

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 257**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2005 E 10184143 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2282206**

54 Título: **Método y aparato para el ensayo simultáneo de varios analitos con un control interno**

30 Prioridad:

**17.02.2004 EP 04003497**

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

**30.08.2013**

73 Titular/es:

**DST DIAGNOSTISCHE SYSTEME &  
TECHNOLOGIEN GMBH (100.0%)  
Hagenower Strasse 73  
19061 Schwerin, DE**

72 Inventor/es:

**SCHWERTNER, HEIKO y  
RUNGE, DOROTHEE MONIKA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 421 257 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

Método y aparato para el ensayo simultáneo de varios analitos con un control interno

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para detectar moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas en las que por lo menos dos superficies son modificadas química o físicamente en un panel del dispositivo de manera que se proporcionen a dichas superficies medios para inmovilizar moléculas o clases y/o mezclas de moléculas, en las que se utiliza una superficie con fines de control o estandarización, y la otra sirve para detectar un analito, en las que se estructuran las dos superficies de manera que entran en contacto (principio de ensayo de contacto tangencial) en esencialmente el mismo punto temporal con una matriz completa de muestras de la que las moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas deben someterse a ensayo, y en la que ambas superficies están estructuradas y dispuestas mutuamente de manera que se evalúan conjuntamente, formando de esta manera una disposición gráfica que puede leerse visualmente. Según la invención, las parejas de símbolos pueden hacerse visibles: "-" significa negativo y "+" significa positivo, o un círculo significa negativo y un círculo con uno o más puntos significa positivo. Pueden proporcionarse anticuerpos, antígenos, ADN, ARN, enzimas, sustratos, receptores, ligandos o combinaciones de los mismos como medios para inmovilizar moléculas o clases y/o mezclas de moléculas.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La totalidad de las referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad para los fines de la presente invención.

20 En los campos de la investigación, medicina, biología, química y toxicología, así como en muchas otras áreas de aplicación, los ensayos analíticos de laboratorio que sirven para someter a ensayo cualitativa y/o cuantitativamente las moléculas o su activación o composición constituyen la base para descripciones detalladas, e incluso para el desarrollo de nuevos métodos o dispositivos. Son ejemplos de lo anterior, los métodos analíticos de la biología molecular, los cuales se utilizan en investigación, en técnicas forenses para la investigación de crímenes o en medicina para la detección de la presencia de cáncer. La base para ello comprende los métodos generalmente conocidos de análisis de ADN/ARN o el análisis de las proteínas. Otro ejemplo es el amplio abanico de procedimientos y métodos analíticos que se utilizan para examinar las reacciones de anticuerpos, las denominadas reacciones inmunológicas, las cuales sirven para someter a ensayo para gérmenes, proteínas, fármacos y muchas otras sustancias. Estos procedimientos analíticos presentan un área de aplicación muy amplia. Se utilizan en los campos de la medicina, de la investigación y de la tecnología de los productos alimentarios y farmacéuticos.

30 A lo largo de los años, estas técnicas de laboratorio han sido consistentemente afinadas a través del amplio abanico de usos analíticos del ADN/ARN, las proteínas y otras moléculas. Lo anterior ha llevado a éxitos cada vez mayores, expandiendo las áreas de aplicación. La consecuencia ha sido un número cada vez mayor de muestras que pueden examinarse sistemáticamente para moléculas específicas. Debido a que un gran número de muestras individuales sólo puede examinarse con un esfuerzo considerable, en la actualidad se utilizan los denominados robots de laboratorio o, más recientemente, las tecnologías denominadas de chip, las cuales son capaces de examinar simultáneamente hasta varios cientos de muestras.

40 En contraste con estos exigentes métodos de examen de laboratorio (patente EP nº 1 338 895, titulada "High-density allergen microarray" (Micromatriz de alérgenos de alta densidad) o patente EP nº 0 875 758 B1, titulada "Immunoassay" (Inmunoensayo)), los ensayos denominados rápidos, los cuales proporcionan a los médicos y terapeutas resultados de análisis rápidos y simples que se limitan a los puntos esenciales, se están utilizando cada vez con mayor frecuencia. Existe una gran demanda y ésta está creciendo continuamente. Estos ensayos con frecuencia se utilizan en el área denominada "de punto de cuidado", es decir, inmediatamente antes, durante o después de las medidas terapéuticas. Otro objetivo es proporcionar una alternativa eficaz en cuanto a costes a los ensayos de laboratorio clásicos. Sin embargo, la fiabilidad de la aplicación y/o el número de analitos que pueden someterse a ensayo simultáneamente, así como la precisión analítica, son muy limitados. Existe una gran necesidad de mejoras en este campo.

50 Se conocen métodos de ensayo rápidos, tales como el ensayo de flujo lateral (EFL), el ensayo de flujo continuo (EFC), el ensayo de aglutinación (EA) y el ensayo en fase sólida (EFS). La totalidad de dichos métodos sirven para detectar con rapidez los analitos sin utilizar instrumentos y resultan adecuados para la evaluación visual. La totalidad de dichos métodos presenta desventajas y por lo tanto sólo pueden sustituir parcialmente los ensayos de laboratorio o sólo pueden ser utilizados por personas no expertas en un grado limitado. Por ello, estos métodos en ocasiones se refuerzan con medios técnicos. Pueden encontrarse ejemplos de estos métodos, entre otros, en las memorias de patente DE nº 197 21151, EP nº 98 928 265.5, WO nº 98/53321, titulada "Streifentest zur *in vitro* Allergiediagnostik" [Strip test for *in vitro* allergy diagnosis] (Ensayo de tira para el diagnóstico *in vitro* de alergias); WO nº 03/094716, US nº 2003-212316, titulado "Method and apparatus for determining blood parameters and vital signs of a patient" [Método y aparato para determinar parámetros sanguíneos y signos vitales en un paciente]; WO nº 02/084249, titulado "Therapeutic and diagnostic uses of antibody specificity profiles" [Usos terapéuticos y diagnósticos de perfiles de especificidad de anticuerpos]; WO nº 00/40967, titulado "Method and device for diagnosing allergy symptoms" [Método y dispositivo para el diagnóstico de los síntomas de alergia]; WO nº 02/066602, EP nº 135011.1; WO nº

93/10458, titulado "Binding of milk allergens to a solid phase" [Unión de alérgenos de la leche a una fase sólida]; patente US nº 6.528.325, WO nº 02/056017, titulado "Method for the visual detection of specific antibodies in human serum by the use of lateral flow assays" [Método para la detección visual de anticuerpos específicos en suero humano mediante la utilización de ensayos de flujo lateral]; EP nº 1327884, titulado "Reagent test strip comprising control means and timer means" [Ensayo de tira reactiva que comprende medios de control y medios de medición del tiempo]; WO nº 97/31268, titulado "Chromatographic strip having detection and control zones oriented parallel to the direction of flow" [Tira cromatográfica que presenta zonas de detección y de control orientadas en paralelo a la dirección de flujo]; patente US nº 6.040.195, titulada "Diagnostic sanitary test strip" [Tira de ensayo sanitario diagnóstica]; patente US nº 6.509.196, WO nº 01/50129, titulado "Compensation for non-specific signals in quantitative immunoassays" [Compensación de las señales no específicas en inmunoensayos cuantitativos].

Los EFL son los ensayos rápidos más extendidos. En ellos, la muestra, por ejemplo suero u orina, se aplica sobre una superficie. De una manera directamente comparable con la cromatografía de capa fina, el líquido (muestra) fluye a través de una capa de separación que contiene reactivos tales como, por ejemplo, anticuerpos marcados, y posteriormente fluye a través de una capa de nitrocelulosa. La capa de nitrocelulosa contiene capas de captura (en contraste con el EFS, en el que las capas de captura se encuentran presentes sobre la superficie del portador) a las que se unen los anticuerpos marcados, formando una línea que es visible al ojo. Dichos métodos fueron descritos en la literatura científica antes de 1980, tanto para la utilización en la cromatografía de capa fina clásica como en un ensayo rápido. Las únicas diferencias son en la utilización de un reactor estandarizado o de una capa de separación que puede utilizarse universalmente múltiples veces.

El EFC es comparable a la cromatografía de columna. En este ensayo, la muestra (líquido) fluye a través de capas de membranas y capas de succión. Al igual que el EFL, por ejemplo, los anticuerpos que son capaces de unirse a analitos se unen a la membrana de detección. Los analitos unidos se hacen visibles como puntos mediante diversos reactivos de detección. Dichos métodos fueron descritos en la literatura científica antes de 1980, para la utilización como cromatografía de columna y como ensayo rápido. Las únicas diferencias son en la utilización de un reactor o de una columna que puede utilizarse universalmente múltiples veces.

