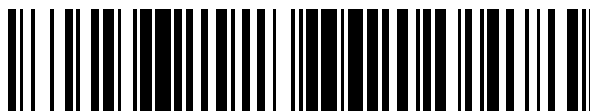


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 992**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2010** **E 10822833 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2486120**

54 Título: **Dispositivo para la detección de antígenos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.10.2009 US 250286 P

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

22.05.2014

73 Titular/es:

**INVISIBLE SENTINEL, INC. (100.0%)
Suite 800, 8th Floor, 3711 Market Street
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**SICILIANO, NICHOLAS A. y
BOULIANE, MARTIN JOSEPH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 461 992 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para la detección de antígenos y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se dirige, en parte, a un dispositivo y a un ensayo para detectar uno o más antígenos y los métodos para utilizar los mismos.

Antecedentes de la invención

10 La detección de antígenos es importante para muchas áreas de la investigación científica, el uso en diagnóstico y los usos terapéuticos. Hay varios métodos mediante los que se pueden detectar los antígenos. Varios métodos se describen en la patente de EE.UU.: 5.160.701, la patente de EE.UU.: 5.141.850, la publicación PCT WO 91/12336, la patente de EE.UU.: 5.451.504, la patente de EE.UU.: 5.559.041, la solicitud de patente europea nº.: Q505636A1, la publicación PCT No. WO 88/08534, la solicitud de patente europea nº. 0284 232A1, la solicitud de patente de EE.UU. nº de publicación 20070020768 y la patente de EE.UU. nº RE39664. Los métodos y los dispositivos disponibles antes de la presente invención todavía puede necesitar mejoras en cuanto a la sensibilidad o la velocidad con las que se obtienen los resultados. Estos factores pueden ser importantes cuando el tiempo es primordial para intentar determinar la presencia o la ausencia de un antígeno.

15 En el área de detección de contaminantes patógenos llevados por alimentos, aproximadamente, setenta y seis millones de personas en Estados Unidos se ven afectadas por una enfermedad llevada por alimentos. De esos setenta y seis millones, aproximadamente, 325.000 llegarán a estar gravemente enfermos, necesitando las hospitalización y aproximadamente 5.000 morirán. La mayoría de las enfermedades llevadas por alimentos son provocadas por Salmonela, E. coli, y Campylobacter, que cuestan aproximadamente 35 mil millones de dólares.

20 Las medidas actuales para asegurar un suministro seguro de alimentos implican a una combinación de autoridades locales, estatales y federales así como un sistema elaborado de inspectores y redes de vigilancia. Los fabricantes de alimentos están sujetos a ciertas regulaciones del Departamento de Agricultura de EE.UU. (*United States Department of Agriculture*), de la Administración de Fármacos y Alimentos de EE.UU. (*United States Food and Drug Administration*) y del Servicio de Pesquerías Marinas Nacionales (*National Marine Fisheries Service*) que son aplicables por ley. El USDA ha creado un sistema de inspectores de salud que tienen la labor de realizar inspecciones diarias de carne, productos y otros consumibles de productos elaborados o procesados en instalaciones de tratamiento y de fabricación. Estas inspecciones implican un análisis estadístico detallado para asegurar mejor la seguridad y la esterilidad de los alimentos antes que llegue al consumidor. Además, la mayoría de la industria cárnica ha adoptado unas técnicas de irradiación para demostrar aún más la esterilidad de los productos. En un nivel más bajo, los departamentos locales y municipales de la salud trabajan para asegurar que los distribuidores, restaurantes y detallistas locales siguen unas estrictas pautas para asegurar un suministro seguro de alimentos. Sin embargo, a pesar de esta elaborada red, las infecciones llevadas por alimentos todavía son comunes.

35 Una vez que se sospecha mucho de un brote, empieza una investigación. Se hace la búsqueda de más casos entre personas que pueden haberse expuesto. Se determinan los síntomas y el momento de comienzo y la ubicación de casos posibles, y se desarrolla una "definición de caso" que describe estos casos típicos. El brote se describe sistemáticamente por tiempo, lugar y persona. Para mostrar gráficamente cuándo se produjo, se dibuja un gráfico del número de personas que cayeron enfermas en cada día sucesivo. El cálculo de la distribución de casos por edad y sexo muestra quien está afectado.

40 A menudo no se conoce el microbio causante, así que se deben recoger muestras de heces o sangre de personas enfermas y deben enviarse al laboratorio sanitario público para hacer un diagnóstico. Cada recogida y muestreo pueden costar más de 500 \$ por prueba y a menudo se tardan 2-4 días para el análisis (CDC "Infecciones llevadas por alimentos").

45 La solicitud de patente de EE.UU. nº de publicación 2002172937 describe un método para detectar patógenos humanos que llevan los artrópodos utilizando una única varilla de inmersión de prueba que proporciona una exposición visual de los resultados del ensayo. La solicitud de patente de EE.UU. nº de publicación 2007218500 describe un método y un aparato para la detección de bacterias en los que se utiliza una sustancia marcada para detectar bacterias que escinde enzimáticamente la sustancia marcada para producir un antígeno marcado que es detectado por un anticuerpo inmovilizado presente en el aparato.

50 La solicitud de patente europea nº: EP 2072135A1 describe un producto de inmunoensayo que comprende varias capas, incluso una capa porosa por debajo de la membrana secante, y un distribuidor de flujo encima de la membrana secante, en las que los distribuidores y el soporte se mantienen juntos para formar una envoltura alrededor de las membranas.

55 La patente de EE.UU.: 7.488.606 describe un dispositivo de recogida para una cromatografía de flujo lateral que tiene un miembro de recogida separado del resto de la tira de cromatografía por una barrera removible, impermeable y líquida.

La publicación PCT nº. WO 2011/014763 describe dispositivos y métodos para detectar antígenos, incluidos los patógenos llevados por alimentos. Los dispositivos tienen un alojamiento que comprende un primer miembro de alojamiento y un segundo miembro de alojamiento, en donde el alojamiento comprende una abertura de entrada en el segundo miembro de alojamiento.

- 5 Antes de la presente invención, para identificar el alimento u otra fuente del brote, los investigadores entrevistaban primero a unas pocas personas con los casos más típicos acerca de las exposiciones que podían haber tenido en unos pocos días antes que se pusieran enfermos. De esta manera, pueden excluirse ciertas exposiciones potenciales mientras otras que se mencionan repetidas veces surgen como posibilidades de origen. Combinadas con otra información, tales como fuentes probables del microbio específico implicado, las hipótesis se prueban
- 10 entonces en una investigación epidemiológica formal. Los investigadores realizan entrevistas sistemáticas acerca de una lista de posibles exposiciones con las personas enfermas, y con un grupo comparable de personas que no están enfermas. Al comparar con qué frecuencia las personas enfermas y las personas sanas informan de una exposición, los investigadores pueden medir la asociación de la exposición con la enfermedad. Utilizando la estadística de probabilidad, se calcula directamente la probabilidad de ninguna asociación.
- 15 A medida que surgen nuevos problemas llevados por alimentos existe la necesidad de dispositivos y métodos novedosos para detectar los patógenos llevados por alimentos. La presente invención proporciona un dispositivo para la detección de antígenos, tales como antígenos de bacterias llevadas por alimentos, y cumple las necesidades de tener un dispositivo y un ensayo con mayor sensibilidad y/o velocidad de detección. Como se menciona en esta memoria, la presente invención satisface además otras necesidades.

20 **Compendio de la invención**

- En algunas realizaciones, la presente invención proporciona unos dispositivos para detectar un antígeno. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un alojamiento que comprende un primer miembro de alojamiento y un segundo miembro de alojamiento, en donde el alojamiento comprende además a) una entrada en el primer miembro de alojamiento en donde la entrada permite que una muestra fluya verticalmente a través del sistema de detección;
- 25 b) un sistema de membrana de detección de antígeno entre el primer y el segundo miembro de alojamiento que comprende una plaquita de conjugado, un miembro adhesivo, una membrana de prueba y un miembro absorbente; y c) un miembro de fuerza. En algunas realizaciones, por lo menos una parte de la plaquita de conjugado, de la membrana de prueba y del miembro absorbente son paralelas entre sí. En algunas realizaciones, el dispositivo tiene una altura de menos de 0,15 cm, una anchura de menos de 2,1 cm, y una profundidad de menos de 4,7 cm.

- 30 En algunas realizaciones, el miembro de fuerza es un sujetador inoxidable. En algunas realizaciones, el primer miembro de alojamiento es removible. En algunas realizaciones, el primer miembro de alojamiento se conecta o está en contacto con la plaquita de conjugado, en donde el movimiento o la retirada del primer miembro de alojamiento mueve la plaquita de conjugado o retira de la plaquita de conjugado del dispositivo. En algunas realizaciones, los dispositivos comprenden una plaquita de conjugado que comprende un primer anticuerpo específico de antígeno.

- 35 En algunas realizaciones, el antígeno reconocido por el primer anticuerpo específico de antígeno es un antígeno patógeno transmitido por los alimentos.

- Aunque no es según se reivindica con la invención, en algunas realizaciones, la presente invención podría proporcionar dispositivos para detectar un antígeno, que comprenden un primer miembro exterior y un segundo miembro exterior que comprende: una plaquita de conjugado, un primer miembro interior y un segundo miembro interior, en donde el primer miembro interior y el segundo miembro interior están en contacto entre sí, en donde el primer miembro exterior y el primer miembro interior comprenden una entrada, y en donde entre el primer y el segundo miembro interior un sistema de membrana de detección de antígeno que comprende en el siguiente orden: una membrana de prueba; y un miembro absorbente; y en donde por lo menos una parte de la plaquita de conjugado, de la membrana de prueba y del miembro absorbente son paralelas entre sí, y en donde el sistema de
- 40 membrana de detección de antígeno se comprime entre el primer miembro interior y el segundo miembro interior, y en donde la plaquita de conjugado no se comprime entre dicho primer y dicho segundo miembro interior.
- 45

Aunque no es según se reivindica en la presente invención, en algunas realizaciones, la presente invención podría proporcionar unos sistemas que comprenden un dispositivo como se describe en la presente memoria y un recipiente amortiguador o un sistema de recogida de muestras.

- 50 La presente invención también proporciona unos métodos para detectar un antígeno utilizando cualquiera de los dispositivos y/o sistemas descritos en esta memoria.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un kit que comprende un dispositivo como se describe en la presente memoria y uno o más de un control positivo, un control negativo, un folleto de instrucciones, un recipiente amortiguador y un sistema de recogida de muestras o cualquier combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa una vista lateral y una vista superior de un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

5 La figura 2 representa un tipo de sistema de membrana de detección de antígeno para un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 3 representa un tipo de sistema de membrana de detección de antígeno para un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 4 representa un tipo de sistema de membrana de detección de antígeno para un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

10 La figura 5 representa un tipo de sistema de membrana de detección de antígeno para un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 6 representa unos miembros representativos de fuerza para un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 7 representa un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

15 La figura 8 representa un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 9 representa un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

Descripción de unas realizaciones

Tal como se emplea en esta memoria y a menos que se indique de otro modo, el término “aproximadamente” pretende significar $\pm 5\%$ del valor al que modifica. De este modo, aproximadamente 100 significa de 95 a 105.

20 La presente invención proporciona unos dispositivos y métodos para detectar antígenos u otras moléculas. En algunas realizaciones, los dispositivos utilizan ensayos cromatográficos. En algunas realizaciones, se emplean ensayos específicos de unión para indicar la presencia o la ausencia de un antígeno.

25 El término “reactivo de captura” se refiere a un reactivo, por ejemplo un anticuerpo o proteína de unión a antígeno o un fragmento de los mismos, capaces de unirse a una molécula o analito de destino que se va a detectar en una muestra biológica. Un reactivo de captura también puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido o un péptido.

El término “detectar” o “detección” se utiliza en el sentido más amplio para incluir mediciones cualitativas y/o cuantitativas de un analito de objetivo.

30 Los términos “conectado” o “conexión” pueden incluir conexión directa o conexión indirecta. Dos componentes que se conectan directamente entre sí también están en contacto físico entre sí. Dos componentes que se conectan indirectamente entre sí se conectan a través de un componente intermedio. Por ejemplo, el Componente A puede conectarse indirectamente al Componente B si el Componente A se conecta directamente al Componente C y el Componente C se conecta directamente al Componente B. Por lo tanto, en tal ejemplo, el Componente A se conecta indirectamente al Componente B.

35 El término “aislado” se refiere a una molécula que se separa substancialmente de su ambiente natural. Por ejemplo una proteína aislada es una que se separa substancialmente de la fuente de tejido o células de la que se deriva.

40 El término “purificado” se refiere a una molécula que es substancialmente libre de otro material que se asocia con la molécula en su ambiente natural. Por ejemplo una proteína purificada es substancialmente libre del material celular u otras proteínas de las que se deriva la célula o el tejido. El término se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es lo suficientemente pura como para ser analizada, o por lo menos de 70% a 80% (en peso) puro, por lo menos de 80% a 90% (en peso) puro, por lo menos de 90 a 95% puro; o por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%, o por lo menos 100% (en peso) puro.

