioluminiscencia, estando adaptada dicha tercera fase para retirar los complejos no unidos y las micropartículas no depositadas de la celda de medición,

30 - una cuarta fase para realizar la medición de electroquimioluminiscencia en la muestra,

- una quinta fase para limpiar la celda de medición con el electrodo de trabajo con una solución de limpieza,

siendo el punto dado cualquiera de los siguientes:

35 - un primer punto durante la primera fase,

- un segundo punto durante la segunda fase, en el que, en caso de que la tercera fase no esté presente, este segundo punto puede estar al final de la segunda fase, justo antes de iniciarse la cuarta fase,

40 - un tercer punto durante la tercera fase, preferentemente al final de la tercera fase,

- un cuarto punto durante la cuarta fase,

45 - un quinto punto después de la quinta fase y antes de la primera fase de la ejecución posterior del ciclo de medición.

Preferentemente, cualquier medición de EIS en cualquiera de los puntos dados se puede realizar en una ocasión con ausencia de movimiento de los líquidos contenidos en la celda de medición. Esto puede incrementar la exactitud del procedimiento.

50 Con respecto al tercer punto, se debe tener en cuenta que, preferentemente, este tercer punto se puede seleccionar de modo que se complete la atracción de las micropartículas. Esto puede proporcionar un estado reproducible en el que se realizan las mediciones de EIS.

55 La selección apropiada de uno o múltiples de los puntos mencionados anteriormente puede tener el beneficio de que los reactivos o componentes del sistema erróneos mencionados anteriormente se pueden identificar con una alta selectividad. Por tanto, un error se puede asignar directa e inequívocamente a un defecto de un determinado reactivo o componente del sistema. Dichos puntos mencionados pueden ser puntos individuales discretos o bien pueden formar parte de los puntos obtenidos de una medición de EIS continua. La medición de EIS también puede ser continua para una determinada fase, mientras que para otra fase la medición de EIS solo se puede realizar para un punto dado discreto.

60 De acuerdo con un modo de realización de la invención, el acondicionamiento, la captura, el lavado opcional, la medición de electroquimioluminiscencia y la limpieza comprenden la aplicación de impulsos de potencial al electrodo de trabajo, aplicándose los impulsos en relación con un potencial de polarización de CC medido en relación con un

electrodo de referencia de la celda de medición, comprendiendo la realización de la EIS aplicar un potencial de CA al potencial de CC.

5 Por tanto, el potencial de CC estándar requerido para realizar la medición de ECL se puede usar como un potencial básico de modo que los resultados de la medición de ECL se obtengan con alta precisión y calidad. Además de ese potencial de CC, el potencial de CA requerido para la EIS se puede modular de modo que no afecte negativamente la medición de ECL. Por ejemplo, el potencial de CC durante el ciclo de medición de ECL puede estar entre -1,5 V y +3,0 V, preferentemente entre -1,2 V a +1,2 V, más preferentemente 0 V.

10 Por ejemplo, el potencial de CA para la realización de la EIS se aplica usando un potencióstato con un módulo de análisis de respuesta de frecuencia (FRA). La EIS se puede realizar a continuación usando una medición de potencial único potencióstático.

15 El hardware de FRA puede comprender un generador de señal digital (DSG), una unidad de acondicionamiento de señal (SCU) y un convertidor de analógico a digital rápido con dos canales (ADC). El DSG puede comprender una memoria digital que se carga con la representación digital de la señal aplicada y un convertidor de digital a analógico. Un convertidor de digital a analógico multiplicador puede controlar la amplitud de la señal. Esta arquitectura puede garantizar una generación de señal exacta. Las señales de corriente y potencial dependiente del tiempo y del potencióstato se filtran y amplifican por la SCU y se registran por medio del ADC. Las señales adquiridas se almacenan en la memoria digital en la placa del ADC. Esta memoria digital permite el promedio en el dominio del tiempo de mediciones repetitivas en el mismo punto de medición dado.

20 Por ejemplo, el potencial de CA tiene una amplitud de al menos 1 mV y como máximo 100 mV de pico a pico, preferentemente de al menos 3 mV y como máximo 80 mV de pico a pico, más preferentemente de al menos 5 mV y como máximo 50 mV de pico a pico. Además, el potencial de CA puede tener una frecuencia de al menos 10 Hz y como máximo 100 kHz, preferentemente de al menos 20 Hz y como máximo 50 kHz, más preferentemente de al menos 30 Hz y como máximo 10 kHz.

30 Se debe observar que, en un modo de realización, las mediciones de EIS se pueden realizar más de una vez para el punto dado. A partir de las mediciones de EIS realizadas para dicho punto dado, se puede calcular un valor promedio. Esto puede mejorar aún más la exactitud del procedimiento. El experto en la técnica entiende que, por supuesto, durante un determinado punto en el tiempo solo se puede realizar una única medición de EIS. Otras mediciones de EIS para "el mismo" punto dado se deben entender, por tanto, como mediciones sucesivas en el tiempo e inmediatamente antes, en y después del punto dado en el tiempo. Por tanto, se pueden realizar múltiples mediciones de EIS dentro de un marco de tiempo limitado y predefinido que incluya el punto de tiempo dado.

35 El electrodo de trabajo se puede seleccionar del grupo que comprende oro, platino, carbono vítreo, iridio y diamante dopado con boro. El electrodo de referencia se puede seleccionar del grupo que comprende electrodo de plata/cloruro de plata, calomelano saturado, mercurio/óxido de mercurio (mercurioso), mercurio/sulfato de mercurio, cobre/sulfato de cobre. Como alternativa al electrodo de referencia para la medición de EIS, se puede usar un "electrodo de seudoreferencia" que se selecciona preferentemente del grupo que comprende plata, platino, oro y acero inoxidable.

40 En otro modo de realización de acuerdo con la presente invención, la medición de EIS se realiza en un procedimiento de detección de 4 cables. El procedimiento de detección de 4 cables compensa la caída de iR en el electrodo de trabajo y en el contraelectrodo mediante 2 electrodos adicionales (cable de detección 1 y cable de detección 2) para la medición de EIS (compensación de iR). Estos 2 electrodos adicionales para la medición de EIS en un procedimiento de detección de 4 cables se seleccionan preferentemente del grupo que comprende plata, platino, oro y acero inoxidable, respectivamente. En otro modo de realización, el potencial de CA para realizar la EIS se aplica usando un potencióstato con un módulo de análisis de respuesta de frecuencia (FRA) en un procedimiento de detección de 4 cables.

45 De acuerdo con un modo de realización de la invención, el resultado de la primera EIS y la segunda EIS comprende cada uno una señal de respuesta respectiva que indica una admitancia y una fase, estando el umbral predefinido definido respectivamente para la admitancia y la fase, comprendiendo la comparación del resultado de la primera EIS y la segunda EIS una comparación de las admitancias respectivas y una comparación de las fases respectivas, indicando el estado de medición si ambas comparaciones dan como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede el umbral predefinido respectivamente para la admitancia y la fase.

50 Puesto que, dentro de una sola medición, el resultado de una EIS siempre comprende dos tipos de información, a saber, fase y admitancia, el uso de ambas informaciones en combinación como un criterio para determinar el estado de medición puede incrementar la fiabilidad del procedimiento.

55 De acuerdo con un modo de realización de la invención, la indicación de un estado de medición es positiva en caso de que la comparación dé como resultado que una desviación entre las EIS comparadas está dentro del umbral predefinido y una indicación de un estado de medición es negativa en caso de que la comparación dé como

5 resultado que una desviación entre las EIS comparadas está fuera del umbral predefinido, realizándose la primera EIS y la segunda EIS respectivas al menos dos veces para al menos dos puntos diferentes de los puntos dados y dando como resultado indicaciones de ejecución de ensayo respectivas de estados de medición, en el que la selección de las contramedidas se realiza en base a una combinación de las indicaciones de ejecución de ensayo respectivas de los estados de medición.

10 Por tanto, una indicación de ejecución de ensayo es una indicación de un estado de medición que se basa en la evaluación de al menos dos EIS diferentes. Esto puede ayudar a reducir aún más las posibilidades de identificar los reactivos o componentes del sistema que se encuentran en un estado irregular.

15 Por ejemplo, los al menos dos puntos dados comprenden el quinto punto, comprendiendo además el procedimiento

- llevar a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de ejecución de preparación usando una muestra líquida desprovista de cualquier analito y realizar una tercera EIS en el quinto punto del ciclo de medición, realizándose la

20 - tercera EIS usando el electrodo de trabajo,

- comparar el resultado de la primera EIS obtenida para el quinto punto y la tercera EIS,

25 - proporcionar una indicación de ejecución de preparación del estado de medición que indique si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la tercera EIS obtenida en el quinto punto excede un umbral predefinido, en la que la selección de las contramedidas se realiza además en base a una combinación de las respectivas indicaciones de ejecución de ensayo de los estados de medición y la indicación de ejecución de preparación.

30 La combinación de la EIS obtenida del quinto punto y un punto adicional puede, por tanto, permitir distinguir entre los motivos de un posible fallo de medición de ECL. Por ejemplo, en caso de que

- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, segundo o tercer punto sea positiva,

35 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el quinto punto sea negativa, y

- la indicación de ejecución de preparación obtenida para el quinto punto sea negativa,

40 la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para reemplazar la solución de limpieza actual por una solución de limpieza de una unidad de lote diferente, siendo la unidad de visualización parte del aparato de medición, siendo el aparato de medición parte de la celda de medición, o bien

45 la contramedida seleccionada comprende una limpieza automatizada de componentes del aparato que se usan para realizar la limpieza de la celda de medición y el electrodo de trabajo.

Por tanto, este modo de realización puede permitir identificar irregularidades en la solución de limpieza como una posible causa de un fallo o problema de medición de ECL. En la presente divulgación, esto también se denominará un problema causado por un estado irregular de la solución de limpieza.

50 En otro ejemplo, en caso de que

- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, segundo o tercer punto sea positiva,

55 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el quinto punto sea negativa, y

- la indicación de ejecución de preparación obtenida para el quinto punto sea positiva,

60 la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para reemplazar la muestra líquida actual que contiene el analito por una nueva muestra líquida que contiene el analito, o una solicitud para un suministro automatizado de otra muestra líquida que contiene el analito.

Por tanto, esto puede permitir identificar una muestra con una incubación "mala". La calidad de una muestra puede ser mala, por ejemplo, debido a contaminaciones dentro de la muestra o el analito.

65 De acuerdo con un modo de realización de la invención, el procedimiento comprende además proporcionar una solución de correactante a la celda de medición que, en combinación con el complejo, permite la reacción de electroquimioluminiscencia, en la que se realiza una primera determinación si se cumple un criterio según el cual

- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer o tercer punto es negativa, o

- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el segundo punto es negativa, mientras que al menos otra indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, tercer o quinto punto también es negativa,

5 en la que, en caso de que se determine mediante la primera determinación que se cumple el criterio, la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para limpiar los componentes del aparato que se usan para proporcionar la solución de correactante a la celda de medición, siendo la unidad de visualización parte del aparato de medición, siendo el aparato de medición parte de la celda de medición, o bien

10 la contramedida seleccionada comprende una limpieza automatizada de los componentes del aparato que se usan para proporcionar la solución de correactante a la celda de medición.

15 Por tanto, una solución de correactante contaminada o "mala" se puede identificar de esta manera. A esto también se hace referencia como un problema causado por un estado irregular de la solución de correactante.

20 De acuerdo con un modo de realización, después de que se complete la contramedida, se realiza una repetición posterior inmediata de las etapas b., c. y d. A continuación, se realiza una segunda determinación si se cumple el criterio según el cual

- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer o tercer punto todavía es negativa, o

25 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el segundo punto es negativa, mientras que al menos otra indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, tercer o quinto punto también es negativa,

30 en la que, en caso de que se determine mediante la segunda determinación que se cumple el criterio, la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para limpiar la celda de medición usando una solución alcalina, siendo la unidad de visualización parte del aparato de medición, siendo el aparato de medición parte de la celda de medición, o bien la contramedida seleccionada comprende una limpieza automatizada del flujo de líquido de la celda de medición usando una solución alcalina.

De acuerdo con un modo de realización, en caso de que

35 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, tercer o quinto punto sea positiva,

- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el segundo punto sea negativa,

40 la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para limpiar los componentes del aparato que se usan para el suministro de la muestra líquida que contiene el analito a la celda de medición, siendo el aparato de medición parte de la celda de medición, o bien

45 la contramedida seleccionada comprende una limpieza automatizada de los componentes del aparato que se usan para el suministro de la muestra líquida que contiene el analito a la celda de medición y/o una calibración mecánica del aparato.

50 De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento comprende además comparar dicha segunda EIS en el punto dado, por ejemplo, usado para la primera o segunda determinación, con una segunda EIS respectiva obtenida para el mismo punto dado en una n a última ejecución posterior del ciclo de medición de electroquimioluminiscencia, siendo n una variable entre 1 y 1000, en el que la contramedida seleccionada solo se realiza en caso de que una comparación del resultado de la segunda EIS obtenida para la presente y la n a última ejecución posterior del ciclo de medición de electroquimioluminiscencia dé como resultado una desviación que exceda un primer umbral de envejecimiento predefinido.

55 En general, esto puede permitir asignar las indicaciones de ejecución de ensayo obtenidas a diferentes motivos: un motivo puede ser la aparición espontánea de un error debido a una contaminación de los componentes respectivos del aparato. Otro motivo puede ser que una indicación de ejecución de ensayo negativa puede ser el resultado de un envejecimiento de la celda de medición. El envejecimiento da como resultado una desviación continua de la EIS realmente obtenida a partir de la EIS respectiva obtenida durante el procedimiento de calibración. Cuanto más antigua es la celda de medición, más fuerte puede ser la desviación.

60 Sin embargo, una desviación de la EIS debida al envejecimiento todavía puede ser admisible, mientras que una desviación espontánea es una indicación de un problema que se tiene que atribuir a una fuente diferente al envejecimiento. Por este motivo, no se puede considerar la desviación absoluta de la segunda EIS en el punto dado con respecto a la primera EIS en dicho punto dado (obtenido hace algún tiempo durante un procedimiento de calibración). Por el contrario, la desviación relativa de la segunda EIS entre ellos puede tener una mayor relevancia aquí.

No obstante, considerando también un posible límite de envejecimiento, la contramedida seleccionada solo se puede realizar en caso de que una comparación del resultado de dicha segunda EIS en el punto dado usado para la primera o segunda determinación con una primera EIS respectiva obtenida para el mismo punto dado dé como resultado una desviación por debajo de un segundo umbral de envejecimiento predefinido. Por lo tanto, el segundo umbral de envejecimiento puede ser un umbral relativo a la calibración original de la EIS. Por tanto, en caso de que la celda de medición esté haciéndose demasiado vieja, esto también se puede detectar mediante el procedimiento. En consecuencia, se puede iniciar una contramedida alternativa respectiva al detectar un envejecimiento inaceptable de la celda. La contramedida puede ser la visualización por medio de la unidad de visualización de una instrucción para renovar determinados componentes de la celda de medición que son sensibles al envejecimiento. Dichos componentes pueden comprender ante todo el contador y los electrodos de trabajo.

El envejecimiento de la celda de medición se puede determinar usando cualquier punto dado del ciclo de medición mencionado anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un aparato para realizar un procedimiento de electroquimioluminiscencia para la detección de un analito en una muestra líquida usando una celda de medición, comprendiendo el aparato la celda de medición, comprendiendo la celda de medición un electrodo de trabajo para detectar el analito usando un ciclo de medición de electroquimioluminiscencia, comprendiendo el aparato un procesador y una memoria, comprendiendo la memoria instrucciones ejecutables por ordenador, provocando la ejecución de las instrucciones por el procesador que el aparato:

a. lleve a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de calibración usando una muestra líquida que está desprovista del analito y realice una primera espectroscopia de impedancia electroquímica, EIS, en un punto dado del ciclo de medición, realizándose la primera EIS usando el electrodo de trabajo,

b. lleve a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de análisis usando la muestra líquida que contiene el analito y realice una segunda EIS en el punto dado del ciclo de medición, realizándose la segunda EIS usando el electrodo de trabajo,

c. compare el resultado de la primera EIS y la segunda EIS,

d. proporcione una indicación de un estado de medición que indique si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede un umbral predefinido.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto de programa informático que comprende instrucciones ejecutables por ordenador para realizar el procedimiento descrito anteriormente.

Los modos de realización de la invención pueden ser aplicables a diversos tipos de técnicas de luminiscencia, que incluyen quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia, en particular ECL-BBA.

Por tanto, los modos de realización de la invención pueden permitir detectar *in situ* diversas cuestiones importantes relevantes en los ciclos de medición de quimioluminiscencia: pueden permitir detectar irregularidades en el estado de los reactivos del sistema, la unión indeseada de electrodos de los componentes de incubación, anomalías en el transporte de incubación y celdas de medición envejecidas. En general, una sola medición de la frecuencia a 10 kHz puede ser suficiente para caracterizar el sistema. Dicha medición se puede realizar en una escala de tiempo inferior al segundo. La EIS no perturba el sistema, ya que el voltaje alterno aplicado es muy pequeño. Además, la instrumentación requerida puede ser simple y económica: el FRA de bajo coste se puede integrar en el potencióstato de los sistemas de ECL existentes.

