

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 868**

51 Int. Cl.:
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06829403 .2**
96 Fecha de presentación: **08.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1957984**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54 Título: **DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA UN DIAGNÓSTICO RÁPIDO.**

30 Prioridad:
08.12.2005 WO PCT/EP2005/013159

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.01.2012

73 Titular/es:
**CORIS BIOCONCEPT SPRL
SCIENCE PARK CREALYS, RUE JEAN SONET 4A
5032 GEMBLoux, BE**

72 Inventor/es:
**MERTENS, Pascal;
DENORME, Laurence y
LECLIPTEUX, Thierry**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 372 868 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de ensayo para diagnósticos rápidos.

5 **Campo de la invención**

5 [0001] Esta invención se refiere a métodos y dispositivos para detectar analitos o análogos de los mismos en una muestra biológica. Esta invención se refiere a ensayos rápidos mejorados tales como dispositivos de tipo "tira reactiva". La invención se refiere en particular a un dispositivo de ensayo hecho de uno o más lados activos, para
10 permitir detecciones individuales o múltiples, detecciones cuantitativas o semi-cuantitativas. Los dispositivos descritos en esta invención permiten detectar o identificar diversos productos biológicos o químicos con una manipulación.

15 **Antecedentes de la invención**

[0002] Se han desarrollado varias estrategias para la detección de analitos en una muestra biológica para diagnóstico rutinario en laboratorios de diagnóstico mediante, por ejemplo, inmunocromatografía.

20 [0003] Los documentos EP 0 088 636, EP 0 186 799, EP 0 284 232 y WO 88/08534 describen dispositivos cromatográficos similares a una lámina que comprenden al menos una primera y una segunda zona o región. Los dispositivos de la técnica anterior descritos en estos documentos comprenden:

- 25 - una primera región o zona que contiene material activo poroso para permitir que el líquido se mueva hasta la región sensibilizada recubierta con reactivos específicos. Esta primera zona o región comprende un reactivo de detección secado sobre ella o impregnado sobre ella. Puede contener además una (sub)zona de aplicación y/o una (sub)zona de absorción. Esta primera zona se denomina generalmente como la zona de aplicación;
- 30 - una segunda región o zona, también denominada como la zona de detección, hecha de material activo poroso sobre el cual se adsorben reactivos específicos. Algunos de estos reactivos descansan sobre una subzona (por ejemplo una línea) de la segunda región del dispositivo son específicos para el analito a detectar y deben reaccionar con el complejo del analito en la muestra-reactivo de marcado mientras otros reactivos no específicos eventualmente descansan sobre una subzona adicional (por ejemplo como una línea adicional) de la segunda región están destinados a reaccionar con el exceso del reactivo de detección. Esta segunda zona o región, preferiblemente hecha de nitrocelulosa, también puede contener una subzona de control, preferiblemente detrás de la zona de detección; y
- 35 - una tercera región o zona hecha de material poroso dedicada a absorber el exceso de líquido que llega a través de las primera y segunda regiones. Esta región se denomina generalmente como la región absorbente o de absorción.

40 [0004] Los dispositivos (inmuno)cromatográficos de la técnica anterior pueden tener un soporte de refuerzo de plástico u otro y/o pueden estar comprendidos en una carcasa impermeable al agua.

45 [0005] Las tres regiones están en contacto por capilaridad para permitir los movimientos de líquidos desde la zona de aplicación a la tercera región.

50 [0006] El documento US 2002001818 describe un dispositivo de ensayo en seco que implica el uso de una tira de un material absorbente a través de la cual fluye la muestra de fluido corporal y en la que un primer analito se determina por calorimetría en una primera región de la tira y un segundo analito se determina mediante un inmunoensayo que tiene lugar en una segunda región de la tira que está situada aguas abajo de la primera región.

55 [0007] El documento US 2004023412 describe un método para determinar un analito que usa una matriz de flujo que muestra: a) opcionalmente una zona de aplicación (AR*Z) para un reactivo de unión que es detectable de forma analítica; b) una zona de detección (DZ), que está situada aguas abajo de la ASZ y muestra un reactivo de unión adicional (Capturador) anclado firmemente a la matriz, y en el que un complejo que contiene el Capturador y el analito y/o Reactivo* se forma durante la reacción.

60 [0008] El documento US 2005227371 describe dispositivos para realizar ensayos de etapa única, en los que dichos dispositivos comprenden un reactivo de unión a un analito marcado inmovilizado de forma reversible sobre un material sólido no poroso, material sólido que está en contacto físico con un portador poroso seco que porta un reactivo de unión a un analito inmovilizado.

[0009] El documento WO 9832019 describe un dispositivo para la detección autónoma de un analito, en el que el líquido de muestra es transportado a través de un conducto que comprende una zona de detección que está conectada de forma operativa a un elemento absorbedor.

5 [0010] Aunque útiles, los dispositivos cromatográficos disponibles actualmente que usan tiras de ensayo tienen una serie de desventajas. Muchas muestras, tales como muestras fecales, contienen materia particulada que puede atascar los poros del medio cromatográfico, obstaculizando en gran medida el proceso inmunocromatográfico. Además, frecuentemente es difícil con los dispositivos de ensayo cromatográfico existentes aplicar la muestra al medio cromatográfico, de modo que el frente de la muestra se mueva uniformemente a través del medio cromatográfico para asegurar que la muestra alcanza el área en el que se producirá la unión de una manera uniforme, en línea recta. La preparación de la muestra y la generación de residuos son responsables de otros problemas con dispositivos y técnicas para inmunocromatografía disponibles actualmente. Raramente es posible aplicar una muestra (tal como heces) o un dispositivo de muestreo (tal como un hisopo para la garganta) directamente al medio cromatográfico. Varias reacciones de extracción y pre-tratamiento se requieren habitualmente antes de que la muestra pueda ser aplicada al medio cromatográfico. Estas reacciones son realizadas típicamente por el facultativo o técnico que realiza el ensayo en varios recipientes pequeños, tales como tubos de ensayo o tubos de microcentrífuga, que requieren el uso de dispositivos de transferencia tales como pipetas. Cada uno de estos dispositivos se contamina a continuación y deben disponerse precauciones de uso especiales, de modo que los trabajadores o personas que puedan entrar inadvertidamente en contacto con los residuos no resulten contaminados.

[0011] Por lo tanto, sería deseable tener un dispositivo de ensayo cromatográfico capaz de recibir una muestra posiblemente contaminada o un dispositivo de preparación de muestras directamente para eliminar la necesidad de recipientes de extracción y dispositivos de transferencia. Dicho dispositivo, preferiblemente en forma de una tira de ensayo, también debe ser capaz de realizar ensayos sobre muestras que contienen particulados sin atasco o sin interferencia y debe ser capaz de suministrar la muestra al medio cromatográfico uniforme y equitativamente para mejorar la exactitud y la precisión del ensayo. Este aspecto de un dispositivo de ensayo mejorado es particularmente importante para evitar falsos negativos y falsos positivos.

30 **Objetivos de la invención**

[0012] La presente invención pretende proporcionar un método de detección de analitos como se define en la reivindicación adjunta 1 que usa dispositivos similares a una lámina altamente flexibles adecuados para la detección de múltiples analitos o análogos de los mismos en una solución o muestra biológica, realizándose estas detecciones en el mismo dispositivo. El dispositivo similar a una lámina está diseñado para permitir el movimiento de líquido por gravedad y capilaridad. En las reivindicaciones adjuntas 2 a 12 se definen realizaciones preferidas.

Resumen de la invención

40 [0013] La presente invención proporciona un método de detección de analitos como se define en la reivindicación 1 que usa un dispositivo de ensayo (que funciona por gravedad) hecho de uno o más lados activos, para permitir detecciones individuales o múltiples, detecciones cuantitativas o semicuantitativas, a través de un proceso que funciona por gravedad que permitirá que una muestra de líquido entre en contacto con las diferentes zonas reactivas del dispositivo.

45 [0014] En particular, la presente invención proporciona un método de detección de analitos para la detección de al menos un analito en una muestra, que comprende las etapas de colocar verticalmente un dispositivo de ensayo, poner en contacto al dispositivo de ensayo con una muestra y permitir que la muestra se mueva desde la parte superior del dispositivo hasta la parte inferior del dispositivo, por gravedad a través de una zona sin capilares (14) del dispositivo, y detectar el analito, en el que el dispositivo de ensayo comprende: en uno o más lados de un soporte sólido (18), dispuestas desde un extremo del dispositivo al otro extremo del dispositivo:

- 55 (a) una primera zona con capilares que comprende una zona de aplicación de la muestra (2), en la que la zona de aplicación de la muestra (2) comprende al menos un conjugado específico de analito con marca directa o indirecta para la detección del al menos un analito o análogo del mismo;
- (b) una segunda zona con capilares que comprende una zona de detección (4), opcionalmente una zona intermedia (6), dispuesta cerca de dicha zona de detección (4), y opcionalmente una zona o región absorbente (5) dispuesta cerca de dicha zona de detección (4), comprendiendo opcionalmente dicha zona de detección (4) una subzona de control; y en la que la zona de detección (4) comprende al menos un reactivo de captura que reconoce específicamente el al menos un analito o análogo del mismo; y
- 60 (c) separando la zona sin capilares (14) a la zona de aplicación de la muestra (2) de la primera zona con capilares de la zona de detección (4) o de la zona intermedia opcional (6) de la segunda zona con capilares,

en el que dicha zona de aplicación de la muestra (2), dicha zona sin capilares (14) y dicha zona de detección (4) o dicha zona intermedia opcional (6) se disponen de tal manera que la muestra pueda fluir solamente por gravedad desde la zona de aplicación de la muestra (2) hasta la zona de detección (4) o hasta la zona intermedia opcional (6).

5 **[0015]** El dispositivo de ensayo para la detección de al menos un analito en una muestra comprende: un soporte sólido, sobre el cual se proporcionan varias zonas yuxtapuestas, con lo que la muestra es capaz de migrar desde una zona de recepción de la muestra hacia una zona de detección de la muestra, con lo que al menos un analito, si está presente, es detectado, con lo que ambas zonas comprenden material que permite un flujo por capilaridad de la muestra a través de dichas zonas, caracterizado por que entre dichas zonas se proporciona una zona intermedia de transporte de la muestra que está libre de cualquier material con capilares, permitiendo que la muestra migre por fuerzas gravitatorias sobre el soporte, cuando se deja en posición vertical.

10 **[0016]** En una realización particular de la presente invención, el presente dispositivo de ensayo que funciona por gravedad para su uso en la presente invención es particularmente adecuado para inmunodetección, y comprende reactivos de captura que son inmunorreactivos.

15 **[0017]** El método de detección de analitos, para la detección de al menos un analito en una muestra, comprende la etapa de poner en contacto un dispositivo de ensayo con una muestra y permitir que la muestra se mueva desde la parte superior del dispositivo hasta la parte inferior del dispositivo, por gravedad a través de una zona sin capilares y detectar dicho al menos un analito.

20 **[0018]** En particular, el método de detección de analitos comprende poner en contacto a una zona de recepción de la muestra en el dispositivo con una muestra, permitir que la muestra migre por capilaridad a través de la zona de recepción de la muestra a una zona sin capilares, permitir que la muestra migre a través de la zona sin capilares por gravedad hasta una zona de detección y permitir que la muestra migre a través de la zona de detección por capilaridad y detectar el analito.

25 **[0019]** El dispositivo de ensayo (1) comprende en uno o más lados de un soporte sólido (18), dispuestas desde un extremo del dispositivo al otro extremo del dispositivo:

- 30
- una primera zona con capilares que comprende una zona de aplicación de la muestra (2);
 - una segunda zona con capilares que comprende una zona de detección (4), opcionalmente una zona intermedia (6), dispuesta cerca de dicha zona de detección (4), y opcionalmente una zona o región absorbente (5) dispuesta cerca de dicha zona de detección (4), comprendiendo opcionalmente dicha zona de detección (4) una subzona de control; y
 - una zona sin capilares (14) que separa la zona de aplicación de la muestra (2) de la zona de detección (4) o la zona intermedia opcional (6)

35

40 en el que la zona de detección (4) comprende al menos un reactivo de captura que reconoce específicamente el al menos un analito o análogo del mismo; y

45 en el que la zona de aplicación de la muestra (2) comprende al menos un conjugado específico de analito con marca directa o indirecta para la detección del al menos un analito o análogo del mismo. La zona intermedia (6) puede estar o no presente en el dispositivo y puede comprender opcionalmente al menos un conjugado específico de analito con marca directa o indirecta para la detección del al menos un analito o análogo del mismo.

50 **[0020]** En una realización particular de la presente invención, el método de detección de analitos comprende las etapas de colocar verticalmente el dispositivo de ensayo, aplicar una muestra en la parte superior del dispositivo, permitir que la muestra migre a través de la zona de aplicación de la muestra (2) e hidratar el al menos un conjugado específico de analito, permitir que al menos un analito en dicha muestra reaccione con el al menos un conjugado específico de analito, formando de este modo al menos un complejo, permitir que el al menos un complejo alcance la zona sin capilares (14), para pasar por gravedad la zona sin capilares (14) para entrar en contacto con y migrar a través de la zona intermedia opcional (6) y pasar a través de la zona de detección (4) reaccionando de este modo con al menos un reactivo de captura y permitir el desarrollo de una señal detectable detectando de este modo dicho al menos un analito.

55 **[0021]** Los dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad y los presentes métodos son particularmente adecuados para, aunque no se limitan a, la detección de analitos en una muestra, en particular para la detección de uno o más analitos o análogos de microorganismos (dañinos) que comprenden *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *C. difficile*, *E. coli*, *E. histolytica*, VRS (Virus Respiratorio Sincitial), virus de la gripe A y B, rotavirus, adenovirus de tipos 40 y 41 u otros grupos de adenovirus, antígeno urinario de *Legionella pneumophila*, coronavirus de origen humano y animal y metapneumovirus humanos.

[0022] Los dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad y métodos de la presente invención, aunque aplicables a muchos tipos de análisis, son especialmente ventajosos cuando se usan en inmunoensayos o ensayos rápidos oligocromatográficos, para mejorar un inmunoensayo en fase sólida convencional. Además, los dispositivos producidos de acuerdo con la invención son relativamente fáciles de usar, y requieren menos etapas procedimentales y una técnica de ensayo menos compleja, en comparación con ensayos de la técnica anterior, y también proporcionan la ventaja adicional de resultados rápidos cuantitativos, semi-cuantitativos o cualitativos para ensayar muestras desconocidas. Los dispositivos están adaptados adicionalmente para un uso ventajoso como controles, por ejemplo, para evaluar la precisión y la fiabilidad de dichos ensayos. Además, durante la fabricación, los dispositivos de la invención pueden fabricarse de forma relativamente fácil. También se ha descubierto que los ensayos que utilizan dichos dispositivos de la invención son altamente sensibles a diversos niveles de analitos. Las anteriores ventajas, así como otras ventajas, serán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención como se presenta en este documento, los dibujos y los ejemplos que la ilustran.