El método de EA se basa en partículas que se recubren con anticuerpos y que se encuentran en una capa uniforme. En el caso de que se añada una muestra positiva, la capa uniforme resulta destruida por reticulación, la cual resulta visible al ojo desnudo en el caso de reacciones fuertes.

Con el método de EFS, con frecuencia también denominado ensayo "de tira reactiva", unos anticuerpos o antígenos unen los analitos a una superficie (en contraste con el EFL, en el que los analitos se unen a una superficie) y posteriormente son detectados mediante reacciones posteriores. Dependiendo del método de detección utilizado, el resultado puede ser un punto o una superficie que resulta visible al ojo desnudo. Dicho método es el método descrito en la memoria de patente europea EP nº 98 928 265.5 (titulada "Streifentest zur *in vitro* Allergiediagnostik" [Strip test for *in vitro* allergy diagnosis] (Ensayo de tira para el diagnóstico *in vitro* de alergias)). Sin embargo, dichos métodos también fueron descritos en la literatura científica antes de 1980.

La totalidad de dichos métodos presenta ventajas y desventajas individuales. Un ensayo rápido ideal permitiría la evaluación por el ojo desnudo, debería permitir el análisis de múltiples analitos en una muestra, y debería presentar estándares internos para el control de la función, el control de calidad y la determinación de la cantidad y también debería permitir que el no experto lleve a cabo la evaluación. Además, el ensayo debería ser rápido, en otras palabras, debería resultar posible llevarlo a cabo en menos de aproximadamente 25 minutos, y debería resultar de producción económica.

Los ensayos de FL sólo pueden determinar analitos individuales (y únicamente en casos excepcionales, varios analitos) en una muestra, ya que la muestra líquida debe fluir a través de la membrana. Aunque resulta posible un control positivo-negativo, no puede llevarse a cabo una cuantificación. Lo mismo resulta de aplicación a los ensayos de EA, EFC y EFS, los cuales habitualmente utilizan un estándar externo, tal como una tarjeta de color (ver la memoria de patente EP nº 98928265.5) o una escala de grises. Ésta es una desventaja para la evaluación visual, es decir, una evaluación con el ojo desnudo, debido a que pueden producirse con facilidad interpretaciones erróneas en estos casos. Además, la sensibilidad se reduce en gran medida. Los métodos EFS, EA y EFC, los cuales han sido conocidos desde principios de los años 1980, ofrecen la posibilidad de someter a ensayo numerosos analitos en una rejilla (matriz) comparable a las tecnologías de chip posteriores, en el laboratorio. Sin embargo, ninguno de dichos métodos es capaz de llevar a cabo un control de la función, un control de la calidad o una determinación de la cantidad en cada uno de los puntos de la matriz, por ejemplo mediante un estándar interno. Sin embargo, lo anterior resulta necesario, ya que una distribución irregular de la muestra líquida sobre la superficie de ensayo conduce a diferencias de concentración de los analitos que deben someterse a ensayo sobre esta superficie particular. Ello conduce inexorablemente a interpretaciones erróneas. Una serie de estándares con o sin un control positivo o negativo conduce a este efecto de interpretación errónea en los bordes de los puntos de la matriz o alternativamente, debidos a tarjetas de color o escala de grises externos.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención evitar las desventajas existentes de los procedimientos y métodos actuales del campo de los ensayos rápidos, sin perder las ventajas de los métodos de ensayo de laboratorio clásicos, incluyendo los robots de laboratorio y/o los sistemas de chips. De manera similar, el objetivo es

simplificar los métodos de ensayo en grado suficiente para que puedan ser llevados a cabo incluso por personas no expertas. Otro objetivo es permitir la realización de los análisis sin medios o instrumentos y/o con medios o instrumentos simples.

5 Dicho objetivo se consigue según la invención mediante un dispositivo en el que se inmovilizan moléculas sobre un panel, siendo capaces dichas moléculas de reaccionar con los analitos que se someten a ensayo, de manera que se unen y seguidamente pueden ser detectados en una reacción posterior o en varias etapas de reacción. Dichas moléculas son, por ejemplo, anticuerpos, antígenos, ADN, ARN, enzimas, receptores, lectinas, proteínas o péptidos. Las superficies de inmovilización se disponen de manera que un control positivo o negativo se encuentre en una relación espacial directa con el analito. Un ejemplo que no limita el alcance de la patente es un círculo con un punto en su centro, por ejemplo, <sup>⊙</sup> (ver la fig. 1). El círculo externo es el control positivo, de manera que debe aparecer en todos los casos. El punto en el centro únicamente aparece en el caso de que el analito se encuentre presente en la muestra (figuradamente: "la diana"). La concentración del control positivo en el anillo puede coordinarse de manera que sólo resulta visible sobre un determinado nivel umbral (valor de corte). Lo anterior permite realizar una cuantificación visual en cada punto de la matriz. En el caso de que el analito se encuentre presente en la muestra a una concentración elevada, el color del punto central provoca que destaque claramente respecto al anillo exterior. En el caso de que el analito se encuentre presente a concentración baja, el color del punto central sólo será ligeramente diferente del anillo externo, y en el caso de que el resultado sea negativo, el anillo se encontrará vacío. En el caso de que se utilicen varios anillos, puede ilustrarse una serie de estándares, por ejemplo <sup>⊙</sup> (ver la fig. 2). Los anillos exteriores son concentraciones estándares con un valor de corte definido, el punto central en la parte intermedia es el punto de medición de la muestra. El presente ejemplo demuestra claramente que una combinación gráfica directa de un estándar (superficie de medición) con el punto de medición (superficie) rinde una fiabilidad de evaluación considerable y una mayor cantidad de información.

El documento WO nº 94/03774 A se refiere a un inmunoensayo en el que se lleva a cabo una evaluación con ayuda de óptica de luz sobre películas delgadas.

25 El documento WO nº 99/30154 A da a conocer un ensayo multicapa, proporcionado esencialmente por un material poroso.

30 Baldwin *et al.* (BALDWIN C I; CALVERT J E; RENOUF D V; KWOK C; HOUNSELL E F: "Analysis of pigeon intestinal mucin allergens using a novel dot blot assay", CARBOHYDRATE RESEARCH, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING COMPANY, Bd. 326, 43-49, 2000), dan a conocer la detección de antígenos mediante la ayuda de los métodos denominados de transferencia por puntos utilizando un ensayo basado en hidrocélulosa.

Kanbe *et al.* (KANBE T; UTSUNOMIYA K; ISHIGURO A, "A crossreactivity at the immunoglobulin E level of the cell wall mannoproteins of *Candida albicans* with other pathogenic *Candida* and airborne yeast species", CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, Bd. 27, 1449-1457, 1997) describe un ensayo para alergias que, de manera similar, se ha diseñado como método de transferencia por puntos.

35 Asimismo, Blais *et al.* (BLAIS BURTON W; GAUDREAU MELISSA; PHILLIPPE LUCILLE M: "Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods", FOOD CONTROL, Bd. 14, 43-47, 2003), describen un ensayo de alergias alimentarias que también se ha desarrollado basándose en un método de transferencia por puntos.

40 La patente EP nº 0 119 858 se refiere a un dispositivo para un ensayo de alergias que puede llevarse a cabo en forma de ensayo de unión.

Asimismo, el documento WO nº 01/71345 describe un dispositivo para llevar a cabo un ensayo de unión que consiste de una cámara con una entrada y una salida.

La patente EP nº 1 226 871 describe un ensayo de unión con detección de fluorescencia.

45 Sin embargo, la totalidad de los documentos anteriormente indicados no da a conocer una matriz gráfica que permita una evaluación ventajosamente visual de múltiples analitos a ojo desnudo.

En efecto, la patente US nº 5.160.701 da a conocer una matriz gráfica óptica legible; sin embargo, en la realización de un ensayo de EFL se requiere para, por ejemplo, la determinación del embarazo a partir de orina. En particular, dicho documento no se refiere a un sistema de coordenadas de una matriz gráfica para la evaluación de diversos analitos.