45 Los términos “unión específica”, “se une específicamente” y similares, significan que dos o más moléculas forman un complejo que es mensurable en condiciones fisiológicas o de ensayo y es selectivo. Un anticuerpo o proteína de unión a antígeno u otra molécula se dice que se “une específicamente” a una proteína, antígeno, o epítipo si, bajo condiciones apropiadamente seleccionadas, tal unión no se inhibe substancialmente, mientras que al mismo tiempo se inhibe una unión no específica. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y es selectiva para el compuesto, la proteína, el epítipo o el antígeno. La unión no específica tiene usualmente una afinidad baja. La unión en anticuerpos IgG se caracteriza generalmente por ejemplo por una afinidad de por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, tal como por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, o por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, o por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, o por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, o por lo menos aproximadamente 10^{-12} M. El término también es aplicable cuando, p. ej., un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular

que no es llevado por numerosos antígenos, en cuyo caso la proteína de unión de antígeno o anticuerpo que lleva el dominio de unión a antígeno generalmente no se unirá a otros antígenos. En algunas realizaciones, el reactivo de captura tiene un K_d igual o inferior a 10^{-9} M, 10^{-10} M, o 10^{-11} M para su socio de unión (p. ej. antígeno). En algunas realizaciones, el reactivo de captura tiene un K_a mayor o igual a $109M^{-1}$ para su socio de unión.

El reactivo de captura también puede referirse, por ejemplo, a los anticuerpos. Los anticuerpos intactos, también conocidos como inmunoglobulinas, son típicamente proteínas tetraméricas glicosiladas compuestas de dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una, y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. En los anticuerpos existen dos tipos de cadena ligera, denominadas lambda y kappa. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se asignan a cinco clases mayores: A, D, E, G y M, y varias de éstas pueden dividirse aún más en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Cada cadena ligera se compone de un dominio variable de N-terminal (VL) y un dominio constante (CL). Cada cadena pesada se compone de un dominio variable de N-terminal (VH), tres o cuatro dominios constantes (CH), y una región de bisagra. El dominio CH más proximal a VH se designa CH1. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas denominadas regiones estructurales (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un armazón para tres regiones de secuencias hipervariables (las regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayor parte de los residuos responsables de las interacciones específicas de la proteína de unión a antígeno o anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, los constituyentes de las CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2 y H3, mientras que los constituyentes de las CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2 y L3. CDR3 es la mayor fuente de diversidad molecular dentro del lugar de unión del anticuerpo o de la proteína de unión a antígeno. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácido o de más de 26 aminoácidos. En la técnica se conocen bien las estructuras sub-unidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas. Para una revisión de la estructura de un anticuerpo, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Eds. Harlow et al., 1988. Un experto en la técnica reconocerá que cada estructura sub-unidad, p. ej., una estructura de CH, VH, CL, VL, CDR y/o FR, comprende fragmentos activos. Por ejemplo, los fragmentos activos pueden consistir en la parte de la sub-unidad VH, VL o CDR que se une al antígeno, es decir el fragmento de unión al antígeno, o la parte de la sub-unidad CH que se une y/o activa un receptor Fc y/o un complemento.

Unos ejemplos no limitativos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "anticuerpo específico de antígeno" utilizados en esta memoria incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; y (vi) una CDR aislada. Por otra parte, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, sean codificados por genes independientes, pueden unirse recombinantemente por un enlazador sintético, creando una cadena única de proteína en la que los dominios VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena única Fv (scFv)). El enlazador más comúnmente utilizado es un péptido de residuo 15 (Gly4Ser)₃, pero en la técnica también se conocen otros enlazadores. También se pretende que los anticuerpos de cadena única también sean abarcados dentro de los términos "anticuerpo o proteína de unión a antígeno", o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, fragmento de unión a antígeno, fragmento Fc, anticuerpos de cadena única, o cualquier derivado de los mismos.

Estos anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban buscando utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. La diversidad del anticuerpo se crea mediante múltiples genes de la línea germinal que codifican dominios variables y una variedad de acontecimientos somáticos. Los acontecimientos somáticos incluyen la recombinación de segmentos variables de genes con segmentos de genes de diversidad (D) y de unión (J) para hacer un dominio completo VH, y la recombinación de segmentos de genes variables y de unión para hacer un dominio completo VL. El propio proceso de recombinación es impreciso, lo que tiene como resultado la pérdida o la adición de aminoácidos en las uniones V(D)J. Estos mecanismos de diversidad se producen en la célula B en desarrollo antes de la exposición del antígeno. Después del estímulo antigénico, los genes expresados de anticuerpo en células B experimentan una mutación somática. Basado en el número estimado de segmentos de genes de la línea germinal, se puede producir la recombinación aleatoria de estos segmentos, y el emparejamiento aleatorio VH-VL, pueden producirse hasta $1,6 \times 10^7$ anticuerpos diferentes (*Fundamental Immunology*, 3ª ed. (1993), ed. Paul, Raven Press, Nueva York, N. Y.). Cuando se tienen en cuenta otros procesos que contribuyen a la diversidad del anticuerpo (tal como mutación somática), se cree que pueden generarse más de 1×10^{10} anticuerpos diferentes (*Immunoglobulin Genes*, 2ª ed. (1995), eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, Calif.). A causa de los muchos procesos implicados en la generación de diversidad de anticuerpos, es improbable que los anticuerpos monoclonales derivados independientemente con la misma especificidad de antígeno tengan secuencias idénticas de aminoácidos.

El anticuerpo o las moléculas de proteína de unión a antígeno capaces de interactuar específicamente con los antígenos, epitopos u otras moléculas descritas en esta memoria pueden producirse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse por

generación de hibridomas según unos métodos conocidos. Los hibridomas formados en esta manera pueden cribarse entonces utilizando los métodos estándar, tales como el ensayo inmunosorbente vinculado a enzima (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) y el análisis de Biacore, para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que interacciona específicamente con una molécula o compuesto de interés.

Como alternativa a preparar hibridomas de secreción de anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal a un polipéptido de la presente invención puede identificarse y aislarse por cribado de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (p. ej., una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpo, *antibody phage display library*) con un polipéptido de la presente invención para aislar por tanto los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen al polipéptido. Las técnicas y los kit disponibles comercialmente para generar y cribar las bibliotecas de exposición de fagos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Adicionalmente, en la bibliografía se pueden encontrar unos ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles de uso para generar y cribar bibliotecas de exposición de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno.

El término “reactivo de captura” también incluye los anticuerpos quiméricos, tales como los anticuerpos humanizados, así como los anticuerpos completamente humanizados. En algunas realizaciones el reactivo de captura es un anticuerpo anti-E coli de cabra 0157:H7 (Cat#: 70-XG13, Fitzgerald Industries); E. coli 0157:H7 mono (Cat #: 10-E13A, Fitzgerald Industries); E. coli 0157:H7 (Cat #: 10C-CR1295M3, Fitzgerald Industries); E. coli 0157:H7 mono (Cat #: 10-E12A, Fitzgerald Industries); o la IgG anti-ratón de cabra (Cat #: ABSE-020, DCN).

Haciendo referencia a los dibujos, en algunas realizaciones, las Figuras 1 a 9 representan unos dispositivos representativos, los componentes de tales dispositivos representativos y varias vistas de tales dispositivos representativos.

La Figura 1 representa un dispositivo representativo que comprende un primer miembro de alojamiento (2) que comprende además una entrada (6) de alojamiento y un segundo miembro (4) de alojamiento. En algunas realizaciones, el primer y el segundo miembro de alojamiento pueden construirse como una única unidad. La entrada de alojamiento permite la introducción de una muestra sobre los componentes del interior del alojamiento. La entrada de alojamiento puede tener tamaño suficiente para manejar una cantidad apropiada de volumen de una disolución que se añade al dispositivo. En algunas realizaciones, el tamaño de la abertura creada por la entrada de alojamiento es suficiente para manejar aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 3 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 ml, y de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 ml. En algunas realizaciones, las dimensiones del dispositivo son de tal manera que cualquier dimensión (p. ej., la anchura, la profundidad o la altura) sea menor o igual a aproximadamente 5,08 cm (2,000 pulgadas). En algunas realizaciones, la altura del dispositivo es menos de aproximadamente 0,635 cm (0,250 pulgadas), menos de aproximadamente 0,254 cm (0,100 pulgadas), menos de aproximadamente 0,191 cm (0,075 pulgadas), menos de aproximadamente 0,165 cm (0,065 pulgadas), menos de aproximadamente 0,152 cm (0,06 pulgadas), o menos de aproximadamente 0,140 cm (0,055 pulgadas). En algunas realizaciones, la altura del dispositivo es aproximadamente 0,127 cm (0,050 pulgadas). En algunas realizaciones, la anchura o la profundidad del dispositivo son menores o iguales a aproximadamente 5,08 cm (2,000 pulgadas), aproximadamente 4,83 cm (1,900 pulgadas), aproximadamente 4,699 cm (1,850 pulgadas), aproximadamente 4,572 cm (1,800 pulgadas), aproximadamente 4,445 cm (1,750 pulgadas), aproximadamente 4,191 cm (1,650 pulgadas), aproximadamente 4,064 cm (1,600 pulgadas), o aproximadamente 3,81 cm (1,500 pulgadas). En algunas realizaciones, el dispositivo tiene una altura de aproximadamente 0,127 cm (0,050 pulgadas), una profundidad de aproximadamente 4,445 cm (1,750 pulgadas) y una anchura de aproximadamente 3,81 cm (1,500 pulgadas).

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una pluralidad de componentes que comprenden uno o más de: un miembro removible, una plaquita de conjugado, un miembro adhesivo, una membrana de prueba, un miembro absorbente, un miembro de fuerza, un miembro de soporte, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un miembro de fuerza, un miembro removible, una plaquita de conjugado, una membrana de prueba, un miembro adhesivo y/o un miembro absorbente. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno comprende una plaquita de conjugado, una membrana de prueba y un miembro absorbente. En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno comprende una membrana permeable adicional, pero el dispositivo también puede ser sin una membrana permeable. En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno comprende en el siguiente orden: una plaquita de conjugado, un miembro adhesivo, una membrana de prueba y un miembro absorbente.

La Figura 2 representa una vista en despiece ordenado del interior de un dispositivo representativo que comprende un miembro removible (5), una plaquita de conjugado (50), un miembro adhesivo (10), una membrana de prueba (30), un miembro absorbente (40) y un miembro de soporte (20), en donde el miembro de soporte comprende además una entrada opcional (25) de miembro de soporte. El miembro removible y el miembro adhesivo también pueden comprender una entrada opcional (8) de miembro removible y una entrada (12) de miembro adhesivo, respectivamente. Tales componentes podrían residir dentro, por ejemplo, del dispositivo de Figura 1.

La Figura 3 representa unos componentes representativos de otro dispositivo representativo que comprende un miembro adhesivo (10), un miembro de soporte (20), una membrana de prueba (30) y un miembro absorbente (40). Como puede verse en la Figura 3, una muestra puede fluir a través del miembro adhesivo (10) y contactar la membrana de prueba (30).

- 5 La Figura 4 representa un miembro adhesivo (10), un miembro de soporte (20), una membrana de prueba (30) y un miembro absorbente (40). La Figura 4 representa los componentes que están substancialmente paralelos entre sí. La Figura 4 representa además el miembro de soporte (20) que comprende una entrada (25) de miembro de soporte. Esta entrada puede utilizarse para permitir a la muestra fluir verticalmente a través del dispositivo.

- 10 La Figura 5 representa, en parte, una plaquita (50) de conjugado, una membrana de prueba (30) y un miembro absorbente (40). La Figura 5 también representan la plaquita de conjugado en contacto y/o conectada a un miembro removible (5). La Figura 5 también representa el miembro removible que se retira o se aleja del dispositivo, que también retira o aleja la plaquita de conjugado respecto el dispositivo. El movimiento de la plaquita de conjugado permite que la membrana de prueba sea visualizada, lo que facilita el análisis y la detección de antígenos.

- 15 La Figura 6 representa unos ejemplos de miembros de fuerza. Unos miembros representativos de fuerza pueden obtenerse con una variedad de formas, tamaños y configuraciones, pero cada miembro aplica presión en los componentes que se colocan en o sobre el miembro de fuerza. Cada miembro de fuerza también puede comprender una abertura (+) en la que se aplica la muestra a analizar. La Figura 6 representa unos ejemplos no limitativos de unos miembros de fuerza con un primer miembro (110) y un segundo miembro (100).

- 20 Las Figuras 7A, 7B, 7C y 7D representan, en parte, un miembro de fuerza que comprende un primer miembro (110), b) un segundo miembro (100), una entrada (115), y un sistema (120) de detección de membrana de antígeno. Las Figuras 7A y 7B también representan, en parte, una plaquita (50) de conjugado. La plaquita de conjugado no se ve en las Figuras 7C y 7D. Las Figuras 7C y 7D también representan, en parte, una membrana de prueba (30) que forma parte del sistema de detección de membrana de antígeno. La Figura 7D también representa, en parte, una membrana de prueba (30) que ha reaccionado con un control, que se visualiza mediante la banda.

- 25 La Figura 8 representa, en parte, un recipiente que comprende una pestaña removible o movable (200), una entrada (210), una plaquita (50) de conjugado y la pestaña de la plaquita (250) de conjugado. La pestaña de la plaquita (255) de conjugado puede utilizarse para retirar la plaquita (50) de conjugado del dispositivo para exponer la membrana de prueba. Por ejemplo, un usuario podría tirar de la pestaña de la plaquita (250) de conjugado para retirar la plaquita (50) de conjugado respecto el recipiente. Lo que no se visualiza es el sistema de membrana de detección de antígeno que está comprimido entre un primer miembro (110) y un segundo miembro (100) como se describe en la presente memoria.

- 30 La Figura 9, representa, en parte, un primer miembro exterior (310), un segundo miembro exterior (320), una pestaña movable o removible (330), y una plaquita (50) de conjugado. La pestaña movable o removible (330) comprende una entrada que expone la plaquita (50) de conjugado de modo que la muestra pueda aplicarse a la plaquita de conjugado. La Figura 9 no muestra el primer miembro interior (110) y el segundo miembro interior (100) que comprenden el sistema (120) de membrana de detección de antígeno. La pestaña movable o removible (330) cuando se mueve o retira, mueve o retira la plaquita (59) de conjugado, que permite a la membrana de prueba ser visualizada y analizada.

