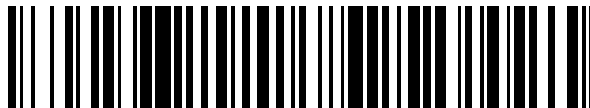


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 114**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2008** **E 08877352 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2352026**

54 Título: **Tira de prueba para líquidos y procedimiento**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2013

73 Titular/es:

ACTHERM INC. (100.0%)
6F, No. 18, Jhanye 2nd Road Hsinchu Science
Park
Hsinchu 30078, TW

72 Inventor/es:

WU, YI-JEN;
HSIEH, WEN-PIN y
HSIEH, CHIH-WEI

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 429 114 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

Tira de prueba para líquidos y procedimiento.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a una tira de prueba para líquidos y, más especialmente, a una tira de prueba para líquidos para ensayos cuantitativos de líquidos biológicos.

2. Descripción de la técnica relacionada

[0002] Los ensayos analíticos cuantitativos tradicionales utilizan una capacidad única que tienen las moléculas inmunológicas, las cuales pueden reconocer y también unirse a las moléculas biológicas de manera específica. Por ejemplo, el enzimoimmunoanálisis de adsorción tradicional (ELISA), que se realiza típicamente en una placa de 96 pocillos, se caracteriza porque determina la concentración de un analito (es decir, un antígeno) por la intensidad de una señal detectada que resulta de la reacción entre el analito, las moléculas inmunológicas correspondientes, las enzimas y los reactivos correspondientes. Sin embargo, habitualmente los usuarios necesitan llevar a cabo un tedioso lavado en cada etapa del ensayo para eliminar las moléculas sin unir y las moléculas de unión inespecífica, para evitar que el ensayo falle o que se produzcan falsos positivos.

[0003] Con el progreso de la tecnología, en la actualidad los ensayos analíticos inmunológicos se llevan a cabo con tiras de prueba para líquidos que cuentan con canales microfluídicos para simplificar o incluso omitir las complicadas y repetidas tareas de lavado requeridas tradicionalmente después de cada etapa de reacción del ensayo. Sin embargo, la tira de prueba para líquidos conocida, en la que es necesario añadir manualmente a dicha tira de prueba para líquidos los reactivos o los sustratos requeridos para las reacciones, es desventajosa para los usuarios. Los reactivos o los sustratos requeridos para las tiras convencionales tienden a degradarse a temperatura ambiente o a la luz después de un almacenamiento prolongado, lo que resulta en errores en el ensayo. Por consiguiente, tales reactivos necesitan almacenarse en condiciones específicas, como refrigeración o a prueba de luz. En consecuencia, sin embargo, las tiras de prueba para líquidos convencionales son desventajosas en cuanto a uso y almacenamiento.

[0004] Además, las tiras de prueba para líquidos convencionales con canales o con canales microfluídicos presentan otros problemas. Aunque un canal o canal microfluídico tal está rodeado de un material no absorbente y normalmente la viscosidad de la muestra líquida para analizar es alta porque la muestra se compone principalmente de proteínas o carbohidratos, parte de la muestra líquida tiende a adherirse a la superficie del canal y no participará en la reacción. Un escenario tal, si se produce, no solamente causa desventajosamente la pérdida de muestra líquida para analizar, sino que también tiene un efecto adverso en la precisión de los ensayos cuantitativos.

[0005] Adicionalmente, la tira de prueba para líquidos convencional puede facilitar el flujo de la muestra líquida por los canales microfluídicos, de modo que la muestra líquida sea suministrada al área de reacción por la fuerza capilar ejercida por las estructuras de tales canales. Otra estrategia alternativa para suministrar la muestra líquida supone la aplicación de una fuerza impulsora, como presurización, en el momento en que la muestra líquida se introduce en el canal, de modo que la muestra líquida sea impulsada al área de reacción a través del canal. Sin embargo, las dos estrategias mencionadas anteriormente tienden a causar la producción de burbujas de aire después de haber introducido la muestra líquida en el canal. Estas burbujas, ya sean grandes o pequeñas, bloquearán el canal y darán lugar a resultados imprecisos en el análisis.

[0006] El documento US 6.218.134 B1 describe un dispositivo de prueba y un procedimiento para uso del mismo. El dispositivo de prueba incluye una matriz, moléculas de anticuerpo inmovilizadas en la matriz y un generador de una sustancia señal, dispuesto en la matriz de manera móvil. Cuando se suministra una sustancia para su análisis, dicha sustancia se acopla con las moléculas de anticuerpo y los generadores de la sustancia señal se mueven hacia dicha sustancia para acoplarse con ella. Una sustancia relacionada con la generación de una sustancia señal alcanza a los generadores de la sustancia señal con el fin de formar una sustancia señal que, en función de la distancia a un electrodo, se mueve hacia dicho electrodo hasta alcanzarlo y proporciona una señal proporcional a la cantidad de la sustancia de ensayo. Sin embargo, este dispositivo de prueba tiene la desventaja de que se requiere mucho tiempo hasta que el generador de la sustancia señal alcanza la sustancia de ensayo y existe el riesgo de que también alcance el electrodo una sustancia señal formada por la reacción de la sustancia

relacionada con la generación de la sustancia señal con un generador de sustancia señal acoplado a la sustancia de ensayo, lo que conduciría a un resultado de detección erróneo. Por lo tanto, a partir de este estado de la técnica, el objetivo de la presente invención es proporcionar una tira de prueba y un procedimiento para uso de la misma que permitan una detección acelerada y al mismo tiempo garanticen un resultado de detección fiable.

5

RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] El objetivo mencionado anteriormente se consigue mediante la tira de prueba de acuerdo con la reivindicación 1 y el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5. Algunas mejoras ventajosas de la invención se describen en las reivindicaciones subordinadas correspondientes.

[0008] Para solucionar las deficiencias mencionadas anteriormente, la presente invención desvela una tira de prueba para líquidos para el ensayo cuantitativo de muestras líquidas. La tira de prueba para líquidos comprende un sustrato con al menos un canal en el mismo. El canal tiene una primera región para recibir una muestra líquida, una segunda región y una tercera región. Estas regiones están dispuestas sucesivamente. La primera región se usa para la introducción de la muestra líquida en la misma. Además, la tira de prueba para líquidos tiene una capa de fibra dispuesta en el fondo de la primera región y una capa de nitrocelulosa dispuesta en el fondo de cada una de las regiones segunda y tercera. Adicionalmente, el canal contiene un primer anticuerpo, un sacárido, una peroxidasa, un segundo anticuerpo, un sustrato óptico y un reactivo de sustrato. El primer anticuerpo se localiza en la primera región y está integrado en la capa de fibra para el reconocimiento de un analito en la muestra líquida. El sacárido y la peroxidasa pueden localizarse en la primera o en la segunda región. El segundo anticuerpo está inmovilizado en la segunda región, en la capa de nitrocelulosa, para el reconocimiento del mismo analito que el primer anticuerpo. Sin embargo, el segundo anticuerpo y el primer anticuerpo están configurados para reconocer diferentes epítomos del analito. El sustrato óptico y el reactivo de sustrato, que comprende una sacárido-oxidasa, se localizan en la tercera región y el reactivo del sustrato está integrado en la capa de nitrocelulosa. Al introducir la muestra líquida en el canal, el primer anticuerpo, el sacárido y la peroxidasa fluirán junto con la muestra líquida. El primer anticuerpo y la peroxidasa, cuando esta se localiza en la primera región, pueden conjugarse entre sí. Alternativamente, el primer anticuerpo puede conjugarse además con biotina, mientras que la peroxidasa puede conjugarse con una molécula seleccionada del grupo que consta de avidina, estreptavidina y neutravidina, con lo que se forma un complejo de biotina y avidina. Una cantidad parcial de la peroxidasa, el primer anticuerpo y el analito se unirán conjuntamente al segundo anticuerpo y, de este modo, quedan retenidos en la segunda región. La peroxidasa sin unir fluirá a la tercera región junto con la muestra líquida. El sacárido será oxidado por la sacárido-oxidasa para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Después, el sustrato óptico y el peróxido de hidrógeno producido serán catalizados por la peroxidasa en la tercera región para producir una señal óptica.

