(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 371 628**

(51) Int. CI.:
G01N 33/558 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01998830 .2**
(96) Fecha de presentación: **30.11.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1340083**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2003**

(54) Título: **SISTEMA DE MEJORA DE SEÑAL CON RESTOS MARCADOS MÚLTIPLES.**

(30) Prioridad:
30.11.2000 GB 0029154
17.04.2001 GB 0109313

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.01.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.01.2012

(73) Titular/es:
DIAGNOSTICS FOR THE REAL WORLD, LTD
840 DEL REY AVENUE
SUNNYVALE, CALIFORNIA 94085, US

(72) Inventor/es:
LEE, Helen;
HUANG, Ling;
DINEVA, Magda, Anastassova y
HU, Hsiang, Yun

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Sistema de mejora de señal con restos marcados múltiples

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para someter a ensayo la presencia de un analito en una disolución de ensayo y a estuches para llevar a cabo dichos métodos.

Un método convencional para someter a ensayo la presencia de un analito en una disolución de ensayo comprende capturar el analito sobre una varilla y detectar la presencia del analito sobre la varilla. La varilla presenta un extremo de contacto para poner en contacto la disolución de ensayo y una zona de captura lejos del extremo de contacto en la cual se inmoviliza el anticuerpo anti-analito (el anticuerpo de captura).

Para someter a ensayo la presencia del analito, el extremo de contacto de la varilla se pone en contacto con la disolución de ensayo. Si el analito se encuentra presente en la disolución de ensayo viaja hasta la zona de captura de la varilla por medio de la acción capilar donde es capturado por el anticuerpo de captura. La presencial del analito en la zona de captura de la varilla se detecta por medio de otro anticuerpo anti-analito (el anticuerpo de detección) marcado con, por ejemplo, oro coloidal.

Estos ensayos de varilla presentan varias ventajas. Son fáciles y baratos de llevar a cabo, no requieren instrumentos especializados y los resultados se obtienen de forma rápida y se puede leer visualmente. Por tanto, estos ensayos resultan particularmente apropiados para su uso en consultorio médico, domicilio, zonas lejanas y países en desarrollo donde el equipamiento especializado puede no estar disponible. Se pueden usar, por ejemplo, para someter a ensayo si el paciente se encuentra infectado con una enfermedad provocada por microorganismos tales como *Chlamydia trachomatis.*

No obstante, la sensibilidad de detección del analito que se usa en dichos ensayos es relativamente baja. Por consiguiente, si el analito únicamente está presente en pequeñas cantidades en la disolución de ensayo puede permanecer no detectado. Esto constituye una desventaja particular si el ensayo se usa para diagnosticar si el paciente presenta o no una enfermedad particular ya que puede ocurrir que la enfermedad no sea diagnosticada en el paciente. Este es particularmente el caso en el que el paciente es asintomático, pero también en el que los síntomas están presentes pero es necesario confirmar que éstos son producidos por la enfermedad particular, o cepa de enfermedad particular.

El documento WO 00/25135 describe un sistema de detección de varilla de dos etapas para la detección de antígenos. El sistema de detección usa un anticuerpo de biotina anti-antígeno y un anti-cuerpo anti-biotina marcado con oro coloidal (conjugado de oro anti-biotina). En la primera etapa, el anticuerpo de biotina se mezcla con la disolución de ensayo y la punta de la membrana de la varilla se sumerge posteriormente en la mezcla de forma que la mezcla acuosa impregne la membrana por medio de la acción capilar. El antígeno de la mezcla unido al anticuerpo con marcador de biotina es capturado por un anticuerpo anti-antígeno inmovilizado en la zona de captura de la varilla para formar un complejo que comprende el anticuerpo anti-antígeno inmovilizado, el antígeno y el anticuerpo con marcador de biotina. En la segunda etapa, la varilla se sumerge en una suspensión por separado del conjugado de oro de anti-biotina. El conjugado de oro anti-biotina impregna la membrana por medio de la acción capilar y se une al anticuerpo de biotina capturado con el antígeno en la zona de captura. Posteriormente, el antígeno es detectado por medio de la presencia de un marcador de oro en la zona de captura.

Mientras que el sistema de dos etapas puede proporcionar una mayor sensibilidad, resulta deseable mejorar la sensibilidad de detección del analito.

La solicitud de patente europea Nº. 0354847 describe un marcador de fluorescencia con agentes de formación de quelato de europio, que evita el conocido efecto de interrupción debido al marcador múltiple.

La patente de EE.UU. Nº. 4.228.237 describe un método para la detección de un ligando que utiliza una enzima marcada con avidina y un reactivo marcado con biotina.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un método para someter a ensayo la presencia de un analito en una disolución de ensayo que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una banda cromatográfica que tiene un extremo de contacto para poner en contacto la disolución de ensayo y un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la banda cromatográfica lejos del extremo de contacto, comprendiendo el resto de captura un miembro de un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción de emparejamiento distinta de base de ácido nucleico, al analito o a uno de sus derivados, como el otro miembro del par de enlace ligando/anti-

ligando;
b) poner en contacto un agente de dirección, capaz de unirse al analito o a su derivado, con la disolución de ensayo para permitir la unión del agente de dirección al analito o a su derivado en la disolución de ensayo, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos;
c) unir un marcador a cada uno de los dos o más ligandos del agente de dirección,
d) poner en contacto el extremo de contacto de la banda cromatográfica con la disolución de ensayo para permitir que el analito, o uno de sus derivados, unido al agente de dirección marcado se desplace hasta la zona de captura por medio de la acción capilar y sea capturado por el resto de captura; y
e) detectar la presencia del marcador en la zona de captura.

De acuerdo con la invención, el agente de dirección es unido a los marcadores para formar el agente de dirección marcado antes de que entre en contacto con la zona de captura. Estos contrastan con el método del documento WO 00/25135 en el que el anticuerpo de biotina y el conjugado de oro anti-biotina se impregnan hasta la membrana de la varilla en dos etapas por separado. De manera sorprendente, se ha encontrado que la sensibilidad de los métodos que usan la detección de analito es mayor que la del método de dos etapas del documento WO 00/25135. En condiciones óptimas, la sensibilidad de la detección de analito es al menos un orden de magnitud mayor que la sensibilidad de detección que usa el método de dos etapas.

Para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención, se puede añadir simplemente el agente de dirección y los marcadores a la disolución de ensayo y posteriormente se pone en contacto la disolución de ensayo con el extremo de contacto de la banda cromatográfica. Dichos métodos son más fáciles de llevar a cabo que el método descrito en el documento WO 00/25135 en el que se requieren dos etapas de impregnación por separado. Por tanto, los resultados se pueden obtener más rápidamente y la sensibilidad de detección del analito es mayor.

La expresión “banda cromatográfica” se use en el presente documento para hacer referencia a cualquier banda porosa de material capaz de transportar una disolución por medio de capilaridad. La banda cromatográfica puede ser apta para flujo lateral absorbente o no absorbente, pero preferentemente flujo lateral absorbente. Por la expresión “flujo lateral no absorbente” se entiende un flujo de líquido en el que todos los componentes disueltos o dispersos del líquido son transportados en tasas considerablemente iguales y con flujo relativamente inalterado en sentido lateral a través de la membrana opuesto a la retención preferente de uno o más componentes como tendría lugar con el “flujo lateral absorbente”. Las membranas aptas para flujo lateral absorbente incluyen papel, nitrocelulosa y nailon. Un ejemplo preferido es nitrocelulosa.

Los marcadores se pueden unir a los ligandos del agente de dirección por medio de pre-mezcla del agente de dirección con los marcadores antes de añadir el agente de dirección (o por el contrario de la puesta en contacto con) la disolución de ensayo. No obstante, en algunas circunstancias, es preferible que el agente de dirección y los marcadores no se pre-mezclen debido a que dicha pre-mezcla provoca la precipitación del agente de dirección y de los marcadores. De este modo, se pueden añadir el agente de dirección y los marcadores por separado a (o se pueden poner en contacto por separado con) la disolución de ensayo. Se pueden añadir el agente de dirección y los marcadores a (o se pueden poner en contacto con) la disolución de ensayo considerablemente al mismo tiempo, o siguiendo cualquier orden.

La disolución se ensayo se puede pre-incubar con el agente de dirección y los marcadores antes de que la disolución de ensayo entre en contacto con el extremo de contacto de la banda cromatográfica para garantizar la formación del complejo. El tiempo óptimo de pre-incubación depende de la proporción de reactivos y del caudal de la banda cromatográfica, En algunos casos, la pre-incubación durante mucho tiempo puede disminuir la señal de detección obtenida, e incluso conducir a señales de detección de falsos positivos. De este modo, puede resultar necesario optimizar el tiempo de pre-incubación para las condiciones particulares usadas.

También puede resultar deseable pre-incubar el agente de dirección con la disolución de ensayo antes de unir los marcadores al agente de dirección de forma que se permita la unión del agente de dirección al analito en la disolución de ensayo en condiciones de enlace óptimas.

En aspectos alternativos de la invención, la unión de los marcadores con el agente de dirección puede tener lugar sobre la banda cromatográfica. Esto se puede conseguir inmovilizando los marcadores y/o el agente de dirección, de forma que se pueden liberar, sobre la banda cromatográfica en una zona de conjugado entre el extremo de contacto y la zona de captura. Posteriormente, los marcadores y/o el agente de dirección son liberados en el interior de la disolución de ensayo a medida que viaja por medio de la acción capilar hasta la zona de captura. Si se inmovilizan los marcadores, de forma que se puedan liberar, pero no el agente de dirección, éste debe ponerse en contacto con la disolución de ensayo de manera que el agente de dirección en la disolución de ensayo pueda unirse a los marcadores a medida que son inmovilizados de forma que se puedan liberar. De igual modo, si se inmoviliza el agente de dirección de forma que se pueda liberar pero no los marcadores, éstos se deben poner en contacto con la disolución de ensayo.

De este modo, de acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un método para someter a ensayo la presencia de un analito en una disolución de ensayo que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una banda cromatográfica que tiene:

i) un extremo de contacto para la puesta en contacto con la disolución de ensayo;
ii) un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la banda cromatográfica lejos del extremo de contacto, comprendiendo el resto de captura un miembro de un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción de emparejamiento distinta de base de ácido nucleico, al analito o a su derivado, como el otro miembro del par de enlace ligando/anti-ligando; y
iii) un agente de dirección inmovilizado de forma que se pueda liberar en una zona de conjugado de la banda cromatográfica entre el extremo de contacto y la zona de captura, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos capaces de unirse al analito o a su derivado;

b) poner en contacto una pluralidad de marcadores con la disolución de ensayo;
c) poner en contacto el extremo de contacto de la banda cromatográfica con la disolución de ensayo para permitir que la disolución de ensayo viaje a través de la zona de conjugado hasta la zona de captura, liberando de este modo el agente de dirección desde la zona de conjugado de manera que cada uno de los dos o más ligandos del agente de dirección liberado queden unidos por un marcador y de manera que el agente de dirección liberado unido a los marcadores pueda viajar con el analito o con su derivado en la disolución de ensayo hasta la zona de captura y sea capturado en la zona de captura como parte de un complejo formado entre el resto de captura, el analito o su derivado, el agente de dirección y los marcadores; y
d) detectar la presencia del marcador en la zona de captura.

De manera alternativa, los marcadores se pueden inmovilizar de manera que se puedan liberar en la zona de conjugado de la banda cromatográfica, y el agente de dirección se puede poner en contacto con la disolución de ensayo.

La inmovilización se puede llevar a cabo simplemente por medio de secado de los marcadores y/o del agente de dirección sobre la banda cromatográfica. Una ventaja de inmovilizar de manera que se puedan liberar parte o todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención sobre la banda cromatográfica es que no es necesario que posteriormente estos reactivos se añadan por separado a la disolución de ensayo, ni que sean transportados o envasados por separado con los otros componentes necesarios para llevar a cabo el método.

En otros aspectos de la invención, puede resultar deseable poner en contacto el extremo de contacto de la banda cromatográfica con una disolución que contiene el agente de dirección marcado después de que el extremo de contacto se hay puesto en contacto con la disolución de ensayo, o poner en contacto el agente de dirección y los marcadores con la disolución de ensayo después de que se haya permitido que analito o su derivado viaje por acción capilar hasta la zona de captura, de manera que el agente de dirección marcado viaje por medio de la acción capilar hasta la zona de captura por separado del analito o su derivado.