Breve descripción de los dibujos

En lo siguiente se describen con mayor detalle modos de realización de la invención, solo a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos en los que:

la Fig. 1 es un diagrama de bloques de un modo de realización de un sistema de análisis de la invención,

la Fig. 2 es un diagrama de tiempos que ilustra la técnica de ECL-BBA,

la Fig. 3 es un diagrama de flujo que describe la técnica de ECL-BBA,

la Fig. 4 muestra diferentes configuraciones de electrodos usadas para realizar la medición de ECL, la Fig. 4 a) muestra una configuración de dos cables, la Fig. 4 b) una configuración de tres cables y la Fig. 4 c) una configuración de dos cables (configuración de 2 cables) y una configuración de 4 cables (procedimiento de detección de 4 cables),

- la Fig. 5 es una tabla de decisiones que proporciona contramedidas basadas en combinaciones de estados de medición (solución de limpieza (CIS); solución de correctante (CoS); celda de medición (MC)),
- 5 la Fig. 6 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para realizar un procedimiento de ECL con control de EIS (PC = solución de correctante (CoS); CC = solución de limpieza (CIS)),
- la Fig. 7 muestra los resultados de la medición de EIS sobre la admitancia y la fase para ilustrar el efecto de una solución de limpieza contaminada y una solución de limpieza limpia,
- 10 la Fig. 8 muestra los resultados de la medición de EIS sobre la admitancia y la fase para ilustrar el efecto de una solución de correctante contaminada y una solución de correctante limpia,
- la Fig. 9 muestra los resultados de la medición de EIS sobre la admitancia para ilustrar el efecto de un error de pipeteo de la muestra que se va a analizar,
- 15 las Figs. 10 y 11 muestran resultados de medición de EIS que demuestran que es posible identificar estados irregulares de reactivos/componentes tales como solución de limpieza (Fig. 10), solución de correctante (correctante) (Fig. 11) y la celda de medición (MC),
- 20 la Fig. 12 muestra resultados de medición de EIS que ilustran la diferencia entre una incubación que contiene microesferas y una incubación que no contiene microesferas,
- la Fig. 13 muestra datos de admitancia de la EIS que ilustran el envejecimiento de las celdas de medición en la fase i,
- 25 la Fig. 14 muestra datos de admitancia de la EIS que ilustran el envejecimiento de las celdas de medición en la fase iv,
- la Fig. 15 muestra datos de admitancia de la EIS que ilustran el envejecimiento de las celdas de medición en la fase v,
- 30 la Fig. 16 muestra datos de fase de la EIS que ilustran el envejecimiento de las celdas de medición en la fase i,
- la Fig. 17 muestra datos de fase de la EIS que ilustran el envejecimiento de las celdas de medición en la fase iv,
- 35 la Fig. 18 muestra datos de fase de la EIS que ilustran el envejecimiento de las celdas de medición en la fase v,
- la Fig. 19 muestra los resultados de medición de EIS que ilustran, en la fase iv, la diferencia resultante de la succión que no comprende incubaciones y que comprende incubaciones, sin que se aplique prelavado,
- 40 la Fig. 20 muestra los resultados de medición de EIS que ilustran, en la fase v, la diferencia resultante de la succión que no comprende incubaciones y que comprende incubaciones, sin que se aplique prelavado,
- la Fig. 21 muestra los resultados de medición de EIS que ilustran, en la fase iv, la diferencia resultante de la succión que no comprende incubaciones y que comprende incubaciones, con aplicación de prelavado,
- 45 la Fig. 22 muestra los resultados de medición de EIS que ilustran, en la fase v, la diferencia resultante de la succión que no comprende incubaciones y que comprende incubaciones, con aplicación de prelavado,
- 50 la Fig. 23 es ilustrativa de una medición continua de EIS.

Descripción detallada

55 A lo largo de la siguiente descripción de modos de realización de la invención, elementos similares o idénticos se designarán mediante números de referencia idénticos.

La Fig. 1 muestra un sistema de análisis 100 para detectar un analito en una muestra líquida. El sistema de análisis también se designa como el "aparato de medición". El sistema de análisis 100 comprende una incubadora 102 para recibir un líquido 104 que es una mezcla de una parte alícuota de la muestra líquida y un marcador para marcar el analito, tal como un inmunoensayo de luminiscencia.

60

El sistema de análisis 100 comprende un depósito 106 que contiene el correctante de la reacción electroquímica que genera la luminiscencia. La incubadora 102 y el depósito 106 están acoplados a una celda de medición 108 del sistema de análisis mediante un sistema de tuberías 110 a través del cual una parte del líquido 104 y el correctante pueden fluir hasta la celda de medición 108.

65

La celda de medición 108 comprende un cuerpo de celda 112 que tiene un conducto 114 para recibir una parte del líquido 104 y del correactante a través del sistema de tuberías 110. La celda de medición 108 tiene un componente magnético 116, tal como un imán permanente, para proporcionar un campo magnético en la celda de medición. El componente magnético 116 puede estar acoplado a un accionador 118 para hacer girar el componente magnético 116 hacia y desde el conducto 114 para activar o desactivar el campo magnético dentro del conducto.

El componente magnético 116 se sitúa debajo de un electrodo de trabajo 120 que está acoplado a una fuente de voltaje 122. Se forma un área de excitación 124 en el conducto 114 dentro del campo magnético provocado por el componente magnético 116 en el electrodo de trabajo 120.

La luminiscencia que se genera en el área de excitación 124 por la aplicación de energía de excitación, es decir, la aplicación de un impulso de disparo voltaico en el electrodo de trabajo 120, se mide por medio de un sensor óptico, tal como un fotomultiplicador 126. El sensor óptico es sensible dentro de un determinado intervalo de frecuencia, de modo que proporciona una señal de medición a la que puede contribuir una señal interferente, tal como una señal de luminiscencia generada por moléculas autoluminiscentes que pueden estar presentes en la celda de medición, siempre que la luminiscencia esté dentro de intervalo de frecuencia del sensor.

El fotomultiplicador 126 se sitúa opuesto al área de excitación 124 sobre una ventana formada por contraelectrodos 128 del electrodo de trabajo 120 a través de la cual los fotones de luminiscencia y cualquier fotón interferente provocado por la energía de excitación impacta en el fotomultiplicador 126. Se proporciona una señal de medición resuelta en el tiempo resultante 130 desde el fotomultiplicador 126 hasta una unidad de control 132 del sistema de análisis 100.

Después de que se haya realizado una medición, el líquido contenido dentro del conducto 114 se retira a un recipiente de residuos líquidos 134 y la celda de medición 108 se regenera para una adquisición posterior de una señal de medición.

La unidad de control 132 está acoplada a la fuente de voltaje 122 para controlar la fuente de voltaje 122 para aplicar la señal de disparo al electrodo de trabajo 120. La unidad de control 132 también está acoplada al accionador 118 para controlar el accionador 118 para activar y desactivar el campo magnético moviendo el imán permanente como corresponda.

Además, la unidad de control 132 puede estar acoplada a una "unidad de succionador", es decir, una bomba 136, para extraer una parte del líquido 104 de la incubadora 102 y una parte del correactante del depósito 106, así como para retirar el líquido de la celda de medición 108 y para la regeneración de la celda de medición. Además, la unidad de control 132 puede estar acoplada a componentes robóticos adicionales tales como una estación de pipeteo.

La celda de medición 108 se puede adaptar para realizar ECL-BBA usando diversos inmunoensayos de luminiscencia.

Aunque la ECL-BBA se analiza en lo siguiente, este es solo un ejemplo y el experto en la técnica puede extender este ejemplo a otras técnicas de ECL.

Por ejemplo, el líquido 104 puede contener una mezcla de una parte alícuota de la muestra líquida, partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, anticuerpos biotinilados y anticuerpos rutenilados para formar el denominado "sándwich", mientras que el correactante contenido en el depósito 106 es tripropilamina (TPA). De ahí que las partículas magnéticas 138 con un marcador unido fluyan hacia el conducto 114. Las partículas magnéticas 138 se inmovilizan en el electrodo de trabajo 120 cuando se activa el campo magnético. A continuación, el impulso de disparo se aplica sobre el electrodo de trabajo 120 para generar la electroquimioluminiscencia de acuerdo con la técnica de ECL-BBA.

La unidad de control 132 tiene una memoria electrónica 140 para almacenar datos de referencia que describen la extinción de la luminiscencia de una señal de medición válida sin una señal interferente superpuesta. Esos datos de referencia son específicos para el inmunoensayo de luminiscencia que se utiliza para la detección del analito.

En el modo de realización considerado aquí, los datos de referencia se almacenan en una tabla de búsqueda o en una tabla de base de datos. Los datos de referencia comprenden un conjunto de datos de referencia para cada inmunoensayo de luminiscencia soportado por el sistema de análisis 100. Por ejemplo, para cada inmunoensayo soportado se almacenan en la memoria dos coeficientes a y b, así como un tiempo t. Los coeficientes a y b describen una ley lineal que relaciona la amplitud máxima de la señal de luminiscencia con un nivel de luminiscencia alcanzado después del tiempo de extinción t. Almacenar el tiempo de extinción t como parte de los datos de referencia puede resultar superfluo si el tiempo de extinción t considerado es siempre el mismo.

La unidad de control 132 tiene al menos un procesador electrónico 144 para la ejecución de los módulos del programa 146, 148 y 162. El módulo del programa 146 se ejecuta por el procesador 144 para la adquisición de la señal de medición 132, mientras que el módulo del programa 148 se ejecuta por el procesador 144 para la

evaluación de la señal de medición adquirida 132. El módulo del programa 162 se ejecuta por el procesador 144 para la adquisición de datos de EIS.

5 La unidad de control 132 tiene una interfaz 150 para acoplar una unidad de visualización (o pantalla) 152 u otra interfaz hombre-máquina a la unidad de control 132. La interfaz 150 se puede implementar como una interfaz gráfica de usuario para visualizar una ventana 154 para la selección de un usuario de uno de los inmunoensayos de luminiscencia soportados por el sistema de análisis 100, así como una ventana 156 para visualizar un resultado del análisis.

10 El resultado del análisis realizado por el sistema de análisis 100 se puede generar como datos tabulares con una columna que indica el analito que se va a detectar y otra columna que indica la concentración del analito que se ha detectado. Otra columna puede servir para indicar si la concentración detectada puede ser errónea, tal como mostrando una bandera u otra señal o símbolo de advertencia, tal como un signo de interrogación o exclamación en rojo.

15 En lo siguiente, la técnica de ECL-BBA se describirá en combinación con las figuras 1, 2 y 3. La figura 2 es un diagrama de tiempos que muestra las diferentes fases de ECL-BBA y la figura 3 es un diagrama de flujo respectivo.

20 El procedimiento se inicia en el bloque 300 (fase i), que es una fase de acondicionamiento en la que se aplica un potencial de CC con determinados impulsos de voltaje. La línea continua 200 en la figura 2 es el perfil del potencial aplicado en el electrodo de trabajo (WE, 120) con respecto al electrodo de referencia (RE, 128). El acondicionamiento tiene el propósito de preparar el electrodo de trabajo para las mediciones posteriores: el acondicionamiento se usa para asegurar que el electrodo tenga un estado de superficie conocido al inicio de las mediciones posteriores.

25 En funcionamiento, un usuario selecciona uno de los inmunoensayos de luminiscencia soportados por el sistema de análisis 100 introduciendo una selección respectiva en la ventana 154. El análisis de la muestra líquida se inicia mediante la ejecución del módulo del programa 146, de modo que la bomba 136 se controla para transportar una parte del líquido 104 y del correctante al conducto 114. La línea 202 en la figura 2 designa el movimiento de cualquier líquido transportado por medio de la bomba 136 dentro y fuera de la celda de medición 108. De hecho, la línea discontinua 202 es el movimiento del pistón del diluidor de la bomba 136 que mueve el líquido a través de la celda.

30 A continuación, el accionador 118 se controla para voltear el imán permanente a una posición tal que su campo magnético se aplique al conducto 114 para la inmovilización, es decir, la captura de las partículas magnéticas con sus marcadores unidos en el electrodo de trabajo 120. El procedimiento de transporte del líquido y la captura de las partículas magnéticas se designa con el bloque 302 y corresponde a la fase ii en la figura 2.

35 A continuación, en el bloque 306 (fase iv), la fuente de voltaje 122 se controla para aplicar el impulso de disparo sobre el electrodo de trabajo para la excitación de la luminiscencia de modo que se produzca la señal de medición 130.

40 La señal de medición 130 se adquiere muestreando la salida del fotomultiplicador 126 a lo largo de un periodo de tiempo dado, tal como 2 segundos después de la aplicación del impulso de disparo por la fuente de voltaje 122, para la medición de la luminiscencia resuelta en el tiempo.

45 Las muestras de datos que constituyen la señal de medición 130 se almacenan en la memoria 140 de la unidad de control 132 y el módulo del programa 148 se inicia para la evaluación de la señal de medición adquirida 130. Mediante la ejecución del módulo de programa 148 se determina la amplitud de la señal de medición 130. A continuación, el módulo del programa 148 realiza un acceso de lectura a los datos de referencia 142 leyendo los coeficientes a y b del inmunoensayo seleccionado por el usuario, así como el tiempo t.

50 Mediante la ley lineal descrita por a y b, se calcula el nivel de señal esperado alcanzado por la señal de medición 130 después del tiempo t y se compara con el nivel de señal real de la señal de medición 130 después de ese tiempo t. En caso de un desajuste, es decir, si el nivel de señal real de la señal de medición 130 está en un margen predefinido por debajo o por encima del nivel de señal esperado, se detecta un desajuste y, por tanto, la presencia de una señal interferente superpuesta.

55 A continuación, la concentración del analito, si la hay, en el líquido se determina mediante el módulo del programa 148 por medio de la señal de medición 130 y la concentración determinada se marca mediante una señal de error si se ha detectado el desajuste.

60 A continuación, en el bloque 308 (fase v), la bomba 136 se controla mediante la unidad de control 132 para retirar el líquido del conducto 114 y para la regeneración de la celda de medición 108.

65

Se puede realizar un etapa de lavado opcional (bloque 304 y fase iii) entre la captura (bloque 302) y la medición (bloque 306) para garantizar que se retire la sustancia marcadora unida a las micropartículas magnéticas que aún no están unidas al imán antes de realizar la medición de ECL en el bloque 306.

5 Para proporcionar la posibilidad de determinar *in situ*, es decir, sin interrumpir o perturbar la detección de la concentración de analito descrita anteriormente (ECL), la fiabilidad de la detección del analito, el aparato de medición 100 está adaptado además para realizar espectroscopia de impedancia electroquímica, EIS. La EIS se realiza usando la fuente de voltaje 122 y el contraelectrodo 120. Por tanto, el procesador electrónico 144 está adaptado además para la ejecución del módulo del programa 162 para la adquisición de señales de EIS. Para ese propósito, la fuente de voltaje 122 se controla para superponer una señal de corriente CA sobre la señal de CC que se usa para realizar la medición de ECL como se describe anteriormente.

15 Los espectros de EIS se pueden adquirir en puntos dados del ciclo de medición analizado anteriormente y representado en la figura 2. Para ese propósito, el ciclo de medición se lleva a cabo en primer lugar en un procedimiento de calibración usando una muestra líquida desprovista del analito. En este procedimiento de calibración se realiza una primera EIS en un punto dado del ciclo de medición usando el electrodo de trabajo. Los ejemplos de dicho punto dado se representan en la figura 2 mediante flechas. La primera EIS se almacena entonces en la memoria 140 como el primer dato de EIS 160.

20 Durante el ciclo de medición en un procedimiento de análisis usando la muestra líquida que contiene el analito, se realiza una segunda EIS adicional en dicho punto dado. Esto da como resultado segundos datos de EIS 164 que se almacenan en la memoria. A continuación, se compara el resultado de la primera EIS y de la segunda EIS y se proporciona una indicación de un estado de medición que indica si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede un umbral predefinido.

25 Por ejemplo, el estado de medición se proporciona como una salida gráfica en la pantalla 152. La unidad de control 132 se puede adaptar además para seleccionar automáticamente en consecuencia una contramedida para corregir un fallo del sistema de análisis 100. Después del inicio de la contramedida, el ciclo de medición se repite en el procedimiento de análisis y se realiza otra segunda EIS en el punto dado para verificar si la contramedida tuvo éxito y si el resultado de la medición de ECL es fiable o no.

30 La figura 4 muestra dos configuraciones de electrodo diferentes usadas para realizar la medición de ECL. El electrodo de trabajo (WE 120) es la designación para el electrodo en el que tienen lugar las reacciones electroquímicas y de ECL de interés. El contador o electrodo auxiliar (CE 128) es el electrodo en la celda que completa la vía de la corriente. Ambos electrodos se fabrican comúnmente con un material conductor inerte, tal como oro, platino, carbono vítreo, iridio, diamante dopado con boro o cualquier otro material que sea eficaz para este propósito.

35 Cualquier celda electroquímica debe tener al menos un par WE-CE para su funcionamiento. En esta configuración mínima de 2 electrodos, los terminales de WE y CE se conectan a la unidad de control de potencial. Es conocido por un experto en la técnica que, en una configuración de 2 electrodos (configuración de 2 cables mostrada en la Fig. 4 c), el voltaje de la celda puede ser bastante diferente del voltaje de estimulación U_{estim} y es al menos una función de la corriente de la celda y la resistencia del cable, que no se solicita. En la siguiente tabla se muestra un cálculo para una configuración de dos electrodos:

45

U_{estim}	U_{celda}	Configuración de 2 electrodos
20 mV	15 mV	$R_{cable} = 50 \Omega,$ $i = 50 \mu A,$ $2 \cdot iR = 5 mV$
10 mV	5 mV	
5 mV	0 mV (!)	

50 Para mediciones de alta precisión se utiliza el procedimiento de detección de 4 cables. Aquí, se usan pares separados de electrodos de detección de voltaje y de transporte de corriente como se muestra en la figura 4a: S1 y S2 se usan para el control y medición del potencial de WE y CE, respectivamente. P1 y P2 se usan para el control y la medición de la corriente que fluye a través de los electrodos respectivos. La separación de los electrodos de corriente y de voltaje elimina la resistencia del contacto y del cable de la medición, lo que permite, por tanto, una mayor exactitud.

55 Más comúnmente, se introduce un tercer electrodo adicional que sirve como electrodo de referencia (RE). Esta configuración de tres electrodos se muestra en la figura 4b: el RE proporciona un potencial de referencia al que se refiere el voltaje aplicado V_0 del electrodo de trabajo. En la configuración de tres electrodos, a través del RE fluye una corriente muy baja o, idealmente, nula. El RE mantiene un potencial estable. Los RE típicos son el electrodo de plata/cloruro de plata, calomelano saturado, mercurio/óxido de mercurio (mercurioso), mercurio/sulfato de mercurio o

cobre/sulfato de cobre. Además, se puede usar un electrodo de seudorreferencia fabricado en platino, oro, acero inoxidable u otro material. Sin embargo, estos pueden proporcionar un potencial de referencia menos estable.

5 Como se divulga anteriormente, para mediciones de alta precisión, el procedimiento de detección de 4 cables se usa para la medición de EIS. El procedimiento de detección de 4 cables compensa la caída de iR en el electrodo de trabajo y en el contraelectrodo mediante 2 electrodos adicionales (configuración de 4 cables con el cable de detección 1 y el cable de detección 2 en la figura 4 c) para la medición de EIS (compensación de iR). El procedimiento de detección de 4 cables elimina caídas de potencial $iR (= i \cdot R_{\text{cable}})$ en los cables de medición. En el procedimiento de detección de 4 cables se esperan respuestas de CA muy bajas al aplicar amplitudes sinusoidales muy bajas de alrededor de 10 mVpp como voltaje de la celda U_{celda} . Una resistencia R_{cable} en un cable de medición puede disminuir significativamente el voltaje de la celda. En el procedimiento de detección de 4 cables, el potencial de onda sinusoidal aplicado es igual al potencial de la celda, porque las caídas de potencial se eliminan mediante los cables de detección.