35

[0009] Por lo tanto, un objetivo primordial de la presente invención es proporcionar una tira de prueba para líquidos que contenga en su mayor parte los reactivos y materiales requeridos para la reacción, sin etapas complicadas.

[0010] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una tira de prueba para líquidos en la que, en su mayor parte, los reactivos y materiales requeridos para la reacción contenidos en la misma estén en forma seca, de modo que la tira de prueba para líquidos pueda almacenarse durante un periodo relativamente prolongado antes de su uso y se eviten los errores de ensayo debidos a la degradación de los reactivos.

[0011] La presente invención desvela también un procedimiento para un ensayo cuantitativo. El procedimiento comprende las etapas siguientes. (1) Proporcionar una muestra líquida que contiene un analito. (2) Proporcionar un sustrato. El sustrato tiene al menos un canal que comprende una primera región para recibir la muestra, una segunda región y una tercera región. Estas tres regiones están dispuestas sucesivamente. La primera región se usa para la introducción de una muestra líquida en la misma. La tira de prueba para líquidos tiene además una capa de fibra dispuesta en el fondo de la primera región y una capa de nitrocelulosa dispuesta en el fondo de cada una de las regiones segunda y tercera. El sustrato comprende además un primer anticuerpo, un sacárido, una peroxidasa, un segundo anticuerpo, un sustrato óptico y un reactivo de sustrato. El primer anticuerpo se localiza en la primera región y está integrado en la capa de fibra para el reconocimiento del analito en la muestra líquida. El sacárido y la peroxidasa pueden localizarse en la primera o en la segunda región. El segundo anticuerpo está inmovilizado en la segunda región, en la capa de nitrocelulosa, para el reconocimiento del analito en la muestra líquida. El segundo anticuerpo y el primer anticuerpo están configurados para reconocer diferentes epítomos de un analito idéntico en la muestra líquida. El sustrato óptico y el reactivo de sustrato se localizan en la tercera región y el reactivo de sustrato comprende una sacárido-oxidasa y está integrado en la capa de nitrocelulosa y comprende una sacárido-oxidasa. (3) Introducir la muestra líquida en la primera región del canal para permitir que el primer anticuerpo, el sacárido y la

peroxidasa fluyan conjuntamente con la muestra líquida. El primer anticuerpo y la peroxidasa, cuando esta se localiza en la primera región, pueden conjugarse entre sí. Alternativamente, el primer anticuerpo puede conjugarse además con biotina, mientras que la peroxidasa puede conjugarse con una molécula seleccionada del grupo que consta de avidina, estreptavidina y neutravidina, con lo que se forma un complejo de biotina y avidina. (4) Unión del analito al primer anticuerpo, al segundo anticuerpo y a una cantidad parcial de la peroxidasa, de modo que queden retenidos en la segunda región. El sacárido, el primer anticuerpo sin unir y la peroxidasa sin unir fluirán a la tercera región junto con la muestra líquida, de modo que el sacárido será oxidado por la sacárido-oxidasa para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Entonces se hace reaccionar al sustrato óptico con el peróxido de hidrógeno producido, lo que es catalizado por la peroxidasa que llega a la tercera región. Y (5) detectar la señal óptica generada.

[0012] Por consiguiente, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para un ensayo cuantitativo que use una tira de prueba para líquidos que contenga en su mayor parte los reactivos y materiales requeridos para la reacción, de modo que el resultado del ensayo pueda obtenerse mediante la detección directa de la señal de la reacción, sin complicadas etapas de operación.

[0013] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para un ensayo cuantitativo que use una tira de prueba para líquidos en la que, en su mayor parte, los reactivos y materiales requeridos para la reacción contenidos en esta estén almacenados en forma seca, de modo que la tira de prueba para líquidos pueda almacenarse durante un período relativamente prolongado antes de su uso y se eviten los errores de ensayo debidos a la degradación de los reactivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014] La invención, así como un modo de uso preferido, otros objetivos y ventajas de la misma se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas al leerla conjuntamente con los dibujos adjuntos, en que:

la figura 1A es una vista en perspectiva de una tira de prueba para líquidos de acuerdo con una primera realización de la presente invención;

la figura 1B es un dibujo esquemático que muestra la distribución de los materiales de reacción en un canal de la tira de prueba para líquidos de la figura 1;

las figuras 1C a 1E son dibujos esquemáticos que muestran la variación de la distribución de los materiales de reacción en el canal de la tira de prueba para líquidos de la figura 1;

las figuras 1F a 1H son dibujos esquemáticos que muestran una variación alternativa de la distribución de los materiales de reacción en el canal de la tira de prueba para líquidos de la figura 1;

la figura 1I es una vista en perspectiva seccionada de la tira de prueba para líquidos de la figura 1; y

la figura 2 es un organigrama de un procedimiento de detección de acuerdo con una segunda realización de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0015] Aunque la presente invención propone una tira de prueba para líquidos y un procedimiento de detección mediante el uso de la misma, los principios físicos y químicos del ensayo biológico son conocidos por los expertos en la técnica y no necesitan ser discutidos en ningún detalle en este documento. Mientras tanto, los dibujos adjuntos a los que se hace referencia en la descripción siguiente se proporcionan con fines ilustrativos y no necesitan hacerse a escala.

[0016] Para una vista en perspectiva de una tira de prueba para líquidos de acuerdo con una primera realización de la presente invención se hará referencia a la figura 1A. La tira de prueba para líquidos 1 comprende un sustrato 10 con un canal 11 dispuesto sobre el mismo. El canal 11 tiene una primera región 111, una segunda región 112 y una tercera región 113. Estas regiones están dispuestas sucesivamente. La primera región 111 es para introducir una muestra líquida en la misma.

[0017] La figura 1B es un dibujo esquemático que muestra la distribución de los materiales de reacción en el canal 11 de la tira de prueba para líquidos 1. La primera región 111 contiene un primer anticuerpo 1111, un sacárido 1112 y una peroxidasa 1113. La segunda región 112 contiene un segundo anticuerpo 1121 inmovilizado en la misma. El primer anticuerpo 1111 y el segundo anticuerpo 1121 están configurados para reconocer diferentes epitopos de un idéntico analito 1101 en la muestra líquida. Por lo tanto, el primer anticuerpo 1111 y el segundo anticuerpo 1121 podrían ser anticuerpos monoclonales (mAb) o anticuerpos policlonales (pAb), siempre que el primer anticuerpo 1111 y el segundo anticuerpo 1121 no compitan entre sí por el mismo antígeno y por tanto interfieran con el reconocimiento del antígeno. Adicionalmente, el primer anticuerpo 1111 así como el segundo anticuerpo 1121, pueden ser un anticuerpo completo, un fragmento de unión a antígenos (fragmento Fab) o estar en la forma de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Un sustrato óptico 1131 y un reactivo de sustrato 1132 que comprende una sacárido-oxidasa 1133 se localizan en la tercera región 113. La peroxidasa 1113 puede ser una HRP (peroxidasa de rábano), una AP (ascorbato-peroxidasa) o una peroxidasa de hidrógeno. El sustrato óptico 1131 es preferentemente 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona y el sacárido 1112 es preferentemente glucosa, mientras que la sacárido-oxidasa 1133 es glucosa-oxidasa.