50 Por lo tanto, la invención presente en dicha memoria de patente permite preparar un método de ensayo rápido que puede utilizarse universalmente para someter a ensayo un amplio espectro de analitos en una muestra. Además, pueden someterse a ensayo en paralelo uno o más, o numerosos, analitos. Ello puede llevarse a cabo en cualquier rejilla deseada (matriz o disposición ordenada), por ejemplo lineal o cuadrada. Dichos dispositivos con superficies que llevan a cabo tareas definidas, activa o pasivamente, ya pueden encontrarse en literatura científica antigua de todos los campos técnicos y, por lo tanto, son parte del estado de la técnica; son ejemplos de ellos, las matrices de

transferencia por puntos y las placas de microtitulación (PMT) con sistema de coordenadas. Según la invención se utilizan estándares internos para llevar a cabo un control de la función, un control de la calidad y/o determinaciones de la cantidad en cada punto de la matriz, de manera que, en el caso de que los analitos que deben someterse a ensayo rindan un gradiente de concentraciones en esta matriz, ello no dé lugar a interpretaciones erróneas. Con la selección apropiada de la reacción de detección, por ejemplo un inmunoensayo enzimático (IEE), una detección que utiliza partículas de oro, selenio o látex unidas a anticuerpos, el ensayo puede evaluarse a ojo desnudo, en otras palabras, de manera puramente visual. Además, por medios simples, el ensayo también utiliza métodos de detección tales como el marcaje de fluorescencia, la detección electroquímica o los métodos espectroscópicos.

Además, puede garantizarse una fiabilidad de la evaluación especialmente buena mediante comparación del diseño gráfico del estándar con la muestra. En la presente memoria se utilizan símbolos entendidos generalmente, por ejemplo "+" para positivo (analito presente) y "-" para negativo (analito ausente). Lo anterior se ha descrito para el EFL en la memoria de patente europea EP nº 0 421 294 B1, aunque únicamente puede detectarse un analito en la muestra líquida y no existe la posibilidad de cuantificación. En el ensayo según la invención, numerosos analitos que deben someterse a ensayo pueden representarse de esta manera y la cuantificación resulta concurrentemente posible en cada punto de la matriz. Además, pueden seleccionarse otras formas de representación, tales como un anillo con un punto en el interior o una estrella.

Otro ejemplo no limitativo es un símbolo de estrella (ver la fig. 2). En este caso, cinco de las seis puntas de la estrella son controles positivos (correspondientes a una serie de estándares de un método de ensayo de laboratorio). Se fijan de manera que cada uno de ellos resulta visible a una concentración superior a determinados umbrales de concentración (por ejemplo crecientes). En caso de encontrarse presente en la muestra, de manera similar el analito resulta visible como función de su concentración. La combinación espacial directa del punto de medición (punto de analito) y de los controles (en este caso una serie de estándares) permite llevar a cabo fiablemente una determinación de la concentración. La precisión de la lectura visual puede determinarse a partir del número de puntas de estrella. La selección de la representación gráfica depende de la aplicación posterior. Los símbolos "+", "-", un círculo con un punto o una estrella han demostrado ser valiosos siempre que se desee un formato de ensayo que pueda evaluarse de manera puramente visual, es decir, a ojo desnudo. En el caso de que se desee un formato de ensayo que deba evaluarse por medios técnicos de cualquier tipo, han demostrado ser valiosos un círculo con un punto central y un cuadrado con una cruz central. En particular, la evaluación por medios técnicos tales como una cámara de CCD, la detección de fluorescencia, la detección electroquímica u otros métodos espectroscópicos también pueden reconocer y evaluar errores relacionados con la producción, ya que la transferencia cruzada de material de ensayo puede ser fácilmente reconocida como una pérdida de resolución entre los puntos gráficos, lo que puede ser evaluado automáticamente por un ordenador. Ello no resulta posible con cualquiera de las variantes de chip, de ADN, ARN o de proteínas, ya que no se produce una relación espacial directa y estrecha. En el caso de que la inmovilización de moléculas utilice además superficies lisas o cuyos poros sean pequeños o inactivos, los materiales de la muestra (matrices de muestras), tales como sangre completa, sangre capilar, suero, plasma, orina, heces o muestras que presenten una elevada viscosidad y/o una coloración fuerte, pueden utilizarse directamente en el método de ensayo según la invención sin métodos de preparación adicionales. Además, pueden utilizarse suspensiones celulares, preparaciones de tejidos o cualquier tipo de solución

El dispositivo según la invención se caracteriza además porque no es un método cromatográfico como el ensayo de flujo lateral (EFL) o el ensayo de flujo continuo (EFC), ni es un método como el ensayo de aglutinación (EA) o el ensayo en fase sólida (EFS), sino que sigue un principio de ensayo de contacto tangencial (ECT). Con este tipo de método según la invención, resulta suficiente que la muestra que debe analizarse entre en contacto con la superficie de inmovilización y en este caso resulta irrelevante si la muestra fluye, se encuentra en reposo o se aplica activa y/o pasivamente sobre la superficie. El principio de ECT difiere especialmente en que, con este método, las superficies de medición y las superficies de control pueden ponerse en contacto simultáneamente con las muestras, en términos tanto temporales como espaciales. De esta manera, no resulta posible, por ejemplo, con la totalidad de los métodos denominados de tira reactiva o con los métodos cromatográficos, ya que la humectación con la muestra siempre tiene lugar secuencialmente -se sumerge una tira en la muestra líquida o la muestra se aspira cromatográficamente a través de materiales o alternativamente unos materiales fluyen a través de la misma. De manera similar, no resulta necesario disponer las superficies de inmovilización de manera que se encuentren óptimamente alineadas con la dirección de flujo (por ejemplo la patente EP nº 0 421 294 B1), titulada "Improved self-performing immunochromatographic device [Dispositivo inmunocromatográfico autoejecutante mejorado]).

La combinación de moléculas inmovilizadas sobre superficies, con independencia del tipo y forma o material, en áreas delimitadas con fines de detección de analitos y una o más superficies de inmovilización gráficamente coordinadas que se encuentran espacialmente próximas con fines de control de la función y/o cuantificación de cada punto de medición de analito utilizando el principio de ensayo de contacto tangencial no ha sido descrita hasta el momento y constituye el dispositivo según la invención.

El dispositivo según la invención es reforzado por un método según la invención caracterizado porque el analito unido mediante moléculas inmovilizadas puede someterse a ensayo mediante una o más reacciones posteriores a las que se hace referencia posteriormente como reacción de detección o reacciones de detección. Los reactivos de detección necesarios para llevar a cabo el método pueden encontrarse presentes sobre la superficie de manera

completamente libre, por ejemplo en forma de liofilizado o en solución, o alternativamente pueden añadirse parcial o completamente en etapas separadas. La ventaja del dispositivo y del método es que pueden utilizarse todos los métodos clásicos de detección, tales como la reacción de antígeno-anticuerpo, los anticuerpos o antígenos marcados, la biotina, la avidina, las sondas de ADN o ARN, los métodos de detección electroquímica o los métodos espectroscópicos. La combinación de dichos métodos de detección con el dispositivo según la invención constituye el método según la invención.

El número y disposición de los elementos de matriz combinados únicamente se encuentran limitados por la aplicación o por el propósito de la aplicación. En aplicaciones que implican una evaluación exclusivamente visual, el límite de resolución del ojo humano es finalmente el factor limitante. En este caso de aplicación, los formatos de hasta 100 matrices han demostrado ser valiosos. En el caso de que se utilicen medios técnicos para la evaluación, dependiendo del método y complejidad técnicas, pueden evaluarse hasta 100.000 elementos de matriz.

Tras la descripción anterior de los antecedentes, un primer aspecto de la presente invención es, de esta manera, un dispositivo para detectar moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, que se caracteriza porque: a) por lo menos dos superficies se modifican química o físicamente en un panel del dispositivo de manera que se proporcionan a dichas superficies medios para inmovilizar moléculas o clases y/o mezclas de moléculas, en las que se utiliza una superficie con fines de control o estandarización, y la otra sirve para detectar un analito, en la que b) las dos superficies están estructuradas de manera que entran en contacto (principio de ensayo de contacto tangencial) en esencialmente el mismo punto temporal con una matriz completa de muestras de la que las moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas deben someterse a ensayo, y c) en la que ambas superficies están estructuras y dispuestas mutuamente de manera que se evalúan conjuntamente, formando de esta manera una disposición gráfica que puede leerse visualmente.