Una posible ventaja de dichos aspectos es que se puede reducir cualquier unión no específica de los marcadores a la banda cromatográfica debido a que una mayor cantidad de disolución de ensayo (o disolución que contiene el agente de dirección) viaje a través de la banda cromatográfica, lavando de este modo la banda cromatográfica.

En su sentido más amplio, el método para someter a ensayo la presencia de un analito en una disolución de ensayo comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una banda cromatográfica que tiene un extremo de contacto para poner en contacto la disolución de ensayo y un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la banda cromatográfica, comprendiendo el resto de captura un miembro de un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción de emparejamiento distinta de base de ácido nucleico, al analito o a uno de sus derivados, como el otro miembro del par de enlace ligando/anti-ligando;
b) poner en contacto el extremo de contacto de la banda cromatográfica con la disolución de ensayo para permitir que el analito, o su derivado, viaje hasta la zona de captura por medio de la acción capilar y sea capturado por el resto de captura;
c) poner en contacto un agente de dirección marcado con la zona de captura, siendo capaz el agente de dirección marcado de unirse con el analito, o su derivado, permitiendo de este modo que el agente de dirección marcado sea capturado en la zona de captura como parte de un complejo que comprende el resto de captura, el analito o su derivado y el agente de dirección marcado, en el que el agente de dirección marcado comprende una pluralidad de ligandos y cada uno de los dos o más ligandos se encuentra unido al marcador; y
d) detectar la presencia del marcador en la zona de captura.

En algunos aspectos y realizaciones de la invención, puede resultar deseable que los marcadores y/o el agente de dirección se encuentren en forma seca, por ejemplo en forma de polvo o de comprimido que se pone en contacto con la disolución de ensayo. Esto presenta la ventaja de que se puede reducir el tamaño y el peso de los estuches

para llevar a cabo los métodos de la invención, ya que no es necesario que incluyan disoluciones separadas de los marcadores y/o del agente de dirección. Esto se añade a la facilidad de uso de los estuches de la invención y puede resultar importante si los estuches tienen que ser transportados, en particular hasta zonas lejanas. Otra ventaja es que el agente de dirección y/o el marcador pueden ser más estables en forma seca. Estos resultan particularmente importantes cuando se llevan a cabo los métodos de la invención en zonas en las que resulta difícil congelar o enfriar las disoluciones de los reactivos que por otro lado son inestables a temperatura ambiente.

Preferentemente, el agente de dirección presenta al menos 4 ligandos, más preferentemente al menos 6 ligandos. Preferentemente, el agente de dirección presenta no más que 50 ligandos. El número óptimo de ligandos puede depender de la identidad del agente de dirección. Por ejemplo, para un agente de dirección que comprende IgG, el número de ligandos preferentemente no es mayor que 20 por molécula de IgG. No obstante, para un agente de dirección que comprende IgM, se pueden usar más ligandos.

Los inventores han comprobado que el número óptimo de ligandos del agente de dirección depende del caudal de la banda cromatográfica. En general, cuanto mayor es el caudal, más elevado es el número de ligandos por cada agente de dirección.

El caudal de la membrana depende del tamaño de poro, estructura de poro y el tratamiento de tensioactivo de la membrana. En membranas de nitrocelulosa no tratadas, los caudales se ven influenciados por el tamaño de poro; cuanto mayor sea el tamaño de poro, más rápido resulta el caudal. No obstante, los pos-tratamientos y las disoluciones de bloqueo también pueden presentar un impacto significativo sobre el caudal. Disoluciones diferentes también pueden fluir a lo largo de la membrana con diferentes caudales, bien por medio de su viscosidad o de su contenido en partículas.

En el presente documento, una membrana de caudal rápido se define como una membrana en la que el agua viaja por medio de la acción capilar a una tasa de aproximadamente 70-80 segundos por cada 40 mm. Ejemplos de membranas de caudal rápido son: membrana Whatman Purabind A-RP (tamaño de poro 8 µm) – caudal de agua = 80 segundos por cada 40 mm; y membrana Whatman Purabind A-XP (tamaño de poro 12 µm) – caudal de agua = 70 segundos por cada 40 mm. Un ejemplo de membrana de caudal más lento es la membrana Schleicher & Schuell AE99 (tamaño de poro 8 µm) – caudal de agua = 130 segundos por cada 40 mm.

Para membranas de caudal rápido, se obtiene resultados óptimos con aproximadamente 9-20 ligandos por agente de dirección, preferentemente aproximadamente 14-18. Para membranas de caudal más lento se obtiene resultados óptimos con aproximadamente 6-12 ligandos por agente de dirección, más preferentemente 8-12 ligandos, incluso más preferentemente de 8-10 ligandos, y del modo más preferido 8 ó 9 ligandos.

Los inventores han encontrado que el número óptimo de ligandos del agente de dirección depende de la viscosidad de la muestra biológica. En general, cuanto más viscoso sea el tipo de muestra, menor es el número de ligandos por agente de dirección. Por ejemplo, cuando se usa el método de la invención para detectar CT, muestras típicas son orina, muestras endocervicales o exudados de uretra. Estos muestras presentan viscosidades diferentes, de manera que el número óptimo de ligandos por agente de dirección usado depende de la viscosidad de la disolución de muestra.

El agente de dirección puede comprender un resto sencillo, o más que un resto. Por ejemplo, el agente de dirección puede comprender; un resto principal capaz de unirse al analito o a su derivado; y un resto secundario capaz de unirse al resto principal, estando el resto secundario provisto de una pluralidad de ligandos.

Ligandos preferidos incluyen biotina (que puede quedar unida por un anticuerpo anti-biotina, avidina, estreptavidina o uno de sus derivados), fluoresceína (que puede quedar unida por un anticuerpo anti-fluoresceína) y DNP (que puede quedar unido por un anticuerpo anti-DNP).

El resto o cada uno de los restos del agente de dirección es preferentemente un anticuerpo. El término “anticuerpo” según se usa en el presente documento significa cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo (producido de forma natural o recombinante) que retiene la actividad de enlace el antígeno. Esto incluye en anticuerpo monoclonal o policlonal, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal o policlonal y un anticuerpo quimérico.

En una realización preferida, el agente de dirección comprende un anticuerpo principal capaz de unirse al analito o a su derivado, y un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo principal, estando el segundo anticuerpo unido convalentemente a una pluralidad de ligandos. Se prefiere esta realización porque el anticuerpo secundario se puede preparar por separado y usar con diferentes anticuerpos principales para la detección de diferentes analitos.

Preferentemente, una pluralidad de marcadores se une al menos a uno de los ligandos del agente de dirección, aumentando de este modo la sensibilidad de la detección del analito.

Se pueden usar cualesquiera marcadores que cuando forman parte de un complejo formado entre el resto de

captura, en analito o su derivado, el agente de dirección y los marcadores, permiten la detección del complejo sobre la banda cromatográfica. Los marcadores preferidos son marcadores detectables visualmente. Ejemplos de marcadores apropiados detectables visualmente incluyen colorantes textiles y partículas coloreadas tales como partículas de látex coloreadas y sol de metal tal como oro coloidal o selenio. Se prefiere el oro coloidal con un intervalo de tamaños de aproximadamente 20-60 nm, más preferentemente de 20-40 nm. Se pueden obtener similares sensibilidades de ensayo usando oro coloidal con una distribución de tamaño estrecha, desde 23-31 nm (30 nm British Biocell International Limited), o una distribución de tamaños amplia, desde 20-47 nm (media de 29-38 nm).

Ejemplos de otros marcadores apropiados incluyen marcadores radiactivos, marcadores luminiscentes en particular marcadores fluorescentes y marcadores que comprenden una enzima capaz de reaccionar con un substrato cromogénico o con un substrato que se convierte en un producto luminiscente por la acción de la enzima. Dichos marcadores luminiscentes con particularmente preferidos ya que la intensidad de la señal luminiscente generada es elevada con respecto a otro marcadores, mejorando de este modo la sensibilidad de la detección del analito.

Se puede proporcionar cada marcador por medio de un agente de marcaje. Cada agente de marcaje puede comprender un resto sencillo o más que un resto. Por ejemplo, el agente de marcaje puede comprender: un resto principal capaz de unirse a un ligando del agente de dirección; y un resto secundario marcado capaz de unirse al resto principal.

Preferentemente, el resto o cada resto del agente de marcaje es un anticuerpo.

En una realización preferida, el agente de marcaje comprende un anticuerpo principal capaz de unirse a un ligado del agente de dirección y un anticuerpo secundario capaz de unirse al anticuerpo principal, estando el anticuerpo secundario acoplado a un marcador. Se prefiere esta realización porque el anticuerpo secundario se puede preparar por separado y se puede usar con diferentes anticuerpos principales para unirse a diferentes ligandos.

Para las realizaciones en las que los ligandos del agente de dirección comprenden biotina, agentes de marcaje apropiados incluyen los siguientes:

i) un anticuerpo anti-biotina marcado;
ii) un resto marcado que comprende avidina, estreptavidina o uno de sus derivados que retiene actividad de enlace de biotina;
iii) un anticuerpo anti-biotina, avidina, estreptavidina o uno de sus derivados que retiene actividad de enlace de biotina (el resto principal) y un anticuerpo marcado (el resto secundario) capaza de unirse al resto principal.

Preferentemente, cada agente de marcaje puede comprender una pluralidad de marcadores para mejorar más la sensibilidad de la detección. Esto se puede conseguir mediante el acoplamiento covalente de una pluralidad de marcadores a cada agente de marcaje. De manera alternativa, si el agente de marca comprende más que un resto, se puede marcar cada resto, como se muestra en la Figura 5C.

El resto de captura puede comprender un resto sencillo o una pluralidad de restos juntos no unidos de forma covalente. El resto de captura puede comprender un anticuerpo capaz de unirse al analito o a su derivado.

En otras realizaciones, el analito puede ser un anticuerpo y el resto de captura puede ser un antígeno. Dichas realizaciones pueden resultar particularmente ventajosas para someter a ensayo si un individuo se encuentra infectado o no por una enfermedad que provoca mircroorganismos, si resulta probable que la cantidad de antígeno de esa enfermedad que provoca micro-organismos en la disolución de ensayo sea muy baja. Por el contrario, los anticuerpos producidos por el individuo frente al antígeno como respuesta a la infección por micro-organismos pueden estar presentes en cantidades mucho mayores, haciendo de este modo que la detección de los anticuerpos constituya un modo más sensible de diagnosticar la infección. Ejemplos son los anticuerpos producidos en respuesta a la infección por VIH.

Se puede formar un derivado de analito mediante modificación química del analito por ejemplo mediante acoplamiento covalente del analito con un ligando que se puede unir por medio del resto de captura. En una realización, el analito se podría acoplar covalentemente a biotina para formar un derivado del analito que pueda ser capturado por un resto de captura que comprende un anticuerpo anti-biotina, avidina, estreptavidina o uno de los derivados de enlace de biotina. De manera alternativa, el analito se puede formar por medio de unión no covalente de un resto de derivación, tal como un anticuerpo, al analito que se puede unir por medio del resto de captura.

Una ventaja de formar un derivado del analito es que el analito y el agente de dirección marcado se pueden espaciar más a partir de la banda cromatográfica, reduciendo o evitando de este modo cualquier impedimento estérico que de otro modo podría darse entre el banda cromatográfica y un complejo que contiene el analito capturado en la zona de captura. La captura del derivado de analito también permite el uso de bandas cromatográficas idénticas para captura diferentes analitos si el derivado de analito comprende un ligando de captura y puede quedar unido por el resto de

captura de dichas bandas.
En realizaciones preferidas, el derivado de analito comprende una pluralidad de ligandos de captura, cada uno de los cuales puede quedar unido por un resto de captura. La presencia de una pluralidad de ligandos aumenta la probabilidad de que el derivado de analito sea capturado por el resto de captura.

Ejemplos de realizaciones preferidas en las que el analito queda unido por un resto de derivación se muestran en la Figura 6. Nótese que en esta figura, no se muestra la unión del analito por parte del resto de dirección marcado.