15

[0018] Con referencia a las figuras 1C a 1E, las figuras son dibujos esquemáticos que muestran la variación de la distribución de los materiales de reacción en el canal 11 de la tira de prueba para líquidos 1 en diferentes etapas de la reacción. En la figura 1C, después de que la muestra líquida que contiene el analito 1101 se introduce en el canal 11, el primer anticuerpo 1111 reconoce el analito 1101 y se une a él. Dado que el primer anticuerpo 1111, el sacárido 1112 y la peroxidasa 1113 no están inmovilizados en la primera región 111, el primer anticuerpo 1111, el analito 1101 unido al primer anticuerpo 1111, la peroxidasa 1113 y el sacárido 1112 fluirán junto con la muestra líquida hacia la segunda región 112.

[0019] Con referencia a la figura 1D, después de que la muestra líquida llega a la segunda región 112, el segundo anticuerpo 1121 se une al analito 1101 y de este modo se forma un complejo de unión que comprende el primer anticuerpo 1111, el analito 1101 y el segundo anticuerpo 1121. El segundo anticuerpo 1121 está inmovilizado en la segunda región 112. Por consiguiente, el primer anticuerpo 1111 unido al analito 1101, el analito 1101 unido al segundo anticuerpo 1121 y la peroxidasa 1113 conjugada con el primer anticuerpo 1111 quedarán retenidos en la segunda región 112. Sin embargo, el sacárido 1112 que fluye junto con la muestra líquida a la segunda región 112 sigue fluyendo hacia la tercera región 113 junto con la muestra líquida y junto con el primer anticuerpo 1111 sin unir, así como con la peroxidasa 1113 conjugada con el primer anticuerpo 1111 sin unir.

[0020] Con referencia ahora a la figura 1E, el sacárido 1112, el primer anticuerpo 1111 sin unir y la peroxidasa 1113 conjugada con el primer anticuerpo 1111 sin unir fluyen ahora a la tercera región 113. Entonces, el sacárido 1112 reacciona con la sacárido-oxidasa 1133 integrada en la tercera región 113, con lo que se produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El peróxido de hidrógeno resultante y el sustrato óptico 1131 son catalizados por la peroxidasa 1113 que está ahora en la tercera región 113, de modo que se genera una señal óptica. En consecuencia, mediante la detección de la intensidad de la señal óptica generada se determina la concentración de la enzima implicada en la reacción. En otras palabras, mediante la detección de la intensidad de la señal óptica generada, puede determinarse la cantidad de peroxidasa 1113 que llega a la tercera región 113 y está implicada en la reacción. Además, dado que la peroxidasa 1113 se incluye en una cantidad constante en la tira de prueba para líquidos 1 durante la fabricación, es fácil determinar la cantidad de peroxidasa 1113 retenida en la segunda región 112 mediante una simple sustracción ([cantidad de peroxidasa 1113 retenida en la segunda región 112] = [cantidad total de peroxidasa 1113] - [cantidad de peroxidasa 1113 que fluye a la tercera región 113]). Finalmente, usando la cantidad de peroxidasa 1113 retenida en la segunda región 112, es posible calcular la concentración del analito 1101 en la muestra líquida, con lo que se consigue un ensayo cuantitativo.

[0021] Antes de la reacción, preferentemente, el primer anticuerpo 1111 y la peroxidasa 1113 se conjugan directamente entre sí según se representa en la figura 1B. Alternativamente, el primer anticuerpo 1111 puede conjugarse con biotina, mientras que la peroxidasa 1113 se conjuga con avidina. La biotina y la avidina se unen fuertemente para formar un complejo AB durante la reacción y cuando el primer anticuerpo 1111 queda retenido en la segunda región 112, también hace que una parte de la peroxidasa 1113 permanezca junto con este en la segunda región 112. La avidina puede ser avidina, estreptavidina o neutravidina.

[0022] Ahora se hace referencia a las figuras 1F a 1H que son dibujos esquemáticos que muestran otros diversos modos de distribución de los materiales de reacción en el canal 11 de la tira de prueba para líquidos 1 antes de la reacción. De acuerdo con el concepto de la presente invención, en la tira de prueba para líquidos 1, en lugar de disponer a la vez el sacárido 1112 y la peroxidasa 1113 en la primera región 111, el sacárido 1112 y la peroxidasa 1113 pueden disponerse alternativamente en la segunda región 112, según se representa en la figura

1F.

[0023] En la figura 1F, el primer anticuerpo 1111 y la peroxidasa 1113 se localizan en la primera región 111. El sacárido 1112 se localiza en la segunda región 112. En este modo, el primer anticuerpo 1111 y la peroxidasa 1113 pueden conjugarse directamente entre sí según se describe previamente o están unidos respectivamente a biotina y avidina y forman un complejo AB. La distribución de los otros materiales de reacción, como el segundo anticuerpo 1121, el sustrato óptico 1131, el reactivo de sustrato 1132 y la sacárido-oxidasa 1133, es de la misma manera que se muestra en la figura 1B. En tal configuración, después de que la muestra líquida fluye a través de la segunda región 112, el sacárido 1112 también se transportará a la tercera región 113 para permitir la reacción siguiente. La distribución de los materiales de reacción en las diferentes etapas de la reacción es según se representa en las figuras 1C a 1E y no necesita repetirse.

[0024] Otro modo de distribución de los materiales de reacción es según se representa en la figura 1G. El primer anticuerpo 1111 se localiza en la primera región 111 y la peroxidasa 1113 y el sacárido 1112 se localizan en la segunda región 112. Otro modo más de distribución de los materiales de reacción es según se representa en la figura 1H. El primer anticuerpo 1111 y el sacárido 1112 se localizan en la primera región 111, mientras que la peroxidasa 1113 se localiza en la segunda región 112. La distribución de los otros materiales de reacción en los dos modos descritos anteriormente es de la misma manera que se muestra en la figura 1B y la distribución de los materiales de reacción en las diferentes etapas de la reacción es según se representa en las figuras 1C a 1E, por lo que se omite una repetición de la descripción en este documento.

[0025] Con referencia ahora a la figura 1I, corresponde a una vista de sección de la tira de prueba para líquidos 1 tomada a lo largo de la línea A-A en la figura 1A. De acuerdo con la figura 1I, se proporciona una capa de fibra 1110 en el fondo de la primera región 111 y el primer anticuerpo (numerado como 1111 en la figura 1B) se localiza en la capa de fibra 1110, de modo que después de haber introducido la muestra líquida en la primera región 111, el primer anticuerpo (numerado como 1111 en la figura 1B) es transportado por la muestra líquida a la segunda región 112. Se proporcionan una segunda capa de nitrocelulosa 1120 y una tercera capa de nitrocelulosa 1130, respectivamente, en el fondo de la segunda región 112 y de la tercera región 113. El segundo anticuerpo (numerado como 1121 en la figura 1B) está inmovilizado en la segunda capa de nitrocelulosa 1120 y el reactivo de sustrato 1132 integrado en la tercera capa de nitrocelulosa 1130.

[0026] La segunda capa de nitrocelulosa 1120 y la tercera capa de nitrocelulosa 1130 pueden ser membranas de nitrocelulosa laminadas en el fondo de la segunda región 112 y de la tercera región 113, respectivamente.

