

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 720**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2019** **PCT/US2019/012890**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2019** **WO19139980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2019** **E 19706049 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3737947**

54 Título: **Métodos para medir analito y/o proteína en muestras biológicas**

30 Prioridad:

09.01.2018 US 201862615242 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2024

73 Titular/es:

IDEXX LABORATORIES, INC. (100.0%)
One Idexx Drive
Westbrook, ME 04092, US

72 Inventor/es:

DOHERTY, PATRICK;
KIRSPER, KEVIN;
FARACE, GIOSI y
YERRAMILLI, MURTHY, VSN

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 984 720 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

Métodos para medir analito y/o proteína en muestras biológicas

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/615.242 presentada el 9 de enero de 2018.

10 Campo

La divulgación se refiere en general a métodos para medir un analito y/o proteína total en muestras biológicas. Más particularmente, la divulgación se refiere a métodos para medir un analito y/o proteína total usando uno o más reactivos colorimétricos, solos o en combinación con reactivos de precipitación de proteínas.

15 Antecedentes

Para detectar una variedad de estados de salud, a menudo es necesario analizar muestras biológicas para cantidades de uno o más analitos, tal como glóbulos rojos o blancos, iones de calcio, iones de potasio, iones de cloruro, iones de sodio, glucosa, lactato, creatinina, creatina, urea, ácido úrico, etanol, albúmina, fosfatasa alcalina, colesterol, piruvato, β -hidroxibutirato, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, cetilcolinesterasa, etc. Además de medir un(os) analito(s) particular(es), también puede ser útil medir una cantidad de proteína total presente en una muestra. Por ejemplo, medir la proteína total puede ser útil en la diagnosis de enfermedad renal o lesión renal aguda. El análisis de concentraciones de un(os) analito(s) particular(es) y la proteína total en una muestra biológica requieren habitualmente enviar la muestra a un laboratorio para su análisis. Esto da como resultado manipulación aumentada de muestra, tiempos de obtención de resultados de laboratorio prolongados, requisitos de envío especiales, y tiempos de almacenamiento aumentados, que a su vez pueden conducir a contaminaciones bacterianas y/o sobrecrecimiento bacteriano en la muestra, cambios en los niveles de proteínas clave, la degradación de moldes y células, la disolución o formación de cristales, cambios en el pH de la muestra, olor aumentado de la muestra, y otros efectos perjudiciales en la muestra. Kehoe y Penn J Chem Educ (2013) 90, 1191-1195 divulga un método colorimétrico de determinación de la concentración de un analito con una cámara correlacionando la intensidad/absorbancia con la concentración.

35 Sumario

Por consiguiente, los inventores han identificado una necesidad de un ensayo de diagnóstico inmediato que pueda medir las concentraciones de analito, contenido de proteína total, o combinaciones de los mismos en muestras biológicas y otras muestras que sea eficaz, preciso y rentable.

40 La invención se define por los siguientes aspectos:

1. Un método de medición de una concentración de un analito o proteína total en una muestra, comprendiendo el método:

45 poner en contacto la muestra con un reactivo colorimétrico para obtener una muestra procesada;

enfocar una cámara que comprende una abertura en la muestra procesada;

50 abrir la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra;

medir el período de tiempo; y

correlacionar el período de tiempo con la concentración del analito o la proteína total en la muestra.

55 2. El método según el aspecto 1:

en el que se pone en contacto la muestra con un reactivo colorimétrico y un reactivo de precipitación de proteína para obtener una muestra procesada que comprende un precipitado de proteína;

60 y que comprende las etapas adicionales de determinar la concentración de proteína total al generar una imagen de la muestra procesada por una cámara;

medir un número de píxeles que se correlaciona con el precipitado de proteína en la imagen; y

65 correlacionar el número de píxeles con una curva estándar para obtener la concentración de proteína total en la

muestra.

3. El método según el aspecto 1, en el que el analito se selecciona de ion de calcio, ion de potasio, ion de cloruro, ion de sodio, glucosa, lactato, creatinina, creatina, urea, ácido úrico, etanol, albúmina, fosfatasa alcalina, colesterol, piruvato, β -hidroxibutirato, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, y cetilcolinesterasa.

4. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 3,

en el que el reactivo colorimétrico es 2,4,6-trinitrofenol y una base; o

el reactivo colorimétrico es 3,5-dinitrobenzoato de metilo, ácido 3,5-dinitrobenzoico, o cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo, y una base o un tampón básico; o

el reactivo colorimétrico comprende cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo; o

el reactivo colorimétrico es un sistema de reactivos que comprende iones cúpricos, un hidroperóxido, y un tinte oxidable,

opcionalmente en el que el reactivo colorimétrico es uno o más de glucosa oxidasa, hexocinasa, tartrato de cobre alcalino, ferricianuro alcalino, y peroxidasa de rábano picante, o en el que el reactivo colorimétrico es verde de bromocresol, o en el que el reactivo colorimétrico es un sistema de reactivos que comprende fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) y nitroazul de tetrazolio (NBT), o en el que el reactivo colorimétrico comprende violeta de pirocatecol, cloruro de bencetonio, y rojo de pirogalol.

5. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 4, en el que la muestra es una muestra de orina.

6. El método según cualquiera de los aspectos 3 – 5, que comprende además generar una imagen de la muestra procesada usando la cantidad predeterminada de luz recolectada de la muestra procesada.

7. El método según el aspecto 6, en el que se obtiene la imagen de la muestra procesada a partir de un portaobjetos que comprende la muestra procesada,

opcionalmente en el que la imagen es una imagen en blanco y negro.

8. El método según cualquiera de los aspectos 6 – 7, que comprende además mostrar la imagen de la muestra procesada en una interfaz de usuario.

9. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 8,

en el que la cantidad de luz predeterminada puede obtenerse al llevar a cabo independientemente uno, dos, o tres experimentos empíricos usando una muestra patrón que tiene una concentración conocida del analito o la proteína total.

10. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 9,

en el que la cantidad de luz predeterminada es constante, o en el que la cantidad de luz predeterminada se selecciona por un usuario de la cámara, opcionalmente en el que la cámara comprende un filtro,

además opcionalmente en el que el filtro está configurado para hacer pasar longitudes de onda que corresponden a un intervalo de longitud de onda del color que resulta de la reacción entre el reactivo colorimétrico y la muestra.

11. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 10,

en el que la cámara comprende una función de exposición automática, y en el que la medición del período de tiempo en el que la abertura está abierta comprende determinar el período de tiempo usando la función de exposición automática.

12. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 11,

en el que la cámara comprende un sensor, y en el que la apertura de la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra comprende:

abrir la abertura;

detectar por el sensor una cantidad de luz recolectada por la cámara;

determinar si la cantidad de luz recolectada por la cámara es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada; y

cerrar la abertura después de determinar que la cantidad de luz predeterminada se ha recolectado por la cámara.

13. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 11,

en el que la cámara comprende un sensor, y en el que la apertura de la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra comprende:

abrir la abertura durante un período de tiempo para recolectar una cantidad de luz de la muestra procesada;

cerrar la abertura;

medir la cantidad de luz recolectada de la muestra procesada por el sensor;

determinar si la cantidad de luz recolectada de la muestra procesada es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada;

abrir la abertura durante un segundo período de tiempo si la cantidad de luz recibida de la muestra no es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada, en el que el segundo período de tiempo es diferente al primer período de tiempo; y

correlacionar el segundo período de tiempo en el que la abertura está abierta con la cantidad de luz predeterminada para obtener la concentración del analito o proteína total en la muestra.

14. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 13,

en el que el analito es creatinina, y

que comprende además, opcionalmente, determinar la razón de proteína:creatinina de la muestra basada en al menos la concentración de creatinina en la muestra y la concentración de proteína total en la muestra.

15. El método según cualquiera de los aspectos 1 – 14,

que comprende además hacer una determinación de salud basada en al menos la concentración del analito, proteína total, o una combinación de los mismos en la muestra.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo de un método según una realización de la divulgación.

La figura 2 es un esquema parcial de una cámara que abre una abertura para recolectar luz de una muestra, según una realización de la divulgación.

La figura 3A es una fotografía de seis alícuotas de muestra preparadas según el método de la divulgación. La técnica colorimétrica usada en la preparación de la muestra se señala por encima de la alícuota de muestra. En la figura, Pro=Proteína Total y Cre=Creatinina.

La figura 3B es una serie de imágenes experimentales generadas por una cámara según un método de la divulgación. La velocidad del obturador que corresponde a cada imagen se muestra por encima de la imagen.

La figura 4A muestra fotografías de una serie de muestras preparadas según un método de la divulgación.

La figura 4B es una curva de correlación que muestra la relación entre la cantidad de creatinina en una muestra experimental y la velocidad del obturador medida según un método de la divulgación.

La figura 5 es un diagrama de flujo de un método según una realización que no es según la invención.

La figura 6A es una serie de imágenes experimentales generadas por una cámara según un método de la divulgación y muestran una cantidad de proteína precipitada en las muestras preparadas.

La figura 6B es una curva de correlación que muestra la relación entre la cantidad de proteína en una muestra experimental y el precipitado de proteína medido según un método de la divulgación.

La figura 7 es un diagrama que muestra una cámara y una muestra preparada según una realización de la

divulgación.

La figura 8A es una curva de correlación que muestra la relación entre la cantidad de glucosa en una muestra experimental y un período de tiempo requerido para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra.

La figura 8B es una curva de correlación que muestra la relación entre la cantidad de albúmina en una muestra experimental y un período de tiempo requerido para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra.

La figura 8C es una curva de correlación que muestra la relación entre la cantidad de fosfatasa alcalina en una muestra experimental y un período de tiempo requerido para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra.

La figura 9 proporciona imágenes de las muestras que tienen diferentes concentraciones de creatinina que se procesaron según los métodos de la divulgación.

La figura 10 es una gráfica que muestra una relación entre la cantidad de proteína en una muestra experimental y la velocidad del obturador medida según un método de la divulgación.

La figura 11A es un diagrama de determinación de la cantidad de proteína en la muestra usando ecuación cuadrática multivariante según una realización de la divulgación. La figura 11B es una gráfica de la relación entre la cantidad de proteína en la muestra y una característica de imagen de desviación estándar de ventana deslizante en múltiples dispositivos. La figura 11C es una gráfica de la relación entre la cantidad de proteína en una muestra y una característica de imagen de área de contorno promedio en múltiples dispositivos. La figura 11D es una gráfica de linealidad de una regresión cuadrática multivariante según una realización de la divulgación usando dos características de imagen en un solo dispositivo.

La figura 12A es un diagrama de determinación de la cantidad de proteína en la muestra usando una red neural artificial según una realización de la divulgación. La figura 12B es un diagrama de la estructura de la red neural artificial. x_1 es una característica de imagen 1, x_2 es una característica de imagen 2, y x_n es una característica de imagen n. La figura 12C es una gráfica de la relación entre la cantidad de proteína en una muestra y una característica de imagen de desviación estándar de ventana deslizante de histograma en múltiples dispositivos. La figura 12D es una gráfica de linealidad de un entrenamiento de la red neural según una realización de la divulgación usando una característica de imagen en múltiples dispositivos.

Descripción

En general, los materiales, métodos y aparatos divulgados proporcionan mejoras para medir concentraciones de analitos y/o proteína total en una muestra biológica. Específicamente, en ciertas realizaciones de la divulgación, un analito y/o proteína total en una muestra biológica se miden usando una única muestra, una única imagen y/o un único ensayo que eliminan múltiples métodos de prueba, manipulación, envío y almacenamiento de la muestra extensivos. Las mediciones pueden llevarse a cabo oportunamente en la clínica, lo cual puede dar como resultado menores cambios a la muestra en comparación con los métodos tradicionales. Por ejemplo, en comparación con las muestras analizadas según los métodos tradicionales, las muestras analizadas según los métodos de la divulgación pueden tener menos contaminaciones bacterianas y/o sobrecrecimiento bacteriano, mínimos y sin cambios en los niveles de proteínas clave, menos degradación de moldes y células, menos disolución o formación de cristales, y mínimos o sin cambios en el pH, aspecto y/u olor.

El término "muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, se refiere en general a una muestra de tejido o líquido de un humano o animal que incluye, pero no se limita a, sangre completa, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo tal como líquido cerebral-cefalorraquídeo; líquido linfático, líquido abdominal (ascitos), las secciones externas de la piel, aparatos respiratorios, intestinales y genitourinarios, lágrimas, saliva, orina, células sanguíneas, tumores, órganos, tejido, y muestra de constituyentes de cultivos de células *in vitro*.

Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína total" se refiere a todas las proteínas en una muestra, incluyendo fragmentos de proteínas de cualquier tamaño.

En varios aspectos de los métodos de la divulgación, el volumen de la muestra es de entre aproximadamente 10 μ l y aproximadamente 500 μ l; por ejemplo, de aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 200 μ l, o aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 100 μ l, o aproximadamente 50 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 50 μ l a aproximadamente 200 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 500 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 200 μ l. En algunos aspectos, el método de la divulgación requiere menos volumen de muestra que los métodos tradicionales para medir los analitos, proteína total y combinaciones de los mismos.

Los métodos de la divulgación incluyen crear una muestra procesada poniendo en contacto una muestra biológica con un reactivo colorimétrico para determinar un analito y/o un reactivo colorimétrico o de precipitación de proteína

para determinar la proteína total. Dependiendo de la concentración del analito y/o la proteína total en la muestra, la reacción entre el/los reactivo(s) colorimétrico(s) y el analito y/o la proteína total puede provocar que la disolución cambie de color a un grado variable. Puede usarse una cámara para tomar una imagen de la muestra procesada al recolectar una cantidad de luz de la muestra a través de una abertura de la cámara, en la que la cantidad de luz que se recolecta es indicativa del color de la muestra.

En ciertas realizaciones, la cámara recolecta (o un sensor asociado con la cámara recolecta) una cantidad de luz predeterminada independientemente del color de la muestra. La cantidad de luz predeterminada que se recolecta puede determinarse experimentalmente, por ejemplo mediante uno, dos, tres, o más experimentos empíricos para obtener un valor o valores para una cantidad de luz predeterminada que se correlaciona con una concentración o concentraciones del analito o la proteína total en la muestra. La cantidad de luz predeterminada no debe ser más que la cantidad de luz máxima o menor que la cantidad de luz mínima que la cámara pueda aceptar.

La cantidad de luz recolectada por la cámara puede ser dependiente del tiempo de exposición, tamaño de abertura y otras características de la cámara. Por ejemplo, la cantidad de luz predeterminada de una muestra que contiene albúmina en una concentración de 1 mg/ml obtenida usando una cámara PL-D725MU-T USB 3.0 (PixelLINK) con un sensor de luz CMOS y un lente objetivo con un aumento de 10x y una abertura numérica de 0.28 puede recolectarse con un tiempo de exposición de aproximadamente 170 ms a aproximadamente 180 ms. Este tiempo representa una cantidad de tiempo en la que la abertura de la cámara está abierta a fin de recolectar la luz en un sensor de otro dispositivo de recolectada de luz. Por lo tanto, una cantidad de luz predeterminada puede definirse por el tiempo de exposición o la velocidad del obturador de la cámara en lugar de un valor que representa directamente la cantidad de luz (por ejemplo, fotones).

En otro ejemplo, la cantidad de luz predeterminada de una muestra que contiene glucosa en una concentración de 1 mM obtenida usando una cámara PL-D725MU-T USB 3.0 (PixelLINK) con un sensor de luz CMOS y un lente objetivo con un aumento de 10x y una abertura numérica de 0.28 puede recolectarse con un tiempo de exposición de aproximadamente 130 ms y 140 ms. En otro ejemplo, la cantidad de luz predeterminada para una muestra que contiene fosfatasa alcalina en una concentración de 1 µg/ml obtenida usando una cámara PL-D725MU-T USB 3.0 descrita anteriormente puede recolectarse con un tiempo de exposición en el intervalo de aproximadamente 135 ms y aproximadamente 145 ms.

Al recolectar una cantidad de luz predeterminada (es decir, discreta) de cada muestra, la cámara puede producir una imagen o pluralidad de imágenes que tienen sustancialmente la misma exposición o brillo, independientemente del color de la muestra. Por consiguiente, los ajustes de la cámara (por ejemplo, la velocidad del obturador y/o el tamaño de la abertura) puede variarse de imagen a imagen a fin de lograr el nivel predeterminado de exposición en cada imagen de las muestras procesadas. Estos ajustes de la cámara pueden medirse para indicar una propiedad óptica de la muestra procesada (por ejemplo, la intensidad colorimétrica de la muestra procesada). Por ejemplo, si el tamaño de la abertura se mantiene constante, la velocidad del obturador requerida para alcanzar el nivel de exposición deseado puede variar dependiendo de la intensidad colorimétrica de la muestra procesada. La velocidad del obturador puede medirse y correlacionarse entonces con la concentración de un analito y/o proteína total en la muestra. A la inversa, (no según la invención), si la velocidad del obturador se mantiene constante, el tamaño de abertura requerida para alcanzar el nivel de exposición predeterminado puede medirse y correlacionarse con la concentración de un analito y/o la proteína total en la muestra. Al generar una imagen que tiene un nivel de exposición predeterminado, la cámara puede estar configurada para producir imágenes clínicamente útiles de la muestra independientemente de la intensidad colorimétrica de la muestra procesada. En ciertas realizaciones, el método puede usarse para medir la concentración del analito y/o la concentración de la proteína total, en el que la concentración del analito se determina con un primer reactivo colorimétrico y la concentración de la proteína total puede determinarse con un segundo reactivo colorimétrico.