- 35 La entrada de miembro removible dentro del miembro removible permite la introducción de una muestra sobre la plaquita de conjugado. La entrada puede tener un tamaño suficiente como para manejar una cantidad apropiada de volumen de una disolución que se añade al dispositivo. En algunas realizaciones, el tamaño de la entrada es suficiente para manejar aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 ml, y de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 ml. El miembro removible también puede construirse de tal manera que una parte del miembro removible sea permeable a disoluciones (es decir, el área definida por la entrada de miembro removible) y otra área es impermeable. El área permeable puede actuar como una entrada porque permitiría a las disoluciones cruzar el miembro removible y contactar con la plaquita de conjugado. La entrada de miembro removible puede tener cualquiera de numerosas formas y tamaños. En algunas realizaciones, el primer miembro de alojamiento sirve como miembro removible. En otras realizaciones, el primer miembro de alojamiento y el miembro removible son unos componentes independientes. En las realizaciones en las que el primer miembro de alojamiento y el miembro removible son unos componentes independientes, por lo menos una parte de la entrada de alojamiento y de la entrada de miembro removible se superponen de tal manera que una disolución pueda entrar a través de ambas entradas.

- 40 La entrada de miembro removible dentro del miembro removible permite la introducción de una muestra sobre la plaquita de conjugado. La entrada puede tener un tamaño suficiente como para manejar una cantidad apropiada de volumen de una disolución que se añade al dispositivo. En algunas realizaciones, el tamaño de la entrada es suficiente para manejar aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 ml, y de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 ml. El miembro removible también puede construirse de tal manera que una parte del miembro removible sea permeable a disoluciones (es decir, el área definida por la entrada de miembro removible) y otra área es impermeable. El área permeable puede actuar como una entrada porque permitiría a las disoluciones cruzar el miembro removible y contactar con la plaquita de conjugado. La entrada de miembro removible puede tener cualquiera de numerosas formas y tamaños. En algunas realizaciones, el primer miembro de alojamiento sirve como miembro removible. En otras realizaciones, el primer miembro de alojamiento y el miembro removible son unos componentes independientes. En las realizaciones en las que el primer miembro de alojamiento y el miembro removible son unos componentes independientes, por lo menos una parte de la entrada de alojamiento y de la entrada de miembro removible se superponen de tal manera que una disolución pueda entrar a través de ambas entradas.
- 45 En algunas realizaciones, el miembro removible contacta con una primera superficie de una plaquita de conjugado. El miembro removible también puede conectarse a la plaquita de conjugado. El miembro removible puede conectarse a la plaquita de conjugado mediante cualquier medio de tal manera que cuando el miembro removible se retira del dispositivo o se cambia su posición, la plaquita de conjugado también se retira o la posición de la plaquita de conjugado también se cambia. El miembro removible puede conectarse a la plaquita de conjugado con, por

ejemplo, pero no limitado a, un adhesivo. Los adhesivos incluyen, pero no se limitan a, pegamento, cinta u otra sustancia que permita al miembro removible y a la plaquita de conjugado conectarse entre sí.

El miembro removible, en algunas realizaciones, contacta directamente con la plaquita de conjugado o contacta indirectamente con la plaquita de conjugado a través de otra capa. La muestra puede aplicarse, en algunas realizaciones, directamente a la plaquita de conjugado a través de la abertura en el miembro removible.

La plaquita de conjugado puede ser una membrana u otro tipo de material que pueda comprender un reactivo de captura. La plaquita de conjugado puede ser acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliamida, policarbonato, fibra de vidrio, membrana, polietersulfona, celulosa regenerada (RC), politetrafluoretileno (PTFE), poliéster (p. ej., tereftalato de polietileno), policarbonato (p. ej., 4,4-hidroxi-difenil-2,2'-propano), óxido de aluminio, éster mezclado de celulosa (p. ej., mezcla de acetato de celulosa y nitrato de celulosa), nilón (p. ej., poliamida, hexametilenediamina, y Nilón 66), polipropileno, PVDF, polietileno de alta densidad (HDPE) + agente nucleante "dibenzoato de aluminio" (DBS) (p. ej., 80u 0,024 HDPE DBS (Porex)), y HDPE, o cualquier mezcla de los mismos. Unos ejemplos de plaquitas de conjugado también incluyen, CYCLOPORE® (tereftalato de polietileno), NUCLEOPORE® (tereftalato de polietileno), MEMBRA-FIL® (nitrato y acetato de celulosa), WHATMAN® (nitrato y acetato de celulosa), Whatman #12-S (rayón), ANOPORE® (óxido de aluminio), ANODISC® (óxido de aluminio), Sartorius (acetato de celulosa, p. ej. 5 µm) y Whatman Standard 17 (cristal unido). En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado puede ser una matriz basada en nanopartículas tales como, pero no limitado a, una hoja 2D o una matriz 3D que comprende nanopartículas a base de carbono, nanopartículas de oro o de aleación metálica, matrices de co-polímero, así como nanocristales semiconductores monodispersos, magnéticos, metálicos y ferroeléctricos.

En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado o membrana de prueba, o ambos, comprenden un reactivo de captura. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado o membrana de prueba, o ambos, se ponen en contacto con el reactivo de captura y luego se deja secar. La plaquita de conjugado o membrana de prueba, o ambos, también pueden comprender otras composiciones para conservar el reactivo de captura de tal manera que pueda almacenarse de manera estable a temperatura ambiente o a temperaturas de refrigeración o congelación. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado o membrana de prueba, o ambos, se empapan con un amortiguador antes de aplicar el reactivo de captura. En algunas realizaciones, el amortiguador es un amortiguador bloqueador que se utiliza para prevenir una unión no específica. En algunas realizaciones, el amortiguador comprende Borato, BSA, PVP40 y/o Tween-100, o cualquier mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, el amortiguador es 10 mM de Borato, 3% de BSA, 1% de PVP40 y 0,25% Tween-100. En algunas realizaciones el reactivo de captura se aplica a la plaquita de conjugado o membrana de prueba o a ambos en una solución que comprende trehalosa y sacarosa. En algunas realizaciones el reactivo de captura se aplica a la plaquita de conjugado o membrana de prueba o a ambos en una solución que comprende trehalosa, sacarosa y fosfato y/o BSA. En algunas realizaciones, el reactivo de captura se aplica en una solución que es 5% de trehalosa, 20% sacarosa, 10 mM de fosfato y 1% de BSA.

En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado o membrana de prueba, o ambos, comprenden aproximadamente de 0,5 a aproximadamente 5,0 µg de un reactivo de captura, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 µg de un reactivo de captura, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 µg de un reactivo de captura, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 µg de un reactivo de captura, aproximadamente 1,5 µg de un reactivo de captura, aproximadamente 2,5 µg de un reactivo de captura, o aproximadamente 2,7 µg de un reactivo de captura. En algunas realizaciones, el miembro removible contacta con una primera superficie de la plaquita de conjugado y el miembro adhesivo contacta con una segunda superficie de la plaquita de conjugado.

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un miembro adhesivo. El miembro adhesivo puede comprender una entrada de miembro adhesivo que permite a la muestra fluir a través de la plaquita de conjugado y contactar con la membrana de prueba. En algunas realizaciones, la entrada de miembro adhesivo tiene el mismo tamaño o forma que la entrada de miembro removible. En algunas realizaciones, la entrada de miembro adhesivo tiene distinto tamaño o forma que la entrada de miembro removible. En algunas realizaciones, las entradas en el miembro adhesivo tienen la misma forma pero tienen áreas diferentes. Las entradas con áreas diferentes se considerarían que tienen diferente tamaño. El miembro adhesivo puede hacerse de cualquier sustancia adecuada para adherir un miembro o membrana a otro miembro o membrana. En algunas realizaciones, el miembro adhesivo es impermeable a líquidos. En algunas realizaciones, el miembro adhesivo contacta con el miembro removible.

La membrana de prueba es una membrana en la que se produce la detección de un socio de unión a un reactivo de captura. Las membranas de prueba incluyen, pero no se limitan a, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de nilón, una membrana de poli(fluoruro de vinilideno), una membrana de polietersulfona, y similares. La membrana de prueba puede ser de cualquier material que pueda ser utilizado por un experto en la técnica para detectar la presencia de un socio de unión de un reactivo de captura (p. ej. antígeno o epítipo). La membrana de prueba también puede comprender un reactivo de captura. En algunas realizaciones, la membrana de prueba se pone en contacto con un reactivo de captura y el reactivo de captura puede secarse y adherirse a la membrana de prueba. Unos ejemplos de membranas de prueba incluyen, pero no se limitan a Protran BA83, Whatman, Oritran BA-SA83, y 0,22 µm blanco plano (nº de producto de Millipore SA3J036107). Las membranas de prueba también pueden comprender matrices de nanopartículas a las que se unen reactivos de captura. Los nanocristales pueden disponerse en hojas 2D y matrices 3D con materiales tales como, pero no limitados a, partículas a base de carbono,

partículas de aleación metálica u oro, matrices de co-polímero, así como nanocristales semiconductores monodispersos, magnéticos, metálicos y ferroeléctricos. La membrana de prueba puede comprender una pluralidad de reactivos de captura. En algunas realizaciones, la membrana de prueba comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 reactivos de captura. En algunas realizaciones, la membrana de prueba comprende una pluralidad de zonas, cada una con un reactivo de captura diferente. En algunas realizaciones, la pluralidad de zonas no se superponen completamente ni coinciden entre sí. Al utilizar una pluralidad de reactivos de captura, se pueden detectar múltiples socios de unión (p. ej. epítomos o antígenos).

En algunas realizaciones, el dispositivo también comprende un miembro absorbente. El miembro absorbente también puede denominarse "membrana de efecto mecha" o "plaquita de efecto mecha". El miembro absorbente absorbe el fluido que fluye a través del dispositivo cuando la muestra se aplica al dispositivo y proporciona una fuerza de efecto mecha que ayuda al flujo de la muestra cuando se aplica al dispositivo.

El miembro absorbente puede ser cualquier material que puede facilitar el flujo de la muestra a través de la plaquita de conjugado y a la membrana de prueba. Unos ejemplos de miembros absorbentes incluyen, pero no se limitan a celulosa, polímeros superabsorbentes, plaquitas de fibra de vidrio (p. ej., C083 (Millipore)), y similares. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una pluralidad (p. ej., 2 o más) de miembros absorbentes. En algunas realizaciones, el alojamiento comprende 2, 3, 4 o 5 miembros absorbentes. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un miembro absorbente. En algunas realizaciones, el miembro absorbente comprende una o más membranas, hasta 10 membranas individuales, y cada membrana puede ser del mismo material o de material diferente. En algunas realizaciones, el dispositivo consiste en sólo 1 membrana que es un miembro absorbente.

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un miembro de fuerza. La Figura 6 representa unos ejemplos representativos, pero no limitativos, de miembros de fuerza. El miembro de fuerza puede utilizarse, en algunas realizaciones, para aplicar presión o para comprimir entre sí los otros componentes del sistema de membrana de detección de antígeno. El miembro de fuerza puede hacerse de cualquier material que incluya, pero no limitado a, acero inoxidable. El acero inoxidable puede cortarse con láser de tal manera que pueda actuar como un sujetador. El miembro de fuerza (p. ej. sujetador) actúa para aplicar presión al sistema de membrana. El miembro de fuerza no se limita a un sujetador, sino que puede ser cualquier forma que pueda aplicar presión al sistema de membrana (p. ej. matrices de nanopartículas) y estructuras como pistones colocadas estratégicamente dentro del conjunto. El miembro de fuerza permite al dispositivo trabajar con flujo vertical a diferencia de basarse en un flujo lateral. En algunas realizaciones, el miembro de fuerza contacta con una superficie del miembro absorbente. En algunas realizaciones, el miembro de fuerza contacta con una superficie del miembro absorbente y una superficie de la capa removible. En algunas realizaciones, el miembro de fuerza comprime el sistema de detección de membrana desde arriba y debajo del sistema de detección de membrana. Por ejemplo, el miembro de fuerza puede emparedar todas las capas del sistema de detección de membrana. En algunas realizaciones el miembro de fuerza se conecta al miembro de soporte. Véase, por ejemplo, la Figura 1C que muestra un componente (110) conectado al componente (100).

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende, en el siguiente orden, un miembro removible, una plaquita de conjugado y un miembro adhesivo.

El dispositivo también puede comprender un miembro de soporte. El miembro de soporte, en algunas realizaciones, contacta con una superficie del miembro absorbente. El miembro de soporte también puede tener una entrada de miembro de soporte. La entrada puede tener el mismo tamaño y/o forma que la entrada en el miembro removible y/o el miembro adhesivo. En algunas realizaciones, el miembro de soporte comprende una entrada que tiene un tamaño y/o una forma diferentes a la entrada en el miembro removible y/o el miembro adhesivo. El miembro de soporte puede hacerse de algún material que incluye, pero no se limita a, plástico. En algunas realizaciones, el segundo miembro de alojamiento sirve como miembro de soporte.