Se pueden usar los métodos de la invención para someter a ensayo cualquier analito apropiado. Ejemplos incluyen antígenos de agentes infecciosos o anticuerpos surgidos a partir de dichos antígenos, hormonas (por ejemplo como ensayo de embarazo), metabolitos (por ejemplo como ensayo para trastornos metabólicos), fármacos (terapéuticos o drogas), vitaminas, esteroides o anticuerpos producidos como parte de una reacción alérgica.

Ejemplos preferidos de antígenos de agentes infecciosos o anticuerpos tales como antígenos son: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), epítopo ´a´ de HBsAg, antígeno ´e´ de hepatitis B (HBeAg), anticuerpos frente HBeAg, anticuerpos frente a antígeno nuclear de hepatitis B (por ejemplo anti antígeno –IgG nuclear de hepatitis B y antígeno-IgM), antígenos del virus de hepatitis C (HCV), anticuerpos frente a antígenos HCV, antígeno de VIH (de VIH 1 o VIH 2), anticuerpos frente antígenos de VIH, antígenos de *Chlamydia trachomatis*, o antígenos de *Neisseria gonorrhea.*

De acuerdo con la invención también se proporcionan estuches para llevar los métodos de la invención.

Un estuche para llevar a cabo un método del primer aspecto de la invención comprende:

a) una banda cromatográfica que presenta un extremo de contacto para poner en contacto la disolución de ensayo y un resto de captura inmovilizado en la zona de captura de la banda cromatográfica lejos del extremo de contacto, comprendiendo el resto de captura un miembro o un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción de emparejamiento distinta de base de ácido nucleido, al analito o a uno de sus derivados, como el otro miembro del par de enlace ligando/anti-ligando;
b) por separado de la banda cromatográfica, un agente de dirección capaz de unirse al analito o a su derivado, no estando unido al analito o a su derivado, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos, y una pluralidad de agentes de marcaje cada uno unido a un ligando del resto de dirección, estando provisto cada agente de marcaje de un marcador.

El estuche para llevar a cabo un método del segundo aspecto de la invención comprende:

a) una banda cromatográfica que presenta: un extremo de contacto para poner en contacto la disolución de ensayo; un resto de captura inmovilizado en la zona de captura de la banda cromatográfica lejos del extremo de contacto, comprendiendo el resto de captura un miembro de un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción distinta de base de ácido nucleico, al analito o a su derivado, como el otro miembro del para de enlace ligando/anti-ligando; y un agente de dirección inmovilizado de forma que se puede liberar en una zona de conjugado de la banda cromatográfica entre el extremo de contacto y la zona de captura, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos y siendo capaz de unirse al analito o a uno de sus derivados; y por separado
b) una pluralidad de agentes de marcaje capaces de unirse a un ligando del resto de dirección, estando provisto cada agente de marcaje de un marcador.

Los agentes de marcaje se pueden inmovilizar de forma que se pueden liberar en la zona de conjugado de la banda cromatográfica así como también el agente de dirección. De manera alternativa, los agentes de marcaje se pueden inmovilizar en la banda cromatográfica en lugar del agente de dirección.

Cuando el estuche es para llevar a cabo un método del segundo aspecto de la invención, debe apreciarse que el hecho de inmovilizar de forma que se puedan liberar el agente de dirección y los agentes de marcaje a la zona de conjugado de la banda cromatográfica presenta la ventaja particular de que todos los reactivos necesarios para someter a ensayo la presencia del analito en la disolución de ensayo se encuentran presentes sobre la banda cromatográfica (con la condición de que los agentes de marcaje sean escogidos de forma que no requieran la reacción con otros reactivos para visualizar el complejo capturado en la zona de captura, a menos que estos otros reactivos sean también inmovilizados de forma que se puedan liberar sobre la banda cromatográfica).

En dichas realizaciones, resulta necesario garantizar que existe suficiente distancia entre la zona de conjugado y la zona de captura para que los agentes de marcaje sean capaces de unirse al agente de dirección a medida que viajan hacia la zona de captura una vez que han sido liberados. De manera alternativa, se debe sumergir la zona de conjugado en la disolución de ensayo para permitir la liberación del agente de dirección y de los agentes de marcaje en el interior de la disolución de ensayo de manera que puedan unirse unos a otros en la disolución de ensayo antes de viajar por medio de la acción capilar hasta la zona de captura.

Cuando el agente de liberación y los agentes de marcaje se inmovilizan de forma que se puedan liberar en la zona de conjugado de la banda cromatográfica, se pueden inmovilizar en la misma parte de la zona de conjugado o en partes diferentes dentro de la zona de conjugado. Cuando el agente de dirección y los agentes de marcaje se inmovilizan en la misma parte de la zona de conjugado, se pueden inter-dispersar unos con otros en la zona de conjugado, o pueden estar en capas diferentes.

En una configuración, puede resultar preferido que los agentes de marcaje sean inmovilizados directamente sobre la banda cromatográfica en al zona de conjugado, formando de este modo una primera capa, y que el agente de marcaje sea inmovilizado sobre la primera capa, formando de este modo una segunda capa sobre la parte superior de la primera capa. Una posible ventaja de esta configuración es que se espera que el agente de dirección sea liberado en el interior de la disolución de ensayo antes que los agentes de marcaje. Esto puede resultar de importancia para garantizar una formación de complejo eficaz en la zona de captura si se tiene la sospecha de que los agentes de marcaje pueden interferir con la unión del agente de dirección al analito o a su derivado.

Cuando el agente de dirección y/o el agente de marcaje no se inmovilizan sobre la banda cromatográfica, preferentemente pueden estar en forma seca, por ejemplo en forma de polvo o de comprimido.

La sensibilidad de detección del analito puede depender de la proporción del agente de dirección con respecto al agente de marcaje. Por consiguiente, se debe escoger la proporción para obtener resultados óptimos.

Cuando los estuches de la invención comprenden un agente de dirección que consiste en más que un resto, en algunos casos puede resultar deseable, para uno o más de los restos, la inmovilización de forma que se pueda liberar sobre la banda cromatográfica y que uno o más de los restos que sobran se separe de la banda cromatográfica. De manera similar, cuando cada agente de marcaje comprende uno o más restos, en algunos casos puede resultar deseable, para uno o más de los restos, la inmovilización de forma que se pueda liberar sobre la banda cromatográfica y que uno o más de los restos que sobran se separen de la banda cromatográfica.

Preferentemente, los estuches de la invención en los que se requiere otro reactivo(s) para la detección de un complejo capturado que contiene el agente de marcaje (por ejemplo, los estuches en los que los agentes de marcaje comprenden una enzima capaz de convertir un substrato cromogénico o un substrato que es convertido en un producto luminiscente por parte de la enzima) comprenden el reactivo(s) requerido para la detección.

Para los aspectos y realizaciones de la invención en los que el agente de dirección y/o los marcadores se inmovilizan de forma que se pueden liberar en la zona de conjugado de la banda cromatográfica, es probable que se produzcan variaciones en la concentración de los marcadores y/o del agente de dirección en la disolución de ensayo que llega a la zona de captura por medio de la acción capilar. Esto es debido a que la concentración del agente de dirección y/o de los marcadores en la disolución de ensayo aumenta y disminuye a medida que el agente de dirección inmovilizado de forma que se pueda liberar y/o el agente de marcaje es liberado en el interior de la disolución de ensayo hasta que no haya ningún reactivo(s) sobrante en la zona de conjugado.

A medida que la concentración de agente de dirección y/o de los marcadores aumenta en la zona de captura, puede haber una cantidad de exceso de agente de dirección y/o de marcadores para la formación óptima del complejo en la zona de captura. Por el contrario, cuando la concentración del agente de dirección y/o de los marcadores es más baja, puede haber cantidades insuficientes del agente de dirección y/o de los marcadores en la zona de captura. Por consiguiente, la cantidad total de complejo capturado en la zona de captura puede ser menor que la cantidad total capturada cuando el extremo de contacto de la banda cromatográfica se pone en contacto con la disolución de ensayo que contiene una concentración óptima del agente de dirección y/o de los marcadores. Por tanto se puede reducir la sensibilidad de detección.

De este modo, puede resultar preferido que el agente de dirección y/o los marcadores no se inmovilicen de forma que se puedan liberar en la zona de conjugado de la banda cromatográfica.

También se proporciona de acuerdo con la invención el uso de un estuche de la invención para someter a ensayo la presencia de un analito en una disolución de ensayo.

También se proporciona un agente de dirección marcado para someter a ensayo la presencia de un analito en una disolución de ensayo, siendo capaz el agente de dirección marcado de unirse al analito o a uno de sus derivados pero no estando unido al analito o a uno de sus derivados, en el que el agente de dirección marcado se proporciona con una pluralidad de ligandos detectables visualmente, siendo cada ligando capaz de ser fijado por un marcado para permitir la detección del agente de dirección marcado por medio de la utilización de marcadores. Además se proporciona el uso de un agente de dirección marcado para someter a ensayo la presencia de un analito en una disolución de ensayo.

Las realizaciones de la invención se ilustran con referencia a la Figura 1. En la siguiente discusión, el anticuerpo principal corresponde al agente de dirección, los haptenos corresponden a los ligandos del agente de dirección, el anticuerpo secundario marcado corresponde al agente de marcaje y el anticuerpo de captura corresponde al resto

de captura.

La principal desventaja de cualquier análisis rápido basado en membrana es su reducida sensibilidad en comparación con la del enzimoinmunoanálisis (EIA). Esta menor sensibilidad se debe al hecho de que, en el análisis rápido, la reacción antígeno-anticuerpo debe completarse en 15 a 20 minutos sin el beneficio de etapas de lavado alternativas y de incubación. Además, el complejo de antígeno-anticuerpo se detecta por medio de lectura visual, sin la ayuda de amplificación de señal por parte de reacciones enzimáticas. En un sistema de análisis mejorado, se debe compensar la combinación de reducción en cuanto a sensibilidad inherente al formato de análisis rápido con la debida al volumen limitado de la muestra.

Se pretende amplificar la señal de detección por medio del acoplamiento químico de copias múltiples (N) de hapteno, tales como biotina o fluoresceína, con anticuerpos principales, que van dirigidas al analito objeto de ensayo. Esto, junto con el marcaje de los anticuerpos secundarios (anti-hapteno) con un marcado tal como partículas coloreadas (por ejemplo, oro coloidal) aumenta la señal de detección.

La Figura 1 muestra una comparación de sensibilidad de análisis entre un análisis directo sin amplificación (técnica anterior) y un sistema de detección indirecta con amplificación de acuerdo con la invención.

En la Figura 1, el analito objeto de ensayo es CT-lipopolisacárido (CT-LPS). En el análisis de la técnica anterior sin amplificación (detección directa, sin mejora de señal de acuerdo con la invención), se dirige un anticuerpo marcado sobre un antígeno específico en el analito. En la Figura 1A se observa esto en forma de anticuerpo anti-LPS unido a oro coloidal. El anticuerpo puede reaccionar con el antígeno específico (por ejemplo, LPS) en un analito (por ejemplo, CT-LPS) en una muestra líquida y unirse al mismo. Con el fin de detectar el analito cuando se une al anticuerpo marcado, se usa un anticuerpo de captura inmovilizado. Esto se muestra en la Figura 1A también en forma de anticuerpo anti-LPS que reconoce un antígeno especifico diferente en el mismo analito.

El analito CT-LPS (que se muestra como referencia 1 en la Figura 1A) es multimérico. Se extrae a partir de bacteria CT, por ejemplo por medio de tratamiento con detergente o tratamiento térmico. El anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado se unen a una parte diferente del multímero CT-LPS.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo principal específico para el analito no se encuentra marcado directamente (detección indirecta). El anticuerpo principal está provisto de copias múltiples (preferentemente 3-9) de un hapteno, en particular biotina. Los haptenos múltiples sobre el anticuerpo principal pueden ser dirigidos por medio de anticuerpos anti-hapteno secundarios marcados. En el Ejemplo de la Figura 1B estos son anticuerpos anti-biotina con marcadores de oro coloidal. Los anticuerpos secundarios múltiples se pueden unir a un anticuerpo principal sencillo, dando lugar al aumento del número de marcadores por analito. El conjugado del analito y del anticuerpo principal (marcado con anticuerpos secundarios) puede ser capturado posteriormente y detectado de forma convencional usando un anticuerpo de captura.

