

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 768**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10835165 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2507632**

54 Título: **Ensayo de flujo lateral multiplanar con compresor de muestras**

30 Prioridad:

**04.12.2009 US 266641 P**

**06.05.2010 US 331966 P**

**07.06.2010 US 352093 P**

**14.10.2010 US 392981 P**

**01.12.2010 US 957683**

**02.12.2010 US 958454**

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

**01.12.2014**

73 Titular/es:

**RAPID PATHOGEN SCREENING INC. (100.0%)**

**7227 Delainey Court  
Sarasota, FL 34240, US**

72 Inventor/es:

**SAMBURSKY, ROBERT, P.;**

**BABU, UMA, MAHESH;**

**VANDINE, ROBERT, W.;**

**KANAUJIA, GANGA, V. y**

**ORSINI, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 523 768 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

Ensayo de flujo lateral multiplanar con compresor de muestras

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La invención se refiere al campo de pruebas de diagnóstico analítico inmediato. Más particularmente, la invención se refiere a ensayos de flujo lateral.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 Los ensayos de flujo lateral son un subconjunto de ensayos que combinan diversos reactivos y etapas del proceso en una tira reactiva, proporcionando de este modo un medio sensible y rápido para la detección de moléculas diana. Inmunoensayos de flujo lateral a base de anticuerpos están disponibles para una amplia gama de analitos diana y pueden diseñarse para principios de prueba en sándwich o competitiva. Generalmente, los analitos con elevado peso molecular con varios epítomos se analizan en formato sándwich mientras que las moléculas pequeñas que representan solamente un epítomo se detectan por medio de un ensayo competitivo. Las primeras pruebas se

20 realizaron para gonadotropina coriónica humana (hCG). Hoy existen pruebas disponibles en el mercado para monitorizar la ovulación, detectar organismos de enfermedades infecciosas, analizar drogas, y medir otros analitos importantes para la fisiología humana. También se han presentado productos para pruebas veterinarias, pruebas medioambientales y monitorización de productos.

25 En la técnica anterior, el receptor marcado móvil (también conocido como el rastreador o el conjugado de prueba en el presente documento) en estos ensayos está seco sobre la tira, contenido en una solución eluyente externa (de modo que pueda mezclarse previamente con la muestra antes de la aplicación sobre la tira reactiva), o es parte de los medios de elución.

30 La publicación de patente europea EP0582231, publicada el 9 de febrero de 1994, titulada "SOLID PHASE ASSAY", desvela un ensayo con un soporte sólido poroso con una primera parte que contacta con una muestra que puede incluir un analito de interés. La muestra fluye a través del soporte sólido y el analito, si está presente, se combina con un rastreador, que está unido de forma reversible sobre el soporte sólido. La muestra y el rastreador inicialmente se desplazan en una dirección perpendicular a la primera parte (por ejemplo verticalmente) mediante flujo por

35 capilaridad. El rastreador y el analito siguen desplazándose a continuación mediante flujo por capilaridad a través del material hasta una segunda parte que incluye un aglutinante inmovilizado, que se une al analito en un inmunoensayo de formato en sándwich. El desplazamiento hasta la segunda parte se produce en una dirección perpendicular a la dirección en la que el rastreador y la muestra se desplazan inicialmente (por ejemplo lateralmente). Todo el desplazamiento de la muestra y el rastreador se produce debido al flujo por capilaridad a través del dispositivo.

40 Aunque el desplazamiento se produce vertical y lateralmente, existe una única trayectoria de flujo. La muestra, el rastreador y el aglutinante inmovilizado están, todos, en la misma trayectoria de flujo.

45 La publicación de patente de Estados Unidos Nº 2007/0224701, publicada el 27 de septiembre de 2007, titulada "COMBINATION VERTICAL AND LATERAL FLOW IMMUNOASSAY DEVICE", desvela dispositivos de inmunoensayo, kits y métodos para determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra de líquido usando una combinación de flujo vertical y flujo lateral. El dispositivo incluye una almohadilla rastreadora con un receptor marcado que está verticalmente yuxtapuesto con un medio de soporte del aglutinante. El dispositivo desvelado en esta publicación es multi-seccionado pero, similar al documento EP0582231, solamente tiene una única trayectoria de flujo. La muestra, el receptor marcado, y el medio de soporte del aglutinante están todos en la

50 misma trayectoria de flujo.

La patente de Estados Unidos Nº 4.963.325, expedida el 16 de octubre de 1990, titulada "SWAB EXPRESSOR IMMUNOASSAY DEVICE", desvela un dispositivo envasado previamente, desechable compuesto por un miembro de soporte alargado con estructura para soportar y colocar un hisopo. Otro miembro de soporte está montado de

55 forma articulada en un extremo del miembro de soporte del hisopo y porta un conjunto de elementos de medios de captura. El dispositivo también incluye un miembro de cubierta con estructura situada para presionar la punta del hisopo contra el elemento de captura.

60 La publicación de patente de Estados Unidos Nº 2005/175992, publicada el 11 de agosto de 2005, titulada "METHOD FOR THE RAPID DIAGNOSIS OF TARGETS IN HUMAN BODY FLUIDS", desvela un método para la detección de una diana, donde una muestra de fluido corporal se recoge con un elemento de hisopo.

65 La patente de Estados Unidos Nº 5.824.268, expedida el 20 de octubre de 1998, titulada "RAPID SELF-CONTAINED ASSAY FORMAT", desvela una tira reactiva, dispositivos y métodos para detectar un analito. La tira reactiva tiene una zona de reacción revestida con una sustancia que se une al analito, una zona de la muestra para añadir la muestra, y una zona de la región de detección con una región revestida con reactivo de detección. La tira reactiva

está incorporada en un dispositivo que incluye un dispositivo de recogida de muestras, una carcasa y un recipiente que contiene soluciones disolventes en ambos extremos externos de la tira reactiva.

5 La patente de Estados Unidos Nº 5.985.675, expedida el 16 de noviembre de 1999, titulada "TEST DEVICE FOR DETECTION OF AN ANALYTE", desvela un dispositivo de prueba que incluye una carcasa y una tira reactiva de flujo lateral para la detección de un analito (por ejemplo beta-lactama en la leche). La carcasa es alargada, tiene forma de cepillo de dientes, es transparente y de plástico, y tiene una cavidad de expansión, que aloja material absorbente expandido en la tira reactiva.

## 10 **Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 1. En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de aplicación de una muestra a una tira reactiva cromatográfica de flujo lateral de un dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la reivindicación 10.

15 Un compresor de muestras, tal como se define en las reivindicaciones, aplica presión a un colector de muestras en la zona de aplicación de la muestra de una tira reactiva para transferir una muestra sobre el colector de muestras y un socio de unión de un analito a la zona de aplicación de la muestra en un dispositivo de flujo lateral. Al menos uno de los socios de unión del analito no está ubicado sobre la tira reactiva o en la solución de elución antes del uso del dispositivo de flujo lateral. La tira reactiva puede ser una tira reactiva universal sin ninguna molécula que se une específicamente al analito sobre la tira reactiva. El compresor de muestras, tal como se define en las reivindicaciones, puede ser un compresor de muestras universal sin ninguna molécula que se une específicamente al analito sobre el compresor de muestras pero contiene un primer socio de unión de control. El dispositivo de flujo lateral también puede incluir un elemento de intensificación, donde el elemento de intensificación se une al sándwich del analito para incrementar una señal de detección en la zona de prueba.

25 En una realización de la presente divulgación, el dispositivo de flujo lateral para detectar un analito incluye un compresor de muestras, un colector de muestras con una parte de recogida de muestras, una tira reactiva con una zona de aplicación de la muestra y una zona de prueba, un conjugado que incluye un primer socio de unión para el analito y un marcador, y un segundo socio de unión para el analito. El conjugado o el segundo socio de unión o tanto el conjugado como el segundo socio de unión no están ubicados sobre la tira reactiva antes del uso del dispositivo de flujo lateral. El compresor de muestras, el colector de muestras y la tira reactiva forman una pila vertical para aplicar la muestra a la tira reactiva por compresión. El compresor de muestras, preferentemente, tiene una almohadilla/superficie afelpada con el conjugado y/o el segundo socio de unión estando ubicados sobre la almohadilla antes del uso del dispositivo de flujo lateral. En algunas realizaciones, el dispositivo de flujo lateral incluye un primer socio de unión de control ubicado sobre la almohadilla del compresor de muestras y un segundo socio de unión de control inmovilizado en una zona de control de la tira reactiva, donde el primer socio de unión de control es un socio de unión para el segundo socio de unión de control. El dispositivo de flujo lateral está formado, preferentemente, de modo que un resultado positivo se consigue solamente mediante aislamiento del analito en la zona de prueba mediante unión del analito al primer socio de unión y al segundo socio de unión. La zona de prueba, preferentemente, no incluye ninguna molécula que se une específicamente al analito. Preferentemente, el segundo socio de unión incluye una marca y la zona de prueba incluye un socio de unión inmovilizado para la marca.

30 En otra realización de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, la tira reactiva universal incluye una zona de prueba pero ninguna molécula que se une específicamente a un analito. La tira reactiva, preferentemente, también incluye una zona de control con un socio de unión de control inmovilizado en la zona de control. La tira reactiva, preferentemente, también incluye una marca inmovilizada en la zona de prueba, donde la marca es biotina, avidina, neutravidina, estreptavidina, una lectina o un resto glucosilo.

35 En otra realización más de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, el compresor de muestras para uso en un dispositivo de flujo lateral incluye una almohadilla y al menos un socio de unión de un analito. El compresor de muestras, preferentemente, también incluye un socio de unión de control móvil sobre la almohadilla.

40 En algunas realizaciones, el compresor de muestras es un compresor de muestras universal sin ninguna molécula que se une específicamente a un analito. El compresor de muestras universal, preferentemente, incluye una almohadilla y un socio de unión de control móvil sobre la almohadilla.

45 En otra realización de la presente divulgación, el dispositivo de flujo lateral para detectar un analito incluye una tira reactiva con una zona de aplicación de la muestra y una zona de prueba, un conjugado con un primer socio de unión para el analito y un marcador, un segundo socio de unión para el analito y un elemento de intensificación. El analito, el conjugado y el segundo socio de unión forman un sándwich que está inmovilizado en la zona de prueba cuando el analito está presente, y el elemento de intensificación se une al sándwich para incrementar una señal de detección en la zona de prueba. En algunas realizaciones, el conjugado incluye oro coloidal y el elemento de intensificación incluye al menos una sal de plata. En otras realizaciones, el elemento de intensificación incluye un antígeno y el conjugado incluye un socio de unión específico para el antígeno. El elemento de intensificación, preferentemente,

incluye un marcador. En una realización preferida, la zona de prueba no incluye una molécula que se une específicamente al analito. Preferentemente, el segundo socio de unión incluye una marca y la zona de prueba incluye un socio de unión inmovilizado de la marca.

5 En otra realización más de la presente invención, el método de aplicación de una muestra a una tira reactiva de un dispositivo de flujo lateral, tal como se define en las reivindicaciones, incluye colocar un colector de muestras con una parte de recogida de muestras con la muestra en una pila vertical entre un compresor de muestras y una zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva y aplicar una presión a la parte de recogida de muestras usando el compresor de muestras para transferir al menos una parte de la muestra a la zona de aplicación de la muestra. El método preferentemente incluye colocar una almohadilla con un socio de unión para un analito sobre la pila vertical, y aplicar la presión para transferir al menos una parte del socio de unión a la zona de aplicación de la muestra. La transferencia de la muestra a la zona de aplicación de la muestra, preferentemente, no se produce mediante flujo.

15 En otra realización más de la presente divulgación, el método de aplicación de una muestra a una tira reactiva de un dispositivo de flujo lateral incluye colocar en primer lugar al menos un socio de unión externo sobre la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva. El socio de unión externo puede estar ubicado sobre una almohadilla externa. En realizaciones donde hay dos socios de unión al analito que se unen al analito antes de alcanzar la zona de prueba, puede añadirse uno o ambos de los socios de unión al analito. Un colector de muestras que incluye la muestra se coloca en una pila vertical entre el socio de unión externo y un compresor de muestras. El compresor de muestras aplica presión al colector de muestras para transferir el socio de unión externo y al menos una parte de la muestra a la zona de aplicación de la muestra. Como alternativa, el socio de unión externo podría añadirse y ser comprimido por el compresor de muestras, a continuación retirarse, antes de que el colector de muestras se apile por encima de la zona de aplicación de la muestra, donde la muestra es comprimida sobre la tira reactiva. En otra realización alternativa, al menos un socio de unión externo se coloca en la pila vertical entre el compresor de muestras y el colector de muestras. Como alternativa, el colector de muestras se añade y se comprime, a continuación se retira, y a continuación el socio de unión externo se añade y se comprime sobre la tira reactiva. En otras realizaciones, el colector de muestras está en una pila vertical entre un primer socio de unión externo y un segundo socio de unión externo, y el compresor de muestras aplica presión a la pila vertical. En estas realizaciones, ni la tira ni el compresor de muestras tienen un socio de unión del analito específico.

30

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una tira reactiva y un colector de muestras en un dispositivo de flujo lateral.

35

La figura 2A muestra un compresor de muestras en una realización de la presente invención.

La figura 2B muestra otro compresor de muestras en una realización de la presente invención.

40

La figura 2C muestra un colector de muestras en una realización de la presente invención.

La figura 3A muestra una tira reactiva de flujo lateral en una realización de la presente invención.

45

La figura 3B muestra un sándwich completo que incluye el analito, el conjugado y un socio de unión inmovilizado en una realización de la presente invención.

La figura 3C muestra un dispositivo de flujo lateral que incluye la tira reactiva de la figura 3A, un colector de muestras y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.

50

La figura 4A muestra otra tira reactiva de flujo lateral en una realización de la presente invención.

La figura 4B muestra un sándwich completo que incluye el analito, el conjugado y un segundo socio de unión marcado en una realización de la presente invención.

55

La figura 4C muestra un dispositivo de flujo lateral que incluye la tira reactiva de la figura 4A, un colector de muestras y un compresor de muestras en una realización de la presente invención.

La figura 5A muestra otra tira reactiva de flujo lateral más, en una realización de la presente invención.

60

La figura 5B muestra un dispositivo de flujo lateral que incluye la tira reactiva de la figura 5A, un colector de muestras y un compresor de muestras en otra realización de la presente invención.

La figura 6A muestra otra tira reactiva de flujo lateral en una realización de la presente invención.

65

La figura 6B muestra un dispositivo de flujo lateral que incluye la tira reactiva de la figura 6A, un colector de muestras y un compresor de muestras, en otra realización de la presente invención.

La figura 7A muestra un dispositivo similar al dispositivo de la figura 3C, excepto que la zona de prueba está en la zona de aplicación de la muestra en una realización de la presente invención.

5 La figura 7B muestra un dispositivo similar al dispositivo de la figura 4C, excepto que la zona de prueba está en la zona de aplicación de la muestra en una realización de la presente invención.

La figura 7C muestra un dispositivo similar al dispositivo de la figura 5B, excepto que la zona de prueba está en la zona de aplicación de la muestra en una realización de la presente invención.

10 La figura 7D muestra un dispositivo similar al dispositivo de la figura 6B, excepto que la zona de prueba está en la zona de aplicación de la muestra en una realización de la presente invención.

La figura 8A muestra un dispositivo de flujo lateral en una realización de la presente invención.

15 La figura 8B muestra otro dispositivo de flujo lateral en una realización de la presente invención.

La figura 9 muestra una pila vertical en una realización de la presente invención.

20 La figura 10 muestra un sándwich con conjugado de oro de la técnica anterior en la zona de prueba.

La figura 11 muestra un sándwich con intensificación de señales en la zona de prueba en una realización de la presente divulgación.

25 La figura 12 muestra un sándwich con apilamiento en la zona de prueba en una realización de la presente invención.

La figura 13 muestra una vista en despiece ordenado esquemática de un dispositivo de flujo lateral con elementos de intensificación de señales en realizaciones de la presente divulgación.

30 La figura 14 muestra un dispositivo de flujo lateral en otra realización de la presente invención.

La figura 15A muestra una pila que se forma en una realización de la presente invención.

35 La figura 15B muestra la pila de la figura 15A inmovilizada en la zona de prueba.

La figura 15C muestra un complejo que se forma en la zona de control.

La figura 16 muestra un dispositivo de flujo lateral en otra realización de la presente invención.

40 La figura 17A muestra una pila que se forma en una realización de la presente invención.

La figura 17B muestra la pila de la figura 17A inmovilizada en la zona de prueba.

45 La figura 18 muestra un dispositivo de flujo lateral en otra realización de la presente divulgación.

La figura 19A muestra una pila que se forma en una realización de la presente divulgación.

La figura 19B muestra la pila de la figura 19A inmovilizada en la zona de prueba.

50 La figura 20A muestra una tira reactiva de flujo lateral en una realización de la presente invención.

La figura 20B muestra un sándwich "completo", que se forma, preferentemente, antes de alcanzar la línea de prueba, entre el analito, el conjugado marcado y un segundo socio de unión móvil marcado.

55 La figura 21A muestra otra realización de una tira reactiva de flujo lateral con elementos intensificadores.

La figura 21B muestra el complejo apilado en la línea de prueba en presencia de analito.

60 La figura 21C muestra un complejo apilado con la línea de prueba con elementos intensificadores adicionales.

### **Descripción detallada de la invención**

65 La presente invención se refiere a métodos y dispositivos para detectar un analito (también conocido como la diana) en una muestra, donde la muestra a analizar se aplica a un portador cromatográfico. En configuraciones multiplanares para pruebas de diagnóstico analítico inmediato, el conjugado que contiene uno de los socios de unión del analito en cuestión es, preferentemente, suministrado desde un plano diferente. La muestra que contiene el

analito es recogida directamente de la fuente y, preferentemente, no experimenta ningún tratamiento, elución, dilución o concentración anterior. Se hace que el conjugado entre en contacto con la muestra por medio de un compresor de muestras, también denominado en el presente documento como dispositivo compresor. La compresión ayuda a combinar el conjugado movilizado y la muestra. El compresor de muestras, que incluye el conjugado en realizaciones preferidas es, preferentemente, completamente independiente del dispositivo de análisis de muestras. El compresor de muestras no forma parte de la trayectoria de flujo sobre la tira reactiva. Como resultado, la transferencia del conjugado y la muestra al dispositivo de análisis de muestras, que es preferentemente una tira reactiva, se inicia usando presión, no flujo o acción por capilaridad. Después de que el compresor de muestras se aplique, si fuera necesario puede haber un lapso de tiempo antes de aplicar el tampón de migración. Este lapso de tiempo entre la aplicación de la muestra y el inicio de las pruebas mediante el flujo puede ser de hasta 24 horas o muchos días, dependiendo de la estabilidad del analito. Los componentes no de la tira reactiva, que incluyen, dependiendo de la realización, cualquier combinación del compresor de muestras, el colector de muestras y uno o más socios de unión externos, preferentemente permanecen asociados con la tira reactiva hasta que se inicia el flujo.

Un dispositivo de flujo lateral de la presente invención puede ser un inmunoensayo que usa anticuerpos o un ensayo no inmunológico que no usa anticuerpos sino que, en su lugar, usa otros socios de unión, incluyendo, aunque sin limitarse a, ácidos nucleicos, nanopartículas, ligandos y receptores.

Antes de una descripción adicional de la presente invención, y para que la invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos han sido definidos en el presente documento, tal como se relacionan con la presente invención:

El término “compresión”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la aplicación de la muestra y cualesquiera componentes sobre una almohadilla de un compresor de muestras a la tira reactiva. La almohadilla, la parte de recogida del colector de muestras y la zona de aplicación de la muestra son, todas, preferentemente compresibles, de modo que la compresión de las tres se produce durante la aplicación de la muestra a la tira reactiva.