Por consiguiente, un método de la divulgación incluye poner en contacto la muestra con un reactivo colorimétrico para obtener una muestra procesada; enfocar una cámara que comprende una abertura en la muestra procesada; abrir la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra; medir el período de tiempo; y correlacionar el período de tiempo con la concentración del analito o la proteína total en la muestra. Otro método de la divulgación, (no según la invención), incluye poner en contacto la muestra con un reactivo colorimétrico para obtener una muestra procesada; enfocar una cámara que comprende una abertura en la muestra procesada; abrir la abertura durante un período de tiempo predeterminado, en el que el tamaño de la abertura es suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra durante el tiempo predeterminado; medir el tamaño de la abertura; y correlacionar el tamaño de la abertura con la concentración del analito o la proteína total en la muestra. Correlacionar el período de tiempo o tamaño de la abertura con la concentración de analito o proteína total puede lograrse al comparar el tiempo o el tamaño de la abertura a una curva estándar. La curva estándar puede representar la cantidad de tiempo o el tamaño de la abertura de la cámara para una serie de concentraciones de analito o proteína total en la muestra.

Además de o como una alternativa para medir la concentración de un analito o proteína como resultado de la intensidad de color de la muestra, los métodos de la divulgación incluyen la medición de la concentración de la proteína total en la muestra al poner en contacto la muestra con un reactivo de precipitación de proteína para

obtener una muestra procesada que incluye un precipitado de proteína. El precipitado de proteína puede ser visible siguiendo la reacción con el reactivo de precipitación de proteína. La concentración de proteína total puede medirse al generar una imagen de la muestra procesada por una cámara y al analizar esta imagen. El análisis de la imagen puede incluir, por ejemplo, medir un número de píxeles que se correlaciona con el precipitado de proteína (por ejemplo, con los glóbulos del precipitado de proteína o un área de la imagen que consiste en un precipitado de proteína). El número de píxeles puede compararse entonces con una curva estándar que refleja una correlación entre píxeles y la concentración de proteína para obtener la concentración de proteína total en la muestra. Este método de prueba puede llevarse a cabo más rápidamente que las pruebas tradicionales, permite un mayor intervalo dinámico, disminución del costo del análisis, y/o uso de menos reactivos y materiales. En algunas realizaciones de la divulgación, la proteína total se mide, usando la imagen de la cámara, sin la medición de otro analito.

Los métodos de la divulgación pueden usarse para medir las concentraciones de numerosos analitos incluyendo, pero no se limitan, a uno o más de los siguientes compuestos que pueden estar presentes en las muestras biológicas: ion de calcio, ion de potasio, ion de cloruro, ion de sodio, glucosa, lactato, creatinina, creatina, urea, ácido úrico, etanol, albúmina, fosfatasa alcalina, colesterol, piruvato, β -hidroxibutirato, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, y acetilcolinesterasa. En algunas realizaciones, el analito puede seleccionarse de uno o más de creatinina, glucosa, albúmina, y fosfatasa alcalina.

Tal como se indica en lo anterior, los métodos de la divulgación incluyen poner en contacto una muestra con un reactivo colorimétrico para obtener una muestra procesada tal como se representa por el paso 101 del método 100 en el diagrama de flujo de la figura 1. Los reactivos colorimétricos pueden seleccionarse basados en las aplicaciones deseadas y tipos de analito que va a medirse. Por ejemplo, los reactivos colorimétricos para medir la creatinina incluyen, pero no se limitan a, uno o más de (1) 2,4,6-trinitrofenol y una base de tampón básico, (d2) 3,5-dinitrobenzoato de metilo, ácido 3,5-dinitrobenzoico, o cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo, y una base o un tampón básico, y (3) un sistema de reactivos que incluye iones cúpricos, un hidroperóxido y un tinte oxidable. Por ejemplo, los reactivos colorimétricos para medir la glucosa incluyen, pero no se limitan a, uno o más de glucosa oxidasa, hexocinasa, tartrato de cobre alcalino, ferricianuro alcalino, y peroxidasa de rábano picante. Por ejemplo, los reactivos colorimétricos para medir la albúmina incluyen, pero no se limitan a, verde de bromocresol. Por ejemplo, los reactivos colorimétricos para medir la fosfatasa alcalina incluyen, pero no se limitan a, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) y sistema de nitro azul de tetrazolio (NBT). Por ejemplo, los reactivos colorimétricos para medir la proteína total incluyen, pero no se limitan a, violeta de pirocatecol, cloruro de bencetonio y rojo de pirogalol. En ciertas realizaciones de los métodos de la divulgación, el reactivo colorimétrico puede incluir uno o más reactivos adecuados para un inmunoensayo. Por ejemplo, el reactivo colorimétrico puede incluir uno o más anticuerpos específicos de analito y/o enzimas adecuadas para el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o inmunoensayo enzimático homogéneo (EIMT).

En ciertas realizaciones de la divulgación, el reactivo colorimétrico puede incluir dos o más componentes (tal como, por ejemplo, una base o tampón básico además de 2,4,6-trinitrofenol). Tales componentes, en ciertas realizaciones, pueden añadirse a la muestra separadamente y de manera secuencial. Por ejemplo, la muestra puede ponerse en contacto en primer lugar con la base, seguido por el contacto con 2,4,6-trinitrofenol. En ciertas realizaciones, los componentes del reactivo colorimétrico pueden ponerse en contacto con la muestra simultáneamente. Por ejemplo, el ácido 3,5-dinitrobenzoico o cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo puede disolverse en un tampón básico antes de poner en contacto la muestra.

El reactivo colorimétrico usado en los métodos de la divulgación puede añadirse en un volumen particular basado en las aplicaciones deseadas y tipos de analito que va a medirse. Por ejemplo, el volumen de reactivo colorimétrico es de entre aproximadamente 1 μ l y aproximadamente 500 μ l; por ejemplo, de aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 200 μ l, o aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 100 μ l, o aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 50 μ l, o aproximadamente 50 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 50 μ l a aproximadamente 200 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 500 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 200 μ l.

Los reactivos de precipitación de proteína para su uso en los métodos de la divulgación pueden seleccionarse basados en las aplicaciones deseadas y también basados en los tipos de analito que va a medirse en las muestras que también se analizan para determinar las concentraciones de proteínas (por ejemplo, el agente de precipitación de proteína puede seleccionarse para reducir de esta manera la interferencia entre este reactivo y la reacción del analito y el reactivo colorimétrico). Por ejemplo, los reactivos de precipitación de proteína incluyen, pero no se limitan a, uno o más de solventes miscibles en agua (tal como alcohol, por ejemplo, isopropanol, metanol, o etanol, cetona, por ejemplo, acetona, metil-etil-cetona, metil-isobutil-cetona, o ciclohexanona, tetrahidrofurano), sales (tal como sulfato de amonio o sales que incluyen iones metálicos polivalentes), ácido tricloroacético (solo o en combinación con acetona), polímeros (por ejemplo, un polímero hidrófilo no iónico, tal como polietilenglicoles y dextranos), agentes tensioactivos acuosos, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, y cualquier combinación de los mismos.

Los reactivos de precipitación de proteína pueden añadirse en un volumen particular basado en las aplicaciones

deseadas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los métodos de la divulgación, el volumen del reactivo de precipitación de proteína es de entre aproximadamente 1 μ l y aproximadamente 500 μ l; por ejemplo, de aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 200 μ l, o aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 100 μ l, o aproximadamente 1 μ l a aproximadamente 50 μ l, o aproximadamente 50 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 50 μ l a aproximadamente 200 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 500 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 300 μ l, o aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 200 μ l.

Tal como se indica en lo anterior, los métodos de la divulgación incluyen enfocar una cámara que incluye una abertura en la muestra procesada tal como se representa por el paso 102 del método 100 mostrado en la figura 1. La cámara puede ser cualquier dispositivo que tenga una abertura que, cuando se abre, puede recolectar una luz de una muestra procesada (es decir, tomar una imagen de la muestra). La cámara puede incluir una variedad de sistemas de obtención de imágenes. En ciertas realizaciones, la cámara puede incluir una plataforma de obtención de imágenes de mesa configurada para obtener imágenes de una muestra biológica suspendida en un cartucho o portaobjetos. En una realización particular, la cámara puede estar asociada con un analizador de sedimento de orina o sangre, por ejemplo, el analizador de sedimento de orina SEDIVUE™ DX™ (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME). En tales realizaciones, la muestra procesada puede pipetarse o de otra manera dispensarse directamente en un cartucho colocado en un orificio de entrada del sistema. En otras realizaciones, pueden obtenerse imágenes de la muestra procesada desde un portaobjetos que incluye la muestra procesada, y el método puede incluir insertar un portaobjetos, un cartucho, u otro recipiente que incluye la muestra procesada en un orificio de entrada del sistema de obtención de imágenes.

En ciertas otras realizaciones, la cámara puede ser una cámara digital, un teléfono con cámara y otro dispositivo portátil, y enfocar la cámara en la muestra procesada puede incluir colocar la cámara frente a la muestra. En casos en los que se usa un dispositivo portátil, un soporte, trípode, armadura, u otro soporte puede estar configurado para colocar la cámara en una ubicación particular con respecto a la muestra procesada para obtener imágenes (es decir, recolectar una cantidad predeterminada de luz de) de la muestra. Enfocar una cámara de este tipo puede incluir controlar manualmente el enfoque a través de un interfaz de usuario de la cámara tal que la muestra procesada está dentro del intervalo de enfoque de la cámara. Adicional o alternativamente, enfocar la cámara puede incluir usar una función de enfoque automático de la cámara para enfocar la muestra procesada. Tal función de enfoque automático de la cámara puede usar un sensor para detectar una instancia entre la muestra procesada y la cámara, y ajustar el enfoque de la cámara tal que la muestra procesada está dentro de un intervalo de enfoque de la cámara.

Tal como se indica en lo anterior, los métodos de la divulgación incluyen abrir la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra tal como se representa por el paso 103 del método 100 en la figura 1. La figura 2 ilustra además un esquema simplificado de un ejemplo de cámara 210 que presenta una abertura 220 y un sensor 230 de luz para recibir luz 260 de una muestra 290. Cuando la abertura 220 se abre, la luz 260 de la muestra 290 puede entrar en la cámara 210, haciendo contacto de esta manera con el sensor 230 de luz. La luz que hace contacto con el sensor puede usarse para analizar características visuales de la muestra 290, para producir una imagen de la muestra, o para llevar a cabo algún otro tipo de procesamiento.

La abertura 220 puede incluir cualquier hueco a través del cual la cámara 210 puede recolectar luz 260 durante un período de tiempo para determinar un color o intensidad de luz de la muestra o para generar una imagen de la muestra 290 preparada. Por ejemplo, la abertura 220 puede incluir un obturador de la cámara 210, que expone el sensor 230 de luz a la luz 260 de la muestra 290 durante un período de tiempo (es decir, un tiempo que corresponde a una velocidad del obturador). El tamaño de la abertura 220 puede fijarse, por ejemplo, ajustarse por un fabricante de la cámara 210, tal que es sustancialmente el mismo cada vez que la abertura se abre. Por ejemplo, la abertura 220 numérica puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,025 y aproximadamente 0,5, o aproximadamente 0,03 y aproximadamente 0,5, o aproximadamente 0,025 y aproximadamente 0,25, o aproximadamente 0,03 y aproximadamente 0,25, o aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,25, o aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,5, o aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,25, o aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5.

En unas realizaciones de la divulgación en las que el tamaño de abertura es constante, la cantidad de luz 260 recolectada por la cámara 210 a través de la abertura 220 puede ser dependiente principalmente del período de tiempo que la abertura se abre. En una realización alternativa, el tamaño de la abertura 220 puede ser ajustable para permitir una velocidad de flujo más alta o más baja de luz 260 al interior de la cámara 210 a través de la abertura, y abrir la abertura puede incluir seleccionar o determinar un tamaño de la abertura. Un tamaño de la abertura puede seleccionarse manualmente por un usuario de la cámara 210, por ejemplo, a través de un interfaz de usuario de la cámara. De manera alternativa, el tamaño de la abertura puede determinarse por la cámara 210 por una función de exposición automática ("auto-exposición") de la cámara.

Abrir la abertura 220 durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz 260 predeterminada puede permitir que la cámara tome una imagen de la muestra. El método puede incluir generar una imagen de la muestra 290 preparada usando una cantidad, tal como una cantidad predeterminada, de luz

recolectada de la muestra procesada. La imagen generada por la cámara 210 puede incluir una imagen a todo color, una imagen en blanco y negro, o cualquier otra imagen adecuada para la medición de un analito y/o proteína en la muestra procesada. De manera alternativa, puede producirse una imagen digitalmente por un sensor 230 de luz, tal como un dispositivo acoplado a carga (CCD), un sensor de píxeles activos (APS), un semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS), un sensor Foveon X3, u otro sensor. En tal realización, el método puede incluir detectar la luz 260 recolectada en un sensor 230 de luz y/o convertir la luz incidente en una señal eléctrica. En algunos ejemplos, n sensor 230 de luz de este tipo puede detectar la luz 260 incidente y registrarla como una serie de píxeles, que representan puntos discretos en la muestra preparada de la cual van a obtenerse imágenes. Tales píxeles pueden ser selectivamente sensibles a la luz de una longitud de onda particular o intervalo de longitudes de ondas. Por ejemplo, los píxeles pueden subdividirse en píxeles que recolectan selectivamente luz de las longitudes de onda que corresponden a los colores verde, rojo y azul, respectivamente. De manera alternativa, tales píxeles pueden ser sensibles a toda la luz recolectada en el intervalo de longitudes de onda a los cuales el sensor es sensible (es decir, para producir una imagen en blanco y negro). El sensor 230 de luz puede medir la longitud de onda y/o cantidad de luz recolectada por cada pixel de la cámara 210 y almacenarla como una matriz de valores en una memoria o almacenamiento de datos de la cámara. En un ejemplo particular, cada pixel puede comprender un valor numérico que corresponde a una cantidad de luz 260 recolectada, una intensidad media, brillo, coloración, u otra propiedad de la luz incidente en el pixel. El método puede incluir además mostrar la imagen de la muestra procesada en un interfaz de usuario en comunicación con la cámara. Adicional o alternativamente, la imagen y/o información asociada puede enviarse a un dispositivo informático remoto tal como un servidor, teléfono móvil, ordenador u otro dispositivo externo.

Tal como se describe en el presente documento, la cantidad de luz predeterminada representa una cantidad de luz recolectada por la cámara para producir una imagen con un brillo o exposición predeterminado. La cantidad de luz predeterminada puede especificarse según una cantidad de luz incidente en un sensor de luz en la cámara, un voltaje producido al convertir la luz incidente a una señal eléctrica, un brillo o propiedad óptica de una imagen producida, o por algún otro medio. La cantidad de luz 260 predeterminada que va a recolectarse por la cámara 210 puede ser constante tal que se produce una imagen de exposición y/o brillo uniforme cada vez que la abertura 220 se abre. La cantidad de luz 260 predeterminada puede verse influida por varios elementos de la cámara o sistema de obtención de imágenes. Por ejemplo, la cantidad de luz predeterminada puede relacionarse con una lente, abertura, sensor de luz, u otros elementos de la cámara. La cantidad de luz 260 predeterminada puede seleccionarse basada en la cantidad de luz requerida para producir una imagen clínicamente útil de la muestra 290 procesada.

En unas realizaciones en las que se mide la cantidad de un precipitado de proteína, la cantidad de luz 260 predeterminada puede ser suficiente para medir una cantidad de un precipitado de proteína de una imagen de la muestra procesada (por ejemplo, por inspección visual de una imagen de la muestra procesada), al contar un número de píxeles que se correlaciona con el precipitado de proteína (por ejemplo, con los glóbulos de precipitado de proteína o un área de la imagen que consiste en un precipitado de proteína), y/o al procesar la imagen usando un programa, algoritmo, o algún otro medio. En otra realización, la cantidad de luz 260 predeterminada puede determinarse basada en un nivel deseado de exposición, brillo, contraste, o intensidad en una imagen generada por la cámara 210 basada en un histograma de brillo de una imagen de la muestra 290 procesada.

La cantidad de luz 260 predeterminada puede seleccionarse por un usuario de la cámara 210 a través de un interfaz de usuario de la cámara 210, y el método puede incluir introducir una cantidad de luz predeterminada. La cantidad de luz 260 predeterminada puede seleccionarse o ajustarse por un usuario para asegurar la claridad de la imagen y/o para facilitar el procesamiento posterior de la imagen. Adicional o alternativamente, un nivel de exposición óptima o de otra manera clínicamente útil puede determinarse usando una función de exposición automática ("auto-exposición") de la cámara 210. Tal función de auto-exposición puede usar un algoritmo que usa información acerca de la muestra 290 preparada y/o los ajustes de la cámara 210 para determinar la cantidad de luz 260 que debe recolectar la cámara para producir una imagen clínicamente útil. La cantidad de luz 260 predeterminada, por ejemplo, puede determinarse basado en un brillo promedio de la muestra 290 preparada, un histograma de brillo de la muestra preparada, la identificación y/o el equilibrio de luces altas y luces bajas de la muestra preparada, o algún otro método.

Para una muestra dada, la cantidad de luz 260 recolectada por la cámara 210 a través de la abertura 220 (es decir, el nivel de exposición de una imagen producida por la cámara) se influye en general por dos ajustes de la cámara: el tamaño de la abertura 220 y el período de tiempo que se abre la abertura. Dependiendo de las propiedades ópticas de la muestra 290 procesada, pueden requerirse un tamaño de abertura más grande o más pequeño y/o una apertura más larga o más corta de la abertura 220 para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra. Por ejemplo, si una muestra es más oscura que la otra, requerirá un tamaño de abertura más grande y/o una velocidad de obturador más larga para recolectar la misma cantidad de luz 260 en comparación con una muestra más clara.

