



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 435**

51 Int. Cl.:
B01L 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07019359 .4**

96 Fecha de presentación : **02.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1908522**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Dispositivo de inmunoensayo y método de uso.**

30 Prioridad: **03.10.2006 US 538226**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2011

73 Titular/es: **MERIDIAN BIOSCIENCE, Inc.**
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244, US

72 Inventor/es: **Maier, Jonathan Scott;**
Kraft, Jeffrey A. y
Kozak, Kenneth J.

74 Agente: **Polo Flores, Carlos**

ES 2 357 435 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

Dispositivo de inmunoensayo y método de uso.

5 **Antecedentes de la invención**

Se revela un novedoso dispositivo para la detección de un analito en una muestra utilizando un ensayo de flujo lateral. El dispositivo y el método de la presente invención se pueden montar de forma fácil y económica, y son adecuados para ser utilizados por el personal con escasa formación especializada. El dispositivo permite también la manipulación y eliminación higiénicas de muestras biológicas. El dispositivo y el método revelados aquí se pueden emplear con etiquetas convencionalmente utilizadas con ensayos de flujo lateral, tales como metales coloidales, o también se pueden emplear con etiquetas colorimétricas o fluorescentes que precisan instrumentación para la detección.

15 *Inmunoensayos*

La presente invención se refiere a los ensayos que utilizan bandas de ensayo, en particular, un inmunoensayo de flujo lateral. El inmunoensayo, en general, es una técnica sensible utilizada para medir los niveles de una sustancia empleando la reacción de un anticuerpo o anticuerpos con su antígeno. Por lo general, los inmunoensayos confían en la unión de un anticuerpo con un antígeno. Los anticuerpos monoclonales, en particular, se utilizan con frecuencia porque normalmente estos anticuerpos se unen solamente a un punto de una determinada molécula. Esta unión específica mejora la especificidad y precisión de la unión a un determinado analito. Los anticuerpos utilizados en inmunoensayos tienen típicamente una gran afinidad con el antígeno, de forma que una alta proporción del antígeno se une al anticuerpo.

Los inmunoensayos son herramientas de diagnóstico biomédico potentes y versátiles que se pueden utilizar, por ejemplo, para comprobar los niveles de fármacos y hormonas en los fluidos corporales, diagnosticar enfermedades infecciosas y autoinmunes, y diagnosticar y controlar el tratamiento del cáncer.

Un analito que resulta particularmente ideal para la detección utilizando técnicas de inmunoensayo es la influenza. La influenza es una enfermedad respiratoria viral aguda epidémica-pandémica y altamente contagiosa causada por varios géneros de la familia Orthomyxoviridae. El Influenzavirus A y el Influenzavirus B son los dos géneros asociados más habitualmente con la enfermedad en el ser humano. Los índices de infección por influenza tienden a ser más elevados entre la población pediátrica, mientras que las complicaciones graves de esta enfermedad son más frecuentes entre las personas mayores. Los síntomas y signos clínicos comienzan tras un período de incubación de 1 a 4 días e incluyen tos, fiebre, mialgia y malestar. La presentación clínica de la influenza puede variar desde la infección asintomática hasta la neumonía fatal. La influenza circula conjuntamente con otros patógenos respiratorios; por ello, es importante diferenciar la influenza de otras enfermedades respiratorias. Las pruebas de detección rápida de la influenza facilitan la administración más temprana de los fármacos antivirales, que, en general, aportan beneficios clínicos cuando se administran en el plazo de 48 horas a partir de la aparición de los síntomas. No todos los fármacos antivirales son efectivos tanto contra la influenza A como contra la influenza B; por tanto, es importante distinguir entre los dos.

La influenza A y B se pueden detectar en muestras respiratorias humanas mediante diversos métodos entre los que se incluyen el cultivo de tejidos, el ensayo de inmunofluorescencia e inmunoensayo enzimático. El aislamiento del cultivo de tejidos siguen siendo el patrón oro para la detección de la influenza, aunque se pueden tardar hasta siete días en completar el procedimiento. Las pruebas basadas en el anticuerpo inmunofluorescente son moderadamente sensibles, aunque altamente dependientes de la preparación y calidad de la muestra. La rápida detección de la influenza utilizando inmunoensayos basados en micropartículas y enzimas se ha convertido en un aspecto importante del tratamiento de pacientes de todas las edades con enfermedad respiratoria aguda provocada por la influenza. Los resultados de las pruebas se pueden utilizar para respaldar los datos obtenidos con la evaluación clínica del paciente y ayudar al médico a determinar la línea de actuación.

Las técnicas de inmunoensayo emplean típicamente una etiqueta detectable que permite al usuario determinar si el analito está presente en la muestra. La etiqueta se puede conjugar con una partícula como un anticuerpo que se une al analito (denominado en el presente como primer "reactivo de unión"). El tipo de etiqueta empleado puede variar, y puede incluir etiquetas detectables visualmente, así como etiquetas que precisan instrumental para su detección. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, de las etiquetas que se pueden utilizar con técnicas de inmunoensayo incluyen enzimas, radioisótopos, marcas fluorescentes, partículas de carbono, perlas, o marcas de solución coloidal de un metal como oro coloidal.

65 *Inmunoensayos de flujo lateral*

Los ensayos de flujo lateral (o ensayos "de flujo") son bien conocidos en el campo y se describen en Ching *et al.*, Patente estadounidense 6.534.320, May *et al.*, Patente estadounidense 6.228.660, Charlton *et al.*, Patente estadounidense 5.989.921, Charlton, Patente estadounidense 6.485.982, Charlton, Patente estadounidense 5.714.389, Rosenstein, I) S RE38.430.

ES 2 357 435 T3

Los ensayos de flujo lateral se caracterizan por el hecho de que una solución líquida que contiene un analito a detectar es transportada lateralmente por acción capilar a lo largo de una banda de membrana. Por lo general, la banda de membrana tiene reactivos impregnados. En la membrana, la muestra se aplica en un extremo de la banda (típicamente en la primera almohadilla absorbente) y, en ocasiones, con la ayuda de un disolvente como agua. La muestra se puede mezclar con un reactivo de marcado que tenga un primer reactivo de unión antes del contacto con la banda, o la propia banda puede contener el reactivo de marcado. Mientras el líquido pasa por una “zona de detección, segundos reactivos de unión inmovilizados en la banda permiten la visualización de los resultados del ensayo. Por lo general, el ensayo de flujo lateral es rápido y permite una detección sensible y precisa de analitos, dependiendo en parte de la selección de los reactivos de unión utilizados.

Los ensayos de flujo lateral pueden emplear técnicas “competitivas” o “no competitivas”, siendo ambas bien conocidas en el campo. En el inmunoensayo de tipo competitivo, el analito de una muestra se mezcla con el analito que está conjugado con una etiqueta detectable. A continuación, la mezcla entra en contacto con una banda de ensayo de flujo lateral. Posteriormente la mezcla migra a lo largo de una trayectoria de flujo definida por una membrana. El analito no marcado (de la muestra) y el analito marcado compiten por un número limitado de puntos de unión o un agente de unión inmovilizado en la banda de ensayo. La cantidad de analito marcado detectada en la región de detección en un ensayo competitivo es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra (es decir, una cantidad superior de marcado acumulado indica unos niveles inferiores de analito en la muestra del ensayo).

Por lo contrario, en los inmunoensayos “no competitivos” o de tipo “sándwich”, el antígeno de la muestra se une a un primer reactivo de unión (como un anticuerpo) conjugado con una etiqueta (el “reactivo de marcado”). La muestra que contiene el antígeno unido al reactivo de marcado se pone posteriormente en contacto con una banda de ensayo de flujo lateral. Mientras la mezcla migra por acción capilar a lo largo de la membrana, el complejo del reactivo de marcado-analito entra en contacto y se une a un segundo agente reactivo inmovilizado en la membrana. El complejo etiqueta-analito se acumula sobre la membrana, y resulta en una línea indicadora visible. La cantidad de una etiqueta acumulada es directamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra. Tanto los ensayos de tipo competitivo como los de tipo no competitivo se describen en Ching *et al*, Patente estadounidense 6.534.320.

Típicamente, los inmunoensayos de flujo lateral emplean los mismos componentes básicos. Estos se describen, por ejemplo, en Ching *et al*, Patente estadounidense 6.534.320 y May *et al*, Patente estadounidense 6.228.660. Estos componentes son: un primer material absorbente, una membrana (como nitrocelulosa) y un segundo material absorbente, donde la banda de ensayo tiene reactivos impregnados para la detección de analitos.

Los dispositivos de flujo lateral también se pueden clasificar por utilizar un método de un paso o dos pasos. El método de dos pasos (también denominado método de “vertido”) se describe en la solicitud de Patente europea 0 250 137 A2, titulada “Inmunoensayo de oro coloidal” publicada el 12 de diciembre de 1987 (“Mochnal”). En este método, la muestra y el reactivo de marcado se mezclan *antes de* poner en contacto la muestra con la banda de ensayo de flujo lateral. Después de mezclar la muestra con el reactivo de marcado, la mezcla se pone en contacto con un primer material absorbente para iniciar el ensayo de flujo lateral. Posteriormente la muestra fluye a lo largo de la membrana, contactando con uno o más de los segundos reactivos de unión inmovilizados. El analito de la muestra se une al segundo reactivo de unión y a los resultados de marcado acumulados en una reacción visible. El método de dos pasos se caracteriza por el paso inicial de premezclado de la muestra líquida con el reactivo de marcado, antes de contactar con la mezcla de la banda de ensayo.

Por lo contrario, en el método de “secado” o de “un paso”, la muestra no se mezcla con el reactivo de marcado antes de entrar en contacto con una banda de ensayo. En el método de un paso, el reactivo de marcado es secado previamente e introducido en la banda de ensayo, típicamente en la primera almohadilla absorbente. La muestra líquida aplicada directamente a la primera almohadilla absorbente solubiliza el reactivo de marcado secado. Cuando la muestra líquida fluye lateralmente a lo largo de la banda de ensayo hacia el punto de ensayo, el analito se une al reactivo de marcado y lo transporta unido a un analito de un segundo aglutinante inmovilizado. Como en el método de dos pasos anteriormente descrito, el analito reacciona con un segundo reactivo de unión inmovilizado sobre la matriz para proporcionar un resultado visual. El método de un paso se diferencia del método de dos pasos principalmente por el hecho de que todos los reactivos necesarios para el ensayo están presentes en forma seca en la banda de ensayo, eliminando la necesidad de un paso de mezclado separado.

Adicionalmente, la contaminación cruzada y el saneamiento suelen ser motivo de preocupación en el uso de los ensayos de flujo lateral. Las bandas de ensayo empleadas para la detección de analitos en muestras biológicas, como orina, saliva o heces, suponen un potencial riesgo de contaminación cuando las bandas de ensayo entran en contacto con la muestra y posteriormente se transportan a un lugar diferente. La contaminación se puede producir cuando las bandas de ensayo se están utilizando o después de desecharlas. Por tanto, es recomendable contar con un dispositivo que permita una manipulación y eliminación higiénicas, minimizando la contaminación cruzada de las bandas de ensayo o del personal.

Las Patentes estadounidenses 4859610, W093/07292, 2005/0023672 y 2006/0210451 se refieren todas a dispositivos de ensayo que comprenden un receptáculo, un soporte y una banda de ensayo.

La invención descrita en el presente proporciona un soporte para una banda de ensayo, en particular, una banda de inmunoensayo de flujo lateral, y un dispositivo para realizar ensayos utilizando bandas de ensayo, que permiten

ES 2 357 435 T3

una mayor facilidad de uso, montaje, manejo y eliminación en condiciones higiénicas. La invención se refiere también a un dispositivo que se puede emplear para la detección de múltiples reactivos de marcado, incluyendo aquellos que pueden emitir luz o que precisan el uso de instrumentos como espectrofotómetros.

5 Breve resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

10 En el presente se divulga un dispositivo para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra, donde el dispositivo comprende un receptáculo, un soporte y una banda de ensayo. En una realización, el soporte comprende una región alargada para fijar una banda de ensayo, una función de tope, un cierre para el receptáculo, un elemento de agarre, una función de alineado y elementos de retención. El soporte también puede comprender clavijas secundarias para fijar la banda de ensayo de forma segura.

15 En otra realización, el soporte comprende un elemento de agarre, una función de tope, un cierre, una función de alineado y una bisagra donde el elemento de agarre y el cierre se forman plegando la parte superior del elemento de agarre sobre la parte inferior del elemento de agarre por la bisagra.

20 Otra realización de la presente invención se refiere también a un dispositivo para determinar la presencia o ausencia de un analito en la muestra, el dispositivo que comprende un receptáculo que contiene un reactivo de marcado que se une con el analito y un soporte. En una realización, el soporte contiene una banda de ensayo que comprende una primera almohadilla absorbente, una banda de membrana y una segunda almohadilla absorbente que define una trayectoria del flujo para transportar una muestra líquida, teniendo la banda de ensayo al menos una región de detección. La banda de ensayo se mantiene en un hueco del soporte que también comprende un soporte alargado que contiene el hueco y dispone de una función de alineado, un cierre, una función de tope y un elemento de agarre. En una realización, el soporte se forma plegando la parte superior del soporte desmontado (sin plegar) por una bisagra, de forma que la porción superior del elemento de agarre se pliega sobre la porción inferior del elemento de agarre, capturando así la segunda almohadilla absorbente de la banda de ensayo entre las dos superficies del elemento de agarre del soporte. El soporte también comprende un cierre que sella sustancialmente el receptáculo cuando el soporte se inserta en el receptáculo.

30 El dispositivo se puede proporcionar en forma de un kit que contiene 1) un receptáculo con el conjugado de oro seco y dispensado, 2) un soporte y un ensamblaje de la banda, 3) un tampón o pipeta de transferencia (en una realización de cuatro piezas), 4) una rejilla u otro ensamblaje para mantener el dispositivo en posición erguida durante el ensayo.

35 En el presente se describen diversas realizaciones de la invención. A continuación se recogen uno o más ejemplos de las mismas. Cada ejemplo se proporciona a modo de explicación, y a título meramente enunciativo, de la invención. Resultará evidente para todos los profesionales cualificados que se pueden introducir modificaciones en la presente invención sin desviarse del alcance y esencia de la invención. Por tanto, está previsto que la presente invención cubra las modificaciones y variaciones recogidas dentro del alcance de las reivindicaciones y sus equivalentes.

Breve descripción de la ilustración

45 La invención se ilustrará ahora con respecto a los siguientes dibujos que muestran realizaciones de la invención, en las que:

La Fig 1 es una vista delantera de una realización de la invención.

50 La Fig 2 es una vista despiezada del soporte desmontado y la banda de ensayo.

La Fig 3 es una vista isométrica ampliada del soporte 2.