15 La figura 5 muestra una tabla de decisiones que proporciona contramedidas basadas en combinaciones de estados de medición. El diagrama de flujo de la figura 6 ilustra un procedimiento que da lugar a las decisiones de la figura 5. El diagrama de flujo de la figura 6 y la tabla de decisiones de la figura 5 se basan en el supuesto de que, para al menos dos de las fases i.-v. mencionadas anteriormente, se realizó una medición de EIS.

20 Por ejemplo, para cualquier punto dado en cualquiera de las fases que se indica mediante una flecha en la figura 2, se realizó una primera EIS en un procedimiento de calibración al llevar a cabo el ciclo de medición. El procedimiento de calibración asume, en general, que el resultado de la primera EIS respectiva es representativo de un sistema que se comporta como se desea. Posteriormente, en un ciclo de medición "real" posterior en un procedimiento de análisis usando la muestra líquida que contiene el analito, se realiza una segunda EIS en el mismo punto dado. A continuación se compara la primera EIS (calibración) y la segunda EIS (muestra real) y se determina un estado de medición que indica si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede un umbral predefinido.

30 Preferentemente, los estados de medición resultantes de más de un punto dado y, por tanto, más de dos segundas EIS, se usan para determinar la fiabilidad de la medición de ECL realizada durante el ciclo de medición del procedimiento de análisis.

35 Para ajustar aún más el procedimiento, por ejemplo para el punto dado en la fase v. (limpieza de la celda de medición), es posible distinguir entre una indicación de ejecución de preparación y una indicación de ejecución de ensayo. En aras de una terminología simple, la indicación de ejecución de ensayo es idéntica al estado de medición obtenido como se describe anteriormente en una medición de EIS que usa una muestra líquida real. La indicación de ejecución de ensayo se puede definir como positiva en caso de que la comparación dé como resultado que una desviación entre las EIS comparadas está dentro del umbral predefinido y como negativa en caso de que la comparación dé como resultado que una desviación entre las EIS comparadas está fuera del umbral predefinido.

40 Por el contrario, una indicación de ejecución de preparación es idéntica al estado de medición obtenido como se describe anteriormente en una medición de EIS, sin embargo, con una muestra líquida que está desprovista de cualquier analito. Por tanto, para obtener la indicación de ejecución de preparación para un punto dado, se realiza una tercera EIS mientras se lleva a cabo el ciclo de medición usando una muestra líquida que está desprovista de cualquier analito. A continuación, esta tercera EIS se compara con la primera EIS obtenida para el mismo punto dado y se determina un estado de medición que indica si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la tercera EIS excede un umbral predefinido. Nuevamente, la indicación de ejecución de preparación se puede definir como positiva en caso de que la comparación dé como resultado que una desviación entre la primera y la tercera EIS comparadas está dentro del umbral predefinido y como negativa en caso de que la comparación dé como resultado que una desviación entre la primera y la tercera EIS comparadas está fuera del umbral predefinido.

55 La variable "Y" del diagrama de flujo de la figura 6 es, de este modo, el estado de medición. Los índices a, b y d son representativos de los puntos dados indicados por las flechas en la figura 2 para la fase i, ii, v, respectivamente. El índice c es representativo del punto dado indicado por la flecha en la fase iii. de la figura 2, o bien por la flecha en la fase iv.

60 El procedimiento comienza en el bloque 500 con la adquisición de EIS. Cabe señalar que en las figuras 5 y 6 se usa la adquisición de la segunda EIS en cuatro fases y la adquisición de una tercera EIS en la fase v. Sin embargo, también es posible reducir el número de EIS segunda y tercera usadas, lo que, sin embargo, puede tener la desventaja de que las mediciones de ECL problemáticas o propensas a errores pueden no ser asignables con exactitud a un determinado motivo.

65 Después de la adquisición de la EIS en el bloque 500, se verifica en el bloque 502 si la indicación de ejecución de ensayo "Ya" obtenida para el primer punto (flecha en la fase i.) es positiva. Esto indicaría que la comparación de la

primera EIS de calibración obtenida para dicho punto y la segunda EIS obtenida para dicho punto no se desvían entre sí en un valor que exceda un umbral predefinido.

En caso de que la indicación de ejecución de ensayo para el punto 1 sea negativa, esto se puede atribuir a diferentes motivos. Un motivo puede ser un envejecimiento de la celda de medición o una contaminación de la celda de medición o de los reactivos o componentes del sistema implicados, tales como la solución de correactante, la solución de limpieza y la celda de medición. El envejecimiento de la celda de medición degrada continuamente el rendimiento del ensayo de ECL, mientras que la contaminación típicamente da como resultado un cambio espontáneo del comportamiento del ensayo de ECL.

Para distinguir entre el envejecimiento y la contaminación de la celda de medición, el procedimiento continúa con el bloque 522 y la determinación de cómo, para el mismo punto dado, la segunda EIS actual se desvía de la segunda EIS obtenida de una medición previa. Por tanto, la segunda EIS en el punto dado se compara con una segunda EIS respectiva obtenida para el mismo punto dado en una n a última ejecución posterior del ciclo de medición de electroquimioluminiscencia, siendo n una variable entre 1 y 1000. En caso de que la desviación Δy_a de la presente EIS respecto a la EIS anterior exceda un umbral de envejecimiento predefinido "x", esto se puede atribuir a una contaminación del sistema. Esto se puede entender como un "salto repentino" de la curva de EIS obtenida para la ejecución de la medición actual en comparación con una ejecución de medición anterior.

Por el contrario, en caso de que la desviación Δy_a esté por debajo del umbral de envejecimiento, esto se puede atribuir a un envejecimiento continuo de la celda de medición. En el último caso, se puede determinar en el bloque 530 si el valor absoluto "ya" de la diferencia entre la primera y la segunda EIS para dicho punto excede un valor absoluto de envejecimiento "abs". Si este es el caso, en el bloque 530 el sistema puede proporcionar información, por ejemplo, usando la pantalla 152, de que la celda de medición se debe cambiar debido a motivos de envejecimiento. De forma más simplificada, puede aparecer un mensaje "llamar al servicio técnico".

Sin embargo, en caso de que en el bloque 530 se determine que el valor absoluto "ya" de la diferencia entre la primera y la segunda EIS para dicho punto no excede un valor absoluto de envejecimiento absoluto, el procedimiento continúa con el bloque 504 que se analizará a continuación.

En caso de que en el bloque 522 se determine que la desviación Δy_a de la EIS actual respecto a la EIS anterior excede un umbral de envejecimiento predefinido "x", el procedimiento continúa con el bloque 524, 526 o 528. El bloque 524 se elige en caso de que dicha desviación se produzca por primera vez, el bloque 526 se elige en caso de que dicha desviación se produzca por segunda vez y el bloque 528 se elige en caso de que dicha desviación se produzca por tercera vez. Por este motivo, se verifica la presencia de una bandera: en caso de que no se asocie una bandera con la segunda EIS para el punto dado (o la bandera sea 1), se elegirá el bloque 524. En caso de que se establezca la bandera (o la bandera sea 2), se elegirá el bloque 526, etc.

La selección de los bloques 524, 526 y 528 corresponde a la puesta en marcha preferentemente automatizada de contramedidas. Por ejemplo, en el bloque 524, se establece la bandera (o se incrementa de 1 a 2) y se puede generar un mensaje por medio de la pantalla que indica que se debe limpiar el vaso que contiene la solución de correactante y la boquilla del succionador usada para obtener la solución de correactante desde su depósito. Además, el mensaje puede recomendar cambiar el lote actual de la solución de correactante. En otro ejemplo, dicha limpieza y dicho cambio se pueden iniciar y realizar automáticamente por el sistema. El bloque 524 corresponde a la tercera línea en la tabla de decisiones de la figura 5. Después de completar el bloque 524, el procedimiento se reinicia con el bloque 500.

En el bloque 526, la bandera se incrementa de 1 a 2 o de 2 a 3 y se puede generar un mensaje por medio de la pantalla que indica que se tiene que realizar una limpieza del flujo de líquido (LFC) del sistema. La limpieza del flujo de líquido se produce cuando esta función se inicia desde la pantalla de servicio del instrumento. Durante la LFC, se aspira una solución de hipoclorito de sodio para la limpieza de las celdas de medición y la vía de flujo. En otro ejemplo, dicha LFC se puede iniciar y realizar automáticamente por el sistema. Además, se puede iniciar un cambio preferentemente automatizado de la celda de medición (MC). El bloque 524 corresponde a la cuarta línea en la tabla de decisiones de la figura 5. Después de completar el bloque 524, el procedimiento se reinicia con el bloque 500.

Conviene señalar que la bandera se puede realizar por cualquier procedimiento conocido que permita distinguir entre la primera, segunda o tercera vez que $\Delta y_a > x$ se produce de manera sucesiva.

En el bloque 528 se puede proporcionar información de que el sistema tiene un mal funcionamiento no definido. De forma más simplificada, puede aparecer un mensaje "llamar al servicio técnico". Aquí, el sistema se detendrá y el procedimiento finalizará.

En caso de que en el bloque 502 se haya determinado que "Ya" estaba bien, es decir, que la indicación de ejecución de ensayo era positiva, el procedimiento continúa con el bloque 504 y la determinación de si la indicación de ejecución de ensayo para "Yb" es positiva o no. "Yb" es el resultado de la EIS obtenida durante o al final del suministro de la muestra líquida a la celda de medición y la captura de micropartículas magnéticas. Por tanto,

dependiendo de si la fase opcional iii. está presente, "Yb" se puede obtener en el punto dado indicado por la flecha en la fase ii. o fase iv. En caso de que la indicación de ejecución de ensayo sea negativa, el procedimiento distinguiría entre la primera y la segunda vez que se produce este problema. Para este propósito, la indicación de ejecución de ensayo usa nuevamente una bandera respectiva, como se analizó con respecto a "Ya".

En caso de que el problema se produzca por primera vez, en el bloque 518 esto se puede atribuir a un problema con el analito. Por ejemplo, el analito puede comprender burbujas de aire o puede estar contaminado. Como contramedida, se puede generar un mensaje por medio de la pantalla de que se tiene que verificar la calidad de la muestra. Además, se establece la bandera (o se incrementa en número). En otro ejemplo, el sistema puede obtener automáticamente una nueva muestra líquida con el mismo analito. El bloque 518 corresponde a la última línea en la tabla de decisiones de la figura 5. Después de completar el bloque 518, el procedimiento se reinicia con el bloque 500.

En caso de que dicho problema se produzca por segunda vez, el bloque 504 va seguido de inmediato del bloque 512 que corresponde al bloque 528.

En caso de que resultara que en el bloque 504 "Yb" estaba bien, el procedimiento continuaría con el bloque opcional 506. En el bloque 506 se determina si la indicación de ejecución de ensayo para "Yc" (obtenida en el punto dado indicado con la flecha en la fase iii.) es positiva o no. "Yc" es el resultado de la EIS obtenida durante la fase de lavado de la celda de medición después de la captura y antes de la medición de electroquimioluminiscencia. En caso de que "Yc" sea negativo, esto puede dar como resultado de inmediato la ejecución del bloque 512. La decisión con respecto a "Yc" no se refleja en la tabla de decisiones de la figura 5, puesto que la etapa de limpieza en la fase iii. es opcional.

En caso de que "Yc" sea positivo o directamente después del bloque 504 ("Yb" está bien), el procedimiento continúa con el bloque 508 y la determinación de si la indicación de ejecución de ensayo para "Yd" es positiva o no. "Yd" es el resultado de la EIS obtenida durante la fase v., es decir, durante la limpieza de la celda de medición con el electrodo de trabajo con una solución de limpieza. En caso de que "Yd" esté bien, el procedimiento termina con el bloque 520 y la determinación de que la medición de ECL es fiable.

Sin embargo, en el caso de que "Yd" no esté bien, el bloque 510 que sigue al bloque 508 determina si el "Yd" actual es el resultado de una ejecución de ensayo o una ejecución de preparación del ciclo de medición. En caso de que sea el resultado de una ejecución de medición, se genera un mensaje de acuerdo con el cual se debe verificar la calidad de la muestra. El sistema puede continuar automáticamente con el siguiente bloque 500 en la ejecución de preparación, es decir, en una ejecución del ciclo de medición con una muestra líquida que está desprovista de cualquier analito.

En caso de que el procedimiento llegue nuevamente al bloque 510, el procedimiento continúa con el bloque 514 en caso de que la ejecución de preparación se realice por primera vez, o bien con el bloque 512 en caso de que la ejecución de preparación se realice por segunda vez. La primera y la segunda vez se pueden verificar por medio de una bandera correspondiente como se describe anteriormente.

El bloque 514 correspondiente a la primera línea en la tabla de decisiones de la figura 5 puede generar un mensaje de acuerdo con el cual se debe limpiar el vaso de solución de limpieza, un depósito en el instrumento en el que se dispensa la solución de limpieza y la boquilla usada para transportar la solución de limpieza hasta la celda de medición y cambiar el lote de solución de limpieza usado actualmente por uno nuevo. De forma alternativa o adicionalmente, la limpieza y el cambio se pueden realizar automáticamente. Después del bloque 514, el procedimiento continúa con el bloque 500.

Aunque en el análisis con respecto a la figura 6 el envejecimiento solo se consideró con respecto a la fase i, el experto en la técnica comprenderá que este principio se puede aplicar en consecuencia a cualquiera de los puntos dados del ciclo de medición.

La figura 7 muestra los resultados de la medición de EIS sobre la admitancia y la fase para ilustrar el efecto de una solución de limpieza contaminada y una solución de limpieza limpia. Para estudiar el efecto de una solución de limpieza en un estado irregular, se midió el ensayo de partículas de estreptavidina (SAP) (n=5) con una solución de limpieza contaminada y se comparó con los resultados del ensayo de SAP con una solución de limpieza sin defectos. Las mediciones de EIS se realizaron en los puntos indicados en la figura 2 para las fases i, iv y v. En el presente documento, la fase i se designa como "Con I", la fase iv se designa como "Con II y C" y la fase v se designa como "Limpieza". Además, (+) significa que la solución de limpieza estaba limpia, mientras que (-) significa que la solución de limpieza estaba contaminada. Las mediciones de EIS se realizaron a 0 Hz, 100 Hz, 300 Hz y 1000 Hz.

Se puede ver claramente que una solución de limpieza contaminada se puede identificar fácilmente en la fase v. Aquí, una fuerte desviación (> 1 DE) entre la EIS obtenida como datos de calibración (líneas rectas) y la EIS obtenida para la medición en la solución de limpieza contaminada (líneas discontinuas) ya es visible en admitancia a

100 Hz. Además, la desviación estándar obtenida para los puntos de medición en la fase v está muy por debajo de la desviación entre la curva de calibración y la curva de medición obtenida para la solución de limpieza contaminada. Esto muestra que una solución de limpieza inadecuada se puede detectar e identificar fácilmente como tal.

5 La figura 8 muestra los resultados de la medición de EIS sobre la admitancia y la fase para ilustrar el efecto de una solución de correctante contaminada y una solución de correctante limpia. Para estudiar el efecto de una solución de correctante en un estado irregular, se midió el ensayo de partículas de estreptavidina (SAP) (n=5) con una solución de correctante errónea y se comparó con los resultados del ensayo de SAP con una solución de correctante sin defectos. Las mediciones de EIS se realizaron nuevamente en los puntos indicados en la figura 2 para las fases i, iv y v. En el presente documento, la fase i se designa como "Con I", la fase iv se designa como "Con II y C" y la fase v se designa como "Limpieza". Además, (+) significa que la solución de correctante estaba limpia, mientras que (-) significa que la solución de correctante estaba contaminada. Las mediciones de EIS se realizaron a 0 Hz, 100 Hz, 300 Hz y 1000 Hz. Las líneas discontinuas corresponden a los datos de calibración, las líneas rectas a los datos de medición en la solución de correctante contaminada.

15 Se puede ver claramente que una solución de correctante contaminada se puede identificar fácilmente en las tres fases. Se observó un cambio significativo ($>> 1$ DE) en la admitancia, así como en la fase en todas las etapas, y esto permite una clara discriminación entre la solución de correctante errónea y la solución de correctante sin defectos. El cambio es significativo a todas las frecuencias considerando la admitancia. Teniendo en cuenta la fase, se observa una mejor discriminación para frecuencias mayores que ~100 Hz. En general, las desviaciones son máximas en Con I (fase i), aunque todavía son visibles en Limpieza (fase v).

20 La figura 9 muestra los resultados de la medición de EIS sobre la admitancia para ilustrar el efecto de un error de pipeteo de la muestra que se va a analizar. Debido al error de pipeteo, se pipetea aire y se transfiere a la celda de medición. En la fase ii, esto da como resultado una desviación significativa entre la admitancia obtenida para la calibración de EIS (IncTrans) y la EIS obtenida en la muestra con el error de pipeteo (IncTrans air). El resultado es un cambio de un 700 % en la admitancia y un cambio de un 60 % en la fase debido a la presencia de aire. Por tanto, se puede detectar un fallo en el pipeteo o la succión de la incubación.

25 En lo siguiente se proporciona una descripción detallada de las mediciones de EIS. Todos los experimentos se llevaron a cabo usando una placa de pruebas Roche Elecsys®. Este es un sistema Elecsys altamente flexible para propósitos de desarrollo y comparable a un Elecsys® 1010 o 2010. Para este estudio, la placa de pruebas se equipó con un potenciostato SP-300 de Bio-Logic Science Instruments SAS, Francia. El SP-300 es un potenciostato de grado de investigación modular de última generación con un analizador de respuesta de frecuencia (FRA) incorporado. Los experimentos se llevaron a cabo en general con celdas de medición Elecsys estándar en la configuración convencional de 3 electrodos que usa un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. Todos los perfiles de potencial, y de acuerdo con las mediciones de EIS, se programaron usando el paquete de programa informático EC-lab. Se estableció comunicación entre el potenciostato y el analizador Elecsys usando el canal incorporado de "disparo" del potenciostato. El analizador Elecsys pudo controlar, por tanto, el potenciostato enviando impulsos TTL en los puntos de tiempo deseados.

30 Las mediciones se llevaron a cabo usando un inmunoensayo artificial (SAP), un ensayo que incluye micropartículas marcadas con RuBpy para una señal de ECL específica alta. Los protocolos para los ensayos mencionados a continuación se tomaron como las recomendaciones para Roche Elecsys® 2010, con ligeras adaptaciones en los volúmenes. El volumen de la suspensión de microesferas fue de 35 µl, el volumen del conjugado RuBpy libre fue de 15 µl, el volumen del tampón de microesferas fue de 150 µl y el volumen de la muestra fue de 0 µl.