[0027] Otra estrategia preferida para disponer las capas de nitrocelulosa en el fondo de la segunda región 112 y de la tercera región 113 es el vaciado de una disolución de nitrocelulosa en el fondo de la segunda región 112 y de la tercera región 113, seguido de un proceso de secado (secado al aire o liofilización). Por consiguiente, tanto la segunda capa de nitrocelulosa 1120 como la tercera capa de nitrocelulosa 1130 formadas por este procedimiento tienen una conformación de matriz hueca. El canal 11 con las capas de nitrocelulosa preparadas por el procedimiento de vaciado de acuerdo con la presente invención es diferente del canal microfluídico tradicional. Además, con el fin de reducir la fuerza capilar, cada una de las regiones segunda 112 y tercera 113 tiene preferentemente una anchura no inferior a 0,3 mm. El sustrato 10 está hecho preferentemente de un material biocompatible. Para optimizar el resultado del procedimiento de vaciado, el canal 11 tiene preferentemente una rugosidad superficial (Ra) en el intervalo de 3 μm a 50 μm . La capa de nitrocelulosa 1120 comprende preferentemente un espesor medio igual al de la capa de nitrocelulosa 1130. Además, el canal 11 puede comprender adicionalmente una cuarta región (no se muestra) con una capa de nitrocelulosa formada en el fondo de la misma que también tiene una conformación de matriz hueca para acomodar el exceso de muestra líquida.

[0028] Para preparar la disolución de nitrocelulosa se mezcla polvo de nitrocelulosa con un disolvente que contiene ésteres y cetonas. La razón volumétrica entre el polvo de nitrocelulosa y el disolvente que contiene ésteres y cetonas es preferentemente de 1:9. Además, cuando la capa de nitrocelulosa 1120 se forma por el procedimiento de vaciado según se describe anteriormente, el segundo anticuerpo 1121 se dispone en la conformación de matriz hueca de la capa de nitrocelulosa 1120 por inyección de una disolución de reacción que contiene el segundo anticuerpo 1121 en la capa de nitrocelulosa 1120, seguida de un proceso de secado y, por lo tanto, el segundo anticuerpo 1121 permanece en la segunda capa de nitrocelulosa 1120 en forma de polvo.

[0029] Además de la estrategia anteriormente mencionada, en la que el segundo anticuerpo 1121 se dispone después de haberse secado las capas de nitrocelulosa, una estrategia alternativa consiste en mezclar previamente la disolución que contiene el segundo anticuerpo 1121 con la disolución de nitrocelulosa y después vaciar la

disolución mixta en el fondo de la segunda región 112, a lo que sigue un proceso de secado. De este modo se forma la segunda capa de nitrocelulosa 1120 en el fondo de la segunda región 112, mientras que el segundo anticuerpo 1121 permanece en la matriz de conformación hueca y se seca en forma de polvo.

5 **[0030]** Para proporcionar la tercera capa de nitrocelulosa 1130 con el reactivo de sustrato 1132 pueden implementarse estrategias similares a la empleada para proporcionar la segunda capa de nitrocelulosa 1120 con el segundo anticuerpo 1121. La tercera capa de nitrocelulosa 1130 puede preformarse y después añadirle el reactivo de sustrato 1132 o el reactivo de sustrato 1132 puede mezclarse con la disolución de nitrocelulosa para después aplicar la disolución mixta sobre el fondo de la tercera región 113 y, de este modo, formar la tercera capa de
10 nitrocelulosa 1130 con el reactivo de sustrato 1132. Los detalles similares se omiten en este documento.

[0031] Además de la primera realización descrita anteriormente, la presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento de detección para muestras líquidas como segunda realización. La tira de prueba para líquidos implementada en la segunda realización es sustancialmente la misma que la tira de prueba para
15 líquidos de la primera realización, por lo que los detalles similares se omitirán y todos los números de referencia para indicar los componentes de la tira de prueba para líquidos se referirán a las figuras 1B a 1H.

[0032] La figura 2 es un organigrama del procedimiento de detección de acuerdo con la segunda realización de la presente invención. Las etapas del procedimiento de detección de la presente invención se describen según se
20 indica a continuación.

[0033] Etapa 21: proporcionar una muestra líquida que contiene un analito 1101 (según se muestra en la figura 1B).

25 **[0034]** Etapa 22: proporcionar un sustrato 10 con al menos un canal 11 que incluye una primera región 111, una segunda región 112 y una tercera región 113. Estas tres regiones están dispuestas sucesivamente. La primera región 111 es para la introducción de una muestra líquida en la misma y tiene un primer anticuerpo 1111. La segunda región 112 tiene un segundo anticuerpo 1121 inmovilizado en la misma. El primer anticuerpo 1111 y el segundo anticuerpo 1121 están configurados para reconocer diferentes epítomos del analito 1101 en la muestra
30 líquida. Por lo tanto, el primer anticuerpo 1111 y el segundo anticuerpo 1121 pueden ser anticuerpos monoclonales (mAb) o anticuerpos policlonales (pAb), siempre que el primer anticuerpo 1111 y el segundo anticuerpo 1121 no compitan entre sí por el mismo antígeno y de este modo interfieran con el reconocimiento del antígeno. Un sustrato óptico 1131 y un reactivo de sustrato 1132 que comprende una sacárido-oxidasa 1133 se localizan en la tercera región 113. La peroxidasa 1113 puede ser una HRP (peroxidasa de rábano), una AP (arcobato-peroxidasa) o una
35 peroxidasa de hidrógeno. El sustrato óptico 1131 es preferentemente 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazina y el sacárido 1112 es preferentemente glucosa, mientras que la sacárido-oxidasa 1133 es glucosa-oxidasa. Además, el sacárido 1112 y la peroxidasa 1113 se distribuyen en el canal 11 de la manera descrita en la primera realización (con referencia a las figuras 1B, 1F, 1G y 1H).

40 **[0035]** Etapa 23: introducir la muestra líquida en la primera región 111 del canal 11, de modo que la muestra líquida fluya a lo largo del canal 11 a través de la primera región 111, la segunda región 112 y la tercera región 113, sucesivamente y de este modo haga fluir consigo al primer anticuerpo 1111, al sacárido 1112 y a la peroxidasa 1113 en el canal 11.

45 **[0036]** Etapa 24: después de su introducción, el analito 1101 fluirá a la segunda región 112 junto con la muestra líquida. El segundo anticuerpo 1121 se unirá al analito 1101 y, por lo tanto, se forma un complejo de unión que comprende el primer anticuerpo 1111, el analito 1101 y el segundo anticuerpo 1121. El segundo anticuerpo 1121 está inmovilizado en la segunda región 112. Por consiguiente, el primer anticuerpo 1111 unido al analito 1101, el analito 1101 unido al segundo anticuerpo 1121 y la peroxidasa 1113 conjugada con el primer anticuerpo 1111
50 quedarán retenidos en la segunda región 112. Sin embargo, la muestra líquida transporta continuamente el sacárido 1112, el primer anticuerpo 1111 sin unir y la peroxidasa 1113 sin unir a la tercera región 113. En la tercera región 113, el sacárido 1112 es catalizado por la sacárido-oxidasa 1133 para producir peróxido de hidrógeno. El sustrato óptico 1131 es catalizado por la peroxidasa 1113 que llega a la tercera región 113 y de este modo reacciona con el peróxido de hidrógeno para generar una señal óptica.

55 **[0037]** Etapa 25: detectar la señal óptica generada en la etapa 24. En consecuencia, la concentración de la enzima implicada en la reacción se determina mediante la detección de la intensidad de la señal óptica generada. En otras palabras, mediante la detección de la intensidad de la señal óptica generada, puede determinarse la cantidad de peroxidasa 1113 que llega a la tercera región 113 y está implicada en la reacción. Además, dado que la

peroxidasa 1113 se incluye en una cantidad constante en la tira de prueba para líquidos 1 durante la fabricación, es fácil determinar la cantidad de peroxidasa 1113 retenida en la segunda región 112 mediante una simple sustracción ([cantidad de peroxidasa 1113 retenida en la segunda región 112] = [cantidad total de peroxidasa 1113] - [cantidad de peroxidasa 1113 que fluye a la tercera región 113]). Finalmente, usando la cantidad de peroxidasa 1113 retenida
5 en la segunda región 112, es posible calcular la concentración del analito 1101 en la muestra líquida, con lo que se consigue un ensayo cuantitativo.