Se espera que la detección del analito de acuerdo con estas realizaciones de la invención se lleve a cabo de manera normal primero haciendo reaccionar el anticuerpo principal con la muestra objeto de ensayo (que puede contener o no el analito). Una vez que el anticuerpo ha reaccionado con cualquier analito presente, se puede marcar posteriormente con el anticuerpo secundario. A continuación, el conjugado de cualquier analito con los marcadores de anticuerpo principal y anticuerpo secundario puede ser capturado por el anticuerpo de captura.

No obstante, no resulta absolutamente esencial para el principio subyacente de la invención que las reacciones de anticuerpo-antígeno y de anticuerpo-hapteno se lleven a cabo exactamente en este orden. Los expertos en la técnica apreciarán que bajo determinadas circunstancias es posible o incluso preferible hacer reaccionar un anticuerpo marcado secundario con el analito marcado principal-anticuerpo de dirección en una primera etapa, seguido de la reacción del conjugado con cualquier analito de la muestra de ensayo y la posterior captura del analito marcado.

Tampoco se excluye que existe la posibilidad de capturar cualquier analito en primer lugar sobre el anticuerpo de captura y posteriormente llevar a cabo las reacciones de unión con el anticuerpo principal y el secundario (en cualquier orden que resulte apropiado), con la condición de que los anticuerpos principal y segundario se unan uno a otro antes de alcanzar la zona de captura.

Se apreciará que en determinados casos puede suponer una ventaja disponer de una primera etapa de reacción en la que el anticuerpo anti-analito (o agente de dirección) presente condiciones óptimas (tiempo, temperatura, reactivos, etc) en las cuales reaccione con cualquier analito presente en la muestra. Este puede ser el caso particular en el que el analito se encuentre en baja concentración en la muestra o que, en cierto modo, resulte de difícil acceso por parte del anticuerpo principal.

En tales circunstancias, se pueden encontrar las mejores condiciones posibles para el anticuerpo principal aportando la posibilidad de detectar el analito en la muestra. De este modo, se apreciará que pueden existir condiciones que favorezcan la unión de un anticuerpo principal no marcado con un analito en base a la unión del anticuerpo principal no marcado con el analito (como sería el caso del método de marcaje directo de la técnica anterior).

Además, debido a que la avidez del anticuerpo secundario (o agente de marcaje) para transportar el marcado para el hapteno sobre el anticuerpo principal (de acuerdo con la invención) puede ser muy elevada, otra ventaja potencial de la invención es que es viable el uso de concentraciones relativamente bajas de anticuerpo marcado mientras que se obtienen niveles relativamente elevados de unión de marcador (amplificados) (por medio de la unión del conjugado anticuerpo principal/anticuerpo secundario al analito).

Los inventores también han reconocido que en la técnica anterior, en el método de marcaje directo, el marcador (por ejemplo la partícula coloreada: oro coloidal) se puede unir al analito diana (es decir el LPS) de forma estrecha por medio del anticuerpo. La Figura 1A muestra esto de forma esquemática. Por ejemplo, una posibilidad es una separación entre analito y partícula de oro de aproximadamente 12 nm. Por el contrario, cuando se usa un anticuerpo principal del tipo que se muestra en la Figura 1, con haptenos múltiples y usando un anticuerpos secundarios marcados con anti-hapteno, es posible incrementar la separación entre el analito y el marcador. Por ejemplo, es posible una separación de aproximadamente 24,2 nm.

De este modo, en esta invención, la realización mostrada en la Figura 1B resulta más probable que la amplificación de señal (es decir, mejora de la señal) sea debida no solo a más partículas coloreadas capturas por el anticuerpo de captura, sino también a un menor impedimento estérico encontrado cuando el anticuerpo marcado con oro se une con el epítopo del antígeno específico. En otras palabras, el aumento del espacio entre las partículas coloreadas y los puntos antigénicos reduce el impedimento estérico y permite la acumulación de más partículas coloreadas en la zona de captura.

Otra posible razón para una mejor sensibilidad de detección conseguida por medio de los métodos y estuches de la invención se puede deber a una mayor probabilidad de unión del marcador con el agente de dirección debido a la presencia de la pluralidad de ligandos del agente de dirección.

En otras realizaciones de la invención, el analito puede ser un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo generado por el individuo frente a un antígeno de un micro-organismo infeccioso tal como VIH. En dichas realizaciones, el anticuerpo principal (de nuevo proporcionado con copias múltiples de un hapteno, tal como biotina o fluoresceína) es dirigido al anticuerpo de analito. Como se describe en otras realizaciones, se pueden dirigir los haptenos múltiples sobre el anticuerpo principal por medio de anticuerpos secundarios anti-hapteno marcados, permitiendo de este modo el aumento del número de marcadores por analito. No obstante, con el fin de capturar un conjugado del analito y del anticuerpo principal (marcado con anticuerpos secundarios), se usa un antígeno de captura inmovilizado que puede ser dirigido por el anticuerpo de analito.

Cuando al analito es un anticuerpo humano, el anticuerpo principal puede ser un anticuerpo anti-Fc humano o un anticuerpo anti-humano, por ejemplo IgG, IgM o uno de sus fragmentos.

La Figura 5 muestra realizaciones preferidas de la invención.

Debe notarse que las realizaciones de la invención ilustradas en las figuras 1 a 5 son esquemáticas. En realidad, los marcadores pueden ser mucho más grades en relación con los otros componentes que se muestran y cada marcada puede presentar varios restos asociados al mismo.

A continuación se describen otras realizaciones de la invención únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 muestra esquemáticamente una comparación de la detección de analito convencional con la detección de analito de acuerdo con una realización de la invención;
La Figura 2 muestra esquemáticamente una banda cromatográfica usada para llevar a cabo las realizaciones de métodos de la invención;
La Figura 3 muestra los resultados obtenidos por medio del ensayo de *Chlamydia trachomatis* usando un método convencional (detección directa) y el método de la invención (detección indirecta);
La Figura 4 muestra los resultados obtenidos mediante el ensayo de HBsAg usando un método convencional (detección directa) y el método de detección de la invención (detección indirecta);
La Figura 5 muestra ejemplos de realizaciones de la invención;
La Figura 6 muestra ejemplos de restos de derivación con el analito por medio de resto de captura (nótese que no se muestra la unión del analito por medio del agente de dirección marcado);
La Figura 7 muestra una comparación de la sensibilidad de la detección de analito que usa un método de detección indirecta con la detección directa, y el efecto que presenta sobre la detección indirecta la variación del número de ligandos por anticuerpo anti-analito;
La Figura 8 muestra el efecto que tiene sobre la sensibilidad de detección de analito la variación del número de ligandos por anticuerpo anti-analito cuando se usa una membrana de varilla de caudal lento;
La Figura 9 muestra una comparación de al sensibilidad de detección del analito para análisis de detección de una etapa y de dos etapas;
La Figura 10 muestra los resultados de la detección de analito usando un FITC acoplado a un anticuerpo anti-

analito; y
La Figura 11 muestra una comparación de la detección de HBsAg usando el método de la invención con un sistema de detección disponible comercialmente.

En los ejemplos siguientes, la detección directa se refiere a la detección de analito que usa un método de detección de analito de la técnica anterior similar al descrito con referencia a la Figura 1A. Detección indirecta se refiere a la detección de analito que usa el método de la invención. Detalles de cada método usado se aportan en cada ejemplo.

Ejemplo 1. Mejora de señal usando anticuerpo anti-lipopolisacárido (LPS) acoplado con biotina en un inmunoanálisis de varilla para evaluación de *Chlamydia trachomatis*(CT).

Objetivo

Investigar la sensibilidad de detección de CT usando un anticuerpo monoclonal anti-LPS acoplado con biotina (como agente de dirección) y un anticuerpo monoclonal anti-biotina marcado con oro coloidal (como agente de marcaje). La detección se lleva a cabo usando un método del segundo aspecto de la invención en el que el agente de dirección y el agente de marcaje se inmovilizan de forma que se puedan liberar sobre al banda cromatográfica.

Configuración del experimento

Diseño de varilla

La Figura 2 muestra un dibujo esquemático de la banda cromatográfica usada para llevar a cabo el método de la invención.

La Figura 2 muestra:

A. Elemento conjugado: B. Zona de lectura (membrana); C. Elemento absorbente; D. Anticuerpo principal = anticuerpo anti-CT-LPS acoplado con biotina (agente de dirección); E. Anticuerpo secundario = conjugado anti-biotina-oro (agente de marcaje); F. Zona de captura de anticuerpo específico; G. Zona de captura para el anticuerpo de control. La membrana se puede superponer entre A y B así como también entre B y C. El flujo de muestra se observa por medio de la flecha en negrita.

Zona de captura, F: se inmoviliza un anticuerpo monoclonal (resto de captura) frente al epítopo CT-LPS de género específico sobre al membrana.

Reactivos de detección (agente de dirección y agente de marcaje) para detección indirecta de CT de acuerdo con el método de la invención: se depositan el anticuerpo monoclonal anti-CT-LPS acoplado a biotina (agente de dirección) y el anticuerpo monoclonal anti-biotina acoplado a oro coloidal (agente de marcaje) sobre las zonas D y E del elemento de conjugado.

Reactivos de detección para la detección directa de CT usando un método convencional: un anticuerpo monoclonal anti-CT-LPS marcado con oro coloidal.

Preparación de muestra: analito objeto de ensayo

Orina de hombre: centrifugar 2 ml de orina, desechar el sobrenadante y resuspender la pella con el tampón de muestra y calentar durante 15 min. a 100 ^{o}C.

Tampón de muestra:

El tampón de muestra estándar comprende sal, detergente y un agente de bloqueo (tal como BSA o lecho en polvo).

Procesado de muestra: se añade el extracto de muestra (100 µl) al elemento de conjugado (A), o se sumerge el elemento de conjugado en el extracto de muestra. Se disuelven los reactivos de detección (D&E) y se comienza a mover con el flujo de muestra debido a la acción capilar a lo largo de la banda. Las moléculas de CT-LPS (analito) presentes en la muestra se unen por medio del anticuerpo principal (anticuerpo anti-CT-LPS acoplado a biotina). El anticuerpo secundario (anti-biotina-oro) se conjuga con la biotina sobre el anticuerpo principal. A medida que la muestra pasa al interior de la zona de lectura (B) y pasa sobre la zona (zona de captura) en la que el anticuerpo de captura (F) ha sido inmovilizado, el complejo queda atrapado. El color se desarrolla en la zona F en proporción a la cantidad de CT-LPS presente en la muestra.
Control de procedimiento: como control para la detección directa, se inmovilizó un anticuerpo anti-ratón-IgG en la zona G. Para la detección indirecta, se inmovilizó un anticuerpo anti-biotina en al zona G como control.

Resultado

La Figura 3 y la Tabla 1 muestran una comparación de la detección directa e indirecta como se ha descrito anteriormente. El efecto de la proporción molecular de biotina por anticuerpo sobre la sensibilidad de análisis también se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 7.

Tabla 1. Comparación de la detección directa e indirecta, y efecto de la proporción molecular de biotina por anticuerpo sobre la sensibilidad de análisis (usando la membrana AE99, una membrana de caudal más lento)

CT-LPS (µl)*	Detección directa	Detección indirecta (número de biotinas por anti-LPS Ab)							
		2	4	6	8	9	10	11	12
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,001	0	0	0	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5
0,003	0	0	0	1	2	2	1,5	1,5	1,5
0,01	0,5	0,5	0,5	2	2,5	2,5	2	2	2
0,03	1	1	2,5	3	4	4	3,5	3,5	3,5
0,1	2	2,5	3	4	4,5	4,5	4	4	4
* 1 µl contiene 4,218 ng de LPS									

La señal de detección es sobre una escala de 1 a 5, siendo 5 la más intensa.

Los resultados de la Tabla 1 muestra:

(1) Que el análisis de detección amplificada de la invención puede detectar CT-LPS a una concentración más baja que la que se puede detectar usando un análisis de detección directa;
(2) La señal detectada se amplificó (es decir, se mejoró) usando el método de análisis de la invención.