35 Las figuras 10 y 11 muestran los resultados de medición de EIS que demuestran que es posible identificar reactivos/componentes del sistema erróneos, tal como la solución de correctante, la solución de limpieza y la celda de medición. Esto requiere una alta reproducibilidad de los resultados de EIS para las mediciones del sistema no contaminado. Para hacerlo, el analizador estaba equipado con una celda de medición intacta y lotes sin defectos de solución de limpieza y solución de correctante.

40 Para considerar también la fluctuación que se podría originar a partir de diferentes lotes de solución de correctante y solución de limpieza, este experimento se repitió con 3 lotes de solución de limpieza y solución de correctante, respectivamente, y con n=5 determinaciones de ensayo de partículas de estreptavidina (SAP) cada una. En otras palabras, para un punto dado, la EIS se adquirió 5 veces por lote y esto se repitió tres veces para diferentes lotes. La precisión se determinó calculando el CV (proporción de desviación estándar y valor medio en porcentaje) en todas las diferentes ejecuciones y determinaciones. Se informa de los resultados en las figuras 10 y 11. La figura 10 muestra una variación de los lotes de solución de limpieza y la figura 11 muestra una variación de los lotes de solución de correctante. Como se puede ver en estas figuras, el CV normalmente está muy por debajo de un 1 %, lo que demuestra la alta reproducibilidad del procedimiento.

45 Nuevamente, "Limpieza" representa la EIS obtenida en la fase v, "Con I" representa la EIS obtenida para la fase i y "Con II y C" representa la fase iv como se describe anteriormente.

Para determinar el efecto de las "microesferas" de nanopartículas magnéticas, se midió el ensayo de partículas de estreptavidina (SAP) (n=5) y se comparó con un ensayo en el que todos los reactivos del SAP se reemplazaron por una solución de correactante (CoS). Básicamente, aquí se comparan dos situaciones: en el primer caso, la incubación contiene microesferas magnéticas que se capturan y depositan sobre el electrodo. En el segundo caso, la incubación no contiene microesferas y el electrodo permanece libre después del procedimiento de captura. En consecuencia, solo se espera un cambio en la admitancia después de la etapa "Con II y C".

De hecho, se observan cambios significativos de la desviación estándar ($\gg 1$ DE) en la admitancia de la etapa "Con II y C" (fase iv) a frecuencias >100 Hz, como se informa en la figura 12. También se observan cambios similares en la fase (con menor importancia debido a un error mayor). No obstante, la medición proporciona por tanto un medio para discriminar entre una incubación que contiene microesferas y una incubación que no contiene microesferas.

El envejecimiento de la celda de medición puede provocar la pérdida de rendimiento del ensayo Elecsys y, por lo tanto, los técnicos de servicio lo monitorizan cuidadosamente usando una verificación del rendimiento del ensayo. Sin embargo, la edad de la celda también se puede monitorizar usando EIS como se muestra en el ejemplo de la figura 13. Para una mejor visibilidad, los resultados se representan gráficamente aquí en un diagrama de barras (en contraste con los gráficos de curvas que se muestran en las figuras previas). Aquí, los espectros de EIS de dos celdas de medición nuevas "nueva 1" y "nueva 2" se comparan con los de dos celdas de medición significativamente envejecidas "vieja 1" y "vieja 2". Obviamente, las celdas nuevas y viejas se pueden distinguir claramente en cuanto a la admitancia. Los cambios son más significativos para frecuencias ≥ 300 Hz. En la figura 13 se muestran los resultados de EIS para la fase i. En la figura 14 se representan los resultados para la fase iv y en la figura 15 los resultados para la fase v.

Además, la fase muestra una clara discriminación entre las celdas de medición viejas y nuevas. Los cambios son más significativos para frecuencias ≤ 1000 Hz para la fase i y fase v y 10 kHz para la fase iv, comparando las figuras 16, 17 y 180. Cabe señalar que el cambio por envejecimiento de la celda es gradual y, por lo tanto, se puede distinguir de los procedimientos no relacionados con el envejecimiento que provocan cambios en escalas de tiempo cortas.

En lo siguiente se estudia el efecto de los componentes de la muestra. Se usa un procedimiento de prelavado "PW" para retirar cualquier anticuerpo biotinilado libre o componentes del suero de la incubación que podrían interferir en la medición. Durante el prelavado, las microesferas de estreptavidina se separan del tampón usando un separador de micropartículas magnéticas. Posteriormente, las microesferas se lavan con solución tampón (PreClean) y se reconstituyen a su volumen original. Se investigó el efecto del tipo de muestra (que forma parte de la incubación) sobre el espectro de EIS. Para hacer esto, se usó el ensayo de partículas de estreptavidina (SAP) y se incluyeron 50 μ l de muestra. El volumen de la suspensión de microesferas fue de 35 μ l, el volumen del conjugado RuBpy libre fue de 15 μ l, el volumen del tampón de microesferas fue de 150 μ l y el volumen de la muestra fue de 50 μ l.

Se usaron sueros diferentes para modelar diferentes tipos de muestras y se investigó su efecto sobre los espectros de EIS. En los analizadores Elecsys de bajo rendimiento comunes, tales como e411 o e2010, los componentes de muestra pueden entrar en contacto con el electrodo durante el transporte de la incubación. Esto normalmente da lugar a una adsorción específica del suero de proteínas a la superficie del electrodo. Si se compara una incubación libre de suero (donde la muestra se reemplaza por tampón) con las incubaciones que contienen suero, se observan claras diferencias en los espectros de EIS analizados en las figuras 19 y 20. No se aplicó prelavado aquí. La incubación que contiene suero da lugar a una disminución de la admitancia en la etapa "Con II y C" (fase iv) a frecuencias >130 Hz con respecto a la incubación libre de suero. Por otra parte, se observa un fuerte incremento de la admitancia para la incubación que contiene suero en la etapa de limpieza (fase v).

En consecuencia, la EIS se puede usar para monitorizar el pipeteo de la muestra. Si no se pipetea ninguna muestra, la incubación está libre de componentes del suero y no se espera adsorción en el electrodo. Dicho evento se puede detectar fácilmente por el procedimiento de EIS como una "incubación anómala" y se puede enviar una advertencia al operario y/o se pueden iniciar automáticamente las contramedidas respectivas.

Por otra parte, los analizadores de alto rendimiento, tales como e170, e601, e602 y e801, hacen uso de la llamada función de prelavado. Durante el prelavado, las microesferas magnéticas se capturan magnéticamente en la pared del recipiente. Posteriormente, la incubación que contiene reactivos de ensayo y suero se retira y se sustituye por solución tampón. Esta "incubación con prelavado" no contiene componentes del suero. Por tanto, no se esperan diferencias entre los diferentes tipos de muestra cuando se consideran los espectros de EIS después de la etapa "Con II y C" (fase iv) o la etapa de limpieza (fase v). Esto se puede observar fácilmente en las figuras 21 y 22, donde se comparan los sueros a-d prelavados.

La figura 23 es un espectro de EIS que se espera como resultado de una medición continua durante todo el ciclo de medición de la figura 2 a una frecuencia única de 1000 Hz. El resultado de la medición de la admitancia de dicha EIS continua se muestra en la figura 26. La línea inferior corresponde a un ciclo de medición en el que se usó una solución de correactante sin defectos, mientras que la línea superior corresponde a un ciclo de medición en el que

se usó solución de correctante en un estado irregular. Un desplazamiento de la admitancia global a valores mayores se puede observar fácilmente en ese caso.

5 Como apreciará un experto en la técnica, los aspectos de la presente invención se pueden realizar como un aparato, un procedimiento o un producto de programa informático. En consecuencia, los aspectos de la presente invención pueden tomar la forma de un modo de realización completamente de hardware, un modo realización de completamente de programa informático (incluyendo firmware, programa informático residente, microcódigo, etc.) o un modo de realización que combina aspectos de programa informático y de hardware que en general se pueden denominar en el presente documento "circuito", "módulo" o "sistema". Además, los aspectos de la presente
10 invención pueden tomar la forma de un producto de programa informático incorporado en uno o más medios legibles por ordenador que tiene(n) un código ejecutable por ordenador incorporado en el mismo.

15 Se puede utilizar cualquier combinación de uno o más medios legibles por ordenador. El medio legible por ordenador puede ser un medio de señal legible por ordenador o un medio de almacenamiento legible por ordenador. Un "medio de almacenamiento legible por ordenador", como se usa en el presente documento, engloba cualquier medio de almacenamiento tangible que pueda almacenar instrucciones que sean ejecutables por un procesador de un dispositivo informático. El medio de almacenamiento legible por ordenador se puede denominar medio de almacenamiento no transitorio legible por ordenador. El medio de almacenamiento legible por ordenador también se puede denominar medio tangible legible por ordenador.

20 En algunos modos de realización, un medio de almacenamiento legible por ordenador también puede almacenar datos a los que se puede acceder mediante el procesador del dispositivo informático. Los ejemplos de medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen, pero no se limitan a: un disquete, una unidad de disco duro magnético, un disco duro de estado sólido, memoria flash, una memoria USB, memoria de acceso aleatorio (RAM),
25 memoria de solo lectura (ROM), un disco óptico, un disco magneto-óptico y el archivo de registro del procesador. Los ejemplos de discos ópticos incluyen discos compactos (CD) y discos versátiles digitales (DVD), por ejemplo, discos CD-ROM, CD-RW, CD-R, DVD-ROM, DVD-RW o DVD-R. El término "medio de almacenamiento legible por ordenador" también se refiere a diversos tipos de medios de grabación a los que se puede acceder mediante el dispositivo informático por medio de una red o enlace de comunicación. Por ejemplo, los datos se pueden recuperar
30 a través de un módem, a través de Internet o a través de una red de área local. El código ejecutable por ordenador incorporado en un medio legible por ordenador se puede transmitir usando cualquier medio apropiado, incluyendo, pero sin limitarse a, inalámbrico, con cable, cable de fibra óptica, RF, etc., o cualquier combinación adecuada de los anteriores.

35 Un medio de señal legible por ordenador puede incluir una señal de datos propagada con código ejecutable por ordenador incorporado en el mismo, por ejemplo, en banda base o como parte de una onda portadora. Dicha señal propagada puede tomar cualquiera de una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, electromagnética, óptica o cualquier combinación adecuada de las mismas. Un medio de señal legible por ordenador puede ser cualquier medio legible por ordenador que no sea un medio de almacenamiento legible por ordenador y que pueda
40 comunicar, propagar o transportar un programa para su uso por o en conexión con un sistema, aparato o dispositivo de ejecución de instrucciones.

45 La "memoria del ordenador" o "memoria" es un ejemplo de un medio de almacenamiento legible por ordenador. La memoria del ordenador es cualquier memoria que sea directamente accesible para un procesador. El "almacenamiento informático" o "almacenamiento" es otro ejemplo de un medio de almacenamiento legible por ordenador. El almacenamiento informático es cualquier medio de almacenamiento no volátil legible por ordenador. En algunos modos de realización, el almacenamiento informático también puede ser la memoria del ordenador o viceversa.

50 Un "procesador", como se usa en el presente documento, engloba un componente electrónico que puede ejecutar un programa o una instrucción ejecutable por máquina o un código ejecutable por ordenador. Las referencias al dispositivo informático que comprende "un procesador" se deben interpretar como que posiblemente contienen más de un procesador o núcleo de procesamiento. El procesador puede ser, por ejemplo, un procesador multinúcleo. Un procesador también se puede referir a una colección de procesadores dentro de un único sistema informático o
55 distribuidos entre múltiples sistemas informáticos. El término "dispositivo informático" también se debe interpretar como que se refiere posiblemente a una colección o red de dispositivos informáticos que comprende cada uno un procesador o procesadores. El código ejecutable por ordenador se puede ser ejecutar por múltiples procesadores que pueden estar dentro del mismo dispositivo informático o que incluso pueden estar distribuidos entre múltiples dispositivos informáticos.

60 El código ejecutable por ordenador puede comprender instrucciones ejecutables por máquina o un programa que hace que un procesador realice un aspecto de la presente invención. El código ejecutable por ordenador para llevar a cabo operaciones para aspectos de la presente invención se puede escribir en cualquier combinación de uno o más lenguajes de programación, incluyendo un lenguaje de programación orientado a objetos tal como Java, Smalltalk, C++ o similares y lenguajes de programación de procedimientos convencionales, tales como el lenguaje
65 de programación "C" o lenguajes de programación similares y compilados en instrucciones ejecutables por máquina.

En algunos casos, el código ejecutable por ordenador puede estar en la forma de un lenguaje de alto nivel o en una forma precompilada y se puede usar junto con un intérprete que genera las instrucciones ejecutables por máquina sobre la marcha.

5 El código ejecutable por ordenador se puede ejecutar completamente en el ordenador del usuario, en parte en el ordenador del usuario, como un paquete de programa informático independiente, en parte en el ordenador del usuario y en parte en un ordenador remoto o completamente en el ordenador o servidor remoto. En el último escenario, el ordenador remoto se puede conectar al ordenador del usuario a través de cualquier tipo de red, incluyendo una red de área local (LAN) o una red de área amplia (WAN), o la conexión se puede hacer a un
10 ordenador externo (por ejemplo, a través de Internet usando un proveedor de servicios de Internet).

Los aspectos de la presente invención se describen con referencia a ilustraciones de diagramas de flujo y/o diagramas de bloques de procedimientos, aparatos (sistemas) y productos de programas informáticos de acuerdo con los modos de realización de la invención. Se entenderá que cada bloque o una parte de los bloques del
15 diagrama de flujo, ilustraciones y/o diagramas de bloques se puede implementar mediante instrucciones de programas informáticos en forma de código ejecutable por ordenador cuando corresponda. Se entiende además que, cuando no sean mutuamente excluyentes, se pueden realizar combinaciones de bloques en diferentes diagramas de flujo, ilustraciones y/o diagramas de bloques. Estas instrucciones de programa informático se pueden proporcionar a un procesador de un ordenador de propósito general, ordenador de propósito especial u otro aparato
20 de procesamiento de datos programable para producir una máquina, de modo que las instrucciones, que se ejecutan por medio del procesador del ordenador u otro aparato de procesamiento de datos programable, cree medios para implementar las funciones/actos especificados en el diagrama de flujo y/o el bloque o bloques del diagrama de bloques.

25 Estas instrucciones del programa informático también se pueden almacenar en un medio legible por ordenador que puede dirigir un ordenador, otro aparato de procesamiento de datos programable u otros dispositivos para que funcionen de una manera particular, de modo que las instrucciones almacenadas en el medio legible por ordenador produzcan un artículo de fabricación que incluya instrucciones que implementen la función/acto especificado en el
30 diagrama de flujo y/o el bloque o bloques del diagrama de bloques.

Las instrucciones del programa informático también se pueden cargar en un ordenador, otro aparato de procesamiento de datos programable u otros dispositivos para provocar que se realicen una serie de etapas operativas en el ordenador, otro aparato programable u otros dispositivos para producir un procedimiento implementado por ordenador, de modo que las instrucciones que se ejecuten en el ordenador u otro aparato
35 programable proporcionen procedimientos para implementar las funciones/actos especificados en el diagrama de flujo y/o el bloque o bloques del diagrama de bloques.

Lista de números de referencia

Sistema de análisis	100
Incubadora	102
Líquido	104
Depósito	106
Celda de medición	108
Un sistema de tuberías	110
Cuerpo de celda	112
Conducto	114
Componente magnético	116
Accionador	118
Electrodo de trabajo	120
Fuente de voltaje	122
Área de excitación	124
Fotomultiplicador	126
Contraelectrodo	128
Señal de medición	130
Unidad de control	132
Recipiente	134
Bomba	136
Partícula	138
Memoria	140
Datos de referencia	142
Procesador	144
Módulo de programa	146
Módulo de programa	148
Interfaz	150
Pantalla	152
Ventana	154
Ventana	156
Datos de EIS	160
Módulo de programa	162
Datos de EIS	164
Perfil de potencial	200
Movimiento del pistón del diluidor	202

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de electroquimioluminiscencia de detección de un analito en una muestra líquida usando una celda de medición (108), comprendiendo la celda de medición (108) un electrodo de trabajo (120) para detectar el analito usando un ciclo de medición de electroquimioluminiscencia, comprendiendo el procedimiento
- 10 a. llevar a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de calibración usando una muestra líquida que esté desprovista del analito y realizar una primera espectroscopia de impedancia electroquímica, EIS, en un punto dado del ciclo de medición, realizándose la primera EIS usando el electrodo de trabajo (120),
- 15 b. llevar a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de análisis usando la muestra líquida que contiene el analito y realizar una segunda EIS en el punto dado del ciclo de medición, realizándose la segunda EIS usando el electrodo de trabajo (120),
- 20 c. comparar el resultado de la primera EIS y la segunda EIS,
- d. proporcionar una indicación de un estado de medición que indique si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede un umbral predefinido.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, siendo la celda de medición (108) parte de un aparato de medición (100) que comprende además una unidad de control (132), proporcionándose la indicación a la unidad de control (132), en la que en caso de que la indicación indique que la comparación dio como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede el umbral predefinido, el procedimiento comprende además que la unidad de control (132) controle el aparato para:
- 30 - seleccionar una contramedida con respecto al fallo de la medición,
- iniciar la contramedida,
- 35 - repetir las etapas b., c. y d.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, comprendiendo además el aparato de medición (100) una unidad de visualización (152), comprendiendo la contramedida visualizar el estado de medición en la unidad de visualización (152).
- 40 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo el ciclo de medición cualquiera de lo siguiente:
- 45 - una primera fase para el acondicionamiento del electrodo de trabajo (120) sin la muestra líquida,
- una segunda fase para el suministro de la muestra líquida a la celda de medición (108) y la captura de micropartículas magnéticas, comprendiendo dicha muestra líquida una sustancia marcadora que puede efectuar una reacción de electroquimioluminiscencia medida con la medición de electroquimioluminiscencia, estando además unido dicho complejo a las micropartículas magnéticas, en la que en caso de que la muestra líquida contenga el analito, el analito está contenido en la muestra líquida como un complejo, comprendiendo dicho complejo la sustancia marcadora, comprendiendo dicha captura atraer las micropartículas con un campo magnético depositando de este modo las micropartículas sobre la superficie de dicho electrodo de trabajo (120),
- 50 - una tercera fase para el lavado de la celda de medición (108) después de la captura y antes de la medición de electroquimioluminiscencia, estando adaptada dicha tercera fase para retirar los complejos no unidos y las micropartículas no depositadas de la celda de medición (108),
- una cuarta fase para realizar la medición de electroquimioluminiscencia en la muestra,
- 55 - una quinta fase para limpiar la celda de medición (108) con el electrodo de trabajo (120) con una solución de limpieza,
- siendo el punto dado cualquiera de los siguientes:
- 60 - un primer punto durante la primera fase,
- un segundo punto durante la segunda fase,
- 65 - un tercer punto durante la tercera fase,
- un cuarto punto durante la cuarta fase,

- un quinto punto después de la quinta fase y antes de la primera fase de la ejecución posterior del ciclo de medición.