[0038] De acuerdo con el procedimiento de detección de la presente invención, la configuración preferida del primer anticuerpo 1111, el segundo anticuerpo 1112 y la peroxidasa 1113, las categorías preferidas del primer
10 anticuerpo 1111, el segundo anticuerpo 1112 y la peroxidasa 1113, las estructuras preferidas de las regiones del canal 11, la configuración y el procedimiento de preparación de las capas de nitrocelulosa, la composición y la razón preferida de la disolución de nitrocelulosa y la composición y los procedimientos de preparación de los materiales de reacción son similares a los descritos en la primera realización y los detalles de los mismos se omiten en este documento.

REIVINDICACIONES

1. Una tira de prueba (1) para el ensayo cuantitativo de un analito en un líquido que comprende un sustrato (10) con al menos un canal (11) sobre el mismo, en que el canal (11) tiene una primera región (111), una
 5 segunda región (112) y una tercera región (113) dispuestas sucesivamente y en que la primera región (111) se usa para la introducción de una muestra líquida en la misma, en que la tira de prueba (1) **se caracteriza porque:** se proporciona una capa de fibra (1110) en el fondo de la primera región (1111); se proporciona una capa de nitrocelulosa (1120, 1130) en el fondo de cada una de la regiones segunda y tercera (112, 113); en que la tira de prueba (1) comprende además: un primer anticuerpo (1111) localizado en la primera región (111) e integrado en la
 10 capa de fibra (1110) para el reconocimiento de un analito (1101) en la muestra líquida; un sacárido (1112) localizado en la primera o en la segunda región (111, 112); una peroxidasa (1113); un segundo anticuerpo (1121) inmovilizado en la segunda región (112), en la capa de nitrocelulosa, para el reconocimiento del analito (1101) en la muestra líquida, en que el segundo anticuerpo (1121) y el primer anticuerpo (1111) están configurados para reconocer diferentes epítomos del analito (1101) en la muestra líquida; y un sustrato óptico (1131) y un reactivo de sustrato
 15 (1132) localizados en la tercera región (113) y con el reactivo de sustrato integrado en la capa de nitrocelulosa (1130), en que el reactivo de sustrato (1132) comprende una sacárido-oxidasa (1133); en que el primer anticuerpo (1111) y la peroxidasa (1113) se localizan en la primera región (111) y pueden conjugarse entre sí o en que, cuando la peroxidasa (1113) se localiza en la primera o en la segunda región (111, 112), el primer anticuerpo (1111) puede conjugarse además con biotina, mientras que la peroxidasa (1113) puede conjugarse con una molécula
 20 seleccionada del grupo que consta de avidina, estreptavidina y neutravidina, con lo que se forma un complejo de biotina y avidina.

2. La tira de prueba (1) de la reivindicación 1, en que el sustrato óptico (1131) es 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona.

3. La tira de prueba (1) de la reivindicación 1, en que la capa de nitrocelulosa (1120, 1130) comprende una conformación de matriz hueca y se prepara por vaciado de una disolución de nitrocelulosa en el fondo de la segunda y la tercera región (112, 113), seguido de un proceso de secado.

4. La tira de prueba (1) de la reivindicación 1, en que cada una de las regiones segunda (112) y tercera (113) tiene una anchura de al menos 0,3 mm.

5. Un procedimiento para el ensayo cuantitativo de un analito en un líquido que comprende las etapas de:

35 proporcionar (21) una muestra líquida que contiene un analito (1101);

proporcionar (22) una tira de prueba (1) que incluye un sustrato (10) con al menos un canal (11) que tiene una primera región (111), una segunda región (112) y una tercera región (113) dispuestas sucesivamente, en que la
 40 primera región (111) se usa para la introducción de la muestra líquida en la misma; una capa de fibra (110) en el fondo de la primera región (111); y una capa de nitrocelulosa (1120, 1130) en el fondo de cada una de las regiones segunda y tercera (112, 113); en que la tira de prueba (1) comprende además: un primer anticuerpo (1111) localizado en la primera región (111) e integrado en la capa de fibra (1110) para el reconocimiento del analito (1101) en la muestra líquida; un sacárido (1112) localizado en la primera o en la segunda región (111, 112); una peroxidasa (1113); un segundo anticuerpo (1121) inmovilizado en la segunda región (112), en la capa de nitrocelulosa (1120),
 45 para el reconocimiento del analito (1101) en la muestra líquida, en que el segundo anticuerpo (1121) y el primer anticuerpo (1111) están configurados para reconocer diferentes epítomos del analito (1101); y un sustrato óptico (1131) y un reactivo de sustrato (1132) localizados en la tercera región (113) y con el reactivo de sustrato integrado en la capa de nitrocelulosa (1130) y en que el reactivo de sustrato (1132) comprende una sacárido-oxidasa (1133);
 50 en que el primer anticuerpo (1111) y la peroxidasa (1113) se localizan en la primera región (111) y se conjugan entre sí o en que, cuando la peroxidasa (1113) se localiza en la primera o en la segunda región (111, 112), el primer anticuerpo (1111) se conjuga además con biotina, mientras que la peroxidasa (1113) se conjuga con una avidina, en que la avidina se selecciona del grupo que consta de avidina, estreptavidina y neutravidina, con lo que se forma un complejo de biotina y avidina;

55 introducir (23) la muestra líquida en la primera región (111) del canal (11) para permitir que el primer anticuerpo (1111), el sacárido (1112) y la peroxidasa (1113), si la peroxidasa está localizada en la primera región (111), fluyan conjuntamente con la muestra líquida;

permitir (24) que el analito (1101) y una parte del primer anticuerpo (1111) y la peroxidasa (1113) se unan al segundo anticuerpo (1121), de modo que queden retenidos en la segunda región (112); permitir que el sacárido (1112) y la otra parte del primer anticuerpo (1111) y la peroxidasa (1113) fluyan a la tercera región (113) junto con la muestra líquida, de modo que el sacárido (1112) sea catalizado por la sacárido-oxidasa (1133) para producir 5 peróxido de hidrógeno; permitir que el sustrato óptico (1131) sea catalizado por la peroxidasa (1113) que llega a la tercera región (113) y reaccione con el peróxido de hidrógeno para generar una señal óptica; y

detectar (25) la señal óptica generada.

10 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en que el sustrato óptico (1131) es 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona.

7. El procedimiento de detección de la reivindicación 5, en que la capa de nitrocelulosa (1120, 1130) comprende una conformación de matriz hueca y se prepara por vaciado de una disolución de nitrocelulosa en el 15 fondo de la segunda y la tercera región (112, 113), seguido de un proceso de secado.

8. El procedimiento de detección de la reivindicación 5, en que cada una de las regiones segunda (112) y tercera (113) tiene una anchura de al menos 0,3 mm.