Ejemplo 2. Análisis para la detección de HBsAg

Se usan ensayos rápidos en algunos países en desarrollo para controlar la cantidad de HBsAg en sangre, en particular en bancos de sangre que controlan demasiadas pocas muestras para justificar el enzimoinmunoanálisis en placa de microvaloración (EIA) o el coste considerable del equipamiento necesario. Los ensayos rápidos usados de manera más común para la detección de HBsAg en países en desarrollo son los ensayos de aglutinación, varilla e impronta. Los análisis de aglutinación no son sensibles, son relativamente no específicos, subjetivos y laboriosos. Los ensayos de impronta requieren múltiples reactivos y no resultan apropiados para la evaluación del rendimiento de tamaño del medio y la pre-donación. Además, esto análisis son considerablemente más caros que los EIAs estándar. Los ensayos de varilla también se encuentran disponibles comercialmente, y algunos de ellos presentan niveles de rendimiento elevados. En comparación con EIA, el límite de sensibilidad de estos ensayos rápidos es un orden de magnitud menor y los resultados se encuentra en un porcentaje menor de unidades detectadas de sangre infectada con HBV. El propio EIA es 3 % menos sensible que la multiplicación genómica (Tabla 2).

Tabla 2. Detección de unidades de sangre infectadas con HBV mediante diferentes análisis de evaluación

Análisis	Límite de detección	% de unidades detectadas de sangre infectada con HBV *
Aglutinación	30 ng/ml	54
Varilla	5 ng/ml	77
EIA	0,5 ng/ml	97
Genómica	40 IU/ml ADN	100
* 100 % corresponde a la detección de HBsAg mediante EIA más detección de ADN de HBV mediante PCR en unidades negativas de sangre EIA		

De los ensayos rápidos de varilla disponibles en el mercado para HBsAg, parece que el ensayo de Abbott Determine es el más sensible (Tabla 3), con un límite de detección de aproximadamente 5 ng/ml, mientras que los otros ensayos varían de 12-25 ng/ml.

Tabla 3. Comparación de tres ensayos rápidos de HBsAg comerciales

Nombre de la compañía	HBSAg (ng/ml)			
	25	12	6	3
Abbott	3	2	1,5	0,5
Veda Lab	2	1	0	0
Alfa Scientific	1	0	0	0

Las señales está en una escala de 1 a 5, siendo 5 la señal más intensa.

Objetivo

Investigar la sensibilidad de detección de HBsAg usando un anticuerpo monoclonal anti-HBsAg acoplado con biotina (agente de dirección) y un anticuerpo monoclonal anti-biotina marcado con oro coloidal (agente de marcaje). La detección se llevó a cabo usando un método del segundo aspecto de la invención en el que el agente de dirección y el agente de marcaje se inmovilizan de forma que se puedan liberar sobre al banda cromatográfica.

Configuración del experimento

Diseño de varilla: véase la Figura 2

Para la línea de captura: se inmoviliza un anticuerpo policlonal dirigido contra un epítopo de HBsAg de género específico (el epítopo ´a´ común para todos los subtipos de HBsAg) sobre la membrana (resto de captura).

Para la detección:

Directa: se usó un anticuerpo monoclonal anti-HBsAg marcado con oro coloidal para la detección directa usando un método convencional.

Indirecta: se usaron un anticuerpo monoclonal anti-HBsAg (agente de dirección) así como también un anticuerpo monoclonal anti-biotina marcado con oro coloidal (agente de marcaje).

Muestra: 50 µl de suero más 10 µl de Tween 20 a 2 %.

Procesado de muestra: añadir la muestra (60 µl) a un recipiente y sumergir una varilla en la disolución.

Control de procedimiento: se inmoviliza un anticuerpo anti-ratón-IgG para el control del procedimiento.

Resultado

Véase la Figura 4 y la Tabla 4

Tabla 4. Comparación de detección directa (técnica anterior) e indirecta (mejora de señal de acuerdo con la invención) usando una membrana de Purabind A-XP (membrana de caudal rápido)

HBsAg ng/ml	Detección directa	Detección indirecta (número de biotinas / anti-HBsAg Ab)					
		2	4	8	9	10	11
0	0	0	0	0	0	0	0
0,195	0	0	0	0,5	0,5	0	0
0,39	0	0	0	1	1	0,5	0,5
0,78	0	0	0,5	1,5	1,5	1	1
1,56	0,5	0,5	1	2,5	2,5	2	2
3,12	1	1	1,5	3,5	3,5	3	3
6,25	1,5	2	2	4,5	4,5	4	4
12,5	2	3	3	5	5	4,5	4,5

La señal de detección está en escala de 1 a 5, siendo 5 la más intensa.

La detección usando el método de detección indirecta de la invención permitió la detección del analito a concentraciones más bajas que el método convencional de detección directa.

Para aquellas concentraciones de analito en las que ambos métodos (directo e indirecto) fueron capaces de detectar el analito (≥ 1,56 ng/ml), se obtuvo una señal más intensa usando la detección indirecta en comparación con la detección directa.

Para el método de detección indirecta, el número óptimo de moléculas de biotina por molécula de anticuerpo fue de 8 ó 9.

Aunque se usa un anticuerpo extra en la detección indirecta en comparación con la detección directa, el método de detección indirecta es todavía un método de una etapa.

Los resultados de la Tabla 4 también muestran que la detección indirecta de acuerdo con la invención es más sensible que los ensayos rápidos disponibles comercialmente. Para confirmar esto, se comparó directamente la

sensibilidad de la detección de HBsAg usando el método de la invención con la sensibilidad de detección usando el ensayo de Abbott Determine disponible comercialmente. La Tabla 5 y la Figura 11 muestran los resultados.

Tabla 5. Comparación de HBsAg entre el método de la invención y un ensayo rápido de Abbott disponible comercialmente

Ensayo de varilla	HBsAg (ng/ml)							
	12	6	3	1,5	0,75	0,38	0,18	0
Indirecta	5	4	3	2	1,5	1	0,5	0
Directa (Abbott)	2	1,5	0,5	0	0	0	0	0

La señal de detección está en escala de 1 a 5, siendo 5 la más intensa.

Discusión y conclusión a partir de los Ejemplos 1 y 2

En comparación con el sistema de detección directa de la técnica anterior, se amplificó la detección de señal (es decir, se mejoró) usando un anticuerpo acoplado con biotina y un anticuerpo anti-biotina marcado con oro.

Comparados con la sensibilidad de detección HBsAg usando los ensayos de varilla rápidos disponibles en la actualidad (aproximadamente 5 ng/ml para el ensayo de Abbott Determine y 12-25 ng/ml para los otros ensayos), los ensayos de la invención son considerablemente más sensibles, permitiendo la detección de una cantidad tan pequeña como 0,38 ng/ml.

El grado de mejora de la sensibilidad depende de la proporción molecular de biotina por anticuerpo anti-LPS ó HBsAg. Se mejoró la señal aumentando el número de moléculas de biotina por anticuerpo de 4 a 8 ó 9. cuando se marcó un anticuerpo monoclonal anti-LPS o HBsAg con 9 o 9 biotinas, la sensibilidad del análisis aumentó 30 veces para CT-LPS y 8 veces para HBsAg. Se obtuvo la misma señal intensa (1) para 0,001 µl de CT-LPS usando el análisis de la invención comparado con 0,03 µl de CT-LPS usando el análisis de detección directa de la técnica anterior. El aumento de 30 veces resulta particularmente sorprendente porque se espera la mejora máxima de la sensibilidad de detección del analito sea de 8 o 9 veces cuando se usan 8 ó 9 biotinas por anticuerpo.

A continuación se aportan dos posibles explicaciones para la mayor acumulación de partículas coloreadas usando el método de la invención:

(1) Cuanto mayor es la proporción de biotina en el anticuerpo específico de antígeno, más partículas de oro son capturadas. No obstante, más allá de un cierto número de moléculas de biotina por anticuerpo, la disponibilidad de biotina no aumenta. Por el contrario, si se proporcionan muchas biotinas, la reactividad del anticuerpo con el antígeno se puede ver reducida.

(2) La detección indirecta con partículas coloreadas aumentar la distancia entre las partículas de oro y el epítopo y de este modo reduce el impedimento estérico de su enlace.

Se redujo la sensibilidad de la detección de analito usando un método indirecto de la invención cuando se usó estreptavidina marcada con oro en comparación con la detección indirecta que usaba anticuerpo anti-biotina marcado con oro. Esto indica que se puede reducir la sensibilidad de la detección si la distancia entre los marcadores y el resto de captura es demasiado pequeña o si la flexibilidad del agente de dirección y/o de marcaje no es suficiente.

Las dos capas de anticuerpo conjugado con las partículas coloreadas aumentan más la distancia entre las partículas coloreadas y el epítopo.

Se debería optimizar el tamaño de las partículas coloreadas usadas para el anticuerpo anti-hapteno marcado con el fin de conseguir la máxima señal. Por ejemplo, se usa oro coloidal de 30 nm para el análisis de CT-LPS y para el análisis de HBsAg.

Se podrían usar otros ligandos, tales como FITC (véase el ejemplo 8).

Se han repetido los experimentos descritos en los ejemplos 1 y 2 usando un método indirecto diferente de la invención. En lugar de inmovilizar el anticuerpo anti-analito con biotina y el conjugado de oro anti-biotina sobre la banda cromatográfica, se mezclaron los reactivos con la disolución de ensayo que contenía analito de CT-LPS ó HBsAg antes de poner en contacto la disolución mixta con el extremo de contacto de la banda cromatográfica. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en los ejemplos 1 y 2. Esto muestra que la sensibilidad mejorada de la detección de analito obtenida usando el método de la invención no depende de si los reactivos

usados se inmovilizan sobre la banda cromatográfica o se encuentran presentes inicialmente en la disolución de ensayo.

Ejemplo 3. Número óptimo de ligandos por agente de dirección para membranas de diferentes caudales

Los inventores encontraron que el número óptimo de biotinas por anticuerpo anti-analito depende del caudal de la membrana de varilla. Para las membranas con caudal más lento (por ejemplo la membrana Schleicher & Shuell AE99, tamaño de poro 8 µm) se obtienen resultados óptimos con aproximadamente 6-12 ligandos por agente de dirección, más preferentemente 8-12 ligandos, incluso más preferentemente 8-10 ligandos, y del modo más preferido 8 ó 9 ligandos.

La Tabla 6 y la Figura 8 muestran el efecto del número de biotinas por anticuerpo anti-analito sobre la sensibilidad de la detección de analito si se usa una membrana de caudal rápido (membrana Whatman Purabind A-RP). Se llevó a cabo la detección indirecta de acuerdo con la invención mezclando la disolución tampón que contenía analito de CT-LPS con anticuerpo anti-CT-LPS con biotina y conjugado de oro anti-biotina y posteriormente poniendo en contacto la disolución mezclada con el extremo de contacto de la banda cromatográfica.

Tabla 6. Número óptimo de ligandos por agente de dirección para membranas de diferentes caudales

CT-LPS (µl)*	Detección indirecta (número de biotinas / anti-LPS Ab)					
	6	9	12	14	18	20
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0,5	0,5	0
0,003	0	0,5	0,75	1	1	0,75
0,01	0,5	1	1,5	2	2	1,5
0,03	1	2	2,5	3,5	3,5	2,5
0,1	2	3	3,5	4,5	4,5	4
* 1 µl contiene 4,218 ng de LPS						

Las señales están en una escala de 1 a 5, siendo 5 la señal más intensa.

Para obtener una intensidad de señal de 1 usando el método de detección indirecta de la invención cuando únicamente están presentes 0,003 µl de CT-LPS, el anticuerpo con biotina debería contener 14-18 biotinas. De este modo, se debería optimizar el número de biotinas por cada anticuerpo anti-CT-LPS con biotina para el caudal de la membrana usada.

Ejemplo 4. Comparación de métodos de una etapa y dos etapas

En este ejemplo, se compararon las sensibilidades de detección de analito de CT-LPS usando un análisis de una etapa (de acuerdo con una realización del primer aspecto de la invención) y un análisis de dos etapas (no de acuerdo con la invención).