La Fig 4 es una vista ampliada del soporte.

55 La Fig 5 es una vista ampliada del soporte.

La Fig 6 es una vista inferior del soporte de la Fig. 2.

60 La Fig 7 es una vista ampliada del soporte de la Fig. 2.

La Fig 8 es una vista en perspectiva del soporte.

Descripción detallada de la invención

65 *Definiciones*

Las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias al plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

ES 2 357 435 T3

En el presente documento, por lo general, el término “analito” se refiere a una sustancia a detectar. Por ejemplo, los analitos pueden incluir sustancias antigénicas, haptenos, anticuerpos y combinaciones de los mismos. El analito puede ser cualquier analito descrito en el campo.

5 La “región de detección de un analito” o “región de detección” es cualquier región de un dispositivo de ensayo en el que el analito o la etiqueta se puede detectar y/o medir para determinar la presencia o ausencia de analito en una muestra. La región de detección de analito puede ser de naturaleza cualitativa o cuantitativa. Así, en un dispositivo de flujo lateral, por ejemplo, la región de detección analítica puede formar parte de una matriz porosa que contiene reactivos de unión para la inmovilización de una etiqueta detectable.

10 Puede haber una o más regiones de detección presentes. Dependiendo del formato del ensayo, la cantidad de etiqueta inmovilizada en la región de detección del analito puede aumentar o disminuir en presencia del analito. Por ejemplo, en un formato de ensayo de sándwich, la cantidad de etiqueta inmovilizada aumentará, mientras que en un formato de ensayo de competencia, la cantidad de etiqueta inmovilizada disminuirá.

15 El término “señal de emisión” se refiere a una radiación electromagnética emitida cuando un átomo en un estado de energía superior excitado cae a un estado de energía inferior.

20 El término “señal de excitación” se refiere a la energía, por ejemplo, que forma radiación electromagnética, que provoca que un electrón de un átomo pase de un estado de energía inferior a un estado de energía superior “excitado”.

25 El término “etiqueta” utilizado en el presente se refiere a cualquier sustancia que sea capaz de producir una señal detectable, sea visiblemente o utilizando instrumentos adecuados. Varias etiquetas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, a título meramente enunciativo, cromógenos, compuestos fluorescentes o quimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, tintes, partículas no metálicas y metálicas coloidales, y partículas de látex polimérico orgánico.

30 El término “luminiscencia” se refiere a cualquier emisión de luz que no obtenga energía de la temperatura de una fuente de luz (por ejemplo, una fuente de radiación electromagnética, una reacción química, energía mecánica). En general, la fuente provoca que un electrón de un átomo pase de un estado de energía inferior a un estado de energía superior “excitado”; posteriormente, el electrón libera esa energía en forma de luz emitida cuando regresa a un estado de energía inferior. Por lo general, esta emisión de luz se produce en el rango visible o casi visible del espectro electromagnético. El término “luminiscencia” incluye, a título meramente enunciativo, fenómenos de emisión de luz tales como la fosforescencia, fluorescencia, bioluminiscencia, radioluminiscencia, electroluminiscencia y termoluminiscencia.

35 El término “etiqueta luminiscente” se refiere a una etiqueta que genera una señal luminiscente, por ejemplo, una emisión de luz que no obtiene energía de la temperatura de la fuente emisora. La etiqueta luminiscente puede ser, por ejemplo, una molécula fluorescente, una molécula fosforescente, una molécula radioluminiscente, un quelato luminiscente, un fósforo o compuesto que contiene fósforo, o un punto cuántico.

40 En el presente documento, el término “material poroso” se refiere a cualquier material capaz de proporcionar una acción capilar. Esto incluiría materiales como, por ejemplo, nitrocelulosa, mezclas de nitrocelulosa con poliéster o celulosa, papel bruto, papel poroso, rayón, fibra de vidrio, copolímero de acrilonitrilo o nylon. Un profesional cualificado conocerá otros materiales porosos que permiten el flujo lateral.

45 En el presente documento, por lo general, el término “muestra de ensayo” se refiere a material biológico que se sospecha que contiene un analito. La muestra de ensayo puede, por ejemplo, incluir materiales obtenidos directamente de una fuente, así como materiales pretratados utilizando técnicas como, a título meramente enunciativo, filtrado, precipitación, dilución, destilación, mezclado, concentración, inactivación de los componentes que interfieren, la adición de reactivos, lisis, etc. La muestra de ensayo se puede obtener de cualquier fuente biológica, como fluido fisiológico, incluyendo, sangre, fluido intersticial, saliva, fluido de la lente intraocular, fluido cerebroespinal, sudor, orina, leche, fluido ascítico, moco, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido vaginal, fluido amniótico, etc. Además de los fluidos fisiológicos, se pueden utilizar otras muestras líquidas como agua, alimentos, etc., para la realización de ensayos medioambientales o para la producción de alimentos. Asimismo, se puede emplear un material sólido sospechoso de contener un analito como muestra de ensayo. La muestra de ensayo se puede utilizar directamente, tal y como se ha obtenido de la fuente biológica, o tras un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Por ejemplo, este pretratamiento puede incluir la preparación de plasma sanguíneo, la dilución de fluidos viscosos, etc. Los métodos de pretratamiento también pueden implicar el filtrado, la precipitación, dilución, destilación, mezclado, concentración, inactivación de componentes que interfieren, la adición de reactivos, etc. Por otra parte, también puede resultar recomendable modificar una muestra de ensayo sólida para formar un medio líquido o liberar el analito.

60 En el presente documento, el término “zona de detección” cuando se utiliza en relación con una banda de ensayo, se refiere a la región de la membrana que contiene reactivos de unión, sea la unión a moléculas que indican un control positivo o negativo, o a moléculas que indican la presencia o ausencia de analitos. Los reactivos de unión pueden incluir aquellos que se unen al analito, reactivo de marcado, etiqueta, o cualquier otra molécula que permita la obtención de una señal visual.

ES 2 357 435 T3

Dispositivo de ensayo

La Fig. 1 representa una realización de la presente invención. En esta realización, el dispositivo de ensayo 1 comprende un receptáculo 3, un soporte 2, y una banda de ensayo 4, donde la banda de ensayo 4 permite que los fluidos fluyan lateralmente por toda su longitud. El ensayo puede ser cualquier banda de ensayo conocida en el campo. El receptáculo 3 se puede utilizar para recibir la muestra, el diluyente y/o reactivo de marcado. El soporte 2 se utiliza para sujetar cualquier banda de ensayo adecuada 4 conocida en el campo, como una banda de inmunoensayo de flujo lateral como se muestra en las Fig. 1, 2 y 8.

El receptáculo

Como se muestra en la Fig. 1, por lo general, el receptáculo 3 del dispositivo 1 tiene forma alargada que puede ser redondeada en la parte inferior (teniendo la forma de un tubo de ensayo, como se muestra) o plana (no se muestra). Cuando la parte inferior del receptáculo 3 es plana, el receptáculo 3 se puede sostener por sí solo.

El receptáculo 3 también puede tener forma de cubeta o tener las propiedades de una cubeta, de forma que el receptáculo 3 sea compatible con el uso de instrumentos espectrofotométricos o similares. No obstante, el receptáculo 3 puede tener cualquier forma adecuada para recibir tanto la muestra como el soporte 2.

En realizaciones en las que el receptáculo 3 tiene las propiedades de una cubeta, el receptáculo 3 puede tener la forma de una cubeta como, por ejemplo, cubetas proporcionadas por Ocean Optics Inc. Las cubetas desechables CVD-UV y CVD-VIS, fabricadas y vendidas por Ocean Optics Inc, son cubetas de plástico que funcionan con una luz de transmisión en el rango UV de entre 220-900 nm. Las cubetas CVD-VIS transmiten luz de 350-900 nm y son adecuadas para su uso en aplicaciones VIS. La cubeta puede ser de forma cuadrada o triangular. Con la presente invención se puede utilizar cualquier cubeta conocida en el campo.

En las realizaciones que utilizan un receptáculo 3 con propiedades de cubeta, el receptáculo 3 se puede utilizar con reactivos de marcado que emplean etiquetas fluorescentes u otras etiquetas luminiscentes, y se puede emplear conjuntamente con espectrofluorómetros, por ejemplo, sin necesidad de transferir la muestra a un segundo contenedor. En esta realización, la muestra no necesita ser retirada del receptáculo 3 para determinar, por ejemplo, la absorción o refracción de la luz. El soporte 2 puede ser retirado o no antes de la evaluación o detección. Cuando se retira antes de la evaluación o detección, el receptáculo 3 se puede cerrar con cualquier tapón conocido para sellar una cubeta o tubo de ensayo (no mostrado).

En las realizaciones que utilizan un tubo de ensayo con forma de receptáculo 3, el receptáculo 3 puede tener una forma que permita el uso con un agitador de vortex con un soporte en forma de tubo de ensayo, y puede ser compatible con las rejillas estándar para tubos de ensayo que pueden mantener el dispositivo en posición erguida durante el uso.

Independientemente de la forma, el receptáculo 3 del dispositivo 1 puede estar hecho de vidrio, plástico o cualquier otro material adecuado para su empleo con el analito o cualquier diluyente, etc. El receptáculo 3 puede estar compuesto por un material que ofrezca resistencia a los productos químicos, que permita el uso con disolventes orgánicos, así como ácidos y bases.

El receptáculo 3 puede ser total o parcialmente transparente para la luz visible, y puede ser total o parcialmente opaco. En algunas realizaciones, el receptáculo 3 puede ser opaco, con la excepción de las mirillas del receptáculo 3. Las mirillas pueden adoptar diversas formas y estar presentes en distintas posiciones del receptáculo 3, dependiendo del uso deseado del dispositivo y de la naturaleza de las etiquetas.

Por ejemplo, cuando se utilicen etiquetas detectables visualmente con el dispositivo, las mirillas del receptáculo 3 pueden estar posicionadas de forma que las regiones de detección de la banda de ensayo resulten visibles a través de las mirillas al colocar el soporte 2 en el receptáculo 3. Alternativamente, las mirillas pueden estar colocadas de forma que la absorción o reflexión de la luz de una muestra se pueda medir empleando instrumentos adecuados.

En otra realización, el receptáculo 3 puede tener una forma que permita el aumento de los contenidos o la banda de ensayo 4. Por ejemplo, una parte del receptáculo 3 puede estar curvada o tener la forma adecuada para aumentar las regiones de una banda de ensayo cerrada 4, de forma que se mejore la visualización de la etiqueta acumulada.

El receptáculo 3 puede tener una forma que permita utilizarlo con rejillas para tubos de ensayo o cubetas disponibles, o con rejillas especialmente diseñadas que mantengan el dispositivo en posición erguida durante el uso. Esta rejilla especialmente diseñada se podrá proporcionar al usuario final como parte de un kit, descrito a continuación.

El receptáculo 3 empleado en el dispositivo 1 presentado aquí puede ser desechable o susceptible de ser reutilizado.

Es necesario entender que el receptáculo 3 es tal que un usuario puede utilizar tanto una banda de ensayo de flujo lateral para analizar la muestra, junto con otros métodos para analizar la muestra. Por ejemplo, la banda de ensayo 4 se puede utilizar y retirar, y, a continuación, la muestra restante se puede someter a un ensayo utilizando otros métodos conocidos en el campo.

ES 2 357 435 T3

Soporte

Como se muestra en las Fig. 1, 2 y 8, el soporte 2 del dispositivo se utiliza para sujetar una banda de ensayo de flujo lateral 4. El soporte 2 tiene la forma necesaria para realizar una o más de las siguientes funciones: 1) sellar sustancialmente el receptáculo 3; 2) proporcionar una estructura de apoyo para la banda de ensayo 4; 3) proporcionar un medio para posicionar la banda de ensayo 4 con respecto al receptáculo 3 y la muestra; 4) minimizar la contaminación de la muestra y el personal; 5) minimizar la contaminación de la banda de ensayo 4 cuando se manipula o inserta el soporte 2 en el receptáculo 3, y; 6) proporcionar una o más guías de detección 13 (“guías de lectura”) para la detección de resultados en la banda de ensayo 4.

El soporte 2 está fabricado preferiblemente como una única pieza utilizando técnicas estándar. Por ejemplo, puede ser moldeado por inyección, moldeado por compresión o mecanizado. El soporte se muestra en una posición abierta o sin montar en la Fig. 2. El soporte 2 puede estar formado por cualquier material adecuado que soporte el entorno de la muestra, el diluyente, los reactivos de marcado y cualquier otro reactivo que se pueda añadir al receptáculo 3. Preferiblemente, está hecho de plástico o similares, más preferiblemente de polipropileno, poliestireno o similares.

Como se ilustra en las Fig. 1-8, el soporte 2 tiene una porción alargada 6. La porción alargada 6 también puede ofrecer una función de alineado 5, una o más funciones de retención 8, y regiones de protección 12. El soporte 2 también comprende clavijas secundarias 19 (mostradas en la Fig.6). Después de plegar el soporte sin montar por la bisagra 7, como se muestra en la Fig. 2, se forma un soporte montado 2 (como se muestra en las Fig. 1 y 8, mostrado con la banda de ensayo 4). En una realización, al plegar la porción superior del elemento de agarre sobre la porción inferior del elemento de agarre por la bisagra se forma el elemento de agarre 11 y el cierre 10.

El elemento de agarre 11 del soporte comprende una porción superior y una porción inferior, separadas por la bisagra 7. La bisagra 7 puede ser una bisagra flexible. Una bisagra flexible es una bisagra o elemento de flexión sin piezas móviles, generalmente una sección fina de plástico u otro material que conecta dos segmentos de una pieza para mantenerlos unidos y permite el movimiento. El elemento de agarre 11 comprende una porción superior y una porción inferior. La porción superior se pliega o coloca sobre la porción inferior por la bisagra para capturar el borde superior de una banda de ensayo. Cuando la porción superior y la porción inferior del elemento de agarre 11 se alinean, la banda de ensayo queda fijada en su posición. Una persona con unos conocimientos normales en el campo también entenderá que la bisagra 7 no es esencial, de forma que el soporte 2 se puede fabricar en dos piezas separadas, una pieza idéntica a la porción inferior de la bisagra 7, la otra pieza idéntica a la porción superior de la bisagra 7.