El término “presión”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a presión física y, más específicamente, presión física aplicada por un compresor de muestras a una muestra sobre un colector de muestras y, a su vez, a una zona de aplicación de la muestra de una tira reactiva. Tal como se usa en el presente documento, presión, que puede ser suministrada mediante un medio mecánico o un usuario del dispositivo de flujo lateral, pone a la almohadilla del compresor de muestras, la parte de recogida del colector de muestras y la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva en contacto físico para transferir la muestra y cualesquiera componentes sobre la almohadilla del compresor de muestras a la tira reactiva. Esta transferencia, preferentemente, no se produce mediante flujo vertical.

Los términos “vertical” y “verticalmente”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a la dirección paralela al grosor o profundidad, en oposición a las dimensiones de longitud y anchura de los elementos utilizados en el dispositivo, tales como las almohadillas o medios.

Los términos “lateral” y “lateralmente”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a la dirección paralela a la longitud, en oposición a las dimensiones de anchura y profundidad de los elementos utilizados en el dispositivo, tales como las almohadillas y los medios.

En algunas realizaciones, muchos de los elementos de la tira reactiva son sustancialmente planos y tienen una dimensión lateral que es mayor que la dimensión vertical. Las magnitudes de estas dimensiones unas con respecto a otras, sin embargo, pueden cambiarse. Generalmente, los términos “vertical”, “verticalmente”, “lateral” y “lateralmente” también se refieren a la yuxtaposición u orientación de los elementos del dispositivo. Para elementos yuxtapuestos verticalmente, una línea normal a y que interseca la superficie plana de dicho elemento es también sustancialmente normal a e interseca la superficie plana de los otros elementos yuxtapuestos verticalmente.

La expresión “trayectoria de flujo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la trayectoria del flujo por capilaridad en un dispositivo de flujo durante el uso del dispositivo. La trayectoria de flujo en un dispositivo de flujo lateral convencional es lateralmente a lo largo de la longitud del dispositivo. En realizaciones preferidas de la presente invención, la trayectoria de flujo es solamente lateral, dado que la muestra es transferida verticalmente por compresión usando presión en lugar de mediante flujo. En contraste, el flujo vertical se usa para transferir la muestra a la tira reactiva en la técnica anterior descrita anteriormente.

El término “marcador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier átomo, átomos, molécula o moléculas, tales como una marca fluorescente, usada para proporcionar una señal detectable y, preferentemente, cuantificable. Los métodos de detección del marcador incluyen, aunque sin limitarse a, detección visible, fluorescencia, quimioluminiscencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X, absorción de rayos X, magnetismo y actividad enzimática. Las zonas de prueba del espectro visible pueden ser interpretadas por un espectrómetro para dar resultados de prueba cuantificados.

La expresión "lisis *in situ*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a técnicas para incorporar agentes de lisis en un dispositivo de pruebas analíticas de diagnóstico inmediato, tales como una tira reactiva de cromatografía u otro dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, de modo que la operación de lisis no se realice como una etapa independiente.

5 El término "zona", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier parte de la tira reactiva. Los límites de una zona son, preferentemente, planos perpendiculares a la dirección lateral. El término "zona" también abarca el término "línea", que se refiere a una zona que tiene una longitud en la dirección lateral significativamente menor que su anchura.

10 Realizaciones de la presente invención incluyen ensayos donde el analito (diana) a detectar no se une directamente a un socio de unión inmovilizado en la zona de prueba de una tira reactiva. En su lugar, el analito preferentemente interactúa con uno o más socios de unión al analito en otras zonas (o en el tampón, en algunas realizaciones) sobre la tira. Al menos uno de los socios de unión al analito incluye una primera marca que forma un complejo con una  
15 segunda marca inmovilizada en la zona de prueba.

En realizaciones preferidas, un socio de unión a la zona de control está incluido sobre el compresor de muestras. Con este diseño, si la zona del conjugado sobre el compresor de muestras no está adecuadamente comprimida y se le ha hecho contactar con la tira reactiva, no se desarrollará ninguna zona de control incluso con un flujo apropiado del tampón de migración. Por lo tanto, el aspecto de la zona de control con las muestras de prueba tanto negativa como positiva indica un auténtico control procedimental en la prueba.

20 En algunas realizaciones de la presente invención, cuando comienza el flujo lateral, la tira reactiva ya no está en contacto compresivo con el compresor de muestras y el colector de muestras. En otras realizaciones de la presente invención, sin embargo, la pila vertical se mantiene durante el flujo lateral para maximizar la transferencia desde el compresor de muestras y el colector de muestras a la tira reactiva. En otras realizaciones más, el colector de muestras se retira de la pila vertical después de la aplicación de la muestra a la tira reactiva, pero el compresor de muestras se mantiene a continuación en contacto con la tira reactiva durante el flujo lateral para maximizar la transferencia desde el compresor de muestras a la tira reactiva.

25 La invención proporciona un método sensible y rápido para la detección de analitos, por ejemplo patógenos, enzimas, mediadores inmunológicos, ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas, lipopolisacáridos, aductos de proteínas, marcadores tumorales y cardíacos y/o compuestos de bajo peso molecular, incluyendo, aunque sin limitarse a, haptenos. Los métodos y dispositivos son adecuados para el diagnóstico en seres humanos y animales, por ejemplo mascotas o animales de granja. La detección puede incluir detección directa del analito y/o la detección de anticuerpos contra el analito, que están presentes en la muestra de fluido a poner a prueba. Preferentemente, el método incluye una determinación paralela de una pluralidad de analitos. Los patógenos se seleccionan, preferentemente, entre virus o microorganismos, tales como bacterias, hongos (por ejemplo levaduras o mohos) o parásitos (por ejemplo amebas o nematodos). Los mediadores inmunitarios son parte de la cascada inflamatoria e incluyen, aunque sin limitarse a, anticuerpos, factores de crecimiento, complementos, citoquinas, linfoquinas, quimioquinas, interferones y derivados de interferón, proteína C-reactiva, calcitonina, amiloide, moléculas de adhesión, anticuerpos, y componentes quimio-atrayentes. Los compuestos de bajo peso molecular pueden incluir moléculas de fármacos o químicas o complejos y metabolitos formados por moléculas de fármacos o químicas.

40 La detección puede incluir una detección directa de la diana, por ejemplo el patógeno, y/o la detección de anticuerpos contra la diana, por ejemplo el patógeno, que están presentes en la muestra de fluido a poner a prueba. Preferentemente, el método incluye una determinación paralela de una pluralidad de dianas.

45 Como alternativa, el analito de interés puede ser un compuesto de bajo peso molecular. En una realización preferida, el analito a detectar es una molécula de fármaco tal como heroína o metanfetamina. En otras realizaciones preferidas, el compuesto de bajo peso molecular es una molécula pequeña, tal como un hapteno.

50 La invención permite la detección de una pluralidad de patógenos, alérgenos, mediadores inmunitarios, ácidos nucleicos o compuestos de bajo peso molecular sobre un único portador cromatográfico. El dispositivo de análisis de muestras puede permitir la detección simultánea de una pluralidad de compuestos de bajo peso molecular, mediadores inmunitarios, ácidos nucleicos, proteínas o patógenos. Aunque la muestra es, preferentemente, un fluido, materia o masa seca parcial o sustancialmente sólida puede ponerse a prueba como una muestra en dispositivos y métodos de la presente invención. Por ejemplo, el fluido puede coagularse o endurecerse, tal como en una herida cicatrizante, ser recogido con el colector de muestras, y a continuación transferido a la zona de aplicación de la muestra. La muestra puede ser, como alternativa, una parte endurecida de una ampolla eliminada de la ampolla que puede estar humedecida por un fluido corporal cerca del sitio de la ampolla, tal como cuando se recoge una muestra a poner a prueba para una enfermedad de transmisión sexual, o humedecerse mediante el tampón de flujo sobre la tira reactiva. La muestra puede ser uno o más exudados de heridas o ampollas.

65 La muestra corporal es, preferentemente, sangre completa, suero, plasma, un fluido de membrana mucosa (de las cavidades bucal, nasal, vaginal, anal, del oído interno y ocular), líquido cefalorraquídeo (LCR), fluido lacrimonal, fluido

del pene, una secreción o exudado de una glándula, o una secreción o exudado de una lesión o ampolla, por ejemplo lesiones o ampollas sobre la piel. Más preferentemente, la muestra se selecciona entre fluidos bucal, nasal, ocular, genital y rectal y secreciones o exudados de lesiones o ampollas de la piel.

5 En algunas realizaciones, la cantidad de líquido asociado con la muestra es insuficiente para transferir la muestra y/o cualquier conjugado o segundo socio de unión sobre la almohadilla del compresor de muestras a la zona de aplicación de la muestra bajo compresión; en su lugar, el tampón de migración proporciona el fluido adicional requerido para la transferencia de la muestra y/o conjugado y/o segundo socio de unión a la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva. En otras realizaciones, la muestra y/o cualquier conjugado o segundo socio de unión  
10 sobre la almohadilla del compresor de muestras es transferido a la zona de aplicación de la muestra bajo compresión. En realizaciones alternativas, el tampón de migración puede aplicarse a través del compresor.

En realizaciones preferidas, la muestra es un fluido que no gotea o fluye después de que es recogido. En su lugar, el fluido es una masa coagulada, de modo que, después de que la muestra está recogida sobre el colector de muestras, la muestra pueda mantenerse verticalmente o incluso boca abajo, y la muestra permanece sobre el colector de muestras. Por ejemplo, cuando una muestra ocular es recogida y no está sometida a pretratamiento, la muestra permanece sobre el colector de muestras incluso si se mantiene verticalmente o boca abajo, principalmente debido a la tensión superficial. Esto se debe a que la muestra está atrapada y contenida eficazmente sobre el colector de muestras material, por ejemplo una superficie afelpada del colector de muestras. En realizaciones preferidas, se usan fibras de polietilentereftalato (PET), tales como fibras Dacron®, o fibras de nylon, dado que la unión no es específica o permanente, así que estas fibras “liberan” el analito cuando se humedecen. El fenómeno es similar a limpiar suavemente una salpicadura con una toalla de papel, de modo que la humedad se mantiene en los poros y mediante la tensión superficial. Otros materiales que podrían usarse para la superficie afelpada del colector de muestras incluyen, aunque sin limitarse a, poliésteres, celulosa, rayón, alginato cálcico, estructuras mecánicas sometidas a microingeniería que contienen microcapilares y/o microcanales, u otras telas o mallas. En realizaciones donde se necesita un material colector estéril para recoger un fluido del cuerpo humano, se usan preferentemente materiales que pueden ser esterilizados y están aprobados para biocompatibilidad.

Una ventaja significativa del método es que los resultados de la prueba se proporcionan dentro del periodo de consulta médica, por ejemplo en unos pocos minutos. Preferentemente, los resultados se proporcionan en un periodo de tiempo de hasta 20 minutos, más preferentemente hasta 15 minutos. La prueba también puede realizarse hasta de 24 a 48 horas después de que la muestra ha sido tomada del paciente. Además, dado que la prueba es no invasiva, plantea muy poco riesgo para el paciente. Por lo tanto, el mejor tratamiento disponible puede aplicarse de forma oportuna para un patógeno específico. Una ventaja adicional respecto a métodos de la técnica anterior es que solamente se requieren unos pocos microlitros de muestra para realizar un análisis. La muestra es, preferentemente, de aproximadamente 0,1 microlitros a aproximadamente 100 microlitros, más preferentemente de aproximadamente 0,2 microlitros a aproximadamente 20 microlitros y, de la forma más preferente, de aproximadamente 0,5 microlitros a aproximadamente 15 microlitros.

40 La invención puede realizarse por medio de un sencillo kit de prueba. La manipulación del kit de prueba no necesita equipo de laboratorio adicional, manipulación adicional de reactivos o instrumentación. Otra importante ventaja de la invención descrita en el presente documento es que el límite de detección es, normalmente, de 10 a 100 veces inferior que las pruebas de diagnóstico disponibles actualmente, dado que las muestras no requieren dilución antes de ser transferidas al dispositivo de análisis. Por lo tanto, los métodos de la presente invención son más sensibles y precisos que los métodos de la técnica anterior.

Si tanto el conjugado, que incluye un primer socio de unión para el analito y un marcador detectable, como un segundo socio de unión para el analito están ubicados sobre el compresor de muestras, el dispositivo de análisis de muestras puede fabricarse y usarse para pruebas para cualquier analito. El usuario necesitaría simplemente elegir el compresor específico que contenía los socios de unión dirigidos al analito de interés.

En algunas de las realizaciones de la divulgación, una muestra de fluido corporal se recoge de forma no invasiva con un dispositivo de recogida o elemento de hisopo. La etapa de recogida preferentemente incluye pasar o restregar el elemento de hisopo sobre una superficie del cuerpo que contiene fluido corporal a poner a prueba. Preferentemente, el elemento de hisopo es estéril. El elemento de hisopo puede estar seco o pretratado con un fluido antes de la etapa de recogida.

En realizaciones preferidas, no hay pretratamiento del elemento de hisopo, y la muestra se recoge y se transfiere al dispositivo de análisis de muestras sin ningún tratamiento de la muestra recogida. Recogiendo la muestra con un dispositivo de recogida y no sometiendo a la muestra a etapas de pretratamiento tales como extraer y/o diluir la muestra, se evita la degradación de la muestra. El analito a poner a prueba, preferentemente, permanece intacto o en su forma nativa rodeado por o mezclado con las otras sustancias de origen natural en la muestra.

En la técnica anterior, cuando la muestra se extrae y se diluye en tampón, la muestra a menudo ya no está intacta. Esto puede cambiar la “conformación” del analito debido a su estabilidad o labilidad. Recogiendo una muestra directamente usando un dispositivo de recogida y no pretratando la muestra, la naturaleza nativa de la muestra se

preserva en forma concentrada. Dado que esto da como resultado una mayor concentración de muestra en menos volumen, esto incrementa la sensibilidad de la prueba. Además, sin dilución de la muestra, el tiempo de aparición y la intensidad de la zona de prueba son directamente proporcionales a la concentración de analito. Usando un espectrómetro, es posible obtener cuantificación numérica absoluta. Además, el no tener que pretratar la muestra hace a la prueba más sencilla, más rápida y menos costosa. También permite que la prueba sea realizada en un entorno clínico por médicos, enfermeros, o técnicos de laboratorio. En tiras reactivas usadas para detectar conjuntivitis, la sensibilidad de las pruebas es comparable a la sensibilidad de pruebas de reacción en cadena de polimerasa ultrasensibles.

Los métodos y dispositivos de la técnica anterior requerían pretratamiento. Algunas de las razones por las que se creía que el pretratamiento era necesario incluían la creencia errónea de que el pretratamiento daría como resultado una muestra más homogénea. Otra razón era que se creía que era necesario tamponar las muestras concentradas antes de llevar a cabo un ensayo de unión. Otros describieron la necesidad de lavar la muestra, eliminar partículas y sustancias contaminantes que podrían causar potencialmente una reacción de unión inespecífica y, por lo tanto, un resultado de la prueba falso positivo. También había una creencia generalizada en la técnica anterior de que una muestra homogénea más grande producía los resultados de la prueba de ensayo más sensibles y específicos.

Por el contrario, al no pretratar la muestra, el usuario conserva muestras no homogéneas, altamente concentradas. Tal como se describe mediante el principio material de la polarización interfacial, en materiales dieléctricos no homogéneos hay distribuciones de carga que se producen en las interfaces de las fases que componen el dieléctrico no homogéneo. En una muestra de fluido corporal infeccioso "intacta" (sin diluir o sin alterar) *in vivo*, las cargas o los portadores de carga están impedidos mediante captura en centros de impureza o en las interfaces de fase. Las características de esta muestra "intacta" dan como resultado un efecto condensador de dos capas que da como resultado una polarización de espacio-carga. Las características de una naturaleza homogénea "intacta" dan como resultado una mayor eficiencia de unión y, por lo tanto, un ensayo más sensible.

Anteriormente se desconocía qué efectos tendrían los fluidos corporales, incluyendo sangre, lágrimas y exudados purulentos, sobre diferentes materiales de superficie afelpada del colector. Específicamente, se desconocía si los analitos serían liberados eficazmente del otro material celular y transferidos desde un colector de muestras a un dispositivo de análisis de muestras.

En algunas realizaciones, el tamaño de muestra es, preferentemente, unos pocos microlitros. Después de la transferencia de la muestra a la zona de aplicación de la muestra (preferentemente sin tratar la muestra), se añade el medio de elución (también conocido como tampón de migración). Los métodos de la técnica anterior de ejecución de inmunoensayos de flujo lateral eran incapaces de realizar esta etapa de lavado. Por ejemplo, cuando se recoge una muestra ocular para realizar pruebas de infecciones oculares, tales como conjuntivitis, el tamaño de muestra es, preferentemente, de 3 a 15 microlitros. En este ejemplo, de 150 a 200 microlitros de medio de elución se añaden a continuación a la tira reactiva. Como comparación con diferentes sistemas de ensayo, este lavado de 40 a 50 veces supera el lavado realizado en pruebas de ELISA dependientes de máquinas.

En un ejemplo de recogida de una muestra, usando un suave movimiento en remolino, un elemento de hisopo estéril puede aplicarse a la superficie corporal o membrana mucosa de importancia y se le permite capturar cualesquiera patógenos, compuestos de bajo peso molecular y/o mediadores inmunitarios, péptidos, glucoproteínas, ácidos nucleicos y componentes relacionados con alergias contenidos en el fluido corporal.

El elemento de hisopo puede ser una parte que es dependiente del dispositivo de análisis de muestras. La muestra es, a continuación, transferida poniendo el contacto el elemento de hisopo con el dispositivo de análisis de muestras y el compresor de muestras en condiciones, donde al menos parte de la muestra está sobre el elemento de hisopo. Al menos parte del conjugado en realizaciones donde el conjugado está ubicado sobre el compresor de muestras y/o al menos parte del segundo socio de unión en realizaciones donde el segundo socio de unión está ubicado sobre el compresor de muestras son también transferidas al dispositivo de análisis de muestras debido a la presión. Esto es un fenómeno similar a exprimir el fluido fuera de una esponja. En esta realización, el elemento de hisopo, preferentemente, está en contacto tanto con una zona de aplicación de la muestra sobre el dispositivo de análisis como sobre la parte de almohadilla del compresor de muestras (que preferentemente incluye el conjugado y/o un segundo socio de unión para el analito). La muestra y el conjugado son, a continuación, transferidos a la zona de aplicación de la muestra y, a continuación, se desplazan a la zona de detección. En algunas realizaciones, el elemento de hisopo puede estar fijado en una posición de contacto con el dispositivo de análisis de muestras en el que la zona de recogida de muestras del elemento de hisopo está en contacto directo con la zona de aplicación de la muestra del dispositivo de análisis. Por lo tanto, el elemento de hisopo y/o el dispositivo de análisis, preferentemente, incluyen medios de fijación para proporcionar un contacto fijado entre ambas partes en una posición predeterminada. Como alternativa, el elemento de hisopo puede ser una parte integrada del dispositivo de análisis de muestras y la transferencia incluye hacer pasar al menos una parte de la muestra sobre el elemento de hisopo, así como el conjugado, a la zona de aplicación de la muestra ejerciendo presión usando el compresor de muestras. En algunas realizaciones, el compresor de muestras es también una parte integrada de un dispositivo de análisis de muestras integrado y está, preferentemente, conectado al dispositivo mediante una bisagra. En otras realizaciones, el compresor de muestras es independiente del resto del dispositivo.