- 5 El procedimiento de la reivindicación 3, comprendiendo el acondicionamiento, la captura, el lavado opcional, la medición de electroquimioluminiscencia y la limpieza la aplicación de impulsos de potencial al electrodo de trabajo (120), aplicándose los impulsos en relación con un potencial de polarización de CC medido en relación con un electrodo de referencia de la celda de medición (108), comprendiendo la realización de la EIS aplicar un potencial de CA al potencial de CC.
- 10 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el potencial de CA para la realización de la EIS se aplica usando un potencióstato con un módulo de análisis de respuesta de frecuencia (FRA).
- 15 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en el que el potencial de CA tiene una amplitud de al menos 1 mV y como máximo 100 mV de pico a pico, preferentemente de al menos 3 mV y como máximo 80 mV de pico a pico, más preferentemente de al menos 5 mV y como máximo 50 mV de pico a pico.
- 20 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el potencial de CA tiene una frecuencia de al menos 10 Hz y como máximo 100 kHz, preferentemente de al menos 20 Hz y como máximo 50 kHz, más preferentemente de al menos 30 Hz y como máximo 10 kHz.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo el resultado de la primera EIS y la segunda EIS una señal de respuesta respectiva que indica una admitancia y una fase, estando el umbral predefinido definido respectivamente para la admitancia y la fase, comprendiendo la comparación del resultado de la primera EIS y la segunda EIS una comparación de las admitancias respectivas y una comparación de las fases respectivas, indicando el estado de medición si ambas comparaciones dan como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede el umbral predefinido respectivamente para la admitancia y la fase.
- 30 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones previas, siendo la indicación de un estado de medición positiva en caso de que la comparación dé como resultado que una desviación entre las EIS comparadas está dentro del umbral predefinido y siendo la indicación de un estado de medición negativa en caso de que la comparación dé como resultado que una desviación entre las EIS comparadas está fuera del umbral predefinido, realizándose la primera EIS y la segunda EIS respectivas al menos dos veces para al menos dos puntos diferentes de los puntos dados y dando como resultado indicaciones de ejecución de ensayo respectivas de estados de medición, en el que la selección de las contramedidas se realiza en base a una combinación de las indicaciones de ejecución de ensayo respectivas de los estados de medición.
- 35 11. El procedimiento de la reivindicación 10, comprendiendo los al menos dos puntos dados el quinto punto, comprendiendo además el procedimiento
- 40 - llevar a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de ejecución de preparación usando una muestra líquida desprovista de cualquier analito y realizar una tercera EIS en el quinto punto del ciclo de medición, realizándose la tercera EIS usando el electrodo de trabajo (120),
- 45 - comparar el resultado de la primera EIS obtenida para el quinto punto y la tercera EIS,
- proporcionar una indicación de ejecución de preparación del estado de medición que indique si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la tercera EIS obtenida en el quinto punto excede un umbral predefinido, en la que la selección de las contramedidas se realiza además en base a una combinación de las respectivas indicaciones de ejecución de ensayo de los estados de medición y la indicación de ejecución de preparación.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que en caso de que
- 55 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, segundo o tercer punto sea positiva,
- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el quinto punto sea negativa, y
- la indicación de ejecución de preparación obtenida para el quinto punto sea negativa,
- 60 la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para reemplazar la solución de limpieza actual por una solución de limpieza de una unidad de lote diferente, siendo la unidad de visualización parte del aparato de medición, siendo el aparato de medición parte de la celda de medición (108), o bien
- 65 la contramedida seleccionada comprende una limpieza automatizada de componentes del aparato que se usan para realizar la limpieza de la celda de medición (108) y el electrodo de trabajo (120).

13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que en caso de que
- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, segundo o tercer punto sea positiva,
 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el quinto punto sea negativa, y
 - la indicación de ejecución de preparación obtenida para el quinto punto sea positiva,
- la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para reemplazar la muestra líquida actual que contiene el analito por una nueva muestra líquida que contiene el analito, o una solicitud para un suministro automatizado de otra muestra líquida que contiene el analito.
14. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además proporcionar una solución de correactante a la celda de medición (108) que, en combinación con el complejo, permite la reacción de electroquimioluminiscencia, en la que se realiza una primera determinación si se cumple un criterio según el cual
- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer o tercer punto es negativa, o
 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el segundo punto es negativa, mientras que al menos otra indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, tercer o quinto punto también es negativa,
- en la que, en caso de que se determine mediante la primera determinación que se cumple el criterio, la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para limpiar los componentes del aparato que se usan para proporcionar la solución de correactante a la celda de medición (108), siendo la unidad de visualización parte del aparato de medición, siendo el aparato de medición parte de la celda de medición (108), o bien
- la contramedida seleccionada comprende una limpieza automatizada de los componentes del aparato que se usan para proporcionar la solución de correactante a la celda de medición (108),
- en la que, después de que se complete la contramedida, se realiza una repetición posterior inmediata de las etapas b., c. y d. A continuación, se realiza una segunda determinación si se cumple el criterio según el cual
- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer o tercer punto todavía es negativa, o
 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el segundo punto es negativa, mientras que al menos otra indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, tercer o quinto punto también es negativa,
- en la que, en caso de que se determine mediante la segunda determinación que se cumple el criterio, la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para limpiar la celda de medición (108) usando una solución alcalina, siendo la unidad de visualización parte del aparato de medición, siendo el aparato de medición parte de la celda de medición (108), o bien la contramedida seleccionada comprende una limpieza automatizada de flujo de líquido de la celda de medición (108) usando una solución alcalina.
15. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que en caso de que
- la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el primer, tercer o quinto punto sea positiva,
 - la indicación de ejecución de ensayo obtenida para el segundo punto sea negativa,
- la contramedida seleccionada comprende mostrar por medio de la unidad de visualización una instrucción para limpiar los componentes del aparato que se usan para el suministro de la muestra líquida que contiene el analito a la celda de medición (108), siendo el aparato de medición parte de la celda de medición (108), o bien la contramedida seleccionada comprende una limpieza automatizada de componentes del aparato que se usan para el suministro de la muestra líquida que contiene el analito a la celda de medición (108) y/o una calibración mecánica del aparato.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, comprendiendo además el procedimiento comparar dicha segunda EIS en el punto dado con una segunda EIS respectiva obtenida para el mismo punto dado en una n a última ejecución posterior del ciclo de medición de electroquimioluminiscencia, siendo n una variable entre 1 y 1000, en el que la contramedida seleccionada solo se realiza en caso de que una comparación del resultado de la segunda EIS obtenida para la presente y la n a última ejecución posterior del ciclo de medición de electroquimioluminiscencia dé como resultado una desviación que exceda un umbral de envejecimiento predefinido.

- 5 17. Un aparato (100) para realizar un procedimiento de electroquimioluminiscencia para la detección de un analito en una muestra líquida usando una celda de medición (108), comprendiendo el aparato la celda de medición (108), comprendiendo la celda de medición (108) un electrodo de trabajo (120) para detectar el analito usando un ciclo de medición de electroquimioluminiscencia, comprendiendo el aparato un procesador (144) y una memoria (140), comprendiendo la memoria instrucciones ejecutables por ordenador, provocando la ejecución de las instrucciones por el procesador que el aparato:
- 10 a. lleve a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de calibración usando una muestra líquida que está desprovista del analito y realice una primera espectroscopia de impedancia electroquímica, EIS, en un punto dado del ciclo de medición, realizándose la primera EIS usando el electrodo de trabajo (120),
- 15 b. lleve a cabo el ciclo de medición en un procedimiento de análisis usando la muestra líquida que contiene el analito y realice una segunda EIS en el punto dado del ciclo de medición, realizándose la segunda EIS usando el electrodo de trabajo (120),
- 20 c. compare el resultado de la primera EIS y la segunda EIS,
- d. proporcione una indicación de un estado de medición que indique si la comparación da como resultado que una desviación entre la primera EIS y la segunda EIS excede un umbral predefinido.
18. Un producto de programa informático que comprende instrucciones ejecutables por ordenador para provocar que el dispositivo de la reivindicación 17 realice el procedimiento de la reivindicación 1.

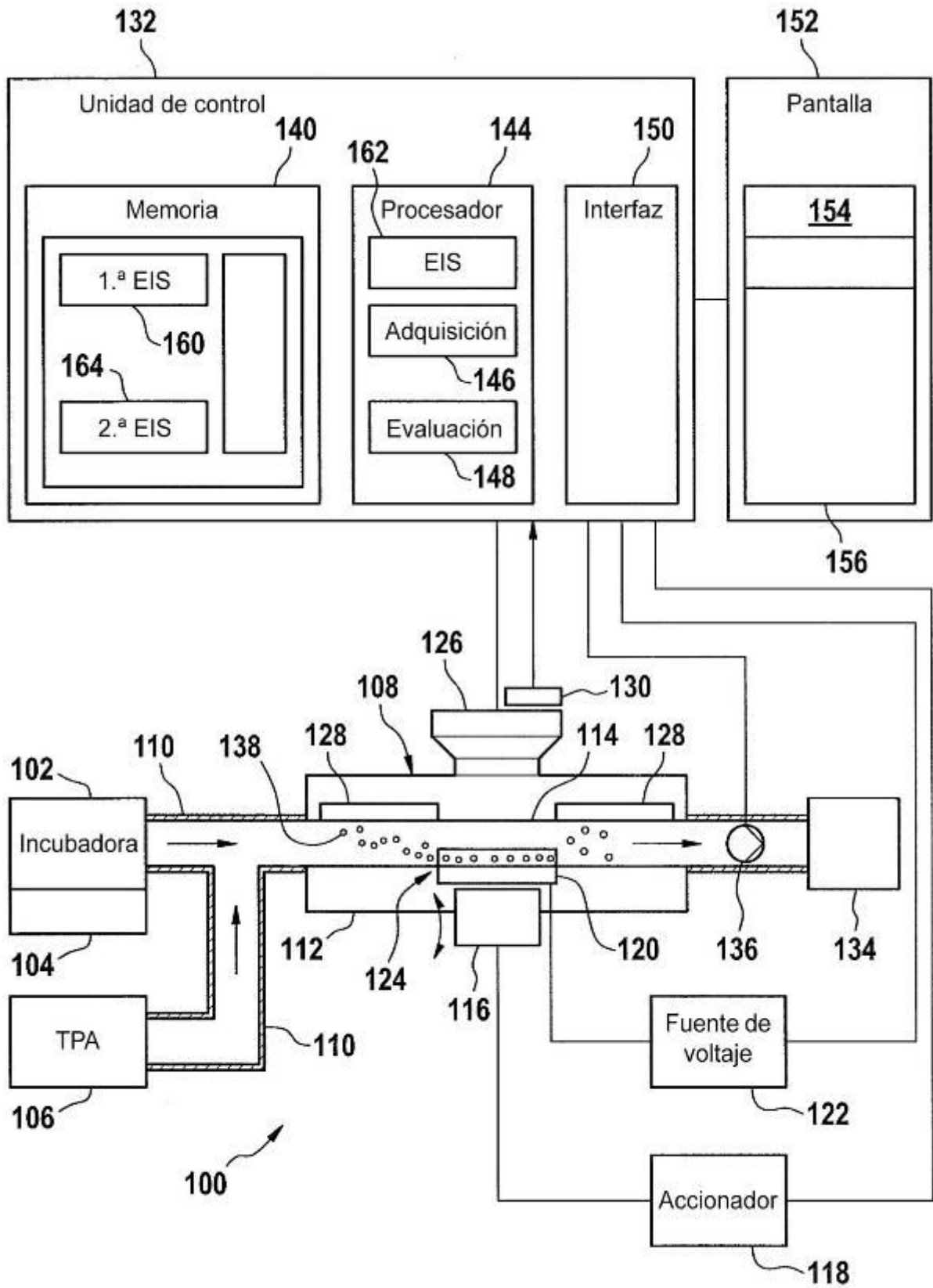


Fig. 1

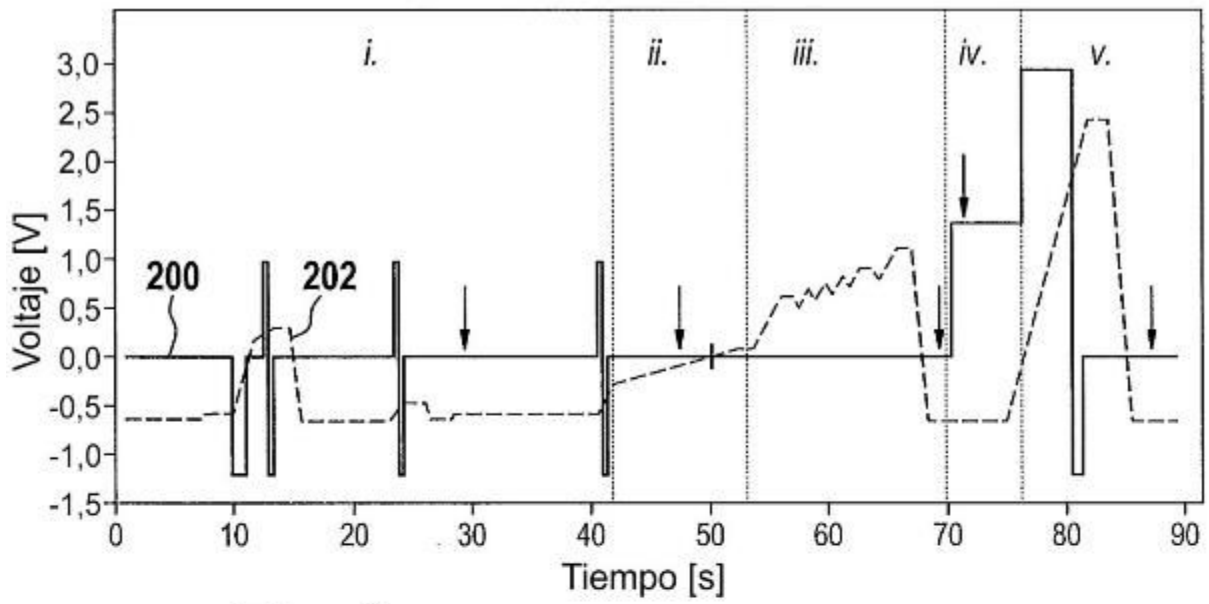


Fig. 2

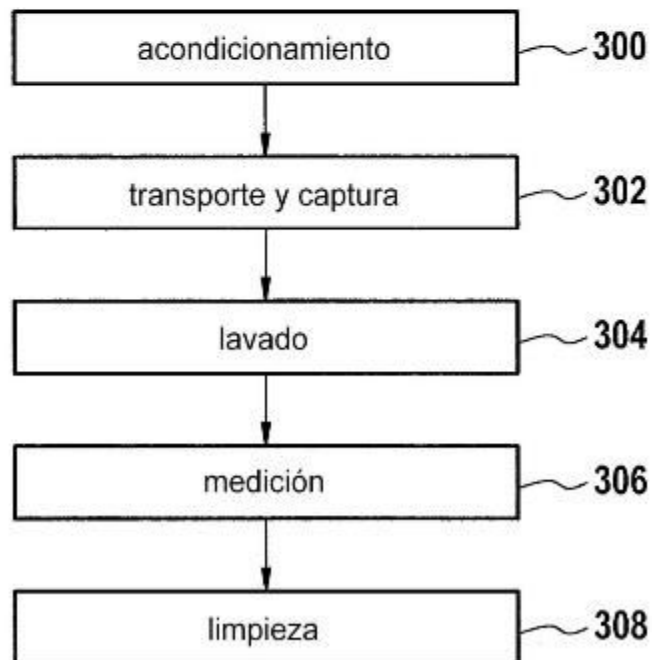


Fig. 3

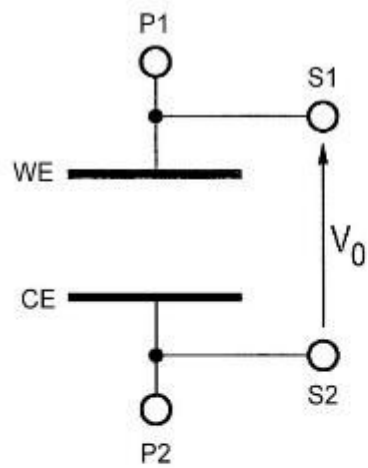


Fig. 4a

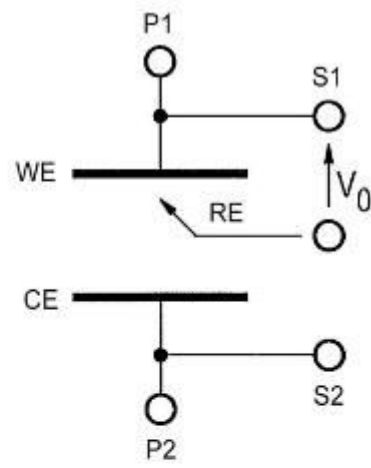


Fig. 4b

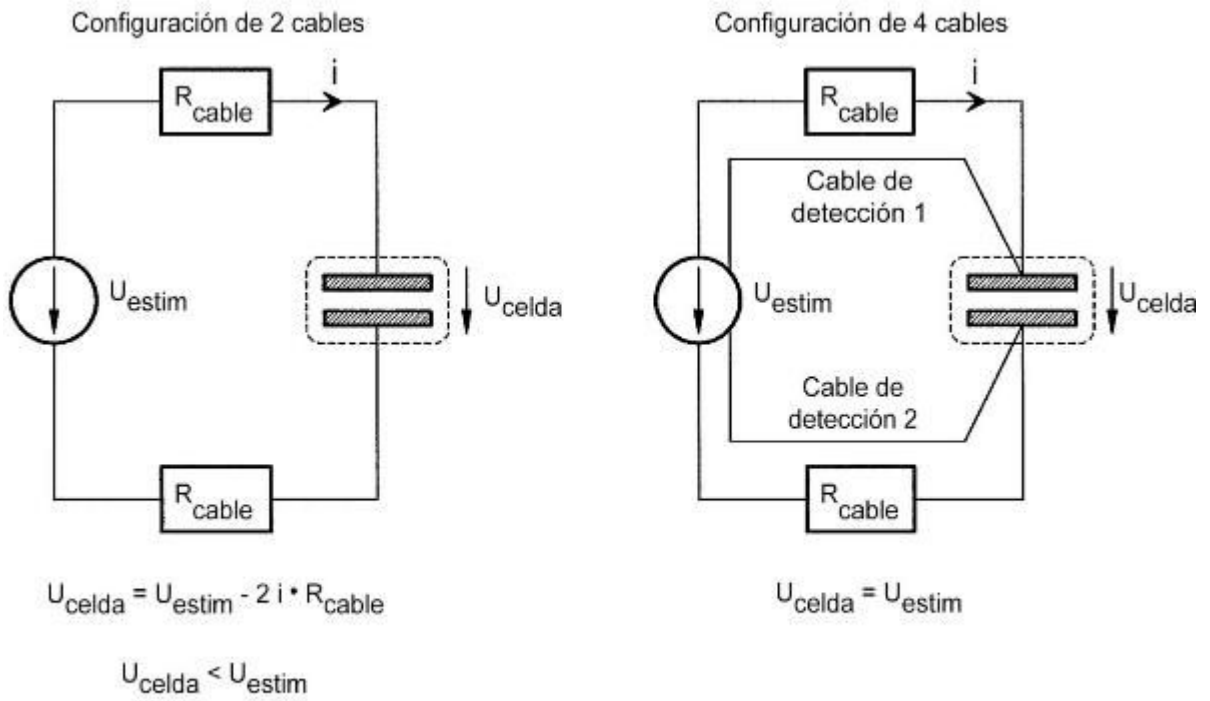


Fig. 4c

a	b	c	d	Problema	Acciones
OK	OK	OK	No OK (P+A)*	Estado irregular de CIS	i. Limpiar vaso de CIS y boquilla del succionador ii. Cambiar lote de CIS
OK	OK	OK	No OK (solo A)	Incubación anómala	i. Establecer bandera ii. Verificar muestra iii. Volver a ejecutar la determinación
No OK (P+A)	No OK (P+A)	No OK (P+A)	No OK (P+A)	Estado irregular de CoS	i. Limpiar vaso de CoS y boquilla del succionador ii. Cambiar lote de CoS
No OK (P+A)	No OK (P+A)	No OK (P+A)	No OK (P+A)	Estado irregular de MC	i. Realizar LFC ii. Cambiar MC
OK	No OK	OK	OK	Incubación anómala	i. Establecer bandera ii. Limpiar boquilla del succionador y verificar el ajuste iii. Volver a ejecutar la determinación