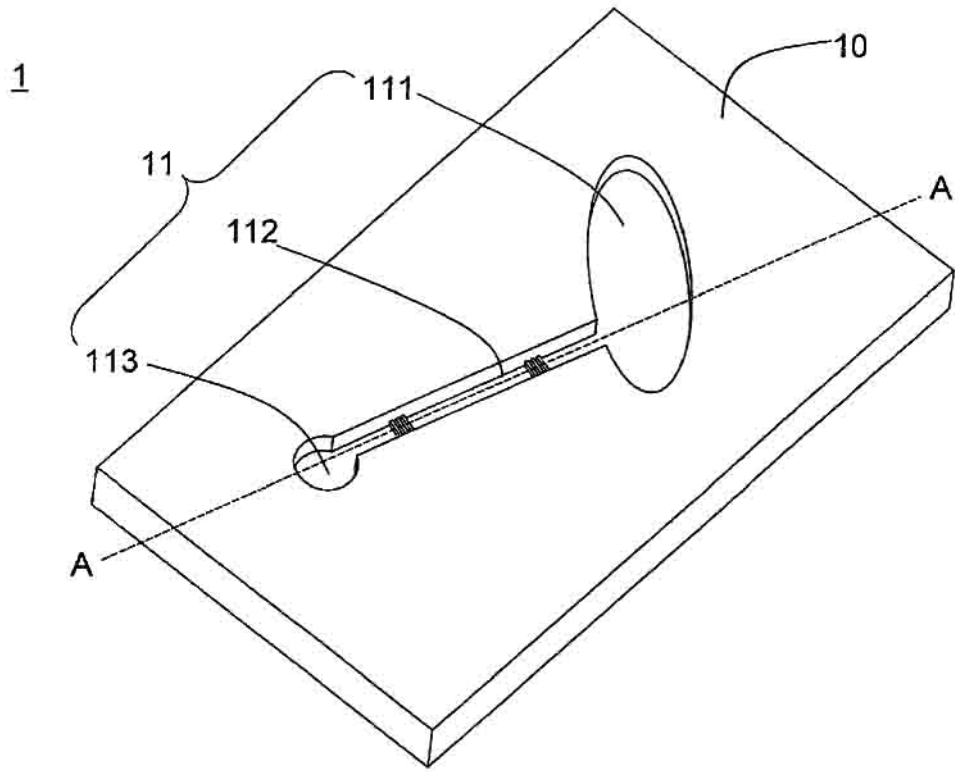


Fig. 1A

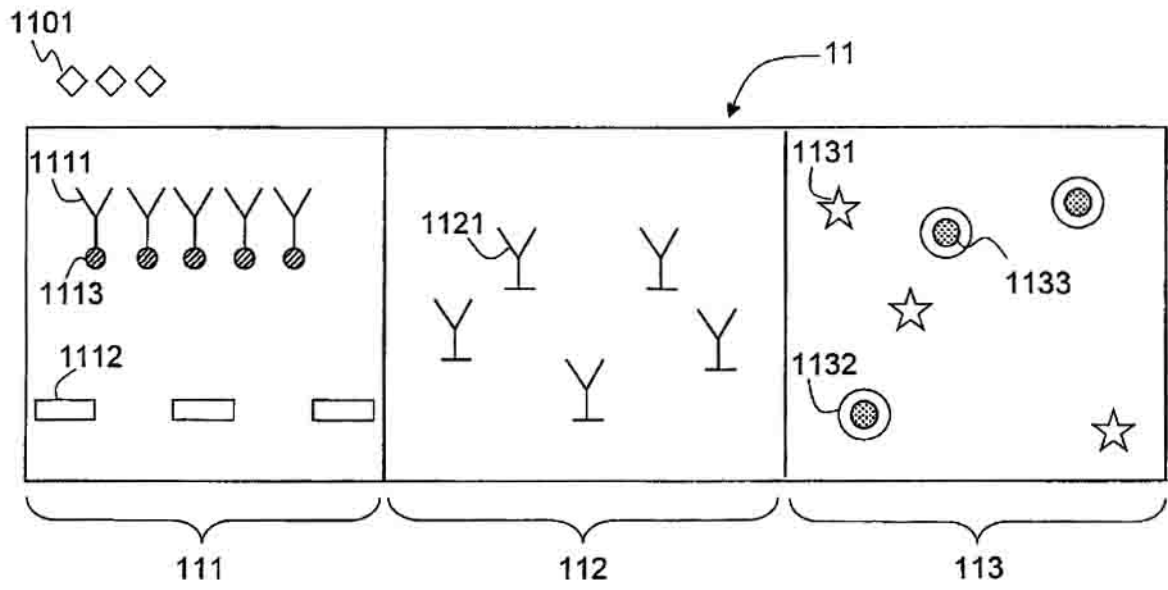


Fig. 1B

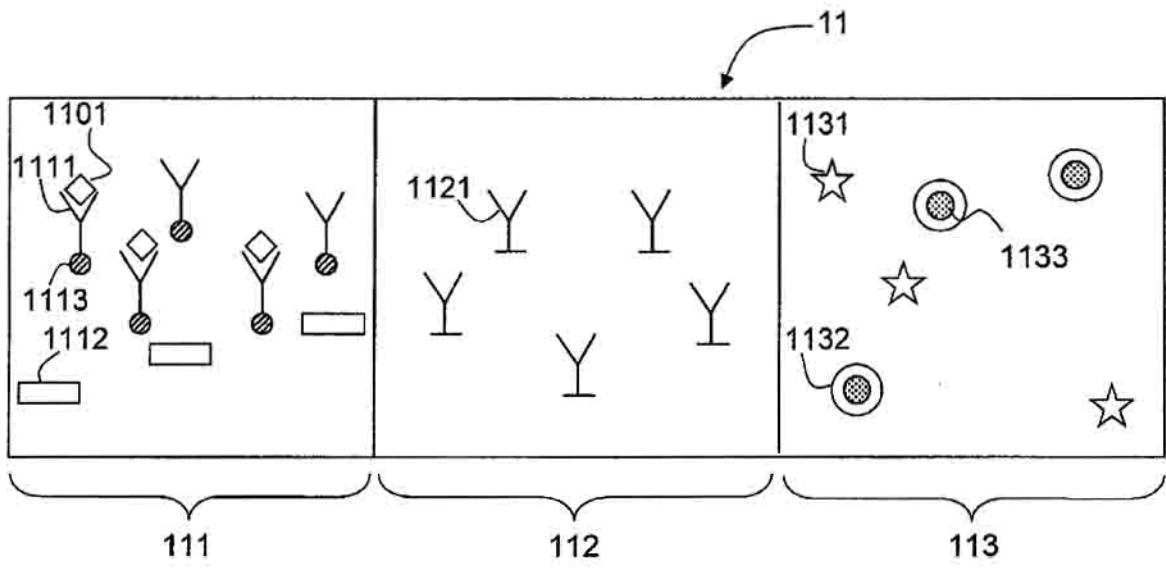


Fig. 1C