La transferencia de la muestra desde el elemento de hisopo a la zona de aplicación de la muestra sobre el dispositivo de análisis de muestras es, preferentemente, una transferencia directa, es decir la transferencia tiene lugar sin pretratamiento de la muestra sobre el elemento de hisopo. En realizaciones sin pretratamiento de la muestra o el elemento de hisopo, la microfiltración se produce en la región donde la superficie afelpada del elemento de hisopo contacta directamente con la superficie afelpada sobre la tira. Las fibras de la superficie afelpada se entrelazan para formar una red o interferencia física. Por lo tanto, elementos más grandes contenidos en la muestra son retenidos y no se eluyen sobre el dispositivo de análisis de muestras. A medida que el conjugado y la muestra se mueven a través de la zona de aplicación de la muestra, los analitos más pequeños se eluyen. Además, cuando se usan muestras de fluidos de membrana mucosa, la alteración mecánica de la mucosa en fluidos corporales de la membrana mucosa purifica la muestra y el analito de interés.

En otras realizaciones, la transferencia incluye una elución de la muestra a partir del elemento de hisopo con un medio de elución, por ejemplo un tampón o agua. El medio de elución puede añadirse desde una fuente externa o puede proporcionarse, por ejemplo como un depósito, dentro del dispositivo de análisis. Además, la transferencia es, preferentemente, una transferencia cromatográfica y/o por capilaridad de fluido a la zona de detección sobre el dispositivo de análisis de muestras.

En algunas realizaciones preferidas, el elemento de hisopo está colocado entre una tira reactiva de flujo lateral y una parte de almohadilla de un compresor de muestras (que puede incluir el conjugado que incluye un primer socio de unión para el analito y un marcador detectable, un segundo socio de unión para el analito que incluye una marca, un socio de unión a la zona de control, o cualquier combinación de cualquiera de estos). Con esta etapa, la muestra recogida es transferida directamente sobre una tira reactiva. La tira reactiva, preferentemente, incluye una o varias superficies afelpadas o membranas activas por capilaridad.

En algunas realizaciones preferidas, la muestra se añade a una tira reactiva cromatográfica, y el conjugado se añade como una etapa independiente después de que la muestra es añadida. En estas realizaciones, el conjugado y la muestra no se añaden simultáneamente. Por ejemplo, un colector de muestras que incluye la muestra se coloca sobre una zona de aplicación de la muestra de una tira reactiva. Al menos parte de la muestra es transferida a la tira reactiva en este momento. A continuación, se añade el compresor de muestras que contiene el conjugado y el compresor de muestras comprime al colector de muestras. Esto facilita la transferencia adicional de la muestra, así como la transferencia del conjugado, sobre la tira reactiva. Si está presente el analito, un complejo entre el analito en la muestra y el conjugado puede formarse en cuanto el conjugado comienza a comprimir la muestra. Con muestras de fluido, el complejo comienza a formarse debido a la naturaleza fluida de la propia muestra. En realizaciones preferidas, el segundo socio de unión para el analito está también sobre el compresor de muestras o en la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva. En estas realizaciones, el sándwich completo entre el primer socio de unión, el analito y el segundo socio de unión puede formarse antes de que se añada si quiera el tampón. La adición del tampón intensifica adicionalmente la formación del complejo y, a continuación, el transporte de los componentes a la zona de detección. Dado que el complejo puede formarse durante la compresión, puede haber un desfase entre el muestreo y las pruebas. La reacción entre el analito y el conjugado comienza, preferentemente, antes de que se añada el tampón a la tira reactiva. El desfase entre cuando se añaden la muestra y el conjugado y cuando se añade el tampón puede ser de hasta 24 horas o incluso mayor.

El proceso de detección se iniciará directamente con la transferencia de la muestra o puede requerir un medio de elución a aplicar para análisis de la muestra. En algunas realizaciones, el medio de elución es simple agua corriente. En otras realizaciones, el medio de elución es una solución tampón alcalina. En el caso de una tira reactiva inmunoquímica donde la zona de detección está lateralmente aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra, el medio de elución seleccionado se mueve hacia una zona de detección y, de este modo, pasa el sitio de contacto dentro del dispositivo de recogida. El analito y el conjugado son eluidos por el medio de elución y son llevados con él a la zona de detección. En la zona de detección, el analito se determina mediante métodos cualitativos y/o cuantitativos, por ejemplo en una reacción de unión inmunológica.

La tira reactiva puede estar hecha de un único material cromatográfico o, preferentemente, varios materiales activos por capilaridad hechos de los mismos o diferentes materiales y fijados sobre un sustrato portador. Estos materiales están en contacto estrecho entre sí para formar una trayectoria de transporte a lo largo de la cual un líquido impulsado por fuerzas de capilaridad fluye desde la zona de partida, pasando el sitio de contacto del hisopo y la zona de detección, hacia una zona de desechos en el otro extremo de la tira.

Algunos materiales y membranas preferidas para la tira reactiva incluyen, aunque sin limitarse a, fibras de polietilentereftalato (PET), tales como fibras Dacron®, nitrocelulosa, poliéster, nylon, acetato de celulosa, hidrogel, polipropileno, fibras de vidrio y combinaciones de estos materiales y sus sustratos. Las características de las superficies afelpadas y membranas dependen de los tipos de materiales usados para una región o zona particular de la tira reactiva o el dispositivo de recogida. Tal como se describe en el presente documento, los materiales que permiten que los reactivos (incluyendo aquellos en la zona de reactivo, la zona de captura o cualquiera de las otras zonas descritas en el presente documento) sean móviles y se desplacen con el medio de elución incluyen materiales o fibras de superficie afelpada, donde la unión no es específica o permanente, de modo que el analito y los reactivos pueden ser liberados cuando se encuentran con el medio de elución o con un gran volumen de muestra. Algunos de

5 estos materiales incluyen, aunque sin limitarse a, fibras de polietilentereftalato (PET), tales como fibras Dacron®, fibras de nylon, fibras de poliéster, fibras de acetato de celulosa, fibras de polipropileno, fibras de vidrio, espuma, esponjas, y otras telas y mallas. En contraste, los materiales que inmovilizan reactivos en una zona particular (incluyendo, por ejemplo, los reactivos inmovilizados sobre la zona de prueba y la zona de control de la zona de  
10 detección y los reactivos de captura en las realizaciones, que incluyen reactivos de captura inmovilizados en una zona de captura aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra) incluyen, aunque sin limitarse a, fibras de nitrocelulosa y nylon tratadas químicamente, de modo que fibras individuales en la malla de nylon se unen permanentemente a reactivos tales como proteínas. Algunos métodos para fabricar diferentes partes de la tira incluyen, aunque sin limitarse a, rallar, pulverizar, empapar, y secar materiales sobre la tira.

15 Aunque se usa nitrocelulosa para la zona de detección en muchas de las realizaciones de la presente divulgación, en otras realizaciones, pueden usarse membranas neutras, tales como de nylon o poliéster. En estas realizaciones, proteínas, tales como neutravidina, anticuerpos y antígenos, nanopartículas, o ácidos nucleicos no se inmovilizan directamente. En su lugar se conjugan a microesferas que se “depositan” en el interior de la membrana y se mantienen en las grietas.

20 Algunos materiales preferidos para la parte de almohadilla del compresor de muestras incluyen, aunque sin limitarse a, fibras de polietilentereftalato (PET), tales como fibras Dacron®, fibras de nylon, fibras de poliéster, fibras de acetato de celulosa, fibras de polipropileno, fibras de vidrio, una superficie afelpada, espuma, esponjas, y otras telas y mallas.

25 Los materiales de la tira reactiva preferentemente filtran y/o retienen materia particulada, así como restos celulares, los precipitados, etc., en las membranas. Además, dado que el volumen de la muestra es, preferentemente, tan pequeño, la muestra permanece situada en los materiales y el tampón de elución, que fluye directamente por debajo de la muestra, contacta con y transporta la muestra de modo que la muestra pueda extraerse, lisarse y/o filtrarse antes de que alcance la zona de prueba de la zona de detección.

30 Además, los dispositivos de la presente invención y kits de prueba de la divulgación preferentemente realizan los métodos descritos en el presente documento.

35 En realizaciones preferidas, el conjugado está ubicado sobre un compresor de muestras, independiente del dispositivo de análisis de muestras. El conjugado, preferentemente, incluye un primer socio de unión para el analito, así como estar marcado con un marcador detectable. El marcador es, preferentemente, detectable de forma visible y/o por fluorescencia, pero puede usarse cualquier forma de detección conocida en la técnica, dependiendo del marcador seleccionado.

40 En algunas realizaciones, el marcador detectable para el conjugado puede ser oro coloidal, perlas de látex coloreadas, nanopartículas fluorescentes, nanopartículas quimioluminiscentes, nanopartículas paramagnéticas o nanopartículas fosforescentes.

45 Se realiza interpretación cualitativa visualmente observando la intensidad y tonalidad de la zona de prueba. En un ejemplo donde se usa un colorante rojo visual como marcador, cuando la concentración del analito es igual o está ligeramente por encima del límite inferior de detección, la zona de prueba puede verse débilmente y la tonalidad es rosa. A medida que la concentración del analito se incrementa, la intensidad de la zona de prueba se incrementa de forma correspondiente y la tonalidad cambia de rosa a rojo brillante. Se desarrolla una interpretación cuantitativa usando un espectrómetro que funciona en el espectro visible. Puede usarse una medición de la absorción o una medición de reflectancia en el espectro visible para desarrollar la cuantificación de la zona de prueba. En primer lugar, se desarrollan un conjunto de concentraciones caracterizadas del analito. Cada una de las concentraciones se aplica a la zona de aplicación de la muestra y se realiza la prueba. El espectrómetro se usa para medir la absorción o la reflectancia de la zona de prueba. Se calcula una curva patrón a partir de los valores medidos del espectrómetro. La curva patrón es normalmente lineal. En otras realizaciones, si se usan marcas fluorescentes, puede desarrollarse un conjunto similar de concentraciones del analito conocidas. Una concentración desconocida del analito puesto a prueba y cuantificado por el espectrómetro proporciona un valor que, cuando se representa gráficamente en la curva patrón, puede correlacionarse con una concentración de analito.

55 El marcador visual puede ser cualquier marcador visible a simple vista, incluyendo, aunque sin limitarse a, partículas coloreadas tales como oro coloidal, perlas de látex teñidas, selenio o carbono. En algunas realizaciones, las marcas visuales también están revestidas con elementos que exhiben fluorescencia. En algunas realizaciones, el elemento que exhibe fluorescencia es un colorante que exhibe fluorescencia. Como alternativa, una mezcla de, preferentemente, conjugados de perlas de látex que exhiben fluorescencia incoloras se mezcla con conjugados de oro coloidal (un espectro visible), o conjugados que producen una zona de prueba de lectura visible, en inmunoensayos de flujo lateral para potenciar la sensibilidad del ensayo y para ayudar a leer visualmente auténticos positivos y auténticos negativos. En realizaciones donde se usan nanopartículas, las nanopartículas que pueden usarse incluyen, aunque sin limitarse a, selenio, carbono y oro coloidal.

65

- 5 En algunas realizaciones, un segundo socio de unión para el analito también está ubicado sobre el compresor de muestras. El segundo socio de unión incluye una marca pero no un marcador detectable. El segundo socio de unión puede estar, como alternativa, ubicado en la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva, aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra, o en cualquier ubicación sobre la tira reactiva entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de detección. En realizaciones donde hay un segundo socio de unión para el analito aguas abajo de la zona de detección o sobre el compresor de muestras, la zona de detección incluye una marca inmóvil que se une a la parte de marca del segundo socio de unión.
- 10 En una realización preferida, el segundo socio de unión está marcado con biotina. En realizaciones donde la marca sobre el segundo socio de unión es biotina, la marca inmovilizada en la zona de detección es, preferentemente, avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión está marcado con avidina, neutravidina o estreptavidina. En estas realizaciones, la marca inmovilizada en la zona de detección es, preferentemente, biotina. Como alternativa, la marca sobre el segundo socio de unión puede ser una lectina y la marca inmovilizada puede ser un resto glucosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glucosilo es una unidad glucosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada pueden invertirse. Por ejemplo, el resto glucosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, pueden usarse otros receptores y ligandos.
- 15 En una realización preferida, los socios de unión específicos para los analitos en la zona del conjugado sobre el compresor de muestras y/o en la zona de aplicación de la muestra son anticuerpos monoclonales, policlonales, o recombinantes o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a un patógeno. En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos contra un patógeno, un mediador inmunitario, péptidos, glucoproteínas o un alérgeno. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas, o ácidos nucleicos. Los métodos y dispositivos de la presente invención pueden usarse para cualesquiera ensayos de unión, y pueden evitar el uso de anticuerpo/antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.
- 20 En todas estas realizaciones, un "sándwich" completo se crea, preferentemente, entre el primer socio de unión del conjugado, el analito y el segundo socio de unión, en la zona de aplicación de la muestra cuando el analito está presente. Como alternativa, el "sándwich" completo puede formarse entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de detección, si cualquiera del primer socio de unión o el segundo socio de unión está ubicado aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra. El sándwich completo se desplaza a continuación a la zona de detección, donde la marca sobre el segundo socio de unión se une a la marca inmovilizada en la zona de detección. Nótese que el complejo entre la marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada en la zona de detección se produce independientemente de si el analito está o no presente. Sin embargo, el complejo solamente es detectable cuando el analito está presente y el conjugado (que incluye un marcador detectable) se ha unido al analito.
- 25 En otras realizaciones, en lugar de tener un segundo socio de unión para el analito sobre el compresor de muestras o sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección, un segundo socio de unión para el analito inmovilizado está ubicado en la zona de detección. En estas realizaciones, la mitad del "sándwich" se forma entre el primer socio de unión del conjugado y el analito, que a continuación se desplaza hasta la zona de prueba, donde el medio sándwich se une al segundo socio de unión inmovilizado, completando el "sándwich" completo.
- 30 El dispositivo preferentemente también incluye una zona de control, que indica si la prueba se ejecutó correctamente. En realizaciones preferidas, un socio de unión a la zona de control, por ejemplo un socio de unión a la zona de control móvil con un marcador visual, también está ubicado sobre el compresor de muestras. La colocación del socio de unión a la zona de control móvil, que se une a un socio de unión inmovilizado en la zona de control, sobre el compresor de muestras indicará si se produjo o no la transferencia del conjugado desde el compresor de muestras a la zona de aplicación de la muestra del dispositivo de análisis de muestras. Éste es un control muy útil, dado que es esencial que el conjugado sea transferido para detectar la presencia del analito.
- 35 La muestra puede tomarse mediante un elemento de hisopo convencional, tal como se usa actualmente en la consulta del médico o salas de urgencias. Este elemento de hisopo es presionado posteriormente en el interior de la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva cromatográfica usando el compresor de muestras.
- 40 En algunas realizaciones preferidas, en lugar de lisar células "fuera" de un dispositivo de pruebas analíticas de diagnóstico inmediato, la presente divulgación utiliza "lisis *in situ*". En estas realizaciones, los métodos y dispositivos de la presente divulgación incorporan una zona de lisis que incluye al menos un agente de lisis como parte de una tira reactiva de ensayo de flujo lateral, tal como las descritas en el presente documento, u otros dispositivos de ensayo de flujo lateral conocidos en la técnica, para lisar el material de la muestra *in situ*. Además, una zona de captura captura sustancias interferentes para incrementar la precisión del ensayo.
- 45 Después de la carga de la muestra, la muestra que se desplaza con el líquido de transporte se encuentra con el agente de lisis. El agente de lisis habrá sido cargado previamente sobre la tira reactiva y es eluido por el líquido de

transporte. En algunas realizaciones preferidas, el agente de lisis ha sido secado en la tira reactiva. Como alternativa, el agente de lisis puede ser secado previamente mediante secado por congelación o liofilización y a continuación cargado previamente en la tira reactiva. En otras realizaciones, el agente de lisis puede estar absorbido, adsorbido, embebido o atrapado en la tira reactiva. En una realización preferida, el agente de lisis está

5 situado sobre la zona de aplicación de la muestra o aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra, de modo que la muestra se lisa cuando es transferida al dispositivo de análisis de muestras. El agente de lisis es, preferentemente, soluble o miscible en el líquido de transporte de la muestra, y el agente de lisis se disuelve y se activa en el momento del contacto con el líquido de transporte de la muestra. El líquido de transporte de la muestra contiene entonces tanto agente de lisis en solución o suspensión como componentes de la muestra en suspensión.

10 Cualesquiera componentes susceptibles a lisis en la muestra, en el momento de ser expuestos en suspensión al agente de lisis, son a su vez lisados *in situ*. El analito es, preferentemente, expuesto a continuación tanto al conjugado marcado como al segundo socio de unión, para formar el sándwich antes de alcanzar la zona de detección. Como alternativa, el agente de lisis puede estar incluido en el tampón de migración.

15 Como alternativa, el agente de lisis puede introducirse en la tira reactiva durante una etapa de compresión de la muestra. En una realización, el agente de lisis está ubicado sobre la almohadilla del compresor de muestras. Como alternativa, el agente de lisis puede secarse sobre el elemento de hisopo del colector de muestras si no es necesario que el elemento de hisopo sea estéril. En caso contrario, el elemento de hisopo puede esterilizarse después de la adición del agente de lisis usando técnicas de esterilización que no dañen la capacidad de lisado del agente de lisis.

20 La concentración de agente de lisis cargado previamente sobre una tira reactiva está, preferentemente, entre el 0,001 % y el 5 % en peso/volumen. El volumen a cargar previamente depende de dónde se cargue previamente el agente de lisis. Son intervalos apropiados de 1 a 10 microlitros cuando se carga previamente en la superficie afelpada del colector de muestras (la zona de aplicación de la muestra) o de 5 a 50 microlitros cuando se carga

25 previamente en la almohadilla absorbente o en otras ubicaciones dentro de la tira reactiva. Idealmente, la cantidad cargada previamente debe ser de aproximadamente 3 microlitros cargados previamente en la superficie afelpada del colector de muestras o aproximadamente 10 microlitros cargados previamente en la almohadilla absorbente o en otras ubicaciones dentro de la tira reactiva.

30 La selección de un entorno y agente de lisado específicos dependerá del analito y el ensayo. El pH y la fuerza iónica son claves para el entorno de lisado. En cuanto al pH establecido por el agente de lisis, un pH por debajo de 4,0 tiende a precipitar materiales, especialmente proteínas. Un pH más elevado, por encima de aproximadamente 10,0, tiende a lisar materiales tales como proteínas y paredes celulares. Por lo tanto, un pH de aproximadamente 10,0 o superior es preferible para muchas aplicaciones. Como alternativa, puede preferirse un pH inferior para dianas de

35 ácido nucleico.

En cuanto a la fuerza iónica establecido por el agente de lisis, puede usarse una fuerza iónica tanto elevada como baja para lisar. Por ejemplo, una fuerza iónica baja (hipotónica) tiende a romper eritrocitos. El agua por sí misma puede lisar eritrocitos. Entornos de fuerza iónica más elevada pueden usarse para romper ciertas paredes y

40 membranas celulares.

En cuanto a agentes de lisis específicos, pueden agruparse y seleccionarse basándose en sus propiedades: sales, agentes anfóteros y catiónicos, y detergentes iónicos y no iónicos. El cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) lisa eritrocitos. Otras sales, incluyendo, aunque sin limitarse a, elevadas concentraciones de cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ) y cloruro potásico ( $\text{KCl}$ ), pueden romper ciertas paredes y membranas celulares. Otros agentes de lisis son agentes anfóteros que incluyen, aunque sin limitarse a, Lyso PC, CHAPS, y Zwittergent. Como alternativa, pueden usarse agentes catiónicos que incluyen, aunque sin limitarse a, C16 TAB y cloruro de benzalconio como agente de lisis. Detergentes tanto iónicos como no iónicos se usan a menudo para romper o lisar los componentes de la pared celular o la membrana celular, tales como lipoproteínas y glucoproteínas. Los detergentes iónicos comunes incluyen, aunque sin limitarse a, SDS, EDTA, colato y desoxicolato. Los detergentes iónicos son buenos agentes solubilizantes. Los anticuerpos conservan su actividad en SDS al 0,1 % o menos. Los detergentes no iónicos comunes incluyen, aunque sin limitarse a, octilglucósido, digitonina, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20 y Tween 80. Los detergentes no iónicos y levente iónicos son desnaturizantes más débiles y, a menudo, se usan para disolver proteínas de la membrana tales como proteínas de la superficie viral. Agentes de lisis adicionales incluyen, aunque

50 sin limitarse a, urea y enzimas. Pueden usarse combinaciones de diferentes agentes de lisis para optimizar el entorno de lisado.