Breve descripción de los dibujos

[0023]

Las figuras 1, 2 y 3 representan vistas laterales en sección transversal de dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La figura 4 representa vistas laterales en sección transversal (4a, 4a1, 4a2, 4a3) y vistas frontales (4b, 4c, 4d y 4e) de dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La figura 5 representa una vista en perspectiva (5a) y una vista en despiece ordenado (5b) de un embalaje de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La figura 6 representa una vista de sección transversal (6a) y una vista frontal en semi-despiece ordenado (6b) de un embalaje de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La figura 7 representa una vista de sección transversal (7a) y una vista posterior (7b) de un embalaje de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

[0024] En una realización, la presente invención proporciona un método que usa un dispositivo de ensayo (1), también denominado como un “dispositivo de ensayo que funciona por gravedad similar a una lámina”, para la detección de al menos un analito en una muestra, que comprende: un soporte sólido (18) que comprende dispuestas desde un extremo al otro extremo del soporte una al lado de otra, (i) una primera zona con capilares que es una zona de recepción de la muestra (2), (ii) una zona sin capilares (14), y (iii) una segunda zona con capilares que es una zona de detección de la muestra (4). De acuerdo con la invención, el dispositivo comprende dos zonas con capilares dispuestas en ambos extremos del eje longitudinal del soporte, en comunicación fluida entre sí a través de una zona sin capilares, en la que una muestra a ensayar puede fluir por gravedad. Dicho soporte sólido puede ser de cualquier forma adecuada incluyendo, aunque sin limitarse a, rectangular, cuadrada, triangular o cualquier otra forma. Preferiblemente dicho soporte sólido (18) es de forma sustancialmente rectangular.

[0025] De acuerdo con una realización de la invención, la zona de recepción de la muestra del dispositivo de ensayo comprende una zona de aplicación de la muestra (2) y la zona de detección de la muestra comprende una zona de detección (4) y opcionalmente una zona intermedia (6) dispuesta cerca de dicha zona de detección (4), en la que dicha zona de detección (4) opcionalmente comprende una subzona de control. Preferiblemente dicha zona intermedia (6) y dicha zona de detección (4) están en contacto entre sí.

[0026] En otra realización, dicha zona de detección comprende una zona o región absorbente (5) dispuesta cerca de la zona de detección (4) en comunicación fluida por capilaridad entre sí.

[0027] De acuerdo con una realización particular, el dispositivo de ensayo (1) para la detección de al menos un analito en una muestra comprende: en uno o más lados del soporte sólido (18), dispuestas desde un extremo al otro extremo del dispositivo:

(a) una primera zona con capilares que comprende una zona de aplicación de la muestra (2),

(b) una segunda zona con capilares que comprende una zona de detección (4), opcionalmente una zona intermedia (6) dispuesta cerca de dicha zona de detección (4), y opcionalmente una zona o región absorbente (5) dispuesta cerca de dicha zona de detección (4), en la que dicha zona de detección (4) opcionalmente comprende una subzona de control, y

(c) una zona sin capilares (14) que separa la zona de aplicación de la muestra (2) de la primera zona con capilares de la zona de detección (4) o de la zona intermedia opcional (6) de la segunda zona con capilares,

5 en la que dicha zona de aplicación de la muestra (2), dicha zona sin capilares (14) y dicha zona de detección (4) o dicha zona intermedia opcional (6), se disponen de tal manera que, cuando el dispositivo está en uso, la muestra pueda fluir por gravedad desde la zona de aplicación de la muestra (2) hasta la zona de detección (4) o hasta la zona intermedia opcional (6).

10 **[0028]** De acuerdo con una realización particular, la zona de detección (4) comprende al menos un reactivo de captura que reconoce específicamente al menos un analito o análogo del mismo; y la zona de aplicación de la muestra (2) comprende al menos un conjugado específico de analito con marca directa o indirecta para la detección de al menos un analito o análogo del mismo. De acuerdo con una realización particular adicional, la zona intermedia (6) puede comprender al menos un conjugado específico de analito con marca directa o indirecta para la detección de al menos un analito o análogo del mismo.

15 **[0029]** De acuerdo con otra realización particular, la zona de detección (4) comprende al menos dos reactivos de captura que reconocen específicamente al menos dos analitos o análogos de los mismos; y la zona de aplicación de la muestra (2) comprende al menos dos conjugados específicos de analito con marca directa o indirecta para la detección de al menos dos analitos o análogos de los mismos. De acuerdo con otra realización particular más, la zona de detección (4) comprende al menos tres reactivos de captura que reconocen específicamente al menos tres analitos o análogos de los mismos; y la zona de aplicación de la muestra (2) comprende al menos tres conjugados específicos de analito con marca directa o indirecta para la detección de los al menos tres analitos o análogos de los mismos.

20 **[0030]** La invención es particularmente adecuada para realizar múltiples detecciones, en las que se detectan más de un analito.

25 **[0031]** Como se usa en este documento, la expresión “dispositivo de ensayo” y “dispositivo de ensayo que funciona por gravedad (GDT)” se usan de forma intercambiable y se refieren a un dispositivo de ensayo, en el que las diferentes zonas del dispositivo se disponen de tal manera que, cuando el dispositivo está en uso, la muestra pueda fluir desde la zona de aplicación de la muestra (2) hasta la zona de detección (4) por gravedad a través de la zona sin capilares (14). La zona sin capilares (14) del dispositivo para su uso en la invención proporciona una zona de mezclado, permitiendo de este modo el correcto y rápido mezclado del reactivo, dando como resultado una precisión y consistencia del ensayo mejoradas. Los ensayos que usan dispositivos para su uso en la invención pueden realizarse con rapidez incluso aunque la muestra sea viscosa. Esto contrasta con los ensayos convencionales que requieren mucho más tiempo para su realización. Debido a dicha zona sin capilares (14) el dispositivo puede usarse solamente en una posición vertical.

30 **[0032]** En referencia a las figuras 1, 2, 3 y 4 de los dibujos, se muestran realizaciones particulares de los dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad para su uso en la presente invención en (1). El dispositivo (1) para su uso en la invención es un dispositivo similar a una lámina, por ejemplo de una forma sustancialmente rectangular, en particular una tira, que incluye un soporte sustancialmente plano, flexible, rígido o semi-rígido (18) que comprende en uno o más de sus lados una zona de aplicación de la muestra (2), una zona intermedia opcional (6), una zona de detección (4), y opcionalmente una zona absorbente (5), en el que la zona intermedia (6), la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en contacto entre sí. De acuerdo con una realización de la presente invención, una zona sin capilares (14) separa la zona intermedia (6) de la zona de aplicación de la muestra (2). La zona (2) está separada de la zona (6), (4) y (5) por la zona sin capilares (14). Las zonas en el soporte sólido están provistas a lo largo del eje longitudinal de la tira, cercanas entre sí. La figura 4a ilustra el dispositivo de acuerdo con una realización particular de la invención sin zona intermedia (6). En la figura 4a el dispositivo comprende, en uno o más lados de un soporte rígido o semi-rígido (18), una zona de aplicación de la muestra (2), una zona de detección (4), y opcionalmente una zona absorbente (5), en el que la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en comunicación fluida por capilaridad entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) está provista en un extremo del soporte sólido y está separada de la zona de detección (4) (Figura 4a) o la zona intermedia opcional (6) (figura 4a1) por una zona (14) libre de cualquier material con capilares.

35 **[0033]** En una realización, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una zona reactiva (3). En una realización particular, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una o varias membranas absorbentes (12) denominadas en este documento como “primera membrana absorbente (12)” y un área o almohadilla para el conjugado (13) en la zona reactiva (3). Como se usa en este documento “área para el conjugado (13)” o “almohadilla para el conjugado (13)” pueden usarse de forma intercambiable. La zona de aplicación de la muestra (2) puede comprender varios conjugados específicos de analito en la primera zona reactiva (3) que comprende el área o almohadilla para el conjugado (13), con marca directa o indirecta que permite la detección de dichos analitos o análogos de los mismos. La zona de aplicación de la muestra (2) comprende al menos un conjugado específico de analito.

[0034] En una realización alternativa, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una membrana absorbente (12) y la zona intermedia (6) puede comprender una zona reactiva que comprende un área o almohadilla para el conjugado. La zona intermedia (6) puede comprender varios conjugados específicos de analito en la zona reactiva que comprende el área o almohadilla para el conjugado, con marca directa o indirecta que permite la detección de dichos analitos o análogos de los mismos.

[0035] En una realización alternativa más, dicha zona de aplicación de la muestra (2) y/o la zona intermedia (6) comprenden zonas reactivas, comprendiendo dichas zonas reactivas áreas o almohadillas para el conjugado que comprenden uno o más conjugados específicos de analito con marca directa o indirecta que permite la detección de dichos analitos o análogos de los mismos.

[0036] En una realización, dicha zona de aplicación de la muestra (2) puede comprender además un conjugado de control también denominado como "conjugado de control de la migración". El conjugado y/o conjugado de control de la migración específico comprende una marca seleccionada entre el grupo que comprende, aunque sin limitación, coloides metálicos conjugados, microesferas de poliestireno conjugadas, nanotubos y micro- o nanopartículas de carbono con un color particular, nanotubos fluorescentes y micro- o nanopartículas fluorescentes de carbono. En una realización, El conjugado y/o conjugado de control de la migración específico comprende partículas de oro y/o microesferas de poliestireno y/o nanotubos de carbono como marca directa y da como resultado la aparición de señales de control y de ensayo.

[0037] En una realización, la zona intermedia (6) comprende una o varias membranas absorbentes (15) denominadas en este documento como "segunda membrana absorbente (15)" y puede portar uno o más conjugados específicos y/o de control.

[0038] En una realización, la zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) hecha de nitrocelulosa u otra matriz capaz de quedar recubierta por reactivos que interactúan con otros reactivos situados en la zona de aplicación o presentes en la muestra a ensayar. Preferiblemente, la zona de detección (4) comprende, por ejemplo, nitrocelulosa como membrana activa (16). En una realización, dicha zona de detección (4) puede tener una subzona de control. La zona de detección puede comprender varios reactivos de captura (7, 7') que reconocen específicamente analitos y análogos de los mismos a detectar en la muestra de ensayo o solamente el conjugado de control situado en el área o almohadilla para el conjugado (13). Los reactivos de captura (7, 7') pueden estar recubriendo diferentes niveles de la zona de detección (4). Los reactivos de captura pueden ser reactivos de captura específicos de analito (7) o reactivos de captura de control (referencia) (7'). En una realización de la presente invención, la zona de detección (4) comprende al menos una línea de ensayo de control con al menos un reactivo de captura de control (7') que reconoce específicamente el conjugado de control en la zona de aplicación (2) o en la zona intermedia (6).

[0039] En una realización de la presente invención, el conjugado específico de analito y/o el conjugado de control comprenden una marca seleccionada entre el grupo que comprende, aunque sin limitarse a, coloides metálicos conjugados, microesferas de poliestireno conjugadas, nanotubos de carbono, micropartículas con un color particular y micropartículas fluorescentes, preferiblemente una marca directa o indirecta seleccionada entre partículas de oro y microesferas de poliestireno.

[0040] En una realización la zona absorbente (5) comprende una membrana absorbente (17) denominada en este documento como "tercera membrana absorbente (17)"

[0041] De acuerdo con la presente invención, una zona sin capilares (14) mantiene separada a la zona de aplicación de la muestra (2) de la zona de detección (4) o de la segunda membrana absorbente (15) de la zona intermedia (6), si está presente. Dicha zona sin capilares actúa como una zona de mezclado que da como resultado una precisión y consistencia de ensayo mejoradas cuando el dispositivo está en uso. Además, la zona sin capilares permite la migración rápida de la muestra por todo el dispositivo, ya que no hay limitaciones de capilaridad a la migración de dicha muestra. Además se evita el atasco.

[0042] Opcionalmente, el dispositivo para su uso en la invención puede estar alojado dentro de una carcasa, permitiendo dicha carcasa que al menos parte de la zona de aplicación de la muestra esté en comunicación con el exterior de dicha carcasa de modo que una muestra pueda aplicarse a dicho dispositivo, comprendiendo además dicha carcasa una ventana yuxtapuesta sobre al menos una parte de dicho dispositivo, estando la zona de detección de la muestra situada en dicha parte en comunicación visual con el exterior de la carcasa.

[0043] Opcionalmente, el dispositivo para su uso en la invención puede estar incluido en un sistema similar a una carcasa hecho de polímeros específicos de modo que una muestra pueda aplicarse a dicho dispositivo. Una ventana puede estar yuxtapuesta sobre al menos una parte de dicho dispositivo es decir, estando la zona de detección de la muestra situada en dicha parte en comunicación visual con el exterior de la inclusión polimérica.

[0044] Las figuras 1 y 4a3 y 2a muestran particularmente diferentes realizaciones en las que el dispositivo (1) está incluido en una cubierta o carcasa hueca o moldeada térmicamente (11). Típicamente, dicha carcasa (11)

comprende una construcción de cubierta hueca, y está hecha de un material sólido impermeable a la humedad tal como un material plástico adecuado, por ejemplo. Permitiendo la carcasa (11) que al menos parte de la zona de aplicación de la muestra (2) esté en comunicación directa con el exterior de dicha carcasa (11), de modo que dicha muestra pueda aplicarse a dicho dispositivo (1) a través de el área de recepción de la cubierta (10).

[0045] La carcasa (11) comprende además una ventana yuxtapuesta sobre al menos una parte del dispositivo (1) de modo que al menos la zona de detección (4) comprendida en dicho dispositivo (1) esté en comunicación visual con el exterior de la carcasa (11). Dicha ventana puede ser de cualquier forma adecuada para permitir una visión clara de al menos la zona de detección (4). En una realización, dicha ventana puede ser de forma rectangular, que tiene preferiblemente una anchura ligeramente menor que la del dispositivo (1).

[0046] Las figuras 2b, 4a, 4a1, 4a2 y 3 muestran diferentes realizaciones de la presente invención, en las que el dispositivo (1) es sin cubierta hueca (11). Las figuras 2b, 4a2 y 3 ilustran un dispositivo (1) de acuerdo con realizaciones de la invención en las que una pegatina (20) puede cubrir la zona de aplicación de la muestra (2), la zona sin capilares (14) (para formar un espacio en el que la muestra pueda moverse libremente por gravedad), y la zona intermedia (6) y se solapa parcialmente con la zona de detección (4). Una segunda pegatina (21) también puede cubrir la zona absorbente (5). Las pegatinas (20, 21) pueden usarse para obligar al líquido a que se mueva al interior de las diferentes membranas (12, 13, 15, 16, 17), sin escapar de la superficie de la tira. En una realización alternativa, el dispositivo (1) descrito en la figura 2b y 3 pueden quedar enrollado por una pegatina o dentro de un tubo de plástico moldeado térmicamente o incluido en un polímero específico para evitar cualquier fuga de líquidos en los lados de la tira. Las figuras 4a y 4a1 muestran un dispositivo (1) de acuerdo con realizaciones de la presente invención sin cubierta hueca y sin pegatinas.

[0047] En referencia a la figura 1, se ilustra un dispositivo (1) de acuerdo con una realización de la invención que comprende un soporte (18) que comprende en uno de sus lados una zona de aplicación de la muestra (2), una zona sin capilares (14), una zona intermedia (6), una zona de detección (4), y una zona absorbente (5), en el que la zona intermedia (6), la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en contacto entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) está separada de la zona intermedia (6) por la zona sin capilares (14). Las zonas en el soporte sólido están provistas a lo largo del eje longitudinal de la tira, cercanas entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) comprende una zona reactiva (3) situada en un extremo de dicha zona de aplicación de la muestra (2). En particular, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una primera membrana absorbente (12) y un área o almohadilla para el conjugado (13) en la zona reactiva (3) de dicha zona de aplicación de la muestra (2). La zona intermedia (6) comprende una segunda membrana absorbente (15). En una realización, dicho área o almohadilla para el conjugado (13) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En otra realización, dicha segunda membrana absorbente (15) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En una tercera realización, tanto dicha almohadilla para el conjugado (13) como dicha segunda membrana absorbente (15) portan uno o más conjugados específicos y/o de control. La zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) que comprende un reactivo de captura específico de analito (7) y un reactivo de captura de control (referencia) (7'). La zona absorbente (5) comprende la membrana absorbente (17). El dispositivo (1) está alojado dentro de una carcasa (11) que permite que al menos parte de la primera membrana absorbente (12) esté en comunicación directa con el exterior de dicha carcasa (11) de modo que una muestra pueda aplicarse a dicho dispositivo (1) a través del área de recepción de la cubierta (10).