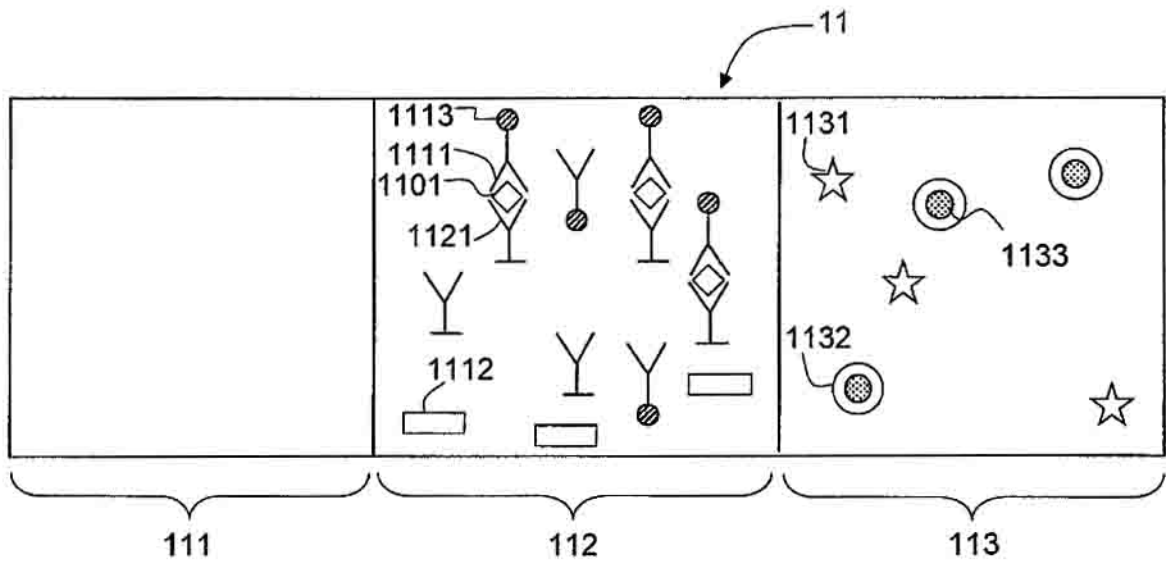


Fig. 1D

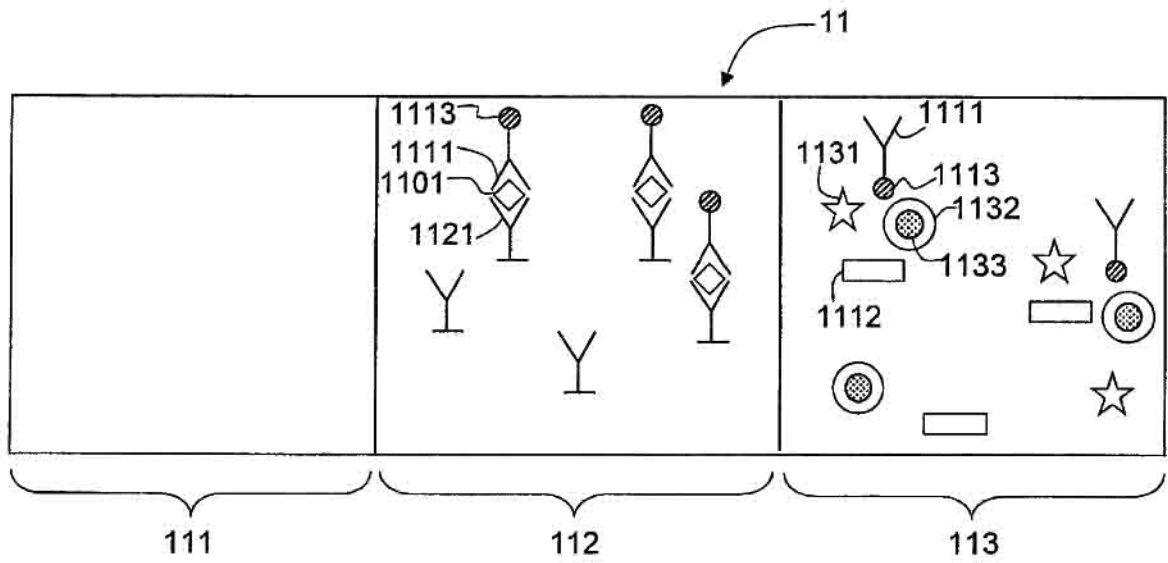


Fig. 1E

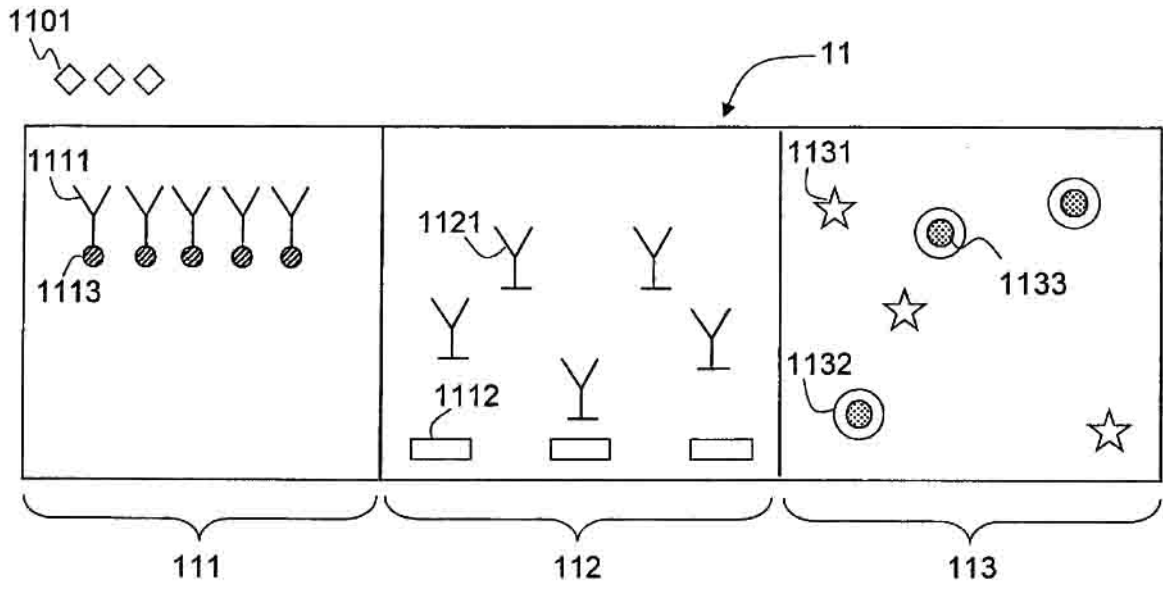


Fig. 1F

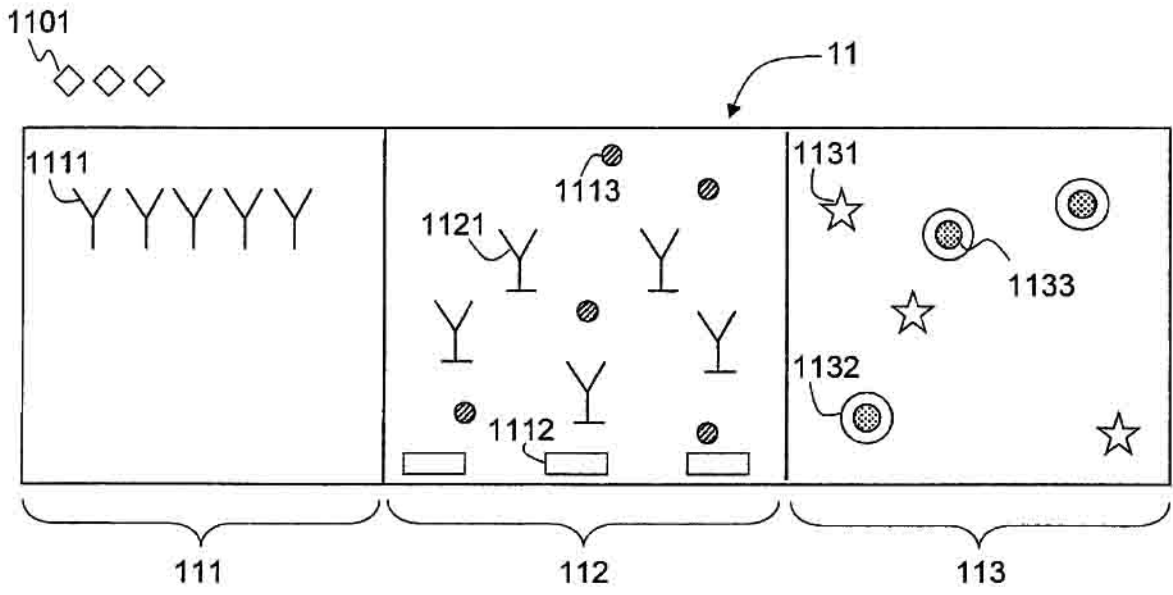