En una realización, los métodos de la divulgación incluyen medir el período de tiempo en el que la abertura está abierta a fin de recolectar la cantidad de luz predeterminada tal como se representa por el paso 104 del método 100 en la figura 1. En algunas realizaciones, una función de auto-exposición de la cámara puede usarse para determinar

varios ajustes de la cámara antes de generar una imagen de la muestra procesada. En una manera similar que una función de exposición automática puede usar las propiedades ópticas de la muestra para determinar un nivel de exposición óptimo, una función de auto-exposición también puede usarse para determinar los ajustes de la cámara apropiados para lograr un nivel de exposición predeterminado. En algunas realizaciones, la función de auto-exposición usa un sensor de luz de la cámara para evaluar las propiedades ópticas de la muestra procesada y determinar una velocidad de obturador apropiada de la cámara antes de abrir la abertura. La función de auto-exposición también puede usar información relacionada con la cantidad de luz predeterminada y/o el tamaño de abertura en determinar el período de tiempo en el que la abertura debe estar abierta.

En otra realización de la divulgación, la cámara puede incluir un sensor que mide la luz recolectada en tiempo real, tal que la cámara puede responder activamente cerrando la abertura cuando la cantidad de luz predeterminada se ha recolectado. Por consiguiente, tal realización puede incluir: (i) abrir la abertura; (ii) detectar por un sensor una cantidad de luz recolectada por la cámara; (iii) determinar si la cantidad de luz recolectada por la cámara es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada; y (iv) cerrar la abertura después de determinar que la cantidad de luz predeterminada se ha recolectado por la cámara. Además, el sensor puede ser sensible o selectivamente sensible a cualquier intervalo de longitudes de onda aplicables para una aplicación particular. Un sensor de este tipo puede medir continuamente la cantidad de luz que entra en la abertura o puede medir la cantidad de luz recolectada a través de la abertura en una pluralidad de puntos de tiempo discretos después de abrir la abertura a fin de tomar mediciones intermitentes de la cantidad de luz recolectada. Cuando el sensor ha determinado que la cantidad de luz predeterminada se ha recolectado a través de la abertura, el sensor puede estar configurado para cerrar la abertura a modo de un controlador, un interruptor, un componente mecánico, u otro elemento de la cámara.

En todavía otra realización, la abertura puede abrirse una pluralidad de veces (es decir, para generar una pluralidad de imágenes). Esto puede ser particularmente deseable en casos en los que la cámara carece de una función de auto-exposición o de otra manera es incapaz de determinar el período de tiempo o tamaño de abertura requerido para recolectar la cantidad de luz predeterminada durante una primera apertura de la abertura. En una realización particular, la cámara puede abrir su abertura para tomar una primera imagen preliminar de la muestra, y luego usar la información acerca de la primera imagen para ajustar los ajustes de la cámara para una segunda imagen o imagen subsecuente. En tal realización, la apertura de la abertura puede incluir: abrir la abertura durante un período de tiempo para recolectar una cantidad de luz de la muestra procesada; medir la cantidad de luz recolectada de la muestra procesada; determinar si la cantidad de luz recolectada de la muestra procesada es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada; abrir la abertura durante un segundo período de tiempo si la cantidad de luz recibida de la muestra no es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada, en la que el segundo período de tiempo es diferente al primer período de tiempo; y correlacionar el segundo período de tiempo en el que la abertura está abierta con la cantidad de luz predeterminada para obtener la concentración de un analito o proteína total en una muestra. El segundo período de tiempo puede determinarse basado en un análisis de la cantidad de luz recolectada de la muestra durante la primera apertura de la abertura. Por ejemplo, la cámara puede usar un algoritmo que correlaciona un período de tiempo en el que la abertura está abierta y una cantidad de luz recolectada de la muestra procesada, y el método puede incluir además determinar, basado en el primer período de tiempo y la primera cantidad de luz recolectada, un segundo período de tiempo que permitiría que la cámara recolecte la cantidad de luz predeterminada de la muestra.

En algunas realizaciones, la cámara puede usar un procedimiento iterativo para recolectar la cantidad de luz predeterminada. En tal caso, la abertura puede abrirse una pluralidad de veces, en el que cada período de tiempo sucesivo es diferente al período de tiempo previo. El período de tiempo en el que la abertura está abierta puede aumentar o disminuir iterativamente en una cantidad de tiempo predeterminada (es decir, un "paso" iterativo). Adicional o alternativamente, puede usarse un algoritmo para determinar la magnitud y/o dirección de los cambios iterativos en el período de tiempo en el que la abertura está abierta. Esto puede permitir que las imágenes sucesivas tomadas por la cámara converjan en la cantidad de luz predeterminada.

Adicional o alternativamente, la cámara puede abrir la abertura un número de veces por diferentes períodos de tiempo, a fin de tomar imágenes en un intervalo de niveles de exposición. La pluralidad de imágenes producidas por la cámara pueden someterse a procesamiento posterior para determinar qué imagen se produjo con la cantidad de luz predeterminada. En tal realización, la medición del período de tiempo en el que la abertura está abierta puede incluir medir el brillo, color, u otra característica de una pluralidad de imágenes, y seleccionar de la pluralidad de imágenes una imagen lo más fiel posible al nivel de exposición predeterminado (por ejemplo, la imagen producida a través de la recolectada de la cantidad de luz predeterminada). El período de tiempo en el que la abertura está abierta asociado con esta imagen puede usarse entonces para correlacionar la velocidad del obturador con una concentración de un analito o proteína total en la muestra.

El período de tiempo medido puede usarse para cuantificar una concentración de un analito o proteína total en la muestra procesada. En algunas realizaciones, el período de tiempo medido puede mostrarse en una pantalla o interfaz de usuario de la cámara. En otras realizaciones, el período de tiempo medido y/o velocidad del obturador puede transmitirse a un dispositivo informático, una memoria, un ordenador remoto, un servidor, u otro sistema por ejemplo para análisis, procesamiento, o correlación adicionales.

En algunas realizaciones, los métodos de la divulgación incluyen además correlacionar el período de tiempo en el que la abertura está abierta con la cantidad de luz predeterminada para obtener la concentración de un analito o proteína total en la muestra. Una realización de este tipo se ilustra en el paso 105 de un método 100 en la figura 1.

5 Tal como se describe anteriormente en relación con el paso 101, la muestra puede ponerse en contacto con un reactivo colorimétrico para obtener una muestra procesada, que puede mostrar grados variables de coloración dependiendo de la concentración de un analito diana o proteína total presente en la muestra. Por ejemplo, muestra tres muestras que contienen reactivos colorimétricos sin creatinina, y tres muestras procesadas que contienen reactivos colorimétricos y 2000 mg/dl de proteína y 1000 mg/dl de creatinina. Usando los métodos de la divulgación, la concentración de creatinina o proteína total en la muestra procesada puede estimarse al medir una coloración, brillo, cromacidad, intensidad, opacidad, u otra propiedad óptica de la muestra, por ejemplo, al tomar una imagen de la muestra procesada.

15 En ciertas realizaciones de la divulgación, si las propiedades ópticas de las imágenes producidas se predeterminan (por ejemplo, se recolecta una cantidad de luz uniforme para producir cada imagen), medir varios ajustes de la cámara que producen al imagen puede permitir que un usuario estime la concentración de un analito o proteína total en una muestra. Por ejemplo, en lugar de usar ajustes de la cámara idénticos para tomar imágenes de coloración variable, en donde la coloración de las imágenes es indicativa de la concentración del analito o proteína total en la muestra, pueden tomarse imágenes idénticas de diferentes muestras, y los ajustes de la cámara usados para lograr las imágenes idénticas pueden ser indicativos de la correlación de un analito o proteína total. En un ejemplo, la exposición de la imagen (es decir, la cantidad de luz recolectada de la muestra) puede permanecer constante, mientras que se mide la velocidad del obturador. La medición del período de tiempo en el que la abertura está abierta reflejado por la velocidad del obturador, puede usarse para determinar la concentración de analito o proteína total en la muestra procesada.

25 La figura 3B muestra las seis imágenes generadas al recolectar una cantidad de luz predeterminada de las seis muestras mostradas en la figura 3A. Cada imagen que representa una muestra de la figura 3A se sitúa en la ubicación correspondiente en la figura 3B (es decir, la imagen izquierda superior en la figura 3B corresponde a la muestra izquierda superior en la figura 3A, etc.). Tal como se muestra en la figura 3B, las seis imágenes producidas por la cámara se ven sustancialmente del mismo color, brillo, y/o exposición a pesar de las diferencias de coloración observadas en las muestras. Esto es debido a que la cámara abre la abertura durante un período de tiempo diferente para cada imagen (568, 436, 252, 782, 1224, y 598 milisegundos tal como se muestra en la figura) a fin de producir una imagen de idéntico color y/o exposición independientemente del color de la muestra original.

35 Un experto en la técnica reconocerá que el período de tiempo en el que la abertura está abierta variará dependiendo de las características de la cámara y la muestra procesada de la cual van a obtenerse imágenes. Por ejemplo, en ciertas realizaciones del método de la divulgación, el período de tiempo puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 ms a aproximadamente 10 segundos, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 ms a aproximadamente 5 s, o aproximadamente 0,1 ms a aproximadamente 1 s, o aproximadamente 1 ms a aproximadamente 10 s, o aproximadamente 1 ms a aproximadamente 5 s, o aproximadamente 10 ms a aproximadamente 10 s, o aproximadamente 10 ms a aproximadamente 5 s, o aproximadamente 100 ms a aproximadamente 10 s, o aproximadamente 100 ms a aproximadamente 1 s.

45 La figura 4A muestra imágenes de las muestras generadas por una cámara para otra serie de muestras procesadas incluyendo un reactivo colorimétrico y cantidades conocidas de creatinina que varían de 0 a 2000 mg/dl. Similar a las imágenes en la figura 3B, estas imágenes se tomaron al recolectar una cantidad de luz predeterminada de las muestras, produciendo de esta manera imágenes de sustancialmente el mismo color y/o exposición. Tal como es evidente en las imágenes, las muestras que contienen más del analito (en este caso, creatinina) son más oscuras, por lo tanto requieren que la apertura se abra durante un período de tiempo más prolongado para recolectar la cantidad de luz predeterminada. La velocidad del obturador medida por la cámara puede correlacionarse con una cantidad de creatinina en la muestra, tal como se ilustra en la figura 4B, que es representativa de una curva estándar que refleja la relación entre la cantidad de un analito en una muestra y la velocidad del obturador en la cual una cámara recolecta una cantidad de luz predeterminada de una muestra.

55 En algunas realizaciones, la correlación del período de tiempo en el que la abertura está abierta con la cantidad de luz predeterminada puede incluir realizar un análisis de regresión. En tal realización, pueden realizarse pruebas preliminares y puede representar gráficamente la relación experimental entre una concentración conocida del analito y la velocidad del obturador, o la proteína total y la velocidad del obturador. Una línea de regresión puede usarse para estimar una función de regresión relacionada con las dos variables, tal que los datos experimentales subsecuentes pueden interpretarse basados en la función de regresión. En tal realización, la correlación del período de tiempo en el que la abertura está abierta con la cantidad de luz predeterminada para obtener la concentración de un analito o proteína total en la muestra puede incluir usar una función de regresión para estimar la concentración del analito o proteína total en la muestra.

65 En otras realizaciones, una memoria de un dispositivo informático, controlador, procesador, servidor, u otra unidad informática asociada con la cámara puede incluir datos relacionados con una velocidad del obturador con la cantidad

de luz predeterminada para obtener la concentración de un analito o proteína total (por ejemplo, una función de regresión almacenada). En tales realizaciones, la correlación del período de tiempo en el que la abertura está abierta con la cantidad de luz predeterminada puede incluir determinar la concentración de un analito o proteína total por medio de un dispositivo informático. Tal determinación puede realizarse basada en al menos una de las especies de analito, las especies de reactivo colorimétrico, y/o un período de tiempo medido en el que la abertura está abierta. Tal determinación también puede realizarse basada en el contenido de proteína, la especie de reactivo colorimétrico, y/o un período de tiempo medido en el que la abertura está abierta. Después de la determinación de la concentración del analito o la proteína total, la cantidad puede mostrarse en una pantalla o interfaz de usuario de la cámara o un dispositivo asociado con la cámara. En otras realizaciones, la concentración del analito o la proteína total puede transmitirse a un dispositivo informático, procesador, una memoria de la cámara, una memoria del dispositivo informático, o un ordenador remoto, a un servidor u otro sistema para análisis, procesamiento o diagnóstico adicionales.

Tal como se explica en lo anterior con referencia al método 100 representado en la figura, en algunas realizaciones el tamaño de la abertura de la cámara puede mantenerse constante y la apertura de la abertura puede incluir abrir la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar la cantidad de luz predeterminada. La medición de la concentración de un analito o proteína total en una muestra preparada puede incluir entonces medir el período de tiempo en el que la abertura está abierta para recolectar la cantidad de luz predeterminada. El período de tiempo medido puede recolectarse entonces con la cantidad de luz predeterminada para obtener la concentración de un analito, o proteína total de la muestra.

En otra realización, el período de tiempo en el que la abertura está abierta (es decir, la velocidad del obturador) puede permanecer constante. En tal realización, el tamaño de la abertura puede variarse para cada imagen, y el tamaño de la abertura puede medirse para determinar la concentración de un analito o proteína total en la muestra. Por ejemplo, el período de tiempo puede oscilar de aproximadamente 0.1 ms a aproximadamente 10 segundos, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 ms a aproximadamente 5s, o aproximadamente 0.1 ms a aproximadamente 1s, o aproximadamente 1 ms a aproximadamente 10s, o aproximadamente 1 ms a aproximadamente 5s, o aproximadamente 10 ms a aproximadamente 10s, o aproximadamente 10 ms a aproximadamente 5s, o aproximadamente 100 ms a aproximadamente 10 s, o aproximadamente 100 ms a aproximadamente 1 s. En estas realizaciones, la cantidad de luz predeterminada cuando la abertura numérica es, por ejemplo, de entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 0.99, entre aproximadamente 0.055 y 0.9, o entre aproximadamente 0.1 y 0.5.

La figura 5 ilustra un diagrama de flujo de tal método 500 (no según la invención) para medir una concentración de un analito y/o concentración de proteína total en una muestra.

Los pasos 501 y 502 del método 500 pueden incluir pasos similares a los pasos 101 y 102 del método 100, tal como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, poner en contacto la muestra con un reactivo colorimétrico (101, 501) y enfocar la cámara (102, 502) pueden llevarse a cabo sustancialmente de la misma manera que en el método 100. El método 500 puede incluir además abrir la abertura durante un período de tiempo discreto, en el que el tamaño de la abertura se relaciona con la concentración del analito o proteína total en la muestra. Por ejemplo, el paso 503 incluye abrir la abertura durante un período de tiempo predeterminado, en el que el tamaño de la abertura es suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra. El tamaño de la abertura que permite que la cámara recolecte la cantidad de luz predeterminada durante el período de tiempo en el que la abertura está abierta puede medirse entonces tal como se representa en el paso 504.

Un tamaño de abertura óptima (es decir, un tamaño de abertura que permite que la cámara recolecte la cantidad de luz predeterminada en el período de tiempo predeterminado) puede determinarse por una función de exposición automática, tal como se describe anteriormente en relación con la velocidad del obturador. En tal realización, la apertura de la abertura durante un período de tiempo puede incluir usar una función de exposición automática para abrir la abertura tal que el tamaño de la abertura es suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra. Por consiguiente, la medición del tamaño de la abertura puede incluir determinar el tamaño de la abertura usando la función de exposición automática. Tal como se describe anteriormente, tal determinación puede basarse en las propiedades ópticas de la muestra procesada y/o al menos uno de los períodos de tiempo y la cantidad de luz predeterminada.

Adicional o alternativamente, los métodos que implican medir el tamaño de la abertura pueden incluir tomar una pluralidad de imágenes para recolectar la cantidad de luz predeterminada. En algunas realizaciones, la cámara puede incluir un sensor, y el método puede incluir: (i) abrir la abertura para recolectar una cantidad de luz de la muestra, en el que la abertura incluye un primer tamaño de abertura; (ii) cerrar la abertura; (iii) medir la cantidad de luz recolectada de la muestra procesada por el sensor; (iv) determinar si la cantidad de luz recolectada de la muestra es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada; (v) abrir la abertura durante un segundo período de tiempo si la cantidad de luz recibida de la muestra no es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada, en el que la abertura tiene un segundo tamaño de abertura, en el que el segundo tamaño de abertura es diferente al primer tamaño de abertura; y (vi) correlacionar el segundo tamaño de abertura de la abertura con la concentración del analito o proteína total en la muestra. Tal enfoque puede usar una primera apertura de la

abertura para dirigir la segunda apertura o la subsecuente apertura de la abertura, usando un algoritmo, un enfoque iterativo, cualquiera de los métodos descritos en relación con la velocidad del obturador, o algún otro procedimiento.