[0048] En referencia a la figura 2a, se ilustra un dispositivo (1) de acuerdo con otra realización de la invención que comprende: un soporte (18) que comprende en uno de sus lados, desde un extremo del dispositivo al otro extremo del dispositivo, una primera membrana absorbente (12) provista a ambos lados de un área o almohadilla para el conjugado (13), una zona sin capilares (14), una segunda membrana absorbente (15), una membrana activa (16) que comprende un reactivo de captura específico de analito (7) y un reactivo de captura de control (referencia) (7') y una tercera membrana absorbente (17). La segunda membrana absorbente (15), la membrana activa (16) y la tercera membrana absorbente (17) están en contacto entre sí. La primera membrana absorbente (12) está separada de la segunda membrana absorbente (15) por la zona sin capilares (14). Las membranas y almohadillas en el soporte sólido están provistas a lo largo del eje longitudinal de la tira, cercanas entre sí. En una realización, dicho área o almohadilla para el conjugado (13) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En otra realización, dicha segunda membrana absorbente (15) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En una tercera realización, tanto dicho área o almohadilla para el conjugado (13) como dicha segunda membrana absorbente (15) portan uno o más conjugados específicos y/o de control. El dispositivo (1) está alojado dentro de una carcasa (11) que permite que al menos parte de la primera membrana absorbente (12) esté en comunicación directa con el exterior de dicha carcasa (11) de modo que una muestra pueda aplicarse a dicho dispositivo (1) a través del área de recepción de la cubierta (10).

[0049] En referencia a la figura 2b, se ilustra un dispositivo (1) de acuerdo con otra realización más de la invención que comprende un soporte (18) que comprende en uno de sus lados una zona reactiva (3), una zona sin capilares (14), una zona intermedia (6), una zona de detección (4) y una zona absorbente (5), en el que la zona intermedia (6), la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en contacto entre sí. La zona reactiva (3) está separada de la zona intermedia (6) por la zona sin capilares (14). Las zonas en el soporte sólido están provistas a lo largo del eje

longitudinal de la tira, cercanas entre sí. La zona reactiva (3) comprende un área o almohadilla para el conjugado (13). La zona intermedia (6) comprende una segunda membrana absorbente (15). En una realización, dicho área o almohadilla para el conjugado (13) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En otra realización, dicha segunda membrana absorbente (15) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En una tercera realización, tanto dicho área o almohadilla para el conjugado (13) como dicha segunda membrana absorbente (15) portan uno o más conjugados específicos y/o de control. La zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) que comprende un reactivo de captura específico de analito (7) y un reactivo de captura de control (referencia) (7'). La zona absorbente (5) comprende una membrana absorbente (17). Una pegatina (20) cubre la zona reactiva (3), la zona sin capilares (14) y la zona intermedia (6) y se solapa parcialmente con la zona de detección (4). Una segunda pegatina (21) cubre la zona absorbente (5).

[0050] En referencia a la figura 3, se ilustra un dispositivo (1) de acuerdo con una realización adicional de la invención. Dicho dispositivo (1) comprende un soporte (18) que comprende en uno de sus lados una zona de aplicación de la muestra (2), una zona sin capilares (14), una zona intermedia (6), una zona de detección (4) y una zona absorbente (5), en el que la zona intermedia (6), la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en contacto entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) está separada de la zona intermedia (6) por la zona sin capilares (14). Las zonas en el soporte sólido están provistas a lo largo del eje longitudinal de la tira, cercanas entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) comprende una zona reactiva (3) situada en un extremo de dicha zona de aplicación de la muestra (2). En particular, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una primera membrana absorbente (12) y un área o almohadilla para el conjugado (13) en la zona reactiva (3) de dicha zona de aplicación de la muestra (2). La zona intermedia (6) comprende una segunda membrana absorbente (15). En una realización, dicho área o almohadilla para el conjugado (13) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En otra realización, dicha segunda membrana absorbente (15) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En una tercera realización, tanto dicho área o almohadilla para el conjugado (13) como dicha segunda membrana absorbente (15) portan uno o más conjugados específicos y/o de control. La zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) que comprende un reactivo de captura específico de analito (7) y un reactivo de captura de control (referencia) (7'). La zona absorbente (5) comprende una membrana absorbente (17). Una pegatina (20) cubre la zona reactiva (3), la zona sin capilares (14) y la zona intermedia (6) y se solapa parcialmente con la zona de detección (4). Una segunda pegatina (21) cubre la zona absorbente (5).

[0051] La figura 4a ilustra un dispositivo (1) de acuerdo con una realización particular de la invención sin zona intermedia (6) y sin cubierta hueca ni pegatinas. En la figura 4a, el dispositivo (1) comprende un soporte (18) sobre el que está provista una zona de aplicación de la muestra (2), una zona sin capilares (14), una zona de detección (4), y una zona absorbente (5), en el que la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en contacto entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) está separada de la zona de detección (4) por la zona sin capilares (14). Las zonas sobre el soporte sólido están provistas a lo largo del eje longitudinal de la tira, cercanas entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) comprende una zona reactiva (3) situada en un extremo de dicha zona de aplicación de la muestra (2). En particular, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una primera membrana absorbente (12) y un área o almohadilla para el conjugado (13) en la zona reactiva (3) de dicha zona de aplicación de la muestra (2). Dicho área o almohadilla para el conjugado (13) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. La zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) que comprende un reactivo de captura específico de analito (7) y un reactivo de captura de control (referencia) (7'). La zona absorbente (5) comprende una membrana absorbente (17).

[0052] La figura 4a1 ilustra un dispositivo (1) de acuerdo con una realización particular de la invención sin cubierta hueca ni pegatinas. En la figura 4a1, el dispositivo (1) comprende un soporte (18) sobre el que está provisto una zona de aplicación de la muestra (2), una zona sin capilares (14), una zona intermedia (6), una zona de detección (4) y una zona absorbente (5), en el que la zona intermedia (6), la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en contacto entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) está separada de la zona intermedia (6) por la zona sin capilares (14). Las zonas en el soporte sólido están provistas a lo largo del eje longitudinal de la tira, cercanas entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) comprende una zona reactiva (3) situada en un extremo de dicha zona de aplicación de la muestra (2). En particular, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una primera membrana absorbente (12) y un área o almohadilla para el conjugado (13) en la zona reactiva (3) de dicha zona de aplicación de la muestra (2). La zona intermedia (6) comprende una segunda membrana absorbente (15). En una realización, dicho área o almohadilla para el conjugado (13) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En otra realización, dicha segunda membrana absorbente (15) porta uno o más conjugados específicos y/o de control. En una tercera realización, tanto dicha almohadilla para el conjugado (13) como dicha segunda membrana absorbente (15) portan uno o más conjugados específicos y/o de control. La zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) que comprende un reactivo de captura específico de analito (7) y un reactivo de captura de control (referencia) (7'). La zona absorbente (5) comprende una membrana absorbente (17).

[0053] La figura 4a2 ilustra un dispositivo (1) de acuerdo con una realización particular de la invención para realizar múltiples ensayos. El dispositivo (1) comprende un soporte (18) sobre el que está provista una zona de aplicación de la muestra (2), una zona sin capilares (14), una zona intermedia (6), una zona de detección (4) y una zona absorbente (5), en el que la zona intermedia (6), la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en contacto

entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) está separada de la zona intermedia (6) por la zona sin capilares (14). Las zonas en el soporte sólido están provistas a lo largo del eje longitudinal de la tira, cercanas entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) comprende una zona reactiva (3) situada en un extremo de dicha zona de aplicación de la muestra (2). En particular, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una primera membrana absorbente (12) y un área o almohadilla para el conjugado (13) en la zona reactiva (3) de dicha zona de aplicación de la muestra (2). La zona intermedia (6) comprende una segunda membrana absorbente (15). En una realización, dicho área o almohadilla para el conjugado (13) porta dos o más conjugados específicos y/o de control. En otra realización, dicha segunda membrana absorbente (15) porta dos o más conjugados específicos y/o de control. En una tercera realización, tanto dicho área o almohadilla para el conjugado (13) como dicha segunda membrana absorbente (15) portan dos o más conjugados específicos y/o de control. La zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) que comprende al menos dos reactivos de captura específicos de analito (71, 72) y un reactivo de captura de control (referencia) (7'). La zona absorbente (5) comprende una membrana absorbente (17). Una pegatina (20) cubre la zona reactiva (3), la zona sin capilares (4) y la zona intermedia (6) y se solapa parcialmente con la zona de detección (4). Una segunda pegatina (21) cubre la zona absorbente (5).

[0054] La figura 4a3 ilustra un dispositivo (1) de acuerdo con una realización particular de la invención para realizar múltiples ensayos. El dispositivo (1) comprende un soporte (18) sobre el que está provista una zona de aplicación de la muestra (2), una zona sin capilares (14), una zona intermedia (6), una zona de detección (4) y una zona absorbente (5), en el que la zona intermedia (6), la zona de detección (4) y la zona absorbente (5) están en contacto entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) está separada de la zona intermedia (6) por la zona sin capilares (14). Las zonas en el soporte sólido están provistas a lo largo del eje longitudinal de la tira, cercanas entre sí. La zona de aplicación de la muestra (2) comprende una zona reactiva (3) situada en un extremo de dicha zona de aplicación de la muestra (2). En particular, la zona de aplicación de la muestra (2) comprende una primera membrana absorbente (12) y un área o almohadilla para el conjugado (13) en la zona reactiva (3) de dicha zona de aplicación de la muestra (2). La zona intermedia (6) comprende una segunda membrana absorbente (15). En una realización, dicho área o almohadilla para el conjugado (13) porta tres o más conjugados específicos y/o de control. En otra realización, dicha segunda membrana absorbente (15) porta al menos tres conjugados específicos y/o de control. En una tercera realización, tanto dicho área o almohadilla para el conjugado (13) como dicha segunda membrana absorbente (15) portan tres o más conjugados específicos y/o de control. La zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) que comprende tres reactivos de captura específicos de analito (71, 72, 73) y un reactivo de captura de control (referencia) (7'). La zona absorbente (5) comprende una membrana absorbente (17). El dispositivo (1) está alojado dentro de una carcasa (11) que permite que al menos parte de la primera membrana absorbente (12) esté en comunicación directa con el exterior de dicha carcasa (11) de modo que una muestra pueda aplicarse a dicho dispositivo (1) a través del área de recepción de la cubierta (10).

[0055] El dispositivo para su uso en el método de la invención preferiblemente es un dispositivo de ensayo que funciona por inmunogravedad. En una realización de la presente invención, las figuras 4b a 4e ilustran esquemáticamente la manera en la que los resultados pueden indicarse en dicho dispositivo (1) es decir: la figura 4b muestra el dispositivo (1) antes del ensayo en el que la zona de detección de la muestra comprende un reactivo de captura específico de analito (7) y un reactivo de captura de control (referencia) (7'). La figura 4c muestra un resultado positivo en el que se forman complejos entre los conjugados específicos de analito y los analitos detectados, y una línea coloreada (8) se genera de este modo en la zona de detección de la muestra donde el reactivo de captura (7) reconoce específicamente los complejos. La reacción entre el reactivo de captura de control (7') y el conjugado de referencia da origen a una línea de control (9). La figura 4d muestra un resultado negativo, en el que no hay analitos detectados y, por lo tanto, sin línea coloreada (8) y la reacción entre el reactivo de captura de control (7') y el conjugado de referencia da origen a una línea de control (9). La figura 4e muestra un resultado no válido, en el que no hay reacción entre el reactivo de captura de control (7') y el conjugado de referencia y, por lo tanto, no hay línea de control (9).

[0056] En una realización preferida, cuando el dispositivo está en uso, en caso de una reacción positiva, es decir en el caso en que se forman uno o más complejos entre los conjugados específicos de analito y los analitos a detectar, se genera una señal específica en la zona de detección (4) donde se deposita el reactivo de captura (7). El reactivo de captura (7) reconoce específicamente los complejos para generar una línea coloreada (8). En una realización preferida, la reacción entre el reactivo de captura de control (7') y el conjugado de referencia da origen a una línea de control (9) visible en la zona de detección (4).

[0057] Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con una realización de la invención, la zona de detección (4) del dispositivo (1) puede sensibilizarse con uno o más reactivos de ensayo (reactivos de captura específicos de analito) (7) y con reactivos de captura de control de la migración (reactivos de captura de control) (7'). El reactivo de ensayo (7) está orientado a la detección directa o indirecta del analito a detectar en la muestra, y el reactivo de captura de control de la migración (7') está dirigido contra un anticuerpo anti-analito que está acoplado a una marca directa, o contra un conjugado específico no relevante para los analitos a detectar.

[0058] Los reactivos de captura (7, 7') y los reactivos conjugados son preferiblemente inmunorreactivos, oligonucleótidos, moléculas de ligando o receptor o análogos de los mismos. Los reactivos de captura (7, 7') y los

reactivos conjugados pueden seleccionarse entre el grupo que comprende oligonucleótidos o análogos de los mismos, anticuerpos policlonales o monoclonales o fragmentos de anticuerpo hipervariables, o un antígeno reconocido por compuestos serológicos tales como IgG, IgA, IgE e IgM o uno de los reactivos específicos de pares (ligando-receptor) como biotina-estreptavidina, y similares.

[0059] La marca de detección es preferiblemente una marca particulada directa, en particular una marca directa seleccionada entre el grupo que comprende coloides metálicos conjugados, microesferas de poliestireno conjugadas, micro- o nanopartículas o nanotubos con un color particular, y micro- o nanopartículas fluorescentes o nanotubos fluorescentes.

[0060] La presente invención se refiere en particular a un método de detección de analitos que usa un dispositivo de ensayo que funciona por gravedad (1) compuesto por sustancias poliméricas laminadas sobre un soporte sólido rígido o semi-rígido (18) hecho de polímero. En una realización particular, el soporte sólido rígido (18) es un refuerzo de plástico tal como un plástico. Los dispositivos permiten ventajosamente la detección de diferentes analitos y análogos de los mismos, que podrían reaccionar de forma diferente en la membrana activa (16).

[0061] En una realización particular, las membranas de la zona de aplicación de la muestra (2) están hechas de fibras de vidrio con la primera zona reactiva (3) hecha de poliéster u otra matriz. En una realización particular, la membrana de la zona de detección (4) está hecha de nitrocelulosa, la membrana de la zona intermedia (6) está hecha de fibras de vidrio, poliéster o celulosa y la membrana de las zonas absorbentes (5) está hecha de celulosa. La zona de aplicación de la muestra (2) y la primera zona reactiva (3) pueden estar hechas del mismo material. Como alternativa, los conjugados pueden estar impregnados directamente sobre la zona de aplicación de la muestra (2).

[0062] El dispositivo (1) para su uso en la invención es altamente adecuado para la detección de varios analitos y análogos de los mismos potencialmente presentes en una muestra de ensayo tales como una solución o muestra biológica. Los analitos y análogos de los mismos pueden obtenerse de o pueden ser producidos por microorganismos (dañinos) tales como, aunque sin limitarse a, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *C. difficile*, toxinas de *C. difficile*, *E. coli*, *E. histolytica*, VRS (Virus Respiratorio Sincitial), virus de la gripe A y B, rotavirus, adenovirus de tipos 40 y 41 u otros grupos de adenovirus, antígeno urinario de *Legionella pneumophila*, coronavirus de origen humano y animal y metapneumovirus humanos.