55 Los tensioactivos generalmente actúan como agentes humectantes y rebajan la tensión superficial de un líquido. Esto permite a continuación una extensión más sencilla rebajando la tensión interfacial entre líquidos. De este modo, los tensioactivos pueden interferir en la unión natural de antígeno y anticuerpo o ligando y receptores. Las concentraciones se seleccionan, por lo tanto, experimentalmente para cada clase de agente de lisis. Una vez que se produce la lisis, es importante que las reacciones de unión deseadas no sean obstaculizadas. Generalmente, una concentración de agente de lisis del 0,001 % se considera el límite inferior, y el límite superior es aproximadamente del 1 %. Existe un efecto aditivo o sinérgico cuando se usan combinaciones de agentes de lisis. Esto expande el

60 intervalo de trabajo de concentración a realizar de aproximadamente el 0,001 % al 1 %. Finalmente, cierta unión inespecífica no deseada puede evitarse a una concentración de Tween 20 del 5 %. En todos los casos, la cantidad

65

total de agente de lisis cargado previamente sobre todas las ubicaciones de una tira reactiva individual debe ser suficiente para lisar barreras para la inmunodetección, permitiendo el funcionamiento práctico de la tira reactiva.

5 El propio agente de lisis no debe interferir con ningún otro agente detector o indicador del ensayo y, por lo tanto, no interfiere en ninguna otra interacción y reacción en una medida tal para impedir el funcionamiento práctico del ensayo. Un agente de lisis debe tener la suficiente vida útil para permitir la fabricación, distribución y almacenamiento antes del uso de una tira reactiva en pruebas de diagnóstico analítico inmediato.

10 En una realización preferida de la presente divulgación, el dispositivo de flujo lateral de la presente invención incluye un líquido de transporte de muestras, que puede ser un tampón, un compresor de muestras y una tira reactiva de cromatografía que contiene uno o varios materiales o membranas de superficie afelpada con propiedades de capilaridad a través de los cuales fluye la muestra. En un dispositivo y método de la divulgación, es innecesario lisar las células en la muestra antes de aplicar la muestra a la tira reactiva.

15 La figura 1 muestra un dispositivo de análisis de muestras (tira reactiva) 1 y un colector de muestras 2. El colector de muestras 2 puede ser cualquier tipo de colector de muestras 2 conocido en la técnica, por ejemplo el colector de muestras 2 podría ser un elemento de hisopo. La muestra 20 puede incluir el analito 3, así como partículas interferentes 5 (que pueden incluir proteínas interferentes o genes interferentes) y otras partículas o restos celulares interferentes 4. El dispositivo de análisis de muestras 1 incluye una zona de conjugado 8 aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 18 en esta figura. Aunque la zona del conjugado 8 se muestra aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 18 en esta figura, la zona del conjugado 8 puede, como alternativa, solaparse con la zona de aplicación de la muestra 18 o estar aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 18. La zona de aplicación de la muestra 18 es también una zona de microfiltración que, preferentemente, elimina por filtración restos celulares y partículas interferentes 4 que están en la muestra 20.

25 La zona del conjugado 8, preferentemente, incluye tanto un conjugado móvil 15, que incluye una parte que se une al analito 3 y un marcador detectable, como un socio de unión a la zona de control 16 con un marcador detectable, que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de la zona de control con un marcador visual. En algunas realizaciones, el conjugado móvil es un conjugado al anticuerpo de prueba con un marcador visual. El socio de unión a la zona de control 16 se une con un socio de unión inmovilizado para él en la zona de control 11 e indica si la prueba se ha realizado correctamente. Si el analito 3 está presente en la muestra 20, el analito se une al conjugado 15, y el complejo conjugado 15-analito 3 se desplaza hasta la zona de prueba 10 en la zona de detección 12. El analito 3 se une a continuación a un socio de unión inmovilizado 17 para el analito 3, para formar el "sándwich" completo en un ensayo de tipo sándwich.

35 La transferencia de la muestra desde el colector de muestras 2 a la zona de aplicación de la muestra 18 sobre el dispositivo de análisis de muestras es, preferentemente, una transferencia directa, es decir la transferencia tiene lugar sin pretratamiento de la muestra sobre el colector de muestras 2. En realizaciones sin pretratamiento de la muestra o el colector de muestras 2, se aplica presión 14 y la microfiltración se produce en la región donde la superficie afelpada del colector de muestras contacta directamente con la superficie afelpada sobre el dispositivo de análisis de muestras 1. Las fibras de la superficie afelpada se entrelazan para formar una red o interferencia física. Por lo tanto, elementos más grandes contenidos en la muestra, por ejemplo restos celulares y partículas interferentes 4 son retenidos y no se eluyen.

45 El dispositivo de aplicación de muestras 1 preferentemente también incluye una zona de bloqueo 9 que incluye uno o más reactivos de captura. Esta zona de bloqueo captura proteínas y/o genes interferentes 5 que pueden estar en la muestra 20. La captura de una sustancia interferente 4, 5 por uno o más reactivos de captura se produce cuando el reactivo de captura interactúa de alguna manera con la sustancia interferente para evitar que la sustancia interferente interfiera en la detección del analito. Aunque una zona de bloqueo 9 se muestra en la figura 1, los reactivos de captura pueden estar ubicados en una zona de captura 9 hecha de materiales que permitan a los reactivos de captura ser móviles, en el medio de elución, mezclarse y secarse con los reactivos, incorporarse en la zona de aplicación de la muestra, incorporarse en el material de la superficie afelpada del colector de muestras, y/o inmovilizarse sobre un material inmovilizante (por ejemplo, nitrocelulosa) como una línea o una zona. Cualquiera de estos o una combinación de estos puede usarse en las realizaciones de la presente invención, dependiendo de la prueba y la matriz de la muestra.

50 El dispositivo de análisis de muestras 1 también incluye opcionalmente una almohadilla absorbente 7 aguas arriba de la zona del conjugado 8 y la zona de aplicación de la muestra 18. El tampón se añade y se desplaza en la dirección de la flecha 6 para eluir los componentes de prueba, incluyendo la muestra 20, el conjugado 15 y el socio de unión a la zona de control 16, a la zona de detección 12. El dispositivo de análisis de muestras 1 también incluye, preferentemente, una almohadilla de desechos 13 en el extremo aguas abajo del dispositivo 1. El dispositivo de análisis de muestras 1 también puede incluir opcionalmente un sustrato 23.

65 Los dispositivos y métodos de la presente invención incluyen un compresor de muestras 30. Algunos ejemplos esquemáticos de compresores de muestras 30 que podrían usarse se muestran en las figuras 2A y 2B. Los compresores de muestras 30 preferentemente incluyen un mango 31, una parte extendida 32 y una parte de

almohadilla 33. En algunos diseños, el compresor de muestras incluye secciones adicionales, tal como una parte de repisa 34 sobre la cual está colocada la parte de almohadilla 33. Aunque se muestran ejemplos específicos en las figuras 2A y 2B, cualquier compresor de muestras 30 que es capaz de ejercer presión para transferir uno o más componentes del ensayo y la muestra al dispositivo de análisis de muestras, podría usarse en las realizaciones de la presente invención. En realizaciones preferidas, el conjugado 36 se carga previamente y se seca sobre una almohadilla 33 que forma la zona del conjugado. En algunas realizaciones preferidas, un control marcado 61 que es capaz de complejarse con un socio de unión en la zona de control también se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. En otras realizaciones preferidas, el segundo socio de unión 38 para el analito está ubicado sobre la almohadilla 33. Cualquier combinación del conjugado 36, el segundo socio de unión 38, o el socio de unión a la zona de control 61 puede estar sobre la parte de almohadilla 33 del compresor de muestras 30.

La figura 2C muestra un ejemplo de un colector de muestras 35. En este ejemplo, el colector de muestras 35 es un elemento de hisopo. El colector de muestras 35 preferentemente incluye una parte de recogida de muestras 60 que, preferentemente, está hecha de materiales de tipo superficie afelpada. En algunas realizaciones, el colector de muestras 35 es estéril.

Las figuras 3A a 3C muestran una realización de un sistema con un compresor de muestras 30, un colector de muestras 35 y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). La tira reactiva preferentemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de aplicación de la muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva también incluye preferentemente un sustrato portador 48. La zona de detección 52 preferentemente incluye una zona de prueba 45, que incluye un socio de unión inmovilizado 38 para el analito 40, así como una zona de control 46. En esta realización, el conjugado 36 está sobre el compresor de muestras 30. El primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36, desde el compresor de muestras 30 se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich, que es transportado a continuación al segundo socio de unión 38 que está inmovilizado en una zona de prueba 45. El sándwich completo 420 que se forma entre la parte 37 del conjugado 36 que se une al analito 40, el analito 40 y el segundo socio de unión 38, se muestra en la figura 3B. En realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión a la zona de control 61 con un marcador detectable. El socio de unión a la zona de control 61 se compleja con su socio de unión en la zona de control 46. Incluir el socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, en lugar de sobre la tira reactiva o en el tampón, tal como se conoce en la técnica anterior, permite al usuario estar seguro de que los componentes sobre el compresor de muestras 30 que, en esta realización, incluyen tanto el conjugado 36 como el socio de unión a la zona de control 61, han sido transferidos eficazmente al dispositivo de análisis de muestras y, por lo tanto, garantiza el funcionamiento apropiado del sistema.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión a la zona de control 61 es también preferentemente un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unión a anticuerpos contra el analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo mostrado en las figuras 3A-3C de la presente invención puede usarse para cualesquiera ensayo de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo/antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

En funcionamiento, el colector de muestras 35 se coloca de modo que la muestra esté directamente encima de la zona de aplicación de la muestra 44. En algunas realizaciones, la colocación del colector de muestras 35 por encima de la zona de aplicación de la muestra 44 no es simultánea con la colocación del compresor de muestras 30. En otras palabras, en estas realizaciones, parte de la muestra es transferida a la zona de aplicación de la muestra 44 antes de que el compresor de muestras 30 se añada a la pila vertical.

El compresor de muestras 30 ejerce presión 51 sobre el colector de muestras 35, usando la presión para transferir la muestra, que incluye el analito 40 (si está presente) y el conjugado 36 sobre la zona de aplicación de la muestra 44. Si también hay un socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, el socio de unión a la zona de control 61 también es transferido. Nótese que la transferencia es debida a la presión, no debida al flujo o a la acción de capilaridad. A continuación, se añade el tampón 43 para permitir el flujo del complejo conjugado 36-analito 40 (si está presente) a la zona de detección 52. Un socio de unión inmovilizado 38 en la zona de prueba 45 se une a continuación al analito, formando el sándwich completo. Dado que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. El funcionamiento apropiado de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión a la zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

Aunque no se muestra, también puede haber opcionalmente una zona de lisis que, preferentemente, se solapa con o está aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. En otras realizaciones, puede haber una zona de bloqueo que incluye reactivos de captura, similar a la zona descrita con respecto a la figura 1.

En otras realizaciones, la zona del conjugado puede contener ambos socios de unión para el analito en la muestra para formar un "sándwich completo". Uno de los socios de unión preferentemente tiene un marcador adecuado tal como biotina, avidina, lectina, un resto glucosilo, un ligando específico o un receptor específico. El otro puede estar conjugado a las nanopartículas apropiadas, tal como se ha mencionado anteriormente. El sándwich completo es capturado a continuación en la zona de prueba donde el socio de unión del marcador adecuado, que incluye, aunque sin limitarse a, avidina para biotina, biotina para avidina, resto glucosilo para lectina, lectina para el resto glucosilo, un receptor para el ligando o un ligando para el receptor, está inmovilizado.

La figura 20A muestra un ejemplo de una tira reactiva en una realización de la presente invención. La tira reactiva preferentemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de aplicación de la muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva también incluye preferentemente un sustrato portador 48. En esta realización, todo el sándwich (primer socio de unión 513-analito-40-segundo socio de unión-518) se forma en la zona de aplicación de la muestra 44. El "sándwich completo" 514 se muestra en la figura 20B. La zona de prueba 45 en esta realización incluye una marca inmovilizada 510 que se une a la marca 519 del segundo socio de unión 518. La marca inmovilizada 510 no se une directamente al analito 40; en su lugar, se une a través de un intermediario, la marca 519 sobre el segundo socio de unión 518 para el analito 40.

En esta realización, un primer socio de unión 513, que es parte del conjugado marcado 505, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 518 también incluye una marca 519. El segundo socio de unión 518, en esta realización, preferentemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de la muestra 44 de la tira reactiva, mientras que el conjugado marcado 505, preferentemente, se carga previamente y se seca sobre una zona del conjugado marcada 515 aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. Como alternativa, el segundo socio de unión 518 y/o la zona del conjugado marcada 515 pueden estar ubicadas en cualquier lugar sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección 52 incluyendo, aunque sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de la muestra 44, aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44 o entre la zona de aplicación de la muestra 44 y la zona de detección 52. En una realización preferida, aproximadamente el 75-80 % del conjugado 505 marcado 509 está aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra (con aproximadamente el 20-25 % del conjugado marcado 505 solapándose con la zona de aplicación de la muestra 44) y aproximadamente el 75-80 % del segundo socio de unión 518 está ubicado aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44 (con aproximadamente el 20-25 % del segundo socio de unión solapándose con la zona de aplicación de la muestra 44). Aunque no se prefiere, en otras realizaciones, el conjugado marcado 505, el segundo socio de unión 518 o ambos pueden estar ubicados en el tampón o mezclarse previamente con la muestra antes de que la muestra se añada a la tira reactiva. En otras realizaciones más, cualquiera de o todos los componentes podrían solaparse con la zona de detección 52.

En algunas realizaciones, tanto el primer socio de unión 513 como el segundo socio de unión 518 son diferentes anticuerpos para el analito 40. En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos contra el analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo mostrado en la figura 20A puede usarse para cualesquiera ensayos de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo/antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 518 está marcado 519 con biotina. En realizaciones donde la marca 519 sobre el segundo socio de unión 518 es biotina, la marca inmovilizada 510 en la zona de detección 52 es, preferentemente, avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 518 está marcado 519 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En estas realizaciones, la marca inmovilizada 510 en la zona de detección 52 es, preferentemente, biotina. Como alternativa, la marca 519 sobre el segundo socio de unión 518 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 510 puede ser un resto glucosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glucosilo es una unidad glucosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada pueden invertirse. Por ejemplo, el resto glucosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, pueden usarse otros receptores y ligandos para las marcas.

En funcionamiento, un colector de muestras que contiene la muestra se coloca de modo que la muestra esté directamente por encima de la zona de aplicación de la muestra 44. En realizaciones preferidas, la muestra no ha sido sometida a pretratamiento antes de la aplicación a la tira reactiva. En su lugar, la muestra sigue estando en su forma nativa.

La muestra es transferida a la zona de aplicación de la muestra 44 de la tira reactiva. Se forma un sándwich con el conjugado marcado 505 como un trozo de pan y el segundo socio de unión 518 como el segundo trozo de pan, con el analito 40 entre ellos, cuando los tres componentes entran en contacto entre sí durante el flujo 43. El complejo conjugado marcado 505-analito 40 (si está presente)-segundo socio de unión 518 (un sándwich completo) fluye hasta la zona de detección 52. Una marca inmovilizada 510 en la zona de prueba 45 se une a continuación a la marca 519. Dado que el conjugado marcado 505 incluye un marcador 509, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. El funcionamiento apropiado de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46, preferentemente debido a la interacción entre un socio de unión a la

línea de control y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

Aunque no se muestra, también puede haber opcionalmente una zona de lisis que, preferentemente, se solapa con la zona de aplicación de la muestra 44 o está, como alternativa, ubicada en otras partes de la tira reactiva.

En algunas realizaciones preferidas que usan marcas, la zona de detección incluye un anticuerpo contra la marca. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, policlonal o de dominio único. Por ejemplo, cuando la marca es biotina, un anticuerpo anti-biotina se inmoviliza en la zona de prueba en lugar de avidina, neutravidina, o estreptavidina.

Las figuras 4A a 4C muestran un ejemplo de una realización del sistema con un compresor de muestras 30, un colector de muestras 35, y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). Similar a la figura 3A-3C, la tira reactiva preferentemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de aplicación de la muestra 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva también incluye preferentemente un sustrato portador 48. En esta realización, todo el sándwich (primer socio de unión 37-analito-40-segundo socio de unión-38) se forma en la zona de aplicación de la muestra 44 (preferentemente antes de la adición de tampón). En algunas realizaciones, la colocación del colector de muestras 35 por encima de la zona de aplicación de la muestra 44 no es simultánea con la colocación del compresor de muestras 30. En otras palabras, en estas realizaciones, parte de la muestra es transferida a la zona de aplicación de la muestra 44 antes de que el compresor de muestras 30 se añada a la pila vertical.

La zona de prueba 45 en esta realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En esta realización, un primer socio de unión 37, que es parte del conjugado 36 y, preferentemente, se carga previamente y se seca sobre almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en esta realización también preferentemente se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39.

El sándwich completo 420 que se forma entre el socio de unión 37 del conjugado 36, el analito 40 y el segundo socio de unión 38 en esta realización (así como las realizaciones en las figuras 5A-5B, 6A-6B, 7B, 7C y 7D) se muestra en la figura 4B. En realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión a la zona de control 61 (mostrado en la figura 3C) con un marcador detectable. El socio de unión a la zona de control 61 se compleja con su socio de unión en la zona de control 46. Incluir el socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, en lugar de sobre la tira reactiva o en el tampón, tal como se conoce en la técnica anterior, permite al usuario estar seguro de que los componentes sobre el compresor de muestras 30, que incluyen tanto el conjugado 61 como el socio de unión a la zona de control 61, han sido transferidos eficazmente al dispositivo de análisis de muestras y por lo tanto garantiza el funcionamiento apropiado del sistema.

En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión a la zona de control 61 también es, preferentemente, un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos contra el analito. Otros tipos de socios de unión son macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo mostrado en las figuras 4A-4C de la presente invención puede usarse para cualesquiera ensayos de unión, y puede evitar el uso de anticuerpos/antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En realizaciones donde la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferentemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En estas realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es, preferentemente, biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glucosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glucosilo es una unidad glucosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada pueden invertirse. Por ejemplo, el resto glucosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, pueden usarse otros receptores y ligandos para las marcas.

En funcionamiento, el colector de muestras 35 se coloca de modo que la muestra esté directamente por encima de la zona de aplicación de la muestra 44. El compresor de muestras 30 ejerce presión 51 sobre el colector de muestras 35. La presión transfiere la muestra (incluyendo el analito 40, si está presente), el conjugado 36 y el segundo socio de unión marcado 38 sobre la zona de aplicación de la muestra 44. Si hay también un socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, el socio de unión a la zona de control 61 también es transferido. Nótese que la transferencia es debida a la presión, no debida al flujo o la acción de capilaridad. A continuación, se añade tampón 43 para permitir el flujo del complejo conjugado 36-analito 40 (si está presente)-segundo socio de unión 38 (un sándwich completo) hasta la zona de detección 52. Una marca inmovilizada 50 en la

zona de prueba 45 se une a continuación a la marca 39. Dado que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. El funcionamiento apropiado de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46 debido a la interacción entre el socio de unión a la zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

5 Aunque no se muestra, también puede haber opcionalmente una zona de lisis, que preferentemente se solapa con la zona de aplicación de la muestra 44. En otras realizaciones, puede haber una zona de bloqueo que incluye reactivos de captura, similar a la zona descrita con respecto a la figura 1.