Una vez plegado, el soporte 2 tiene una forma general como la ilustrada en las Fig. 1 y 3. Para montar el soporte 2 como se muestra en las Fig. 1 y 8, una banda de ensayo de flujo lateral 4 o similares se coloca en primer lugar en la función de alineado 5. En una realización preferible, la función de alineado 5 puede ser un hueco con una pared sólida a cada lado o una pared periódica (por ejemplo, postes de guía o guías en serie, formados en la porción alargada 6 del soporte 2). Las funciones de retención superior a inferior 8 (mostradas en una vista de cerca en las Fig. 3, 4 y 7) pueden estar presentes para fijar la segunda y la primera almohadilla absorbente, respectivamente. El soporte 2 se pliega por la bisagra 7, capturando así el borde superior de la banda de ensayo 4. También se pueden proporcionar clavijas secundarias 19, como se muestra en la Fig. 6 (vista inferior del soporte sin una banda de ensayo.). Las clavijas secundarias 19 pueden estar presentes para fijar también la banda de ensayo 4 en su lugar, bloqueando la segunda almohadilla absorbente 17. En una realización, las clavijas secundarias 19 fijan la banda de ensayo penetrando en la segunda almohadilla absorbente aproximadamente $\frac{1}{2}$ mm.

El soporte montado 2 mostrado en la Fig. 8 puede comprender también una función de tope 9. La función de tope 9 se forma tras unir la porción superior y la porción inferior del soporte 2 por la bisagra 7. En una realización, cuya mejor vista se recoge en la Fig. 8, la función de tope 9 se compone de una región tipo saliente que sobresale del cierre 10. La función de tope 9 evita que el soporte 2 se inserte en el receptáculo 3 más allá de un determinado punto. La función de tope 9 posiciona el extremo distal del soporte 2 y la banda de ensayo 4 en la posición adecuada dentro del receptáculo 3 con respecto a la muestra, a una distancia necesaria para el comienzo de la reacción, pero de forma que el borde inferior de la banda de ensayo 4 entre en contacto con la muestra y que el borde inferior del soporte 2 no entre en contacto con la muestra de ensayo. La función de tope 9 y la función de alineado 5 están relacionadas de forma que se consiga el posicionamiento adecuado de la banda de ensayo 4 con respecto a la muestra cuando se coloca el soporte en el receptáculo 3.

El soporte montado comprende también un cierre 10 (como se muestra en las Fig. 1 y 8) para el receptáculo 3. El cierre 10, en una realización, tiene por lo general forma de tapón, aunque cualquier forma adecuada que selle sustancialmente el receptáculo 3 está contemplada en la presente invención. El cierre 10 tiene una forma que asienta sustancialmente el dispositivo 1 cuando se inserta en el receptáculo 3. El cierre 10 mostrado en la Fig. 8 tiene porciones huecas que facilitan la fabricación del dispositivo, aunque se entenderá fácilmente que la invención no se limita a esta realización, y el cierre 10 puede adoptar diversas formas.

El soporte 2 montado comprende también un elemento de agarre 11. En la realización mostrada en las Fig. 1 y 8, el elemento de agarre 11 tiene una forma generalmente rectangular. No obstante, el elemento de agarre 11 no tiene que tener esta forma en concreto, sino que puede tener cualquier otra forma que permita un fácil manejo del soporte 2. Por ejemplo, el elemento de agarre 11 puede tener bordes redondeados o también puede comprender bordes cuneiformes, crestas u otra textura para facilitar la extracción e inserción del soporte 2. El elemento de agarre 11 tiene el tamaño adecuado para que un usuario pueda manipular y utilizar el soporte 2.

Como se ve en la Fig. 2, el soporte 2 también puede tener regiones de protección 12 que ayudan a prevenir la contaminación de la banda de ensayo 4 cuando se inserta el soporte 2 en el receptáculo 3. En esta realización, las regiones de protección 12 pueden ser bordes levantados en el soporte alargado 6 que protegen los lados de una banda de ensayo 4. Estos bordes levantados pueden ser una pared sólida, como se muestra, o una pared rota. En la práctica, es necesario que el usuario inserte el soporte 2 dentro del receptáculo 3 para iniciar la reacción. Puede haber líquido u otros contaminantes en el borde del receptáculo 3. Las regiones de protección 12 protegen la banda de ensayo 4 de la contaminación del borde cuando se inserta en el receptáculo 3.

Como se muestra en las Fig. 1 y 8, la porción alargada 6 también puede tener una o más “guías de detección” 13 para mostrar al usuario dónde se debería acumular el reactivo de marcado. Por ejemplo, se puede realizar una o más marcas visibles en una región de protección 12 de la banda de ensayo o en la porción alargada 6 correspondiente a una región de la banda de ensayo 4 que contiene un reactivo de unión para el analito. Las guías de detección 13 pueden ser una línea u otra demarcación, y pueden estar indicadas con un color o una porción elevada del soporte 2. En una realización, hay al menos tres líneas de lectura, correspondientes a una región de detección para la influenza A, una región de detección para la influenza B y una línea de control. No obstante, una persona con conocimientos normales en el campo entenderá fácilmente que las guías de detección 13 pueden adoptar diversas formas y pueden corresponder a uno o más analitos y regiones de control diferentes.

20 *La banda de ensayo*

El soporte 2 de la presente invención se puede utilizar para sujetar cualquier banda de ensayo utilizada en el campo. En una realización, una banda de ensayo de flujo lateral conocida en el campo (e ilustrada en las Fig. 1, 2 y 8) se coloca en el soporte 2. La banda de ensayo 4 puede utilizar el método de un paso o dos pasos. En el método de un paso, la banda de ensayo 4 tiene un primer reactivo de marcado inmovilizado difusamente en la primera almohadilla absorbente 14. En el método de dos pasos, como se ha descrito anteriormente, el primer reactivo de marcado está separado de la banda de ensayo 4. En una realización de dos pasos, un reactivo de marcado, como un conjugado seco, se proporciona en el receptáculo 4 por separado de la banda de ensayo 4. El reactivo de marcado también puede ser añadido por el usuario final.

En realizaciones que utilizan una banda de ensayo de flujo lateral, la banda de ensayo 4 puede ser cualquier banda de ensayo de flujo lateral conocida en el campo. Por ejemplo, la banda de ensayo 4 preferiblemente se compone de una primera almohadilla absorbente 14, una membrana 15, y una segunda almohadilla absorbente 17, como se muestra en las Fig. 1, 2 y 8. La Fig. 1 ilustra una banda de ensayo 4 colocada en el dispositivo, y la Fig. 2 ilustra la banda de ensayo antes de colocarla en el soporte 2 del dispositivo 1. Con respecto a la Fig. 2, los reactivos de marcado adecuados que comprenden un primer reactivo de unión y una etiqueta, pueden estar impregnados en la primera almohadilla absorbente 14, y los segundos reactivos de unión adecuados están impregnados en la membrana 15. Los reactivos de unión se seleccionan basándose en el analito a detectar, y una selección adecuada de los reactivos de unión será fácilmente conocida por una persona con unos conocimientos normales en el campo. Los segundos reactivos de unión impregnados en la membrana 15 forman una o más “región/es de detección” que también comprenden regiones que contienen segundos reactivos de unión para el analito y/o las “regiones de control”. Los reactivos adecuados para las regiones de control serán fácilmente conocidos por una persona con unos conocimientos normales en el campo. La banda de ensayo 4 puede tener una o más regiones de detección para el analito y una o más regiones de control, según se desee.

La banda de ensayo 4 utilizada con el dispositivo 1 también puede ser cualquier otra banda conocida en el campo y compatible con el soporte 2 descrita anteriormente, y no se limita a las bandas de ensayo para inmunoensayos de flujo lateral. Por ejemplo, la presente invención puede emplear una membrana utilizada para la cromatografía en capa fina. En esta realización, la membrana de la cromatografía en capa fina comprende una membrana apropiada u otro material fijado a la porción alargada 6 del soporte 2. La muestra, sea un líquido o un sólido disuelto en un disolvente volátil, se deposita en el receptáculo 3 del dispositivo 1 o directamente en la banda de ensayo 4. Los componentes de una muestra se pueden identificar ejecutando simultáneamente los patrones con el desconocido. El disolvente que contiene la muestra sube por la porción alargada 6 del soporte 2 o la membrana/banda de ensayo 4 contenida por acción capilar. Cuando la parte delantera del disolvente alcanza el borde superior del soporte 2, los puntos separados se pueden visualizar utilizando métodos de detección apropiados, como luz ultravioleta o la colocación de la placa en vapor de yodo. Los diferentes componentes de la mezcla suben por la placa a diferentes velocidades, debido a las diferencias en su comportamiento de posicionamiento entre la fase móvil de líquido y la fase inmóvil.

Cuando el dispositivo 1 se utiliza en combinación con una banda de ensayo 4 de flujo lateral, la banda de ensayo 4 se monta conforme los conocimientos en el campo. La Fig. 2 ilustra un ejemplo de una banda de ensayo 4 de flujo lateral que se puede utilizar. En una realización, la banda de ensayo para el inmunoensayo comprende una banda de membrana absorbente 15 como nitrocelulosa, una primera almohadilla absorbente 14, y una segunda almohadilla absorbente 17. Los materiales “absorbentes” incluyen formas de papel sin tratar, nitrocelulosa y similares que provocan la separación cromatográfica de los componentes contenidos en los líquidos que pasan a través de los mismos. Por lo contrario, en el flujo de líquido “no absorbente” todos los componentes disueltos o dispersados del líquido que no quedan permanentemente atrapados o “filtrados” son transportados a velocidades sustancialmente iguales y con un flujo relativamente no reducido a través de la membrana o respaldan los resultados del flujo absorbente al retener de forma preferencial uno o más componentes. Las bandas de ensayo se divulgan en Charlton, *et al*, Patente estadounidense 5.989.921, “*Test Device and Method for Colored Particle Immunoassay*”, publicada el 23 de noviembre de 1999.

ES 2 357 435 T3

En realizaciones que emplean una banda de ensayo de flujo lateral, por lo general la membrana es un soporte poroso, como nitrocelulosa. La banda de ensayo 4 puede comprender también una capa de soporte, como Mylar, o estar directamente adherida a la porción alargada 6 del soporte 2. La banda de ensayo 4 puede tener una parte posterior de una película en una pieza continua o piezas separadas. La parte posterior también puede ser una película, como vinilo, pero un profesional cualificado en el campo reconocerá que se pueden emplear numerosos materiales para proporcionar un soporte a la banda de ensayo. En las realizaciones en las que el dispositivo de ensayo se utiliza con métodos distintos al inmunoensayo de flujo lateral, la banda puede comprender papel cromatográfico u otros materiales adecuados para el tipo de ensayo deseado.

Primera almohadilla absorbente

En realizaciones de la presente invención que utilizan una banda de ensayo de flujo lateral, se utiliza preferiblemente una primera almohadilla absorbente. Con respecto a la Fig. 2, la primera almohadilla absorbente 14 está situada al final de la membrana 15 donde la muestra va a contactar con la banda, típicamente en el extremo distal más alejado del soporte. La primera almohadilla absorbente 14 entra en contacto con la muestra cuando el soporte 2 se inserta en el receptáculo 3. La primera almohadilla absorbente 14 puede sobresalir más allá del borde inferior del soporte 2, de forma que la muestra entre en contacto con la banda de ensayo 4 sin contactar con el borde inferior del soporte 2. La primera almohadilla absorbente 14 entra en el volumen de la muestra cuando el soporte 2 está fijado en el receptáculo 3. El posicionamiento de la primera almohadilla absorbente 14 con respecto a la muestra y el receptáculo 3 se fija mediante la función de alineado 5 y la función de tope 9 del soporte 2. El contacto de la almohadilla 14 con la muestra o el diluyente de la muestra inicia el ensayo, permitiendo que la almohadilla 14 absorba la muestra, conduciendo el fluido a lo largo de la membrana 15. El flujo a lo largo de la membrana 15 permite que el analito de la muestra contacte con los segundos reactivos de unión inmovilizados en la membrana. La primera almohadilla absorbente 14 también puede servir de filtro para separar la muestra líquida de las partículas que podrían interferir con el flujo capilar, reduciendo también la posibilidad de falsos positivos.

La almohadillas absorbentes utilizadas con inmunoensayos de flujo lateral son bien conocidas en el campo. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, de las almohadillas que se pueden emplear con la presente invención incluyen Whatman D28, Whatman 1.5WF, Whatman 3MMCHR, disponibles en Ahlstrom, 122 West Butler Street, Mount Holly Springs, PA 17065, o Whatman, 200 Park Ave, Florham Park, NJ 07932.

Banda matriz

De nuevo con respecto a la Fig. 2, la banda matriz es una membrana porosa 15 que puede ser cualquier membrana adecuada conocida en el campo. En general, la membrana porosa 15 puede estar hecha de cualquier variedad de materiales a través de los que puedan pasar las sondas de detección. Por ejemplo, los materiales utilizados para formar la membrana porosa 15 pueden incluir, a título meramente enunciativo, materiales naturales, sintéticos o presentes en la naturaleza y modificados sintéticamente, como polisacáridos (p. ej. materiales de celulosa, como papel y derivados de celulosa, como acetato de celulosa y nitrocelulosa); polietersulfona; polietileno; nylon, polivinilo de flúor (PVDF); poliéster; polipropileno; sílice; materiales inorgánicos, tales como alúmina desactivada, tierra de diatomeas, MgSO₄ u otro material inorgánico muy fino dispersado de manera uniforme en una matriz polimérica porosa, con polímeros como cloruro de vinilo, copolímero de propileno-cloruro de vinilo; y copolímero de acetato de vinilo-cloruro de vinilo; tejido, tanto presente en la naturaleza (como algodón) como sintético (como nylon o rayón); geles porosos, como gel de sílice, agarosa, dextrana, y gelatina; películas poliméricas, como poliacrilamida; y similares.

El tamaño de poro de la membrana 15 puede ser preferiblemente de unos 0,05 a unos 20 micrones.

En realizaciones que utilizan un inmunoensayo de flujo lateral, la banda de ensayo 4 comprende también una o más regiones de detección 16, como se ha descrito anteriormente y como se muestra en las Fig. 1, 2 y 8. La banda de ensayo 4 puede también comprender una o más zonas de control, según desee el usuario. Estas regiones de detección 16 comprenden reactivos de unión impregnados en la banda matriz en puntos predeterminados.

Las regiones de detección 16 comprenden reactivos de unión no marcados inmovilizados en la membrana 15 que se unen al complejo del reactivo de marcado-analito. La acumulación de analito unido resulta en una señal visible. La región de control se compone de reactivos inmovilizados que típicamente se unen a una región del reactivo de marcado (como la región Fc del primer reactivo de marcado, donde el primer reactivo de marcado es un anticuerpo) y el reactivo de marcado acumulado en la región de control indica que el ensayo se ha completado con éxito.