[0063] En una realización preferida de la invención, más de un analito o análogo del mismo se detecta con un dispositivo para su uso en la invención. El dispositivo de ensayo que funciona por gravedad (1) para su uso en la presente invención es altamente adecuado para la detección múltiple. Por ejemplo, es posible detectar la presencia de gripe A y gripe B o adenovirus y VRS en el mismo dispositivo. La detección de rotavirus y adenovirus entéricos o la detección de *C. parvum*, toxinas de *C. difficile*, *G. lamblia* y *E. histolytica* son otros ejemplos.

[0064] El dispositivo de ensayo que funciona por inmunogravedad similar a una lámina (1) para su uso en la invención comprende en un soporte sólido rígido o semi-rígido (18): una zona de aplicación de la muestra (2) opcionalmente con un área o almohadilla para el conjugado (13), una zona sin capilares (14), una zona intermedia opcional (6) y una zona de detección (4) posiblemente con una subzona de control, y opcionalmente una zona absorbente (5). La zona de detección (4) del dispositivo (1) se sensibiliza con un reactivo de ensayo (7). Ésta también se sensibiliza con un anticuerpo de control (7'). La zona sin capilares (14) evita cualquier contacto directo y por capilaridad entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de detección de la muestra, contacto por capilaridad que se observa habitualmente y se describe en dispositivos de la técnica anterior.

[0065] Preferiblemente, los conjugados se secan en la parte inferior de la zona de aplicación de la muestra en la primera zona reactiva (3).

[0066] En una realización particular, se usan anticuerpos en la zona de detección (4). Preferiblemente, el anticuerpo o anticuerpos de control, en particular los anticuerpos de control de la migración (7'), se extienden sobre una región de control de la zona de detección (4), estando dicha región de control situada por debajo de una región de ensayo en la que un anticuerpo de ensayo, en particular un anticuerpo específico de analito. Como se ha indicado anteriormente, los conjugados de ensayo y de control pueden ser reactivos tales como oligonucleótidos o análogos de los mismos o anticuerpos policlonales o monoclonales tales como fragmentos de anticuerpo hipervariables o tales como un antígeno reconocido por compuestos serológicos tales como IgG, IgA, IgE e IgM o uno de los reactivos específicos de pares como biotina-estreptavidina. La marca de los conjugados de ensayo o específicos y de los conjugados de control puede ser una marca directa, en particular una marca directa que se selecciona entre el grupo constituido por coloides metálicos conjugados, partículas de poliestireno conjugadas y micro- o nanopartículas o nanotubos que tiene un color particular específico o que son fluorescentes. Ventajosamente, los conjugados de control presentes en el dispositivo (1) de la presente invención no interfieren en la detección de los analitos y análogos de los mismos que se sospecha que están presentes. Los controles ventajosamente generan una señal con intensidad constante que es independiente de la señal específica. Dichos controles pueden permitir cuantificar o semi-cuantificar los analitos o análogos de los mismos detectados.

5 **[0067]** Un dispositivo de ensayo que funciona por gravedad similar a una lámina (1) para su uso en la invención es fácil de usar y de manejar y es altamente flexible en su uso. El dispositivo de ensayo que funciona por gravedad (1) para su uso en el método de la invención permite, por ejemplo, el uso de diferentes tipos de partículas y/o diferentes tipos de muestra y/o almohadillas para el conjugado en el mismo dispositivo (1). La presente invención proporciona, por lo tanto, métodos que usan dispositivos (1) que son fáciles de manejar y que permiten una detección y/o un diagnóstico rápido aunque preciso de múltiples analitos en una muestra de ensayo (detección múltiple).

10 **[0068]** Una realización particular de la invención se refiere a un método de detección de analitos que usa un dispositivo de ensayo que funciona por gravedad (1) en el que puede seleccionarse una porosidad de la membrana activa (16) de 8, 10, 12, 15 μm , etc.

15 **[0069]** En otra realización de la presente invención, la membrana activa (16) está hecha de diferentes materiales, con porosidades similares o diferentes. Por ejemplo, la membrana activa puede estar compuesta por nitrocelulosa o por PredatorTM (Pall) o por membrana Porex. El especialista en la técnica está al tanto de otras posibilidades. Las posibles membranas activas (16) para su uso en la zona de detección (4) incluyen aunque no están restringidas a: celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio, nylon, copolímero acrílico/nylon, poliétersulfona, polietileno y poliéster.

20 **[0070]** Los presentes métodos pueden usarse para comprobar la presencia de analitos y análogos de los mismos. La detección puede realizarse a simple vista y/o automáticamente con ayuda de un lector de tiras y programas informáticos específicos para la detección y/o la cuantificación de analitos y análogos de los mismos.

25 **[0071]** Una realización particular de la invención se refiere a un método como se ha descrito anteriormente en el que el desarrollo o no de una señal (por ejemplo una señal coloreada) en la posición de la inmovilización del reactivo de ensayo o de captura específico de analito (7), tal como un anticuerpo de ensayo o específico de analito, indica la presencia o la ausencia de un analito o análogo del mismo. Ventajosamente, el desarrollo de una señal (por ejemplo una señal coloreada) en la posición de la inmovilización del reactivo de captura de control (7'), tal como un anticuerpo de control de la migración, indica que la muestra se ha movido sobre la membrana activa del dispositivo de ensayo que funciona por (inmuno)gravedad (1) para su uso en la invención.

30 **[0072]** Ventajosamente, el desarrollo de una señal (por ejemplo una señal coloreada) en la posición de la inmovilización del reactivo de control, tal como un anticuerpo de control, indica el correcto uso y el buen estado del dispositivo de ensayo que funciona por (inmuno)gravedad similar a una lámina (1) para su uso en la invención, la calidad de los conjugados secos así como la finalización de la reacción de captura tal como una reacción inmunológica.

35 **[0073]** Ventajosamente, el desarrollo de una señal (por ejemplo una señal coloreada) en la posición de la inmovilización de un reactivo de captura de control (migración y posiblemente reactivo de control de referencia), tal como un anticuerpo de control, es independiente de la presencia o ausencia del analito o análogo del mismo a detectar en la muestra.

40 **[0074]** La presente invención proporciona, por lo tanto, el uso de dispositivos para la detección rápida de un analito o análogo del mismo y su uso en la detección de (múltiples) analitos y análogos de los mismos posiblemente presentes en una muestra de ensayo tal como una muestra biológica. Los dispositivos para su uso en la invención muestran una mejor reactividad que los dispositivos de la técnica anterior. Tener una zona sin capilares y tener una migración que funciona por gravedad, permite el manejo de diversas muestras incluyendo sobrenadantes de cultivo, fluidos biológicos tales como secreciones nasofaríngeas, sangre, suero, orina, semen, saliva o excrementos. En particular el dispositivo para su uso en la invención permite el ensayo de un tipo viscoso de muestras, tales como muestras de heces, suspensiones, coloides y similares sin atascos. El dispositivo en uso permite la migración rápida de la muestra por todo el dispositivo independientemente de la viscosidad o complejidad de la muestra. Los dispositivos preferidos comprenden en uno o más lados de un polímero de soporte (18) una zona de aplicación de la muestra (2), una zona sin capilares (14), una zona intermedia (6), una zona de detección (4) y una zona de absorción (5). La zona de detección (4) puede contener varias subzonas definidas, preferiblemente líneas, dedicada cada una a la detección de uno o más analitos particulares, un grupo de analitos o de productos de analito particulares. Puede estar incluida al menos una zona de control. Los dispositivos para su uso en la invención pueden ser dispositivos similares a una lámina de una pieza o pueden comprender varias partes en contacto entre sí.

50 **[0075]** Los documentos de la técnica anterior tales como EP 0 088 636, EP 0 186 799, EP 0 284 232 y WO 88/08534 se citan con respecto a los principios de dispositivos (inmuno)cromatográficos y la reacción entre los diferentes compuestos tales como analito, conjugado y reactivo de captura tal como un inmunorreactivo. La descripción de estos documentos se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

55 **[0076]** Los dispositivos (1) para su uso en la invención están compuestos por sustancias poliméricas porosas que preferiblemente están laminadas en uno o más lados del polímero rígido o semi-rígido (18) para proporcionar resistencia mecánica, lo que hace a los dispositivos (1) para su uso en la invención fáciles de manejar. La porosidad

de las sustancias poliméricas debe ser tal que el movimiento de un fluido y sus componentes desde la parte superior a la parte inferior de la tira, moviendo junto con el conjugado rehidratado sea posible sin ningún impedimento debido a las fuerzas gravitatorias. Estas características también son permitidas por las propiedades hidrófilas de estos polímeros. Los ejemplos de polímeros adecuados con celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio, nylon, copolímero acrílico/nylon, poliétersulfona, polietileno y poliéster.

[0077] Las expresiones “analitos y análogos de los mismos” o “analitos” se usan de forma intercambiable, y se refieren a moléculas a detectar en muestras biológicas y análogos y derivados de las mismas cuando dichos análogos y derivados se unen a otra molécula usada en el ensayo de una manera sustancialmente equivalente a la del propio analito. Los ejemplos no limitantes de dicha molécula incluyen proteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, péptidos, glucopéptidos, haptenos, polisacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos, partículas virales, partes de microorganismos tales como bacterias, virus, protozoos y parásitos, o compuestos químicos de cualquier origen.

[0078] Los dispositivos (1) para su uso en la invención son útiles en particular para la detección de microorganismos dañinos o compuestos de los mismos en muestras biológicas, incluyendo, aunque sin limitarse a, la detección de ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, quistes de *Giardia lamblia*, VRS (Virus Respiratorio Sincitial), *E. coli*, *C. difficile*, toxinas de *C. difficile*, *E. histolytica*, virus de la gripe A y B, rotavirus, adenovirus de tipos 40 y 41, grupos de adenovirus, antígenos urinarios de *Legionella pneumophila*, coronavirus de origen humano y animal y metapneumovirus humanos. Ventajosamente, el dispositivo puede estar diseñado para permitir la detección de varios de dichos analitos y análogos de los mismos mediante un único ensayo (1) y/o permitir la detección de más de un compuesto dañino producido por un analito dado tal como toxinas similares a Shiga I y II de *E. coli*, y/o permitir la detección de múltiples compuestos serológicos tales como IgG, IgA e IgM generados después de una infección por un patógeno.

[0079] La muestra de ensayo, preferiblemente una muestra de ensayo líquida, de la que se sospecha que contiene un analito o análogo del mismo, puede obtenerse de cualquier muestra biológica, incluyendo aunque sin limitación sobrenadantes de cultivo, secreciones nasofaríngeas, muestras de heces, suero,... Muestras tales como por ejemplo muestras de heces se suspenden preferiblemente antes de la aplicación en una solución que permite la migración del líquido a través del dispositivo (1). Las muestras que pueden ensayarse con el sistema de la presente invención incluyen muestras biológicas tales como sangre, orina, semen, saliva, o excrementos, preferiblemente de un sujeto ser humano. También pueden ensayarse muestras de animales, plantas, alimentos, agua, alcantarillado y suelos.

[0080] Los reactivos marcados específicos que son específicos para los analitos y análogos de los mismos sirven para detectar y/o cuantificar analitos y análogos de los mismos posiblemente presentes en una muestra. Los reactivos marcados específicos (conjugados) formarán individualmente un complejo con analitos y análogos de los mismos individuales, complejos que son capturados a continuación por reactivos específicos de analito (7). Un reactivo marcado puede usarse para reaccionar finalmente con un reactivo de control adsorbido preferiblemente en la segunda región o zona porosa. Los reactivos de captura (7, 7') pueden ser oligonucleótidos o análogos, o anticuerpos policlonales o monoclonales o cualesquiera fragmentos de anticuerpo hipervariables conocidos en la técnica o un antígeno reconocido por compuestos serológicos tales como IgG, IgA, IgE e IgM o uno del reactivo específico de pares como biotina-estreptavidina. Preferiblemente se usan anticuerpos monoclonales o fragmentos hipervariables de los mismos. Algunos reactivos de captura (7, 7') pueden producirse mediante ingeniería genética.

[0081] Los reactivos marcados o agentes de detección se inmovilizan (se impregnan) sobre un material inerte que puede ser fibras de vidrio o poliéster o cualquier otro material física y químicamente inerte y con suficiente porosidad y humectabilidad para permitir el movimiento de partículas y para permitir que los reactivos marcados se rehidraten fácil y completamente cuando una muestra de líquido los alcanza. Cuando la muestra líquida está en contacto con estos agentes de detección rehidratada, los analitos individuales formarán un complejo con su reactivo marcado específico y estos complejos reaccionarán con sus reactivos específicos adsorbidos sobre la zona de detección de la muestra mientras que el agente de control marcado se moverá libremente hasta el reactivo de control adsorbido sobre la zona de control para reaccionar con él.

[0082] En la técnica se conocen diversos sistemas de detección. Las marcas particuladas coloreadas o visibles (directas) conocidas en la técnica incluyen, aunque sin limitación, partículas hechas de polímeros de poliestireno (látex), coloides metálicos tales como oro, carbono, liposomas, plata, cobre,... que pueden conjugarse con el reactivo de unión que normalmente reacciona con los analitos a detectar. Los sistemas de detección para fluorescencia también pueden usarse. La cuantificación y/o semi-cuantificación son posibles.

[0083] La presente invención se refiere a un método para la identificación rápida y específica de varios patógenos de muestras biológicas, o muestras de laboratorio con dispositivo de ensayo que funciona por gravedad similar a una lámina (1).

[0084] En una realización preferida de la invención, los conjugados específicos y de control comprenden marcas visibles (directas) a las que se unen (se conjugan con) reactivos específicos de analitos y análogos de los mismos o reactivos de control. El complejo formado entre los analitos y análogos de los mismos o el reactivo de control y sus

conjugados se moverán por gravedad hasta la zona intermedia (6) antes de encontrar la membrana de la zona de detección (preferiblemente nitrocelulosa) (4) y alcanzar analitos específicos y análogos de los mismos o reactivos de control (7, 7') que la recubren. La reacción entre los complejos y los reactivos (7, 7') para los analitos y análogos de los mismos o el reactivo de control se visualizará, dado que las partículas se acumularán y generarán una señal visible (8, 9). Esta señal permite al usuario identificar específicamente qué analito o análogo del mismo está presente en la muestra analizada y preferiblemente también cuantificar o semi-cuantificar (posiblemente mediante una línea de control (9)) la cantidad del mismo presente en la muestra de ensayo.

[0085] A continuación, se proporcionan más detalles con respecto a aspectos generales y composiciones preferidas y acumulación del dispositivo de ensayo que funciona por gravedad particular para su uso en la presente invención.

[0086] Para realizar el ensayo que funciona por gravedad, el dispositivo (1) de acuerdo con una realización de la invención se divide preferiblemente en cinco zonas, una al lado de otra (yuxtapuestas) longitudinalmente, que incluyen una zona de aplicación de la muestra (2), una zona sin capilares (14), posiblemente una zona intermedia (6), una zona de detección (4) y posiblemente una zona absorbente (5) situada en uno o más lados del dispositivo (1).

[0087] En una realización preferida, las membranas de la zona de aplicación de la muestra (2) están hechas de fibras de vidrio o celulosa con almohadillas para el conjugado (13) hechas de poliéster, las membranas de la zona intermedia (6) están hechas de fibras de vidrio o celulosa y las membranas de la zona de detección (4) están hechas de nitrocelulosa, y las membranas de las zonas absorbentes (5) están hechas de celulosa. En realizaciones particulares, las zonas de aplicación de la muestra (2) y las almohadillas para el conjugado (13) pueden estar hechas de la misma materia o material. Los conjugados también pueden, sin embargo, estar impregnados directamente sobre la zona de aplicación de la muestra (2).