10 En otra realización, los dos socios de unión para el analito están ubicados de tal manera para conseguir un "sándwich vertical" donde la muestra se une con el conjugado que está siendo comprimido desde el segundo plano y puede unirse simultánea o concurrentemente con el otro socio de unión ubicado sobre la tira en el plano de la tira. Por lo tanto una intercalación del analito en la muestra se consigue mediante unión al socio desde el conjugado suministrado desde encima del plano de la tira y unión al segundo socio de unión ubicado sobre el plano de la tira por debajo del material de suministro de la muestra.

15 Las figura 5A y 5B muestran otro ejemplo de una realización del sistema con un compresor de muestras 30, un colector de muestras 35 y un dispositivo de análisis de muestras (una tira reactiva en la figura). Similar a la figura 3A-3C, la tira reactiva preferentemente incluye una almohadilla absorbente 42, una zona de aplicación de la muestra 20 44, una zona de detección 52 y una almohadilla de desechos opcional 47. La tira reactiva también incluye preferentemente un sustrato portador 48. Similar a la realización mostrada en las figuras 4A y 4C, en esta realización, todo el sándwich (primer socio de unión 37-analito 40-segundo socio de unión 38) se forma en la zona de aplicación de la muestra 44. La zona de prueba 45 en esta realización incluye una marca inmovilizada 50 que se une a la marca 39 del segundo socio de unión 38. En esta realización, un primer socio de unión 37, que es parte del 25 conjugado 36 y, preferentemente, se carga previamente y se seca sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, se une al analito 40 en la muestra de prueba para formar medio sándwich. El segundo socio de unión 38 en esta realización preferentemente se carga previamente y se seca sobre la zona de aplicación de la muestra 44 de la tira reactiva. El segundo socio de unión 38 también incluye una marca 39. Como alternativa, el segundo socio de unión 38 en esta realización puede estar ubicado en cualquier lugar sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, aunque sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de la muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra y entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de detección.

30 En realizaciones preferidas, la almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también incluye un socio de unión a la zona de control 61 (mostrado en la figura 3C) con un marcador detectable. El socio de unión a la zona de control 61 se compleja con su socio de unión en la zona de control 46. Incluir el socio de unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, en lugar de sobre la tira reactiva o en el tampón, tal como se conoce en la técnica anterior, permite al usuario estar seguro de que los componentes sobre el compresor de muestras 30, que incluyen tanto el conjugado 61 como el socio de unión a la zona de control 61, han sido transferidos eficazmente al dispositivo de análisis de muestras y, por lo tanto, garantiza el funcionamiento apropiado del sistema.

35 En un ejemplo, tanto el primer socio de unión 37 como el segundo socio de unión 38 son diferentes anticuerpos para el analito. El socio de unión a la zona de control 61 también es, preferentemente, un anticuerpo, y su socio de unión en la zona de control es un antígeno (o viceversa). En otras realizaciones, socios de unión específicos también pueden ser antígenos capaces de unirse a anticuerpos contra el analito. Otros tipos de socios de unión son 40 macromoléculas bioorgánicas como aptámeros o receptores, nanopartículas o ácidos nucleicos. El dispositivo mostrado en las figuras 5A-5B de la presente invención puede usarse para cualesquiera ensayos de unión, y puede evitar el uso de anticuerpo/antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos de unión ligando-receptor y ensayos de unión enzima-sustrato.

45 En una realización preferida, el segundo socio de unión 38 está marcado con biotina 39. En realizaciones donde la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 es biotina, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección es preferentemente avidina, neutravidina o estreptavidina. En otras realizaciones, el segundo socio de unión 38 está marcado 39 con avidina, neutravidina o estreptavidina. En estas realizaciones, la marca inmovilizada 50 en la zona de detección 52 es preferentemente biotina. Como alternativa, la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 50 puede ser una lectina y la marca inmovilizada 50 puede ser un resto glucosilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la lectina es la lectina de guisante y el resto glucosilo es una unidad glucosilo de eritrocitos. La marca sobre el segundo socio de unión y la marca inmovilizada pueden invertirse dentro del espíritu de la presente invención. Por ejemplo, el resto glucosilo puede ser la marca sobre el segundo socio de unión, con una marca de lectina inmovilizada en la zona de detección. En otras realizaciones, pueden usarse otros receptores y ligandos para 55 las marcas.

60 En funcionamiento, el colector de muestras 35 se coloca de modo que la muestra esté directamente por encima de la zona de aplicación de la muestra 44. El compresor de muestras 30 ejerce presión 51 sobre el colector de muestras 35, usando la presión para transferir la muestra (incluyendo el analito 40, si está presente) y el conjugado 65 36 sobre la zona de aplicación de la muestra 44. Un sándwich "vertical" se forma con el conjugado 36 como pieza superior y el segundo socio de unión 38 como pieza inferior, con el analito 40 entre ellos. Si hay también un socio de

unión a la zona de control 61 sobre el compresor de muestras 30, el socio de unión a la zona de control 61 también es transferido. Nótese que la transferencia es debida a la presión, no debida al flujo o la acción de capilaridad. A continuación, se añade el tampón 43 para permitir el flujo del complejo conjugado 36-analito 40 (si está presente)-segundo socio de unión 38 (un sándwich completo) hasta la zona de detección 52. Una marca inmovilizada 50 en la zona de prueba 45 se une a continuación a la marca 39. Dado que el conjugado 36 incluye un marcador 41, el complejo que se forma es detectable e indica un resultado positivo. El funcionamiento apropiado de la prueba también da como resultado un resultado positivo detectable en la zona de control 46, debido a la interacción entre el socio de unión a la zona de control 61 y su socio inmovilizado en la zona de control 46.

10 Aunque no se muestra, también puede haber opcionalmente una zona de lisis, que preferentemente se solapa con o está ubicada aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. En otras realizaciones, puede haber una zona de bloqueo que incluye reactivos de captura, similar a la zona descrita con respecto a la figura 1.

15 Las figuras 6A y 6B muestran otra realización de la presente invención, donde el compresor de muestras 30 incluye el segundo socio de unión 38 para el analito 40, acoplado con una marca 39, y la tira reactiva incluye el conjugado 36, que incluye tanto un primer socio de unión 37 para el analito 40 como un marcador detectable 41, y la marca inmovilizada 50 que se une a la marca sobre el segundo socio de unión en la zona de prueba 45. Esta realización funciona análogamente a la realización descrita con respecto a las figuras 5A y 5B, excepto que el sándwich "vertical" se forma con el segundo socio de unión 38 como pieza superior y el conjugado 36 como pieza inferior, con el analito 40 entre ellos. Como alternativa, el conjugado 36, en esta realización, puede estar ubicado en cualquier lugar sobre la tira reactiva aguas arriba de la zona de detección incluyendo, aunque sin limitarse a, solapándose con la zona de aplicación de la muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra o entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de detección.

25 Las figuras 7A a 7D son similares a las figuras 3C, 4C, 5B y 6B, respectivamente, excepto que la zona de detección 52 se solapa con la zona de aplicación de la muestra 44, en estas figuras. La zona de detección, en estas realizaciones, está hecha preferentemente de nitrocelulosa. Aunque no se requiere estrictamente ningún flujo lateral para ejecutar el ensayo en estas realizaciones, se prefiere al menos una cantidad nominal de flujo, de modo que el sándwich sea capaz de unirse en la zona de prueba y cualquier conjugado no unido sea eliminado por lavado de la zona de prueba. En una realización, en lugar de un tampón de migración que es aplicado en un extremo de la tira reactiva, un fluido de lavado puede aplicarse directamente a la zona de prueba, desde arriba o desde el lado, por ejemplo usando un frasco de agua. En una realización, el compresor de muestras y el colector de muestras son sustancialmente transparentes, de modo que la zona de prueba pueda leerse sin la retirada de la pila vertical de la tira reactiva. Nótese que, aunque tanto la zona de prueba 45 como el control 46 se muestran dentro de la zona de aplicación de la muestra en estas figuras, en otras realizaciones la zona de prueba 45 podría solaparse con la zona de aplicación de la muestra 44 mientras la zona de control 46 está aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44. Si la zona de control estuviera lateralmente aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44, sería necesario añadir tampón para permitir el flujo. Además, puede ser preferible añadir un tampón, por ejemplo un tampón que incluye plata, para intensificar la señal de un resultado positivo.

40 Una tira reactiva universal 80, tal como se muestra en la figura 8A, puede usarse cuando el compresor de muestras 30 incluye ambos de los socios de unión 37, 38 para el analito 40. El compresor de muestras 30 y el colector de muestras 35 serían transferidos a la tira reactiva universal 80 en la ventana de la muestra 81. Dado que los elementos específicos para el analito 40, que está siendo puesto a prueba, están sobre el compresor de muestras 30, la zona de prueba 83 en la ventana de visualización 82 de la tira reactiva universal 80 solamente necesita tener una marca 50 que se compleja con la marca 39 sobre el segundo socio de unión 38 para el analito 40. Por ejemplo, cuando el segundo socio de unión 38 para el analito 40 está marcado 39 con biotina, la zona de prueba 83 de la tira reactiva universal 80 incluiría avidina 39, un socio de unión para biotina. La tira reactiva universal 80 también incluye preferentemente una zona de control 84 y una carcasa 85. Para las realizaciones de las figuras 7A a 7D, la zona de prueba está ubicada en la ventana de la muestra 81. En otras realizaciones, el marcador adecuado puede ser una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la secuencia de ácido nucleico adecuada inmovilizada en la zona de prueba.

55 Aunque el compresor de muestras y el colector de muestras se muestran como entidades independientes en las figuras 1-8A, la almohadilla 33 del compresor de muestras y la parte colectora de muestras 60 del colector de muestras pueden ser componentes de un único elemento. Por ejemplo, el colector de muestras puede estar conectado de forma que pueda girar o de forma flexible o como parte de un cartucho al compresor de muestras, de modo que una muestra pueda ser recogida de un paciente con la parte de recogida de muestras sin exponer al paciente a la almohadilla del compresor de muestras y, a continuación, la parte de recogida de muestras y la almohadilla del compresor de muestras pueden ponerse en contacto para aplicación a la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva por compresión. El colector de muestras también puede estar conectado de forma que pueda girar o de forma flexible a la casete de prueba o puede insertarse como un cartucho. En otra realización, la muestra puede inyectarse de forma forzada directamente sobre la tira reactiva antes de colocar el compresor y/o los conjugados en posición. En otra realización más, el colector de muestras puede contactar con los conjugados en un cartucho externo que, a continuación, encaja o se inserta en una casete de prueba para poner al material en contacto con la tira reactiva.

En algunas realizaciones, el compresor de muestras 30 está conectado, de forma que pueda girar, a la carcasa 85 tal como se muestra en la figura 8B. Mientras que la bisagra del compresor de muestras 30 se muestra de modo que el compresor de muestras 30 esté girado hacia el extremo aguas abajo de la tira cuando está abierto, la carcasa podría estar diseñada de modo que el compresor de muestras 30 está articulado a cualquier lado o en otras direcciones. La parte de recogida de muestras 60 del colector de muestras 35 está, preferentemente, insertada desde el lado de modo que se alinea con un agujero de inserción 88 en el lado de la carcasa 85. Sin embargo, el colector de muestras 35 podría insertarse en cualquier dirección dependiendo del diseño de la carcasa. El compresor de muestras 30 preferentemente incluye una almohadilla (no visible en la figura 8B), con uno o más componentes de ensayo, ubicada sobre la superficie del compresor de muestras orientada hacia la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva 80. El compresor de muestras 30 se cierra a continuación de modo que una presión de compresión se aplica a la pila vertical de la almohadilla del compresor de muestras, la parte de recogida de muestras y la zona de aplicación de la muestra para transferir la muestra y los uno o más componentes de ensayo a la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva. Aunque hay una almohadilla absorbente que se proyecta desde la carcasa en el extremo aguas arriba alejado del dispositivo en la figura 8B, la longitud de la almohadilla absorbente puede variar. De hecho, mientras pueda añadirse tampón en el extremo aguas arriba (por ejemplo, a través de una ventana de aplicación en la carcasa), no es necesario hacer que la almohadilla absorbente se extienda significativamente fuera de la carcasa. En esta realización, no existe ninguna posibilidad de perder el compresor de muestras, y no existe ninguna necesidad de alinear el compresor de muestras con la zona de aplicación de la muestra cuando se forma la pila vertical. Una ventaja de estas realizaciones es que permiten un lapso de tiempo entre la aplicación de la muestra y el inicio real de flujo a la zona de prueba. En otras palabras, el sándwich puede prepararse previamente, y el flujo iniciarse mucho más tarde.

Como alternativa, la almohadilla 33 puede ser independiente del compresor de muestras. La almohadilla puede estar sobre un aplicador del socio de unión similar al colector de muestras. En estas realizaciones, el aplicador del socio de unión puede estar ubicado entre la parte de recogida de muestras y la zona de aplicación de la muestra cuando la presión es aplicada por el compresor de muestras para transferir la muestra a la zona de aplicación de la muestra.

La figura 9 muestra una pila vertical que incluye un compresor de muestras 30, un colector de muestras 35 con una parte de recogida de muestras 60, un aplicador del socio de unión 62 con una almohadilla del aplicador 64 y una zona de aplicación de la muestra 44 de una tira reactiva. Aunque el aplicador del socio de unión 62 incluye un mango en la figura 9, el aplicador del socio de unión 62 podría, como alternativa, simplemente ser una almohadilla. La parte de repisa 34 del compresor de muestras 30 aplica presión a la parte de recogida de muestras 60 cargada con una muestra y la almohadilla del aplicador 64 cargada con al menos un socio de unión para un analito para el que se realizarán pruebas en la muestra. La presión preferentemente empuja a al menos una parte de la muestra desde la parte de recogida de muestras 60 para humedecer la almohadilla del aplicador 64, movilizándolo de este modo parte del socio de unión, de modo que al menos parte de la muestra y parte del socio de unión son transferidas a la zona de aplicación de la muestra 44. En algunas realizaciones, esta transferencia se produce sin dilución. En realizaciones con pequeños volúmenes de muestra o muestras viscosas o sólidas, sin embargo, puede usarse un líquido adicional para facilitar la transferencia de la muestra y el socio de unión a la tira reactiva. En algunas realizaciones, tal como se muestra en la figura 9, el compresor de muestras no tiene ninguna almohadilla, aunque puede usarse una almohadilla para ayudar en la transferencia, tal como suministrando líquido o tampón adicional. En algunas realizaciones, tal como se muestra en la figura 9, la parte de recogida de muestras 60 está ubicada entre el compresor de muestras 30 y la almohadilla del aplicador 64 en la pila vertical para ayudar en la transferencia del socio de unión a la tira reactiva durante la compresión. Como alternativa, la almohadilla del aplicador 64 puede estar colocada entre el compresor de muestras 30 y la parte de recogida de muestras 60. En realizaciones donde el sándwich completo se forma antes de alcanzar la zona de prueba, pueden usarse dos aplicadores del socio de unión (un aplicador independiente para cada socio de unión del analito), con la parte de recogida de muestras, estando la primera almohadilla del aplicador y la segunda almohadilla del aplicador colocadas en cualquier orden sobre la pila vertical. Como alternativa, un único aplicador del socio de unión podría incluir ambos de los socios de unión para el analito. En otras realizaciones, la muestra, el primer socio de unión y el segundo socio de unión pueden aplicarse secuencialmente a la tira reactiva en cualquier orden usando el compresor de muestras.

En un método de aplicación de una muestra a una tira reactiva de un dispositivo de flujo lateral, al menos un socio de unión externo se coloca en primer lugar sobre la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva. El socio de unión externo puede estar ubicado sobre una almohadilla externa. En realizaciones donde hay dos socios de unión al analito, que se unen al analito antes de alcanzar la zona de prueba, pueden añadirse uno o ambos de los socios de unión al analito. Un colector de muestras que incluye la muestra se coloca en una pila vertical entre el socio de unión externo y un compresor de muestras. El compresor de muestras aplica presión al colector de muestras para transferir el socio de unión externo y al menos una parte de la muestra a la zona de aplicación de la muestra. Como alternativa, el socio de unión externo podría añadirse y ser comprimido por el compresor de muestras, a continuación retirado, antes de que el colector de muestras se aplique por encima de la zona de aplicación de la muestra, donde la muestra es comprimida sobre la tira reactiva. En otra realización alternativa, al menos un socio de unión externo se coloca en la pila vertical entre el compresor de muestras y el colector de muestras. Como alternativa, el colector de muestras se añade y se comprime, a continuación se retira y, a continuación, el socio de unión externo se añade y se comprime sobre la tira reactiva. En otras realizaciones, el colector de muestras está en una pila vertical entre un primer socio de unión externo y un segundo socio de unión externo, y el compresor de

muestras aplica presión a la pila vertical. En estas realizaciones, ni la tira ni el compresor de muestras tienen un socio de unión del analito específico. La muestra, el socio de unión al analito y el socio de unión de control también puede aplicarse a la zona de aplicación de la muestra en múltiples etapas en cualquier combinación.

5 Como alternativa, en un dispositivo de flujo lateral de la presente invención, el compresor de muestras puede ser un compresor de muestras universal sin componentes específicos para el analito de interés. En una realización, el compresor de muestras no contiene componentes del ensayo. La almohadilla del compresor de muestras contiene solamente el socio de unión a la zona de control móvil. En estas realizaciones, uno o más aplicadores del socio de unión incluyen al menos un socio de unión para el analito y se convierten en parte de la pila vertical con el  
10 compresor de muestras y el colector de muestras cuando la muestra es transferida a la zona de aplicación de la muestra. La muestra, el socio de unión al analito y el socio de unión de control móvil también pueden aplicarse a la zona de aplicación de la muestra en múltiples etapas en cualquier combinación.

15 En otra realización de la presente divulgación, el compresor de muestras 30 también sirve como colector de muestras, y la almohadilla 33 del compresor de muestras también sirve como parte de recogida de muestras. En esta realización, el conjugado, el segundo socio de unión, el socio de unión a la línea de control y/o cualquier combinación de los tres, están preferentemente ubicados sobre una superficie posterior de la almohadilla 33, donde la almohadilla está fijada al brazo del compresor de muestras. En realizaciones donde es necesario realizar la recogida de muestras de forma estéril, el compresor de muestras 30 es esterilizado preferentemente a continuación  
20 por radiación antes del uso como colector de muestras. La muestra es recogida a continuación usando la parte frontal de la almohadilla de modo que el paciente no es expuesto al conjugado o el segundo socio de unión durante la adquisición de la muestra. Cuando la muestra se aplica a la zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva, la almohadilla es, preferentemente, comprimida de modo que la muestra se mezcla con el conjugado o el segundo socio de unión y al menos una parte de ambos es exprimida sobre la tira reactiva.

25 En algunas realizaciones, un dispositivo de flujo lateral de la presente divulgación también puede incluir un sistema de amplificación de señales incorporado, en línea o *in situ*. El sistema de amplificación de muestras puede usarse en combinación con un compresor de muestras o en un método o dispositivo sin un compresor de muestras. En realizaciones donde se usa oro coloidal como marcador detectable para el conjugado, la señal del oro coloidal en el  
30 conjugado unido a la zona de prueba puede amplificarse adicionalmente mediante intensificación con plata. Formulaciones adecuadas de sales de plata y los reveladores de plata pueden secarse en el sitio de aplicación de la muestra o aguas arriba de éste o aguas abajo de éste. Las sales de plata y los reveladores pueden secarse conjuntamente, aguas arriba o aguas abajo entre sí, o pueden estar separados por el área de aplicación de la muestra. En otras realizaciones, el apilamiento, donde el sistema incluye un conjugado con un antígeno adicional y  
35 un segundo conjugado, que es preferentemente una nanopartícula, con el socio de unión específico del antígeno, se usa para amplificar la señal. El segundo conjugado también incluye preferentemente un marcador. En el segundo conjugado, el socio de unión puede estar conjugado a una partícula que es del mismo tamaño, más pequeña o de mayor tamaño de la partícula en el primer conjugado. En otras realizaciones más, tanto la intensificación con plata como la intensificación por apilamiento pueden usarse sobre la misma tira reactiva. El conjugado y los elementos de  
40 intensificación con plata de apilamiento pueden estar juntos o aguas arriba o aguas abajo entre sí. Una característica preferida de estas realizaciones es que las nanopartículas y/o intensificadores de plata “de apilamiento” no entran en contacto con el conjugado inicialmente sino que entran en contacto solamente mientras el conjugado está inmovilizado en la zona de prueba. Por lo tanto, se consigue una mejor especificidad.