El método 500 puede incluir correlacionar el tamaño de la abertura con la concentración del analito o proteína total en la muestra tal como se representa en el paso 505. La correlación del tamaño de la abertura con la cantidad del analito o proteína total puede incluir comparar un tamaño de abertura medida con una curva estándar para estimar la cantidad del analito o la proteína total. Una curva estándar de este tipo puede generarse obteniendo imágenes de una serie de muestras que contienen una cantidad conocida de un analito o proteína total y representando gráficamente los tamaños de abertura medidos de cada muestra con respecto a la concentración conocida. Tal como se describe anteriormente, una línea de regresión puede usarse para estimar una función de regresión que vincula las dos variables, tal que los datos experimentales subsecuentes pueden interpretarse basados en la función de regresión que vincula, por ejemplo, el tamaño de la abertura medido y la concentración de un analito o proteína total.

En algunas realizaciones, los métodos 100 y 500 pueden incluir determinar una concentración tanto del analito como la proteína total en la muestra. La cantidad de proteína total en la muestra puede estimarse a través de un análisis de una imagen de la muestra, por ejemplo, una imagen generada cuando la luz se recolecta por la cámara para la medición de la concentración de un analito. Este procedimiento puede incluir generar una imagen de la muestra procesada por la cámara (pasos 106 y 506); medir un número de píxeles que se correlaciona con el precipitado de proteína en la imagen (pasos 107 y 507); y correlacionar el número de píxeles con una curva estándar para obtener la concentración de proteína total en la muestra (pasos 108 y 508).

En una realización, la medición de la cantidad de un precipitado de proteína incluye realizar un análisis visual de una imagen de la muestra procesada generada por la cámara. Una imagen de la muestra procesada puede generarse durante varios pasos del método, por ejemplo, cuando la abertura de la cámara se abre para recolectar la cantidad de luz previamente determinada. La imagen puede generarse al recolectar luz y registrarla como una imagen usando un sensor de luz de la cámara, tal como se describe anteriormente.

Una imagen del precipitado de proteína puede incluir glóbulos de la proteína precipitada que pueden presentarse en varias cantidades en una imagen dependiendo de la concentración de la proteína en la muestra. La figura 6A muestra imágenes experimentales de las muestras procesadas que contienen entre 0-1000 mg/dl de proteína. Tal como se observa en la figura 6A, las proteínas pueden ser visibles a simple vista, y se presentan como interrupciones en una imagen de la exposición o coloración de otra manera uniforme. En algunas realizaciones, las imágenes del precipitado de proteína, tal como las imágenes observadas en la figura 6A, pueden ser las mismas imágenes usadas para medir la concentración del analito (es decir, las imágenes producidas cuando se recolecta la cantidad de luz predeterminada de la muestra). Adicional o alternativamente, pueden generarse imágenes separadas para la cuantificación de proteínas, y el método puede incluir abrir la abertura para recolectar una segunda cantidad de luz de la muestra procesada y/o generar una imagen de la muestra procesada.

El método puede incluir procesar las imágenes del precipitado de proteína. En algunas realizaciones, las imágenes del precipitado de proteína pueden someterse a procesamiento posterior para aumentar la claridad de las imágenes, aumentar el contraste, aumentar el enfoque, o facilitar la cuantificación de las proteínas. Por ejemplo, la cámara puede acoplarse o comunicarse con un dispositivo informático, que incluye un controlador, procesador, memoria u otros componentes. El procesamiento posterior puede incluir usar un programa de procesamiento de imágenes en un dispositivo informático, o ejecutar instrucciones almacenadas en una memoria del dispositivo informático. Adicional o alternativamente, los aspectos de la imagen pueden ajustarse manualmente por el usuario de la cámara al interactuar con una interfaz de usuario de la cámara o dispositivo informático asociado.

En algunos casos, puede usarse un análisis visual para cuantificar la cantidad de precipitado de proteína en una muestra. En una realización, el método puede incluir realizar un análisis a simple vista de una imagen producida por la cámara para medir la concentración de precipitado de proteína en la muestra. Por ejemplo, un usuario del método puede observar la imagen y contar los glóbulos de la proteína precipitada, estimar un área de la imagen que incluye el precipitado de proteína, o realizar algún otro análisis a simple vista.

En algunas realizaciones, un algoritmo, programa, o software puede usarse para cuantificar el precipitado de proteína en la muestra procesada. En algunas realizaciones, un dispositivo informático acoplado a o en comunicación con la cámara ejecuta instrucciones (por ejemplo, instrucciones almacenadas en una memoria del dispositivo informático) a fin de medir una cantidad de precipitado de proteína en la muestra procesada. Tales instrucciones pueden ejecutarse por un procesador del dispositivo informático a fin de automatizar una porción de la medición descrita en lo anterior en relación a las técnicas a simple vista. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar configuradas para medir la cantidad del precipitado de proteína en la muestra procesada al medir o al determinar un número de píxeles que se correlaciona con el precipitado de proteína (por ejemplo, corresponde a los glóbulos del precipitado de proteína o un área de la imagen que consiste en un precipitado de proteína) en una imagen de la muestra procesada. Adicional o alternativamente, las instrucciones pueden provocar que el dispositivo informático mida una cantidad de un precipitado de proteína en la muestra procesada al medir un área de una imagen de la muestra procesada que incluye el precipitado de proteína. La medición del área que incluye el precipitado de

proteína puede incluir determinar un número de píxeles de una imagen que se relaciona con el precipitado de proteína. La diferenciación del precipitado de proteína del fondo de la imagen puede incluir analizar un valor numérico asociado con los píxeles. Por ejemplo, cada píxel en una imagen puede incluir un valor que corresponde a una cantidad de luz recolectada, un nivel de intensidad, brillo, coloración, escala de grises, u otra propiedad óptica del píxel (por ejemplo, un píxel en la imagen de 8-bit puede ser representada por un número de entre 0 y 255, donde 0 corresponde al negro y 255 corresponde al blanco). En un ejemplo particular, un valor umbral puede establecerse tal que se considera que los píxeles con un valor más alto que el umbral comprenden el precipitado de proteína, mientras que aquellos con un valor más bajo que el valor umbral se considera como fondo. En tal caso, la determinación de un número de píxeles que se relaciona con el precipitado de proteína puede incluir determinar un número de píxeles que están por encima o por debajo de algún valor umbral.

Adicional o alternativamente, la proteína precipitada puede medirse al determinar la homogeneidad de la imagen producida. Una imagen más heterogénea (es decir, menos homogénea) puede representar una mayor cantidad de proteína precipitada, mientras que una imagen homogénea puede indicar una menor cantidad de proteína. En tal ejemplo, la homogeneidad de una imagen puede determinarse al analizar valores numéricos (por ejemplo, valores asociados con la luz recolectada, tal como se describe anteriormente) asociados con cada píxel en la imagen. En un ejemplo particular, la determinación de la homogeneidad de la imagen puede incluir calcular una desviación estándar de los valores asociados con cada píxel en la imagen, en el que una desviación estándar más alta puede ser el resultado de una cantidad más alta de proteína precipitada (y viceversa).

La figura 6B muestra una gráfica de la relación entre la concentración de proteína en una muestra y la cantidad medida de precipitado de proteína en una imagen de la muestra procesada. La "respuesta", tal como se indica en la figura 6B, se refiere a la homogeneidad de la imagen, tal como se determina por el procedimiento descrito anteriormente. La cantidad de precipitado de proteína en la muestra procesada se determinó usando un software de análisis de imagen que calcula la homogeneidad de una imagen (es decir, la respuesta) y correlaciona la homogeneidad con una cantidad de proteína en la muestra de la cual se obtienen imágenes. En algunos casos, la correlación de la cantidad de un precipitado de proteína en la muestra procesada con la concentración de proteína en la muestra puede incluir realizar un análisis de regresión. En tal caso, pueden realizarse pruebas preliminares y puede representarse gráficamente la relación experimental entre una concentración conocida de la proteína y el precipitado en una imagen de la muestra. Puede usarse una línea de regresión para estimar una función de regresión que vincula las dos variables, tal que los datos experimentales subsecuentes pueden interpretarse basados en la función de regresión. En tal realización, la correlación de la cantidad del precipitado de proteína en la muestra procesada con la cantidad de proteína en la muestra puede incluir usar una función de regresión para estimar la cantidad de proteína en la muestra.

En algunas realizaciones de la descripción, la correlación de la cantidad del precipitado de proteína en la muestra procesada a la cantidad de proteína en la muestra usa una ecuación cuadrática multivariante tal como se proporciona en la figura 11A. Las múltiples imágenes del precipitado de proteína se obtienen de diferentes ubicaciones dentro de la muestra en el paso 1. Después en el paso 2, las imágenes se procesan a través de una multitud de canales de procesamiento de imágenes que extraen características del precipitado de proteína dentro de las imágenes. En ciertas realizaciones, los canales de procesamiento de imágenes pueden incluir la corrección de ruido del sensor, mejoras de borde y contraste, detección de borde y contorno, área de contorno, la transformada de Fourier, y/o la desviación estándar. Las características extraídas a través de los canales de procesamiento de imágenes se correlacionan con la proteína en el paso 3 usando una ecuación cuadrática multivariante tal como sigue:

$$[PRO] = c_1 x_1^2 + c_2 x_1 + c_3 x_2^2 + c_4 x_2 + \dots + c_n x_n^2 + c_{n+1} x_n + c_0$$

donde x_1 es una característica de la imagen 1; x_2 es una característica de la imagen 2; x_n es una característica de la imagen n.

La figura 11B muestra una gráfica de la relación entre la concentración de proteína en la muestra en múltiples dispositivos y una característica de imagen de desviación estándar de ventana deslizante; y la figura 11C muestra una gráfica de la relación entre la concentración de proteína en una muestra en múltiples dispositivos y la característica de imagen de área de contorno promedio. La figura 11D muestra una gráfica de linealidad para un único dispositivo después de llevar a cabo una regresión cuadrática multivariante en las dos características de imagen.

En algunas realizaciones de la divulgación, la correlación de la cantidad del precipitado de proteína en la muestra procesada con la cantidad de proteína en la muestra usa una red neural artificial tal como se proporciona en la figura 12A. Múltiples imágenes del precipitado de proteína se obtienen de diferentes ubicaciones dentro de la muestra en el paso 1. Después en el paso 2, las imágenes se procesan a través de una multitud de canales de procesamiento de imágenes que extraen características del precipitado de proteína dentro de las imágenes. En ciertas realizaciones, los canales de procesamiento de imágenes pueden incluir corrección de ruido del sensor, mejoras de contraste, y/o histogramas de la transformada de Fourier y/o la desviación estándar. Las características extraídas a través de los canales de procesamiento de imágenes se correlacionan con la proteína en el paso 3 usando una red

neural artificial. La estructura de la red neural artificial se proporciona en la figura 12B (donde x_1 es una característica de la imagen 1, x_2 es una característica de la imagen 2, x_n es una característica de la imagen n). La figura 12C muestra una gráfica de la relación entre la concentración de proteína en una muestra en múltiples dispositivos y una característica de imagen de desviación estándar de ventana deslizante de histograma; y la figura 12D muestra una gráfica de linealidad para múltiples dispositivos después de entrenar la red neural en la característica de la imagen.

En otros casos, un dispositivo informático, controlador, procesador, servidor, u otra unidad informática asociada con la cámara puede incluir datos que vinculan la concentración de un precipitado de proteína en la muestra procesada con la cantidad de proteína en una muestra. En tal realización, la correlación de la cantidad del precipitado de proteína en una imagen con la cantidad de proteína en la muestra puede incluir determinar la cantidad de proteína por medio de un dispositivo informático. Tal determinación puede realizarse basada en al menos uno del número de un número de píxeles que se correlaciona con el precipitado de proteína encontrado en la imagen, el área medida que consiste en la proteína precipitada en la imagen. Después de la determinación de la concentración de la proteína, los métodos 100 y 500 pueden incluir mostrar la concentración en una pantalla o interfaz de usuario de la cámara o un dispositivo asociado con la cámara. En otras realizaciones, la concentración de la proteína puede transmitirse a un dispositivo informático, procesador, una memoria de la cámara, o un ordenador remoto, a un servidor o a otro sistema por ejemplo, para análisis, procesamiento o diagnóstico adicionales.

En algunas realizaciones, los métodos 100 y 500 incluyen además realizar una determinación a cerca de un estado de salud del usuario basada en al menos la concentración determinada de un analito y/o proteína en la muestra. En algunos casos, un dispositivo informático (por ejemplo, un ordenador, un servidor, un procesador, o un controlador) en comunicación con la cámara puede usar la concentración determinada del analito y/o proteína para determinar un estado de salud, diagnosticar una enfermedad, expresar un factor de riesgo, u ofrecer alguna otra información acerca de la salud de un paciente. En una realización, una relación (por ejemplo, una razón) de la cantidad de proteína y analito puede ser indicativa de un estado de salud, y determinar el estado de salud puede incluir determinar si la relación del analito y creatinina es más alta o más baja que un nivel umbral. En una realización particular, el analito puede ser creatinina, y los métodos 100 y 500 pueden incluir determinar una razón de proteína:creatinina en la orina ("razón UPC") de la muestra. En tal caso, el diagnóstico de un estado de salud (por ejemplo, proteinuria) puede incluir determinar si la razón UPC está por encima o por debajo de un valor umbral. Un experto habitual en la técnica puede concebir otros estados de salud y análisis.

Se pretende que los métodos 100 y 500 de ejemplo ilustrados en las figuras 1 y 5 sean ejemplos no limitantes, ilustrativos. El paso y los pasos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo secuencialmente en paralelo. Además, el paso y los diversos pasos pueden llevarse a cabo en un orden diferente que el descrito en el presente documento y algunos pasos y pasos pueden omitirse, saltarse, y/o repetirse. Los elementos adicionales o alternativos de los métodos y componentes adicionales o alternativos de los sistemas se anticipan, como será obvio para el experto en la técnica.

La figura 7 es una ilustración de un sistema 700, por ejemplo un sistema usado en cualquiera de los métodos 100 o 500, según las realizaciones de ejemplo de la divulgación. El sistema 700 puede incluir una cámara 710, una placa 720 de muestra de múltiples pocillos, un dispositivo 730 informático (incluyendo un procesador 740 y una memoria 750), y un servidor 760. La placa 720 de múltiples pocillos puede incluir múltiples pocillos 722.

La cámara 710 puede incluir uno o más sensores de luz, tal como un dispositivo acoplado a carga (CCD), un sensor de píxeles activo (APS), un semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS), un sensor FOVEON X3®, u otro sensor. Este sensor de luz puede ser sensible a cualquier intervalo de longitudes de onda de interés para una aplicación dada, tal como se entiende por un experto habitual en la técnica. En una realización, el sensor de luz puede ser sensible a un intervalo de longitudes de onda que corresponden al espectro visual o una porción del espectro visual (es decir, longitudes de onda de entre aproximadamente 190 nm a 700 nm). Adicional o alternativamente, el sensor de luz puede ser sensible o selectivamente sensible a longitudes de onda en un intervalo de infrarrojo y/o ultravioleta. En una realización, el sensor de luz puede ser selectivamente sensible a un intervalo de longitudes de onda que corresponden a las longitudes de onda reflejadas, emitidas, transmitidas de la muestra preparada, por ejemplo, longitudes de onda que corresponden al color de la muestra preparada después de que reacciona con un reactivo colorimétrico, longitudes de onda que corresponden al espectro de emisión de un fluoróforo, u otro intervalo de longitudes de onda. Tal sensor de luz también puede ser un sensor de luz negra/blanca, tal que sustancialmente toda la luz entrante se detecta y se registra la misma en el intervalo al cual el sensor es sensible, independientemente de la longitud de onda.

La cámara 710 también puede incluir una abertura 712 y uno o más filtros 714 ópticos. El filtro óptico solo puede hacer pasar luz a través de la abertura 712 dentro de un cierto intervalo de longitud de onda. Un filtro 714 de este tipo puede estar configurado para hacer pasar o bloquear selectivamente la luz de una cierta longitud de onda o intervalo de longitudes de onda tal que solo la luz de una longitud de onda o intervalo de longitudes de onda particular se recolecta por la cámara 710. Por ejemplo, el intervalo de longitudes de onda que pasó por el filtro 714 se puede relacionar con la reflectancia, emisión, o espectro de transmitancia de la muestra procesada. Este intervalo de longitudes de onda puede corresponder al color de un reactivo colorimétrico o de un producto producido por una reacción entre la muestra y un reactivo colorimétrico. De esta manera, solo pueden registrarse las longitudes de

onda deseadas por la cámara 710, reduciendo de esta manera el ruido o contenido de imágenes innecesario. También se consideran usos adicionales o alternativos para un filtro 714 óptico.

En otra realización de ejemplo, uno o más fluoróforos en un reactivo pueden seleccionar como diana el analito o proteína total. Los fluoróforos pueden emitir luz dentro de un primer intervalo de longitud de onda específico cuando se excitan por la radiación dentro de un segundo intervalo de longitud de onda. De esta manera, en tales realizaciones, el sistema 700 puede incluir adicionalmente una fuente de excitación (por ejemplo, un láser) que emite luz dentro del segundo intervalo de longitud de onda para excitar los fluoróforos. En tal caso, el filtro puede estar configurado para bloquea todas las longitudes de onda fuera de un espectro de emisión de la muestra procesada.