Los dispositivos descritos en esta memoria pueden utilizarse en ensayos para detectar la presencia de un socio de unión de reactivo de captura. Por ejemplo, un antígeno puede ser detectado por un anticuerpo utilizando los dispositivos de la presente invención. Los dispositivos de la presente invención emplean flujo vertical. El "flujo vertical" se refiere a la dirección con que la que fluye la muestra a través de diferentes membranas y miembros presentes en el dispositivo. El flujo vertical se refiere a una muestra que fluye a través de la membrana (p. ej., de la parte superior a la inferior) en comparación con un flujo lateral, que se refiere a una muestra que fluye a través (p. ej., de lado a lado) de una membrana, plaquita o miembro absorbente. En un dispositivo de flujo lateral, las membranas y las plaquitas se asientan horizontalmente adyacentes entre sí substancialmente en el mismo plano. En un dispositivo de flujo vertical, cada membrana o plaquita son substancialmente paralelas o completamente paralelas entre sí y ocupan unos planos espaciales substancialmente diferentes en el dispositivo. Las membranas y las plaquitas pueden ocupar unos planos similares cuando se comprimen o se ponen bajo presión. En algunas realizaciones, por lo menos una parte de cada miembro, membrana o plaquita se estratifican uno encima de uno. En algunas realizaciones, por lo menos una parte de cada capa de miembro, membrana o plaquita son substancialmente paralelas entre sí. En algunas realizaciones, por lo menos una parte de cada capa está en un plano espacial diferente que las otras capas.

Para permitir que se produzca eficazmente un flujo vertical, en algunas realizaciones, la plaquita de conjugado, la membrana de prueba y el miembro absorbente son substancialmente paralelos entre sí. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado, la membrana de prueba y el miembro absorbente están presentes en planos espaciales diferentes. En algunas realizaciones, el alojamiento también comprende una membrana hidrófoba (no se muestra) que puede ralentizar o detener el flujo vertical de la muestra. La membrana hidrófoba puede estar en contacto con la membrana de prueba, que permitiría a la muestra residir o descansar sobre la membrana de prueba. La residencia puede permitir mayor sensibilidad y detección. El flujo vertical es modulado por la presión que se aplica a la membrana, a la plaquita y a los miembros. En algunas realizaciones, la presión se aplica perpendicular a la membrana de prueba y/o a la plaquita de conjugado. La presión puede aplicarse de modo que la plaquita de conjugado se comprime contra el alojamiento.

El miembro de fuerza puede aplicar presión que es substancialmente perpendicular a la membrana de prueba. La presión facilita el flujo vertical. La presión permite que cada componente del sistema de membrana de detección de antígeno esté en contacto con otro componente. La presión también puede aliviarse para detener el flujo de modo que la muestra de prueba pueda residir o descansar sobre la membrana de prueba, lo que puede permitir una mayor sensibilidad. La presión puede aplicarse entonces de nuevo para permitir que continúe el flujo vertical al permitir que la muestra fluya adentro de los miembros absorbentes. El miembro de fuerza puede aplicar presión de tal manera que la plaquita de conjugado contacta con una parte del alojamiento (p. ej., el primer miembro de alojamiento o la capa removible). En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado contacta con el alojamiento cuando no está bajo la presión que ejerce el miembro de fuerza sino sobre el miembro de fuerza que ejerce presión con la que la plaquita de conjugado se comprime contra una parte del alojamiento.

En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado contacta con el perímetro de la entrada de alojamiento. La entrada de alojamiento también puede comprender un collarín u otra característica similar, tal como un anillo tórico. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado contacta con el perímetro de un collarín y/o un anillo tórico. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado puede comprimirse contra el perímetro de la entrada de alojamiento, que puede incluir, en algunas realizaciones, un collarín y/o un anillo tórico.

"Capaz de ser comprimido contra el perímetro de la entrada de alojamiento" se refiere a una membrana o plaquita (p. ej., plaquita de conjugado) que se comprime directamente en contacto con el perímetro de la entrada de alojamiento o se comprime contra otra capa o material (p. ej., membrana) que está en el contacto con el perímetro de la entrada de alojamiento.

En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado no está en el contacto físico directo con el alojamiento pero está en contacto de fluidos con el alojamiento. "Contacto de fluidos" significa que si se aplica una muestra al dispositivo a través de la entrada de alojamiento u otra abertura, el fluido contactará con la plaquita de conjugado. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado puede estar separada del alojamiento mediante otra membrana, tal como una membrana permeable, en la que la otra membrana está en el contacto físico directo con el alojamiento o en contacto físico directo con el collarín o el anillo tórico. Cuando la muestra se aplica al dispositivo, el fluido puede contactar primero con la otra membrana y luego contactar con la plaquita de conjugado. Esto es sólo un ejemplo de la plaquita de conjugado que está en el contacto de fluidos con el alojamiento. Hay otras numerosas realizaciones en las que la plaquita de conjugado no está en contacto físico directo con el alojamiento, el collarín o el anillo tórico, pero está en el contacto de fluidos con el alojamiento.

El miembro de fuerza puede aplicar cualquier presión que sea suficiente para facilitar el flujo vertical a través de capas diferentes. En algunas realizaciones, la fuerza es inferior a 0,45 kgf (1 lbf). La fuerza también puede comprimir una membrana hidrófoba o impermeable, si está presente en el dispositivo.

En algunas realizaciones, el miembro de fuerza contacta con una primera superficie de un miembro absorbente. En algunas realizaciones, una plaquita de conjugado contacta con una membrana de prueba. En algunas realizaciones, una primera superficie de una membrana de prueba contacta con una membrana permeable. En algunas realizaciones, una segunda superficie de la membrana de prueba contacta con una segunda superficie de la plaquita absorbente. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una membrana hidrófoba y, por ejemplo, la membrana hidrófoba contacta con una segunda superficie de la membrana de prueba. En algunas realizaciones, la membrana hidrófoba contacta con una primera superficie de la plaquita absorbente. En algunas realizaciones, una plaquita de conjugado contacta con un miembro adhesivo. En algunas realizaciones, una membrana de prueba contacta con un miembro adhesivo.

En algunas realizaciones, una primera superficie de la plaquita de conjugado contacta con el alojamiento y una segunda superficie de la plaquita de conjugado contacta con una primera superficie del miembro adhesivo, en donde la segunda superficie del miembro adhesivo contacta con una primera superficie de la membrana de prueba, en donde una segunda superficie de la membrana de prueba contacta con una primera superficie de la plaquita absorbente, en donde una segunda superficie de la plaquita absorbente contacta con el miembro de soporte. En algunas realizaciones, la primera superficie de la plaquita de conjugado contacta con un perímetro de la entrada de alojamiento. En algunas realizaciones, la primera superficie de la plaquita de conjugado contacta con un perímetro de un collarín o un anillo tórico.

En algunas realizaciones, una o más de las entradas comprende una abertura elegida de un intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 20 cm². En algunas realizaciones, una o en más de las entradas tiene un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 cm. En algunas realizaciones, una o en más de las entradas tiene un diámetro de aproximadamente 1 o aproximadamente 1,5 cm. En algunas realizaciones, una o en más de las

5 entradas tiene un diámetro de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 cm.

En algunas realizaciones, un dispositivo para detectar un antígeno comprende un primer miembro y un segundo miembro. En algunas realizaciones, el primer miembro y el segundo miembro están en contacto entre sí. En algunas realizaciones, el primer miembro comprende una o más entradas. En algunas realizaciones, entre el primer y el

10 segundo miembro hay un sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno entre el primer y el segundo miembro comprende una plaquita de conjugado, un miembro adhesivo, una membrana de prueba y un miembro absorbente. En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno comprende en el siguiente orden: una plaquita de conjugado; un miembro adhesivo, una membrana de prueba y un miembro absorbente. Como se menciona en esta memoria, en algunas

15 realizaciones, por lo menos una parte de la plaquita de conjugado, de la membrana de prueba y del miembro absorbente son substancialmente paralelas entre sí.

En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno se comprime entre el primer y el segundo miembro (p. ej. del miembro de fuerza). En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno se comprime entre un plano formado por el primer miembro y un plano formado por el segundo miembro en

20 donde los planos formados por el primer y el segundo miembro son substancialmente paralelos entre sí y el sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, los planos son paralelos entre sí y al sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, el primer y el segundo miembro que comprimen el sistema de detección de membrana de antígeno son un miembro de fuerza. Por ejemplo, el miembro de fuerza puede referirse como que comprende un primer y un segundo miembro para crear la fuerza que comprime el

25 sistema de detección de membrana de antígeno.

En algunas realizaciones, el primer y el segundo miembro se conectan entre sí por una orilla del primer miembro que es paralela a una orilla del segundo miembro. En algunas realizaciones, el primer y el segundo miembro se conectan mediante un resorte, bisagra y similares. La manera por la que se conectan el primer y el segundo miembro no está limitada y puede ser mediante cualquier estructura que permita al sistema de membrana de antígeno ser comprimido

30 entre el primer y el segundo miembro. En algunas realizaciones, el primer y el segundo miembro son contiguos entre sí y forman un sujetador. Unos ejemplos de sujetadores (p. ej. miembros de fuerza) se muestran por toda la presente solicitud (p. ej. Figura 6). El sujetador, puede cortarse por ejemplo de metal u otro tipo de material que permita al primer miembro ser flexible de tal manera que el sistema de detección de membrana de antígeno pueda insertarse entre el primer y el segundo miembro. En algunas realizaciones, el primer miembro es removible.

En algunas realizaciones, el primer miembro se conecta o está en contacto con la plaquita de conjugado, en donde el movimiento o la retirada del primer miembro mueve la plaquita de conjugado o retira la plaquita de conjugado del dispositivo. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado es removible.

35 En algunas realizaciones, el primer miembro se conecta o está en contacto con la plaquita de conjugado, en donde el movimiento o la retirada del primer miembro mueve la plaquita de conjugado o retira la plaquita de conjugado del dispositivo. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado es removible.

En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado se retira del dispositivo que comprende el primer y el segundo miembro al retirar sólo la plaquita de conjugado.

En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado comprende una pestaña. La pestaña puede utilizarse para retirar o facilitar la retirada de la plaquita de conjugado.

40 En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado comprende una pestaña. La pestaña puede utilizarse para retirar o facilitar la retirada de la plaquita de conjugado.

En algunas realizaciones, los dispositivos descritos en esta memoria se colocan en un recipiente. En algunas realizaciones, el recipiente es un saco o una bolsa. En algunas realizaciones, el recipiente comprende una entrada. En algunas realizaciones, el recipiente comprende una capa o miembro removibles o movibles que cuando se

45 mueven o retiran exponen la entrada que permite a la muestra ser aplicada al sistema de membrana del detección de antígeno. Unos ejemplos de un miembro o capa removibles o movibles incluyen, pero no se limitan a, una aleta o pestaña. En las Figuras 8 y 9 se muestra una aleta o pestaña, por ejemplo. En algunas realizaciones, la capa removible o capa movable también pueden actuar como un sello para el recipiente. El sello puede proteger la plaquita de conjugado y/o el sistema de detección de membrana de antígeno.

En algunas realizaciones de los dispositivos y sistemas descritos en esta memoria, la capa movable o removible está en contacto o conectada con la plaquita de conjugado.

50 En algunas realizaciones de los dispositivos y sistemas descritos en esta memoria, la capa movable o removible está en contacto o conectada con la plaquita de conjugado.

En algunas realizaciones, un dispositivo para detectar un antígeno comprende un primer miembro exterior y un segundo miembro exterior que comprenden un primer miembro interior y un segundo miembro interior, en donde el primer miembro interior y el segundo miembro interior están en contacto entre sí. En algunas realizaciones, el primer

55 miembro exterior comprende una entrada. En algunas realizaciones, el primer miembro interior comprende una entrada. En algunas realizaciones, el primer miembro exterior y el primer miembro interior comprenden una entrada. En algunas realizaciones, entre el primer y el segundo miembro interior hay un sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una plaquita de conjugado. En algunas

realizaciones, el dispositivo carece de plaquita de conjugado. En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno comprende una membrana de prueba y un miembro absorbente y opcionalmente una plaquita de conjugado. En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno comprende en el siguiente orden una membrana de prueba y un miembro absorbente. En algunas realizaciones, por lo menos una parte de la plaquita de conjugado opcional, de la membrana de prueba y del miembro absorbente son substancialmente paralelas entre sí. En algunas realizaciones, como se menciona antes, el sistema de membrana de detección de antígeno se comprime entre el primer miembro interior y el segundo miembro interior. En algunas realizaciones, el dispositivo y/o el sistema comprenden un miembro adhesivo como se describe antes en la presente memoria. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una membrana de filtración. En algunas realizaciones, la membrana de filtración puede estar dentro del sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, la primera superficie de la membrana de filtración contacta con una superficie del primer miembro interior y una segunda superficie de la membrana de filtración contacta con otra membrana o miembro del sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, una segunda superficie de una membrana de filtración contacta con una superficie de una membrana de prueba. La membrana de filtración puede ser de cualquier material como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, la membrana de filtración, en algunas realizaciones, puede ser de los mismos materiales que pueden ser una plaquita de conjugado, la membrana de prueba, el miembro absorbente, y similares. En algunas realizaciones, la membrana de filtración es una plaquita de fibra de vidrio.

En algunas realizaciones, en las que la plaquita de conjugado no está presente dentro del dispositivo ni del sistema, el conjugado se suministra como un líquido o como un material que puede disolverse en un líquido (p. ej. agua, solución amortiguada, salino y similares). El conjugado puede suministrarse en un recipiente aparte (p. ej. tubo) y se proporciona con un dispositivo o sistema descrito en esta memoria. Cuando el conjugado se suministra en un recipiente, el conjugado se incuba con la muestra antes de que la muestra se aplique al sistema de membrana de detección de antígeno. La muestra puede producirse por cualquier método y/o como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, puede limpiarse o estregarse un pedazo de carne y producir una muestra de prueba. La muestra de prueba puede incubarse o puede ponerse en contacto con el conjugado para producir una mezcla de muestra de prueba-conjugado. Esta mezcla puede aplicarse luego al sistema de membrana de detección de antígeno como se describen en la presente memoria utilizando un dispositivo y/o sistema como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la mezcla de muestra de prueba-conjugado se aplica directamente a la membrana de prueba. En algunas realizaciones, la mezcla de muestra de prueba-conjugado se filtra o se pasa a través de otra membrana antes de contactar con la membrana de prueba.