45 En algunas realizaciones donde un “sándwich completo” está formado entre el analito 40, el primer socio de unión al analito 37 y el segundo socio de unión al analito 38 antes de que el complejo alcance la zona de detección 52 (véase, por ejemplo, las figuras 4A-4C, 5A-5B, y 6A-6B), la intensificación con plata u otras señales de amplificación pueden colocarse aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44 de modo que la sal de plata y/o revelador de plata interactúa con el sándwich completo antes de que el complejo alcance la zona de detección 52. En otras  
50 realizaciones con un sándwich completo, la sal de plata y/o revelador de plata están ubicados aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44 de modo que el sándwich completo se forma y se desplaza hasta la sal/revelador de plata antes de alcanzar la zona de detección 52.

55 En la técnica anterior, tal como se muestra en la figura 10, hay una correspondencia uno a uno entre el analito 40 y el marcador 41 en la zona de prueba 45, dado que cada analito se une a un socio de unión inmovilizado 38 y un socio de unión móvil 37 sin ningún marcador 41 sobre el conjugado 36.

60 En un sistema de amplificación de señales de la presente divulgación, la fuente de amplificación puede estar ubicada en cualquier lugar sobre la tira reactiva, incluyendo en la zona de aplicación de la muestra, o aguas arriba o aguas abajo de ésta. Como alternativa, la fuente de amplificación puede estar ubicada en el tampón o sobre el compresor de muestras.

65 En algunas realizaciones, tal como se muestra en la figura 11, la fuente de amplificación 70 se deposita no específicamente sobre el conjugado, de modo que múltiples conjugados están asociados con un analito unido en la zona de prueba. En esta realización, la fuente de amplificación es, preferentemente, una o más sales de plata, y un revelador de plata puede usarse para intensificar la señal en ensayos usando oro coloidal como la parte de

- 5      marcador 41 del conjugado. Las sales de plata y el revelador de plata pueden ubicarse o introducirse de cualquier manera para intensificar la detección del analito. En realizaciones donde se usa oro coloidal como marcador detectable para el conjugado, la señal del oro coloidal en el conjugado unido en la zona de prueba puede amplificarse mediante intensificación con plata. Formulaciones adecuadas de sales de plata y los reveladores de plata pueden secarse en el sitio de aplicación de la muestra aguas arriba de éste o aguas abajo de éste. Las sales de plata y los reveladores pueden secarse conjuntamente, aguas arriba o aguas abajo entre sí, o separados por el área de aplicación de la muestra. Como alternativa, sales y/o reveladores de plata pueden estar incluidos como parte del tampón.
- 10     En una realización preferida, la mezcla de las sales de plata y reveladores se seca en un área entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de prueba. En esta realización, un sándwich completo del analito entre dos socios de unión (estando uno un conjugado sobre oro y el otro marcado adecuadamente con marcadores tales como biotina) se mueve al interior del área de intensificación con plata y juntos se desplazan a la zona de prueba donde son capturados. Aunque la intensificación con plata puede aplicarse al medio sándwich antes de la captura, la intensificación con plata se aplica preferentemente después de la captura, dado que, en caso contrario, puede interferir en la unión en la zona de prueba. Las sales de plata y los reveladores pueden usarse en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, incluyendo, aunque sin limitarse a las mostradas en las figuras 3A-3C, 4A-4C, 5A-5B, 6A-6B, y 7A-7D.
- 15     En otra realización más, el área de intensificación con plata está ubicada directamente debajo del material de aplicación de la muestra. El compresor con ambos socios de unión, tal como se han descrito anteriormente, formarían el sándwich completo y se volverían potenciados por sales de plata y reveladores todos en su lugar. Este megacomplejo puede moverse a continuación al interior de la zona de prueba donde puede ser capturado.
- 20     En otra realización más, la intensificación con plata se consigue incorporando las sales de plata y los reveladores en el tampón de migración. En otras realizaciones, las sales de plata y/o el revelador de plata pueden estar ubicados sobre el compresor de muestras o el colector de muestras en situaciones en las que no es necesario que el colector de muestras sea estéril. En caso contrario, el colector de muestras puede esterilizarse después de la adición de las sales de plata y/o el revelador de plata usando técnicas de esterilización, tales como, por ejemplo, radiación, que no dañan las sales de plata y/o el revelador de plata.
- 25     En otra realización más, las sales de plata se secan en el sitio, aguas arriba, o aguas abajo del área de aplicación de la muestra y el revelador de plata puede añadirse a la ventana de visualización como una etapa independiente.
- 30     En una realización preferida que implica la intensificación con plata, dado que la plata es sensible a la luz, la prueba se realiza boca abajo (con la casete dada la vuelta en realizaciones donde se usa una casete) o protegida de otro modo de la luz ambiente antes de que se complete la prueba.
- 35     En otra realización, la intensificación con plata se consigue como una etapa independiente donde la sal de plata y el revelador se añaden juntos o por separado al área de la ventana de visualización 82 donde está ubicada la zona de prueba 83. Si no hay ningún área de la ventana de visualización 82, la sal de plata y el revelador se añaden, preferentemente, a la zona de prueba 83 de la tira. En algunas de estas realizaciones, la intensificación con plata se añade a la tira reactiva mientras sigue estando húmeda o seca después del uso. En algunas de estas realizaciones, la tira se retira de cualquier carcasa y una parte de la tira que contiene la zona de prueba 83 se corta y se trata con intensificación con plata conjuntamente o por separado.
- 40     En una realización preferida, después de que se ha realizado la prueba, se deja secar a la tira al aire. El secado moderado de la tira se consigue en aproximadamente de 20 a 30 minutos, pero depende de las condiciones medioambientales. Después de que la tira se ha secado, una gota o dos de la sal de plata y los reveladores se añaden al área de la ventana de visualización 82 donde está ubicada la zona de prueba 83. Si no hay ningún área de la ventana de visualización 82, la sal de plata y el revelador se añaden, preferentemente, a la zona de prueba 83 de la tira. Esto intensifica la sensibilidad al menos 5 veces. La sal de plata y los reveladores pueden añadirse conjuntamente o por separado. La intensificación con plata se produce casi instantáneamente y los resultados se leen preferentemente en el plazo de dos a tres minutos después del añadido de la intensificación con plata. Si los resultados no se leen rápidamente, la tira puede volverse negra y el fondo interferirá en la lectura de la línea de prueba gris/negra resultante. Este fondo puede minimizarse en gran medida si se añade una solución de lavado a la ventana de visualización 82/zona de prueba 83. La sensibilidad puede intensificarse adicionalmente con el uso de un lector óptico portátil, por ejemplo un espectrómetro en miniatura fabricado por Ocean Optics, Inc. (Dunedin, Florida). Un lector portátil es un espectrómetro en miniatura de mano, que cuantifica la intensidad del color de la línea de prueba que mide la absorbancia o la reflectancia del complejo marcado que se une a la línea de prueba. La cuantificación de la línea de prueba puede determinarse mediante el uso de una curva patrón. En el desarrollo de una curva patrón, se crean varias valoraciones de la concentración del analito y se registra la salida del lector en cada valoración. El lector incrementa la sensibilidad de una prueba en 5 a 10 veces. En funcionamiento, la ventana de detección para ver la línea de prueba visible se coloca directamente sobre o en las proximidades de la abertura del espectrómetro, de modo que pueda realizarse una medición directa de absorbancia o reflectancia.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

En otra realización preferida, la solución de sal de plata y/o revelador incluye un líquido volátil. La sal de plata y el revelador podrían prepararse juntas en una única solución o como soluciones independientes. Cualquier líquido que se evapora a temperatura ambiente o se vaporiza fácilmente y no interfiere en la prueba podría usarse. El disolvente volátil se selecciona de tal manera que no disuelve el material de la membrana (por ejemplo nitrocelulosa) que compone la zona de prueba 83 donde el segundo socio de unión 17 (véase la figura 1), 38 (véase las figuras 3A-3C y 7A) o la marca inmovilizada 50 (véase las figuras 4A-4C, 5A-5B, 6A-6B y 7B-7D) están ubicados. Algunos ejemplos de un líquido volátil que podrían usarse incluyen, aunque sin limitarse a, metanol, alcohol isopropílico, bajas concentraciones de benceno y bajas concentraciones de acetona. La intensificación con plata tiene la sal de plata y un revelador que es, preferentemente, de naturaleza relativamente orgánica. La solución de sal de plata y revelador se añade al área de la ventana de visualización 82 donde la zona de prueba 83 está ubicada al final de la prueba (por ejemplo aproximadamente 10 minutos después de que la muestra se añadió a la tira), cuando la tira sigue estando bastante húmeda. Si no hay ningún área de la ventana de visualización 82, la sal de plata y el revelador se añaden preferentemente a la zona de prueba 83 de la tira. El líquido volátil "seca" el área donde se añade el líquido (la zona de prueba 83). En esta realización, no es necesario esperar a que toda la tira esté moderadamente seca. Esta realización crea secado "in-situ" de solamente el área de interés (la zona de prueba 83).

En algunas realizaciones, tal como se muestra en la figura 12, la amplificación se debe a un fenómeno de "apilamiento" donde un segundo conjugado 74 "se apila" sobre al menos una parte del complejo formado durante el ensayo. En estas realizaciones, el primer conjugado 72 incluye una parte adicional 73 a la que un socio de unión 76 de la parte 73 se une específicamente, y el segundo conjugado 74 preferentemente también incluye un marcador 78. Por ejemplo, cuando el segundo socio de unión 38 incluye una marca de avidina 39, el sándwich completo es capturado en la zona de prueba por biotina inmovilizada 50, y posterior o concurrentemente, el conjugado "de apilamiento" se acumula o se apila sobre el sándwich completo inmovilizado en la zona de prueba, dando origen a más acumulación apilada y mejor percepción de señales. En una realización, el primer conjugado es oro conjugado a un anticuerpo del analito e IgY de pollo, y el segundo conjugado es una perla de látex rojo conjugada a un antígeno de conejo anti-IgY de pollo.

Preferentemente, el "apilamiento" se usa solamente en realizaciones donde el "sándwich completo" se forma antes de alcanzar la zona de prueba. Por ejemplo, en las figuras 4C, 5B, 6B, 7B, 7C y 7D, un sándwich completo se forma en la zona de aplicación de la muestra. En una realización preferida, anticuerpo de ratón sobre conjugado marcado se une a un antígeno para formar un primer complejo. El primer complejo se une inmediatamente al anticuerpo policlonal marcado con biotina movilizado para formar un sándwich completo como un segundo complejo. El segundo complejo es capturado a continuación en la zona de prueba por avidina mediante el marcador de biotina. El conjugado con marcador anti-ratón liberado lentamente se une a continuación y se aplica sobre el anticuerpo de ratón en el segundo complejo en la zona de prueba. El conjugado con marcador anti-ratón está ubicado preferentemente de modo que alcance la zona de prueba después de que se han formado los complejos de analito. Algunas ubicaciones preferidas para el conjugado con marcador anti-ratón incluyen en la zona de aplicación de la muestra, aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra, añadido al tampón después de una cantidad de tiempo predeterminada, aplicado a la zona de prueba después de que el sándwich se ha formado o en la trayectoria de flujo pero encapsulado para retardar su liberación, por ejemplo, durante 20 a 30 segundos. En esta realización, el apilamiento incrementa la sensibilidad del ensayo de 3-5 veces.

En realizaciones de la presente divulgación con conjugados de oro, que pueden usarse en todos los ensayos de flujo lateral, un anticuerpo anti-IgY de pollo marcado y secado u otro resto inmunógeno inespecífico, se incorpora en la tira reactiva aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra o, como alternativa, en el tampón. Cuando la muestra es de mamífero (por ejemplo, ser humano), el resto inmunógeno inespecífico es, preferentemente, de un organismo no mamífero tal como, por ejemplo, un ave, un pez o una planta, de modo que no interfiera en la unión al analito. El segundo conjugado, por ejemplo anti-IgY de pollo, es movilizado a continuación por el tampón. Retardar la movilización del segundo conjugado permite que el sándwich completo fluya y comience la unión mediante una marca inmovilizada con una marca, por ejemplo biotina-avidina, captura en la zona de prueba en el caso de un segundo socio de unión móvil. El sándwich completo se acumula en la zona de prueba, seguido por unión y apilamiento del segundo conjugado, por ejemplo perlas de látex rojas, encima del primer conjugado, por ejemplo oro. Esta realización también incrementa la sensibilidad del ensayo de 3-5 veces. En realizaciones donde el segundo socio de unión para el analito se inmoviliza en la zona de prueba, el medio sándwich preferentemente se desplaza hasta la zona de prueba, seguido por unión y apilamiento.

La figura 11 muestra amplificación inespecífica y la figura 12 muestra amplificación específica. En otras realizaciones, podrían usarse combinaciones de tanto amplificación específica como amplificación inespecífica, para amplificar adicionalmente la señal. Como ejemplo, la primera amplificación se debe a un fenómeno de "apilamiento" tal como se ha mostrado y descrito anteriormente con respecto a la figura 12 donde un segundo conjugado 74 "se apila" sobre al menos una parte del complejo formado durante el ensayo. Amplificación adicional se proporciona cuando una fuente de amplificación 70 se deposita a si misma inespecíficamente sobre el conjugado, de modo que múltiples conjugados se asocien con un analito unido en la zona de prueba, tal como se ha mostrado y descrito anteriormente con respecto a la figura 11. Como alternativa, podrían usarse otras combinaciones de amplificación específicas e inespecífica.

En otra realización de apilamiento e intensificación de señales, la intensificación se realiza usando una enzima conjugada al resto de apilamiento. En un ejemplo, la enzima es peroxidasa de rábano picante, y está conjugada a un anticuerpo de conejo anti-ratón. Aunque la peroxidasa de rábano picante se usa a menudo para amplificar una señal débil, podrían usarse, como alternativa, otras enzimas que intensifican señales débiles incluyendo, aunque sin limitarse a, fosfatasa alcalina, catalasa, ureasa y glucosa oxidasa. Análogamente, podrían usarse como alternativa otros anticuerpos que se unen al conjugado o un intermediario. No hay nanopartículas o microesferas en esta realización. En su lugar, esta realización incluye una forma "soluble" del conjugado. La ubicación donde se seca este conjugado enzimático puede variar; puede ser aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de la muestra. En realizaciones con un compresor de muestras, el conjugado enzimático podría estar, como alternativa, sobre el compresor de muestras. El conjugado enzimático se seca, preferentemente, sobre la tira reactiva, pero no se inmoviliza. Puede estar ubicado en solitario o en combinación con otros componentes que forman el "sándwich" con el anticuerpo (que está, preferentemente, biotinilado) y/o el anticuerpo conjugado a oro.

La figura 14 muestra una realización de un detector con una enzima conjugada al resto de apilamiento. La zona de control 46 incluye un primer socio de unión de control inmovilizado 110. La zona de prueba 45 incluye un primer socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 109 sobre la membrana. Un primer socio de unión al analito 102 conjugado a un segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 101 se seca o se incorpora de otro modo (por ejemplo, se liofiliza) en la zona de aplicación de la muestra 44. Aunque no se muestra en esta figura, el primer socio de unión al analito 102 podría estar, como alternativa, ubicado aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44. Un socio de unión 107 para un segundo socio de unión al analito 103 está conjugado a una enzima 108, y está ubicado aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. Como alternativa, el socio de unión 107 para el segundo socio de unión al analito 103 podría solaparse con la zona de aplicación de la muestra 44 o estar ubicado aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 está, preferentemente, embebida con el segundo socio de unión al analito 103 conjugado a un primer marcador detectable 104 y se mezcla preferentemente con un segundo socio de unión de control 105 conjugado a un segundo marcador detectable 106, que sirve como control.

Aunque la figura 14 muestra los diferentes reactivos en ciertas ubicaciones sobre la tira reactiva o el compresor de muestras 30, también son posibles otras ubicaciones para cada uno del primer socio de unión al analito 102 conjugado a un segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 101, el socio de unión 107 para el segundo socio de unión al analito 103, el segundo socio de unión al analito conjugado al primer marcador detectable 104, y el segundo socio de unión de control 105 conjugado al segundo marcador detectable 106 sobre la tira reactiva y/o sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. Otras realizaciones no requieren un compresor de muestras 30. En estas realizaciones, los reactivos 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 y 108 estarán ubicados en diversas ubicaciones, preferentemente aguas arriba de la zona de prueba 45, sobre la tira reactiva.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justamente sobre la zona de aplicación de la muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge, preferentemente, en tampón de migración durante aproximadamente 15-30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 15A y 15B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el analito 40 está presente en la muestra, se compleja con el primer socio de unión al analito 102 y el segundo socio de unión al analito 103, que se compleja con el socio de unión 107 conjugado con la enzima 108.

Si el analito 40 no está presente en la muestra, el segundo socio de unión al analito 103 aún se compleja con el socio de unión 107 conjugado con la enzima 108, pero estos no se complejan con la muestra o el primer socio de unión al analito 102. El segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 101 se unirá al primer socio de unión a la zona de prueba 109 en la zona de prueba 45, independientemente de si el analito 40 está o no presente en la muestra. Sin embargo, si no hay analito presente, nada será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si se forma una línea de prueba visible junto con una línea de control visible, el resultado indica niveles elevados de analito en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea visible en la línea de prueba, entonces una gota de un sustrato para la enzima se añade en la línea de prueba. Si la adición del sustrato enzimático da como resultado una señal visible, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea visible en la línea de control indica que el segundo socio de unión de control 105 conjugado a la segundo marcador detectable 106 se ha unido al primer socio de unión de control 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. La figura 15C muestra el complejo que se forma en la zona de control.

Como ejemplo, un detector del virus del herpes simple (VHS) incluye las siguientes secciones, tal como se muestra en la figura 14. La zona de control 46 incluye anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo inmovilizado 110. La zona de prueba 45 incluye NeutrAvidina inmovilizada 109 sobre la membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS-1 y/o VHS-2 102 se seca sobre la zona de aplicación de la muestra 44. Aunque no se muestra en esta figura, el anticuerpo anti-VHS-1/VHS-2 102 podría secarse, como alternativa, aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44. Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (H&L) 107 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) 108 se seca aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. Como alternativa, el

anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 107 conjugado a peroxidasa de rábano picante 108 podría solaparse con la zona de aplicación de la muestra 44 o estar ubicado aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 está, preferentemente, embebida con anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 103 (anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína D del virus del herpes simple) conjugado a oro coloidal 104 y mezclada con IgY de pollo 105 conjugada a perlas de látex teñidas de azul 106, que sirve como control.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de la muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge, preferentemente, en tampón de migración durante aproximadamente 15-30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 15A y 15B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si VHS (el analito 40) está presente en la muestra, se compleja con el anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS1/2 102 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 103 conjugado a oro coloidal 104, que se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 107 conjugado con HRP 108.