Por lo tanto, la invención se refiere a un panel en el que dos superficies han sido química o físicamente modificadas de manera que pueden inmovilizarse moléculas o clases de moléculas y/o mezclas de las mismas sobre dichas superficies, de manera que pueden formar la base para fines de control o estandarización (interna) por una parte y, por otra, para fines de detección de un analito en una muestra (correspondiente a la matriz de muestras). La inmovilización de materiales de ensayo sobre una superficie es conocida del estado de la técnica y depende de los materiales de ensayo mismos y de la superficie de ensayo. La inmovilización puede tener lugar covalente o no covalentemente y de manera directa o mediante grupos químicos.

Tal como ya se ha explicado anteriormente, debido a la disposición de las superficies (o también de los puntos de medición, puntos de la matriz), el presente ensayo puede proporcionar un control de la función, un control de la calidad y una determinación de la cantidad en cada punto de la matriz, por ejemplo mediante un estándar interno. Lo anterior resulta ventajoso ya que, en el caso de una distribución irregular de la muestra líquida sobre la superficie de ensayo, se producen sobre la superficie diferencias de concentración de los analitos que deben detectarse. Ello inexorablemente conduce a interpretaciones erróneas. Una serie de estándares con o sin un control positivo o negativo exagera este efecto de interpretación errónea en los bordes de los puntos de la matriz o, alternativamente, debidos a tarjetas de color o escala de grises externos. Según la invención, ambas superficies se encuentran estructuradas o dispuestas en el panel unas respecto a otras de manera que pueden evaluarse conjuntamente, de manera que esta estructuración les permite formar un dispositivo gráfico legible visualmente. Por lo tanto, resulta preferente un dispositivo según la invención para el ensayo de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas que se caracteriza porque las superficies están dispuestas unas respecto a otras en niveles, espacialmente y/o en forma sólida. Asimismo, de modo preferente, las superficies se encuentran estructuradas y dispuestas en el panel unas respecto a otras según la invención de manera que pueden evaluarse visualmente de manera conjunta. Dicha evaluación visual se lleva a cabo, por ejemplo, mediante superficies gráficamente coordinadas que se disponen espacialmente muy próximas entre sí.

Según la invención, las dos superficies se encuentran estructuradas de manera que entran en contacto esencialmente en el mismo punto temporal con una matriz de muestras entera en la que unas moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas deben someterse a ensayo. Según la invención, lo anterior se conoce como principio de ensayo de contacto tangencial. Además, con este tipo de método según la invención, resulta suficiente que la muestra que debe analizarse entre en contacto con la superficie de inmovilización y en este caso resulta irrelevante si la muestra fluye, se encuentra en reposo o se aplica activa y/o pasivamente sobre la superficie. Por lo tanto, el principio de ECT difiere de otros métodos especialmente en que, en dicho método, las superficies de medición y las superficies de control pueden ponerse en contacto simultáneamente con las muestras, tanto en términos temporales como espaciales.

Según la invención, la matriz de muestras en la que deben someterse a ensayo el analito o analitos puede encontrarse presente en forma líquida, sólida o gaseosa, o alternativamente en estados físicos intermedios o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto del dispositivo según la invención para detectar moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, dicho dispositivo se caracteriza porque las superficies se representan mediante uno o más símbolos linealmente o en una matriz dispuesta de una manera diferente.

- 5 En todavía otro aspecto del dispositivo según la invención para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, dicho dispositivo se caracteriza porque las moléculas o clases y/o mezclas de moléculas inmovilizadas pueden determinarse visualmente mediante una reacción de detección sin medios técnicos adicionales, de manera que diversas superficies aparecen coloreadas, negras o grises, o se encuentran teñidas en una mezcla de colores y/o tonos de gris.
- 10 Resulta preferente un dispositivo según la invención para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas que se encuentra configurado como recipiente que presenta una o más aberturas. Asimismo, resulta preferente un dispositivo según la invención para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas que se caracteriza porque las superficies están situadas en el interior del recipiente o alternativamente una o más superficies se encuentran situadas sobre las paredes del recipiente.
- 15 En todavía otro aspecto del dispositivo según la invención, para detectar moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, dicho dispositivo se caracteriza porque se hacen visibles parejas de símbolos, "-" significa negativo y "+" significa positivo, o un círculo significa negativo y un círculo con uno o más puntos en el interior significa positivo.
- 20 En todavía otro aspecto del dispositivo según la invención para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, dicho dispositivo se caracteriza porque los medios para inmovilizar moléculas o clases y/o mezclas de moléculas se seleccionan de entre el grupo que consiste de anticuerpos, antígenos, ADN, ARN, enzimas, sustratos, receptores, ligandos o combinaciones de los mismos.
- 25 El objetivo de la presente invención también se consigue mediante un método para detectar moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, comprendiendo dicho método: a) establecer contacto entre una matriz de muestras de la que debe someterse a ensayo moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, y el panel de un dispositivo, de manera que entran en contacto (principio de ensayo de contacto tangencial) en esencialmente el mismo punto temporal en la matriz entera de muestras de la que debe someterse a ensayo moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, en la que por lo menos dos superficies son modificadas química o físicamente en el panel del dispositivo de manera que dichas superficies estén dotadas de medios para inmovilizar moléculas o clases y/o mezclas de moléculas, en los que una superficie se utiliza con fines de control o de estandarización, y la otra sirve para detectar un analito y en los que las dos superficies se encuentran estructuradas y dispuestas una con respecto a la otra de manera que se evalúan conjuntamente, formando de esta manera una disposición gráfica que puede leerse visualmente, y b) una visualización y evaluación de las superficies. Resulta preferente un método según la invención que se caracteriza porque las superficies se leen de una manera plana, de una manera espacial y/o en forma sólida.
- 30 Según otro aspecto del método de la invención, dicho método se caracteriza porque las diversas superficies de detección presentan una apariencia coloreada, negra o gris, o se encuentran tintadas en una mezcla de colores y/o tonos de gris. Preferentemente, las superficies se leen en uno o muchos símbolos linealmente o en una matriz dispuesta de una manera diferente. Son ejemplos de dichos dispositivos, dispositivos de tipo matriz o de tipo tablero de ajedrez o dispuestos formando un círculo, otros símbolos gráficos o letras o números. De manera similar, resulta preferente que los símbolos se hagan visibles: "-" significa negativo y "+" significa positivo, o un círculo significa negativo y un círculo con uno o más puntos en el interior significa positivo.
- 35 Según todavía otro aspecto del método de la invención, dicho método se caracteriza porque unos símbolos que consisten de varios círculos concéntricos que presentan un punto central se hacen visibles, apareciendo dicho punto únicamente en caso de detección positiva, y en el que cada círculo individual sólo se hace visible a una concentración superior a determinado valor de concentración del analito o se hace visible cada una de las puntas de una estrella a una concentración superior a determinado valor de concentración y, en el caso positivo, aparece una punta predefinida o las puntas individuales detectan la presencia de varios analitos y aparece una punta a una concentración superior a determinado valor de concentración, o una combinación de dichas parejas de símbolos.
- 40 Según todavía otro aspecto del método de la invención, dicho método se caracteriza porque la matriz de muestras en la que deben someterse a ensayo el analito o analitos puede encontrarse presente en forma líquida, sólida o gaseosa, o alternativamente en estados físicos intermedios o combinaciones de los mismos. Resulta preferente la utilización de sangre completa, sangre capilar, sangre de cordón umbilical, sangre completa arterial o venosa, suero, plasma, orina, heces, lágrimas, saliva, moco corporal, soluciones colorantes, soluciones que contienen constituyentes sólidos o líquidos de alta viscosidad como la matriz de muestras.
- 45 De manera similar, resulta preferente que las muestras se preparen antes, durante o después mediante purificación, división en alícuotas, derivatización y/o aislamiento con el fin de aplicarlas en el panel según la invención.
- 50 Según todavía otro aspecto del método de la invención, dicho método se caracteriza porque las reacciones de detección de moléculas, clases de moléculas o mezclas de moléculas se seleccionan de entre reacciones de colorantes, nucleótidos radioactivos, anticuerpos, ADN o ARN, biotina, avidina o de detección de enzimas, o combinaciones de las mismas.
- 55