[0088] La primera zona de reacción (3) puede estar total o parcialmente cubierta por la primera membrana absorbente (12). Ambas membranas absorbentes y la almohadilla para el conjugado podrían estar hechas de la misma materia o material. Posiblemente, en este caso, los conjugados podrían pulverizarse directamente sobre el polímero que también se usa para absorber el líquido de la muestra en la primera membrana absorbente (12).

[0089] Las almohadillas para el conjugado están impregnadas con partículas que están recubiertas por algunos compuestos que podrían incluir proteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, péptidos, glucopéptidos, haptenos, polisacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos o análogos (APN, ALN, ...) para formar un conjugado específico de analito. Estos compuestos reaccionarán en algún lugar específicamente con analitos y análogos de los mismos que podrían estar presentes en las muestras a analizar. Los ejemplos de partículas adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a, partículas de oro coloidal; partículas de azufre coloidal; partículas de selenio coloidal; partículas de sulfato de bario coloidal; partículas de sulfato de hierro coloidal; partículas de yoduro metálico; partículas de haluro de plata; plata coloidal, paladio coloidal, platino coloidal, rodio coloidal, partículas de sílice; partículas de óxido metálico (hidroso) coloidal; partículas de sulfuro metálico coloidal; partículas de seleniuro de plomo coloidal; partículas de seleniuro de cadmio coloidal; partículas de fosfato metálico coloidal; partículas de ferrito metálico coloidal; nanotubos de carbono; cualquiera de las partículas coloidales mencionadas anteriormente recubierta con capas orgánicas o inorgánicas; moléculas de proteínas o péptidos; liposomas; micro-partículas coloreadas, nanopartículas coloreadas, micro y nanopartículas fluorescentes o partículas de polímero orgánico de poliestireno. En una realización preferida, las partículas son partículas de oro coloidal o microesferas de poliestireno (látex). Las partículas de oro coloidal podrían ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 nm de diámetro. Preferiblemente, se usan las partículas de aproximadamente 20 nm o aproximadamente 40 nm de diámetro. Podrían usarse microesferas de poliestireno (látex) que han sido activadas con varias funciones químicas tales como un carboxilo, una amina, un hidroxilo y una sulfhidrilo. En una realización preferida, se usan microesferas de poliestireno no activadas y activadas con amina. Preferiblemente, se usan microesferas de aproximadamente 20 nm a 1000 nm y preferiblemente de 150 nm a aproximadamente 350 nm de diámetro.

[0090] Para realizar detecciones multicolor, se usan diferentes esferas coloreadas (por ejemplo rojas para el analito A, azules para el analito B y verdes para la línea de control).

[0091] Las partículas específicas de analito a usar en los dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad similares a una lámina (1) están recubiertas con compuestos que se unen específicamente directa o indirectamente al analito o análogo del mismo a detectar.

[0092] La zona de detección (4) de los dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad similares a una lámina (1) para su uso en la invención podría estar hecha de celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio, nylon, polímero acrílico/nylon, poliétersulfona, polietileno y poliéster pero preferiblemente está hecha de nitrocelulosa de Advanced Microdevices Pvt, Ltd. También pueden usarse membranas de otro proveedor (Schleicher & Schuell o Millipore o Porex o Pall o Whatman).

5 **[0093]** El recubrimiento se realiza preferiblemente diluyendo los reactivos (7, 7') en un tampón apropiado y distribuyéndolos sobre la membrana, preferiblemente nitrocelulosa (16), con un sistema de contacto (por ejemplo IsoFlow de Imagen Technology). La distribución de la velocidad podría variar entre aproximadamente 50 mm y aproximadamente 10 mm/segundo pero está fijada preferiblemente en aproximadamente 40 mm/segundo o aún mejor a aproximadamente 30 mm/segundo. El volumen de material distribuido varía entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3 $\mu\text{l}/\text{cm}$, preferiblemente de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 2 $\mu\text{l}/\text{cm}$ y más precisamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 $\mu\text{l}/\text{cm}$.

10 **[0094]** La concentración de reactivo varía entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/ml y preferiblemente es de aproximadamente 0,15 a 2 mg/ml. En una realización preferida de la invención, el tampón usado para este recubrimiento estaba constituido por una solución salina (NaCl) tamponada con fosfato a aproximadamente pH 7,2.

15 **[0095]** En una realización de la invención, los dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad similares a una lámina (1) de la invención incluyen zonas absorbentes (5) que aspiran solución que ha sido transportada hasta el extremo de la nitrocelulosa (16). Los ejemplos de sustancias incluyen celulosa y fibras de vidrio. Se han usado preferiblemente celulosa (MDI) o fibra de vidrio (Schleicher & Schuell). Los dispositivos de ensayo que funcionan por gravedad similares a una lámina (1) para su uso en la invención, preferiblemente también incluyen subzonas de control (entre otras, control interno y/o control de migración) que contienen preferiblemente al menos una línea de control. El conjugado de control de la migración no debe reaccionar con los conjugados específicos, ni con el propio analito, ni con cualquier cosa que podría estar presente en la muestra a analizar. Preferiblemente la línea de control de la migración se construye de tal manera que su intensidad sea siempre la misma y no depende de la señal específica y su intensidad. El recubrimiento del reactivo de control es como se ha descrito anteriormente. El conjugado de captura de migración se mezcla en la almohadilla para el conjugado con los conjugados específicos, o se impregna en solitario.

25 **[0096]** El dispositivo de ensayo que funciona por gravedad se coloca preferiblemente verticalmente (es decir en una posición erguida) en una base, soporte o un tubo de ensayo vacío.

30 **[0097]** Como se usa en este documento el término "verticalmente" se refiere a una posición sustancialmente erguida. Cuando el dispositivo se coloca verticalmente, la tira a usar en la presente invención puede formar un ángulo que varía entre 45° y 135° desde un plano horizontal, preferiblemente entre 60° y 120°, preferiblemente entre 80° y 100°. La muestra líquida que contiene el analito o análogo del mismo a detectar se sitúa en la parte superior del dispositivo (1) y migra a través de la primera membrana absorbente (12) hasta la almohadilla para el conjugado (13) y rehidrata ambos conjugados, es decir los conjugados específicos de analito o análogo del mismo y el conjugado de control. Si están presentes analitos y análogos de los mismos relacionados, se formarán varios complejos. Estos alcanzarán la zona sin capilares (14) donde se mezclan. Dado que el líquido avanza por gravedad, pasa a través de la segunda membrana absorbente (15) para llegar a través de la membrana activa (16) preferiblemente hecha de nitrocelulosa. Dichos complejos darán origen a líneas o subzonas visibles (por ejemplo roja, azul, verde,...) en caso de reacciones positivas, mientras que el conjugado de control avanza en una dirección para alcanzar y reaccionar con su reactivo recubierto conduciendo a una línea visible coloreada (verde). La señal de control indica, entre otras cosas, que el ensayo se ha realizado apropiadamente, apareciendo también en ausencia de una reacción específica. La señal de control puede servir además como una referencia cuantitativa. Las señales específicas y de control pueden ser del mismo o de un color diferente. El tamaño de las partículas de los conjugados de control y de los conjugados específicos puede ser el mismo o puede ser diferente. En una realización particular de acuerdo con esta invención, ambos conjugados (de control y específicos), preferiblemente conjugados de oro, se impregnan sobre una membrana inerte sólida que podría ser poliéster o nylon. Se prefiere el poliéster. Las membranas de poliéster usadas en este caso tienen un tamaño de 27 x 260 mm y son de Advanced Microdevices Pvt, Ltd (India). Las membranas están impregnadas preferiblemente con los conjugados de oro después de una etapa de dilución en un tampón específico para proporcionar una rehidratación óptima con la muestra líquida cuando el ensayo se está realizando. Las membranas AccuFlow G de Schleicher & Schuell también son útiles para este fin y proporcionan la ventaja de que los conjugados son pulverizados directamente sobre la membrana absorbente.

55 **[0098]** En otra realización particular de acuerdo con esta invención, ambos conjugados (de control y específicos), preferiblemente microesferas coloreadas de poliestireno, se impregnan en una membrana inerte sólida que podría ser de poliéster o fibras de vidrio. Se prefieren las fibras de vidrio. Las membranas de fibras de vidrio usadas en este caso tienen un tamaño de 27 x 260 mm y son de Whatman.

60 **[0099]** Cuando se usan las membranas de poliéster de Advanced Microdevices Pvt, las membranas se impregnan sumergiéndolas en un vial apropiado con un volumen finito que es de 1,6 ml pero que podría reducirse a 1,3 ml dependiendo del sistema de impregnación usado. Las membranas se dejan secar a temperatura ambiente durante una noche. A continuación se secan en un horno a aproximadamente 55°C durante aproximadamente 20 minutos. Después del secado, esas membranas se almacenan en cajas específicas con desecantes a un máximo del 10% de humedad relativa. Las membranas (denominadas como almohadilla para el conjugado (13)) se cortan en piezas de 65 aproximadamente 5 mm de anchura y se pegan en las primeras partes adhesivas de los laminados como se indica

en las figuras 1, 2 y 3. La ubicación de estas membranas es importante para alcanzar la detectabilidad máxima esperada para fines específicos. Papeles absorbentes hechos de fibras de vidrio, o cualquier otra materia absorbente, se pegan a continuación sobre las partes adhesivas superiores de la tira siempre que estén en contacto por solapamiento, o borde sobre borde con la membrana de poliéster que contiene los conjugados para permitir que el líquido rehidrate los conjugados y dejarles reaccionar con los analitos y análogos de los mismos presentes en la muestra.

[0100] Cuando se usan membrana AccuFlow G o Standard 14 o membrana 8964 (Alströhm), los conjugados se pulverizan con el sistema IsoFlow Atomizing Nozzle de Imagen Technology. En este caso, los conjugados se pulverizan a una velocidad de 50 mm/segundo para cantidades pulverizadas que varían entre 0,8 µl/mm y 3,0 µl/mm con una presión que varía entre 1 y 20 psi. Se deja secar a las membranas a temperatura ambiente durante una noche. A continuación se secan en un horno a aproximadamente 55°C durante aproximadamente 10 minutos. Después del secado, esas membranas se almacenan en cajas específicas con desecantes a un máximo del 10% de humedad relativa. Las membranas (denominadas como almohadilla para el conjugado (13)) se cortan en piezas de aproximadamente 5 a 10 mm de anchura o no se cortan y se pegan en las partes adhesivas superiores de los laminados como se indica en las figuras 1, 2 y 3. La ubicación de estas membranas es importante para alcanzar la máxima detectabilidad esperada con fines específicos. Papeles absorbentes (Fusion 5 de Whatman) hechos de fibra de vidrio, o cualquier otra materia absorbente, se pegan a continuación sobre las partes adhesivas superiores de la tira siempre que estén en contacto borde con borde o cubriendo parcial o completamente a la membrana que contiene los conjugados para permitir que el líquido rehidrate los conjugados y dejarles reaccionar con los analitos y análogos de los mismos presentes en la muestra.

[0101] Algunos ensayos requieren que se realice una cuantificación para saber si la concentración de, por ejemplo, el antígeno o si la respuesta serológica a, por ejemplo, un antígeno a detectar es mayor o menor que un nivel límite definido. Esto puede realizarse comparando la intensidad de una línea de ensayo (línea específica (8)) con la de una o varias líneas de control (9) de intensidades constantes o progresivas. La escala de referencia que se obtiene como tal está constituida por varias líneas de diferentes intensidades entre ellas, pero constante y reproducible para cada una de ellas. Cada conjugado se seca por la presente preferiblemente a una concentración predefinida para obtener una intensidad constante. La intensidad de la señal de la línea de ensayo será proporcional a la concentración de, por ejemplo, el antígeno al menos en un intervalo predefinido deseado de concentraciones incluyendo el nivel límite.

[0102] La presente memoria descriptiva también describe kits que incorporan el dispositivo para su uso en la invención, envase que incorpora dicho dispositivo, carcasas unitarias, bases y medios para soportar a dicho dispositivo. Dichos medios de soporte, también denominados como un miembro de soporte, se refieren a un material que puede actuar para mantener al dispositivo de ensayo que funciona por gravedad de acuerdo con la invención en una posición sustancialmente erguida, con la zona de aplicación de la muestra situada en el extremo superior de dicho dispositivo. Los materiales para su uso como medio de soporte incluyen, aunque sin limitación, vidrio, plástico y similares.

[0103] La presente memoria descriptiva describe kits de ensayo para la detección de al menos un analito o análogo del mismo en una muestra. Estos kits de ensayo pueden incluir, envasados por separado, o envasados juntos: un dispositivo de ensayo que funciona por gravedad similar a una lámina para su uso en la presente invención; y opcionalmente, cualesquiera reactivos adicionales para tratar o extraer la muestra.

[0104] El término "kit" como se usa en este documento se refiere a cualquier combinación de reactivos o aparatos que pueden usarse para realizar un método de la invención. El kit puede incluir además cualesquiera reactivos adicionales, tampones, excipientes, recipientes y/o dispositivos según se requiera descritos en este documento o conocidos en la técnica, para poner en práctica un método de la invención. Otros elementos del kit pueden incluir recipientes para envasar uno o más elementos del dispositivo, materiales de envasado, soluciones acuosas para su uso con el dispositivo, y similares. Los dispositivos descritos anteriormente pueden envasarse y comercializarse como kits para la detección de analitos. De hecho, los dispositivos anteriores, siendo auto-ensados y convenientes para su uso, son a su vez kits.

[0105] Un juego de instrucciones para guiar a un usuario en el uso de los dispositivos o métodos de acuerdo con la invención también se incluirá, típicamente.

[0106] La presente memoria descriptiva describe un artículo de fabricación o envasado, adecuado para envasar el dispositivo de ensayo, que comprende opcionalmente una marca sobre o asociada con el envase que indican el contenido del mismo, y un inserto en el envase que contiene instrucciones. Preferiblemente el dispositivo de ensayo se selecciona entre el grupo que comprende el dispositivo de ensayo que funciona por gravedad para su uso en la invención, tiras de ensayo, tiras reactivas, tira de diagnóstico, dispositivos de flujo a su través, dispositivos de flujo lateral y similares. Preferiblemente, las zonas de ensayo y las zonas de control de cada tira de ensayo están en la misma ubicación en cada tira de ensayo de modo que cada una puede verse de una manera una al lado de la otra. El envase ofrece un acceso rápido, responsabilidad sobre el dispositivo de ensayo unitario y una mejor protección física para el dispositivo de ensayo.

[0107] Las figuras 5, 6 y 7 ilustran diferentes realizaciones de un envase (30) adecuado para ensayos que funcionan por gravedad, y/o dispositivos de ensayo inmuno- y oligocromatográficos (34).

[0108] En referencia a la figura 5a, un envase (30) de acuerdo con la invención está compuesto por una base (31) para alojar a uno o más dispositivos de ensayo (34). La base (31) puede estar al menos parcialmente sellada con una lámina de tapa (32). Opcionalmente parte de la base (31) está sellada adicionalmente con una lámina de tapa desmontable (33) que puede pelarse, dicha tapa desmontable (33) se solapa preferiblemente a parte de la lámina de tapa (32). La figura 5b ilustra el envase de acuerdo con una realización de la invención en una vista en despiece ordenado. Un envase (30) de acuerdo con la invención está compuesto por una base (31) que comprende uno o más alojamientos (311) para alojar a una o más tiras (34). Preferiblemente dichos alojamientos (311) se forman térmicamente. Cada alojamiento está separado del siguiente en la base (31) por un separador elevado. El alojamiento (311) es típicamente de forma rectangular, teniendo preferiblemente una anchura ligeramente menor que la del dispositivo de ensayo (34). En una realización, el separador elevado puede estar debilitado a lo largo de su longitud (por ejemplo, puede estar cortado previamente) para ser capaz de separar cada alojamiento entre sí. Por consiguiente, la lámina de tapa y la lámina de tapa desmontable selladas sobre la base también pueden estar provistas de líneas pre-cortadas correspondientes, para la desconexión de envases unitarios que comprenden un dispositivo.