Tal como se ilustra, la cámara 710 se acopla comunicativamente con el dispositivo 730 informático. Un acoplamiento comunicativo de este tipo puede implementarse usando WiFi, sobre BLUETOOTH®, o a través de interfaz alámbrica (por ejemplo, un cable USB), en varias realizaciones. De manera alternativa, en algunas realizaciones, la cámara 710 puede acoplarse al dispositivo 730 informático sobre una conexión alámbrica, tal como un interfaz de Ethernet. En algunas realizaciones, la cámara 710 puede ser una cámara unida a o integrada en un dispositivo informático móvil (por ejemplo, un teléfono celular). El dispositivo informático móvil puede acceder al Internet público para transmitir imágenes (por ejemplo, imágenes candidato o imágenes diana de las células biológicas) al dispositivo 730 informático. En algunas realizaciones, la cámara 710 puede acoplarse adicional o alternativamente de manera comunicativa con el servidor 760. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cámara 710 puede transmitir imágenes al servidor 760, el servidor 760 puede llevar a cabo el procesamiento o análisis de imágenes (por ejemplo, procesamiento posterior de las imágenes, determinaciones a cerca de la concentración de analito o proteína total en la muestra), y el servidor 760 puede transmitir entonces la información resultante al dispositivo 730 informático.

El dispositivo 730 informático, tal como se ilustra, incluye un procesador 740 y una memoria 750. La memoria 750 incluye instrucciones 752 almacenadas en la misma. La memoria 750 puede incluir una memoria volátil (por ejemplo, RAM) y/o memoria no volátil (por ejemplo, un disco duro). La memoria 750 también puede acoplarse de manera interna comunicativamente con el procesador 740. El procesador 740 puede estar configurado para ejecutar las instrucciones 752 almacenadas en la memoria 750 (por ejemplo, para llevar a cabo varias tareas de informáticas). Adicional o alternativamente, la memoria 750 puede almacenar imágenes (por ejemplo, grabadas por la cámara 710) e información relacionada con las imágenes. La memoria 750 puede almacenar además información relacionada con la concentración medida del analito o proteína en la muestra.

Las instrucciones 752 almacenadas en una memoria 750 del dispositivo informático pueden incluir instrucciones relacionadas a la ejecución de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, las instrucciones 725 pueden instruir a la cámara enfocar en la muestra procesada, abrir y/o cerrar la abertura 712, generar una imagen de la muestra (por ejemplo, una muestra situada dentro de un pocillo 722 de la placa de múltiples pocillos), medir un período de tiempo en el que la abertura 712 está abierta, y/o medir un tamaño de la abertura. Tales instrucciones 725 también pueden provocar que el dispositivo 730 informático correlacione un período de tiempo determinado y/o un tamaño de abertura con una concentración del analito o proteína total en la muestra. Adicionalmente, las instrucciones 725 pueden estar relacionadas al procesamiento de una imagen producida por la cámara 710. Por ejemplo, las instrucciones 725 pueden provocar que el dispositivo 730 informático procese una imagen de la muestra, mida la concentración del precipitado de proteína en la muestra procesada, y/o correlacione la concentración de precipitado de proteína en la muestra procesada con la concentración de la proteína en la muestra.

Ejemplo 1

Se obtuvieron las imágenes de las muestras procesadas que contenían cantidades conocidas de glucosa, albúmina y fosfatasa alcalina para obtener un brillo uniforme. Se representó gráficamente el tiempo de exposición (es decir, el período de tiempo en el que la abertura está abierta, la velocidad del obturador) de las imágenes para mostrar la relación (es decir, una curva estándar) entre el tiempo de exposición y la cantidad de analito en la muestra.

Las imágenes de unas muestras procesadas se tomaron por una cámara PL-D725MU-T USB 3.0 (PixelLINK) con un sensor de luz CMOS y un espacio de color monocromático. La cámara incluyó un lente objetivo con un aumento de 10× y una abertura numérica de 0.28. La distancia focal del lente objetivo fue 20 mm, con una profundidad de enfoque de aproximadamente 3.5 μm. Un lente de tubo con una distancia focal más larga se acopló al lente objetivo a fin de facilitar el aumento y el enfoque de la cámara. El lente de tubo tuvo una distancia focal de 200 mm. Se usó un adaptador para acoplar el/los lente(s) a la cámara en una distancia óptima para enfocar la imagen en un sensor de imagen de la cámara.

Las mediciones tomadas según el método descrito en lo anterior se muestran en las figuras 8A-C. La figura 8A ilustra una curva estándar que muestra la relación entre la cantidad de glucosa en una muestra experimental y el período de tiempo predeterminado. Esta curva se obtuvo al preparar una muestra de control negativo, muestra de glucosa 1 mM, y muestra de glucosa 20 mM. Para fijar la muestra de control negativo, se usaron los siguientes reactivos: 590 μl de agua D.I., 10 μl de peroxidasa de rábano picante (HRP), 10 μl de glucosa oxidasa, 100 μl de 4-aminoantipirina, y 100 μl de 1,7-dihidroxinaptaleno en etanol al 95 %. Para fijar la muestra de glucosa 1 mM, se usaron los siguientes reactivos: 580 μl de agua D.I., 10 μl de peroxidasa de rábano picante, 10 μl de glucosa

oxidasa, 100 µl de 4-aminoantipirina, 100 µl de 1,7-dihidroxiaptaleno en etanol al 95 %, y 10 µl de glucosa. Para fijar la muestra de glucosa 20 mM, se usaron los siguientes reactivos: 380 µl de agua D.I., 10 µl de peroxidasa de rábano picante, 10 µl de glucosa oxidasa, 100 µl de 4-aminoantipirina, 100 µl de 1,7-dihidroxiaptaleno en etanol al 95 %, y 200 µl de glucosa. Para cada portaobjetos, se añadieron 600 µl de la muestra (negativa, 1 mM, y 20 mM) y se obtuvieron imágenes para obtener la curva ilustrada en la figura 8A.

La figura 8B ilustra una curva de correlación que muestra la relación entre la cantidad de albúmina en una muestra experimental y el período de tiempo predeterminado. Esta curva se obtuvo al preparar una muestra de control negativa, 1 mg/ml de muestra de albúmina, y 5 mg/ml de muestra de albúmina. Para fijar la muestra de control negativa, se usaron los siguientes reactivos: 880 µl de tampón PBS (pH 4,2) y 120 µl de verde de bromocresol (pH 4,2). Para fijar 1 mg/ml de muestra de albúmina, se usaron los siguientes reactivos: 870 µl de tampón PBS (pH 4,2), 120 µl de verde de bromocresol (pH 4,2), y 10 µl de albúmina. Para fijar 5 mg/ml de muestra de albúmina, se usaron los siguientes reactivos: 830 µl de tampón PBS (pH 4,2), 120 µl de verde de bromocresol (pH 4,2), y 50 µl de albúmina. Para cada portaobjetos, se añadieron 600 µl de la muestra (negativa, 1 mg/ml, y 5 mg/ml) y se obtuvieron imágenes para obtener la curva ilustrada en la figura 8B.

La figura 8C ilustra una curva de correlación que muestra la relación entre la cantidad de fosfatasa alcalina en una muestra experimental y el período de tiempo predeterminado. Esta curva se obtuvo al preparar una muestra de control negativa, 1 µg/ml de muestra de fosfatasa alcalina, y 10 µg/ml de muestra de fosfatasa alcalina. Para fijar la muestra de control negativa, se usaron los siguientes reactivos: 1 ml de sustrato BCIP/NBT (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo / nitroazul de tetrazolio) y 1 ml de HCl 1 M. Para fijar 1 µg/ml de muestra de fosfatasa alcalina, se usaron los siguientes reactivos: 990 µl de sustrato BCIP/NBT, 10 µl de fosfatasa alcalina, y 1 ml de HCl 1 M para detener la reacción. Para fijar 10 µg/ml de muestra de fosfatasa alcalina, se usaron los siguientes reactivos: 900 µl de sustrato BCIP/NBT, 100 µl de fosfatasa alcalina, y 1 ml de HCl 1 M para detener la reacción. Para cada portaobjetos, se añadieron 600 µl de la muestra (negativa, 1 µg/ml, y 10 µg/ml) y se obtuvieron imágenes para obtener la curva ilustrada en la figura 8C.

Ejemplo 2

Se añadieron 165 µl de muestra de orina a 1485 µl de una solución de cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo en 300 mM de tampón de fosfato (pH 12,4) para obtener la muestra procesada. Se tomaron las imágenes de 165 µl de la muestra procesada por la cámara descrita en el ejemplo 1.

La figura 9 proporciona imágenes de las muestras generadas por una cámara que muestran una cantidad de creatinina, por ejemplo, que oscila desde 0 hasta 1000 mg/dl.

Se añadieron otros 165 µl de muestra de orina a 2475 µl de una solución de reactivo violeta de pirocatecol (violeta de pirocatecol 0,28 mM, molibdato de sodio 0,16 mM, ácido succínico 120 mM, y oxalato de sodio 1mM en agua desionizada) para obtener la muestra procesada. Se obtuvieron imágenes de 165 µl de la muestra procesada tal como se describe en lo anterior. La velocidad del obturador de la muestra procesada se compara con una curva estándar, que se obtiene representando gráficamente las velocidades del obturador contra las concentraciones de proteínas conocidas. La correlación a modo de ejemplo de la relación entre la cantidad conocida de proteína (por ejemplo, que oscila desde 0 hasta 500 mg/dl) y la velocidad del obturador medida según un método de la divulgación se proporciona en la figura 10.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiere de otra manera, la palabra "comprenden" e "incluyen" y variaciones (por ejemplo, "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye") se entenderá que implica la inclusión de un componente, característica, elemento, o paso o grupo de componentes, características, elementos o pasos citados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a", "el" y "la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera.

La descripción detallada anteriormente describe varias características y funciones de los sistemas, dispositivos, y métodos divulgados con referencia a las figuras adjuntas. Aunque se han divulgado varios aspectos y realizaciones en el presente documento, otros aspectos y realizaciones serán evidentes. Las diversas realizaciones divulgadas en el presente documento son para propósitos de ilustración solamente y no se pretende que sean limitantes, indicándose el alcance real por las siguientes reivindicaciones.

En las figuras, símbolos similares identifican habitualmente componentes similares, a menos que el contexto lo indique de otra manera. Las realizaciones ejemplares descritas en la presente y en las figuras no se proponen ser limitantes. Pueden usarse otras realizaciones, y se pueden hacer otros cambios, sin apartarse del alcance del contenido presentado en la presente. Se entenderá fácilmente que los aspectos de la descripción, como se describe en general en la presente, y se ilustra en las figuras, se puede disponer, sustituir, combinar, separar, y designar en una amplia variedad de diferentes configuraciones, todas de las cuales se contemplan explícitamente en la presente.

Se hace constar que con razón a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la presente invención, es el que resulta claro a partir de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Método de medición de una concentración de un analito o proteína total en una muestra, comprendiendo el método:
 - poner en contacto la muestra con un reactivo colorimétrico para obtener una muestra procesada;
 - enfocar una cámara que comprende una abertura en la muestra procesada;
 - abrir la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra;
 - medir el período de tiempo; y
 - correlacionar el período de tiempo con la concentración del analito o la proteína total en la muestra.
2. Método según la reivindicación 1:
 - en el que se pone en contacto la muestra con un reactivo colorimétrico y un reactivo de precipitación de proteína para obtener una muestra procesada que comprende un precipitado de proteína;
 - y que comprende las etapas adicionales de
 - determinar la concentración de proteína total al
 - generar una imagen de la muestra procesada por una cámara;
 - medir un número de píxeles que se correlaciona con el precipitado de proteína en la imagen; y
 - correlacionar el número de píxeles con una curva estándar para obtener la concentración de proteína total en la muestra.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el analito se selecciona de ion de calcio, ion de potasio, ion de cloruro, ion de sodio, glucosa, lactato, creatinina, creatina, urea, ácido úrico, etanol, albúmina, fosfatasa alcalina, colesterol, piruvato, β -hidroxibutirato, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, y acetilcolinesterasa.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, en el que el reactivo colorimétrico es 2,4,6-trinitrofenol y una base; o el reactivo colorimétrico es 3,5-dinitrobenzoato de metilo, ácido 3,5-dinitrobenzoico, o cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo, y una base o un tampón básico; o el reactivo colorimétrico comprende cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo; o el reactivo colorimétrico es un sistema de reactivos que comprende iones cúpricos, un hidroperóxido, y un tinte oxidable, opcionalmente en el que el reactivo colorimétrico es uno o más de glucosa oxidasa, hexocinasa, tartrato de cobre alcalino, ferricianuro alcalino, y peroxidasa de rábano picante, o en el que el reactivo colorimétrico es verde de bromocresol, o en el que el reactivo colorimétrico es un sistema de reactivos que comprende fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) y nitroazul de tetrazolio (NBT), o en el que el reactivo colorimétrico comprende violeta de pirocatecol, cloruro de bencetonio, y rojo de pirogalol.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, en el que la muestra es una muestra de orina.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 – 5, que comprende además generar una imagen de la muestra procesada usando la cantidad predeterminada de luz recolectada de la muestra procesada.
7. Método según la reivindicación 6, en el que se obtiene la imagen de la muestra procesada a partir de un portaobjetos que comprende la muestra procesada, opcionalmente en el que la imagen es una imagen en blanco y negro.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 – 7, que comprende además mostrar la imagen de la muestra procesada en una interfaz de usuario.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 8, en el que la cantidad de luz predeterminada puede obtenerse al llevar a cabo independientemente uno, dos, o tres experimentos empíricos usando una muestra patrón que tiene una concentración conocida del analito o la proteína total.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 9, en el que la cantidad de luz predeterminada es constante, o en el que la cantidad de luz predeterminada se selecciona por un usuario de la cámara,

opcionalmente en el que la cámara comprende un filtro, además opcionalmente en el que el filtro está configurado para hacer pasar longitudes de onda que corresponden a un intervalo de longitud de onda del color que resulta de la reacción entre el reactivo colorimétrico y la muestra.

- 5 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10, en el que la cámara comprende una función de exposición automática, y en el que la medición del período de tiempo en el que la abertura está abierta comprende determinar el período de tiempo usando la función de exposición automática.
- 10 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 11, en el que la cámara comprende un sensor, y en el que la apertura de la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra comprende:
abrir la abertura;
15 detectar por el sensor una cantidad de luz recolectada por la cámara;
determinar si la cantidad de luz recolectada por la cámara es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada; y
20 cerrar la abertura después de determinar que la cantidad de luz predeterminada se ha recolectado por la cámara.
- 25 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 11, en el que la cámara comprende un sensor, y en el que la apertura de la abertura durante un período de tiempo suficiente para recolectar una cantidad de luz predeterminada de la muestra comprende:
abrir la abertura durante un período de tiempo para recolectar una cantidad de luz de la muestra procesada;
30 cerrar la abertura;
medir la cantidad de luz recolectada de la muestra procesada por el sensor;
determinar si la cantidad de luz recolectada de la muestra procesada es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada;
35 abrir la abertura durante un segundo período de tiempo si la cantidad de luz recibida de la muestra no es sustancialmente equivalente a la cantidad de luz predeterminada, en el que el segundo período de tiempo es diferente al primer período de tiempo; y
40 correlacionar el segundo período de tiempo en el que la abertura está abierta con la cantidad de luz predeterminada para obtener la concentración del analito o proteína total en la muestra.
- 45 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 13, en el que el analito es creatinina, y que comprende además, opcionalmente, determinar la razón de proteína:creatinina de la muestra basada en al menos la concentración de creatinina en la muestra y la concentración de proteína total en la muestra.
- 50 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 14, que comprende además hacer una determinación de salud basada en al menos la concentración del analito, proteína total, o una combinación de los mismos en la muestra.