Las regiones de detección 15 pueden contener los mismos reactivos de unión; o pueden contener diferentes reactivos de unión para la captura de múltiples analitos. Por ejemplo, la región de detección 16 puede incluir dos o más regiones de unión distintas (por ejemplo, dientes, puntos, etc.) para la detección de uno o más analitos y una o más regiones de control para la confirmación de la conclusión e integridad del ensayo. Preferiblemente, las regiones de unión y control pueden estar dispuestas en forma de líneas, en una dirección sustancialmente perpendicular al flujo de la muestra de ensayo a través del dispositivo 1. Sin embargo, en algunas realizaciones, las regiones de unión y control pueden estar dispuestas en forma de líneas en una dirección sustancialmente paralela al flujo de la muestra de ensayo a través del dispositivo de ensayo.

ES 2 357 435 T3

Por lo general, la región de control está ubicada en un lugar de la membrana 15 en sentido descendente de las regiones de detección que contienen reactivos de unión específicos para el analito. El reactivo puede unirse a partículas del conjugado complejas y no complejas y, por tanto, normalmente es diferente del primer reactivo de unión. En una realización, el reactivo es un reactivo de unión biológico (como antígenos, haptenos, proteína A o G, nauravidina, 5 avidina, estreptavidina, anticuerpos primarios o secundarios (p. ej. policlonales, monoclonales, etc.) y complejos de los mismos) diferente del primer reactivo de unión. Por ejemplo, el primer reactivo de unión puede ser un anticuerpo monoclonal, mientras que el segundo reactivo de unión puede ser avidina (una glicoproteína de 66.000 dalton y altamente catiónica), estreptavidina (una proteína de 52.800 dalton no glicosilada), neutravidina (un derivado de la avidina 10 deglisolado), y/o captavidina (un derivado de la avidina nitrato). En esta realización, el segundo reactivo de unión se puede unir a biotina, que es biotinilado o contenido en sondas de detección conjugado con un anticuerpo monoclonal diferente del anticuerpo monoclonal del primer reactivo de unión.

Por otra parte, se pueden emplear diversos materiales biológicos para el segundo reactivo de unión de la región de control conocidos por una persona con unos conocimientos normales en el campo.

15

Segunda almohadilla absorbente 17

Cuando se emplean bandas de inmunoensayo de flujo lateral como las ilustradas en las Fig. 1, 2 y 8, la banda de ensayo 4 también comprende una segunda almohadilla absorbente 17. La primera almohadilla absorbente 14, la membrana 15 y la segunda almohadilla absorbente 17, anteriormente descritos, comprenden una trayectoria del flujo para el líquido que contiene el analito a detectar. La segunda almohadilla absorbente 17 sirve como depósito para recoger el líquido de la muestra que ha pasado a través de la membrana 15 por acción capilar. Los sorbentes adecuados incluyen tipos disponibles en el mercado como, por ejemplo, los de Alstrom o Whatman.

20

En una realización, la banda de ensayo 4 emplea un inmunoensayo de flujo lateral, rápido y cualitativo, como el descrito anteriormente, donde los analitos a detectar son los antígenos de la nucleoproteína viral de la influenza A e influenza B en un lavado nasal humano, aspiración nasofaríngea, muestra faríngea o muestras nasales y nasofaríngeas. En esta realización, la membrana 15 se compone de nitrocelulosa y comprende también dos regiones de detección separadas que se componen asimismo de anticuerpos monoclonales o policlonales secos (segundos reactivos de unión) para la influenza A y la influenza B. una primera región de detección comprende anticuerpos de la influenza A y una segunda región de detección comprende anticuerpos de la influenza B. Los anticuerpos son inmovilizados en la membrana. Cuando el analito conjugado con el primer reactivo de marcado se une al anticuerpo inmovilizado en la banda de ensayo 4, se produce una reacción visiblemente detectable. Cuando se utiliza oro coloidal como etiqueta, la región de detección adquiere un color entre rosa y rojo. En esta realización, se puede emplear cualquier anticuerpo adecuado en la región de control. En una realización, el anticuerpo utilizado es el anticuerpo antimurino de cabra, que posteriormente es inmovilizado en la región de control de la banda de ensayo 4.

25

Reactivo de marcado (conjugado)

Cuando se emplea una banda de inmunoensayo de flujo lateral, se selecciona un reactivo de marcado adecuado. Dependiendo del método seleccionado, se deposita una cantidad predeterminada de al menos un tipo de reactivo de marcado en el receptáculo 3, impregnado en la primera almohadilla absorbente 14 o proporcionado por separado al usuario final.

40

El reactivo de marcado utilizado puede ser cualquier partícula, proteína o molécula que reconozca o se una al analito en cuestión, habiendo añadido, conjugado o unido de otro modo una etiqueta detectable. La naturaleza exacta del reactivo de marcado depende de si el ensayo utiliza el ensayo de tipo competitivo o tipo sándwich.

50

En una realización, la partícula, proteína o molécula es un anticuerpo monoclonal o policlonal natural o no natural. Los anticuerpos monoclonales y policlonales o fracciones de los mismos con propiedades de unión específicas y alta afinidad con prácticamente cualquier sustancia antigénica son conocidos y están disponibles en el mercado o se pueden producir con líneas celulares estables, empleando técnicas de selección y fusión celular bien conocidas.

55

El reactivo de marcado de la presente invención puede ser liofilizado, secado en el frigorífico o similares, y colocado en el receptáculo 3. En una realización, el reactivo de marcado puede ser liofilizado en fibra de vidrio u otra almohadilla adecuada. El reactivo de marcado puede contener agentes crioprotectores adicionales o proteínas metasolubles como las descritas en Ching *et al*, Patente estadounidense 6.534.320. Cuando el reactivo es estable en una forma líquida, no necesita ser liofilizado. La cantidad de reactivo de marcado se calcula u optimiza experimentalmente para conseguir la sensibilidad del ensayo deseada.

60

En una realización, el reactivo de marcado comprende uno o más anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos de la influenza A o B, conjugados con oro. En otra realización, el reactivo de marcado se fabrica como LyoSphere™ por Biolyph LLC 1317 Fifth Street South, Hopkins, MN 55343-7807, EE.UU. En esta realización, uno o más anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de la influenza A, anticuerpo-1) son conjugados en oro y proporcionados en estado líquido en un tampón seco de conjugado de oro. El tampón seco de conjugado de oro comprende tris, citrato de sodio, sucrosa, EDTA, azida de sodio y Triton X-405. Posteriormente se liofilizan partes alícuotas de microlitros de líquido como una

65

ES 2 357 435 T3

unidad precisa y duradera, en forma de esfera. Las LyoSpheres™ contienen el volumen preciso necesario en partes alícuotas que oscilan entre 13 μ L y 250 L. Si se precisa más volumen por dispositivo, se pueden envasar fácilmente múltiples LyoSpheres™ en el interior de un único dispositivo. En una realización, las esferas LyoSphere™ comprenden aproximadamente unos 15-50 microlitros o unos 25-30 microlitros cada una.

Las LyoSpheres™ se envasan en el interior del receptáculo 3 inmediatamente después de la fabricación. El receptáculo 3 puede estar sellado al vacío y empaquetado con una unidad deshidratante para evitar la degradación. Los reactivos liofilizados se manejan en el interior de juegos de envases que funcionan por debajo del 2% de humedad relativa (HR).

Etiquetas

Cuando se necesita una etiqueta para detectar los resultados, se puede emplear cualquier sustancia generalmente capaz de generar una señal detectable visualmente o mediante un dispositivo instrumental. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, de sustancias adecuadas incluyen cromógenos, catalizadores, compuestos luminiscentes (como fluorescente, fosforescente, etc.), compuestos radiactivos, etiquetas visuales incluyendo metales coloidales (como el oro) y partículas no metálicas, partículas teñidas, enzimas o sustratos, o partículas de látex polimérico orgánico, liposomas u otras vesículas que contienen sustancias que producen una señal, y similares. Véase, por ejemplo, la Patente estadounidense 2005/0112703, Song *et al.* y la Patente estadounidense U 5.2006/0127886, Kaylor *et al.*

Las soluciones coloidales de metales y otros tipos de partículas coloreadas útiles como etiquetas en procedimientos de inmunoensayo son conocidas y frecuentemente utilizadas en el campo para los inmunoensayos de flujo lateral. Véase, por ejemplo, Ching *et al.*, Patente estadounidense 6.534.320 para obtener una descripción de las partículas coloidales adecuadas como etiquetas. Véanse también las Patentes estadounidenses 4.313.734 y 6.485.982.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar enzimas como etiquetas. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, de las enzimas adecuadas para ser utilizadas como sondas de detección se divulgan en la Patente estadounidense 4.275.149. Un ejemplo de un sistema enzima/sustrato es la enzima fosfatasa alcalina y el sustrato nitroazul de tetrazolio-5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, o un derivado o análogo del mismo, o el sustrato 4-metilumbel-liferyl-fosfato. Otras etiquetas adecuadas pueden estar descritas en las Patentes estadounidenses 5.670.381 y 5.252.459. En algunas realizaciones, la etiqueta puede contener un compuesto fluorescente que produce una señal detectable. El compuesto fluorescente puede ser una molécula fluorescente, un polímero, un dendrímero, una partícula, etc. Algunos ejemplos de moléculas fluorescentes adecuadas incluyen, a título meramente enunciativo, fluoresceína, quelatos de europio, ficobiliproteína, rodamina y sus derivados y análogos.

Las etiquetas, como las anteriormente descritas, se pueden utilizar de forma independiente o conjuntamente con una micropartícula (en ocasiones denominada “perlas” o “microperlas”). Por ejemplo, se pueden utilizar las micropartículas presentes en la naturaleza, como las bacterias, polisacáridos (como agarosa), etc. También se pueden utilizar micropartículas sintéticas, como micropartículas de látex marcadas con un tinte de color o fluorescente. A pesar de que se puede utilizar cualquier micropartícula de látex en la presente invención, las micropartículas de látex están típicamente formadas por poliestireno, estirenos de butadieno, terterpolímero estireno-acrílico-vinilo, polimetilmetacrilato, polietilmetacrilato, copolímero estireno anhídrido maleico, acetato de polivinilo, polivinilpiridina, polidivinilbenceno, polibutilenotereftalato, acrilonitrilo, vinilcloruro-acrifatos, etc. o un derivado aldehído, carboxilo, amino, hidroxilo o hidrazido de los mismos. Otras micropartículas adecuadas se pueden describir en las Patentes estadounidenses 5.670.381 y 5.252.459. Algunos ejemplos disponibles en el mercado de partículas fluorescentes adecuadas incluyen las microesferas carboxiladas fluorescentes que comercializa Molecular con los nombres comerciales “FluoSphere” (Red 580/605) y “TransfluoSphere” (543/620), así como “Texas Red” y 5- y 6-carboxitetrametilrodamina, también comercializadas por Molecular Probes, Inc. Por otra parte, algunos ejemplos de micropartículas de látex coloreadas adecuadas disponibles en el mercado, a título meramente enunciativo, incluyen las perlas de látex carboxilado que comercializa Bang’s Laboratory, Inc, 9025 Technology Drive, Fishers, IN 46038-2886.

Cuando se utilizan, la forma de las partículas puede generalmente variar. En una realización en particular, por ejemplo, las partículas tienen forma esférica. No obstante, cabe señalar que la presente invención también contempla otras formas, como placas, varillas, discos, barras, tubos, formas irregulares, etc. Además el tamaño de las partículas también puede variar. Por ejemplo, el tamaño medio (por ejemplo, el diámetro) de las partículas puede oscilar entre los 0,1 nanómetros hasta los 1.000 micrones aproximadamente; en algunas realizaciones entre 1 nanómetro y 100 micrones aproximadamente; y en algunas realizaciones, entre 10 nanómetros y 10 micrones aproximadamente. Por ejemplo, las partículas a “escala micrón” suelen ser preferibles. Cuando se utilizan, estas partículas a “escala micrón” pueden tener un tamaño medio de entre 1 micrón y 1.000 micrones aproximadamente; en realizaciones entre 1 micrón y 100 micrones aproximadamente; y en algunas realizaciones entre 1 micrón y 10 micrones aproximadamente. De igual modo, también se pueden utilizar partículas a “nanoescala”. Estas partículas a “nanoescala” pueden tener un tamaño medio de entre 0,1 y 80 nanómetros aproximadamente; en algunas realizaciones de entre 0,1 y 5 nanómetros aproximadamente; y en algunas realizaciones de entre 1 y 20 nanómetros.

En algunos casos, resulta recomendable modificar las partículas de alguna forma, para que les resulte más fácil unirse al analito. En estos casos, las partículas pueden ser modificadas con determinados elementos de unión específicos que se adhieren a las mismas para formar partículas conjugadas. Por lo general, los elementos de unión

ES 2 357 435 T3

específicos se refieren a un elemento de una pareja de unión específica, es decir dos moléculas diferentes donde una de las moléculas se une química y/o físicamente a la segunda molécula. Por ejemplo, los elementos de unión específica inmunorreactivos pueden incluir antígenos, haptenos, aptámeros, anticuerpos (primarios o secundarios) y complejos de los mismos, incluyendo los formados mediante métodos de ADN recombinante o síntesis de péptidos. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína recombinante o una mezcla o mezclas o fragmentos de la misma, así como una mezcla de un anticuerpo y otros elementos de unión específicos. Los detalles de la preparación de estos anticuerpos y su adecuación para el uso como elementos de unión específicos son bien conocidos para los profesionales cualificados en el campo. Otras parejas de unión específica frecuentes incluyen, a título meramente enunciativo, biotina y avidina (o derivados de las mismas), biotina y estreptavidina, carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias (incluyendo secuencias de ácido nucleico de unión y sonda utilizadas en ensayos de hibridación de ADN para detectar una secuencia de ácido nucleico diana), secuencias de péptidos complementarias, incluyendo las formadas por métodos recombinantes, moléculas efectoras y receptoras, hormona y proteína de unión a hormona, cofactores de enzimas y enzimas, inhibidores de enzimas y enzimas, etc. Por otra parte, las parejas de unión específica pueden incluir elementos análogos al elemento de unión específica original. Por ejemplo, se puede utilizar un derivado o fragmento del analito, es decir un análogo del analito, siempre que tenga al menos un epítoto en común con el analito.

Por lo general, los elementos de unión específica se pueden unir a las partículas utilizando diversas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, la unión covalente de los elementos de unión específica a las sondas de detección (por ejemplo, partículas) se puede realizar utilizando grupos carboxílicos, amino, aldehído, bromoacetil, tiol, epíxi y otros grupos funcionales de unión o reactivos, así como cationes radicales y radicales libres residuales, a través de los que se puede obtener una reacción de unión a proteína. También se puede incorporar un grupo funcional en la superficie como un comonomero funcionalizado, porque la superficie de la partícula puede contener una concentración de superficie relativamente elevada de grupos polares. Por otra parte, aunque las partículas del conjugado a menudo están funcionalizadas tras la síntesis, en determinados casos, como el del poli (tiofenol), las micropartículas son capaces de una unión covalente directa con una proteína sin necesidad de otras modificaciones.