Fig. 5

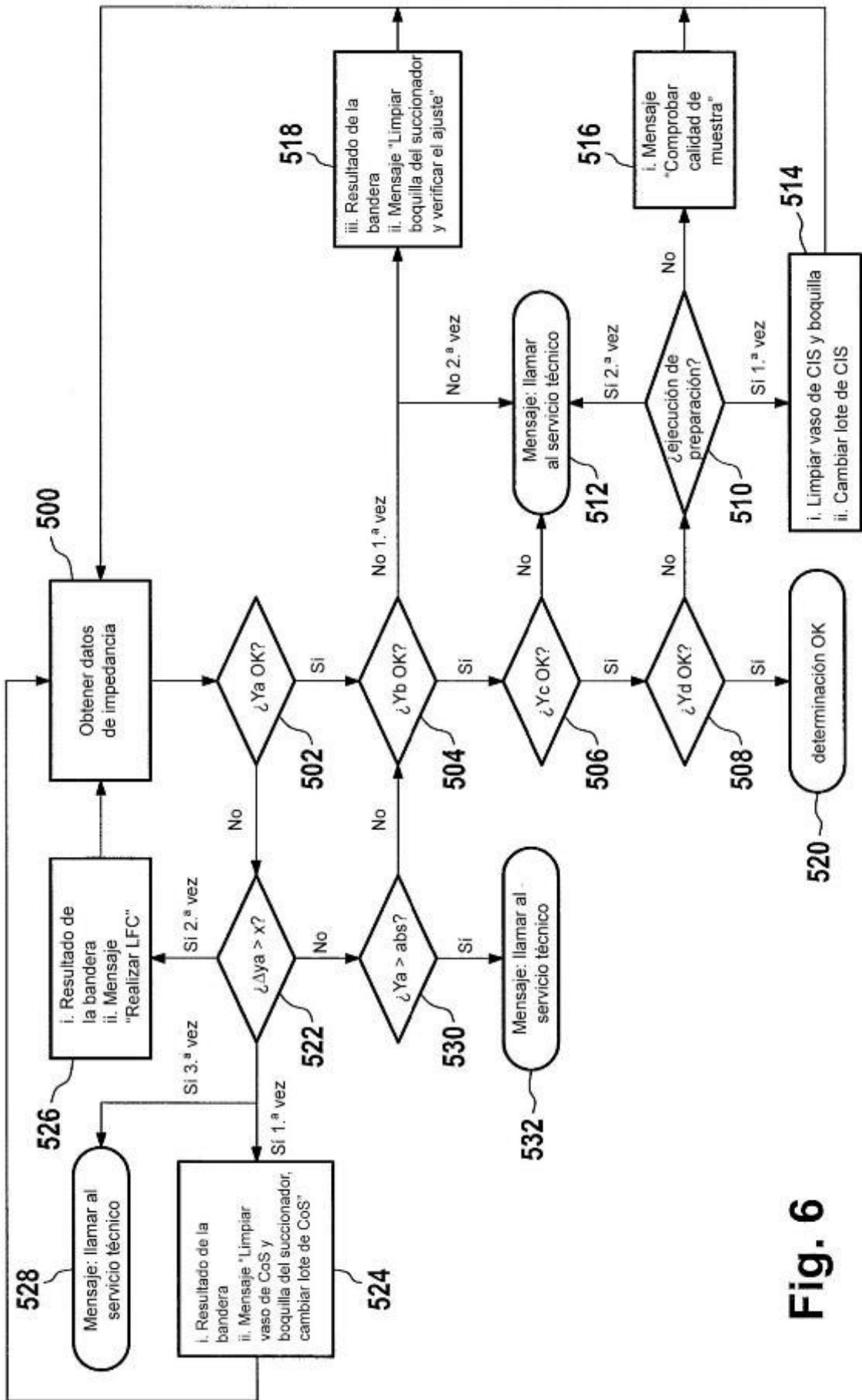


Fig. 6

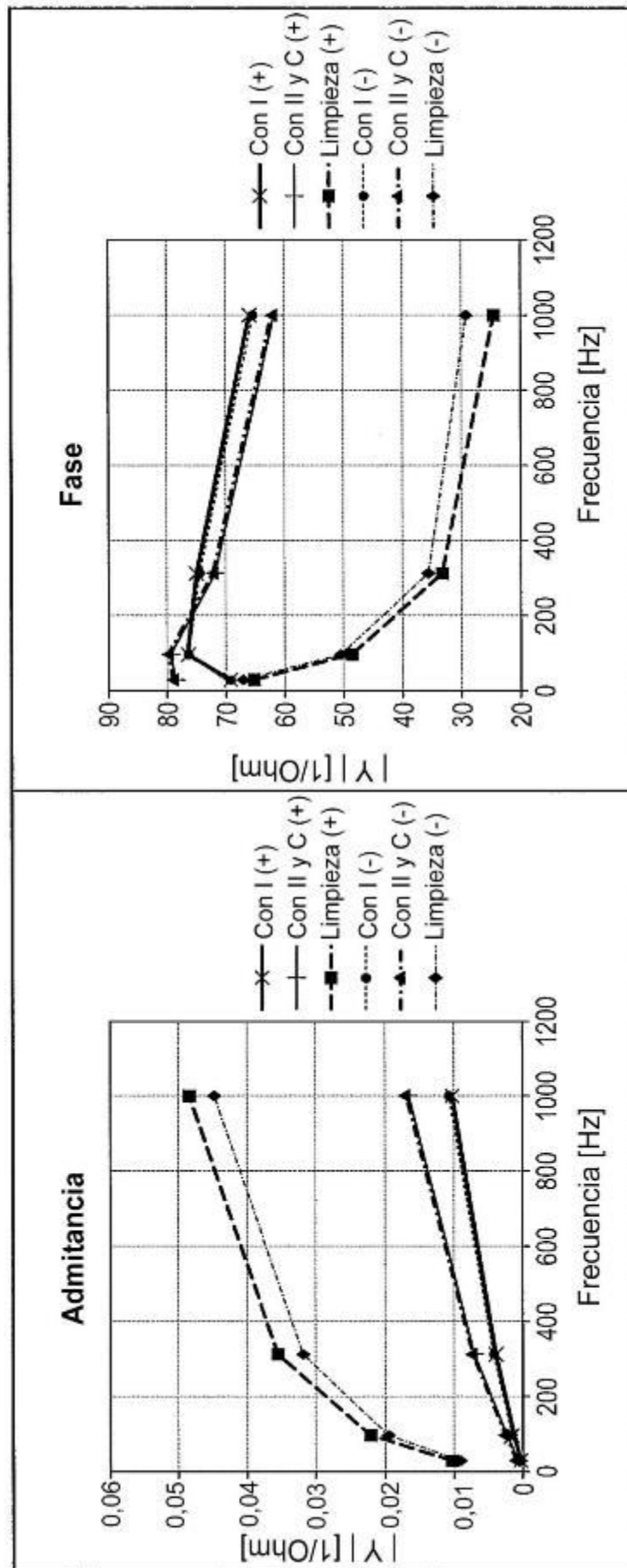


Fig. 7

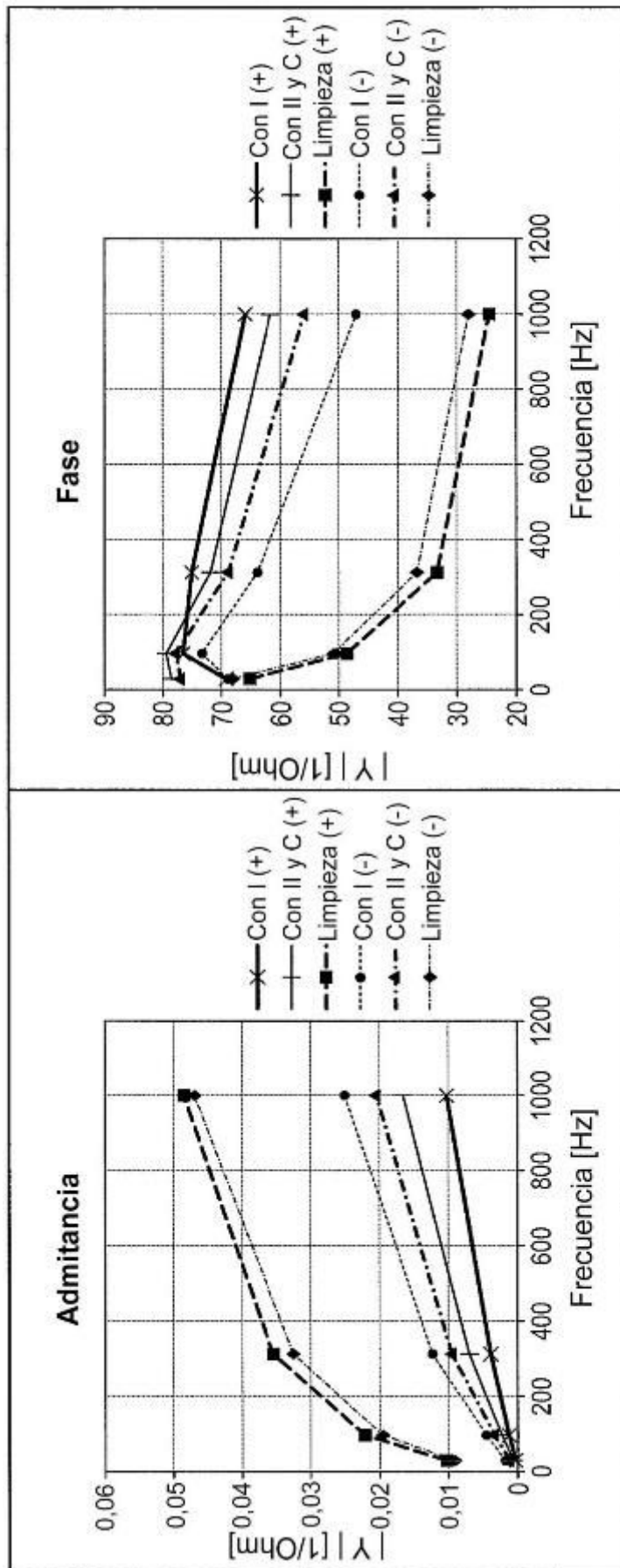


Fig. 8

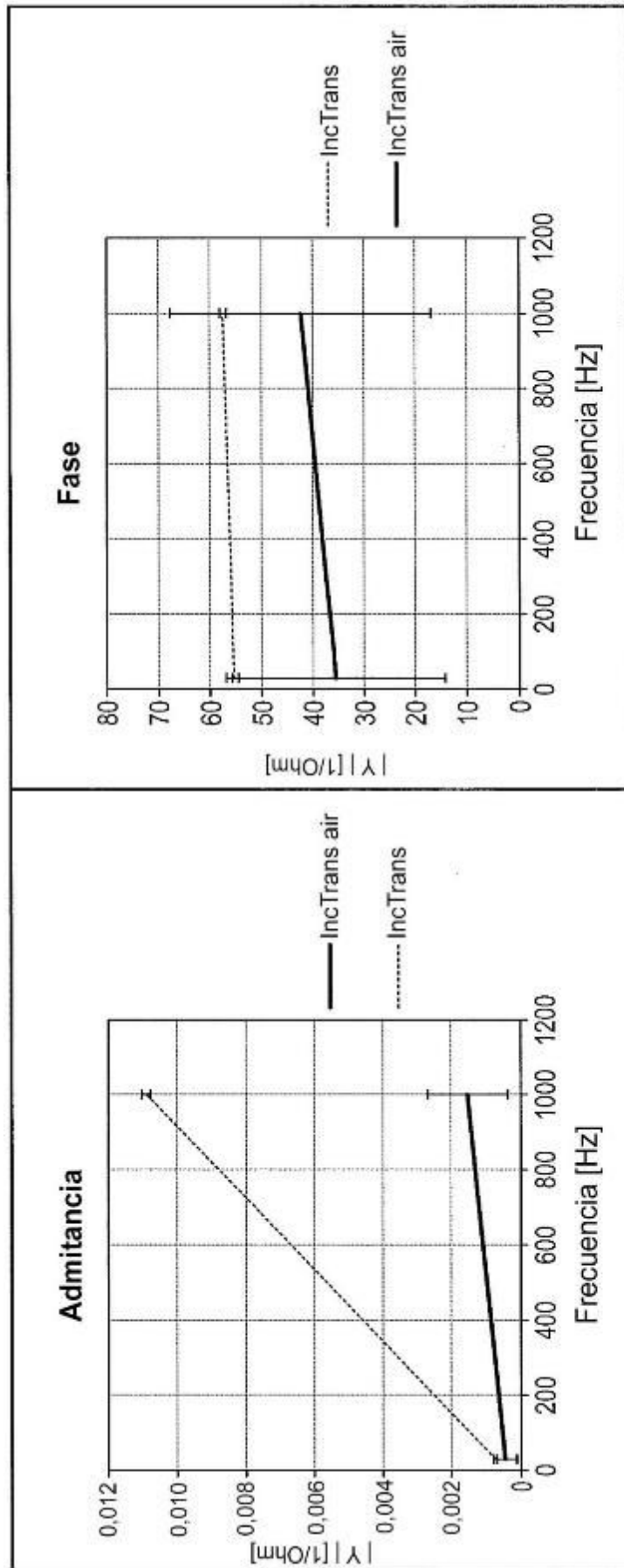


Fig. 9

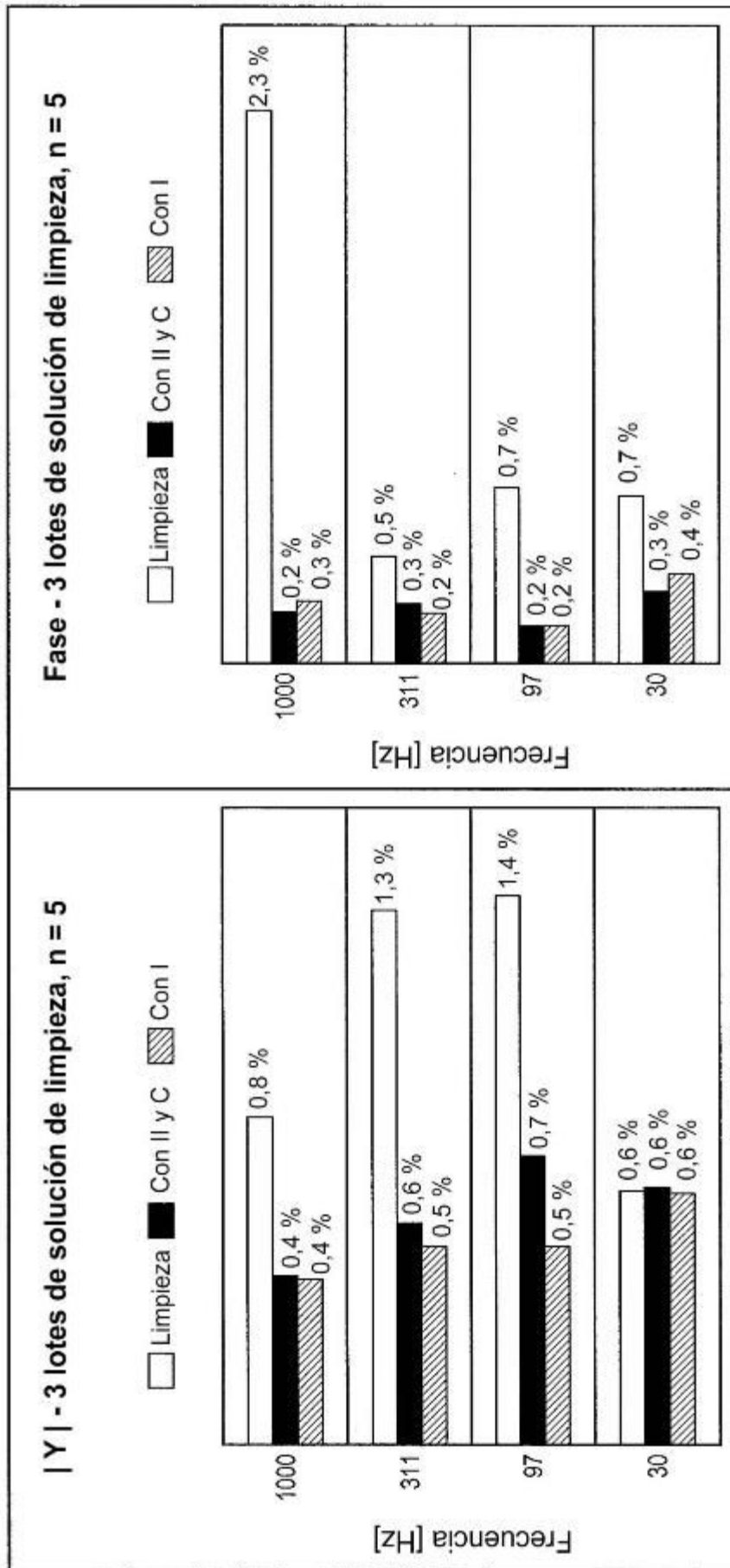


Fig. 10

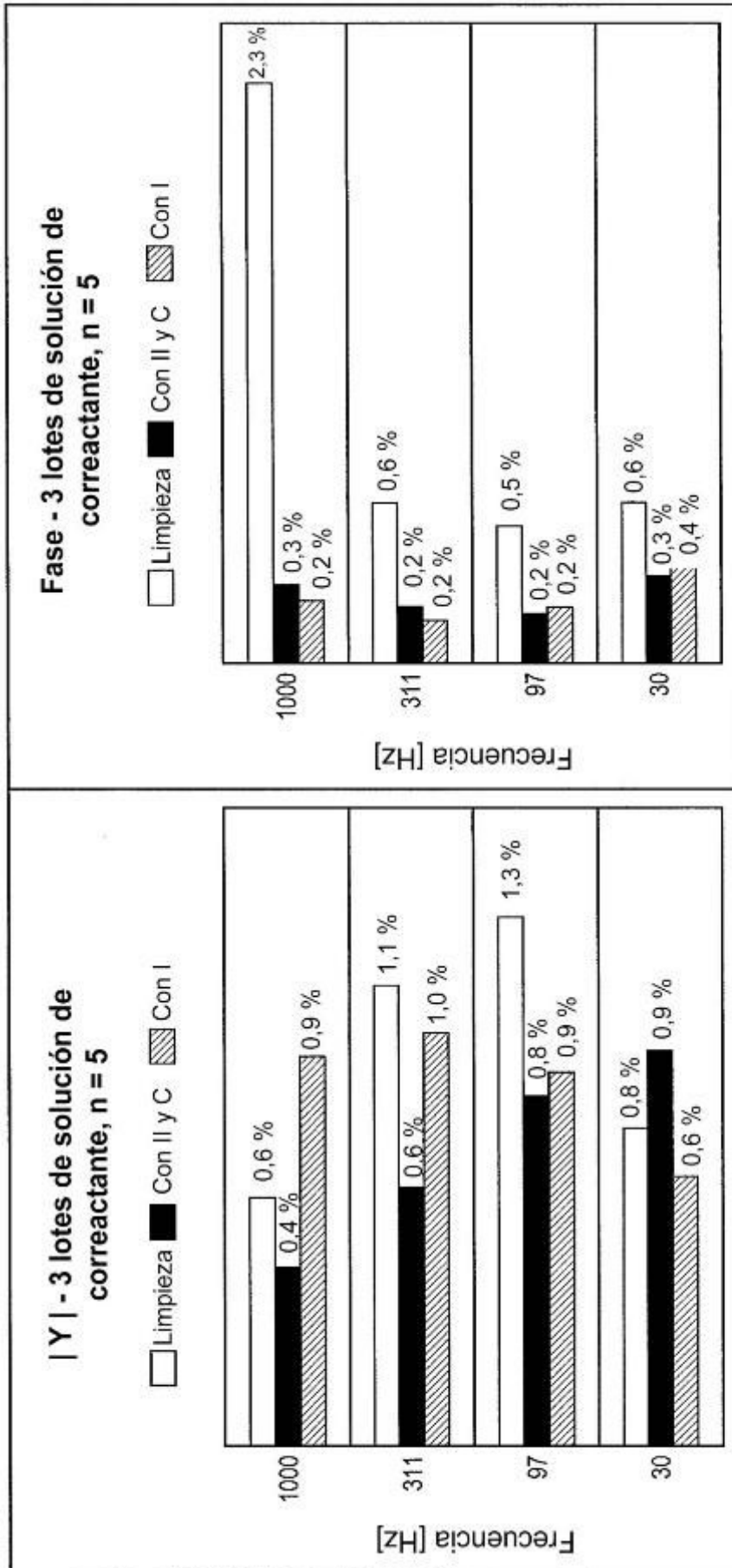


Fig. 11