Si el VHS no está presente en la muestra, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 103 conjugado a oro coloidal 104 aún se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 107 conjugado con HRP 108, pero estos no se complejan con la muestra o el anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS1/2 102. El anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS1/2 102 se unirá a neutravidina 109 en la zona de prueba 45, independientemente de si VHS está o no presente en la muestra. Sin embargo, si no hay VHS presente, el anticuerpo biotinilado 101 policlonal anti-VHS 1/2 102 no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si una línea de prueba roja visible se forma junto con la línea de control azul, el resultado indica niveles elevados de VHS en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea roja visible en la línea de prueba, entonces una gota del sustrato enzimático TMBM (u otro sustrato para peroxidasa de rábano picante) se añade en la línea de prueba. Si la adición del TMBM da como resultado una línea de prueba azul/púrpura, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea azul en la línea de control indica que la IgY de pollo 105 conjugada a las perlas de látex teñidas de azul 106 se ha unido al anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. La figura 15C muestra el complejo que se forma en la zona de control.

En esta realización, la prueba de diagnóstico analítico inmediato se convierte en ligada a enzimas y la amplificación depende de la cantidad de enzima y sustrato, y se incrementa con el tiempo. Esto no ocurre en conjugados marcados visualmente a nanopartículas como oro coloidal o microesferas como perlas de látex. Además, el resultado de la línea de prueba no se debe a un ensayo de unión antigénico-anticuerpo alguno, sino a un ensayo de unión entre un ligando y un receptor tal como neutravidina y biotina. La unión en la línea de prueba no es debida a unión inmunológica sino a unión química. Por lo tanto, esto no es un ensayo de unión ligada a enzimas (ELISA o EIA). En su lugar, es una cromofiltografía ligada a enzimas, o cromofiltografía enzimática multiplanar directa cuando se usa con un compresor de muestras. Incluso con una etapa adicional de añadir el sustrato enzimático a la línea de prueba, la prueba sigue siendo sencilla de realizar.

En una realización de apilamiento alternativa, mostrada en las figuras 16, 17A, y 17B, una enzima está unida físicamente al marcador detectable sobre tanto el conjugado como el resto de apilamiento. En un ejemplo, la enzima reviste perlas detectables visiblemente (por ejemplo, perlas de látex rojas) y está conjugada a un anticuerpo de conejo anti-ratón. Aunque la peroxidasa de rábano picante se usa a menudo para amplificar una señal débil, podrían usarse, como alternativa, otras enzimas que intensifican señales débiles incluyendo, aunque sin limitarse a, fosfatasa alcalina, catalasa, ureasa y glucosa oxidasa. Análogamente, podrían usarse como alternativa otros anticuerpos que se unen al conjugado o un intermediario. No hay nanopartículas o microesferas en esta realización. En su lugar, esta realización incluye una forma "soluble" del conjugado. La ubicación donde se seca este conjugado enzimático puede variar; puede ser aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de la muestra. En realizaciones con un compresor de muestras, el conjugado enzimático podría estar, como alternativa, sobre el compresor de muestras. El conjugado enzimático se seca, preferentemente, sobre la tira reactiva, pero no se inmoviliza. Puede estar ubicado en solitario o en combinación con otros componentes que forman el "sándwich" con el anticuerpo que está, preferentemente, biotinilado.

La figura 16 muestra una realización de un detector con una enzima unida físicamente al marcador detectable sobre tanto el conjugado como el resto de apilamiento. La zona de control 46 incluye un primer socio de unión de control inmovilizado 110, similar al detector mostrado en la figura 14. La zona de prueba 45 incluye un primer socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 209 sobre una membrana. Un primer socio de unión al analito 202 conjugado a un segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 201 se seca o se incorpora de otro modo (por ejemplo, se liofiliza) en la zona de aplicación de la muestra 44. Aunque no se muestra en esta figura, el primer socio de unión al analito 202 podría estar ubicado, como alternativa, aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44.

Un socio de unión 207 para un segundo socio de unión al analito 203, que está conjugado a una enzima 208 y conjugado a un marcador detectable 215 (que también está conjugado a la enzima 208), está preferentemente

embebido en la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. En otras realizaciones, hay solo un socio de unión 207 para el segundo socio de unión al analito 203 conjugado a un marcador detectable 215, y el marcador detectable también está conjugado a la enzima 208. En algunas realizaciones, la enzima 208 está conjugada al marcador detectable 215 revistiendo el marcador detectable 215. En algunas realizaciones, el socio de unión 207 conjugado a la enzima 208 más el socio de unión 207 conjugado al marcador detectable 215 (que también está conjugado a la enzima 208) podría estar ubicado sobre la tira reactiva, solapándose con la zona de aplicación de la muestra 44 o estando ubicado aguas abajo o aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también está preferentemente embebida con el segundo socio de unión al analito 203 conjugado a un marcador detectable 204 revestido con la enzima 208 que, preferentemente, se mezcla con un segundo socio de unión de control 105 conjugado a un marcador detectable 106 (mostrado en la figura 14), que sirve como control.

Aunque la figura 16 muestra los diferentes reactivos en ciertas ubicaciones sobre la tira reactiva o el compresor de muestras 30, otras ubicaciones para cada uno del primer socio de unión al analito 202 conjugado al segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 201, el socio de unión 207 conjugado a la enzima 208 más el socio de unión 207 conjugado al marcador detectable 215 revestido con la enzima, y el segundo socio de unión de control 105 conjugado al marcador detectable 106, sobre la tira reactiva y/o sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30 también son posibles. Otras realizaciones no requieren un compresor de muestras 30. En estas realizaciones, los reactivos 201, 202, 203, 204, 105, 106, 207, 208 y 215 estarán ubicados en diversas ubicaciones, preferentemente aguas arriba de la zona de prueba 45, sobre la tira reactiva.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de la muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge, preferentemente, en tampón de migración durante aproximadamente 15-30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 17A a 17B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el analito 40 está presente en la muestra, se compleja con el primer socio de unión al analito 202 y el segundo socio de unión al analito 203. El segundo socio de unión al analito también se compleja con el socio de unión 207.

Si el analito 40 no está presente en la muestra, el segundo socio de unión al analito 203 aún se compleja con el socio de unión 207, pero estos no se complejan con la muestra o el primer socio de unión al analito 202. El segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 201 se unirá al primer socio de unión a la zona de prueba 209 en la zona de prueba 45, independientemente de si el analito 40 está o no presente en la muestra. Sin embargo, si no hay analito 40 presente, el segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 201 conjugado al primer socio de unión al analito 202 y complejo con el primer socio de unión a la zona de prueba 209 no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si se forma una línea de prueba visible junto con una línea de control visible, el resultado indica niveles elevados de analito en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea visible en la línea de prueba, entonces una gota del sustrato enzimático se añade en la línea de prueba. Si la adición del sustrato enzimático da como resultado una línea de prueba visible, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea visible en la línea de control indica que el segundo socio de unión de control 105 se ha unido al primer socio de unión de control 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. El complejo de la línea de control se muestra en la figura 15C.

En esta realización, la enzima está unida físicamente al marcador detectable (por ejemplo, perlas de látex) y se mueve con el marcador detectable. Por lo tanto, la especificidad y los problemas con el fondo mejoran. A niveles elevados de antígeno, un resultado positivo es fácilmente detectable de forma visible mediante una línea visible. A niveles muy bajos, el sustrato enzimático se añade a la ventana de resultados para conseguir una reacción de color amplificada por enzimas. Depositando muchos de los reactivos, incluyendo el socio de unión 207, que incluye la enzima 208 y el marcador detectable 215, sobre el compresor de muestras, estos reactivos no están sobre la tira. En algunas realizaciones preferidas, el segundo socio de unión al analito 203 puede mezclarse previamente con el socio de unión 207 (con o sin el socio de unión marcado con enzimas) y estar embebido en la almohadilla del compresor de muestras. En estas realizaciones, la tira reactiva incluye el segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 202, que se une al primer socio de unión a la zona de prueba 209. Esto convierte a la tira reactiva en un ensayo de unión y no un inmunoensayo.

Como ejemplo, un detector del virus del herpes simple (VHS) incluye las siguientes secciones, tal como se muestra en la figura 16. La zona de control 46 incluye un anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo inmovilizado 110, similar al detector mostrado en la figura 14. La zona de prueba 45 incluye NeutrAvidina inmovilizada 209 sobre la membrana de nitrocelulosa. Un anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS-1 y/o VHS-2 202 se seca sobre la zona de aplicación de la muestra 44. Aunque no se muestra en esta figura, el anticuerpo anti-VHS-1/VHS-2 202 podría secarse, como alternativa, aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44. Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (H&L) 207 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) 208 más anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado a perlas de látex rojas 215 revestidas con peroxidasa de rábano picante y está preferentemente embebido en la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. En otras realizaciones, solamente

5 existe anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado a perlas de látex rojas 215 revestidas con peroxidasa de rábano picante. Como alternativa, el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado a perlas de látex rojas 215 revestidas con peroxidasa de rábano picante podría estar ubicado sobre la tira reactiva, que se solapa con la zona de aplicación de la muestra 44 o que está ubicado aguas abajo o aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 está, preferentemente, también embebida con anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 203 (anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína D del virus del herpes simple) conjugado a perlas de látex rojas 204 revestidas con peroxidasa de rábano picante y mezclado con IgY de pollo 105 conjugada a perlas de látex teñidas de azul 106 (mostradas en la figura 14), que sirve como control.

10 La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de la muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge preferentemente en tampón de migración durante aproximadamente 15-30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 17A y 17B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si VHS (el analito 40) está presente en la muestra, se compleja con el anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS1/2 202 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 203 conjugado a perlas de látex rojas 204, que se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado con HRP 208 y el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207 conjugado a perlas de látex rojas 215 revestidas con peroxidasa de rábano picante.

25 Si VHS no está presente en la muestra, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 203 conjugado a las perlas de látex rojas 204 aún se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 207, pero estos no se complejan con la muestra o el anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS1/2 202. El anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS1/2 202 se unirá a NeutrAvidina 209 en la zona de prueba 45, independientemente de si VHS está o no presente en la muestra. Sin embargo, si no hay VHS presente, el anticuerpo biotinilado 201 policlonal anti-VHS 1/2 202 no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si una línea de prueba roja visible se forma junto con la línea de control azul, el resultado indica niveles elevados de VHS en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea roja visible en la línea de prueba, entonces una gota del sustrato enzimático TMBM (u otro sustrato para peroxidasa de rábano picante) se añade en la línea de prueba. Si la adición del TMBM da como resultado una línea de prueba azul/púrpura, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea azul en la línea de control indica que la IgY de pollo 105 conjugada a las perlas de látex teñidas de azul 106 se ha unido al anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. El complejo de la línea de control se muestra en la figura 15C.

40 En este ejemplo, anticuerpo de conejo anti-ratón se conjuga a la enzima, que también se conjuga a las perlas de látex rojas, un anticuerpo de conejo anti-ratón adicional se conjuga directamente a las mismas perlas. La enzima está unida físicamente a las perlas y se mueve con las perlas. Por lo tanto, la especificidad y los problemas con el fondo mejoran. A niveles elevados de antígeno, un resultado positivo es fácilmente detectable de forma visible mediante una línea roja. A niveles muy bajos, el sustrato enzimático se añade a la ventana de resultados para conseguir una reacción de color amplificada por enzimas.

45 Depositando el anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a las perlas rojas (junto con el conjugado enzimático sobre la misma perla) sobre el compresor de muestras, estos reactivos no están sobre la tira. En algunas realizaciones preferidas, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 libre puede mezclarse previamente con el anticuerpo de conejo anti-ratón (con o sin el anticuerpo de conejo anti-ratón marcado con enzimas) y embeberse en la almohadilla del compresor de muestras. En estas realizaciones, la tira reactiva incluye biotina que se une a neutravidina. Esto convierte a la tira reactiva en un ensayo de unión y no un inmunoensayo.

50 Las figuras 18, 19A, y 19B muestran otra realización de apilamiento de la presente divulgación. En esta realización, una enzima se conjuga/se une físicamente a un marcador detectable sobre el resto de apilamiento y el conjugado que se une al analito no incluye un marcador detectable. Esta realización incrementa adicionalmente la especificidad. En un ejemplo, la enzima reviste perlas detectables visiblemente (por ejemplo, perlas de látex rojas) y se conjuga a un anticuerpo de conejo anti-ratón. Aunque a menudo se usa peroxidasa de rábano picante para amplificar una señal débil, podrían usarse, como alternativa, otras enzimas que intensifican señales débiles que incluyen, aunque sin limitarse a, fosfatasa alcalina, catalasa, ureasa y glucosa oxidasa. Análogamente, podrían usarse como alternativa otros anticuerpos que se unen al conjugado o un intermediario. No hay nanopartículas o microesferas en esta realización. En su lugar, esta realización incluye una forma "soluble" del conjugado. La ubicación donde se seca este conjugado enzimático puede variar; puede ser aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de la muestra. En realizaciones con un compresor de muestras, el conjugado enzimático podría estar, como alternativa, sobre el compresor de muestras. El conjugado enzimático se seca, preferentemente, sobre la tira reactiva, pero no se inmoviliza. Puede estar ubicado en solitario o en combinación con otros componentes que forman el "sándwich" con el anticuerpo (que está, preferentemente, biotinilado).

Una realización de un detector con enzima conjugada/unida físicamente a un marcador detectable sobre el resto de apilamiento y un conjugado que se une al analito que no incluye un marcador detectable se muestra en la figura 18. La zona de control 46 incluye un primer socio de unión de control inmovilizado 110, similar al detector mostrado en la figura 14. La zona de prueba 45 incluye un primer socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 309 sobre una membrana. Un primer socio de unión al analito 302 conjugado a un segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 301 se seca o se incorpora de otra manera (por ejemplo, se liofiliza) en la zona de aplicación de la muestra 44. Aunque no se muestra en esta figura, el primer socio de unión al analito 302 podría estar, como alternativa, ubicado aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra 44. Una mezcla de un socio de unión 307 para el segundo socio de unión al analito 303 conjugado a una enzima 308 y el socio de unión 307 conjugado a un marcador detectable 315 (por ejemplo, perlas de látex) revestidas o conjugadas de otro modo a la enzima 308 está, preferentemente, embebido en la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. En otras realizaciones, solamente existe el socio de unión 307 conjugado al marcador detectable 315, que también se conjuga a la enzima 308 (por ejemplo, mediante la enzima que reviste las perlas de látex). Aunque el socio de unión 307 conjugado a la enzima y el socio de unión 307 conjugado al marcador detectable 315 revestido con la enzima se muestra sobre el compresor de muestras 30 en esta figura, estos componentes podrían estar, como alternativa, ubicados sobre la tira reactiva, solapándose con la zona de aplicación de la muestra 44 o estando ubicados aguas abajo o aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. La almohadilla 33 sobre el compresor de muestras 30 también está, preferentemente, embebida con un segundo socio de unión al analito 303. A diferencia de en las realizaciones anteriores, el segundo socio de unión al analito 303 no está conjugado a un marcador detectable o una enzima. En algunas realizaciones, el segundo socio de unión al analito 303 se mezcla, preferentemente, con el segundo socio de unión de control 105 conjugado al marcador detectable 106 (mostrada en la figura 14), que sirve como control.

Aunque la figura 18 muestra los diferentes reactivos en ciertas ubicaciones sobre la tira reactiva o el compresor de muestras 30, también son posibles otras ubicaciones para cada uno del primer socio de unión al analito 302 conjugado al segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 301, la mezcla del socio de unión 307 para el segundo socio de unión al analito 303 conjugado a una enzima 308 y el socio de unión 307 conjugado a un marcador detectable 315 revestido o conjugado de otro modo a la enzima 308, el segundo socio de unión al analito 303 y el segundo socio de unión de control 105 conjugado a un marcador detectable 106, sobre la tira reactiva y/o sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. Otras realizaciones no requieren un compresor de muestras 30. En estas realizaciones, los reactivos 301, 302, 303, 304, 105, 106, 307, 308 y 315 estarán ubicados en diversas ubicaciones, preferentemente aguas arriba de la zona de prueba 45, sobre la tira reactiva.

La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de la muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge preferentemente en tampón de migración durante aproximadamente 15-30 segundos antes de retirar el compresor de muestras 30. Las figuras 19A y 19B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si el analito 40 está presente en la muestra, se compleja con el primer socio de unión al analito 302 y el segundo socio de unión al analito 303. El segundo socio de unión al analito 303 también se compleja con el socio de unión 307.

Si el analito 40 no está presente en la muestra, el segundo socio de unión al analito 303 aún se compleja con el socio de unión 307, pero estos no se complejan con la muestra o el primer socio de unión al analito 302. El segundo socio de unión a la zona de prueba inmovilizado 301 se une al primer socio de unión a la zona de prueba 309 en la zona de prueba 45, independientemente de si el analito está o no presente en la muestra. Sin embargo, si no hay analito 40 presente, el complejo resultante no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si se forma una línea de prueba visible junto con la línea de control visible, el resultado indica niveles elevados de analito 40 en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea visible en la línea de prueba, entonces una gota de un sustrato enzimático se añade en la línea de prueba. Si la adición del sustrato enzimático da como resultado una línea de prueba visible, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea visible en la línea de control indica que el segundo socio de unión de control 105 conjugado al marcador detectable 106 se ha unido al primer socio de unión de control 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. El complejo de la línea de control se muestra en la figura 15C.

En esta realización, el socio de unión 307 se conjuga a la enzima 308, que también se conjuga al marcador detectable 315 (por ejemplo, perlas de látex), y un socio de unión adicional 307 se conjuga directamente al mismo marcador detectable 315. La enzima está unida físicamente al marcador detectable y se mueve con el marcador detectable. Por lo tanto, la especificidad y los problemas con el fondo mejoran. A niveles elevados de antígeno, un resultado positivo es fácilmente detectable de forma visible mediante una línea visible. A niveles muy bajos, el sustrato enzimático se añade a la ventana de resultados para conseguir una reacción de color amplificada por enzimas.

Depositando el socio de unión 307 y sus otros componentes (308 y 315) sobre el compresor de muestras, estos reactivos no están sobre la tira. En algunas realizaciones preferidas, el segundo socio de unión al analito 303 puede

mezclarse previamente con el socio de unión 307 (con o sin el socio de unión marcado con enzimas 307) y embeberse en la almohadilla del compresor de muestras. En estas realizaciones, el dispositivo incluye socios de unión tales como biotina y avidina. Esto convierte a la tira reactiva en un ensayo de unión y no un inmunoensayo.

5 Como ejemplo, un detector del virus del herpes simple (VHS) incluye las siguientes secciones, tal como se muestra en la figura 18. La zona de control 46 incluye anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo inmovilizado 110, similar al detector mostrado en la figura 14. La zona de prueba 45 incluye NeutrAvidina inmovilizada 309 sobre una membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS-1 y/o VHS-2 302 se seca sobre la zona de aplicación de la muestra 44. Aunque no se muestra en esta figura, el anticuerpo anti-VHS-1/VHS-2 302 podría estar  
10 ubicado, como alternativa, aguas arriba o aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra. Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (H&L) 307 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) 308 más anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a perlas de látex rojas 315 revestidas con peroxidasa de rábano picante está preferentemente embebido en la almohadilla 33 del compresor de muestras. En otras realizaciones, solamente hay  
15 anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a perlas de látex rojas 315 revestidas con peroxidasa de rábano picante. Como alternativa, el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a peroxidasa de rábano picante 308 más anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a perlas de látex rojas revestidas con peroxidasa de rábano picante 308 podrían estar ubicados sobre la tira reactiva, solapándose con la zona de aplicación de la muestra 44 o estando ubicados aguas abajo o aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44. La almohadilla sobre el compresor de muestras 30 también está, preferentemente, embebida con anticuerpo  
20 monoclonal de ratón anti-gD 1&2 libre 303. A diferencia de en la realizaciones anteriores, los anticuerpos monoclonales de ratón libres 303 no están conjugados a un marcador detectable o una enzima. Los anticuerpos monoclonales de ratón libres 303 se mezclan preferentemente con IgY de pollo 105 conjugada a perlas de látex teñidas de azul (mostradas en la figura 14), que sirve como control.