En algunas realizaciones, el primer o segundo reactivo de unión puede ser un reactivo de unión biológico. Estos reactivos de unión biológicos son bien conocidos en el campo y pueden incluir, a título meramente enunciativo, antígenos, haptenos, proteína A o G, neutravidina, avidina, estreptavidina, captavidina, anticuerpos primarios o secundarios (por ejemplo, monoclonales, policlonales, etc.) y complejos de los mismos. En muchos casos, resulta recomendable que estos reactivos de unión biológicos sean capaces de unirse a un elemento de unión específico (como un anticuerpo) presente en las partículas del conjugado.

También puede resultar recomendable el uso de diversos materiales no biológicos para el primer o el segundo reactivo de unión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el reactivo puede incluir un polielectrolito. Los polielectrolitos pueden tener una carga neta positiva o negativa, o una carga neta que es generalmente neutra. Algunos ejemplos adecuados de polielectrolitos con una carga neta positiva incluyen, a título meramente enunciativo, polilisina (comercializada por Sigma-Aldrich Chemical Co, Inc., St Louis, Mo.), polietilenimina; poliaminas funcionalizadas con epiclorohidrina y/o poliamidoaminas, como poli (dimetilamina-co-epiclorohidrina); polidialil (dimetil-amonio-cloruro; derivados de celulosa catiónica, como copolímeros de celulosa o derivados de celulosa injertados con un monómero de amonio cuaternario soluble en agua, etc. En una realización, se puede utilizar CelQuat[®] SC-230M o H-100 (comercializados por National Starch & Chemical, Inc. 742 Grayson Street, Berkeley, CA 94710-2677), que son derivados celulósicos que contienen un monómero de amonio cuaternario soluble en agua. Algunos ejemplos adecuados de polielectrolitos con una carga neta negativa incluyen, a título meramente enunciativo, ácidos poliacrílicos, como poli (ácido de etileno-co-metacrílico, sales de sodio), etc. Cabe señalar que también se pueden utilizar otros polielectrolitos. Algunos de ellos, como los polielectrolitos anfífilicos (es decir, que tienen porciones polares y no polares) pueden tener una carga neutra que es generalmente neutra. Algunos ejemplos de polielectrolitos anfífilicos incluyen, a título meramente enunciativo, poli (estiril-b-N-metil-2-vinil piridinio-yoduro) y poli (estiril-b-ácido acrílico), ambos comercializados por Polymer Source, Inc.. of Dorval, Canadá.

Diluyente

El diluyente se puede proporcionar en un contenedor separado, como un vial o una pipeta cerrada.

El diluyente utilizado con la actual invención puede ser suministrado por el usuario final o suministrado como parte de un kit, en una formulación concentrada o preparada para el uso. El diluyente se puede añadir antes o después de la adición de la muestra, y puede ser añadido independientemente de que se emplee un método de un paso o de dos pasos, cuando la banda de ensayo 4 sea un inmunoensayo de flujo lateral. Un propósito del diluyente consiste en resuspender y transportar las partículas del conjugado. El diluyente puede ser cualquier líquido que solubilice y resuspenda suficientemente el reactivo de marcado, de forma que la unión y el posterior marcado del analito de interés se produzcan en la solución. El diluyente también debe ser capaz de transportar el complejo del analito-reactivo de marcado mediante acción capilar, junto con la membrana de drenaje 15 y en todas las regiones de detección 16. El diluyente también puede servir para la ventaja añadida de reducir la cantidad de fluido corporal necesaria.

El rendimiento del ensayo se puede optimizar limitando el volumen total de muestra y diluyente en el receptáculo 3 hasta un nivel en el que el líquido contacte con la primera almohadilla absorbente 14 sin contactar con la porción

ES 2 357 435 T3

alargada 6 del soporte 2. El contacto de la solución diluyente-muestra con la porción alargada 6 del dispositivo 1 permite un drenaje indeseado de la solución entre la banda de ensayo 4 y el soporte 2. El drenaje más allá de la banda de ensayo 4 interfiere con el flujo adecuado de la solución a lo largo de la banda de ensayo 4. Por tanto, el nivel de solución está preferiblemente limitado a un nivel inferior al borde inferior del soporte 2, que se puede conseguir a través de la función de alineado 5 y la función de tope 9, o de ambas, del soporte 2 del dispositivo 1.

Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen solución salina fosfatada (PBS) (pH de 7,2), solución salina tamponada con tris (TBS) (pH de 8,2) o ácido 2-(N-morfolino)etano sulfónico (MES) (pH de 5,3). Estos pueden contener otras actividades para mejorar el rendimiento del ensayo, como el glicol de polietileno, materiales proteínicos como gelatina, caseína y albúmina de suero bovino, detergentes como sulfato de dodecilo y sodio, desoxicolato de sodio y TRITON X-100 (éter de polietileno glicol tert-octilfenilo), polímeros solubles en agua y conservantes. En una realización, el diluyente puede comprender entre 10 y 13 g/L aproximadamente, o unos 12,1 g/L de tris base; entre 0,9 y 2,0 g/L aproximadamente, o unos 1,86 g/L EDTA; entre 5 y 15 g/L aproximadamente, o unos 10,00 g/L BSA; entre 1 y 3 mLVL aproximadamente, o unos 2,0 ml de Thesit; unos 0,94 g/L de azida de sodio; entre 8,5 y 30 g/L aproximadamente, o unos 29,22 g/L de cloruro sódico; entre 8 y 30 g/L aproximadamente, o unos 25 g/L de CHAPS; unos 0,32 mL/L de gentamicina (50 ug/mL) ajustada a un pH de entre 7 y 9 aproximadamente. En una realización, el pH es aproximadamente de 9,0.

Método de uso

Muestra de ensayo

Como se ha descrito anteriormente, la muestra de ensayo utilizada se puede obtener de diversas fuentes. La muestra utilizada depende en parte de la disponibilidad de la muestra y del analito a detectar. La muestra puede ser procesada antes del uso con el dispositivo descrito aquí. Las muestras contempladas que se pueden utilizar con la presente invención incluyen, a título meramente enunciativo, tampones de mucosa nasal u oral, muestras de orina, muestras de lavado nasal, aspiración nasofaríngea, muestras faríngeas o similares.

Analitos

El dispositivo descrito aquí es adecuado para cualquier analito para el que haya disponible una pareja de unión adecuada y que sea capaz de migrar por la banda con la muestra de líquido mediante el flujo lateral. Los ejemplos de analitos se han descrito anteriormente y son conocidos por un profesional cualificado en el campo.

El dispositivo puede ser utilizado con bandas de inmunoensayo lateral que emplean el método de un paso o el método de dos pasos anteriormente descritos. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, el reactivo de marcado utilizado puede estar impregnado en la primera almohadilla absorbente 14 de la banda de ensayo 4, empleando así el método de "un paso". El usuario puede aplicar directamente, poner en contacto o depositar la muestra de ensayo en la primera almohadilla absorbente 14. El diluyente se puede añadir antes o después de que la muestra entre en contacto con la banda de ensayo 4. El diluyente se puede aplicar al receptáculo 3 mediante una fuente separada como una pipeta, o cualquier otro medio efectivo conocido por los profesionales cualificados en el campo. El diluyente se desplaza a través de la primera almohadilla absorbente 14 que está en comunicación líquida con la membrana porosa 15, con una o más regiones de detección 16. En esta realización, el reactivo de marcado no necesita ser previamente dispensado en el receptáculo 3. Además, en esta realización, el soporte 2 que contiene la banda de ensayo 4 puede ser proporcionado al consumidor ya introducido en el interior del receptáculo 3.

Alternativamente, el dispositivo 1 se puede utilizar con bandas de inmunoensayo de flujo lateral que emplean un método de "vertido" o de dos pasos. En esta realización, una muestra se mezcla primero con un reactivo de marcado antes de poner en contacto la muestra con una banda de ensayo 4. La muestra y el reactivo de marcado se pueden mezclar en el interior del receptáculo 3, o en un contenedor separado. Posteriormente, el soporte 2 que contiene la banda de ensayo 4 se pone en contacto con la mezcla que contiene la muestra y el reactivo de marcado.

En una realización que emplea el método de dos pasos, el reactivo de marcado se proporciona previamente dispensado en un receptáculo 3. El receptáculo 3 puede ser proporcionado a un cliente conteniendo el reactivo de marcado y sellado con un tapón o cierre similar. En esta realización, el reactivo de marcado se puede suministrar de diversas formas, incluyendo, por ejemplo, secado en el receptáculo 3, secado en perlas, secado en polvo, secado al vacío, secado en frigorífico, secado con aire a alta temperatura, liofilizado utilizando métodos estándar o liofilizado en esferas, como se describe a continuación. El reactivo de marcado también se puede liofilizar sobre fibra de vidrio u otra almohadilla adecuada, o se puede secar sobre el fondo del receptáculo 3. El usuario puede después abrir el receptáculo 3 y añadir diluyente para solubilizar el reactivo de marcado, o el reactivo de marcado se puede solubilizar, cuando sea necesario, con la adición de la muestra. El diluyente se puede añadir antes o después de colocar la muestra en el receptáculo 3.

El usuario, independientemente del tipo de banda de ensayo 4 utilizado, inicia el flujo lateral a lo largo de la banda de ensayo 4, insertando el soporte 2 que contiene una banda de ensayo 4 adecuada. El soporte 2 y la banda de ensayo 4 se pueden montar antes de proporcionar el dispositivo 1 al consumidor o el soporte 2 y la banda de ensayo 4 se pueden proporcionar por separado para su montaje antes del uso.

ES 2 357 435 T3

Tras la inserción del soporte 2 que contiene una banda de ensayo adecuada 4 en el receptáculo 3 que contiene la muestra, se inicia el flujo lateral. En las realizaciones que utilizan una banda de ensayo de tipo inmunoensayo de flujo lateral, la muestra y/o el diluyente se desplaza por la primera almohadilla absorbente 14 en comunicación líquida con la membrana porosa 15 que tiene una o más regiones de detección 16. La muestra líquida y/o el diluyente se acumula después en la segunda almohadilla absorbente 17.

Detección de los resultados del ensayo

Como se ha mencionado anteriormente, con la presente invención se pueden utilizar diversas etiquetas. El tipo de etiqueta utilizado para determinar la forma en la que se detecta la etiqueta. Algunos ejemplos, a título meramente enunciativo, de la detección de la etiqueta se pueden utilizar con el dispositivo, como se recoge a continuación.

15 *Partículas coloreadas*

Las partículas coloreadas, como una solución coloidal de un metal (por ejemplo, oro coloidal), se pueden utilizar, especialmente en realizaciones que utilizan inmunoensayos de flujo lateral. En realizaciones que utilizan estos tipos de etiquetas, el desarrollo del color en la zona de reacción se puede observar visualmente sin la ayuda de instrumentos adicionales. Cuando haya una región de control presente, la presencia o ausencia de color en la región de control indica si la prueba se ha completado con éxito. Por ejemplo, cuando no aparece ninguna línea en la región de control, se puede concluir que la prueba no es concluyente, sea por una degradación del reactivo o por una muestra insuficiente. Cuando la reacción sea de naturaleza cuantitativa, el desarrollo del color se puede comparar con el color de uno o más estándares de controles internos para determinar el nivel aproximado de concentración de analito. Cualquier partícula coloreada adecuada conocida en el campo se puede emplear con la presente invención, y estas partículas serán conocidas por una persona con unos conocimientos normales en el campo.

Etiquetas luminiscentes

Una alternativa a las partículas coloreadas como etiquetas son las etiquetas que utilizan la luminiscencia. Los sistemas de ensayo de lectura visual que emplean etiquetas coloreadas como una solución coloidal de oro o partículas de látex azul pueden proporcionar solamente una sensibilidad limitada.

En la presente invención también se puede emplear una técnica conocida como “detección de fluorescencia de resolución temporal”. La detección de fluorescencia de resolución temporal está diseñada para reducir las señales de fondo de la fuente de emisión o de los procesos de dispersión (resultantes de la dispersión de la radiación de excitación) al aprovechar las propiedades de fluorescencia de determinados materiales fluorescentes, como quelatos de lantánidos como el europio (Eu (III)) y terbio (Tb (III)). Los quelatos pueden presentar una emisión de larga vida, banda estrecha, de fuerte desplazamiento hacia el rojo, tras la excitación del quelato a longitudes de onda sustancialmente más cortas. Típicamente, el quelato posee una fuerte banda de absorción ultravioleta debido a un cromóforo ubicado cerca del lantánido en la molécula. Con posterioridad a la absorción de luz del cromóforo, la energía de excitación puede ser transferida del cromóforo excitado al lantánido. Esto viene seguido de una emisión de fluorescencia característica del lantánido. El uso de la excitación en forma de impulsos y de la detección temporal, combinado con filtros de emisiones de banda estrecha, permite la detección específica de la fluorescencia del quelato de lantánido solamente, rechazando la emisión de otras especies presentes en la muestra que típicamente tienen una vida más corta o una emisión de longitud de onda más corta.

La detección de fluorescencia se puede utilizar para detectar la presencia de analito en las zonas de detección y control y, por lo general, utiliza el filtrado de la longitud de onda para aislar los fotones de emisión de los fotones de excitación, y un detector que registra los fotones de emisión y produce un resultado registrable, normalmente en forma de señal eléctrica o imagen fotográfica. Algunos ejemplos de los tipos de detectores incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplatas; microscopios de fluorescencia; escáneres de fluorescencia y citómetros de flujo. Un detector de fluorescencia adecuado para su uso con la presente invención es el FluoroLog III Spectrofluorometer, comercializado por SPEX Industries, Inc of Edison, N.J. La etiqueta de la zona de unión se puede confinar a una o más regiones de unión específicas.

La etiqueta luminiscente determinable mediante cualquiera de los lectores objeto del ensayo puede ser una etiqueta fluorescente, como las descritas en la solicitud de Patente estadounidense 2004/0151632, Badley, *et al.* En estas realizaciones, la señal de emisión puede ser una señal de emisión fluorescente. En determinadas realizaciones, la fuente de luz puede ser una fuente de luz ultravioleta. La señal de excitación puede ser luz ultravioleta en determinadas realizaciones.

También se pueden utilizar etiquetas radioactivas y la detección se consigue utilizando métodos estándar conocidos en el campo. El soporte 2 puede retirarse o no para la detección de etiquetas radioactivas.