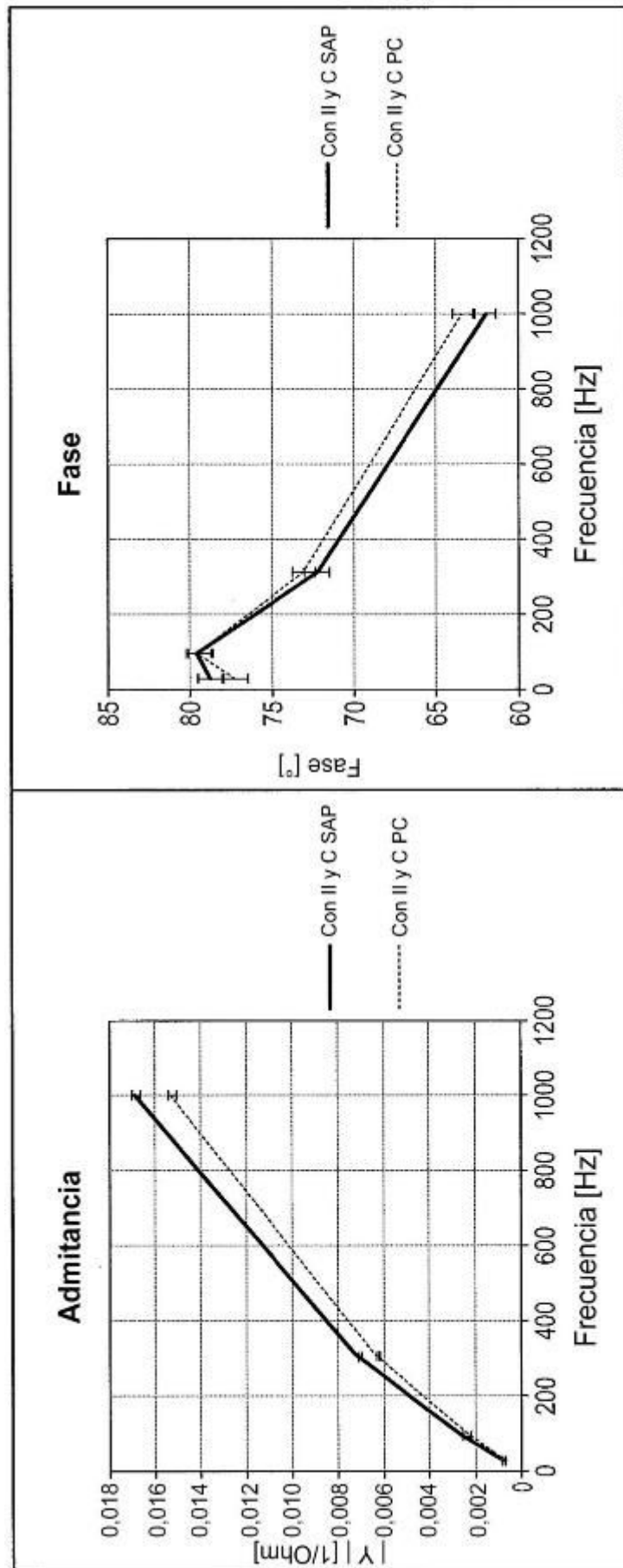


Fig. 12

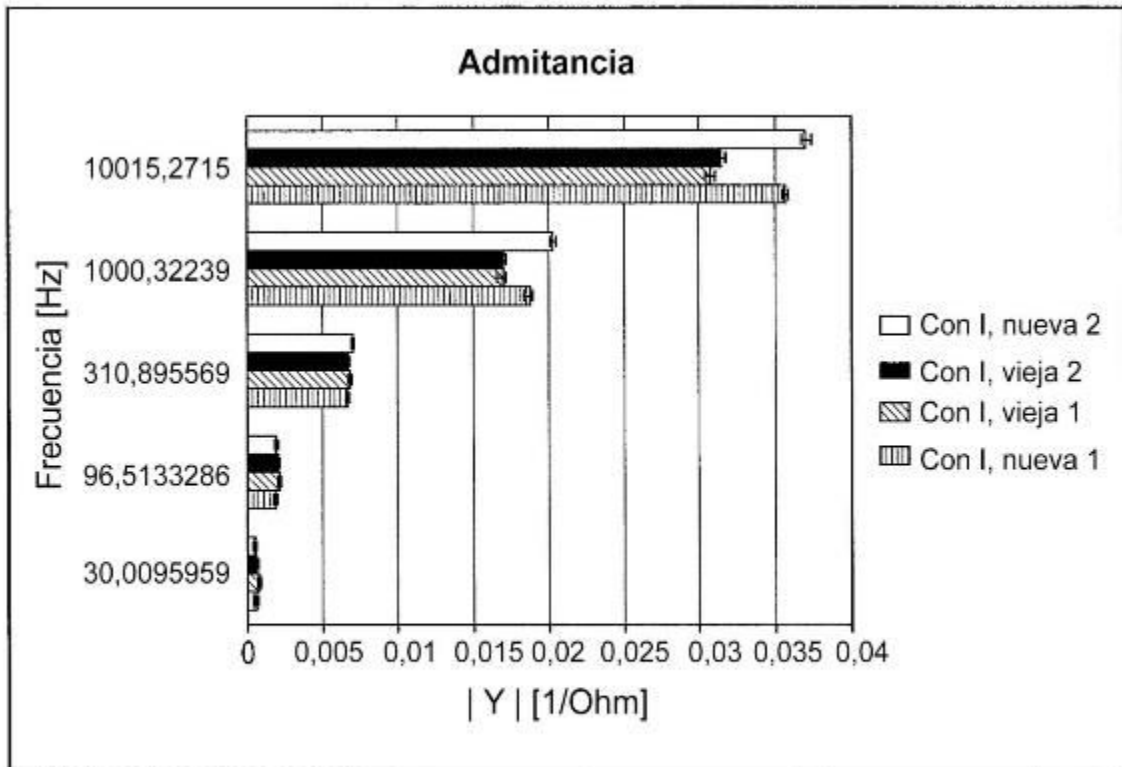


Fig. 13

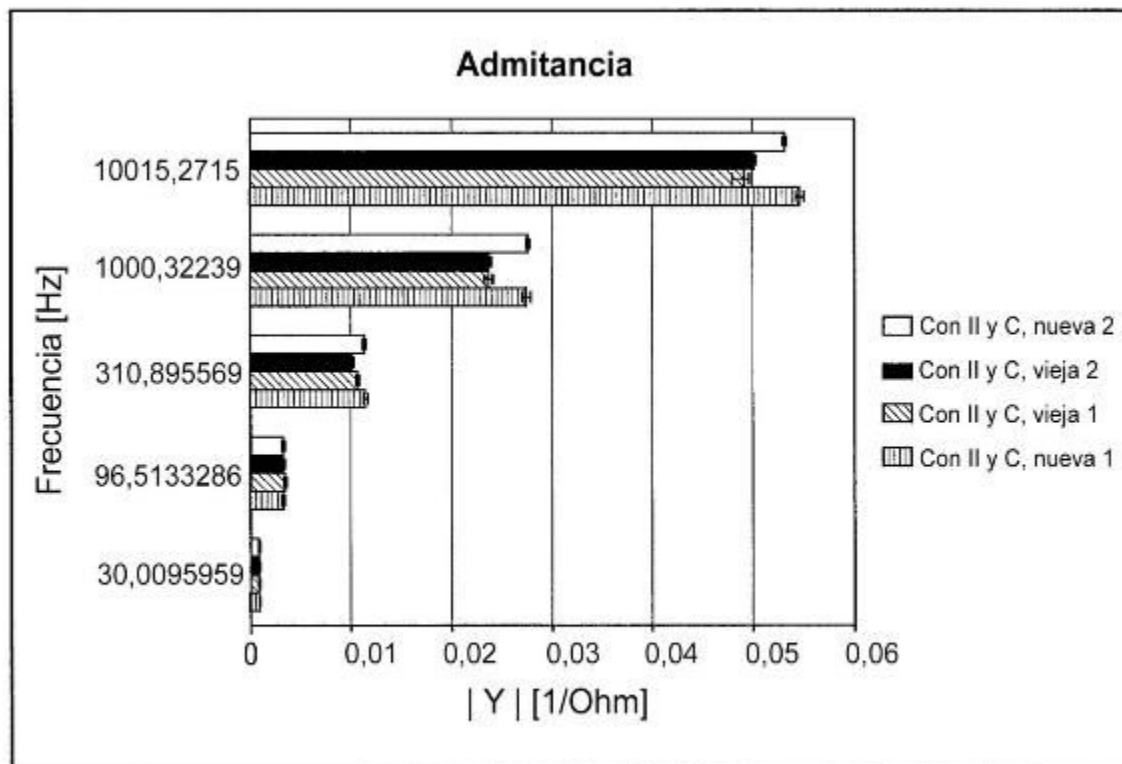


Fig. 14

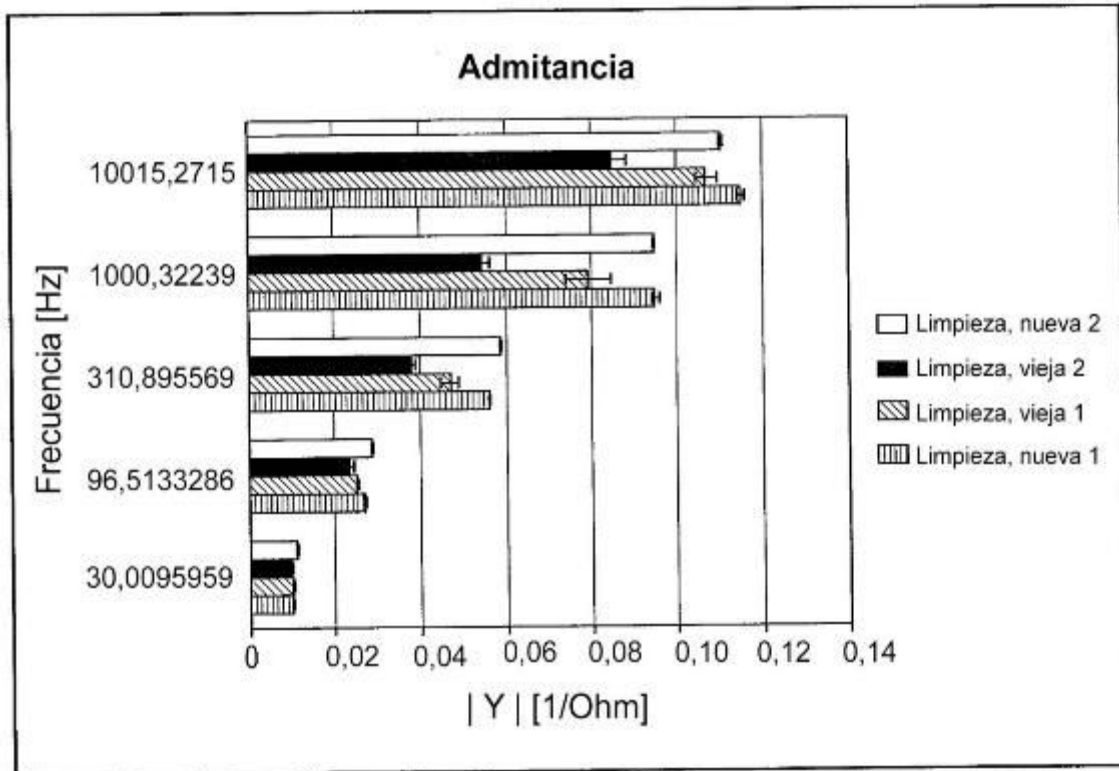


Fig. 15

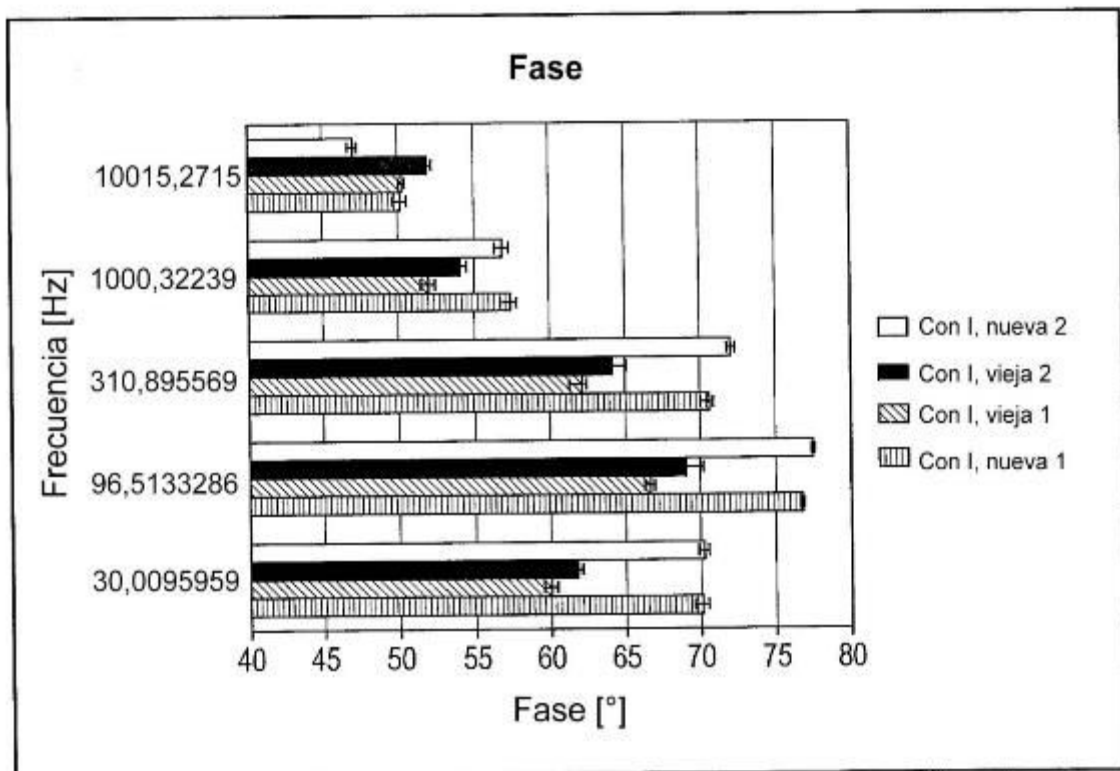


Fig. 16

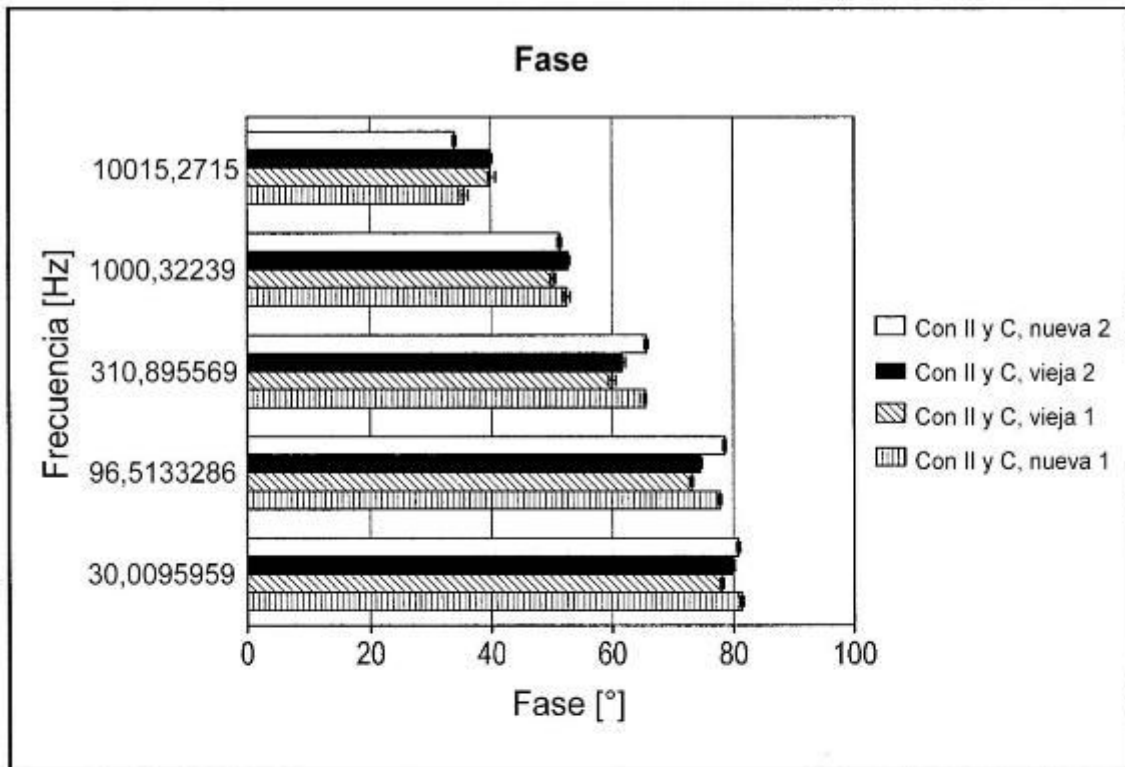


Fig. 17