- 5 Resulta preferente un método de la invención en el que las moléculas o clases y/o mezclas de moléculas inmovilizadas pueden someterse a ensayo visualmente mediante una reacción de detección sin ayudas técnicas adicionales. Sin embargo, un método alternativo de la invención puede caracterizarse porque se utilizan ayudas técnicas para la lectura y/o evaluación con el fin de permitir una evaluación visual, o alternativamente un método, por ejemplo se combinan métodos densitométricos, métodos espectroscópicos o electroquímicos con la lectura y/o evaluación según la invención. El método según la invención también puede caracterizarse porque se combina con ensayos de flujo continuo, ensayos de aglutinación y/o ensayos en fase sólida y comprende una, varias o muchas parejas de símbolos. El método según la invención también puede caracterizarse porque se combina con el método de ensayo rápido de flujo lateral y comprende dos, varias o muchas parejas de símbolos.
- 10 Un último aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de un dispositivo de la invención con el fin de detectar moléculas o clases de moléculas en medicina humana, medicina veterinaria o en diagnósticos vegetales, diagnósticos de productos alimentarios, diagnósticos ambientales, diagnósticos forenses, farmacología, toxicología, enfermedades del sistema inmunológico o del sistema metabólico, enfermedades infecciosas, enfermedades venéreas, enfermedades parasitarias, la detección de moléculas pequeñas, tales como fármacos, farmacéuticos o metabolitos, mediadores celulares, tipado de tejidos, tipado de especies, tipado de alimentos, tipado de antígenos, tipado de epítomos y detección de ADN o ARN. Resulta preferente un método según la invención para el diagnóstico inmediatamente antes, durante o después de una medida terapéutica.
- 15

20 Los términos utilizados dentro del alcance de la presente invención presentan los significados siguientes (todavía no se ha estipulado internacionalmente una lista de definiciones tal como la proporcionada posteriormente). Las abreviaturas no listadas a continuación en todos los casos se refieren a los estándares internacionales que han sido estipulados o que se utilizan comúnmente:

División en alícuotas	división de líquido en unidades o volúmenes de menor cantidad, por ejemplo, extracción de una cantidad más pequeña de una muestra.
Analito	molécula o grupo de moléculas que debe detectarse.
EA	ensayo de aglutinación.
Purificación	separación de líquidos, partículas, clases de sustancias, células o componentes celulares, impurezas.
Derivatización	modificación química o física de una sustancia o clase de sustancias.
EFC	ensayo de flujo continuo.
Aislamiento	separación de una sustancia o clase de sustancias respecto de una mezcla compleja, con independencia de si se encuentra presente en fase sólida, gaseosa o líquida o en una combinación de las mismas.
EFL	ensayo de flujo lateral.
Detección	ensayo para la presencia de una o más de las moléculas o grupos de moléculas con o sin cuantificación de los mismos.
Parámetro	sinónimo de analito.
Cuantificación	determinación de la cantidad de moléculas o grupos de moléculas.
EFS	ensayo en fase sólida.
Medios técnicos	la expresión medios técnicos se refiere a todos los medios simples que se utilizan para hacer que los resultados sean visibles, con fines de intensificación, modificación y evaluación o una combinación de los mismos. Por ejemplo, películas, fuentes de luz, todo tipo de detectores, reacciones químicas o físicas utilizadas antes, durante o después de la medición. Las gafas que únicamente sirven para corregir la visión natural no se consideran medios técnicos.
Evaluación visual	evaluación de un resultado medido en exclusiva visualmente o a ojo desnudo. En este contexto, las gafas no se consideran medios técnicos.

Negativo	el analito no se encuentra en la muestra o se encuentra a menos de un valor de corte estipulado.
Positivo	el analito se encuentra en la muestra y/o se encuentra a más de un valor de corte estipulado.
Matriz	sinónimo: disposición ordenada; cualquier disposición y número de superficies que pueda identificarse individualmente dentro de un sistema de coordenadas. Por ejemplo un sistema de coordenadas clásico en tablero de ajedrez o un sistema de coordenadas de PMT.
PMT	placas de microtitulación.
Valor de corte	valor límite de concentración sobre el cual, en caso de encontrarse presente el analito, el resultado debe considerarse positivo al evaluar el resultado.

El método según la invención puede llevarse a cabo en modos técnicos alternativos que difieren entre sí y también puede utilizarse en combinación con métodos clásicos de ensayo rápido.

La invención se explica en mayor detalle posteriormente haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Los ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención, sino que por el contrario sirven para mostrar las posibilidades del método.

5 La fig. 1 muestra ejemplos de parejas gráficas de símbolos con un control positivo simple que presenta un valor de corte definido. Fig. 1 a-símbolo de "cruz"; fig. 1 b-símbolo de "cruz con punto"; fig. 1 c-símbolo de "rombo con rombo interno"; fig. 1 d-símbolo de "polígono con centro poligonal", y fig. 1 e-símbolo de "triángulo con punto".

10 La fig. 2 muestra ejemplos de parejas gráficas de símbolos con una serie graduada de estándares, con o sin un control negativo. Fig. 2 a-símbolo de "estrella con control negativo"; fig. 2 b-símbolo de "círculo sin control negativo".

La fig. 3 muestra ejemplos de realizaciones inventivas de matrices basadas en dos paneles de inhalación (figs. 3 a, b) y dos paneles de alimentos (figs. 3 c, d).

15 La fig. 4 muestra un ejemplo de una realización inventiva de un dispositivo (1) del Ejemplo 7, con una cámara (2), una membrana (3), una tapa (4) de cámara, una abertura superior (5) de la cámara, una abertura inferior (6) de la cámara y un sistema de coordenadas (7).

### Ejemplos

20 El método según la invención puede combinarse con los métodos de ensayo rápido conocidos, tales como el ensayo de flujo lateral (EFL), el ensayo de flujo continuo (EFC), el ensayo de aglutinación (EA) o el ensayo en fase sólida (EFS). Además, todos los métodos ópticos, tales como los métodos densitométricos, espectroscópicos o electroquímicos, pueden combinarse con el método según la invención. Son ejemplos de combinación de tecnologías de procedimiento:

25 1. reacciones de anticuerpo/antígeno, reacciones de sondas de ADN o ARN, reacciones de enzima/sustrato, reacciones de receptor/ligando o reacciones de afinidad superficial u otras combinaciones de los mismos, la totalidad de las cuales puede utilizarse para hacer visibles símbolos conectados directamente de modo gráfico, utilizando el método según la invención, con independencia del nivel de sensibilidad (visualmente o con ayuda de medios técnicos). La selección de la reacción de detección sólo depende del analito o analitos que deben detectarse y de las condiciones bajo las que debe darse la detección.

30 2. La ejecución del método con el dispositivo según la invención utilizando un recipiente especial o sin un recipiente.

3. Ejecución del método llevando a cabo una purificación, división en alícuotas, derivatización y/o aislamiento antes, durante o después.

35 La combinación consistente del dispositivo y el método según la invención puede utilizarse en muchas áreas de aplicación, entre otras el diagnóstico en medicina humana o en medicina veterinaria, el diagnóstico de productos alimentarios, los diagnósticos ambientales y los diagnósticos forenses. Se proporcionan unos cuantos ejemplos seleccionados a continuación, los cuales sirven para ilustrar el alcance de la patente, pero que no deben interpretarse como una limitación de la misma.

1. La combinación consistente del método y el dispositivo según la invención puede utilizarse para el ensayo para perfiles de anticuerpos o epítomos específicos de paciente. En esta combinación deben someterse a ensayo

simultáneamente numerosos anticuerpos o epítomos específicos diferentes en el cuerpo del paciente. Ello resulta necesario en el caso de enfermedades tales como alergias o enfermedades del sistema autoinmunitario o del sistema metabólico.

5 2. La combinación consistente del método y el dispositivo según la invención puede utilizarse para el ensayo para componentes de productos alimentarios. Ello puede llevarse a cabo en dos direcciones, es decir, por una parte el ensayo para ingredientes contenidos en un producto alimentario y, por otra parte, el ensayo para productos alimentarios individuales contenidos en mezclas (alimentos procesados, etc.).

10 3. La combinación consistente del método y el dispositivo según la invención puede utilizarse para la detección de enfermedades infecciosas, enfermedades venéreas o enfermedades parasitarias. En esta combinación pueden someterse a ensayo en matrices tanto antígenos específicos de un germen como anticuerpos específicos de un germen.

4. La combinación consistente del método y el dispositivo según la invención puede utilizarse para el ensayo para enfermedades metabólicas. En esta combinación pueden someterse a ensayo simultáneamente en un ensayo diversos enzimas metabólicos y/o sus metabolitos.

15 5. La combinación consistente del método y el dispositivo según la invención puede utilizarse para la detección de moléculas pequeñas tales como fármacos, farmacéuticos, mediadores celulares o sustancias pequeñas comparables. Estas determinaciones resultan necesarias en análisis farmacológicos, toxicológicos y forenses.