Para llevar a cabo ensayos de una etapa y dos etapas, se usó una varilla (membrana Purabind A-RP, una membrana de caudal rápido) que comprende un extremo de contacto y un anticuerpo (el anticuerpo de captura) inmovilizados en la zona de captura de la varilla lejos de extremo de contacto. El anticuerpo de captura es capaz de unirse al analito de CT-LPS (un anticuerpo anti-CT-LPS). Se usaron un anticuerpo anti-CT-LPS con biotina que comprende 14 biotinas por anticuerpo (el agente de dirección) y el anticuerpo anti-biotina marcado con oro coloidal (el agente de marcaje) para detectar al analito de CT-LPS.

Se llevó a cabo el análisis de una etapa mezclando una disolución de ensayo que contenía CT-LPS con un anticuerpo anti-CT-LPS con biotina y un conjugado de oro-anticuerpo anti-biotina, posteriormente poniendo en contacto la disolución mezclada con el extremo de contacto de la varilla, dejando que la disolución alcanzara la zona de captura por acción capilar y detectando la presencia de marcador de oro en la zona de captura. De este modo, se impregnan el analito, el agente de dirección y el agente de marcaje en la varilla de forma simultánea en una única etapa.

Se llevó a cabo el análisis de dos etapas mezclando 50 µl de disolución tampón con CT-LPS y anticuerpo anti-CT-LPS con biotina, poniendo en contacto a continuación la disolución mezclada con el extremo de contacto de la varilla y dejando que la disolución alcanzara la zona de captura mediante la acción capilar. Posteriormente, se puso en contacto el extremo de contacto con 100 µl de una suspensión del conjugado de oro-anti-biotina y se dejó que éste viajara hasta la zona de captura por medio de acción capilar. A continuación, se detectó la presencia de marcador de oro en la zona de captura. De este modo, el agente de dirección y el agente de marcaje se impregnaron en la varilla por separado en dos etapas distintas.

Los resultados de la comparación de los ensayos de una etapa y dos etapas se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 9.

Tabla 7. Comparación de análisis de una etapa y dos etapas

CT-LPS (µl)*	Una etapa	Dos etapas
0	0	0
0,001	0,5	0
0,003	1	0
0,01	2	0,5
0,03	3	1
0,1	4,5	2
* 1µl contiene 4,218 ng de LPS		

Las señales están en una escala de 1 a 5, siendo 5 la señal más intensa.

Los resultados de la Tabla 7 y de la Figura 9 muestran que la sensibilidad de la detección de CT-LPS usando el análisis de CT-LPS de una etapa es 10 veces mayor que la del análisis de CT-LPS de dos etapas (se obtiene la misma señal intensa (1) para 0,003 µl de CT-LPS usando el análisis de una etapa que con 0,03 µl de CT-LPS usando el análisis de dos etapas).

Los inventores encontraron que la calidad y visibilidad de la línea de señal producida en la zona de captura de la varilla es mayor para el análisis de una etapa que para el análisis de dos etapas.

Ejemplo 8. Uso de FITC como ligando de agente de dirección

En este ejemplo, se compararon de nuevo la sensibilidad de la detección de analito usando métodos de detección directa e indirecta. No obstante, en el presente caso el ligando usado en el método de detección indirecta fue isotiocianato de fluoresceína (FITC) en lugar de biotina. Se llevó a cabo la detección directa (técnica anterior) usando un método similar al descrito en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo la detección indirecta de acuerdo con la invención mezclando la disolución tampón que contenía analito de CT-LPS con FITC acoplado con anticuerpo anti-CT-LPS y con anticuerpo anti-FITC marcado con oro coloidal. Posteriormente, se puso en contacto la disolución mezclada con el extremo de contacto de la banda cromatográfica. Se varió el número de ligandos FITC por anticuerpo anti-analito. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8 y en la Figura 10, y son muy similares a los obtenidos en el Ejemplo 1. El número óptimo de moléculas de FITC por anticuerpo anti-CT-LPS es de aproximadamente 7-11.

Tabla 8. Uso de FITC como ligando de agente de dirección (membrana AE99)

CT-LPS (µl) *	Detección directa	Detección indirecta (número de FITCs/anti-LPSAb)			
		6	7	9	11
0	0	0	0	0	0
0,001	0	0	1	1	1
0,003	0	0,5	2	2	2
0,01	0,5	1	2,5	2,5	2,5
0,03	1	2	3,5	4	4
0,1	2	3	4,5	4,5	4
* 1µl contiene 4,218 ng de LPS					

Las señales están en una escala de 1 a 5, siendo 5 la señal más intensa.

Estos resultados demuestran que la sensibilidad mejorada de detección de analito obtenida usando el método indirecto de la invención no está restringida al uso de biotina.

Leyendas de las Figuras

Figura 1

A) Representación esquemática de detección convencional de analito (detección directa). La figura muestra una bacteria CT (1) unida por un anticuerpo anti-LPS (2) inmovilizado sobre una fase sólida (3) y un anticuerpo anti-LPS (4) marcado con oro coloidal (5) unido a la bacteria CT (1).
B) Representación esquemática de la detección de analito de acuerdo con una realización de la invención. La figura muestra una bacteria CT (6) unida por un anticuerpo anti-LPS (7) inmovilizado sobre una fase sólida (8) y un anticuerpo anti-LPS (9) acoplado a 8 biotinas (10) [(9) y (10) forman el agente de dirección]. Cada biotina se encuentra unida por un anti-cuerpo anti-biotina (11) marcado con oro coloidal (12) [(11) y (12) forman los agentes de marcaje].

Figura 5

Se muestran esquemáticamente diferentes realizaciones de la invención:

A) Analito (20) capturado por un resto de captura (21) inmovilizado sobre una fase sólida (22). Se une un resto principal (23) [por ejemplo un anticuerpo de ratón anti-analito] del agente de dirección al analito (20) y se encuentra propiamente unido por medio de un resto secundario (24) [por ejemplo un anticuerpo anti-ratón] del agente de dirección. El restos secundario (24) comprende una pluralidad de ligandos (25). Los ligandos están unidos por medio de agentes de marcaje (26) que comprenden marcadores (27) [por ejemplo anticuerpos anti-ligando conjugados con partículas coloreadas].

B) Analito (30) capturado por un resto de captura (31) inmovilizado sobre una fase sólida (32). Se une un agente de dirección (33) [por ejemplo un anticuerpo anti-analito] provisto de una pluralidad de ligandos (34) al analito (30) y se encuentra unido propiamente por medio de una pluralidad de restos principales (35) [por ejemplo anticuerpos de ratón anti-ligando] del agente de marcaje. Cada resto principal (35) se encuentra unido por medio de un resto secundario (36) del agente de marcaje que comprende un marcador (37) [por ejemplo un anticuerpo anti-ratón conjugado con una partícula coloreada].

C) Analito (40) capturado por un resto de captura (41) inmovilizado sobre una fase sólida (42). Se une un agente de dirección (43) provisto de una pluralidad de ligandos (44) al analito (40) y se encuentra unido propiamente por medio de una pluralidad de restos principales (45) del agente de marcaje. Cada resto principal marcado (45) se encuentra unido por medio de un resto secundario marcado (46) del agente de marcaje. Los marcadores se muestran como (47).

Figura 6

Se muestran más realizaciones de la invención de manera esquemática.

A) Analito (110) unido al resto de derivación (112) provisto de una pluralidad de ligandos (114) capturados por medio de un resto de captura (116) inmovilizado en la zona de captura de la banda cromatográfica (118).

B) Analito (120) unido a un primer resto de derivación (122) provisto de una pluralidad de ligandos (124). Se une un segundo resto de derivación (126) a un ligando del primer resto de derivación. El segundo resto de derivación es capturado por medio de un resto de captura (128) inmovilizado en la zona de captura de la banda cromatográfica (130).

C) Analito (140) unido a un primer resto de derivación (142). El segundo resto de derivación (144) unido al primer resto de derivación está provisto de una pluralidad de ligandos de captura (146). El resto de captura (148) inmovilizado sobre la zona de captura de la banda cromatográfica (150) se une a uno de los ligandos de captura.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la presencia de un analito en una disolución de ensayo que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una banda cromatográfica que tiene un extremo de contacto para poner en contacto la disolución de ensayo y un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la banda cromatográfica lejos del extremo de contacto, comprendiendo el resto de captura un miembro de un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción de emparejamiento distinta de base de ácido nucleico, al analito o a uno de sus derivados, como el otro miembro del par de enlace ligando/anti-ligando;
b) poner en contacto un agente de dirección, capaz de unirse al analito o a su derivado, con la disolución de ensayo para permitir la unión del agente de dirección al analito o a su derivado en la disolución de ensayo, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos;
c) unir un marcador a cada uno de los dos o más ligandos del agente de dirección,
d) poner en contacto el extremo de contacto de la banda cromatográfica con la disolución de ensayo para permitir que el analito, o uno de sus derivados, unido al agente de dirección marcado se desplace hasta la zona de captura por medio de la acción capilar y sea capturado por el resto de captura; y
e) detectar la presencia del marcador en la zona de captura.

2. Un método para evaluar la presencia de un analito en la disolución de ensayo que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una banda cromatográfica que tiene:

i) un extremo de contacto para la puesta en contacto con la disolución de ensayo;
ii) un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la banda cromatográfica lejos del extremo de contacto, comprendiendo el resto de captura un miembro de un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción de emparejamiento distinta de base de ácido nucleico, al analito o a su derivado, como el otro miembro del par de enlace ligando/anti-ligando; y
iii) un agente de dirección inmovilizado de forma que se pueda liberar en una zona de conjugado de la banda cromatográfica entre el extremo de contacto y la zona de captura, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos y siendo capaz de unirse al analito o a su derivado;

b) poner en contacto una pluralidad de marcadores con la disolución de ensayo;
c) poner en contacto el extremo de contacto de la banda cromatográfica con la disolución de ensayo para permitir que la disolución de ensayo viaje a través de la zona de conjugado hasta la zona de captura, liberando de este modo el agente de dirección desde la zona de conjugado de manera que cada uno de los dos o más ligandos del agente de dirección liberado queden unidos por un marcador y de manera que el agente de dirección liberado unido a los marcadores pueda viajar con el analito o con su derivado en la disolución de ensayo hasta la zona de captura y sea capturado en la zona de captura como parte de un complejo formado entre el resto de captura, el analito o su derivado, el agente de dirección y los marcadores; y
d) detectar la presencia del marcador en la zona de captura.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los marcadores se encuentran inmovilizados de forma que se pueden liberar sobre la banda cromatográfica en lugar del agente de dirección, y el agente de dirección se pone en contacto con la disolución de ensayo en la etapa (b) en lugar de los marcadores.

4. Un método para evaluar la presencia de un analito en una disolución de ensayo que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una banda cromatográfica que tiene un extremo de contacto para poner en contacto la disolución de ensayo y un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la banda cromatográfica lejos del extremo de contacto, comprendiendo el resto de captura un miembro de un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción de emparejamiento distinta de base de ácido nucleico, el analito o a uno de sus derivados, como el otro miembro del par de enlace ligando/anti-ligando;
b) poner en contacto la banda cromatográfica con la disolución de ensayo para permitir que el analito o uno de sus derivados viaje hasta la zona de captura por medio de la acción capilar y sea capturado por medio del resto de captura;
c) poner en contacto el extremo de contacto de la banda cromatográfica con una disolución que contiene un agente de dirección capaz de unirse al analito o a uno de sus derivados, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos y estando unido cada uno de los dos o más ligandos por medio de un

marcador, permitiendo que el agente de dirección marcado de la disolución viaje por medio de acción capilar hasta la zona de captura y se una al analito o a su derivado capturado en la zona de captura; y
e) detectar la presencia del marcador en la zona de captura.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4, en el que la unión de los marcadores a los ligandos del agente de dirección se lleva a cabo en la disolución de ensayo.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que los marcadores están proporcionados por los agentes de marcaje que se añaden por separado a la disolución de ensayo en considerablemente el mismo instante en que el agente de dirección se pone en contacto con la disolución de ensayo.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente de dirección se pre-incuba con la disolución de ensayo antes de que los marcadores se unan al agente de dirección.

8. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que una pluralidad de marcadores está unida a al menos uno de los ligandos del agente de dirección.

9. Un estuche para evaluar la presencia de un analito en una disolución de ensayo que comprende:

i) la banda cromatográfica que se define en la reivindicación 1;
ii) por separado de la banda cromatográfica, un agente de dirección capaz de unirse al analito o a su derivado, no estando unido al analito o a su derivado, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos, y una pluralidad de agentes de marcaje cada uno unido a un ligando del resto de dirección, estando provisto cada agente de marcaje de un marcador.

10. Un estuche para evaluar la presencia de un analito en una disolución de ensayo que comprende:

i) la banda cromatográfica que se define en la reivindicación 2; y por separado
ii) una pluralidad de agentes de marcaje capaces de unirse a un ligando del resto de dirección, estando provisto cada agente de marcaje de un marcador.

11. Un estuche para evaluar la presencia de un analito en una disolución de ensayo que comprende:

una banda cromatográfica que presenta

i) un extremo de contacto para la puesta en contacto con la disolución de ensayo;
ii) un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la banda cromatográfica lejos del extremo de contacto, comprendiendo el resto de captura un miembro de un par de enlace ligando/anti-ligando capaz de unirse, por medio de una interacción de emparejamiento distinta de base de ácido nucleico, al analito o a su derivado, como el otro miembro del par de enlace ligando/anti-ligando; y
iii) un agente de dirección inmovilizado de forma que se pueda liberar en una zona de conjugado de la banda cromatográfica entre el extremo de contacto y la zona de captura, estando provisto el agente de dirección de una pluralidad de ligandos capaces de unirse al analito o a su derivado; y

una pluralidad de agentes de marcaje capaces de unirse al ligando del resto de dirección, estando provisto cada agente de marcaje de un marcador, en el que los agentes de marcaje están inmovilizados de forma que se puedan liberar en una zona de conjugado de la banda cromatográfica entre el extremo de contacto y la zona de captura.

12. El estuche de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el agente de dirección marcado se encuentra en forma seca.

13. El estuche de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los agentes de marcaje se encuentran en forma seca.

14. El estuche de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 13, en el que el agente de dirección comprende un anticuerpo acoplado a una pluralidad de ligandos.

15. El estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el agente de dirección comprende: un resto principal capaz de unirse al analito o a su derivado; y un resto secundario capaz de unirse al resto principal, estando el resto secundario acoplado a una pluralidad de ligandos.

16. El estuche de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el resto principal y/o secundario del agente de dirección es un anticuerpo.

17. El estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, en el que cada agente de marcaje comprende un anticuerpo marcado.

18. El estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16 en el que el agente de marcaje comprende: un resto principal capaz de unirse a un ligando del agente de dirección; y un resto secundario marcado capaz de unirse al resto principal.

19. El estuche de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el resto principal y/o secundario del agente de marcaje es un anticuerpo.

20. El estuche de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, en el que el resto principal del agente de marcaje se encuentra marcado.

21. El estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20, en el que los marcadores comprenden marcadores detectables visualmente, preferentemente partículas coloreadas, o marcadores luminiscentes, preferentemente marcadores fluorescentes.

22. Un estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 21, en el que los marcadores comprenden una enzima estable capaz de convertir un substrato en un producto coloreado, o en un producto luminiscente, preferentemente un producto fluorescente.

23. El estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 22, en el que el analito es un analito de *Chlamydia trachomatis* (CT), o un antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg).

24. El uso del estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 23 para evaluar la presencia de un analito en una disolución de ensayo.

25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el analito es un analito de CT, o un HBsAg.

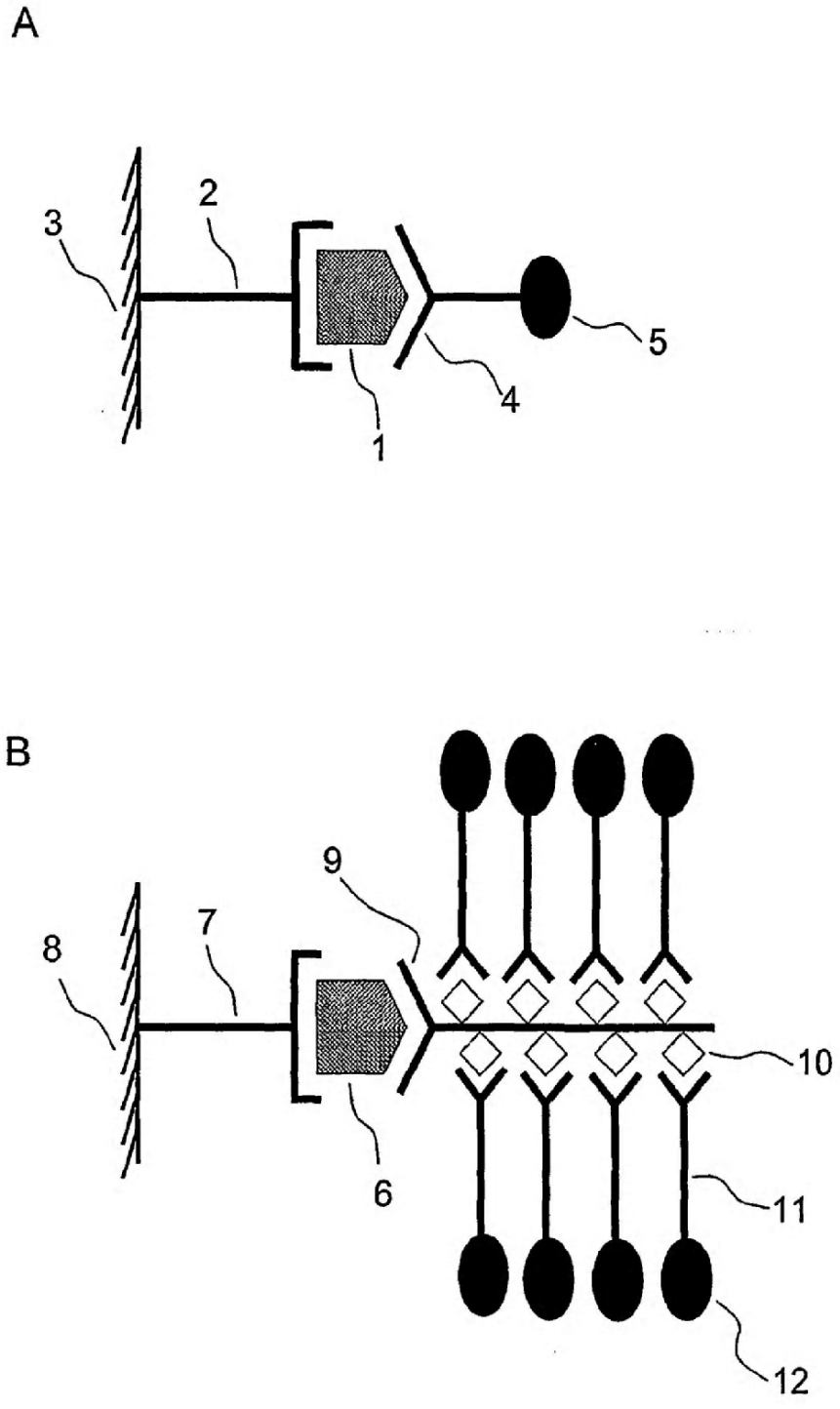


FIGURA 1

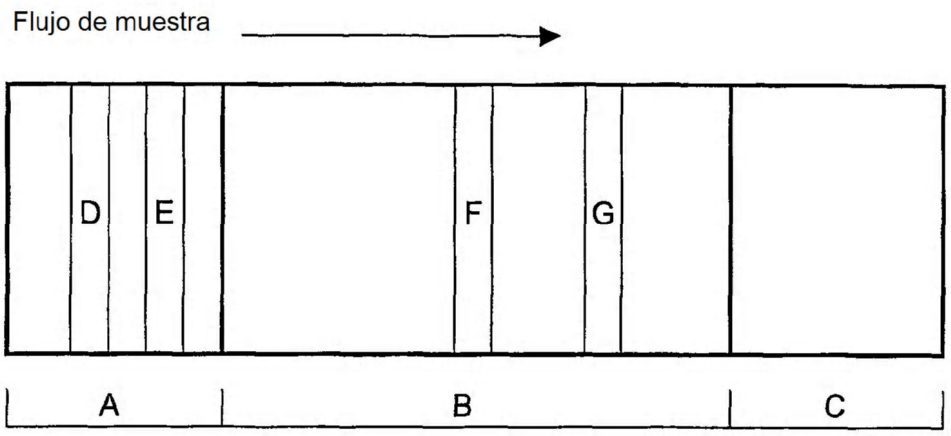
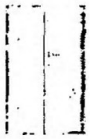
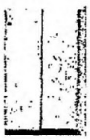


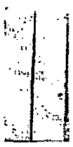
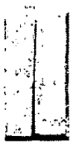
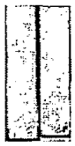
FIGURA 2

Figura 3

Análisis de varilla	Concentración de CT-LPS (pg/ensayo)					
	420	125	40	15	5	NC*
Directa (Técnica Anterior)						
Indirecta (Señal Mejorada)						

*NC: control negativo

Figura 4

Análisis de varilla	HBsAg (ng/ml)							
	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,195	NC*
Directa (Técnica Anterior)								
Indirecta (Señal Mejorada)								