En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno se comprime entre el primer y el segundo miembro interior. En algunas realizaciones, el sistema de membrana de detección de antígeno se comprime entre un plano formado por el primer miembro interior y un plano formado por el segundo miembro interior en donde los planos formados por el primer miembro interior y el segundo miembro interior son substancialmente paralelos entre sí y el sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, los planos son paralelos entre sí y al sistema de membrana de detección de antígeno. En algunas realizaciones, los planos son substancialmente paralelos al primer y al segundo miembro exterior.

En algunas realizaciones de los dispositivos descritos en esta memoria y totalmente, la plaquita de conjugado no es comprimida por el primer y el segundo miembro interior o por los miembros de fuerza descritos en esta memoria.

En algunas realizaciones, el primer miembro exterior comprende una pestaña removible o movable. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado se conecta a dicho primer miembro exterior. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado se conecta a la pestaña removible o movable. En algunas realizaciones, el primer miembro exterior y el segundo miembro exterior forman un recipiente y el recipiente encierra al primer y al segundo miembro interior. En algunas realizaciones, el recipiente es un saco, bolsa (p. ej. que se puede sellar (p. ej. cremallera, adhesivo y similares) o cualquier otro tipo de recipiente que pueda encerrar al sistema de detección de membrana de antígeno y que se comprime entre el primer y el segundo miembro interior.

En algunas realizaciones, el recipiente comprende una pestaña removible o movable. La pestaña removible o movable puede tener cualquier forma y puede ser completamente removible o retirada hasta el punto que expone la entrada. En algunas realizaciones, cuando se mueve o retira la pestaña se mueve o retira la plaquita de conjugado. La plaquita de conjugado puede moverse, por ejemplo, una distancia suficiente de modo que los resultados de la membrana de prueba puedan ser analizados (p. ej. visualizados).

En algunas realizaciones, una primera superficie de la plaquita de conjugado está en contacto con el primer miembro exterior y una segunda superficie de la plaquita de conjugado está en contacto con el primer miembro interior.

En algunas realizaciones, el primer y el segundo miembro interior se conectan entre sí por una orilla del primer miembro interior que es paralela a una orilla del segundo miembro interior. En algunas realizaciones, el primer y el segundo miembro interior se conectan mediante un resorte, bisagra y similares. La manera por la que se conectan el primer y el segundo miembro interior no está limitada y puede ser por cualquier estructura que permita al sistema de membrana de antígeno ser comprimido entre el primer y el segundo miembro. En algunas realizaciones, el primer y el segundo miembro interior son contiguos entre sí y forman un sujetador. En toda la presente solicitud se muestran

unos ejemplos de sujetadores. El sujetador, puede cortarse por ejemplo del metal u otro tipo de material que permita al primer miembro interior ser flexible de tal manera que el sistema de detección de membrana de antígeno pueda insertarse entre el primer y el segundo miembro. En algunas realizaciones, el primer miembro interior es removible.

5 Como se menciona en esta memoria, los dispositivos y sistemas pueden comprender una capa removible o movable (p. ej. pestaña). La capa removible o movable puede retirarse o moverse por fuerza manual, tal como, pero no limitado a, desprender o desgarrar. La capa removible o movable también puede retirarse o moverse por fuerza mecánica. La manera por la que la capa removible o movable se mueve puede ser por cualquier medio. Unos ejemplos de una capa removible o movable incluyen, pero no se limitan a, pestañas, aletas y similares. Como se menciona en esta memoria, esta aleta o pestaña pueden actuar como un sello y similares.

10 Como se menciona en esta memoria, la plaquita de conjugado puede comprender un reactivo de captura específico de antígeno. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado comprende una pluralidad de reactivos de captura específicos de antígeno. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado comprende 1, 2, 3, 4 o 5 reactivos de captura específicos de antígeno. El antígeno puede ser cualquier molécula que pueda ser reconocida específicamente por un reactivo de captura. Unos ejemplos de antígenos incluyen una molécula de polinucleótido (p. ej., ADN, ARN, siARN, oligonucleótido de antisentido) un péptido, una proteína, un sacárido, un polisacárido, un carbohidrato y similares. El antígeno también puede referirse a los diferentes epítomos presentes en la misma proteína o polipéptido.

El reactivo de captura también puede ser, por ejemplo, proteína A, proteína G y similares.

20 En algunas realizaciones, la proteína detectada es una proteína de patógeno. Una proteína de patógeno se refiere a una proteína que proviene de un patógeno. Unos ejemplos de patógenos incluyen, pero no se limitan a, virus, procariota y organismos de eucariota tales como organismos patógenos unicelulares y parásitos pluricelulares. Los patógenos también pueden incluir patógenos de protozoo que incluyen una fase en el ciclo vital en el que son patógenos intracelulares. Tal como se emplea en esta memoria, el término "patógeno intracelular" pretende referirse a un virus u organismo patógeno que, por lo menos parte de su ciclo reproductor o vital, existe dentro de una célula anfitriona y en la misma produce o hace que se produzcan proteínas de patógeno.

25 Los patógenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a, coco gram-positivo patógeno bacteriano, que incluyen, pero no se limitan a: neumocócica, stafilocócica y estreptocócica. Los cocos gram-negativo patógenos incluyen, pero no se limitan a: meningocócica y gonocócica. Los bacilos gram-negativo entéricos patógenos incluyen, pero no se limitan a: enterobacteriaceas, pseudomonas, acinetobacteria, eikenella, melioidosis, salmonella, shigelosis, haemophilus, chancroide, brucelosis, tularemia, yersinia (pasteurella), moniliformis de streptobacillus y spirillum, monocitogenes de listeria, erysipelotheix rhusiopathiae, difteria, cólera, ántrax, donovanosis (granuloma inguinal) y bartonellosis. Las bacterias anaerobias patógenas incluyen, pero no se limitan a: tétano, botulismo, otros Clostridia, tuberculosis, lepra y otras micobacterias. Las enfermedades patógenas spiroquetales incluyen, pero no se limitan a: sífilis, treponematosas, pian, pinta y sífilis endémica y leptospirosis. Otras infecciones causadas por bacterias patógenas mayores y hongos patógenos incluyen, pero no se limitan a: actinomicosis, nocardiosis, criptococcosis, 30 icosis, histoplasmosis y coccidioidomí, candidiasis, aspergilosis, y mucormicosis, sporotricosis, paracoccidioidomí, petriellidiosis, tomlopsosis, micetoma y cromomicosis, y dermatofitosis. Las infecciones de Rickettsial incluyen rickettsial y rickettsioses. Unos ejemplos de infecciones de micoplasma y clamidial incluyen, pero no se limitan a: pulmonías de micoplasma, linfogranuloma venéreo, psitacosis, y las infecciones perinatales de chlamydial. Unos protozoos y helmintos patógenos incluyen, pero no se limitan a: amebiasis, malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, toxoplasmosis, pneumocistis carinii, babesiosis, giardiasis, triquinosis, filariasis, squistosomiasis, nematodos, trematodos o duelas, y infecciones cestoda (tenia). Las bacterias también incluyen E. coli, un Campylobacter y una Salmonella.

En algunas realizaciones, E. Coli es E. coli 0157.

45 Unos ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, VIH, Hepatitis A, B y C, VIF, lentivirus, pestivirus, Virus Occidental de Nilo, sarampión, viruela, viruela bobina, ébola, coronavirus y similares. Otros patógenos también se describen en la solicitud de patente de EE.UU. nº de publicación 2008-0139494.

50 En algunas realizaciones, el patógeno es un patógeno llevado por alimentos. El antígeno puede estar presente en un patógeno llevado alimentos. Los patógenos llevados por alimentos son unos patógenos (p. ej., víricos o bacterianos) que ocasionan una enfermedad después de comer un alimento contaminado. El alimento mismo no ocasiona directamente la enfermedad, sino más bien el consumo del patógeno, llevado por alimentos, que está presente en el alimento el que ocasiona la enfermedad. En algunas realizaciones, el patógeno llevado por alimentos es E. coli, Campylobacter o Salmonella. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno que se elige de un antígeno patógeno llevado por alimentos. Por ejemplo, el antígeno patógeno llevado por alimentos puede elegirse, pero no se limita a, un antígeno de E. de coli, un antígeno de Campylobacter o un antígeno de Salmonella. En algunas 55 realizaciones, el antígeno es la especie específica O-Antígeno. En algunas realizaciones, el O-antígeno es el O-antígeno de E. coli y/o de Salmonella y puede utilizarse para la detección de E. coli y de Salmonella. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno de flagelina. En algunas realizaciones, el antígeno es el antígeno de flagelina de Campylobacter.

En algunas realizaciones, el reactivo de captura comprende un reactivo de detección. El reactivo de detección puede ser cualquier reactivo que pueda utilizarse para detectar la presencia de la unión de reactivo de captura a su socio de unión específico. El reactivo de captura puede comprender un reactivo de detección directamente o el reactivo de captura puede comprender una partícula que comprende el reactivo de detección. En algunas realizaciones, el reactivo de captura y/o la partícula comprende un color, oro coloidal, etiqueta radioactiva, etiqueta fluorescente o un sustrato de quimioluminiscente. En algunas realizaciones, la partícula o el reactivo de captura comprenden un nanocristal, nanopartículas de conversión en aumento, nanopartículas de fusión de selenuro de cadmio/sulfuro de cadmio, puntos de cuanto y fluoróforos de infrarrojos cercanos (NIR) o material (como, pero no limitados a, los materiales tales como las agrupaciones de lantano y ftalocianinas, así como diodos emisores de luz que consisten en CuPc, PdPc y PtPc) capaz de emitir la luz en el espectro de NIR. La partícula puede ser, por ejemplo, una partícula vírica, una partícula de látex, una partícula de lípido o una partícula fluorescente. En algunas realizaciones, el oro coloidal tiene un tamaño de diámetro de: aproximadamente 20 nm, aproximadamente 30 nm o aproximadamente 40 nm o en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nm, o de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 nm. En algunas realizaciones, la partícula comprende una partícula de aleación metálica. En algunas realizaciones, la partícula de aleación metálica tiene un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nm. Unos ejemplos de partículas de aleación metálicas incluyen, pero no se limitan a, partículas de aleaciones metálicas de oro, partículas bimetalicas oro-plata, partículas metálicas de aleación de plata, partículas de aleación de cobre, partículas de Cadmio-Selenio, partículas de aleación de paladio, partículas de aleación de platino y nanopartículas de plomo.

En algunas realizaciones, la membrana de prueba también comprende uno o más reactivos de captura.

Los reactivos de captura de la presente invención también pueden incluir un anti-anticuerpo, es decir un anticuerpo que reconoce otro anticuerpo pero no es específico para un antígeno, tal como, pero no limitado a, anti-anticuerpo IgG, anti-anticuerpo IgM o anti-anticuerpo IgE. En el que la membrana de prueba comprende un anti-anticuerpo, tal como anti-anticuerpo IgG, anti-anticuerpo IgM o anti-anticuerpo IgE, este anticuerpo no específico puede utilizarse como un control positivo para detectar si el conjugado se ha liberado de la plaquita de conjugado. Cuando la muestra se aplica al dispositivo permite la liberación de un primer reactivo de captura desde la plaquita de conjugado. Cuando el reactivo de captura se libera y fluye a través del dispositivo, ya sea conectado al antígeno o no, puede contactar con el anti-anticuerpo, tal como anti-anticuerpo IgG o anti-anticuerpo IgM, que entonces puede detectarse. Esta detección puede utilizarse para mostrar que el dispositivo trabaja apropiadamente.

En algunas realizaciones, la membrana de prueba comprende un segundo reactivo de captura específico de antígeno. En algunas realizaciones, la membrana de prueba comprende una primera zona que comprende un primer reactivo de captura que comprende un reactivo de captura de anti-IgG; y una segunda zona que comprende un segundo reactivo de captura específico de antígeno, en donde la primera y la segunda zona no se superponen completamente ni coinciden entre sí. Esta realización no limitante puede utilizarse para demostrar que el dispositivo trabaja apropiadamente y se utiliza para detectar la presencia del antígeno de interés.

En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado comprende un primer reactivo de captura específico de antígeno y la membrana de prueba comprende un segundo reactivo de captura específico de antígeno, en donde el primer y el segundo reactivos de captura específicos de antígeno se unen a los epítomos no competitivos presentes en el antígeno. El dispositivo puede, por ejemplo, emplear un ensayo de tipo sándwich que se produce en dos etapas. La primera etapa es la unión del antígeno al reactivo de captura presente en la plaquita de conjugado. Después la unión al primer reactivo de captura específico de antígeno el antígeno puede fluir a través o ponerse en contacto con la membrana de prueba en la que está presente un segundo reactivo de captura específico de antígeno. Con la interacción con la membrana de prueba si el antígeno de prueba puede unirse al segundo reactivo de captura específico de antígeno, podrá ser detectado por visualización por el uso de otro dispositivo de detección tal como, pero no limitado a, un lector fluorescente. La membrana de prueba y la plaquita de conjugado pueden comprender reactivos adicionales de captura específicos de antígeno que reconocen diferentes antígenos o diferentes epítomos. En algunas realizaciones, la membrana de prueba o la plaquita de conjugado comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 reactivos de captura específicos de antígeno. En algunas realizaciones, la membrana de prueba o la plaquita de conjugado comprenden una pluralidad de reactivos de captura específicos de antígeno. En algunas realizaciones, cada reactivo de captura específico de antígeno reconoce un antígeno diferente o un epítomo diferente en el mismo antígeno.