20 6. La combinación consistente del método y el dispositivo según la invención puede utilizarse para el ensayo para especies de ADN y/o ARN. De esta manera, por ejemplo, pueden someterse a ensayo enfermedades metabólicas causadas genéticamente o pueden detectarse infecciones víricas en sus primeros estadios. Además, lo anterior permite realizar todo tipo de tipados de tejidos, incluyendo en seres humanos, animales, plantas y hongos.

#### **Ejemplo 7 Ejemplo de un dispositivo según la invención y utilización del mismo**

25 Un ejemplo de un dispositivo de ECT según la invención y la utilización del mismo por parte del médico implica un ensayo de cribado de detección de alergias para 12 alérgenos alimentarios utilizando dos gotas de sangre. En cada caso también pueden utilizarse 100µl de sangre -EDTA, sangre-heparina o suero. Este ensayo permite una visión global rápida de los alérgenos contra los que reacciona el paciente. Posteriormente puede llevarse a cabo un ensayo cuantitativo de confirmación, así como un ensayo para otros alérgenos. El método se descompone en líneas generales en: a) extracción de sangre (tiempo de incubación para la sangre: 15 minutos), b) procedimiento de lavado (tiempo de incubación del sustrato: 5 a 10 minutos), c) segundo procedimiento de lavado, d) lectura, y e) evaluación.

Contenido del paciente del dispositivo FastCheckPOC® según la invención

- 50 ml de solución de lavado, 300 µl de solución de ensayo, 3 ml de sustrato de colorante
- 1×pipeta, 1×lanceta, 1×capilar, 1×jeringa de plástico de 10 ml, 1×jeringa de plástico de 5 ml
- 1xunidad de filtración con 12 alérgenos y 3 controles
- 35 • información sobre la evaluación del ensayo

Preparaciones/Extracción de sangre

1. Extraer del paquete el capilar, el tubo con tapón enroscable y la lanceta.

2. Abrir el tubo marrón de tapón enroscable de 2 ml que contiene la solución de ensayo y colocarlo verticalmente sobre una superficie nivelada.

40 3. Extraer la sangre, por ejemplo de la punta de un dedo utilizando, por ejemplo, la lanceta. En cada caso también pueden utilizarse 100 µl de sangre-EDTA, sangre-heparina o suero.

4. Extraer el capilar del tubo transparente y abrir el tapón. Recoger dos gotas completas de sangre con el capilar. Añadir la sangre al tubo de tapón enroscable que contiene la solución de ensayo. Como resultado, se transfiere la sangre a la solución de ensayo.

45 Ejecución del ensayo

1. Abrir la botella que contiene la solución de lavado y la cámara con el filtro de ensayo y humedecer el filtro de ensayo con una cantidad reducida de la solución de lavado. Debería utilizarse una pipeta desechable para mezclar uniformemente el líquido.

50 2. Recoger la totalidad de la solución de ensayo de sangre con la pipeta desechable. Aplicar dicha solución sobre el filtro en la cámara de ensayo y esparcir la solución sobre la membrana utilizando la pipeta desechable.

3. Cerrar la cámara, inicialmente sólo hasta donde pueda cerrarse la pequeña pestaña en el lado derecho de la cámara de ensayo. La floculación de la sangre no afecta negativamente al resultado. Sin embargo, no debe dejarse sangre sobre la tapa de la cámara, ya que de lo contrario el filtro no se empapará adecuadamente. El tiempo de incubación es de 15 minutos.
- 5 4. Cerrar completamente la cámara de ensayo. Tras el cierre completo, la cámara ya no puede abrirse. Retirar la tapa de cierre de la abertura de la cámara superior.
- 10 5. En una primera etapa de lavado, en primer lugar enjuagar la cámara de ensayo con agua corriente. Con este fin, fijar la jeringa (10 ml) a la abertura superior de la cámara y se impulsa agua de modo uniforme hacia el interior de la cámara. Sostener la cámara con la abertura inferior sobre un desagüe o recipiente en donde pueda drenarse el líquido. Repetir el procedimiento 2 ó 3 veces. El filtro podría mostrar una coloración rosa. Recoger la solución de enjuague con la jeringa (10 ml) e inyectarla por la abertura de la cámara superior en el interior de la carcasa mediante la aplicación de una presión lenta y constante. Parte de la solución de lavado permanece en la cámara durante 2 minutos y sólo entonces se retira la jeringa de la abertura de manera que el líquido pueda drenar por completo. Se repite este procedimiento 2 veces más. A continuación, el filtro de ensayo se enjuaga dos veces con 10 ml de solución de lavado cada vez. Se deja que drene el líquido.
- 15 6. Rellenar la pequeña jeringa de 5 ml con sustrato (botella negra de 3 ml) y conectarla con la cámara en la abertura grande en la parte superior, sosteniendo la carcasa en posición horizontal durante este procedimiento para evitar la formación de burbujas de aire. Inyectar el sustrato de manera uniforme en la cámara.
- 20 7. Dejar la cámara de ensayo en posición horizontal sobre una superficie nivelada. La cámara debe encontrarse horizontal y la jeringa debe permanecer en la abertura de la cámara de manera que no puedan producirse fugas de sustrato. Incubar el sustrato durante 5 a 10 minutos en la cámara.
8. Retirar la jeringa y dejar que drene el líquido de la cámara.
9. Rellenar con agua corriente utilizando la jeringa grande de plástico (10 ml) y conectarla con la abertura superior de la cámara.
- 25 10. Enjuagar la membrana con el contenido de la jeringa sosteniendo la cámara con la segunda abertura, de menor tamaño, orientada hacia abajo sobre un desagüe o recipiente en el que pueda drenar el líquido de enjuague. El procedimiento debe repetirse, aunque ahora debe quedar cierta cantidad de agua en la cámara para facilitar la lectura. La evaluación debe llevarse a cabo en los 10 minutos siguientes, ¡mientras el filtro todavía se encuentra húmedo! En el caso de que el tiempo de espera sea mayor, podrían producirse reacciones posteriores no específicas que falsifiquen el resultado.
- 30

#### Evaluación

1. El filtro de ensayo presenta cinco filas en tres columnas. La fila inferior contiene, de izquierda a derecha, un control negativo, un control de valor límite y un control positivo, mientras que las otras cuatro filas contienen los alérgenos.
- 35 2. Evaluar los resultados basándose en el sistema de coordenadas y transferirlos al formulario de evaluación.
3. Un signo menos (-) indica que el ensayo es negativo; no se detectan alergias. Un signo más (+) indica una reacción positiva, se detecta una IgE específica contra el alérgeno en cuestión. La posición de los alérgenos se indica en el formulario de evaluación.
4. Marcar el resultado en la columna apropiada del formulario de evaluación.

#### 40 Lista de la literatura de patentes citada

- DE 19721151, EP 98928264.5, WO 98/53321, titulada "Streifentest zur *in vitro* Allergiediagnostik" [Strip test for *in vitro* allergy diagnosis] (Ensayo de tira para el diagnóstico *in vitro* de alergias)
- EP 0 421 294 B1, titulada "Improved self-performing immunochromatographic device [Dispositivo inmunocromatográfico autoejecutante mejorado]
- 45 - EP 1 369 391; WO 96/10747, titulado "Device and method utilizing arrays of structures for analyte capture" [Dispositivo y método que utiliza matrices de estructuras para la captura de analitos]
- WO 03/094716; US 2003-212316, titulado "Method and apparatus for determining blood parameters and vital signs of a patient" [Método y aparato para determinar parámetros sanguíneos y signos vitales en un paciente]
- 50 - WO 02/084249, titulado "Therapeutic and diagnostic uses of antibody specificity profiles" [Usos terapéuticos y diagnósticos de perfiles de especificidad de anticuerpos]

- WO 00/40967, titulado "Method and device for diagnosing allergy symptoms" [Método y dispositivo para el diagnóstico de síntomas de alergia]
- EP 0875758 B1 Immunoassay [Inmunoensayo]
- 5 - WO 02/066602, EP 1350111; WO 93/10458, titulado "Binding of milk allergens to a solid phase" [Unión de alérgenos de la leche a una fase sólida]
- EP 1338895, titulado "High-density allergen microarray" [Micromatriz de alérgenos de alta densidad]
- patente US nº 6.528.325, WO 02/056017, titulado "Method for the visual detection of specific antibodies in human serum by the use of lateral flow assays" [Método para la detección visual de anticuerpos específicos en suero humano mediante la utilización de ensayos de flujo lateral]
- 10 - EP 1327884, titulado "Reagent test strip comprising control means and timer means" [Tira de ensayo de reactivos que comprende medios de control y medios de medición del tiempo]
- WO 97/31268, titulado "Chromatographic strip having detection and control zones oriented parallel to the direction of flow" [Tira cromatográfica con zonas de detección y de control orientadas en paralelo a la dirección de flujo]
- patente US nº 6.040.195, titulada "Diagnostic sanitary test strip" [Tira de ensayo sanitario diagnóstica]
- 15 - patente US nº 6,509,196, WO 01/50129, titulado "Compensation for non-specific signals in quantitative immunoassays" [Compensación de señales no específicas en inmunoensayos cuantitativos]

## REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas en medicina humana, medicina veterinaria o en diagnósticos vegetales, diagnósticos de alimentos, diagnósticos ambientales, diagnósticos forenses, farmacología, toxicología, enfermedades autoinmunitarias o metabólicas, enfermedades infecciosas, enfermedades genitales, enfermedades parasitarias, en la determinación de moléculas pequeñas tales como fármacos, medicaciones o metabolitos, mediadores celulares, en el tipado de tejidos, tipado de especies, tipado de alimentos, tipado de antígenos, tipado de epítomos y en la detección de ADN o ARN, caracterizado por:
- 5 a) como mínimo dos áreas superficiales en una superficie del dispositivo están provistas de moléculas inmovilizadas o clases de moléculas, en el que un área superficial se utiliza con fines de control o de estandarización, y el otro área superficial se utiliza para detectar un analito, en el que:
- 10 b) las dos superficies se encuentran estructuradas de manera que entran en contacto esencialmente en el mismo punto temporal con una muestra entera de la que deben determinarse algunas moléculas o o clases de moléculas o mezclas de moléculas, y
- 15 c) en el que ambas áreas superficiales se encuentran estructuradas y dispuestas una respecto a otra de manera que se evalúan conjuntamente mediante la formación de una disposición gráfica que puede leerse visualmente, y
- d) en el que las áreas superficiales se disponen en un sistema de coordenadas o matriz y pueden ser evaluadas a ojo desnudo, y
- e) en el que dicho dispositivo se diseña en forma de recipiente,
- 20 f) en el que las áreas superficiales están representadas por una pluralidad de símbolos de manera lineal o en una matriz que se dispone de una manera diferente.
2. Dispositivo para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas según la reivindicación 1, caracterizado porque las áreas superficiales presenta una disposición plana y/o espacial unas respecto a otras.
3. Dispositivo para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque las áreas superficiales están representadas por uno o más símbolos de una manera lineal o en una matriz que se dispone de una manera diferente.
- 25 4. Dispositivo para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque las moléculas inmovilizadas o clases de moléculas se evalúan conjuntamente de manera visual mediante una reacción de detección sin medios técnicos adicionales, en el que las diversas áreas superficiales presentan una apariencia coloreada, negra o gris o en una mezcla de colores y/o tonos de gris.
- 30 5. Dispositivo para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el dispositivo está diseñado en forma de recipiente que comprende una o más aberturas.
- 35 6. Dispositivo para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas según la reivindicación 5, caracterizado porque las áreas superficiales se sitúan en el interior del recipiente o una o más áreas superficiales se sitúan sobre las paredes del recipiente.
7. Dispositivo para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque las áreas superficiales se hacen visibles como símbolos, "-" significa negativo y "+" significa positivo, o un círculo significa negativo y un círculo con uno o más puntos en el interior significa positivo.
- 40 8. Dispositivo para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque las moléculas o clases y/o mezclas de moléculas inmovilizadas se seleccionan de entre el grupo que consiste de anticuerpos, antígenos, ADN, ARN, enzimas, sustratos, receptores, ligandos o combinaciones de los mismos.
- 45 9. Método para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas en medicina humana, medicina veterinaria o en diagnósticos vegetales, diagnósticos de alimentos, diagnósticos ambientales, diagnósticos forenses, farmacología, toxicología, enfermedades autoinmunitarias o metabólicas, enfermedades infecciosas, enfermedades genitales, enfermedades parasitarias, la determinación de moléculas pequeñas tales como fármacos, medicaciones o metabolitos, mediadores celulares, en el tipado de tejidos, tipado de especies, tipado de alimentos, tipado de antígenos, tipado de epítomos y en la detección de ADN o ARN, comprendiendo las etapas siguientes:
- 50

- 5 a) establecer contacto entre una muestra de la que deben determinarse algunas moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas y una superficie de un dispositivo, de manera que este dispositivo entra en contacto esencialmente de manera simultánea con la muestra entera de la que deben determinarse moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas, en el que como mínimo dos áreas superficiales en la superficie del dispositivo están provistas de moléculas o clases y/o mezclas de moléculas inmovilizadas de manera que un área superficial se proporciona con fines de control o de estandarización, y la otra se proporciona para la detección de un analito, y en el que ambas áreas superficiales están estructuradas y dispuestas una respecto a otra de manera que se evalúan conjuntamente mediante la formación de una disposición gráfica que puede leerse visualmente, y
- 10 b) leer y evaluar las áreas superficiales basándose en un sistema de coordenadas o matriz,
- en el que dicho dispositivo ha sido diseñado en forma de recipiente y las áreas superficiales están representadas por una pluralidad de símbolos de manera lineal o en una matriz que se dispone de una manera diferente.
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque las áreas superficiales se leen en plano y/o espacialmente.
- 15 11. Método según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque las áreas superficiales se leen como uno o más símbolos de una manera lineal o en una matriz que se dispone de una manera diferente.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que las áreas superficiales se hacen visibles como símbolos, "-" significa negativo y "+" significa positivo, o un círculo significa negativo y un círculo con uno o más puntos en el interior significa positivo.
- 20 13. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque se hacen visibles símbolos que consisten de varios círculos concéntricos que presentan un punto central, apareciendo dicho punto únicamente en caso de detección positiva, y en el que cada círculo individual sólo se hace visible a una concentración superior a determinado valor de concentración del analito o se hace visible cada una de las puntas de una estrella a una concentración superior a determinado valor de concentración y, en el caso positivo, aparece un punto predefinido o
- 25 los puntos individuales detectan varios analitos y aparece un punto a una concentración superior a determinado valor de concentración, o una combinación de dichos símbolos.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado porque se utiliza a modo de muestra sangre completa, sangre capilar, sangre de cordón umbilical, sangre completa arterial o venosa, suero, plasma, orina, heces, lágrimas, saliva, moco, soluciones colorantes, soluciones que contienen constituyentes sólidos o
- 30 líquidos de alta viscosidad.
15. Utilización de un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la detección de moléculas o clases de moléculas o mezclas de moléculas en medicina humana, medicina veterinaria o en diagnósticos vegetales, diagnósticos de alimentos, diagnósticos ambientales, diagnósticos forenses, farmacología, toxicología, enfermedades autoinmunitarias o metabólicas, enfermedades infecciosas, enfermedades genitales, enfermedades parasitarias, la determinación de moléculas pequeñas tales como fármacos, medicaciones o metabolitos, mediadores celulares, en el tipado de tejidos, tipado de especies, tipado de alimentos, tipado de antígenos, tipado de epítomos y en la detección de ADN o ARN.
- 35

---

**Figura 1a**

Imagen global en caso de presencia de analito en la muestra y de que el control indique un resultado positivo

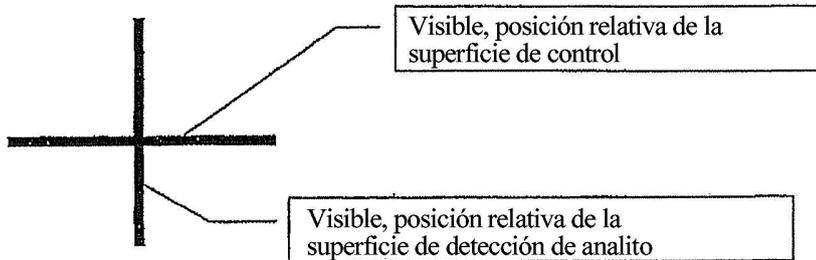
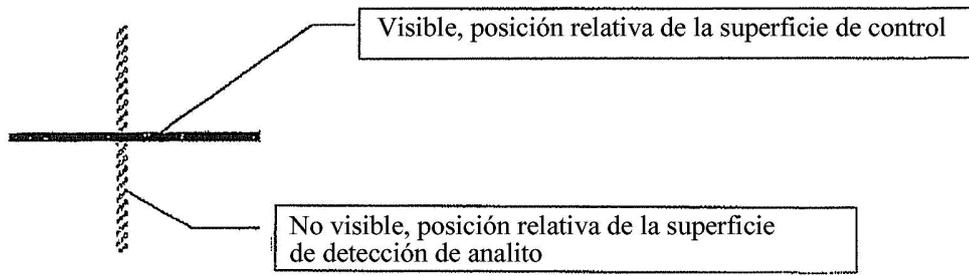
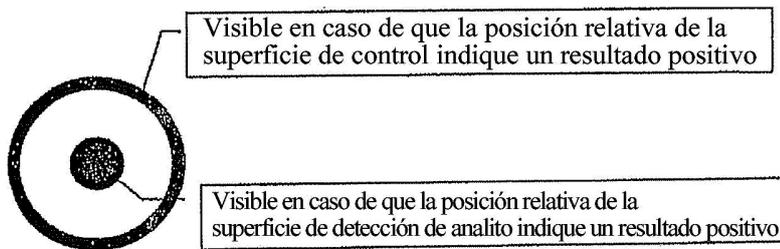