Ejemplos

Ejemplo I

5 Los siguientes ejemplos se refieren a una realización que utiliza el dispositivo 1, en la que la banda de ensayo 4 es un inmunoensayo de flujo lateral rápido y cualitativo, para detectar los antígenos de la nucleoproteína viral de la influenza A e influenza B en muestras como el lavado nasal, la aspiración nasofaríngea, muestras faríngeas, nasales y nasofaríngeas.

10

Kit de ensayo y componentes

15 Se prepara un kit de ensayo para la detección de la influenza A y B, que comprende un receptáculo 3 en forma de tubo de ensayo, un soporte 2, un diluyente de la muestra e instrucciones. El receptáculo 3 contiene una perla liofilizada de anticuerpos monoclonales asociados al oro coloidal para la influenza A y la influenza B (“anticuerpos detectores”). El soporte 2 contiene una membrana de nitrocelulosa 15 con anticuerpos de captura secos en líneas separadas para la influenza A y la influenza B. El soporte 2 se monta con el receptáculo 3 durante el ensayo y posteriormente se desecha para reducir la exposición a posibles patógenos. El soporte 2 también proporciona una o más guías de detección 13 para la banda de ensayo 4.

20

25 El kit incluye una banda de ensayo 4 con un soporte 2 montado como se muestra en la Fig. 8, cerrada en una bolsa con una unidad deshidratante y un indicador que se utiliza para señalar los niveles de humedad en el interior de la bolsa. La banda de ensayo 4 transporta anticuerpos monoclonales de captura contra la influenza A y la influenza B para las líneas de ensayo y un anticuerpo antimurino de cabra para un control. Las cepas de influenza utilizadas para producir los anticuerpos monoclonales incorporados en la banda de ensayo 4 y los reactivos de marcado son A/Texas, A/H1N1, B/Singapore y B/Beijing/184/93. El soporte 2 se utiliza para sellar sustancialmente el receptáculo 3. La porción alargada 6 del soporte 2 evita que la banda de ensayo 4 se doble mientras el receptáculo 3 está tapado. La banda de ensayo está preparada para ser utilizada tal y como se suministra. La bolsa que contiene la banda de ensayo 4 y el soporte 3 se almacena a 2-25°C cuando no está en uso.

30

35 El kit también incluye un receptáculo 3 tapado que contiene un reactivo de marcado en forma de una perla del conjugado. El receptáculo 3 está cerrado en una bolsa para prevenir la contaminación por humedad. El reactivo de marcado comprende un conjugado de oro contra la influenza A y contra la influenza B que actúa como anticuerpos detectores. Las cepas de influenza utilizadas para producir los anticuerpos monoclonales incorporados en la banda de ensayo 4 y el reactivo de marcado son A/Texas, A/H1N1, B/Singapore y B/Beijing/184/93. La bolsa se almacena a 2-25°C cuando no se está utilizando. El tapón que cierra el receptáculo 3 no se retira antes del uso.

Diluyente de la muestra/Control negativo

40

El kit también incluye diluyente proporcionado en un vial con gotero que sirve como control negativo. La solución se almacena entre 2°C y 25°C, cuando no se está utilizando.

45 Las pipetas de transferencia de plástico con marcas del volumen de 50 μ L y 100 μ L también se proporcionan con el kit.

50 El reactivo de marcado proporcionado en el receptáculo 3 es en forma de una perla liofilizada. La perla liofilizada es una perla LyoSphere™ comercializada por Biolyph. Una LyoSphere comprende una mezcla de tres anticuerpos incluyendo el anticuerpo-1 de la influenza A, el anticuerpo-2 de la influenza A, y el anticuerpo-1 de la influenza B conjugada con oro. Se prepara a partir de un “tampón seco de conjugado de oro” líquido que se suministra a Biolyph, una empresa con ubicada en Hopkins Minnesota y especializada en reactivos de diagnóstico y ciencias de la vida, <http://www.biolyph.com>. El tampón seco de conjugado de oro se compone de tris, PEG-20.000, citrato de sodio, PVP-40, sucrosa (0,5%), BSA, EDTA, leche deshidratada no grasa, azida de sodio, Tween-20, Triton X-405, ajustado a un pH de 9,0 a 9,5 aproximadamente. Se secan unos 25-30 microlitros en una única perla.

55

60 La membrana de nitrocelulosa 15 de la banda de ensayo 4 se prepara de la siguiente manera: En primer lugar, se aplican los reactivos de unión apropiados descritos aquí a la nitrocelulosa en presencia de un “tampón de control/ensayo” compuesto por fosfato de sodio, cloruro de sodio y azida de sodio. Posteriormente la nitrocelulosa se seca al aire en una torre de calor durante varios minutos. Un “tampón de tope” que comprende fosfato de sodio, tween-20, cloruro de sodio, Triton X-405, BSA, azida de sodio y leche deshidratada no grasa se aplica a la nitrocelulosa. La nitrocelulosa se seca al aire por segunda vez en una torre de calor durante unos minutos, se lamina y se corta en bandas de ensayo. Se monta la banda de ensayo, incluyendo una parte posterior adhesiva, nitrocelulosa bloqueada, una almohadilla de drenaje superior y una almohadilla de muestra inferior. La banda de ensayo 4 se monta en un entorno de humedad controlada.

65

La banda de ensayo 4 está colocada en una bolsa con los tubos del conjugado de oro y la unidad deshidratante en un entorno de humedad controlada.

ES 2 357 435 T3

Método de uso del dispositivo

Recogida de muestras

5 Las muestras son recogidas y transportadas en contenedores estándar y almacenadas a unos 2-8°C hasta el ensayo. Idealmente, la muestra se somete al ensayo lo antes posible, aunque se puede conservar hasta 72 horas a una temperatura de 2-8°C antes del ensayo. Si el ensayo no se puede realizar en este marco de tiempo, las muestras se pueden congelar inmediatamente después de su recepción y almacenarse congeladas (por debajo de -20°C aproximadamente) hasta dos semanas antes del ensayo. Un único ciclo de congelación/descongelación no afectará a los resultados del
10 ensayo.

Se pueden utilizar medios de transporte apropiados para la muestra a analizar. Por ejemplo, para la recogida de fluidos orales, los siguientes medios de transporte son aceptables para la recogida de muestras: M4, M4-RT, M5, Stuart's, Hank's Balanced Salt, Amies, Dulbecco's PBS, solución salina al 0,85%, comercializada por Fisher Scientific, 4500 Turnbeny Drive, Hanover Park Illinois 60133.
15

Se utilizan los siguientes tipos de tampón (tampón/mango): algodón/plástico, rayón/plástico, espuma/plástico, poliéster/metal, poliéster/plástico, rayón/metal, algodón/metal, nylon flocado y similares. Los tampones de alginato de calcio no son aconsejables, porque la sustancia química reduce las reacciones positivas.
20

Preparación de muestras

Las muestras y reactivos se llevan inicialmente hasta la temperatura ambiente (20-25°C), antes del ensayo.
25

Cuando se utilizan muestras de lavado nasal, aspiración nasofaríngea o tampones en medios de transporte, se siguen los pasos siguientes:

1. Un receptáculo 3 que contiene el reactivo de marcado se retira de su bolsa. Se etiqueta convenientemente el
30 receptáculo 3.

2. Se retira el tapón del receptáculo 3.

3. Se añaden tres gotas (unos 100 μ L) del diluyente de la muestra al receptáculo 3 utilizando un vial con gotero.
35

4. Se mezcla bien la muestra independientemente de la consistencia. Una de las pipetas de transferencia suministradas con el kit se puede utilizar para mezclar la muestra suavemente, aunque a fondo, apretando el bulbo de la pipeta tres veces en la muestra. Alternativamente, la muestra se puede mezclar durante al menos 10 segundos utilizando un agitador de vortex.
40

5. Utilizando la misma pipeta, se retiran unos 100 μ l de la muestra y se añaden al receptáculo 3.

6. Utilizando la misma pipeta, se mezcla suavemente aunque a fondo la muestra y el reactivo de marcado apretando el bulbo de la pipeta en tres ocasiones. Alternativamente, la muestra y el reactivo de marcado se pueden mezclar durante al menos 10 segundos utilizando un agitador de vortex. Posteriormente se desecha la pipeta.
45

Cuando se recogen muestras con tampón nasales, de garganta o nasofaríngeas inmediatamente sin medios de transporte, se siguen los siguientes pasos:

1. Un receptáculo 3 que contiene el reactivo de marcado se retira de su bolsa. Se etiqueta convenientemente el
50 receptáculo 3.

2. Se retira el tapón del receptáculo 3 y se desecha.

3. Utilizando el vial con gotero, se añaden inmediatamente 8 gotas (unos 300 μ l) del diluyente de la muestra al receptáculo 3. Para las muestras muy viscosas, se pueden añadir hasta 12 gotas (unos 500 μ l) de diluyente de la muestra.
55

4. Posteriormente se sumerge el tampón en el receptáculo 3 y se gira tres veces en el líquido. Se presiona el tampón contra el lateral del tubo mientras se retira para apretarlo todo lo posible.
60

Procedimiento de ensayo

65 Para utilizar el dispositivo, la perla del conjugado se rehidrata en el receptáculo 3 que contiene el reactivo de marcado con diluyente. Posteriormente se añade la muestra como se describe a continuación. El contenido se mezcla girando el receptáculo 3 suavemente antes de añadir el soporte 2 que contiene la banda de ensayo 4. Posteriormente

ES 2 357 435 T3

se incuba el ensayo a unos 20°C (aproximadamente a temperatura ambiente), lo que permite que el antígeno de la influenza A o de la influenza B de la muestra diluida se una al correspondiente conjugado anticuerpo monoclonal-oro coloidal, a medida que la muestra sube por la banda de ensayo. El segundo reactivo de unión, un anticuerpo monoclonal para la influenza A, se une a la membrana de nitrocelulosa en una posición “test-FLU A”. Cuando el complejo antígeno-anticuerpo de la influenza A-oro coloidal se une al segundo reactivo de unión, se crea una línea de color rosa a rojo visible. De igual modo, el anticuerpo monoclonal de la influenza B se une a la membrana en una posición “test-FLU B”. La unión del analito a esta posición resulta en una línea de color rosa a rojo cuando captura los complejos antígeno-anticuerpo de la influenza B-oro coloidal. Cuando no hay ningún antígeno presente, no se forma ningún complejo ni aparece ninguna línea de color rosa a rojo ni en la posición “test FLU A” ni en la “test FLU B” de la banda de ensayo. Se coloca una línea de control interna en sentido ascendente de las posiciones FLU A y FLU B para determinar si se ha producido un flujo adecuado a través de la banda de ensayo durante el ensayo. La línea de control puede ser cualquier anticuerpo adecuado, conocido por cualquier persona con unos conocimientos normales en el campo. Por ejemplo, la línea de control puede comprender un anticuerpo antimurino de cabra, que está unido en la posición de control de la banda de ensayo. Hay una línea de color rosa a rojo visible en la posición de control de la banda de ensayo presente cada vez que se somete a ensayo una muestra o control, siempre que el ensayo haya funcionado convenientemente. Si no se ve ninguna línea de control de color rosa a rojo, el ensayo se considera inválido.

Para realizar un ensayo utilizando el dispositivo, se deben seguir los pasos siguientes:

1. El soporte 2 que contiene una banda de ensayo 4, suministrado en una bolsa, se retira de la bolsa.
2. La porción alargada 6 del soporte 2 que contiene la banda de ensayo 4 se inserta en el receptáculo 3 que contiene la muestra y el oro coloidal rehidratado conjugado con anticuerpos de la influenza A y de la influenza B (el reactivo de marcado).
3. El soporte 2 se presiona firmemente para sellar sustancialmente el receptáculo 3.
4. Posteriormente el dispositivo se incuba a 20-25°C durante 15 minutos.
5. Posteriormente los resultados se pueden leer en el plazo de un minuto. El soporte 2 se puede retirar del receptáculo 3, si los resultados del ensayo son difíciles de leer. El receptáculo 3 se puede volver a tapar con el soporte 2 u otro tapón y desechar una vez que se haya completado el ensayo.

Controles internos

Los controles internos están contenidos en la banda de ensayo 4 y, por lo tanto, se pueden evaluar con cada ensayo. Una línea rosa o roja que aparece en la “línea de control” sirve como control positivo interno e indica que el ensayo se ha realizado correctamente, que la muestra se ha añadido, que ha fluido correctamente, y que los reactivos del ensayo estaban activos en el momento del uso. Un fondo incoloro alrededor de las líneas de control o de ensayo sirve como control negativo. Un fondo que oscurece la lectura de los resultados invalida el ensayo y es una señal de deterioro del reactivo, una muestra incorrecta o un rendimiento inapropiado del ensayo.

Ensayos de control externos

Se puede realizar un ensayo de control externo que consta de los pasos siguientes:

1. Todos los componentes del ensayo, los reactivos y las muestras se llevan a temperatura ambiente (20-25°C) antes del ensayo.
2. Un receptáculo 3 y una banda de ensayo 4 se utilizan para el ensayo de control positivo y un receptáculo 3 y una banda de ensayo 4 se utilizan para el ensayo de control negativo.
3. El receptáculo 3 se retira de la bolsa y los tubos se etiquetan convenientemente. Las bolsas se desechan.
4. Los tapones se retiran de los receptáculos 3.
5. Se añaden entre tres y cinco gotas (entre 90 μL y 210 μL aproximadamente) del reactivo de control positivo al receptáculo 3 marcado para el control positivo.
6. Se añaden entre tres y siete gotas (entre 120 μL y 280 μL aproximadamente) del diluyente de la muestra/control negativo al receptáculo 3 marcado para el control negativo.
7. Los contenidos de los receptáculos 3 se mezclan o agitan durante 10 segundos.
8. El soporte 2 que contiene las bandas de ensayo de flujo lateral 4 anteriormente descritas se retiran de las bolsas.

ES 2 357 435 T3

9. El soporte 2 que contiene la banda de ensayo 4 se añade a cada receptáculo 3. Cada receptáculo 3 se cierra presionando firmemente la parte superior del soporte 2.

10. Ambos receptáculos 3 son incubados a 20-25°C durante 15 minutos.

11. Los resultados se leen en el plazo de un minuto.

Resultados de la lectura

Un resultado negativo del ensayo se determina si existe una banda de color rosa a rojo en la posición de la línea de control solamente.

Un ensayo positivo para la influenza A se determina si aparece una banda de color rosa a rojo en las posiciones de control y Flu A, sin ninguna banda presente en la posición Flu B. El aspecto de la línea de ensayo Flu A, incluso aunque sea muy débil, indica la presencia de un antígeno de influenza A. La intensidad de la línea del ensayo puede ser inferior que la de la línea de control.