[0109] Dicha base (31) preferiblemente está hecha de un material sólido impermeable a la humedad seleccionado entre el grupo constituido por una única capa metálica, múltiples capas metálicas, una única capa de plástico, múltiples capas de plástico, y una capa de metal y de plástico compuesta, y la lámina de tapa (32) y/o (33) es una lámina seleccionada entre el grupo constituido por una única capa metálica, múltiples capas metálicas, una capa de metal y plástico compuesta, una capa de metal y papel compuesta y una capa compuesta integrada de metal, plástico y papel. Dicha base (31) está hecha preferiblemente de material plástico.

[0110] En referencia a la figura 6, el envase (30) está compuesto por una base (31) que comprende uno o más alojamientos (311) para alojar uno o más dispositivos de ensayo (34), en el que un extremo de dichos alojamientos comprende un área de depósito de la muestra (312) que puede estar en comunicación directa con el extremo del dispositivo de ensayo (34) que tiene la zona de aplicación de la muestra, de modo que una muestra puede aplicarse a dicho dispositivo de ensayo (34) a través del área de depósito de la muestra (312).

[0111] La base está sellada parcialmente con una lámina de tapa (32) y una lámina de tapa desmontable (33) que opcionalmente se solapa parcialmente con dicha primera lámina de tapa (32). La figura 7b ilustra una vista posterior de un envase (30) de acuerdo con una realización de la invención, en el que la base (31) está provista opcionalmente de una ventana de observación (35) yuxtapuesta sobre al menos una parte del dispositivo de ensayo (34) de modo que al menos la zona de detección (4) comprendida en dicho dispositivo de ensayo (34) esté en comunicación visual con el exterior de la base (31). Como alternativa, la parte de la base (31) que está sobre las zonas de detección de los dispositivos de ensayo (34) es transparente para permitir que se vean los resultados observables visualmente en cada zona. Como alternativa, la lámina de tapa (32) es transparente para permitir que se vean los resultados observables visualmente en cada zona.

[0112] El dispositivo de ensayo (34) puede fijarse dentro del alojamiento (311) mediante adhesión del suelo de cada alojamiento; sin embargo, la colocación de la lámina de tapa (32) sobre la base (31) es suficiente para retener a los dispositivos de ensayo (34) dentro del alojamiento (311). Con este fin, la lámina de tapa (32) y/o la lámina de tapa desmontable (33) puede construirse convenientemente a partir de una cinta opaca que tiene al menos una ventana transparente formada en ella para ver los resultados de ensayo a lo largo de una zona de detección de la muestra. Para fijar la lámina de tapa (32) sobre la base (31), así como para fijar el dispositivo de ensayo (34), dentro del alojamiento (311), la lámina de tapa (32) se presiona en su lugar para formar una unión adhesiva entre la tapa (32) y los bordes superiores de raíles de la base (31). Convenientemente, la tapa (32) y/o la lámina de tapa desmontable (33) también están provistas de ventanas transparentes a través de las cuales pueden verse marcas sobre dispositivos de ensayo (34). Las marcas (no se muestran) pueden imprimirse con información útil para realizar el ensayo, tal como la identidad del analito detectable con cada dispositivo de ensayo.

[0113] El envase está particularmente adaptado para realizar un método de detección de acuerdo con la invención, en el que el dispositivo de ensayo después de la aplicación de una muestra sobre una zona de aplicación de la muestra del mismo, está colocado verticalmente de modo que la zona de aplicación de la muestra esté en la parte superior del dispositivo, y en la que se permite que la muestra migre a través del dispositivo por gravedad. Por ejemplo, el envase puede estar colocado verticalmente para colocar verticalmente el dispositivo de ensayo. Con este fin el envase puede comprender medios de soporte adicionales para mantener en una posición sustancialmente erguida a dicho envase.

[0114] En uso, el envase (30) que comprende uno o más dispositivos de ensayo (34) se coloca preferiblemente en una posición erguida, con la lámina de tapa desmontable (33) en el extremo superior de dicho envase (30). La lámina de tapa desmontable (33) puede retirarse a continuación para mostrar uno o más alojamientos (311) comprendiendo cada uno un área de depósito de la muestra (312) y un dispositivo (34). La muestra líquida que contiene el analito o análogo del mismo a detectar se sitúa en la parte superior del dispositivo (34) y migra a través

de la zona de ensayo para unirse al analito y la zona de control para unirse a un trazador y permitir el desarrollo de una señal detectable detectando de este modo a dicho analito. La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden limitarla de ninguna manera.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Detección de rotavirus y adenovirus entérico 40/41 (grupo F, cepas 40 y 41).

Preparación de microesferas de poliestireno:

10 [0115] Microesferas de poliestireno (Estapor) se lavan en un tampón de lavado específico (Coris BioConcept). Las microesferas se centrifugan a continuación a 13.000 RPM durante de 5 a 10 minutos para recuperar un volumen de 1 ml. El sedimento se resuspende a continuación en el tampón de activación y se mezcla durante una hora. La suspensión se lava a continuación dos veces en el tampón de lavado antes de resuspenderlo finalmente en el
15 tampón de acoplamiento después de un centrifugado final.

[0116] *Acoplamiento de anticuerpos a microesferas de poliestireno no activadas y amino-activadas:*

20 [0117] El acoplamiento del reactivo a las microesferas de poliestireno se realizó esencialmente siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

[0118] El primer acoplamiento se realizó con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el antígeno del grupo A de rotavirus con microesferas de poliestireno-NH₂ azules.

25 [0119] El segundo acoplamiento se realizó con microesferas de poliestireno rojas no activadas con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra adenovirus entéricos (40 y 41).

[0120] El tercer acoplamiento se realizó con microesferas de poliestireno verdes no activadas con IgY de pollo sin estimulación previa.

30 *El dispositivo de ensayo que funciona por gravedad:*

[0121] El dispositivo de ensayo que funciona por inmunogravedad similar a una lámina (1) del presente ejemplo está constituido por un soporte sólido de refuerzo de plástico (MDI) (2) con sobre él una zona de aplicación de la muestra (2) constituida por Fusion 5 (Whatman), que cubre una almohadilla para el conjugado (13) constituida por Standard 14 (Whatman) que contiene los tres conjugados, una zona sin capilares (14), una zona intermedia (6) constituida por GFBR-1 (MDI), una zona de detección (4) hecha de nitrocelulosa (MDI) y una región de adsorción (5) hecha de celulosa (MDI).

40 [0122] La membrana de nitrocelulosa se sensibiliza con tres reactivos. El primer reactivo encontrado es un anticuerpo monoclonal dirigido contra adenovirus y está localizado en la parte superior de la membrana activa (16) de la zona de detección (4). Esto se define como la "línea de ensayo Ad40/41". El segundo reactivo encontrado por la muestra es un anticuerpo policlonal de cobaya dirigido contra rotavirus y se deposita en la parte media de la membrana activa en la zona de detección de la muestra. Esto se define como la "línea de ensayo Rota". El tercer reactivo es una IgY policlonal anti-pollo y se deja en la parte inferior de la membrana activa (16) de la zona de
45 detección (4). Esto se define como la línea de control de la migración. Se usan tres conjugados: el anticuerpo monoclonal dirigido contra rotavirus conjugado a microesferas de NH₂-poliestireno azules, el anticuerpo monoclonal dirigido contra los adenovirus entéricos (40 y 41) conjugado a las microesferas de poliestireno rojas y la IgY policlonal de pollo conjugada a microesferas de poliestireno verdes. La mezcla de estos tres conjugados se deposita en la primera zona reactiva (3) (Standard 14 de Whatman) de la zona de aplicación de la muestra del dispositivo.
50 Esta membrana está completamente cubierta por la primera membrana absorbente (12) (Fusion 5 de Whatman).

[0123] La zona intermedia está constituida por la membrana GFBR-1 (MDI) que se solapa en 1 mm con la membrana activa (16).

55 [0124] Una pegatina puede cubrir las tres primeras zonas, es decir la zona de aplicación de la muestra, la zona sin capilares que conduce a un espacio en el que el líquido se moverá libremente por gravedad y la zona intermedia. Llega hasta la pegatina por 2 mm en la zona activa (16).

Realización del ensayo:

60 [0125] El ensayo con el dispositivo de ensayo que funciona por gravedad para su uso en la invención se realiza verticalmente colocando el dispositivo en un tubo de ensayo, estando la zona de aplicación de la muestra en la parte superior.

[0126] Muestras que contienen rotavirus o adenovirus entéricos (40 ó 41) se diluyen en un tampón de muestra. Entre 100 y 250 µl de esta solución se pipetea y se deposita en la parte superior del dispositivo sobre la zona de aplicación de la muestra.

5 **[0127]** La presencia de adenovirus entéricos (40 ó 41) será detectada por la aparición de una línea roja en la región superior de la zona de detección de la muestra (línea de ensayo Ad 40/41), y la presencia de rotavirus será detectada por la aparición de una línea azul en la región media de la zona de detección (línea de ensayo Rota). La migración del conjugado de poliestireno verde de pollo reaccionará con la IgY anti-pollo recubierta dando origen a una línea de control de la migración verde. El ensayo se realiza en 10 minutos.

10 **[0128]** En todos los casos, la línea de control de la migración aparece, mostrando que la muestra ha migrado desde la parte superior hasta la parte inferior del dispositivo de ensayo que funciona por inmunogravedad (1).

Ejemplo 2: Detección de antígeno urinario de *Legionella pneumophila*

15 *Preparación de partículas de oro coloidal*

[0129] Las partículas de oro coloidal de aproximadamente 40 nm se adquirieron de una fuente comercial (Diagam).

20 *Acoplamiento de anticuerpos a partículas de oro coloidal:*

[0130] El acoplamiento de anticuerpos a partículas de oro coloidal se conoce bien en la técnica. En este ejemplo, se usaron anticuerpos de conejo purificados dirigidos contra el antígeno urinario de *Legionella pneumophila*. El polisúero purificado se hizo reaccionar con una suspensión de partículas de oro coloidal que se había tamponado con una solución de carbonato de potasio para obtener el pH deseado. Este pH está predeterminado y puede ser diferente para cada reactivo inmunológico. La dilución del polisúero purificado a usar en el proceso de acoplamiento se definió en un experimento preliminar.

30 **[0131]** En este experimento preliminar, diluciones en aumento del polisúero se hicieron reaccionar durante tres minutos con las partículas de oro coloidal tamponadas y a continuación se añadió cloruro sódico hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente el 1%. La absorbancia a 630 nm se registró. La dilución más alta del polisúero a la que la absorbancia era igual o similar a la absorbancia obtenida con la dilución más baja del polisúero se seleccionó como la dilución de referencia para el acoplamiento del reactivo a las partículas de oro coloidal.

35 **[0132]** Para el acoplamiento en sí mismo, el polisúero a la dilución seleccionada y las partículas de oro coloidal tamponadas se hicieron reaccionar durante tres minutos. Este llamado conjugado se saturó posteriormente y se lavó varias veces mediante centrifugado y resuspensión en un tampón de lavado para retirar cualesquiera anticuerpos no conjugados y finalmente se resuspendió en un tampón de conservación.

40 **[0133]** Un segundo conjugado hecho de IgY policlonal de pollo purificada se usó como conjugado de control y se acopló de acuerdo con el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente en este documento.

El dispositivo de ensayo que funciona por gravedad:

45 **[0134]** El dispositivo de ensayo que funciona por inmunogravedad similar a una lámina (1) del presente ejemplo está constituido por un soporte sólido de refuerzo de plástico (MDI) (18) con sobre él una zona de aplicación, sin capilares, intermedia, de detección y una de absorción.

50 **[0135]** La zona de aplicación de la muestra (2) está constituida por AccuflowG (Whatman-Schleicher & Schuell), la zona intermedia (6) está constituida por GFBR-1 (MDI), la región de detección (4) está hecha de nitrocelulosa (MDI) que tiene preferiblemente, aunque sin limitarse a, una porosidad de 10 µm y la región de absorción (5) está hecha de celulosa (MDI).

55 **[0136]** La membrana de nitrocelulosa se sensibiliza con dos reactivos. El primer reactivo es un reactivo de polisúero de conejo purificado dirigido contra antígeno urinario de *Legionella pneumophila* y se deposita en la parte superior de la membrana activa (16) en la zona de detección (4). Esto se define como la "línea de ensayo Lp". El segundo reactivo es un polisúero de conejo purificado anti-IgY de pollo y reaccionará con la IgY policlonal de pollo acoplada a partículas de oro coloidal. Se deposita en la región inferior de la membrana activa (16) de la zona de detección (4). Esto se define como la "línea de control de la migración". Tanto el conjugado específico de antígeno urinario de *Legionella pneumophila* como el conjugado de control de IgY de pollo están impregnados en el AccuflowG (Whatman-Schleicher & Schuell), en la zona de aplicación de la muestra (2). En una realización preferida, el tampón de dilución se pulveriza sobre la parte superior de la membrana de AccuFlow G, dando origen a un ensayo para el que no se requiere tampón líquido.

60

Realización del ensayo:

5 [0137] El presente ensayo está dirigido a la detección de antígeno urinario de *Legionella pneumophila* con el dispositivo de ensayo que funciona por inmunogravedad (1) para su uso en la invención. Se realiza de forma similar a como se ha descrito en el primer ejemplo.

10 [0138] Muestras de orina que contenían antígenos de *L. pneumophila* se diluyen en un tampón específico en la proporción de 3 V/V. El dispositivo de ensayo que funciona por inmunogravedad (1) para su uso en la invención se coloca en un tubo de ensayo, estando la zona de aplicación de la muestra en la parte superior. Cuando el tampón de dilución específico ya está impregnado sobre la membrana de muestra de AccuFlow G, la muestra de orina se coloca directamente en la zona de aplicación.

15 [0139] Entre 100 y 250 μ l de esta solución se pipetea y se deposita en la parte superior del dispositivo sobre la zona de aplicación de la muestra.

[0140] El ensayo demostró ser específico: La "línea de ensayo Lp" aparece con una muestra que contiene antígenos urinarios de *L. pneumophila*, y la intensidad disminuye al aumentar las diluciones de la muestra.