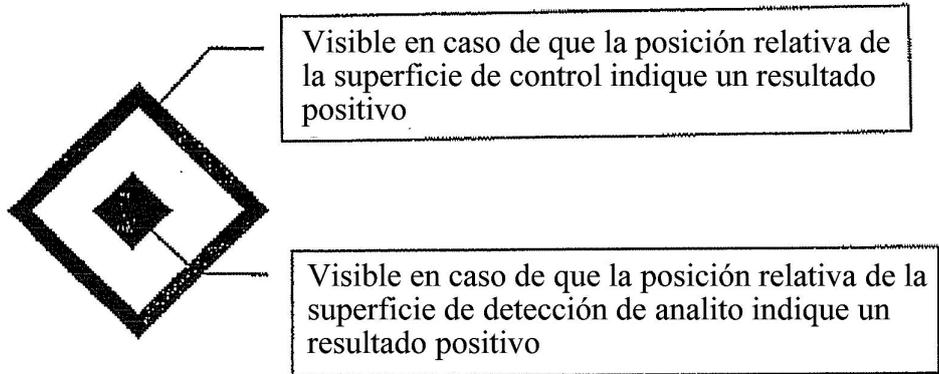
Imagen global en caso de ausencia de analito en la muestra y de que el control indique un resultado negativo



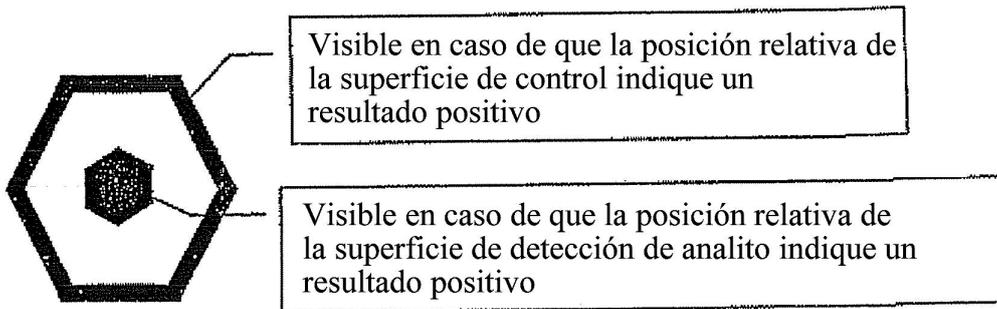
**Figura 1b**



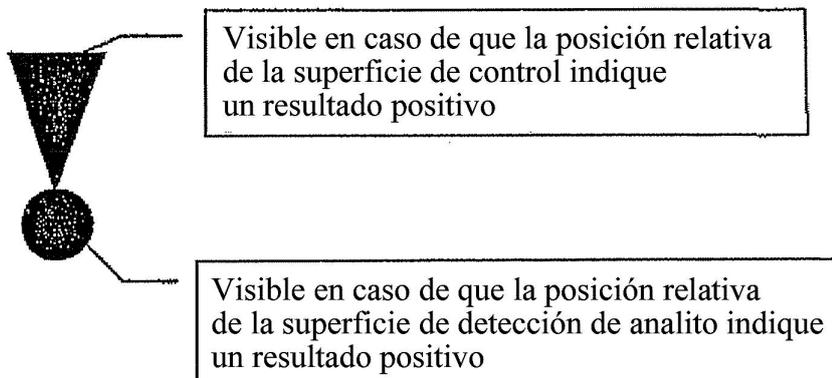
**Figura 1c**



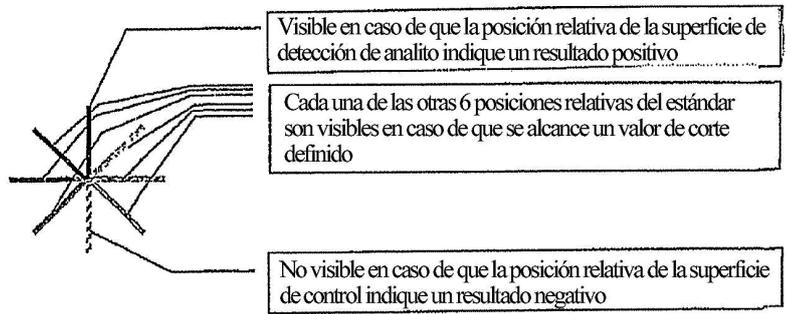
**Figura 1d**



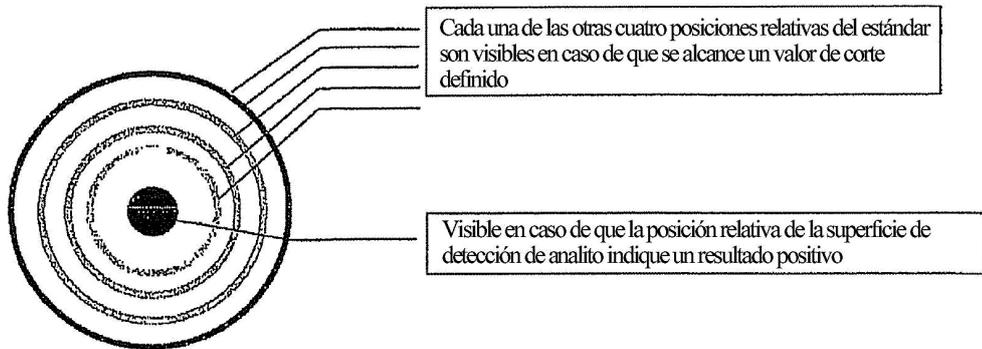
**Figura 1e**



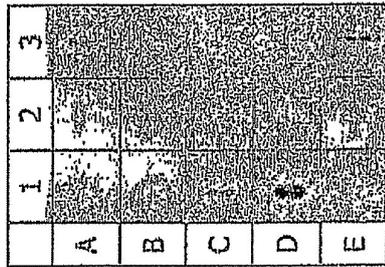
**Figura 2a**



**Figura 2b**

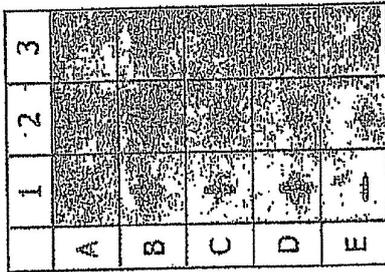


**Figura 3**



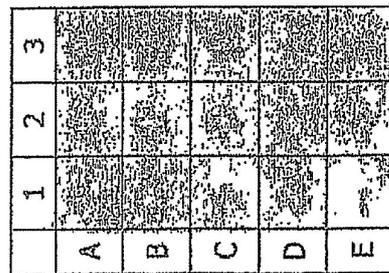
**Panel de inhalación**

Resultado de ensayo de una persona con múltiples alergias, con una reacción particularmente fuerte en D1 (polen de Artemisa). El control interno es difícil de identificar en esta posición



**Panel de inhalación**

Resultado de ensayo de una persona con múltiples alergias, con una reacción particularmente fuerte al polen del avellano y al polen del abedul (B1, 2), así como al polen de Artemisa (D1).



**Panel de alimentos**

Resultado de ensayo de una persona con múltiples alergias, con una reacción particularmente fuerte a la avellana (A2), los cacahuetes (B2), la soja (C2), tipos de harina (D2, A3), zanahorias (B3) y apio (C3).



**Panel de alimentos**

El resultado del ensayo es negativo. Los símbolos positivos en la fila E pertenecen a los controles positivos, E2: línea límite E3: positivo

b

d

a

c

**Figura 4**