Los "diferentes antígenos" también pueden referirse a la misma proteína pero una proteína que es de diferentes cepas del mismo organismo. Los diferentes antígenos también pueden referirse a antígenos de organismos diferentes. Por ejemplo, hay muchas cepas de E. coli. No todas las cepas de E. coli ocasionan una enfermedad llevada por alimentos. La presente invención puede utilizarse, por ejemplo, para detectar un antígeno de una cepa patógena de E. coli a diferencia de detectar un antígeno de una cepa no patógena de E. coli. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado y/o la membrana de prueba comprenden un primer y un segundo reactivo de captura específico de antígeno, en donde el primer y dichos segundos reactivos de captura reconocen diferentes antígenos. En algunas realizaciones, la membrana de prueba y/o la plaquita de conjugado comprenden una pluralidad de áreas que comprenden una pluralidad de reactivos de captura específicos de antígeno, en donde la

pluralidad de reactivos de captura específicos de antígenos reconocen diferentes antígenos. En algunas realizaciones, la pluralidad de zonas no se superponen completamente ni coinciden entre sí. En algunas realizaciones, la pluralidad de antígenos se eligen de manera independiente de un antígeno de *E. coli*, un antígeno de *Campylobacter* y un antígeno de *Salmonella*. En algunas realizaciones de la presente invención, la pluralidad de antígenos es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de 10 antígenos.

Los dispositivos pueden alojarse por separado, en pares o en múltiples configuraciones. El alojamiento puede ser hermético a agua para evitar fugas y puede fabricarse de una variedad de materiales inertes, tales como materiales de polímero. Las entradas, en algunas realizaciones, pueden tener un tamaño suficiente como para contener alguna cantidad necesaria de muestra o reactivos a utilizar con la invención.

Debido a que las membranas, los miembros o las plaquitas del dispositivo son químicamente inertes de manera adecuada, pueden tener que ser activados en cualquier lugar de reacción en el que se desee inmovilizar un reactivo de unión específico contra el transporte de disolvente. Pueden ser necesarios varios métodos para producir el reactivo inmovilizado según la naturaleza química particular del reactivo. Generalmente, cuando el medio es nitrocelulosa o un éster mezclado de nitrocelulosa, para la inmovilización de reactivos no se necesita ningún enlace químico especial. Pueden utilizarse varias técnicas para otros materiales y los reactivos que incluyen funcionalización con materiales tales como carbonildiimidazol, tal como glutaraldehído o ácido succínico, o el tratamiento con materiales tales como bromuro de cianógeno. Otras reacciones adecuadas incluyen el tratamiento con bases de Schiff y borohidruro para la reducción de grupos aldehído, carbonilo y amino. ADN, ARN y ciertos antígenos pueden inmovilizarse contra el transporte de disolvente mediante horneado sobre el material cromatográfico. El horneo puede ser llevado a cabo a temperaturas que van de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 120 °C para tiempos que varían de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente 12 horas, y, en algunas realizaciones, a aproximadamente 80 °C durante aproximadamente dos horas.

La presente invención también proporciona unos sistemas que comprenden los dispositivos descritos en esta memoria y un recipiente de amortiguador. El recipiente de amortiguador puede ser cualquier amortiguador con el que se pueda mezclar la muestra que se prueba y luego se aplica al dispositivo. Por ejemplo, la muestra puede cogerse de una fuente y la muestra puede mezclarse con el amortiguador. El amortiguador puede ser un amortiguador de lisis que hace la lisis de las células o un amortiguador que mantiene el pH de la muestra de modo que el análisis pueda hacerse apropiadamente. El recipiente de amortiguador puede tener cualquier forma y puede incluirse fuera o dentro del alojamiento del dispositivo.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un sistema que comprende a un sistema de recogida de muestras. El sistema de recogida de muestras puede ser de cualquier material que pueda tomar una muestra de una fuente y permitir que la muestra sea probada. Por ejemplo, el sistema de recogida de muestras puede ser un bastoncito, tal como un bastoncillo de algodón. En algunas realizaciones, el sistema de recogida de muestras es un inoculador. En algunas realizaciones, el alojamiento comprende al sistema de recogida de muestras y una parte del sistema de recogida de muestras está en el interior del alojamiento. En algunas realizaciones, el sistema de recogida de muestras está parcialmente fuera y parcialmente dentro del alojamiento. En algunas realizaciones, el sistema de recogida de muestras está completamente fuera del alojamiento.

La presente invención también proporciona unos kits que comprenden los dispositivos descritos en esta memoria. El kit puede incluir un dispositivo como se describe en la presente memoria, un sistema de recogida de muestras, un recipiente de amortiguador, un manual de instrucciones, un control positivo, un control negativo o cualquier combinación de los mismos. Con respecto al kit, un control positivo es una muestra que se sabe que contiene el antígeno que puede ser detectado con el dispositivo presente en el kit. A diferencia del control negativo, no contendría un antígeno que puede ser detectado por el kit. El control negativo, cuando se usa conjuntamente con el anti-anticuerpo, podría demostrar que el dispositivo está funcionando apropiadamente.

En la presente invención también pueden incluirse amortiguadores. Unos ejemplos de amortiguadores incluyen, pero no se limitan a, 1X PBS (10 mM de fosfato, 137 mM de cloruro de sodio, 2,7 mM de cloruro de potasio), un amortiguador de lavado (p. ej. 10 mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, 0,5% Tween-20, 0,05% de azida de sodio), un amortiguador de membrana (p. ej. 10 mM de fosfato de sodio, 0,1% de sacarosa, 0,1% de BSA, 0,2% de PVP-40 pH 7,21, filtrado con filtro de 0,2 µm, amortiguador de conjugado de bloque policlonal (p. ej. 50 mM de borato, 10% de BSA, pH 8,93); diluyente de conjugado policlonal (p. ej., 50 mM de borato, 1% de BSA, pH 9,09), o amortiguadores bloqueadores (p. ej. 10 mM de fosfato de sodio, 0,1% de sacarosa, 0,025% de Silwet pH 7,42; 10 mM de fosfato de sodio, 1% de sacarosa, 1% de trehalosa, 0,01% de BSA, 0,025% Tween-20; 0,05% de azida de sodio, 0,025% de Silwet pH 7,4; 10 mM de fosfato de sodio, 0,1% de sacarosa, 0,1% de BSA, 0,2% de PVP-40 pH 7,21). El amortiguador también puede ser, pero no se limita a, un amortiguador bloqueador (p. ej. 10% de BSA en agua desionizada, pH 7,4 o 1% de BSA en agua desionizada, pH 7,4); 10 mM Borato, 3% de BSA, 1% de PVP40, y 0,25% Tween-100; y similares.

La plaquita de conjugado y la membrana de prueba pueden ponerse en contacto con cualquiera de los amortiguadores descritos en esta memoria o en presencia o ausencia de un reactivo de captura y, en algunas realizaciones, se deja secar.

Unos ejemplos de amortiguadores que son amortiguadores de lisis incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, 2% Tween (en volumen) y 0,1% de Triton (en volumen); 2% Tween (en volumen) y 0,1% de SDS (peso/volumen); 2% Tween (en volumen) y 0,1% de BSA (peso/volumen); 2% Tween (en volumen) y 1% de BSA (peso/volumen), 0,1% de SDS (peso/volumen) 1% de BSA (peso/volumen) o cualquier combinación de los mismos. Los amortiguadores de lisis también pueden ser, por ejemplo, 5% de Tween/PBS; 2% de Tween/PBS + 0,1% de SDS; 2% de Tween/PBS + 1% de BSA. Otros ejemplos de amortiguadores de lisis incluyen, pero no se limitan a, 5% Tween-80 (en volumen); 5% de Triton X-100 (en volumen); 5% de NP40 (en volumen); 2% Tween-80 (en volumen); 2% de Triton X-100 (en volumen); 2% de NP40 (en volumen); 1% Tween-80 (en volumen); 1% de Triton X-100 (en volumen); y 1% de NP40 (en volumen). Los detergentes y otros componentes de los amortiguadores pueden hacerse con cualquier amortiguador adecuado para las proteínas, e incluyen, pero no se limitan a, agua y salino amortiguado con fosfato. Pueden utilizarse amortiguadores de lisis para preparar las muestras antes de que las muestras se pongan en contacto con los dispositivos descritos en esta memoria. En algunas realizaciones no se utiliza un amortiguador de lisis. Un amortiguador de lisis no se utiliza en una muestra cuando se desea detectar una proteína de superficie o un antígeno de superficie. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la muestra no se somete a lisis o a condiciones que causarían la lisis de una célula.

La presente invención también proporciona unos métodos para detectar un antígeno, que comprenden poner en contacto una muestra utilizando un dispositivo y/o un sistema como se describe en la presente memoria, en donde la muestra contacta con la plaquita de conjugado y la membrana de prueba, en donde una reacción positiva con la membrana de prueba indica la presencia del antígeno, en donde la plaquita de conjugado comprende un primer reactivo de captura específico de antígeno y la membrana de prueba comprende un segundo reactivo de captura específico de antígeno. Una reacción positiva es indicada por el reactivo de captura presente en la unión de la membrana de prueba con un antígeno en la muestra de prueba. El reactivo de captura en la membrana de prueba se aplica a la membrana de prueba de modo que indicará una reacción positiva cuando se una a su antígeno específico. El reactivo específico de captura puede aplicarse de cualquier manera de tal manera que cuando se detecta puede formar una línea, un círculo, un signo más, una línea interrumpida, una "X" o cualquier otro patrón. En algunas realizaciones, la línea de control que indica que el dispositivo está funcionando apropiadamente cruzará la línea específica de antígeno y cuando el reactivo de captura específico de antígeno se une al antígeno la pestaña detectable formará un signo más. La detección puede ser determinada por la detección del reactivo de detección como se describe en la presente memoria y por métodos rutinarios conocidos por un experto en la técnica.

En algunas realizaciones, una muestra contacta con el dispositivo, que entonces es seguido por un amortiguador que se aplica al dispositivo después de que la muestra haya contactado con el dispositivo. Por ejemplo, una muestra que comprende un antígeno puede ponerse en contacto con la plaquita de conjugado de tal manera que la muestra sea transferida a la plaquita de conjugado. Tras el contacto con la plaquita de conjugado, una disolución aparte puede aplicarse al dispositivo para facilitar o iniciar el flujo vertical a través de los dispositivos descritos en esta memoria.

En algunas realizaciones, como se describe en la presente memoria, el reactivo de captura es un anticuerpo. En algunas realizaciones, la muestra que se prueba es una disolución, pero también puede ser una mezcla de disolución o un amortiguador y un material sólido que pueden aplicarse al dispositivo. La disolución disuelve luego el antígeno y permite que el reactivo de captura de la plaquita de conjugado entre en contacto con los antígenos presentes en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra comprende un residuo de lisis celular. En algunas realizaciones, el residuo de lisis celular se aclara por centrifugado u otros medios para retirar los materiales no solubles.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una muestra de prueba con un sistema de recogida de muestras y poner en contacto el sistema de recogida de muestras con el dispositivo. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto el sistema de recogida de muestras con una disolución o amortiguador, en donde la disolución o amortiguador se aplican al dispositivo. En algunas realizaciones, las muestras se ponen en contacto con la plaquita de conjugado antes de que la muestra entre en contacto con la membrana de prueba. En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto con la plaquita de conjugado y la membrana de prueba simultáneamente.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden mover la plaquita de conjugado de los dispositivos que se describen en esta memoria, en donde el movimiento o la retirada de la plaquita de conjugado expone la membrana de prueba para la detección. En algunas realizaciones, el movimiento o la retirada del miembro removible mueve o retira la plaquita de conjugado. En algunas realizaciones, la plaquita de conjugado se conecta al miembro removible y/o al miembro adhesivo. En algunas realizaciones, cuando el miembro removible se mueve o se retira el miembro adhesivo también se mueve con respecto a su posición original o se retira del dispositivo. El antígeno que puede utilizar el método para detectar puede ser cualquier antígeno. El antígeno puede ser los que se describen en esta memoria o cualquier otro antígeno que pueda detectarse utilizando los métodos y los dispositivos que se describen en esta memoria. En algunas realizaciones, el método comprende aplicar la muestra en el dispositivo y permitir que la muestra fluya a través del dispositivo por flujo vertical.