20 [0141] Análogamente, la "línea de control" aparece en todos los casos, con la misma intensidad incluso cuando la muestra era negativa para el antígeno urinario. El ensayo se realiza en 15 minutos.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de analitos para la detección de al menos un analito en una muestra, que comprende las etapas de colocar verticalmente un dispositivo de ensayo, poner en contacto el dispositivo de ensayo con una muestra y permitir que la muestra se mueva desde la parte superior del dispositivo hasta la parte inferior del dispositivo, por gravedad a través de una zona sin capilaridad (14) del dispositivo y detectar el analito, en el que el dispositivo de ensayo comprende: en uno o más lados de un soporte sólido (18), dispuestas de un extremo a otro extremo del dispositivo:
- (a) una primera zona de capilaridad que comprende una zona de aplicación de la muestra (2), en la que la zona de aplicación de la muestra (2) comprende al menos un conjugado específico de analito con un marcador directo o indirecto para la detección del al menos un analito o análogo del mismo;
- (b) una segunda zona de capilaridad que comprende una zona de detección (4), opcionalmente una zona intermedia (6), dispuesta cerca de dicha zona de detección (4) y opcionalmente una zona o región absorbente (5) dispuesta cerca de dicha zona de detección (4), dicha zona de detección (4) comprendiendo opcionalmente una subzona de control; y en la que la zona de detección (4) comprende al menos un reactivo de captura que reconoce específicamente el al menos un analito o análogo del mismo; y
- (c) la zona sin capilaridad (14) separando la zona de aplicación de la muestra (2) de la primera zona de capilaridad de la zona de detección (4) o de la zona intermedia opcional (6) de la segunda zona de capilaridad,
- en el que dicha zona de aplicación de la muestra (2), dicha zona sin capilaridad (14) y dicha zona de detección (4) o dicha zona intermedia opcional (6) se disponen de tal manera que la muestra puede fluir solamente por gravedad desde la zona de aplicación de la muestra (2) hasta la zona de detección (4) o hasta la zona intermedia opcional (6).
2. Método de detección de analitos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende poner en contacto a una zona de recepción de la muestra en el dispositivo con una muestra, permitir que la muestra migre por capilaridad a través de la zona de recepción de la muestra a una zona sin capilaridad, permitir que la muestra migre a través de la zona sin capilaridad por gravedad hasta una zona de detección y permitir que la muestra migre a través de la zona de detección por capilaridad y detectar el analito.
3. El método de detección de analitos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de colocar verticalmente el dispositivo de ensayo, aplicar una muestra en la parte superior del dispositivo, permitir que la muestra migre a través de la zona de aplicación de la muestra (2) e hidrate el al menos un conjugado específico de analito, permitir que al menos un analito en dicha muestra reaccione con el al menos un conjugado específico de analito, formando de este modo al menos un complejo, permitir que el al menos un complejo alcance la zona sin capilaridad, para pasar por gravedad la zona sin capilaridad para entrar en contacto y migrar a través de la zona intermedia opcional (6) y pasar a través de la zona de detección (4) reaccionando de este modo con al menos un reactivo de captura y permitir el desarrollo de una señal detectable, detectando de este modo dicho al menos un analito.
4. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la detección de analitos o análogos de microorganismos (dañinos) que comprenden *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *E. coli*, *E. histolytica*, *C. difficile*, toxinas de *C. difficile*, VRS (Virus Respiratorio Sincitial), virus de la gripe A y B, rotavirus, adenovirus de tipos 40 y 41 u otros grupos de adenovirus, antígeno urinario de *Legionella pneumophila*, coronavirus de origen humano y animal y metapneumovirus humanos.
5. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos reactivos de captura se seleccionan del grupo que comprende oligonucleótidos o análogos de los mismos, anticuerpos policlonales o monoclonales o fragmentos de anticuerpo hipervariables, o un antígeno reconocido por compuestos serológicos tales como IgG, IgA, IgE e IgM o uno de los reactivos específicos de pares como biotina-estreptavidina.
6. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la zona de aplicación de la muestra (2) comprende además al menos un conjugado de control.
7. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la zona de detección (4) comprende al menos una línea de ensayo de control con al menos un reactivo de captura de control (7') que reconoce específicamente al conjugado de control en la zona de aplicación (2).
8. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el conjugado específico del analito y/o el conjugado de control comprenden un marcador seleccionado del grupo que comprende, coloides metálicos conjugados, microesferas de poliestireno conjugadas, nanotubos y micro- o nanopartículas de carbono con un color particular, y micro- o nanopartículas fluorescentes.

9. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la zona de detección (4) comprende una membrana activa (16) hecha de nitrocelulosa u otra matriz capaz de quedar recubierta por reactivos que interactúan con otros reactivos situados en la zona de aplicación o presentes en la muestra a ensayar.
- 5
10. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la zona intermedia (6) comprende una membrana absorbente (15).
- 10
11. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que una pegatina (20) cubre la zona de aplicación de la muestra (2), la zona sin capilaridad (14), la zona intermedia (6) y se solapa parcialmente con la zona de detección (4).
12. El método de detección de analitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho dispositivo está provisto en una cubierta hueca o una cubierta moldeada con calor o está incrustado en un polímero.

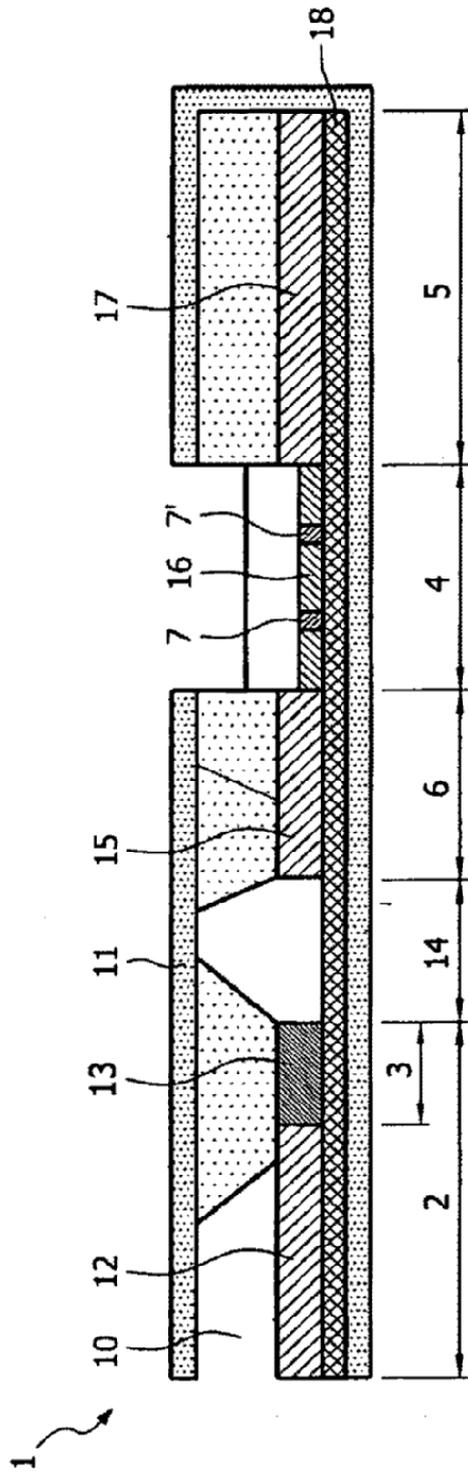


FIG. 1

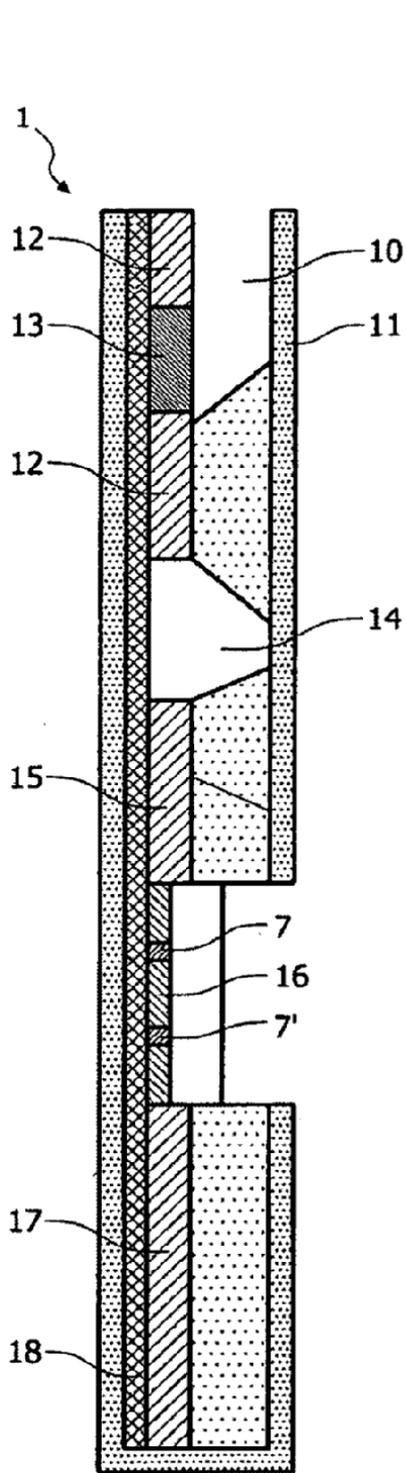


FIG. 2a

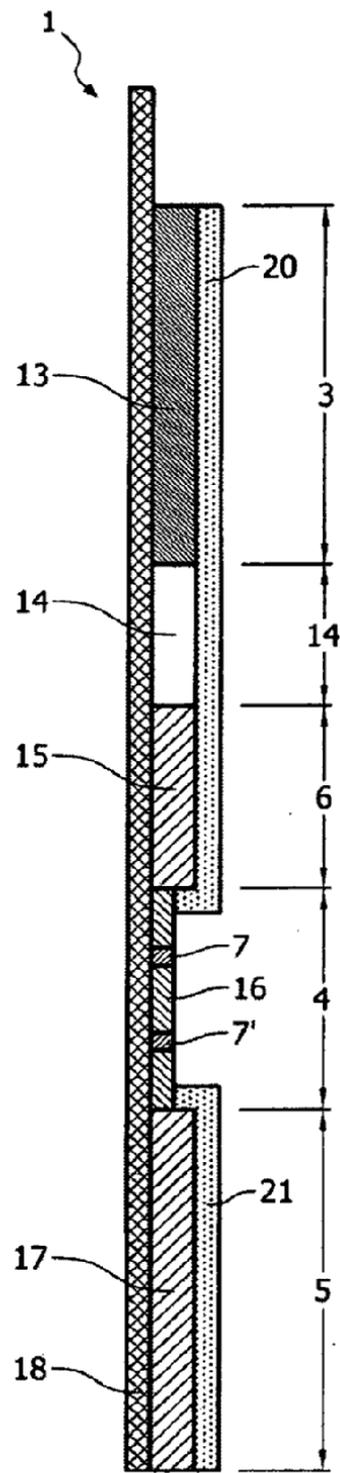


FIG. 2b

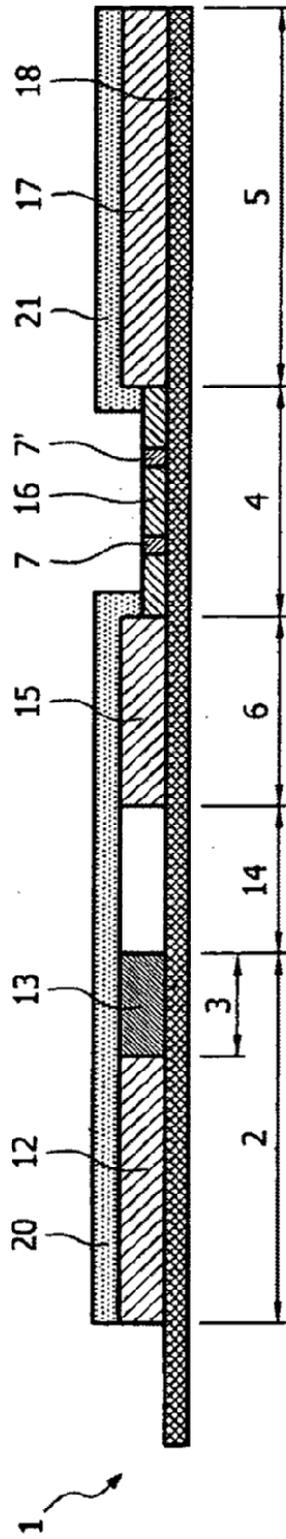


FIG. 3

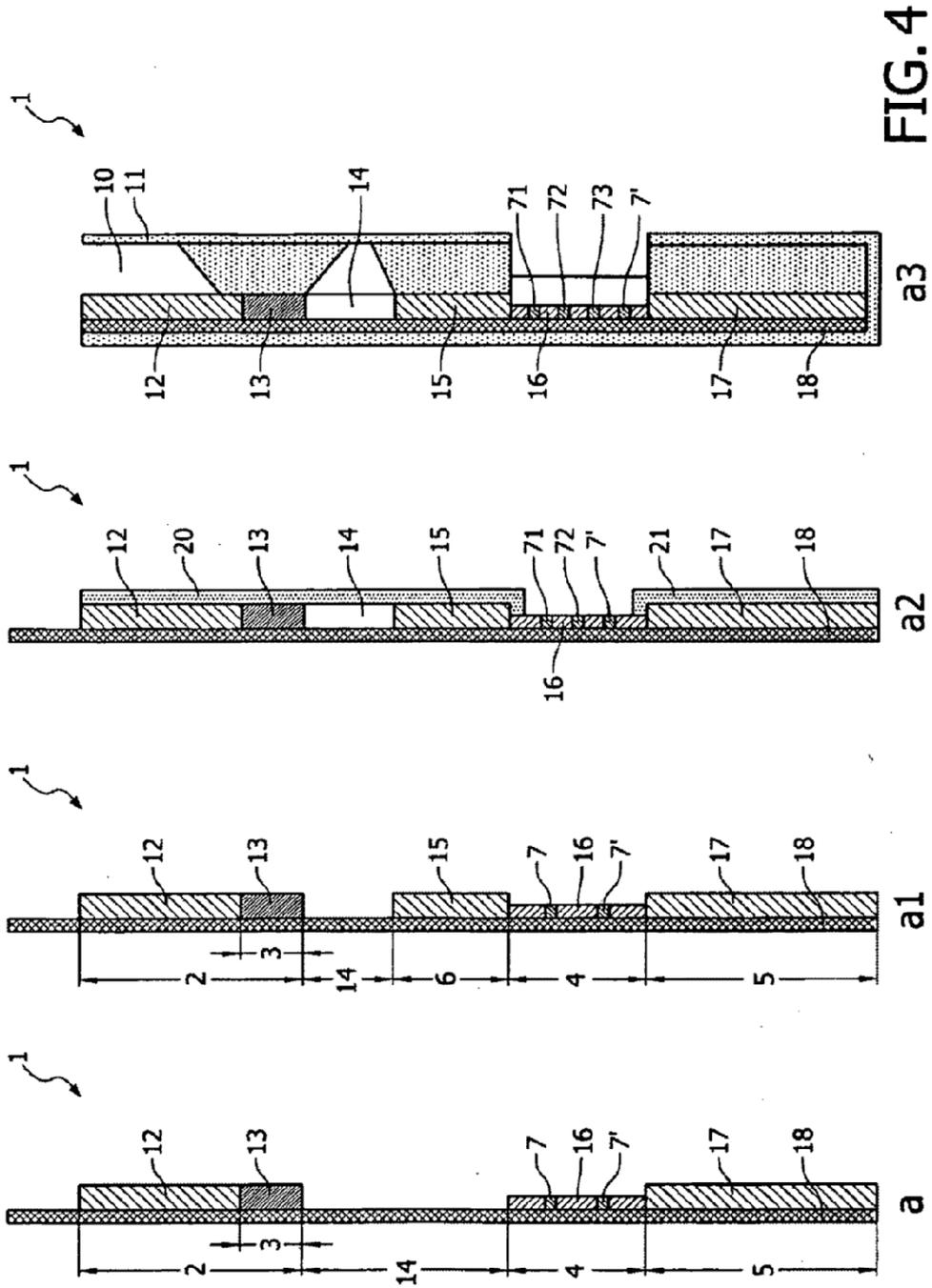
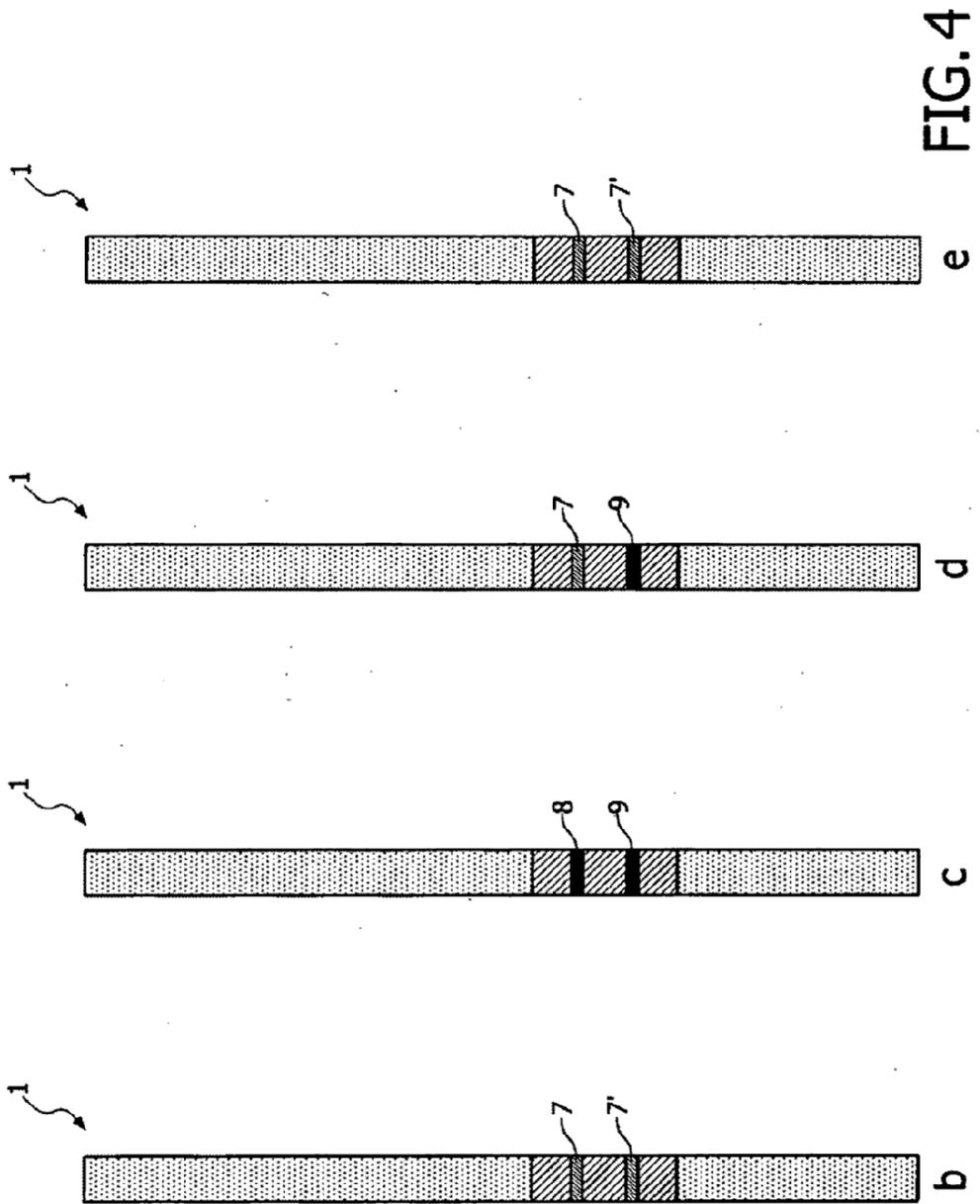