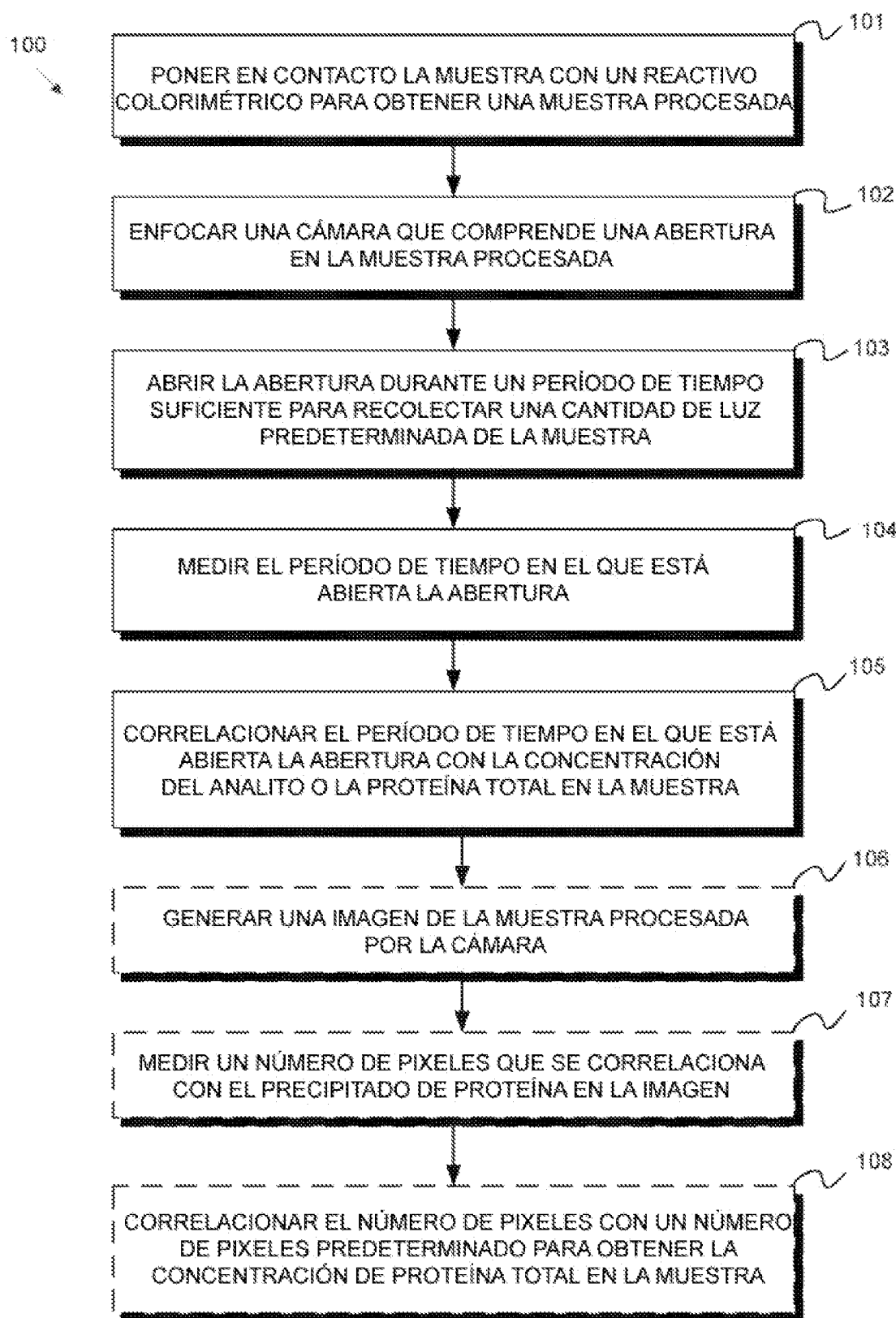


Figura 1

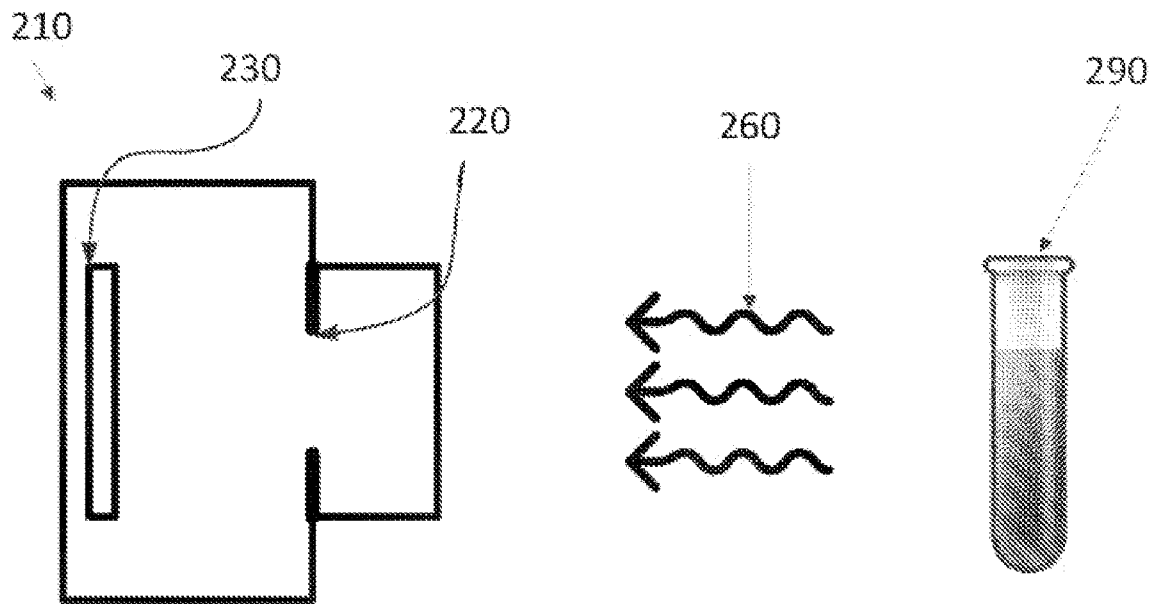


Figura 2

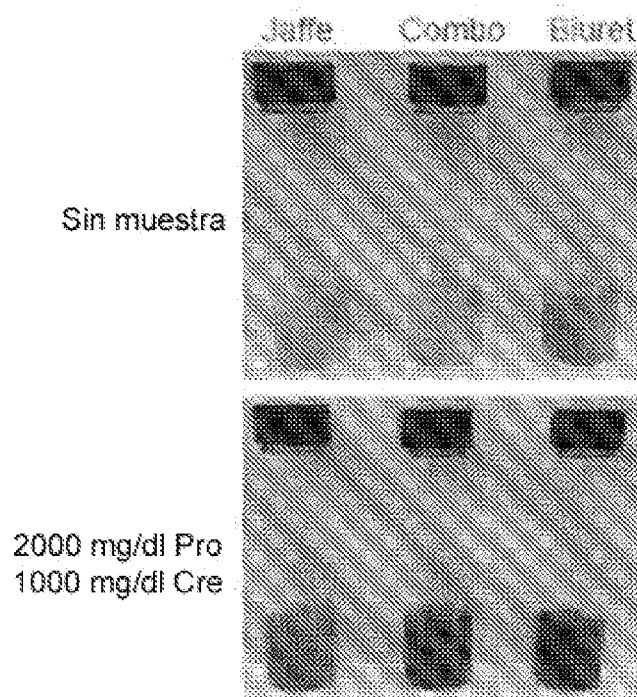


Figura 3A



Figura 3B

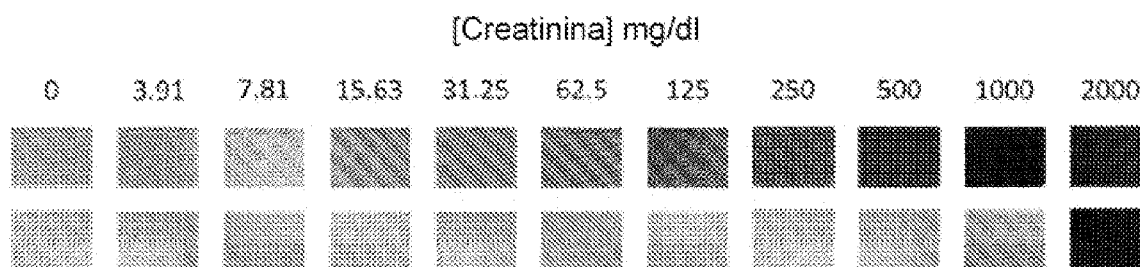


Figura 4A

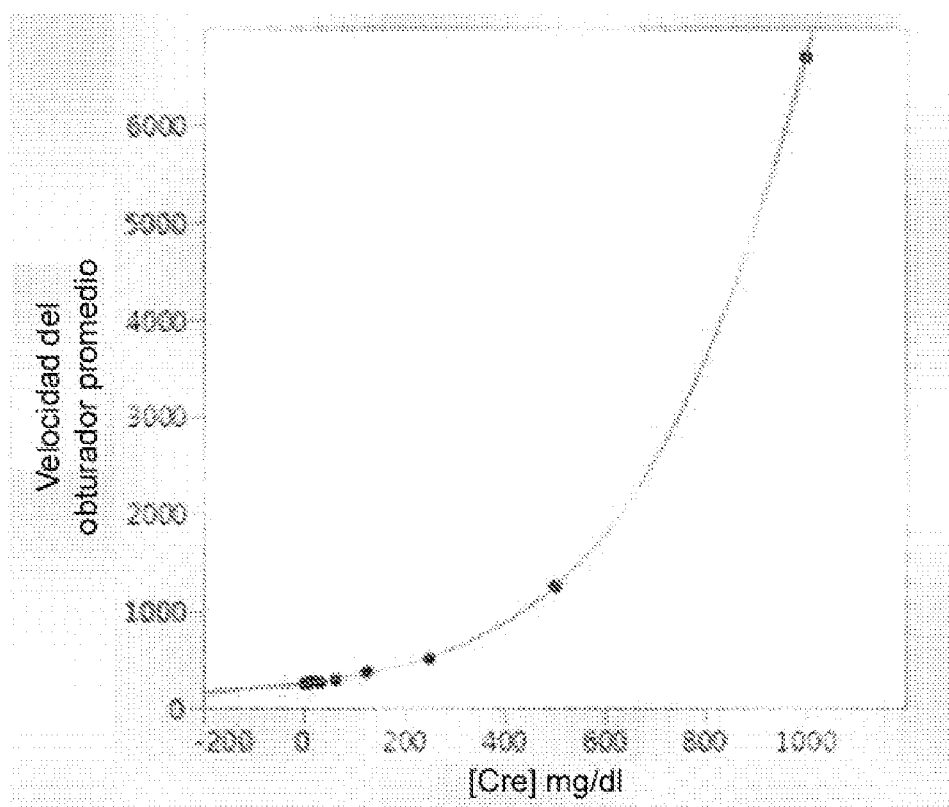


Figura 4B

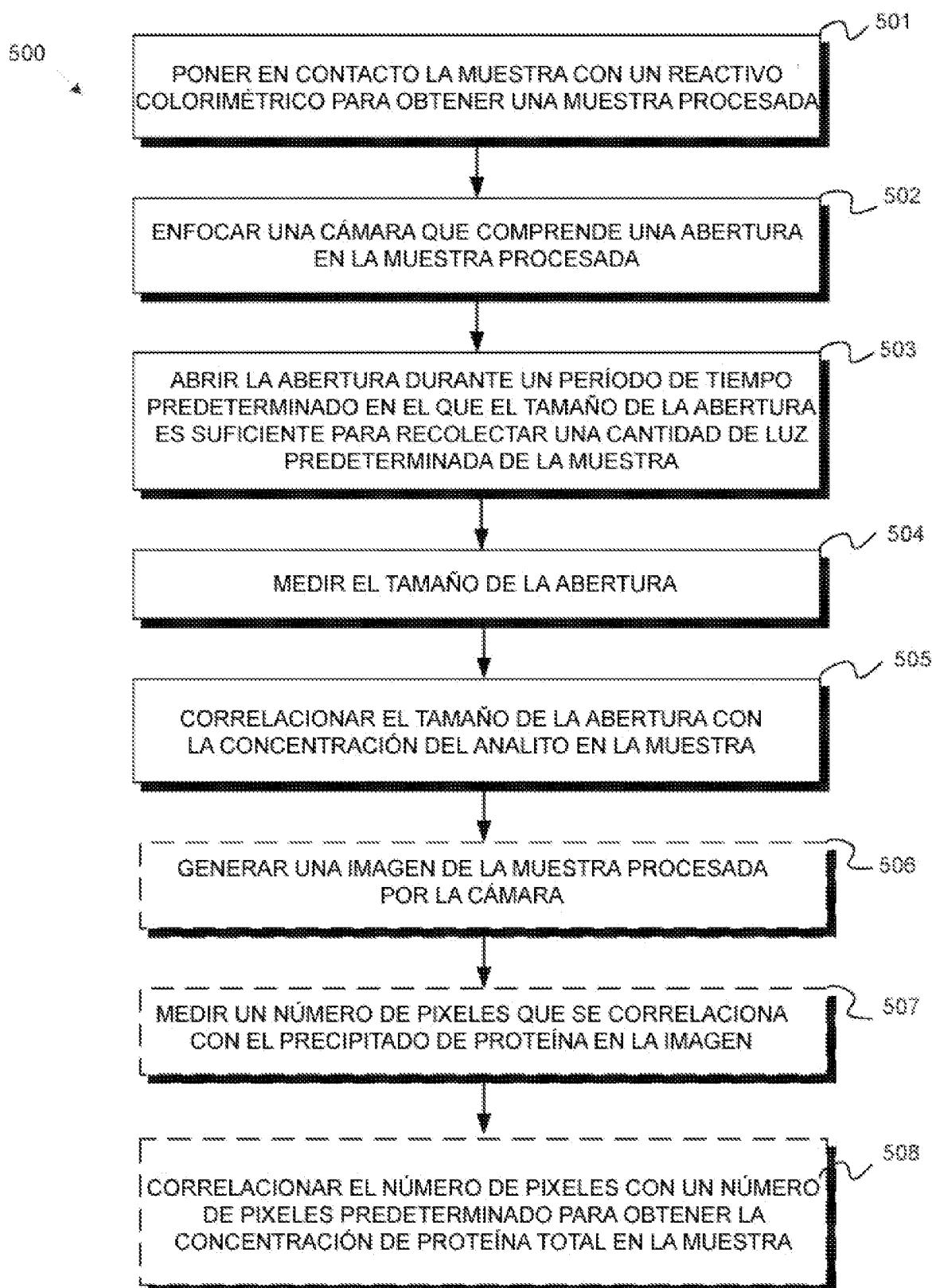


Figura 5

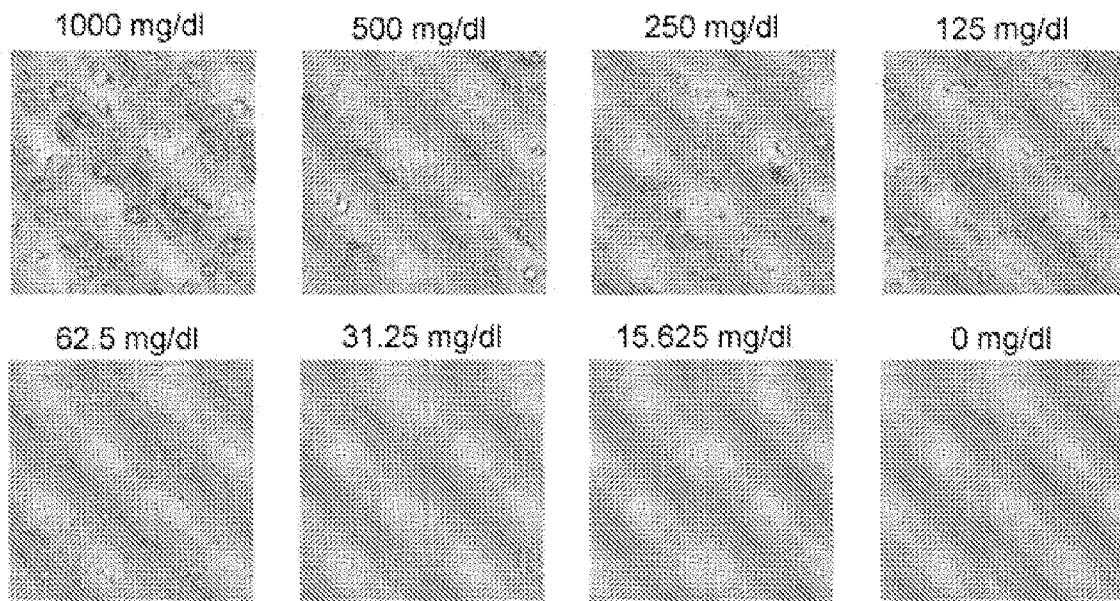


Figura 6A

Curva estándar de proteína