* NC: control negativo

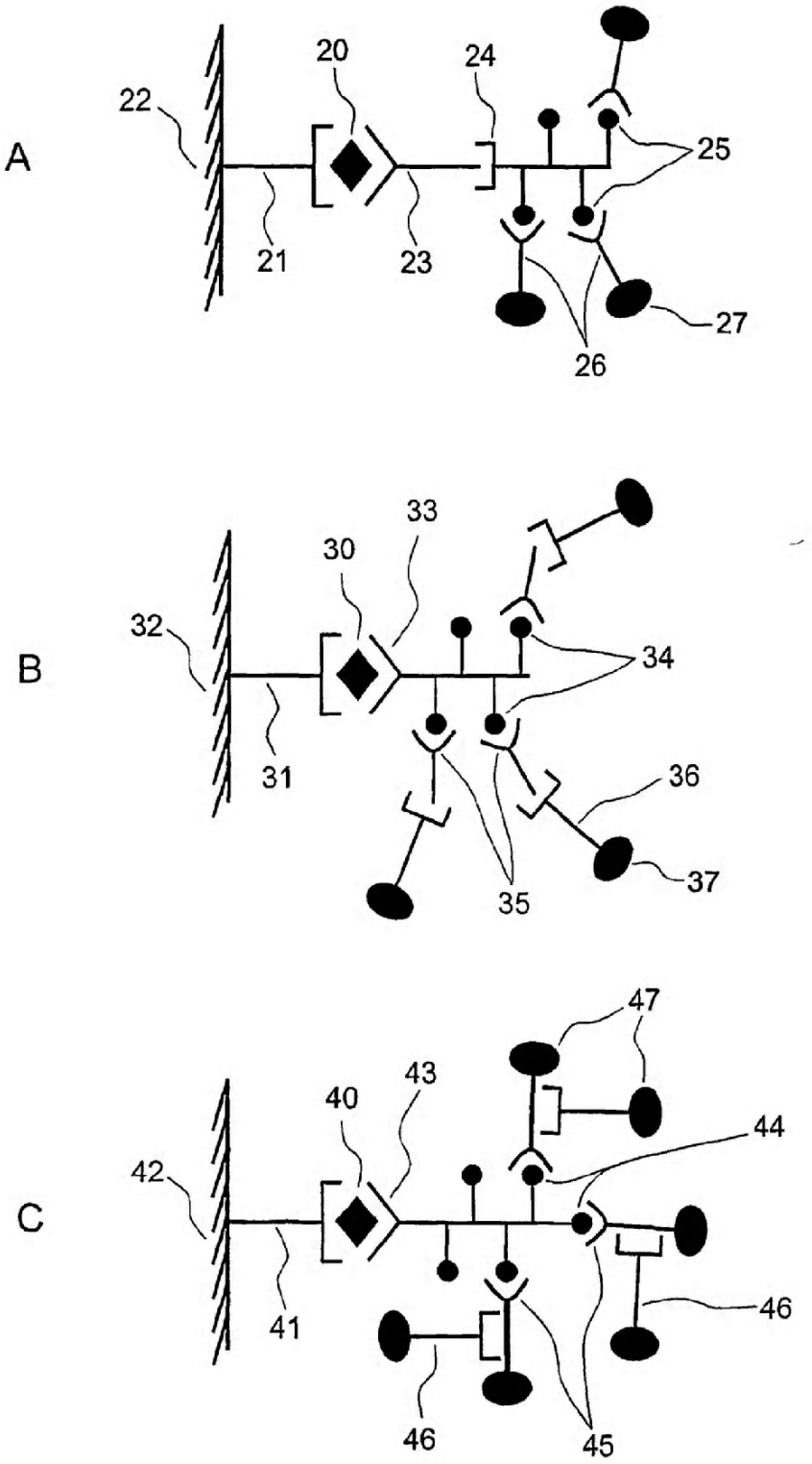

A
22
20
24
25
21
23
27
26
B
33
30
32
34
31
36
37
35
C
47
43
40
44
42
41
46
46
45

FIGURA 5

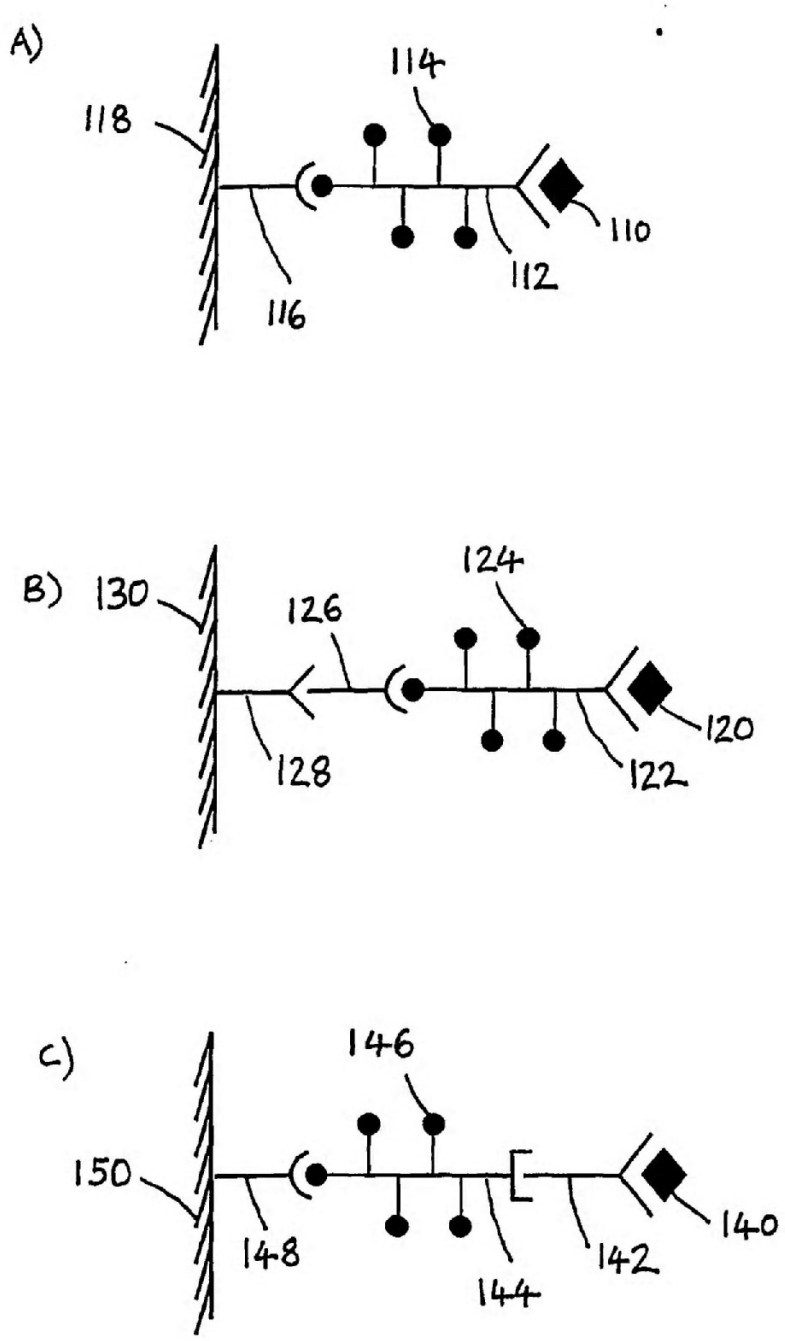
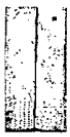
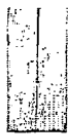
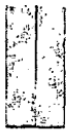
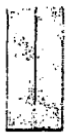
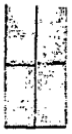
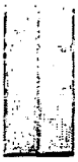
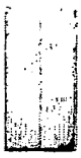
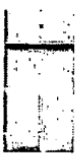
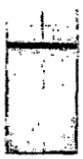
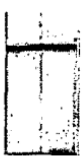
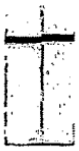
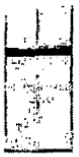
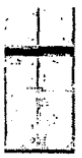
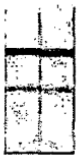
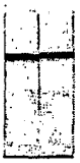
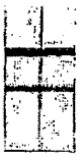
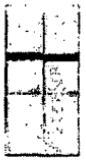
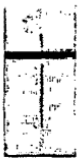

A)
118
114
110
112
116
B)
130
126
124
120
128
122
C)
146
150
140
148
144
142

FIGURA 6

Formato de análisis	Concentración de CT-LPS (µl/ensayo)					
	0,1	0,03	0,01	0,003	0,001	0
Detección directa (Técnica Anterior)						
Detección indirecta (Señal Mejorada) 2 biotinas/Ab						
4 biotinas/Ab						
6 biotinas/Ab						
8 biotinas/Ab						
9 biotinas/Ab						
10 biotinas/Ab						
11 biotinas/Ab						
12 biotinas/Ab						

1 µl contiene 4,218 ng de LPS

FIGURA 7

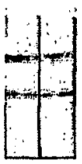
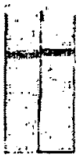
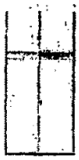
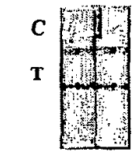
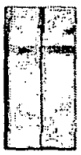
Formato de análisis	Concentración de CT-LPS (µl/ensayo)					
	0,1	0,03	0,01	0,003	0,001	0
6 biotinas/Ab						
9 biotinas/Ab	C T					
12 biotinas/Ab						
14 biotinas/Ab						
18 biotinas/Ab						
20 biotinas/Ab						

1 µl contiene 4,218 ng de LPS

C = Control procedimental

T = Línea de ensayo

FIGURA 8

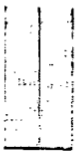
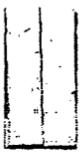
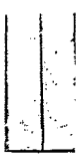
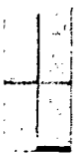
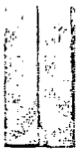
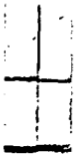
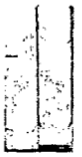
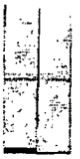
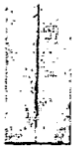
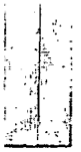
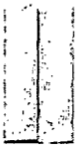
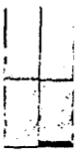
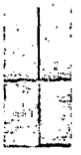
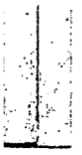
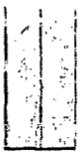
Formato de análisis	Concentración de CT-LPS (µl/ensayo)					
	0,1	0,03	0,01	0,003	0,001	0
Una etapa (Señal Mejorada)						
Dos etapas (Técnica Anterior)						

1 µl contiene 4,218 ng de LPS

C = Control procedimental

T = Línea de ensayo

FIGURA 9

Formato de análisis	Concentración de CT-LPS (µl/ensayo)					
	0,1	0,03	0,01	0,003	0,001	0
Detección directa (Técnica Anterior)						
Detección indirecta (Señal Mejorada) 6 FITC/Ab						
7 FITC/Ab						
9 FITC/Ab						
11 FITC/Ab						

1 µl contiene 4,218 ng de LPS

FIGURA 10

Comparación de detección indirecta de una etapa (señal mejorada de acuerdo con la presente invención) y un análisis de varilla HBsAg rápido comercial por medio de detección directa

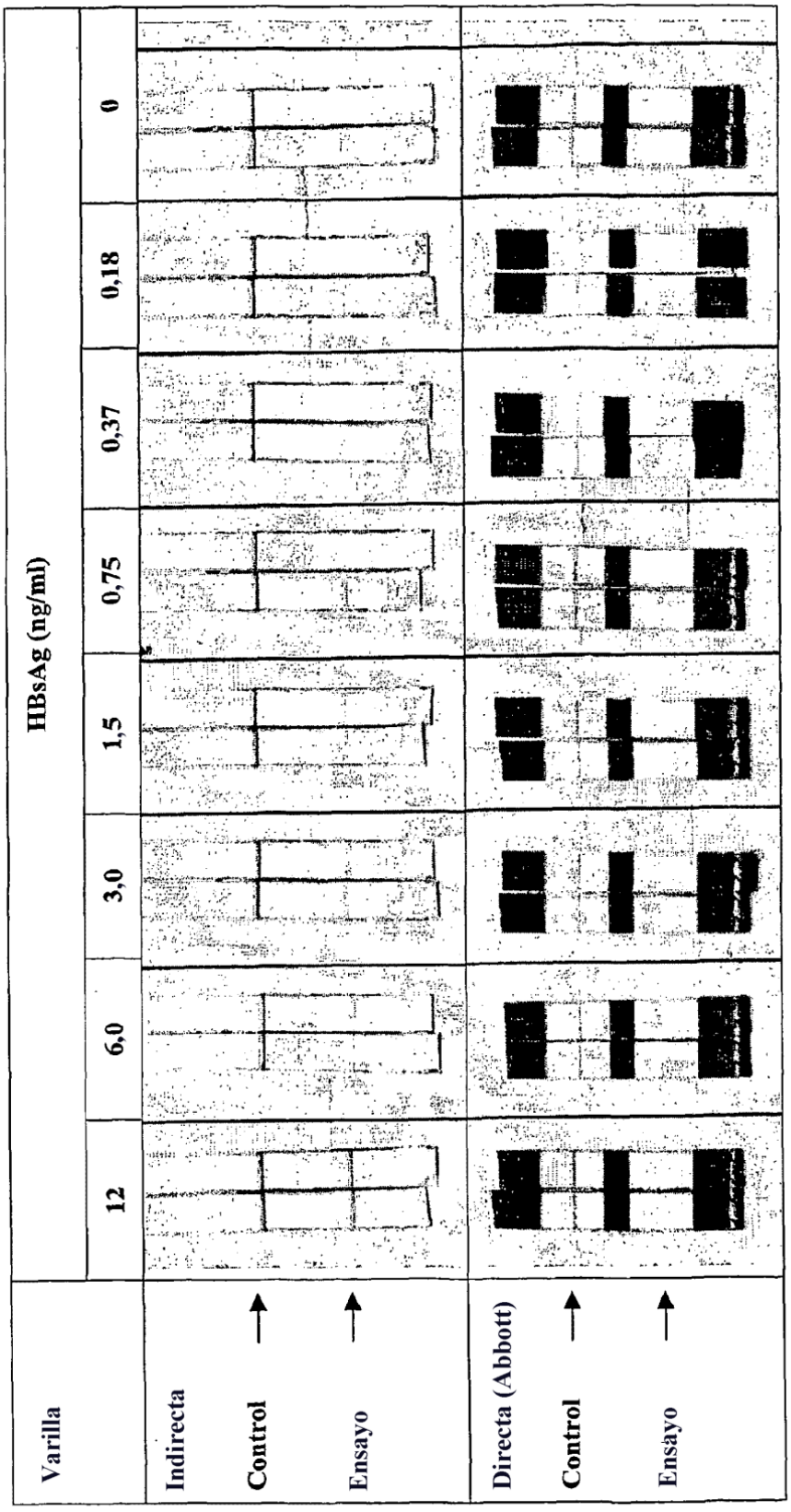


FIGURA 11