Resultados positivos del ensayo para la influenza B: bandas de color ROSA-ROJO en las posiciones de la línea de control y Flu B. Ninguna banda en la línea de ensayo Flu A. El aspecto de la línea de ensayo Flu B, incluso aunque sea muy débil, indica la presencia de un antígeno de influenza B. La intensidad de la línea de ensayo puede ser inferior que la de la línea de control.

Unos resultados inválidos del ensayo se determinan cuando no se observa ninguna banda en la posición designada para la línea de control. El ensayo es inválido puesto que la ausencia de una banda de control indica que el procedimiento de ensayo se realizó de forma incorrecta o que se ha producido un deterioro de los reactivos. Los resultados del ensayo también se consideran inválidos cuando aparece una banda de color rosa a rojo en las posiciones de la línea de ensayo FLU A o FLU B del dispositivo, después de 16 minutos de incubación, o una banda de cualquier color que no sea rosa a rojo. Se pueden producir falsos positivos, si los ensayos se incuban durante demasiado tiempo. Las bandas con unos colores distintos al rosa/rojo pueden indicar un deterioro del reactivo.

Ejemplo II

En este ejemplo, el kit y el método son sustancialmente los mismos que los descritos en el Ejemplo I, con la excepción del reactivo de marcado utilizado. En este ejemplo, el reactivo de marcado se prepara en una almohadilla que posteriormente se coloca en el receptáculo 3, en lugar de la esfera liofilizada descrita en el Ejemplo I.

Para preparar la almohadilla que contiene el reactivo de marcado, cada anticuerpo se conjuga por separado añadiendo el anticuerpo a una solución de oro coloidal con un pH óptimo y con una concentración de proteína determinada para cada anticuerpo. Posteriormente, el conjugado de oro se bloquea con BSA y PEG-20.000, y después se centrifuga. El supernatante se desecha y la perla del conjugado de oro se resuspende en el tampón seco de conjugado de oro. Se mezclan los tres conjugados juntos a las proporciones convenientes para garantizar reactividades apropiadas y uniformes. Posteriormente el conjugado de oro líquido se pulveriza sobre una almohadilla de fibra de vidrio y se seca utilizando una torre de calor. El conjugado seco se corta en secciones de 8x10 mm y se coloca en un receptáculo con forma de tubo de ensayo, en un entorno de humedad controlada. El receptáculo que contiene la almohadilla del conjugado se puede utilizar después siguiendo el mismo protocolo descrito en el Ejemplo I.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de ensayo comprende:

- 5 a) un receptáculo con un extremo abierto y un extremo cerrado, y
b) un soporte, y
10 c) una banda de ensayo de flujo lateral,

15 donde el soporte se compone de una porción alargada para fijar la banda de ensayo al mencionado soporte, un cierre que sella sustancialmente el extremo abierto del mencionado receptáculo, una bisagra flexible que forma el soporte, y un elemento de agarre que sobresale por el extremo abierto del mencionado receptáculo cuando el soporte y la banda de ensayo se insertan en el receptáculo;

donde una bisagra flexible es una bisagra o elemento de flexión sin piezas móviles.

2. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el soporte comprende también una función de tope.

20 donde una función de tope posiciona el extremo distal del soporte y la banda de ensayo en la posición adecuada dentro del receptáculo con respecto a una muestra, a una distancia necesaria para iniciar el flujo lateral.

25 3. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el soporte comprende también al menos una función de alineado, donde una función de alineado es un hueco con una pared sólida a cada lado o una pared periódica.

30 4. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el soporte también dispone de uno o más elementos de retención.

5. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el soporte se compone de dos partes acoplables complementarias separadas que se acoplan una con otra para formar el elemento de agarre.

35 6. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el soporte comprende también una bisagra que separa una porción superior y una porción inferior de un elemento de agarre, donde el elemento de agarre se forma plegando la porción superior del elemento de agarre sobre la porción inferior del mismo por dicha bisagra.

40 7. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el soporte comprende también al menos una región de protección por toda su longitud.

8. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el soporte comprende también una o más guías de detección.

45 9. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el soporte comprende también una o más clavijas secundarias.

10. Un dispositivo conforme a la reivindicación 9, donde la banda de ensayo comprende también un reactivo de marcado movilizado difusamente.

50 11. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el receptáculo contiene una etiqueta conjugada al menos con un reactivo de unión.

55 12. Un dispositivo conforme a la reivindicación 11, donde la etiqueta se selecciona de entre el grupo compuesto por enzimas, radioisótopos, etiquetas fluorescentes, partículas de carbono, perlas y soluciones coloidales de metales.

13. Un dispositivo conforme a la reivindicación 11, donde el reactivo de marcado es una esfera liofilizada.

60 14. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el reactivo de marcado es liofilizado en una almohadilla y colocado en el receptáculo.

15. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el receptáculo se selecciona de entre el grupo compuesto por tubos de ensayo, cubetas cuadradas, cubetas triangulares, tubos de ensayo transparentes, cubetas transparente, tubos de ensayo opacos y cubetas opacas.

65 16. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el receptáculo dispone de una o más mirillas.

ES 2 357 435 T3

17. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde el receptáculo está curvado de manera que permite el aumento de su contenido.

5 18. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde la banda de ensayo es una banda de ensayo de flujo lateral que comprende un segundo reactivo de unión inmovilizado específico para la influenza A, un segundo reactivo de unión inmovilizado específico para la influenza B, y una región de control.

19. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, que también comprende un elemento de retención.

10 20. Un dispositivo conforme a la reivindicación 1, donde:

a) un receptáculo en forma de tubo de ensayo contiene un reactivo de marcado capaz de unirse a un analito,

15 b) la banda de ensayo comprende una primera almohadilla absorbente, una banda de membrana y una segunda almohadilla absorbente que define una trayectoria del flujo para el transporte de una muestra líquida,

c) la banda de ensayo comprende al menos un sitio de ensayo, además de un segundo reactivo de unión inmovilizado,

20 d) la banda de ensayo está insertada en el soporte, donde el soporte comprende también un soporte alargado que dispone de un hueco, un cierre que sella sustancialmente el extremo abierto del mencionado receptáculo, una función de tope y un elemento de agarre que sobresale por el extremo abierto del mencionado receptáculo cuando se inserta el soporte en el mismo.

25 e) el soporte se forma al plegar la porción superior del elemento de agarre sobre la porción inferior del mismo por la bisagra flexible, de forma que un borde de la porción plegada captura la segunda almohadilla absorbente;

f) donde el soporte, una vez plegado, comprende el elemento de agarre, el cierre y la función de tope;

30 donde una función de tope posiciona el extremo distal del soporte y la banda de ensayo en la posición adecuada dentro del receptáculo con respecto a una muestra, a una distancia necesaria para iniciar el flujo lateral.

35 21. Un dispositivo de ensayo conforme a la reivindicación 20, donde el reactivo de marcado comprende una etiqueta detectable y un primer reactivo de unión que se une a la influenza A.

22. Un dispositivo de ensayo conforme a la reivindicación 20, donde el reactivo de marcado comprende una etiqueta detectable y un primer reactivo de unión que se une a la influenza B.

40 23. Un dispositivo conforme a la reivindicación 20, donde el reactivo de marcado se conjuga con una almohadilla.

24. Un dispositivo de ensayo conforme a la reivindicación 20, donde el reactivo de marcado es una esfera liofilizada.

45 25. Un dispositivo de ensayo conforme a la reivindicación 20, donde la banda de ensayo comprende también una región de control.

50 26. Un dispositivo de ensayo conforme a la reivindicación 20, donde la banda de ensayo se compone de una primera almohadilla absorbente, una membrana de nitrocelulosa que cuenta con una parte posterior de plástico y una segunda almohadilla absorbente, que contiene los segundos reactivos de unión inmovilizados impregnados.

55 27. Un kit para detectar la presencia de un analito en una muestra, comprendiendo dicho kit: el dispositivo de la reivindicación 1, donde el soporte comprende una función de alineado, una o más guías de detección y un elemento de agarre, y una banda de ensayo, donde dicha banda de ensayo está fijada a la porción alargada y el soporte está configurado para ajustarse en el receptáculo, donde una función de alineado es un hueco con una pared sólida a cada lado o una pared periódica.

28. Un kit conforme a la reivindicación 27, donde el receptáculo contiene un reactivo de marcado predispensado.

60 29. Un kit conforme a la reivindicación 27, donde el kit comprende también un diluyente.

30. Un método para detectar un analito en una muestra, utilizando un dispositivo conforme a la reivindicación 2, que comprende los pasos siguientes:

65 a) proporcionar un receptáculo con un extremo abierto y un extremo cerrado que contiene un reactivo de marcado compuesto por una etiqueta y, al menos, un reactivo de unión;

ES 2 357 435 T3

- b) dispensar un diluyente en el receptáculo;
- c) introducir en el receptáculo una muestra sospechosa de contener el analito;
- 5 d) formar una mezcla compuesta por un reactivo de marcado, la muestra y el diluyente;
- e) poner en contacto la mezcla con una banda de ensayo de flujo lateral;
- 10 f) donde la banda de ensayo se fija a un soporte que comprende una porción alargada, un elemento de agarre, una característica de tope, un cierre que sella sustancialmente el receptáculo, donde el soporte se forma plegando por una bisagra flexible, la banda de ensayo se fija a la porción alargada, y el elemento de agarre sobresale por el extremo abierto del mencionado receptáculo cuando la porción alargada del soporte y la banda de ensayo se insertan en el receptáculo.
- 15 g) permitir el flujo lateral de la mezcla por acción capilar a lo largo de la banda de ensayo, de forma que la mezcla entre en contacto al menos con un segundo reactivo de unión inmovilizado en la banda de ensayo, y
- 20 h) detectar un resultado;

donde una bisagra flexible es una bisagra o elemento de flexión sin piezas móviles, generalmente una sección fina de plástico u otro material que conecta dos segmentos de una pieza para mantenerlos unidos y permite el movimiento;

25 donde una función de tope posiciona el extremo distal del soporte y la banda de ensayo en la posición adecuada dentro del receptáculo con respecto a una muestra, a una distancia necesaria para iniciar el flujo lateral.

31. Un método conforme a la reivindicación 30, donde el reactivo de marcado es una esfera liofilizada.

30 32. Un método conforme a la reivindicación 30, donde los analitos a detectar son uno o más analitos seleccionados de entre el grupo compuesto por la influenza A y la influenza B.