Fig. 1G

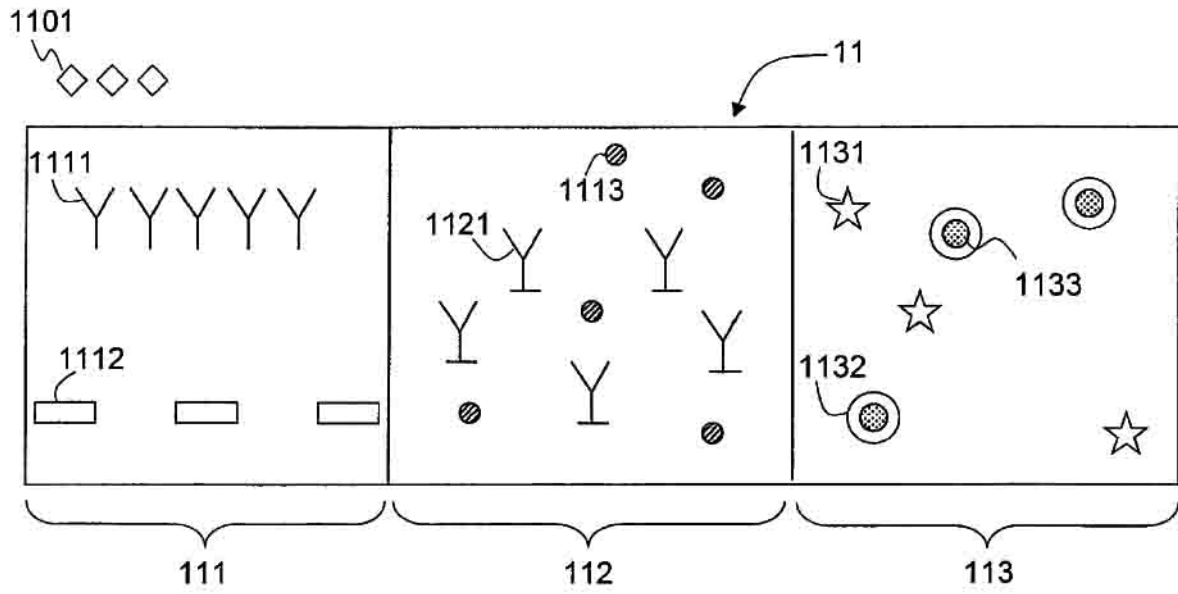


Fig. 1H

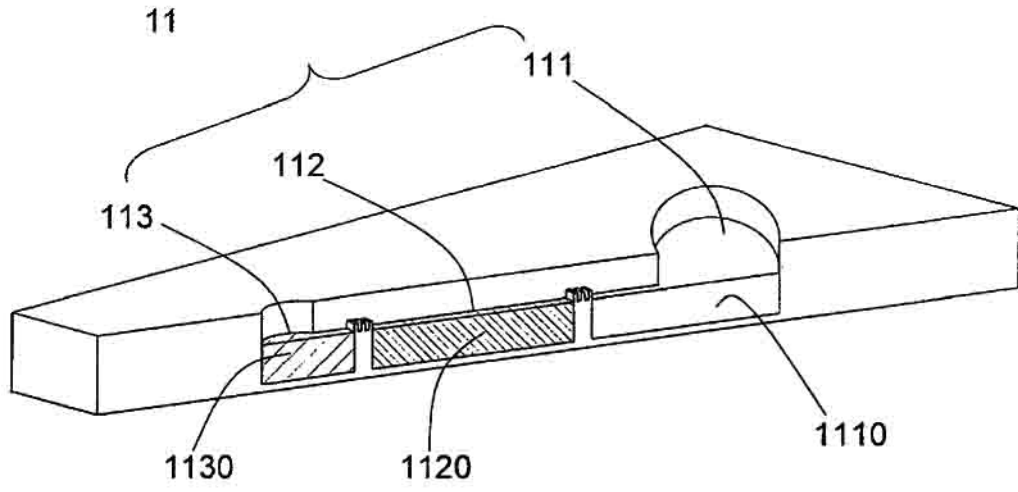


Fig. 1I

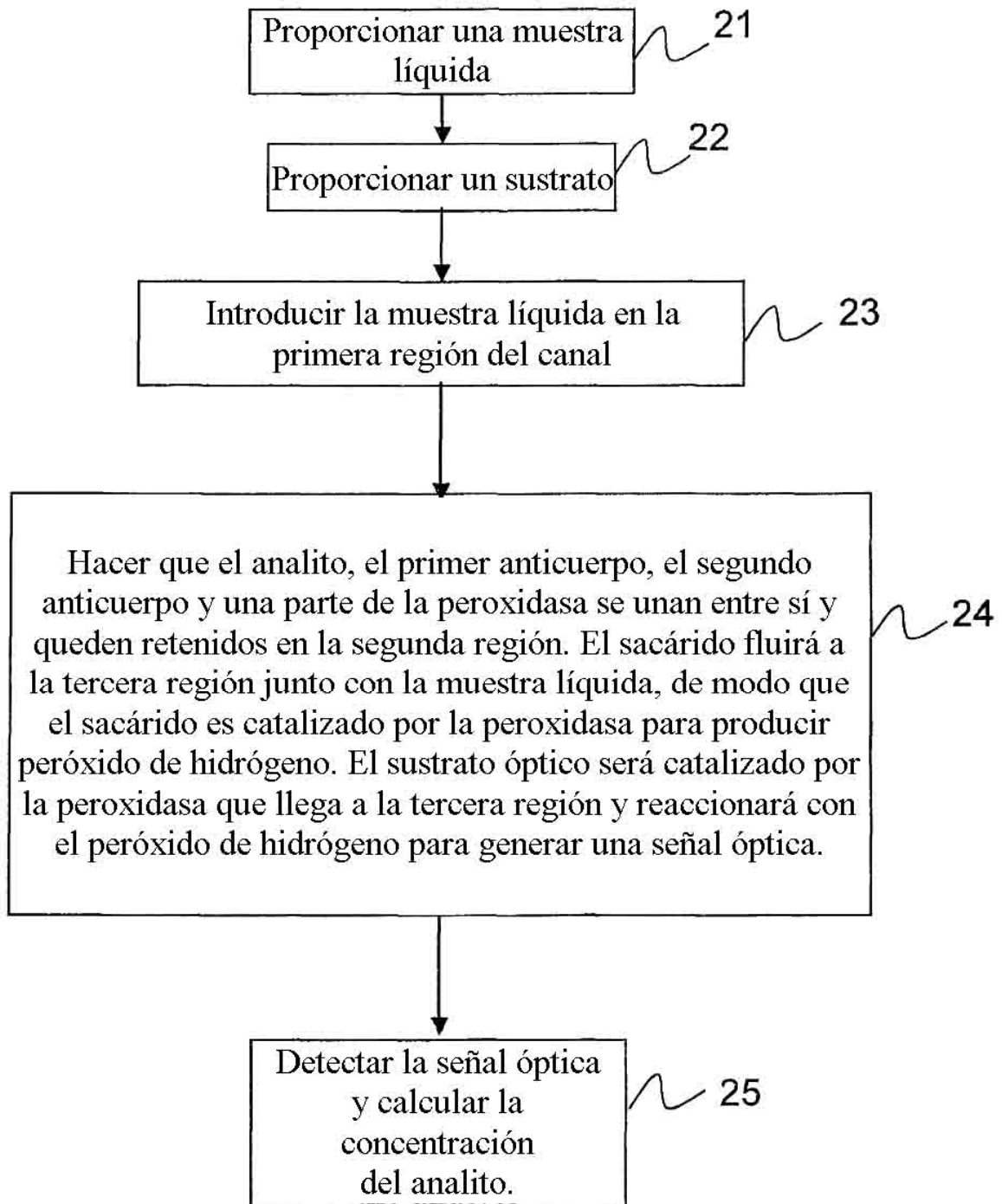


Fig. 2