FIG. 4



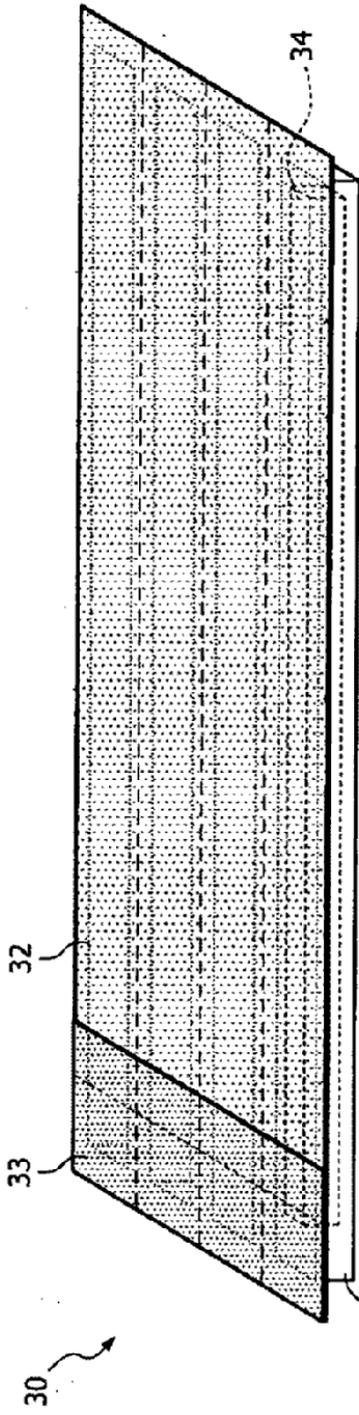


FIG. 5a

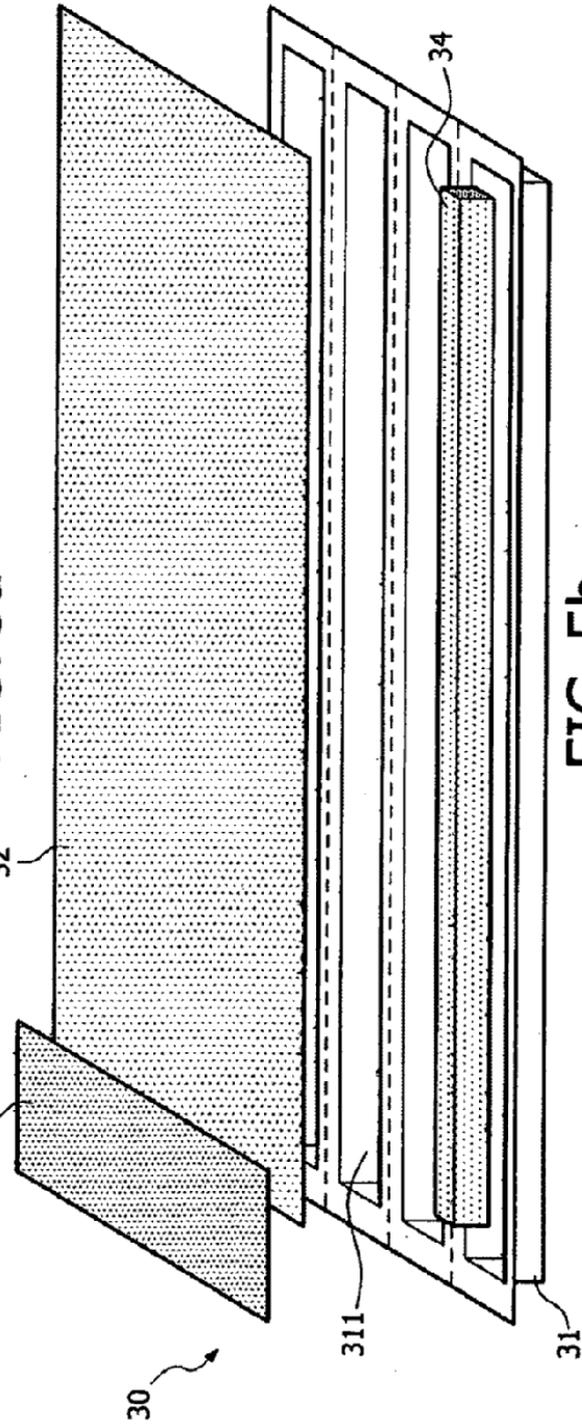


FIG. 5b

30 →
33
32
34
31
30 →
FIG. 6a

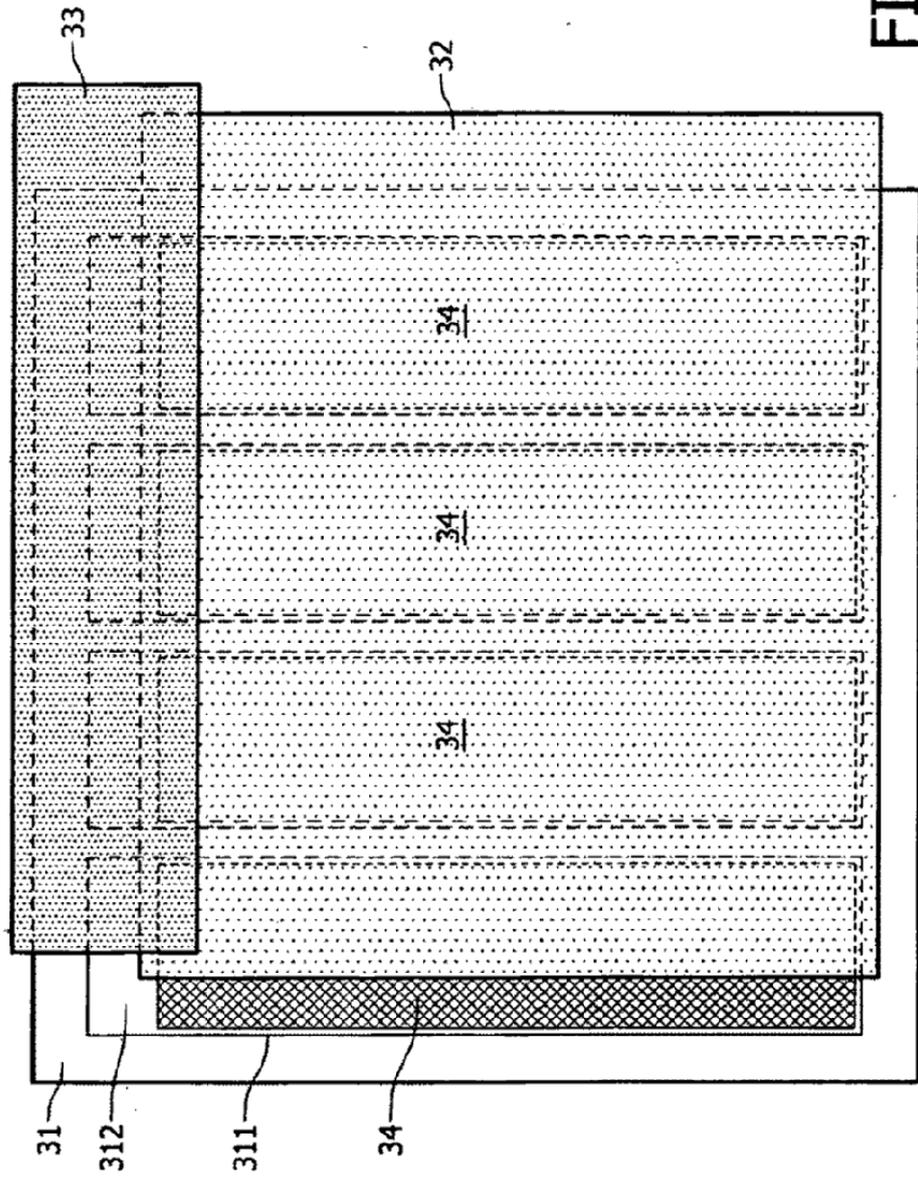
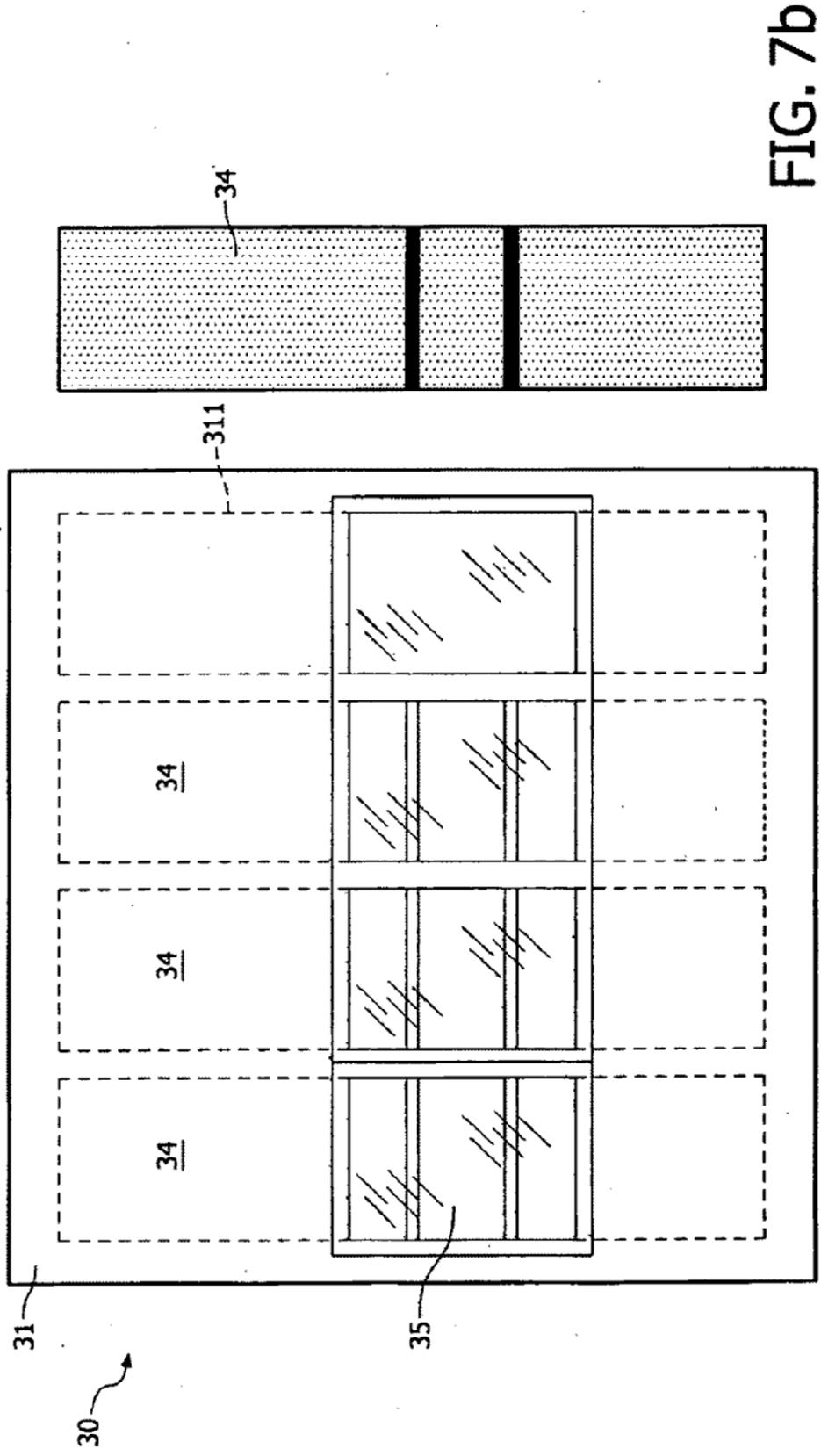
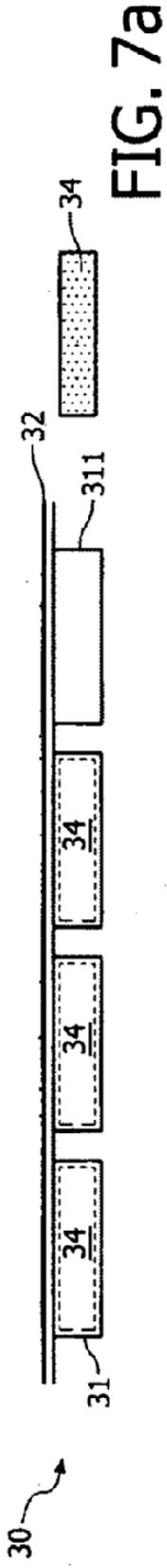


FIG. 6b



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 0088636 A [0003] [0075]
- EP 0186799 A [0003] [0075]
- EP 0284232 A [0003] [0075]
- WO 8808534 A [0003] [0075]
- US 2002001818 A [0006]
- US 2004023412 A [0007]
- US 2005227371 A [0008]
- WO 9832019 A [0009]