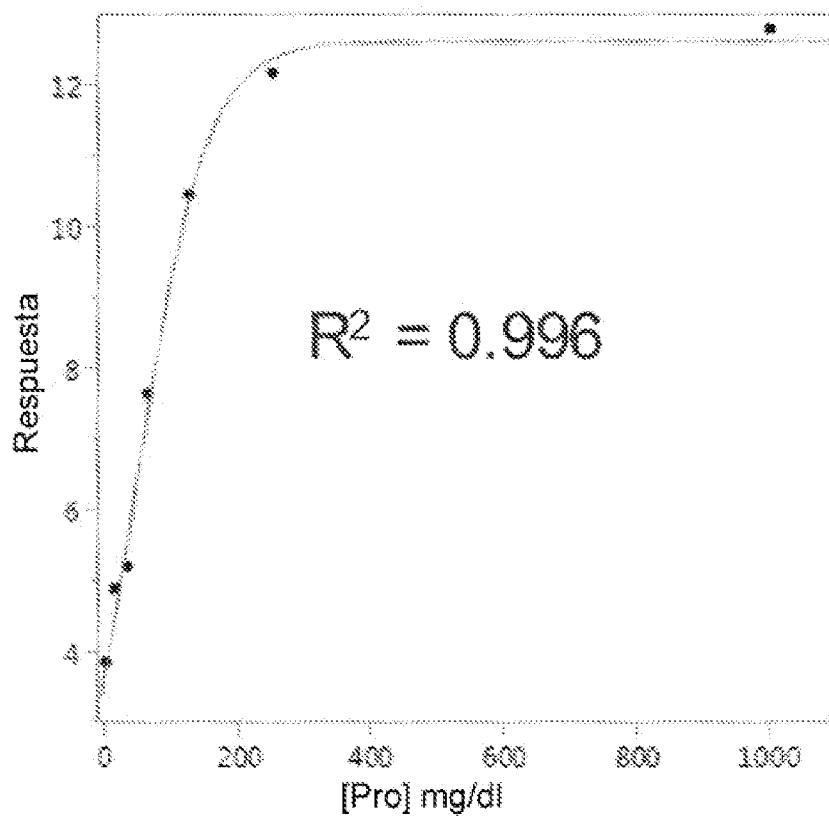


Figura 6B

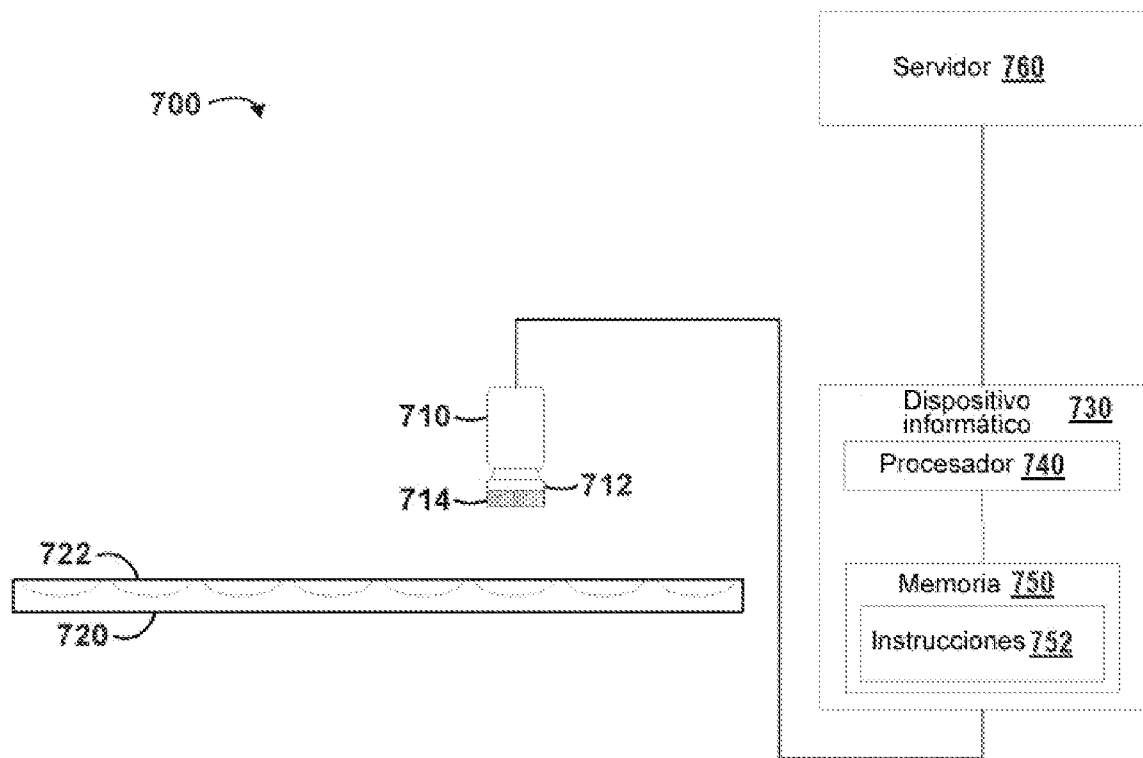


Figura 7

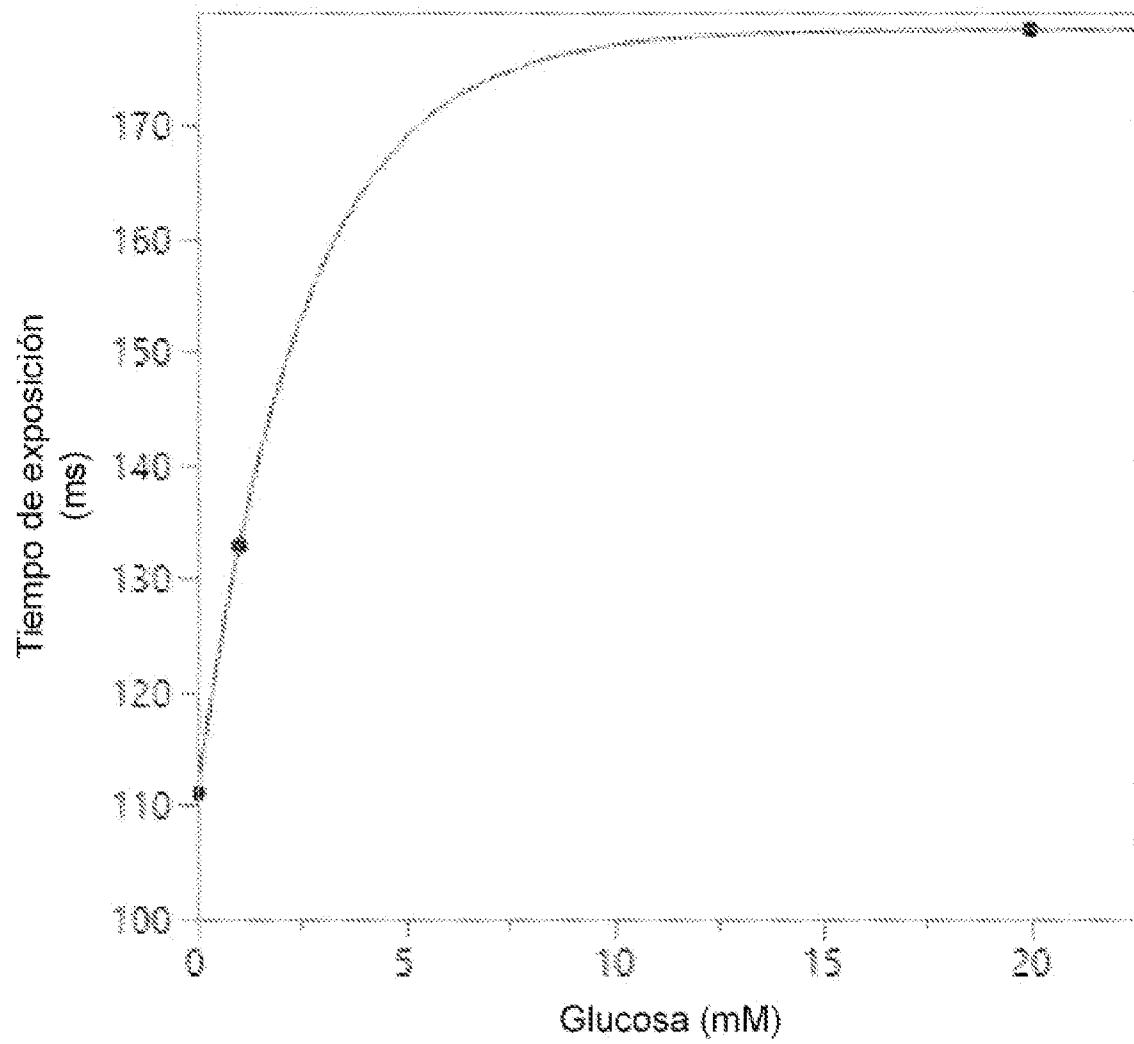


Figura 8A

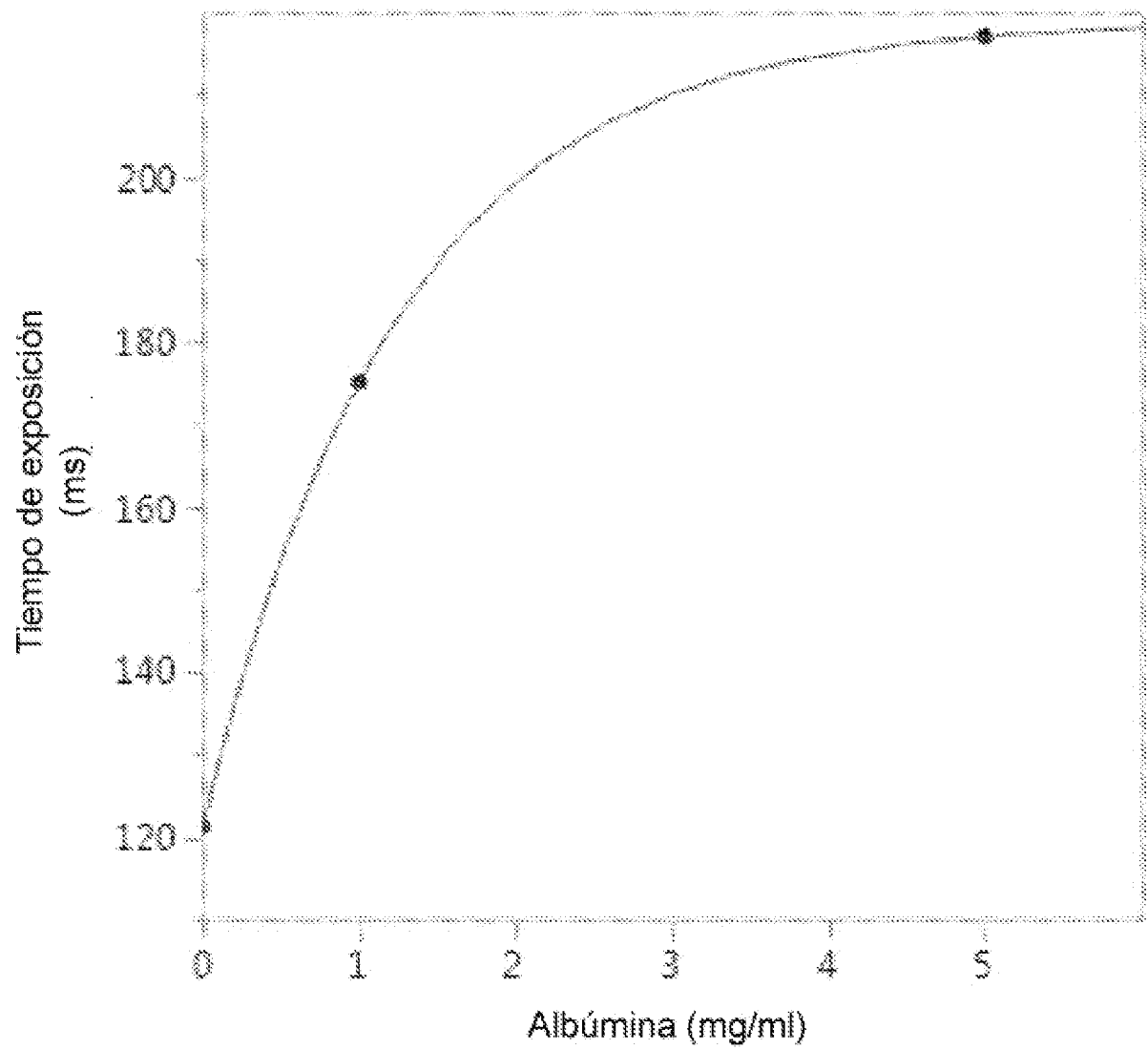


Figura 8B

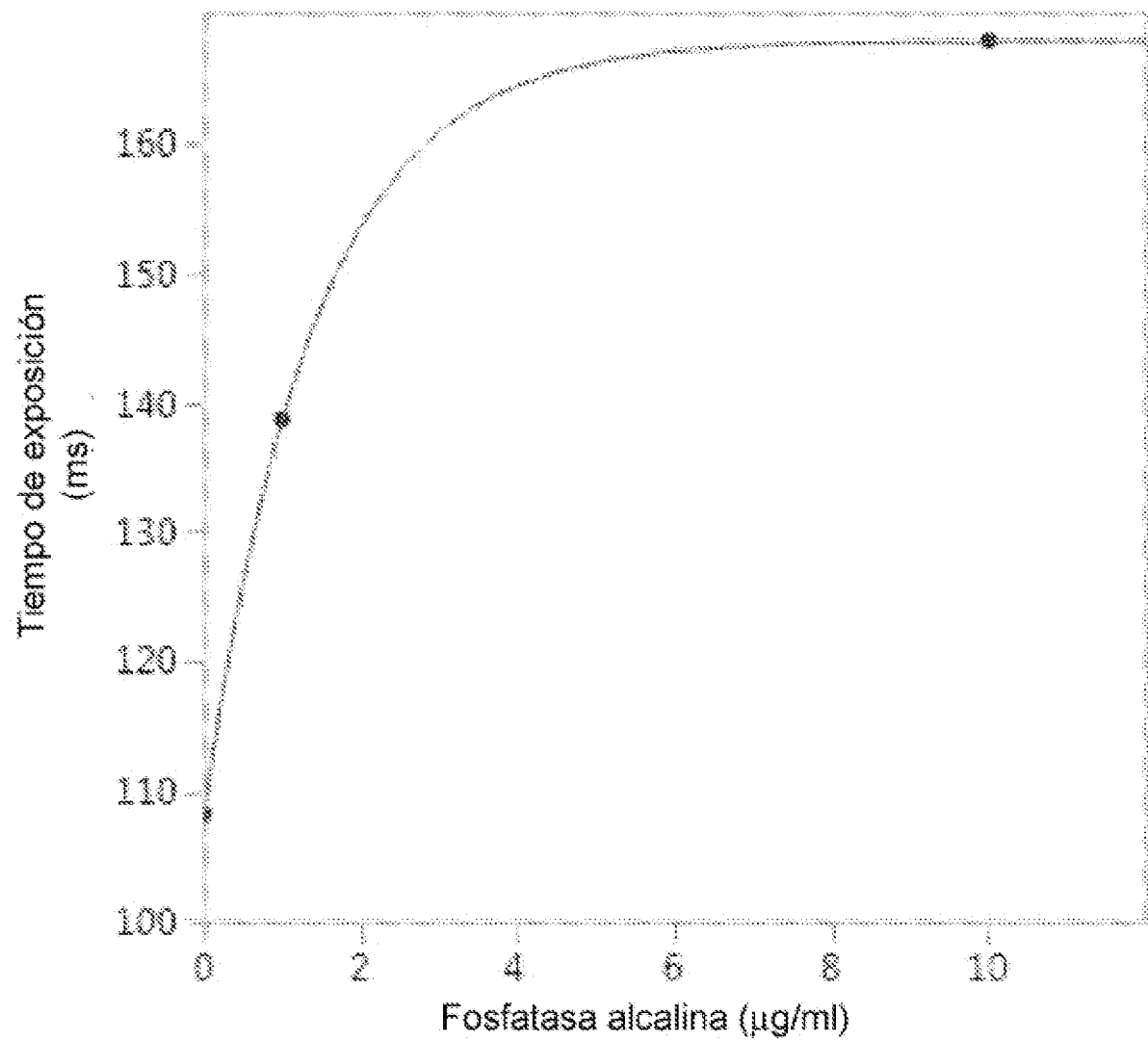


Figura 8C

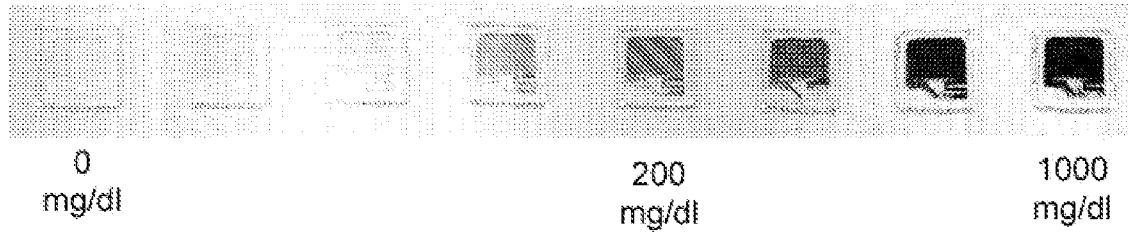


Figura 9

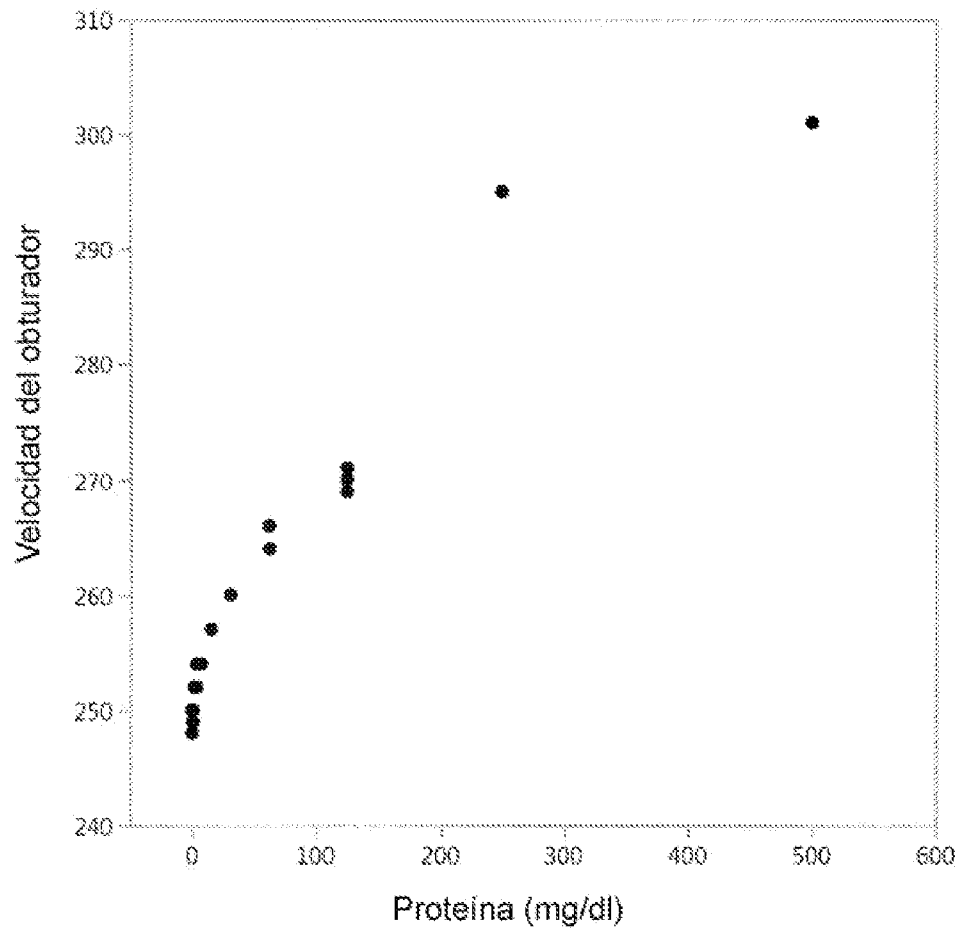


Figura 10

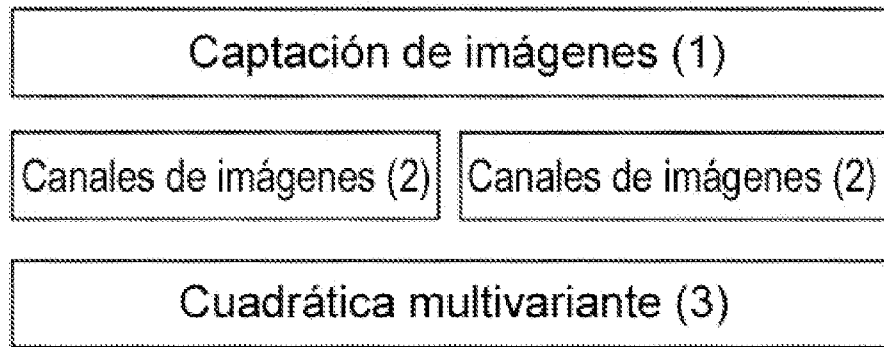