Los ejemplos que se proporcionan en esta memoria solo tienen la finalidad de ilustración y la invención no debe interpretarse como limitada a estos ejemplos.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para detectar un analito que comprende:
un alojamiento que comprende un primer miembro de alojamiento y un segundo miembro de alojamiento, en donde el alojamiento comprende:
 - 5 a) una entrada en el primer miembro de alojamiento;
 - b) un sistema de la membrana de detección de analito entre el primer y el segundo miembro de alojamiento que comprende en el siguiente orden:
 - una plaquita de conjugado;
 - un miembro adhesivo;
 - 10 una membrana de prueba; y
 - un miembro absorbente; y
 - c) un miembro de fuerza;en donde por lo menos una parte de la plaquita de conjugado, de la membrana de prueba y del miembro absorbente son paralelas entre sí;
- 15 en donde el miembro de fuerza comprime el sistema de membrana de detección de analito;
en donde la entrada permite que una muestra fluya verticalmente a través del sistema de membrana de detección de analito; y
en donde el dispositivo tiene una altura de menos de 0,15 cm, una anchura de menos de 2,1 cm, y una profundidad de menos de 4,7 cm.
- 20 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el miembro de fuerza es un sujetador.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el primer miembro de alojamiento se conecta o está en contacto con la plaquita de conjugado, en donde el movimiento o la retirada del primer miembro de alojamiento mueve la plaquita de conjugado o retira la plaquita de conjugado del dispositivo.
4. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde la plaquita de conjugado comprende un primer reactivo de
25 captura específico de analito.
5. El dispositivo de la reivindicación 4, en donde el analito reconocido por el primer reactivo de captura específico de analito es un polinucleótido, un péptido, una proteína, un sacárido o un carbohidrato.
6. El dispositivo de la reivindicación 4, en donde el analito reconocido por el primer reactivo de captura específico de analito es un analito patógeno.
- 30 7. El dispositivo de la reivindicación 4, en donde el primer reactivo de captura específico de analito es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un fragmento Fc o un anticuerpo de cadena simple.
8. El dispositivo de la reivindicación 4, en donde el primer reactivo de captura específico de analito es conjugado a un nanocrystal, nanopartículas de conversión en aumento, fluoroforo de infrarrojos cercanos (NIR), oro coloidal,
35 molécula fluorescente, etiqueta radioactiva o un sustrato quimioluminiscente.
9. Un dispositivo para detectar un analito que comprende:
un primer miembro y un segundo miembro en contacto entre sí, en donde dicho primer miembro comprende una entrada, y
en donde entre el primer y el segundo miembro hay un sistema de membrana de detección de analito que
40 comprende en el siguiente orden:
 - una plaquita de conjugado;
 - un miembro adhesivo;
 - una membrana de prueba; y
 - un miembro absorbente; y

en donde por lo menos una parte de la plaquita de conjugado, de la membrana de prueba y del miembro absorbente son paralelas entre sí,

en donde dicho sistema de membrana de detección de analito se comprime entre el primer y el segundo miembro, y

5 en donde la entrada permite que una muestra fluya verticalmente a través del sistema de membrana de detección de analito.

10. El dispositivo de la reivindicación 9, en donde dicho primer y dicho segundo miembro se conectan entre sí con una bisagra o resorte o en donde el primer y segundo miembro son contiguos y forman un sujetador.

10 11. El dispositivo de la reivindicación 9, en donde el primer miembro se conecta o está en contacto con la plaquita de conjugado, en donde el movimiento o la retirada del primer miembro mueve la plaquita de conjugado o retira la plaquita de conjugado del dispositivo.

12. Un kit que comprende el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y uno o más de un control positivo, un control negativo, un folleto de instrucciones, un recipiente de amortiguador y un sistema de recogida de muestras, o cualquier combinación de los mismos.

13. Un método para detectar un analito que comprende:

15 poner en contacto una muestra con la plaquita de conjugado del dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11;

retirar la plaquita de conjugado; e

identificar una reacción positiva o negativa para el analito;

en donde la muestra fluye verticalmente desde la plaquita de conjugado a la membrana de prueba.