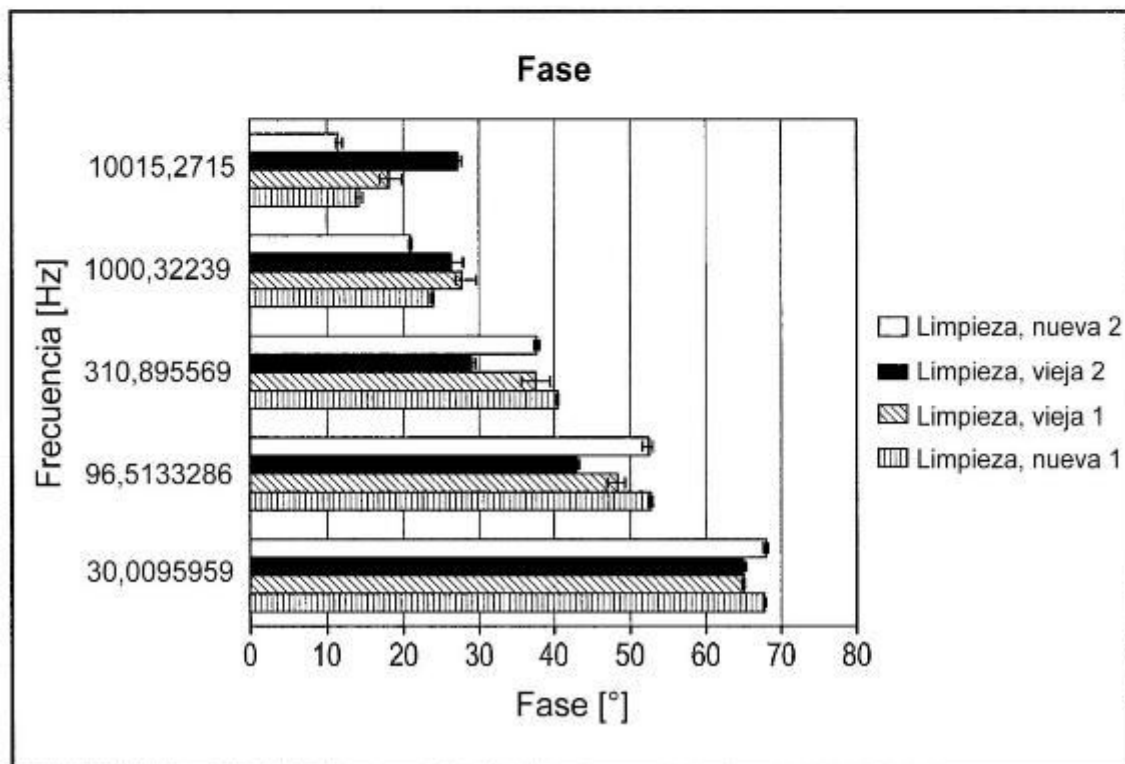


Fig. 18

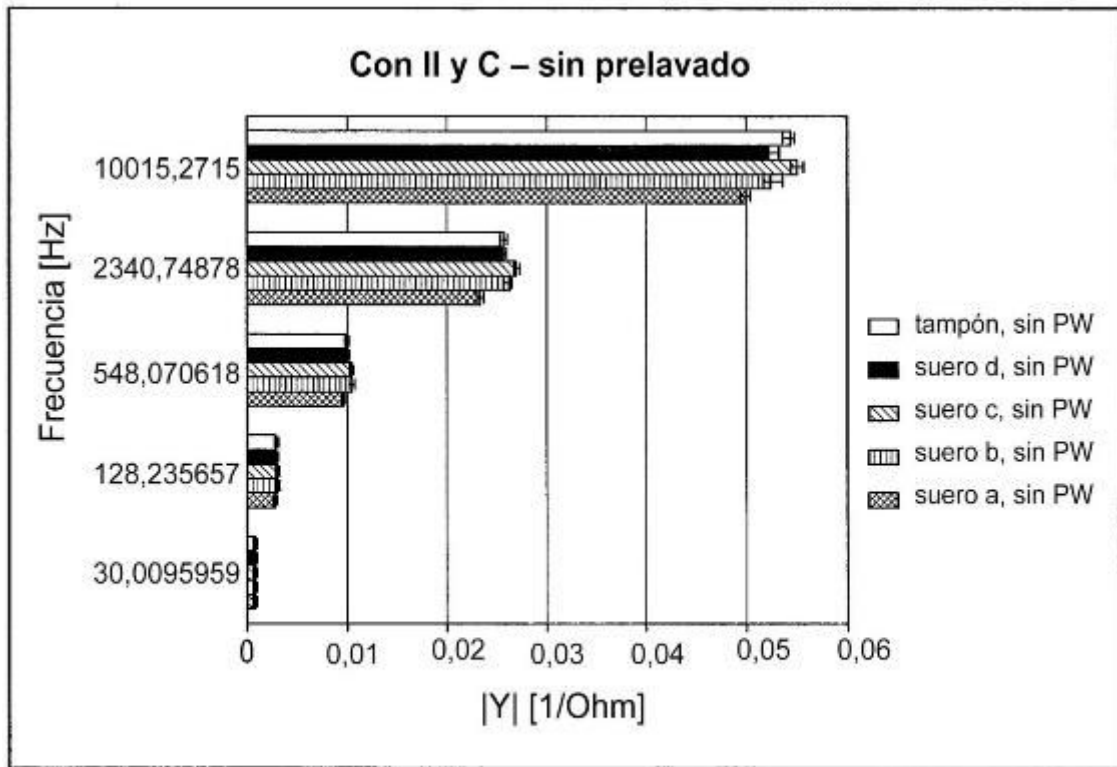


Fig. 19

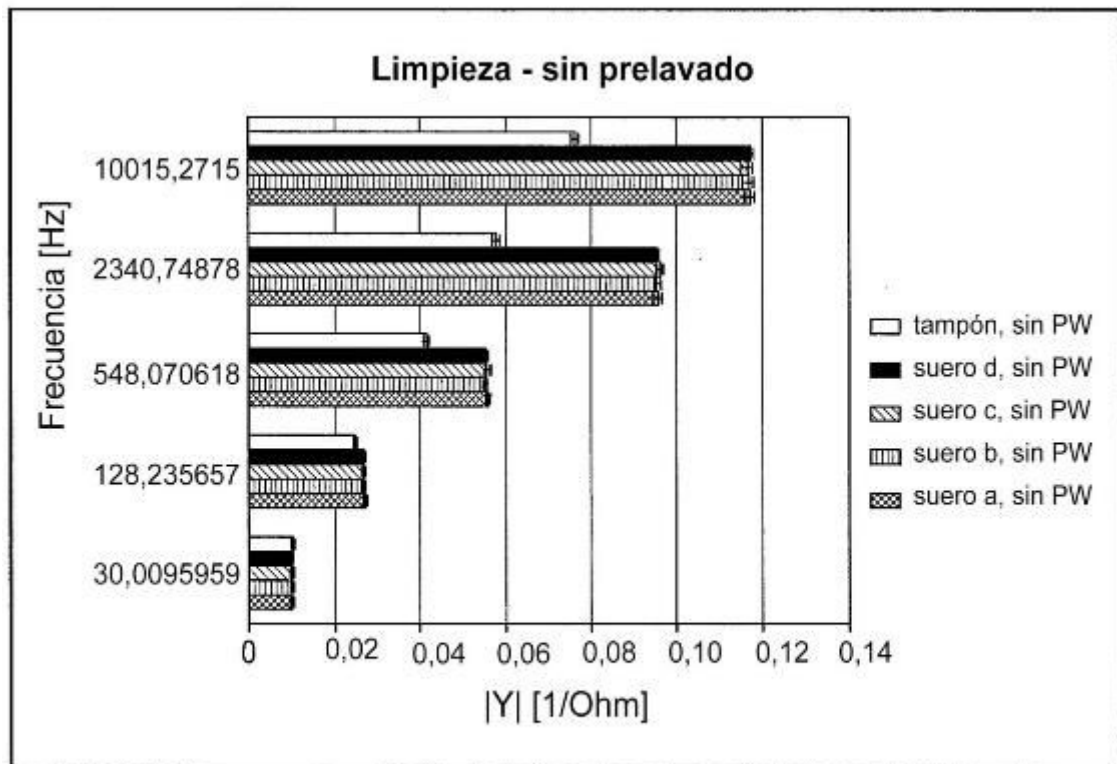


Fig. 20

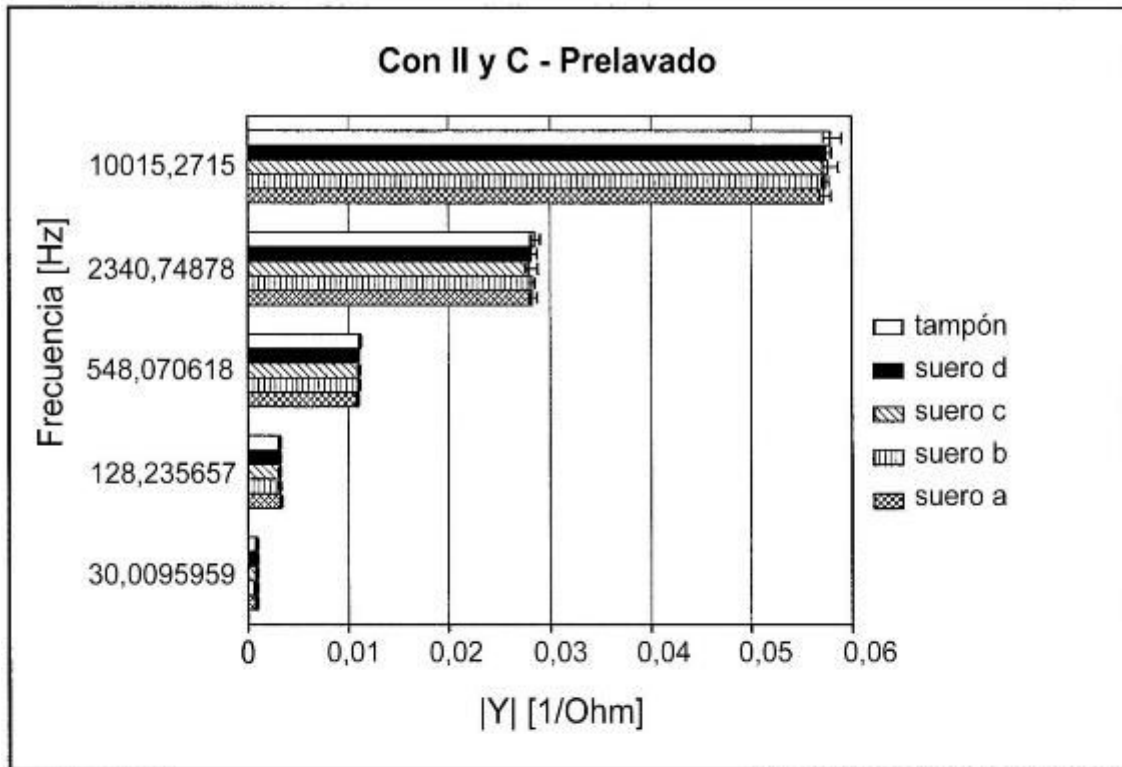


Fig. 21

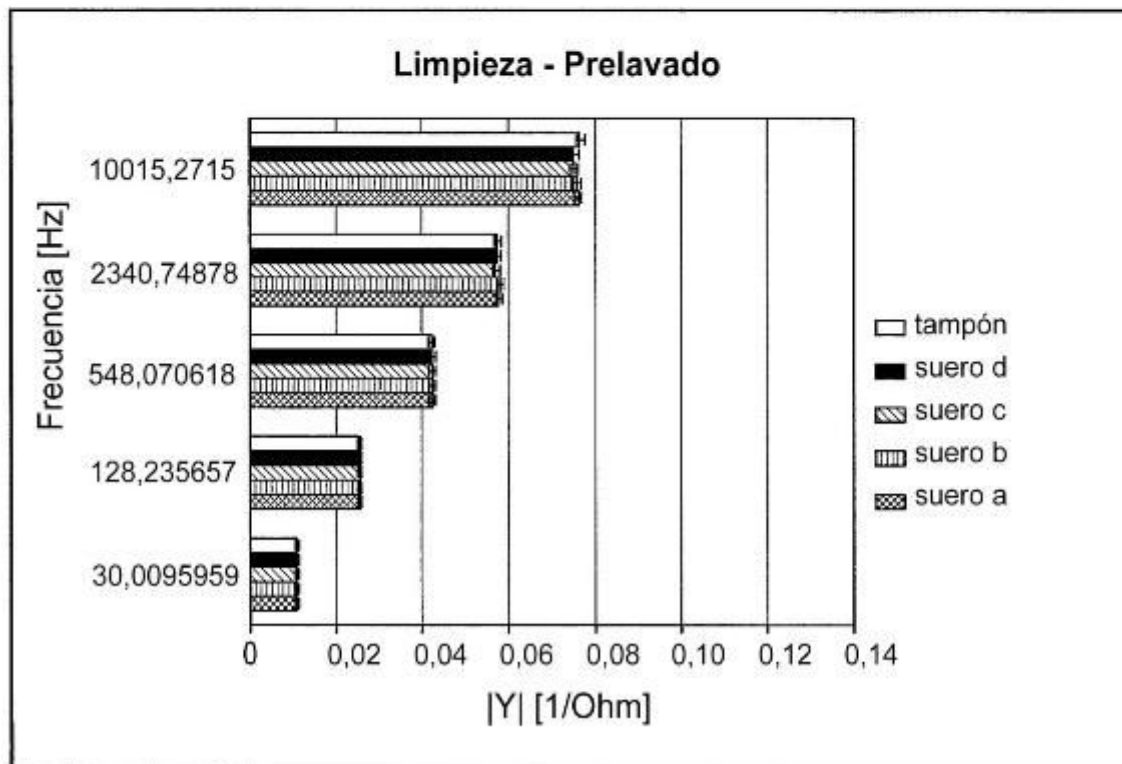


Fig. 22

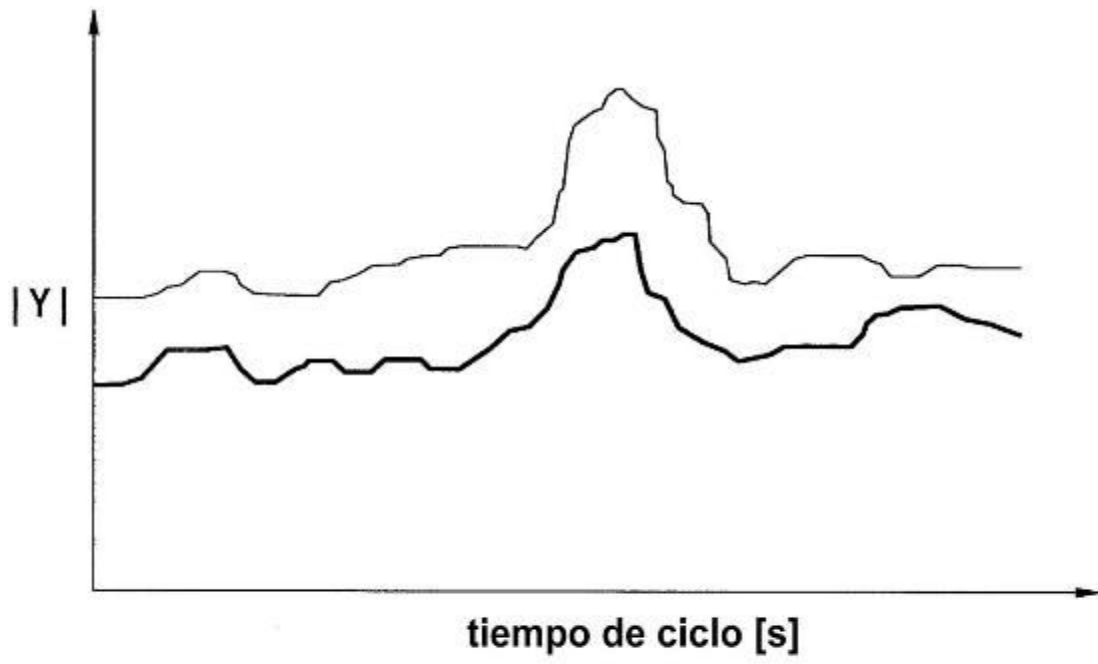


Fig. 23