Figura 11A

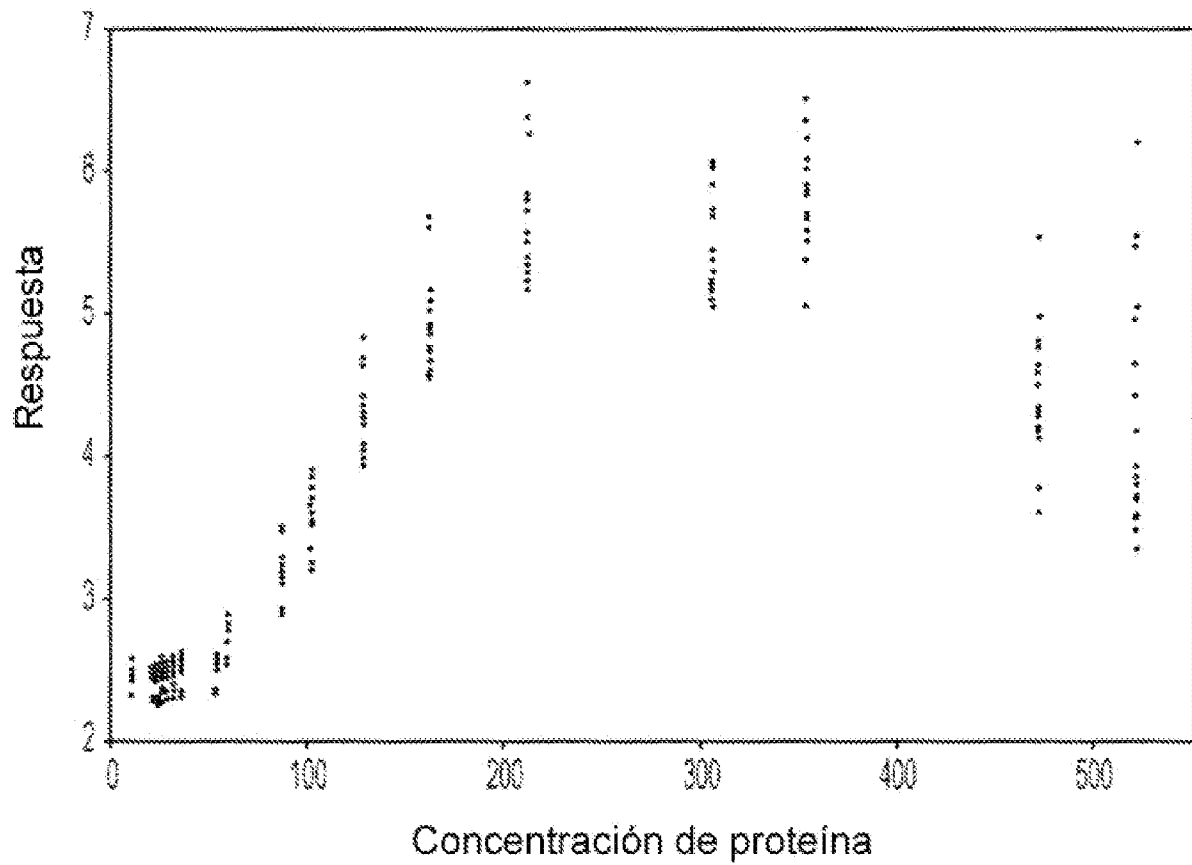


Figura 11B

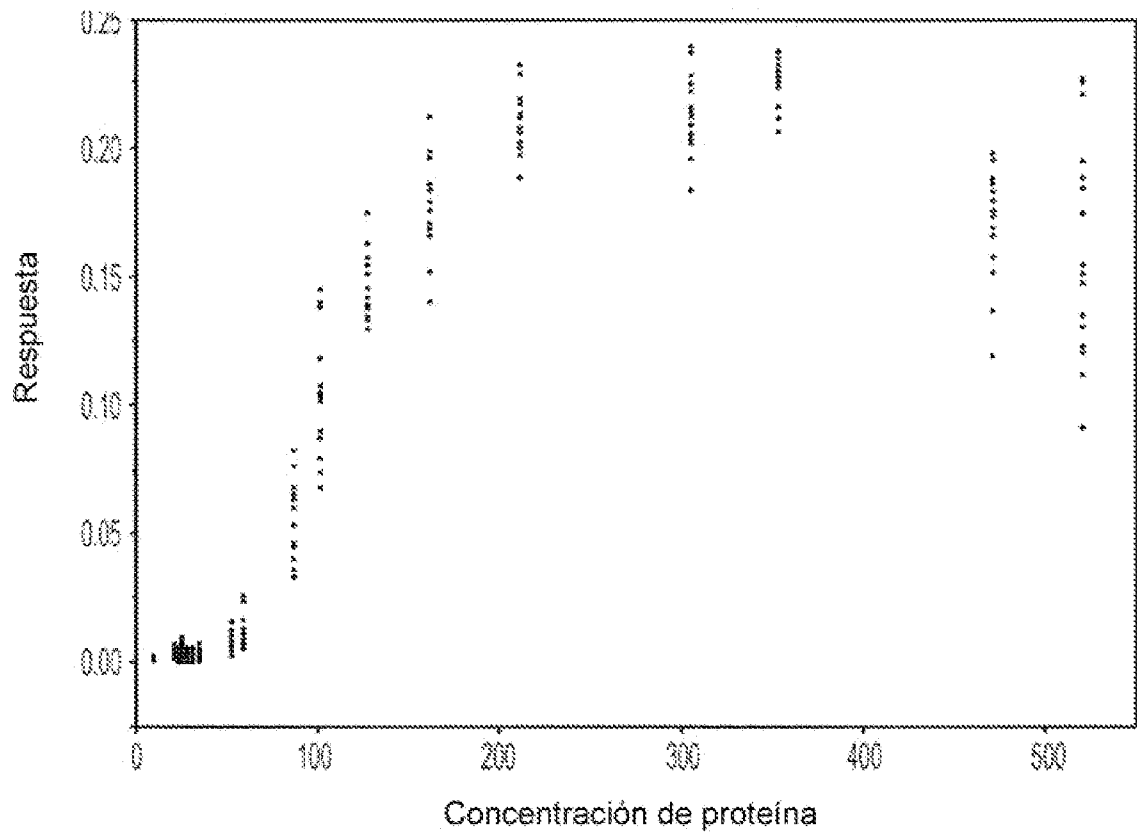


Figura 11C

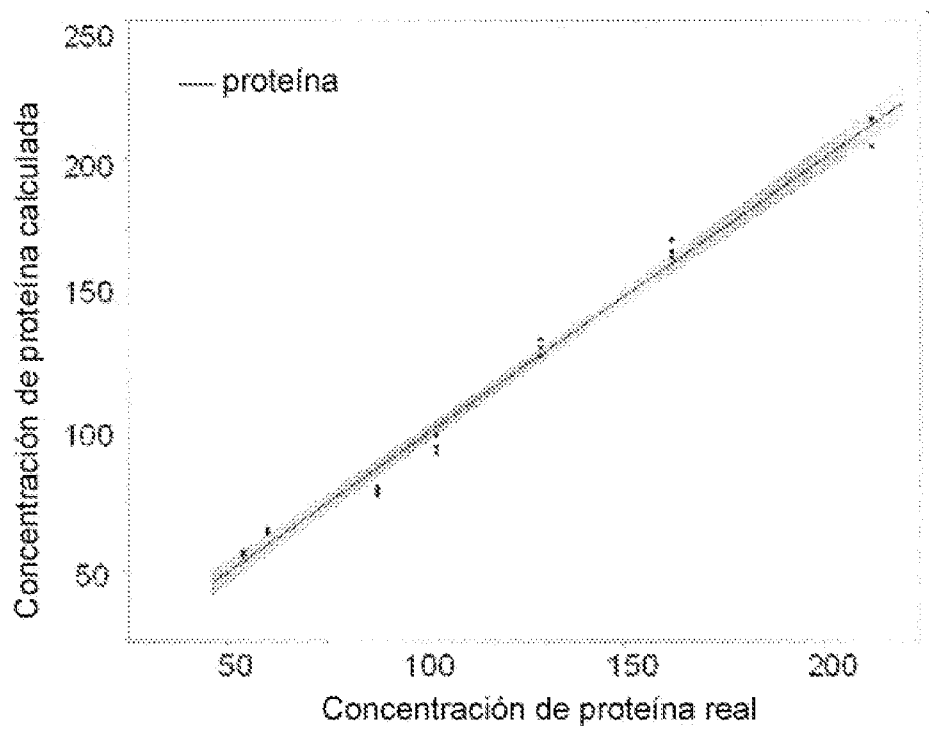


Figura 11D

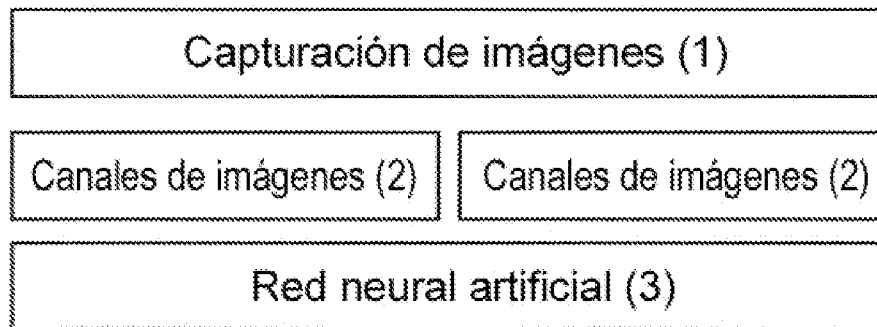


Figura 12A

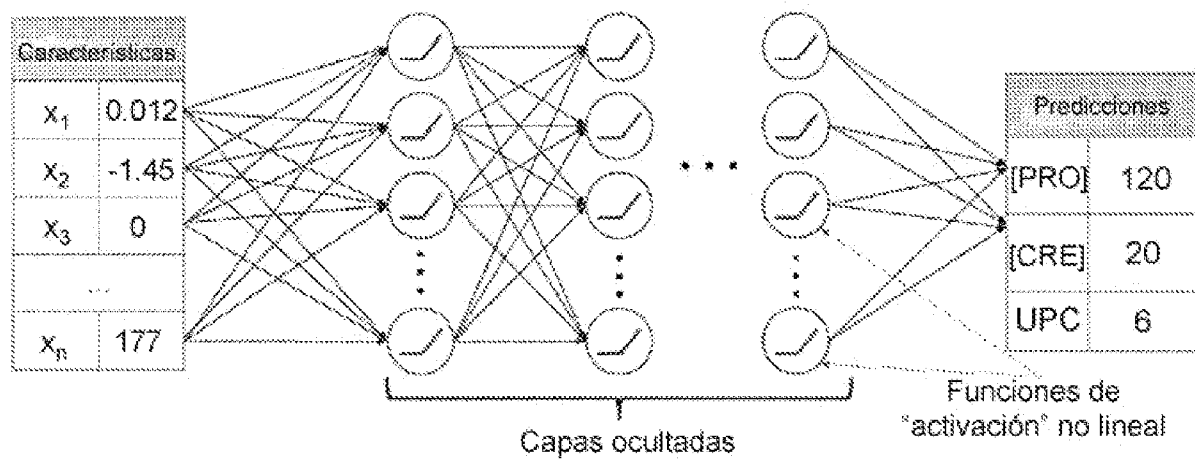


Figura 12B

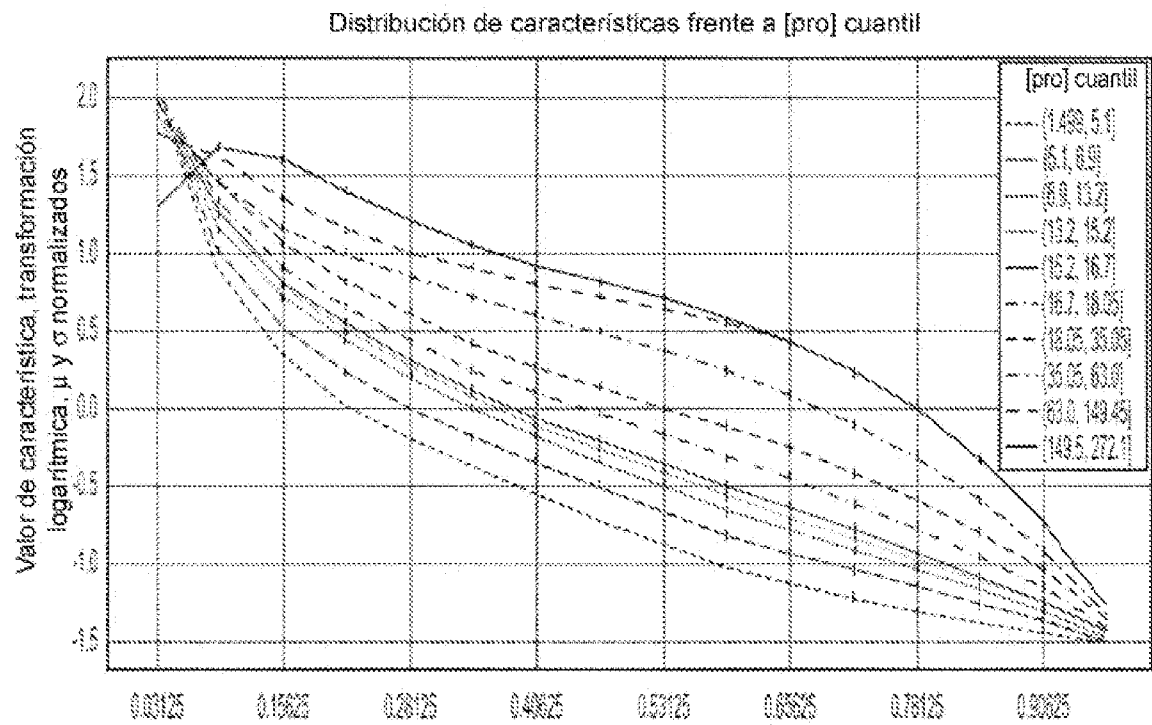


Figura 12C

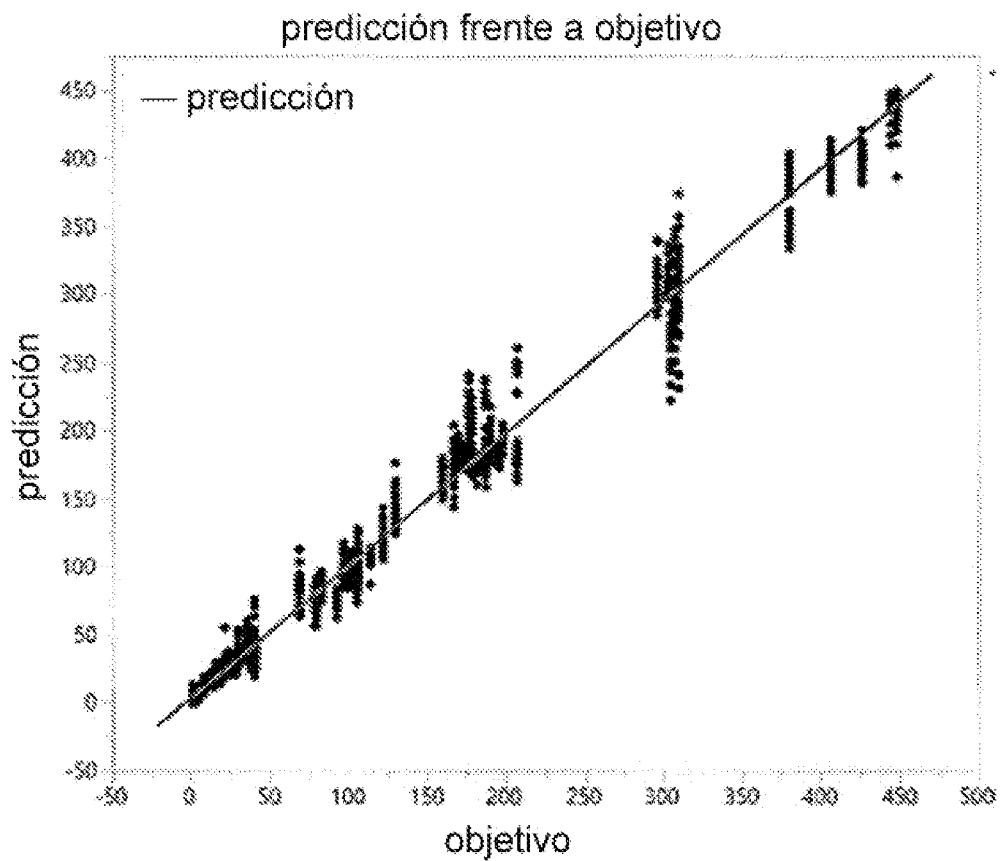


Figura 12D