Figura 1

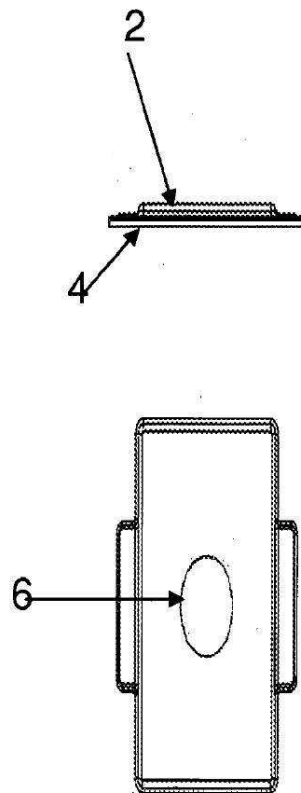


Figura 2

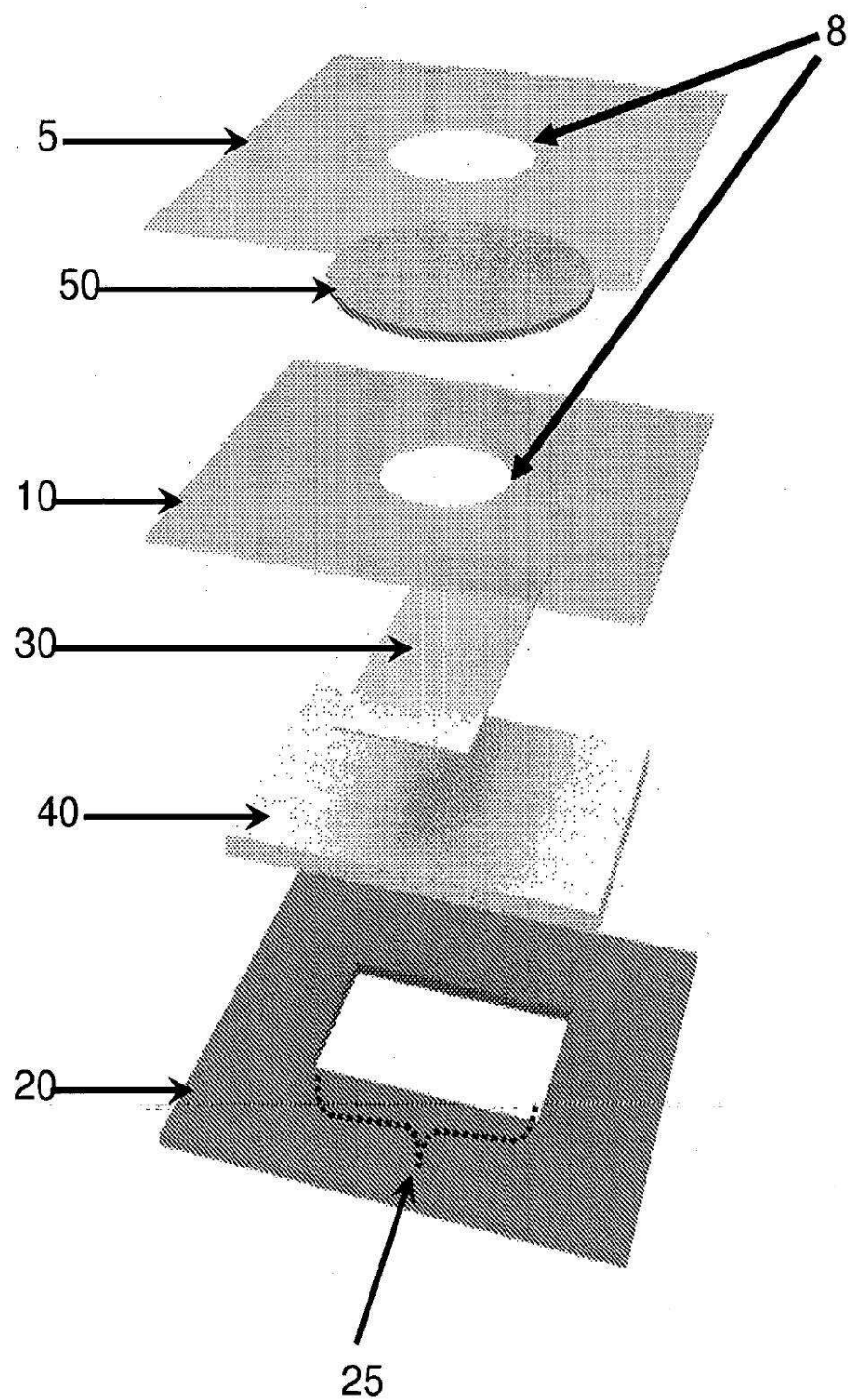


Figura 3

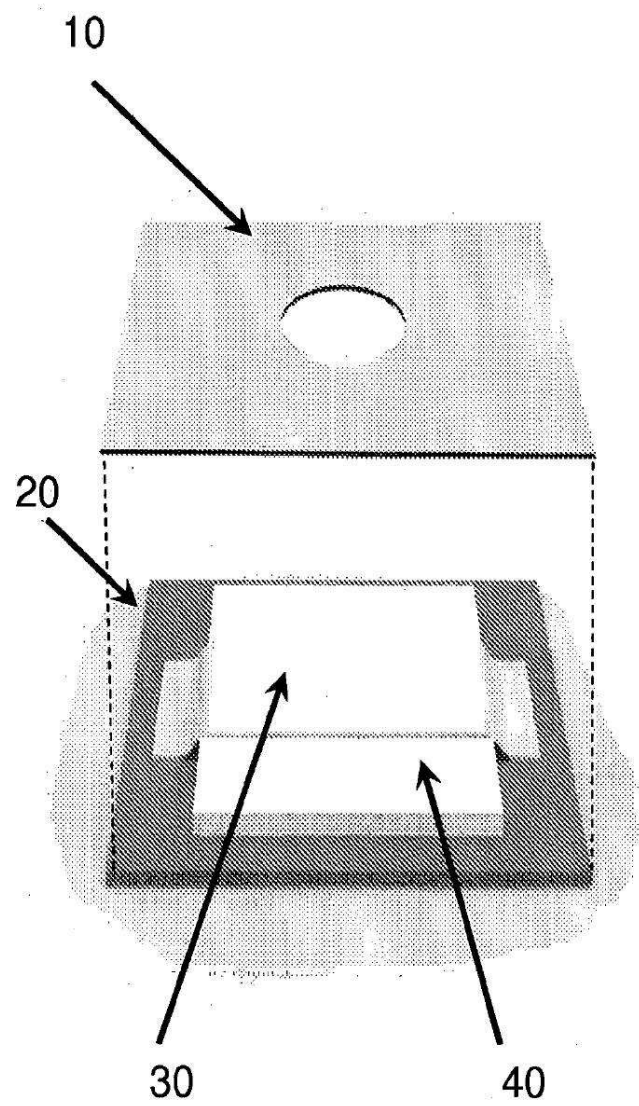


Figura 4

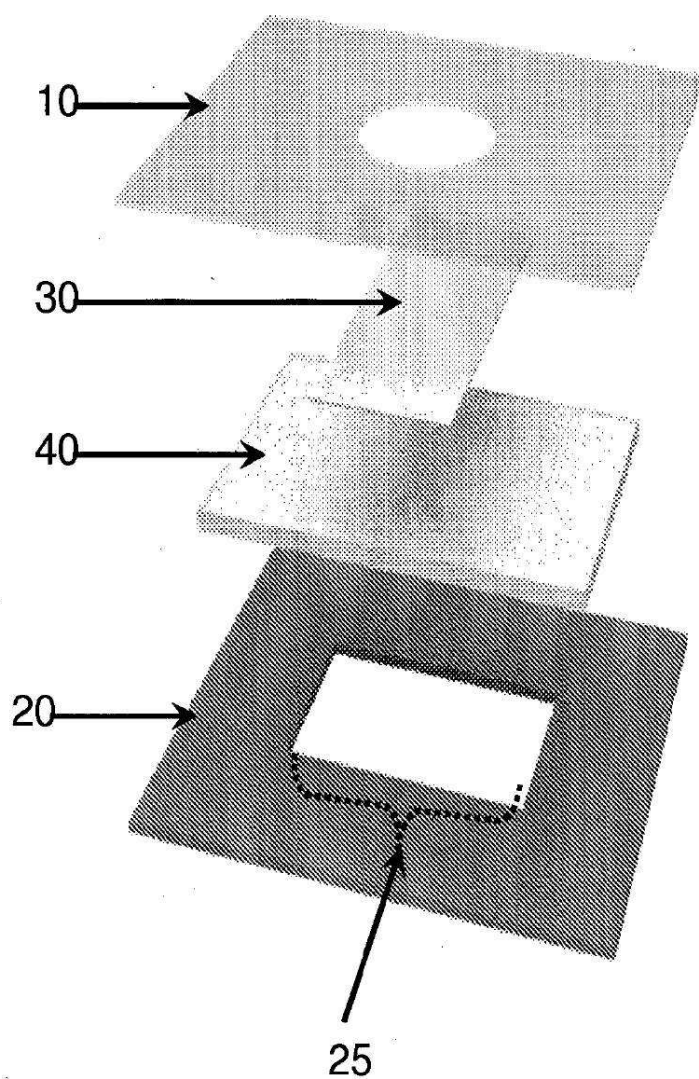


Figura 5

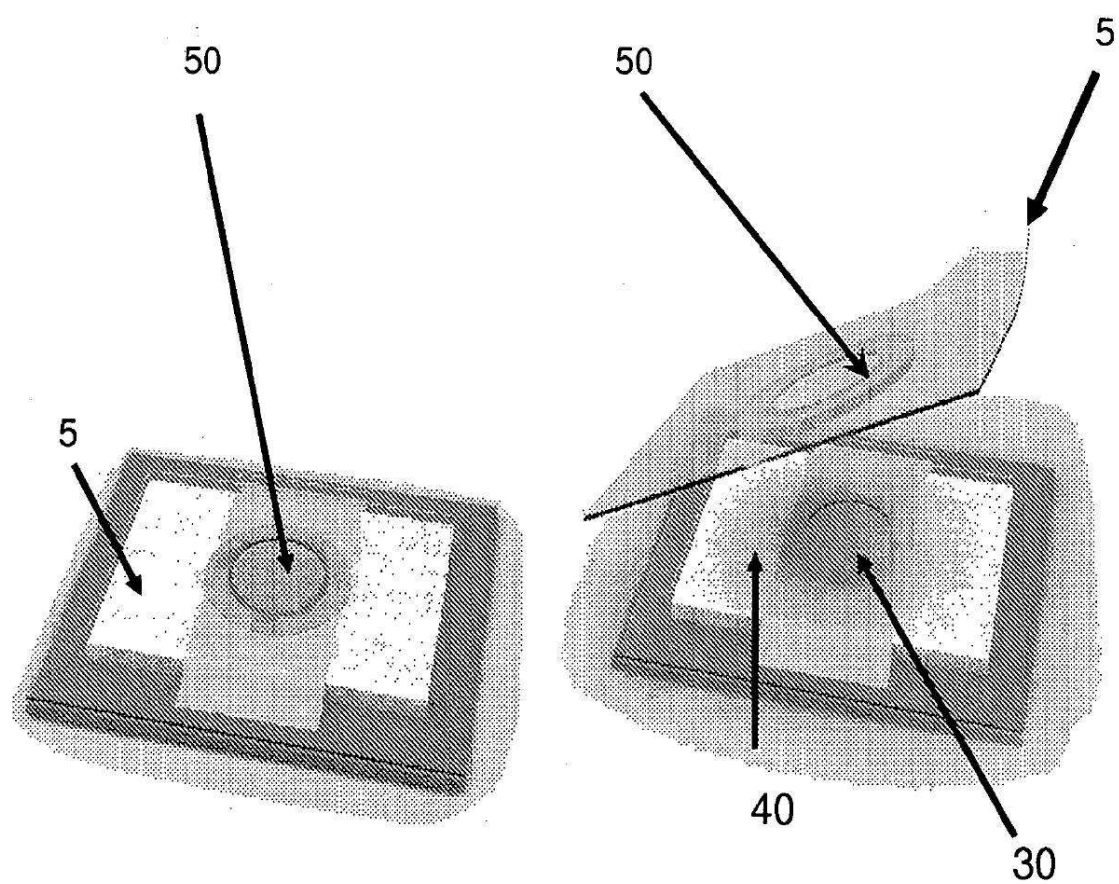


Figura 6

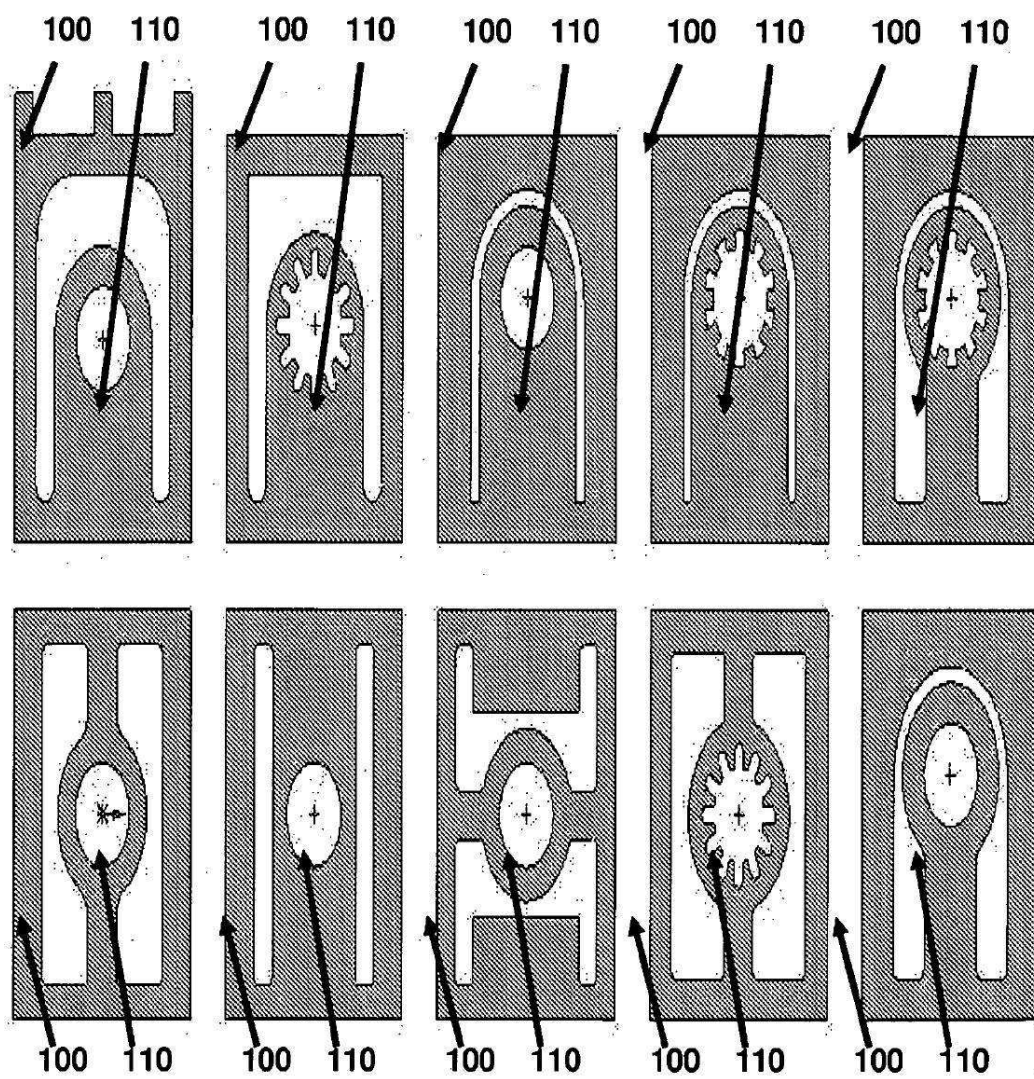


Figura 7

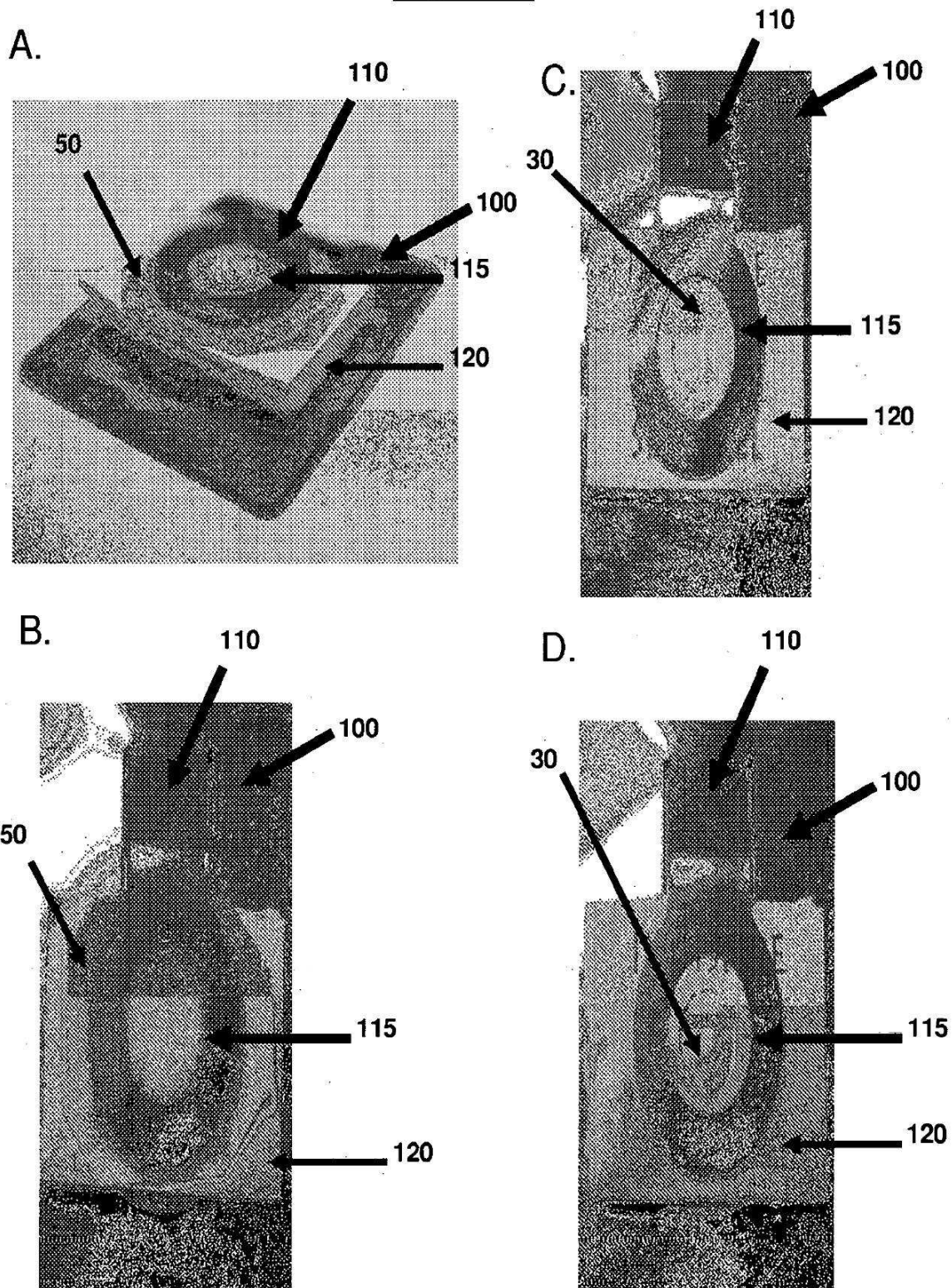


Figura 8

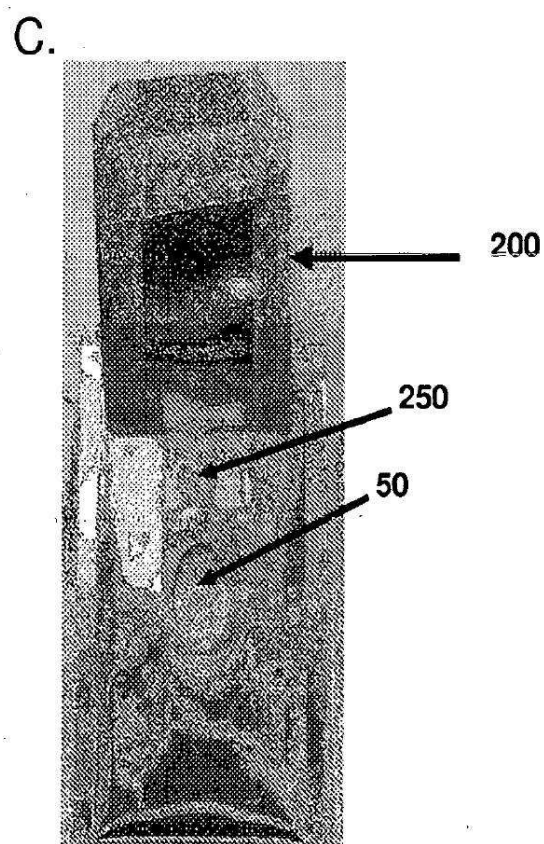
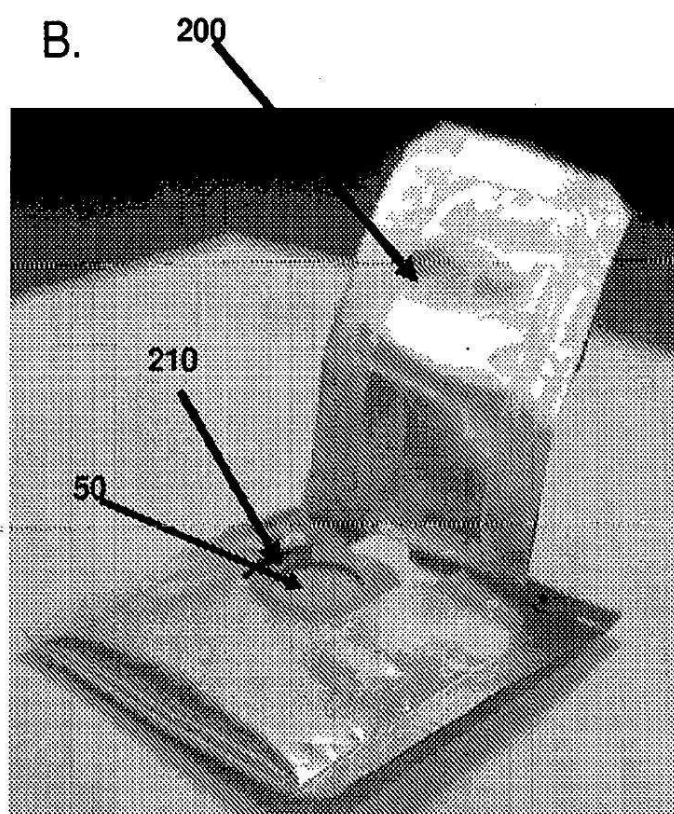
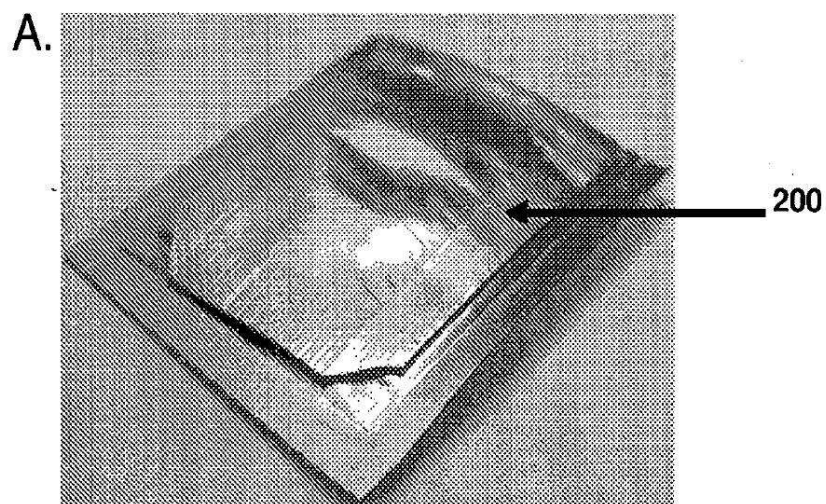


Figura 9