35

40

45

50

55

60

65

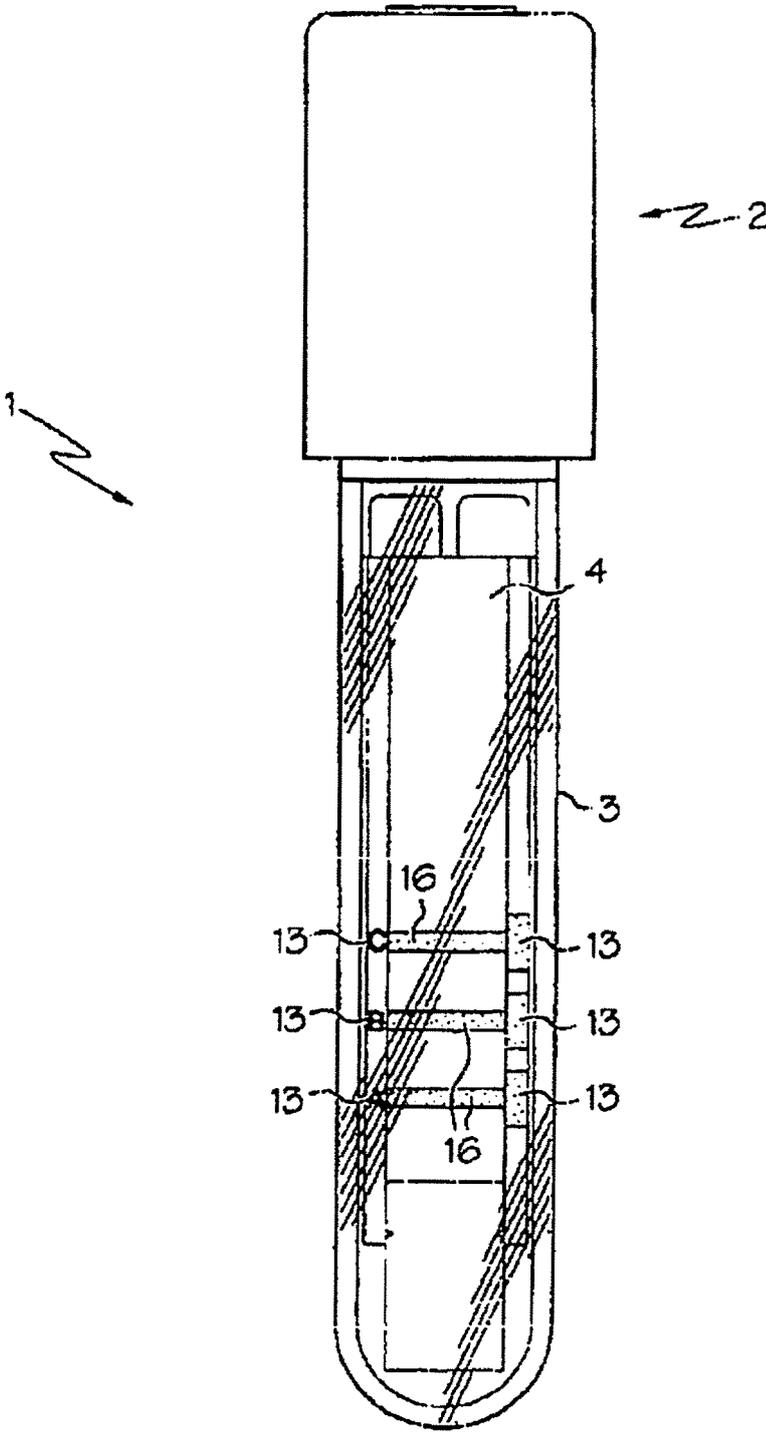


FIG. 1

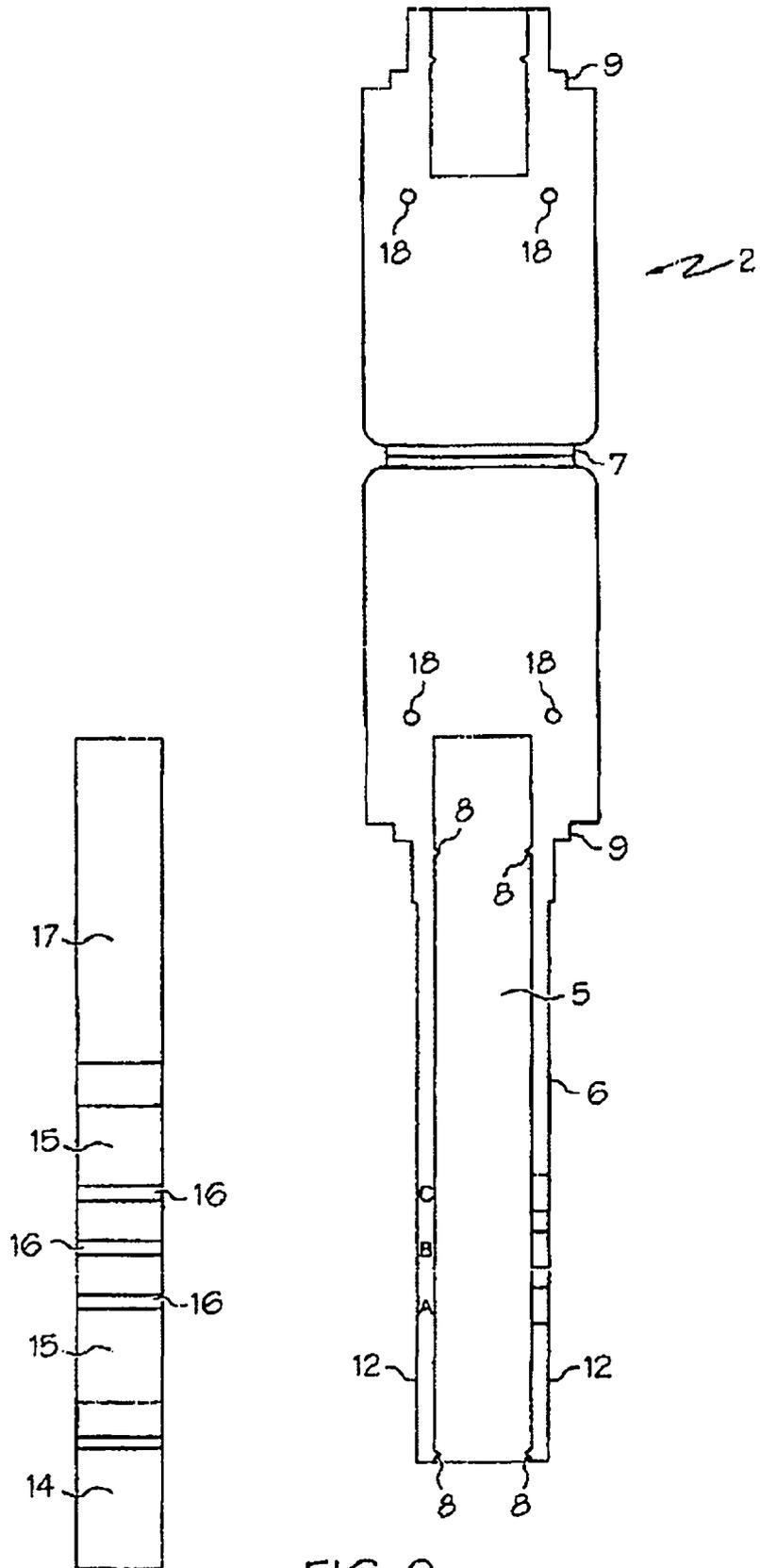


FIG. 2

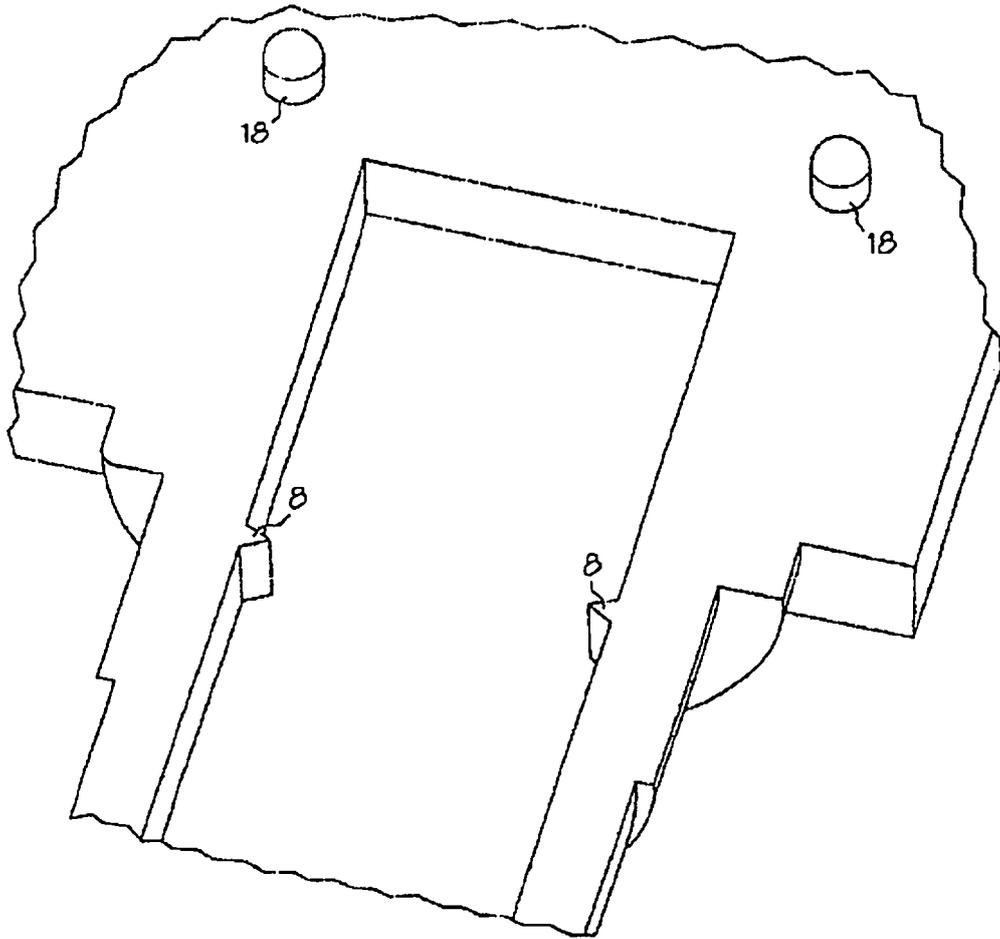


FIG. 3

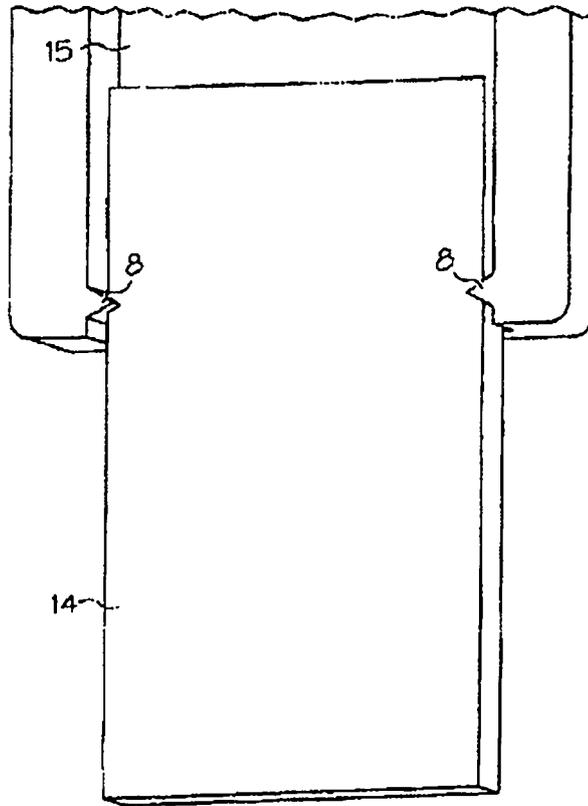


FIG. 4

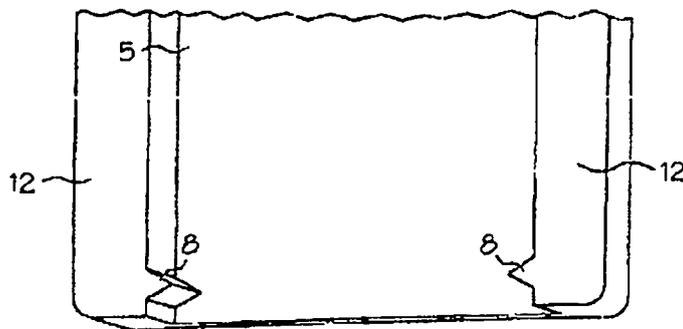


FIG. 5

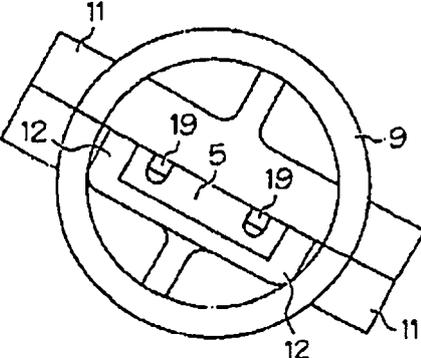


FIG. 6

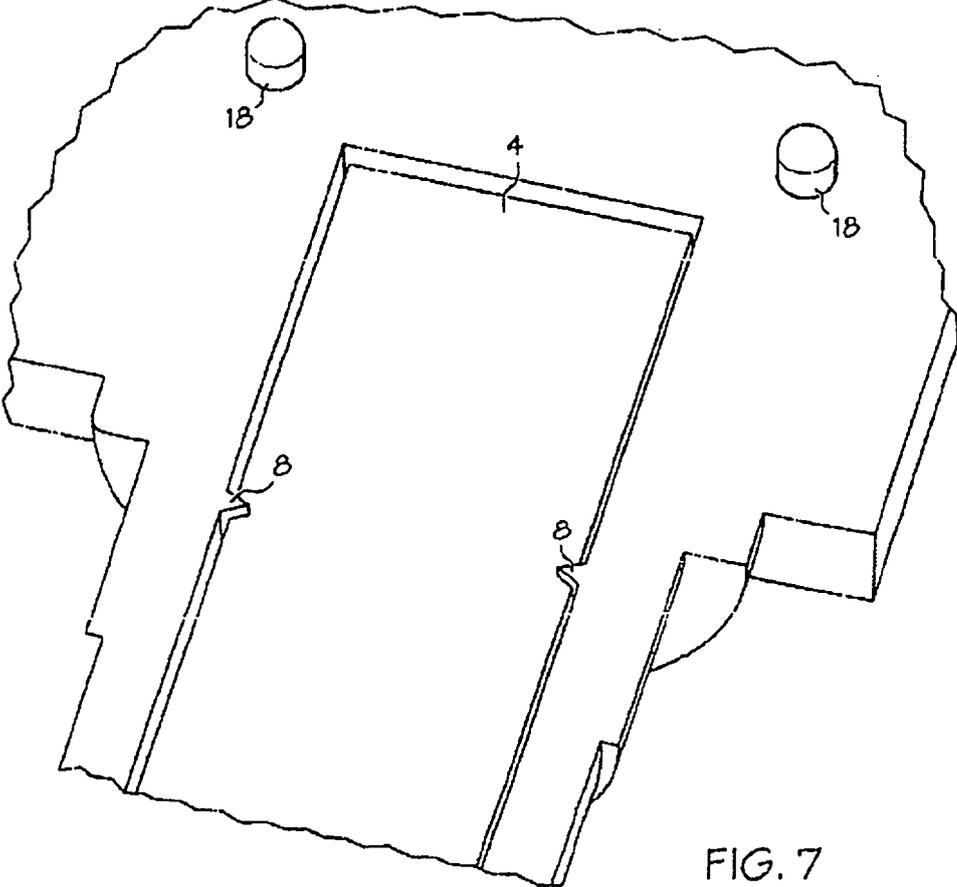


FIG. 7

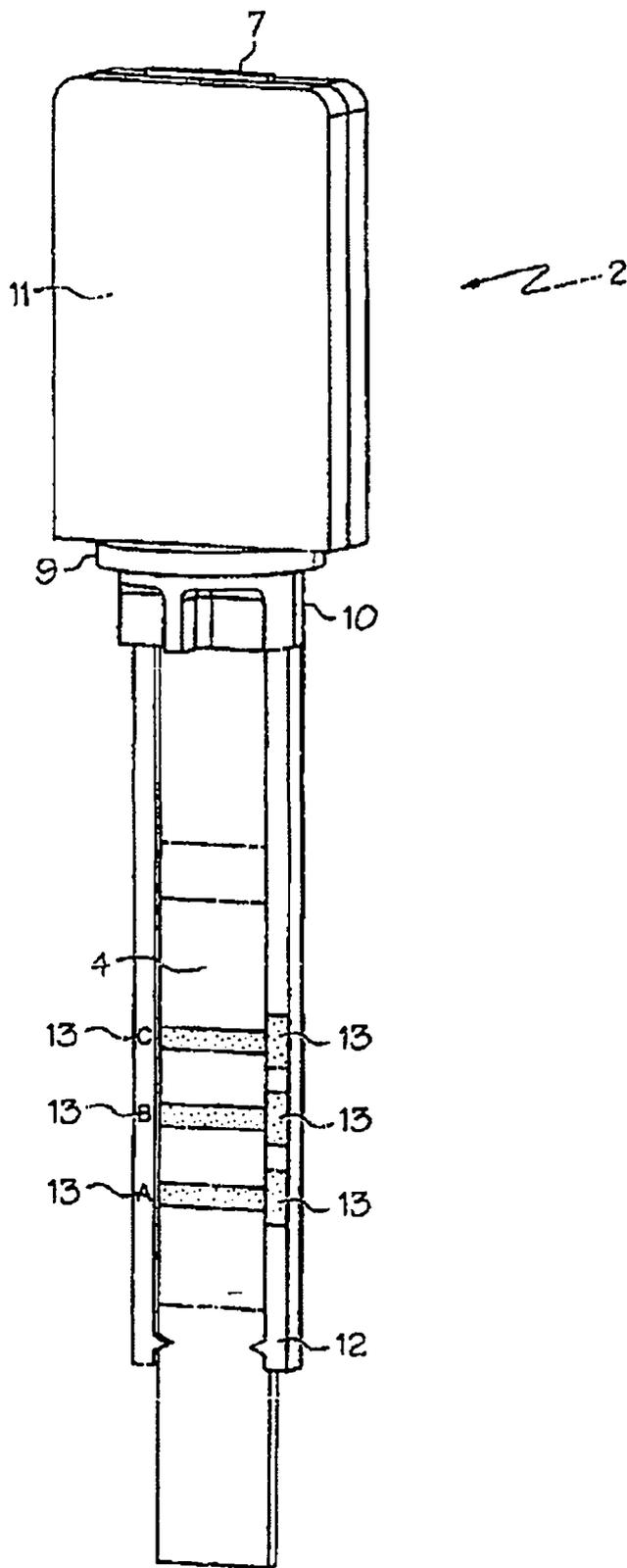


FIG. 8