25 La muestra se toma sobre un hisopo de la muestra 35, que se coloca a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44 a través de la ventana de la muestra 81 (en realizaciones con una carcasa y una ventana de la muestra) o justo sobre la zona de aplicación de la muestra 44. El compresor de muestras 30 es comprimido a continuación sobre la zona de aplicación de la muestra 44. La punta absorbente del compresor de muestras 30 se sumerge, preferentemente, en tampón de migración durante aproximadamente 15-30 segundos antes de retirar el  
30 compresor de muestras 30. Las figuras 19A y 19B muestran los diferentes complejos que se forman entre los reactivos de prueba y el analito. Si VHS (el analito 40) está presente en la muestra, se compleja con el anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS1/2 302 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1 & 2 303, que se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado con HRP 308 y el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307 conjugado a perlas de látex rojas 315 revestidas con peroxidasa de rábano picante.

35 Si VHS no está presente en la muestra, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD1&2 303 aún se compleja con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón 307, pero estos no se complejan con la muestra o el anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS1/2 302. El anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS1/2 202 se unirá a neutravidina 309 en la zona de prueba 45, independientemente de si VHS está o no presente en la muestra. Sin embargo, si no hay VHS presente, el anticuerpo biotinilado 301 policlonal anti-VHS 1/2 302 no será visible en la línea de prueba. El resultado se lee visualmente en aproximadamente diez minutos. Si una línea de prueba roja visible se forma junto con la línea de control azul, el resultado indica niveles elevados de VHS en la muestra. Si, al cabo de 10 minutos, no hay ninguna línea roja visible en la línea de prueba, entonces una gota del sustrato enzimático TMBM (u otro sustrato para peroxidasa de rábano picante) se añade en la línea de prueba. Si la adición del TMBM da como  
40 resultado una línea de prueba azul/púrpura, el resultado indica una muestra positiva débil. Una línea azul en la línea de control indica que la IgY de pollo 105 conjugada a las perlas de látex teñidas de azul 106 se ha unido al anticuerpo de conejo anti-IgY de pollo 110 en la zona de control 46 y que la prueba se ha realizado correctamente. El complejo de la línea de control se muestra en la figura 15C.

50 En este ejemplo, el anticuerpo de conejo anti-ratón se conjuga a la enzima, que también se conjuga a las perlas de látex rojas, y el anticuerpo de conejo anti-ratón adicional se conjuga directamente a las mismas perlas. La enzima está unida físicamente a las perlas y se mueve con las perlas. Por lo tanto, la especificidad y los problemas con el fondo mejoran. A niveles elevados de antígeno, un resultado positivo es fácilmente detectable de forma visible mediante una línea roja. A niveles muy bajos, el sustrato enzimático se añade a la ventana de resultados para conseguir una reacción de color amplificada por enzimas.

60 Depositando el anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a las perlas rojas (junto con el conjugado enzimático sobre la misma perla) sobre el compresor de muestras, estos reactivos no están sobre la tira. En algunas realizaciones preferidas, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD 1&2 libre puede mezclarse previamente con el anticuerpo de conejo anti-ratón (con o sin el anticuerpo de conejo anti-ratón marcado con enzimas) y embeberse en la almohadilla del compresor de muestras. En estas realizaciones, el dispositivo incluye socios de unión tales como biotina y avidina. Esto convierte a la tira reactiva en un ensayo de unión y no un inmunoensayo.

65 En algunas realizaciones preferidas, la nitrocelulosa está "bloqueada" con bloqueantes, lo que incrementa la especificidad de la reacción. Algunos ejemplos para bloqueantes incluyen, aunque sin limitarse a, caseína y albúmina de suero bovino (BSA). En cuanto se bloquea la membrana de nitrocelulosa, la carga inherente de la

nitrocelulosa se neutraliza y, por lo tanto, ninguna proteína adicional puede unirse a la membrana bloqueada. Además, la estructura cromatográfica se cambia y el flujo es más como un flujo deslizante o resbaladizo en lugar de cromatografía tradicional. El resultado es un proceso de cromofiltografía único.

5 La figura 21A muestra otra realización de una tira reactiva de flujo lateral con elementos intensificadores. Esta realización preferentemente incluye un socio de unión marcado 407 que es específico para una especie en lugar de un analito 40. Como ejemplo, cuando el socio de unión 402 para el analito es un anticuerpo de ratón, el socio de unión específico de especie marcado 407 es un anticuerpo anti-ratón. Como otro ejemplo, cuando el socio de unión 402 para el analito es un anticuerpo de conejo, el socio de unión específico de especie marcado 407 es un anticuerpo anti-conejo. Los expertos en la materia entenderían que cualquier socio de unión específico de especie 407, u otro socio de unión no específico para el analito 40 pero específico para un socio de unión 402 para el analito, podría usarse en esta realización. Los expertos en la materia también sabrían cómo seleccionar especies para minimizar reacciones cruzadas.

15 La zona de aplicación de la muestra 44 incluye un primer socio de unión 402 para el analito 40. Nótese que el primer socio de unión 402 no incluye un marcador detectable. En esta realización, parte del primer socio de unión 402 está preferentemente marcada 401 y un socio de unión 409 para la marca 401 está preferentemente marcado con un marcador detectable. En realizaciones preferidas, la cantidad del primer socio de unión 402 que está marcado 401 es del 1-10 % de la cantidad total del primer socio de unión 402 en la prueba.

20 La zona de aplicación de la muestra 44 también incluye un socio de unión específico de especie marcado 407 (conjugado a un marcador detectable 417) que se une al primer socio de unión 402 debido a la especie del primer socio de unión 402. La zona de aplicación de la muestra 44 también incluye, preferentemente, un socio de unión de control 405 marcado 415. Aunque el primer socio de unión 402 para el analito 40, el conjugado que incluye un marcador visible 417 y un socio de unión específico de especie 407, y el conjugado de control 405 conjugado a un marcador visible 415 se muestran en la zona de aplicación de la muestra 44 en esta figura, cualquier combinación de estos elementos puede estar ubicada en otras ubicaciones sobre la tira reactiva (aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de la muestra) o sobre un compresor de muestras 30, tal como se ha descrito en realizaciones anteriores.

30 La zona de prueba 45 incluye un segundo socio de unión inmovilizado 427 para el analito 40. La zona de control 46 incluye un socio de unión inmovilizado 420 para el socio de unión de control 405. La zona de prueba 45 y la zona de control 46 están, preferentemente, ubicadas sobre una membrana de nitrocelulosa.

35 Cuando una muestra que incluye analito 40 se añade a la tira reactiva, el primer socio de unión 402 se une al analito 40 y forma "medio sándwich". Esto se produce preferentemente sin flujo sobre la tira reactiva. Cuando se aplica tampón de migración, éste moviliza el "medio sándwich". El tampón de migración también moviliza al socio de unión específico de especie 407. Durante el flujo, el socio de unión específico de especie 407 interactúa con y se une al primer socio de unión 402 en el medio sándwich. Debido a múltiples sitios de unión sobre el primer socio de unión 402, existe un efecto de agregación o apilamiento que intensifica la detección del analito 40. En la zona de prueba 45, el analito 40, que es ahora parte de un complejo agregado o apilado, se une al segundo socio de unión inmovilizado 427 para formar el sándwich completo. El resultado es una señal visible intensificada formada en la zona de prueba 45. La unión entre el socio de unión de control 405 y el socio de unión de control inmovilizado 420 da como resultado una señal detectable 415.

45 En presencia del analito 40, la señal detectable 417 conjugada al socio de unión específico de especie 407 es parte del complejo y debe ser visible. Si una línea de prueba visible es "leída" por el usuario, la prueba es registrada como un resultado positivo para la presencia del analito 40. Si la línea de prueba no es visible o es equívoca, entonces una o más gotas de un fluido que incluye un socio de unión a una marca 409 para la marca 401 conjugado a un marcador detectable (por ejemplo, oro coloidal o perlas de látex) se añaden en la zona de prueba 45. El socio de unión a una marca 409 se une instantáneamente a la marca 401 sobre el primer socio de unión 402. Esto intensifica en gran medida la visibilidad de la línea de prueba en presencia del analito 40. En ausencia del analito, el socio de unión a una marca 409 se disipa y no hay ninguna línea de prueba visible.

55 La figura 21B muestra un complejo apilado en la línea de prueba cuando el analito 40 está presente en la muestra. La figura 21C muestra el complejo apilado con la adición de las marcas 401 y 409.

60 En un ejemplo de la realización mostrada en las figuras 21A a 21C para detectar el virus del herpes simple (VHS), la zona de aplicación de la muestra 44 incluye anticuerpo para gD 1&2 de VHS de ratón libre 402 (que se une a VHS), así como algo de anticuerpo para gD1&2 de VHS de ratón 402 biotinilado 401. En una realización preferida, aproximadamente 1-10 % del anticuerpo para gD1&2 de VHS libre 402 está biotinilado 401.

65 La zona de aplicación de la muestra 44 también incluye anticuerpo de conejo anti-ratón 407 conjugado a perlas de látex rojas 417 y un anticuerpo para IgY de pollo de control 405 conjugado a perlas de látex azules 415. Nótese que el anticuerpo de conejo anti-ratón 407 no es específico para un analito 40. En su lugar, se une específicamente al anticuerpo para gD1&2 de VHS de ratón 402. Tal como se ha descrito anteriormente, cualquiera del anticuerpo para

gD1&2 de VHS 402, el anticuerpo para gD1&2 de VHS 402 biotinilado 401, el anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a las perlas de látex rojas, el anticuerpo para IgY de pollo conjugado a perlas de látex azules, o cualquier combinación de estos elementos, puede estar, como alternativa, aguas arriba, aguas abajo o solapándose con la zona de aplicación de la muestra 44, o estar incluido sobre un compresor de muestras 30 en realizaciones donde se usa un compresor de muestras 30. La zona de prueba 45 incluye anticuerpo de conejo anti-VHS inmovilizado 427, que se une al analito VHS 40 cuando está presente en la muestra. La zona de control 46 incluye anticuerpo de conejo anti-IgG de pollo/conejo inmovilizado 420. La zona de prueba 45 y la zona de control 46 están ubicadas, preferentemente, sobre una membrana de nitrocelulosa.

Cuando una muestra que incluye el analito 40 se añade a la tira reactiva, el anticuerpo para gD1&2 de VHS 402 se une al analito VHS 40 y forma "medio sándwich". Esto se produce sin flujo sobre la tira reactiva. Cuando se aplica tampón de migración, moviliza el "medio sándwich". El tampón de migración también moviliza el anticuerpo de conejo anti-ratón 407. Durante el flujo, el anticuerpo de conejo anti-ratón 407 interactúa con y se une al anticuerpo para gD1&2 de VHS 402 en el medio sándwich. Debido a múltiples sitios de unión sobre el anticuerpo de ratón 402, existe un efecto de agregación o apilamiento que intensifica la detección del analito 40. En la zona de prueba 45, el analito complejo agregado o apilado 40, que es ahora parte de un complejo agregado o apilado, se une al anticuerpo de conejo anti-VHS inmovilizado 427 para formar el sándwich completo. El resultado es una señal visible intensificada que se forma en la zona de prueba 45. La unión se produce entre el conjugado a IgY de pollo de control 405 y el anticuerpo de conejo anti-IgG de pollo/conejo inmovilizado 420, dando como resultado un marcador detectable azul 415.

En presencia del analito 40, las perlas de látex rojas 417 conjugadas al anticuerpo de conejo anti-ratón 407 son parte del complejo y deben ser visibles. Si una línea de prueba visible es "leída" por el usuario, la prueba se registra como un resultado positivo para la presencia del analito 40. Si la línea de prueba no es visible o es equívoca, entonces una gota de avidina, neutravidina o estreptavidina conjugada 409 a oro coloidal o perlas de látex se añade en la zona de prueba 45. El conjugado de avidina, neutravidina o estreptavidina 409 se une instantáneamente a la biotina 401 sobre el anticuerpo para gD1&2 de VHS 402. Esto intensifica en gran medida la visibilidad de la línea de prueba en presencia del analito 40. En ausencia del analito, el conjugado a avidina, estreptavidina o neutravidina 409 se disipa y no hay ninguna línea de prueba visible.

En algunas realizaciones, en lugar de una membrana de nitrocelulosa, pueden usarse membranas tales como de nylon o poliéster que son neutras. En estas realizaciones, las proteínas tales como neutravidina, anticuerpos y antígenos no están inmovilizadas directamente. En su lugar, están conjugadas a microesferas que se "depositan" en la membrana y se mantienen en sus grietas. Aunque se muestra el uso de una membrana neutra con respecto a esta realización particular, podrían usarse, como alternativa, membranas neutras y microesferas depositadas sobre esas membranas, en otras realizaciones de la presente divulgación

La figura 13 muestra algunas ubicaciones preferidas de materiales de intensificación de señales tanto para intensificación con plata como apilamiento en realizaciones de dispositivos de flujo lateral de la presente divulgación. La figura 13 muestra esquemáticamente dos opciones para la ubicación de la zona de detección, y en la figura se muestran solamente los elementos específicos para la intensificación de señales.

En realizaciones con intensificación con plata, la sal de plata 70 está ubicada preferentemente en una zona 90 entre la zona de aplicación de la muestra 44 y la zona de prueba 45 para permitir que al menos parte del sándwich se forme antes de la unión a la sal de plata. Como alternativa, la sal de plata 70 puede colocarse sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, en la zona de aplicación de la muestra 44, en una zona 92 aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44, en el tampón de migración 43 o directamente sobre la zona de prueba 45 después de que el ensayo se ha realizado. En algunas realizaciones, el revelador de plata 71 también está ubicado en la zona 90 entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de prueba. En otras realizaciones, el revelador de plata 71 está ubicado en la zona 92 aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44, en el tampón de migración 43, sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, o directamente sobre la zona de prueba 45 después de que el ensayo se ha realizado.

En realizaciones con apilamiento, el primer conjugado 72 puede estar ubicado sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30, en la zona de aplicación de la muestra 44, en una zona 92 aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra 44, o en una zona 90 aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra. Como alternativa, el primer conjugado 72 puede mezclarse previamente con la muestra antes de la aplicación a la zona de aplicación de la muestra; en esta realización, el medio sándwich se forma fuera del dispositivo de ensayo. El segundo conjugado 74 está ubicado, preferentemente, en una zona 92 aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra. Como alternativa, el segundo conjugado 74 puede estar ubicado sobre la almohadilla 33 del compresor de muestras 30. Como alternativa, el segundo conjugado 74 puede estar en una ubicación donde puede retardarse su alcance del primer conjugado 72, incluyendo, aunque sin limitarse a, aguas arriba de la zona de aplicación de la muestra, aguas arriba del conjugado o añadirse en un momento después de que el ensayo ha comenzado, tal como en el tampón de migración o directamente en la zona de prueba. Aunque no se prefiere, cualquiera o ambos del primer conjugado 72 o el segundo conjugado 74 podrían estar, como alternativa, ubicados en el tampón de migración 43 (no mostrado).

5 Aunque los métodos y dispositivos se describen en el presente documento como ensayos en sándwich, los métodos y dispositivos de la presente invención pueden usarse igualmente en ensayos competitivos. En estos ensayos competitivos, el conjugado preferentemente incluye un analito o un análogo del analito, en lugar de un socio de unión del analito, unido a un marcador o, como alternativa, el segundo socio de unión se sustituye por el analito o análogo del analito. Un resultado positivo es indicado entonces por la falta o la presencia del marcador en la zona de prueba de la tira reactiva.

10 Por consiguiente, debe entenderse que las realizaciones de la invención descrita en el presente documento son meramente ilustrativas de la aplicación de los principios de la invención. La referencia en el presente documento a detalles de las realizaciones ilustradas no pretende limitar el alcance de las reivindicaciones que, a su vez, refieren aquellas características consideradas esenciales para la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo de flujo lateral para detectar un analito en una muestra, que comprende:
  - 5 un compresor de muestras que comprende una almohadilla compresible; un elemento de hisopo para la recogida de la muestra; una tira reactiva cromatográfica de flujo lateral que comprende una zona de aplicación de la muestra y una zona de prueba lateralmente aguas abajo de la zona de aplicación de la muestra; un conjugado que comprende un primer socio de unión para el analito y un marcador;
  - 10 un segundo socio de unión para el analito; un primer socio de unión de control ubicado sobre la almohadilla compresible del compresor de muestras; y comprendiendo además la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral una zona de control que comprende un segundo socio de unión de control inmovilizado en la zona de control, en donde el primer socio de unión de control es un socio de unión para el segundo socio de unión de control;
  - 15 en donde el compresor de muestras, el elemento de hisopo y la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral forman una pila vertical para aplicar la muestra a la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral por compresión; y en donde el elemento de hisopo está ubicado entre el compresor de muestras y la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral en la pila vertical.
- 20 2. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 1, en el que el conjugado, el segundo socio de unión o tanto el conjugado como el segundo socio de unión están ubicados sobre la almohadilla compresible del compresor de muestras antes del uso del dispositivo de flujo lateral.
- 25 3. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 2, en el que el conjugado está ubicado sobre la almohadilla compresible y el segundo socio de unión está ubicado sobre un medio externo.
4. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 2, en el que el segundo socio de unión está ubicado sobre la almohadilla compresible y el conjugado está ubicado sobre un medio externo.
- 30 5. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 1, en donde el dispositivo de flujo lateral está formado de modo que un resultado positivo se consigue solamente mediante la captura del analito en la zona de prueba a través de la formación de un complejo entre el analito, el primer socio de unión y el segundo socio de unión.
- 35 6. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 1, en el que la zona de prueba no comprende ninguna molécula que se une específicamente al analito.
7. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 1, en el que el segundo socio de unión comprende una marca y la zona de prueba comprende un socio de unión inmovilizado de la marca.
- 40 8. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 1, que comprende además una carcasa que rodea a al menos una parte de la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, en el que una parte giratoria de la carcasa forma el compresor de muestras.
- 45 9. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 1, que comprende además una carcasa que rodea a al menos una parte de la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral, en el que un cartucho insertable forma el compresor de muestras.
- 50 10. Un método de aplicación de una muestra a una tira reactiva cromatográfica de flujo lateral de un dispositivo de flujo lateral, comprendiendo el método las etapas de:
  - a) colocar un elemento de hisopo que incluye una muestra recogida en una pila vertical entre un compresor de muestras que comprende una almohadilla compresible y una zona de aplicación de la muestra de la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral; y
  - 55 b) aplicar una presión al elemento de hisopo usando el compresor de muestras para transferir al menos una parte de la muestra recogida a la zona de aplicación de la muestra;
- en el que un primer socio de unión de control está ubicado sobre la almohadilla compresible del compresor de muestras; y
- 60 en el que una zona de control sobre la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral comprende un segundo socio de unión de control inmovilizado en la zona de control, en donde el primer socio de unión de control es un socio de unión para el segundo socio de unión de control.
- 65 11. El método de la reivindicación 10, en el que la almohadilla compresible del compresor de muestras comprende, además, un componente seleccionado entre el grupo constituido por un primer socio de unión para el analito, un segundo socio de unión para el analito y tanto el primer socio de unión para el analito como el segundo socio de unión para el analito.

12. El método de la reivindicación 10, en el que el elemento de hisopo suministra la muestra de forma pasiva por contacto o a través de presión sobre la tira reactiva cromatográfica de flujo lateral antes de aplicar el compresor de muestras a la pila vertical.

5 13. El método de la reivindicación 10, en el que la etapa a) comprende, además, colocar una almohadilla con un socio de unión para un analito sobre la pila vertical y en el que, en la etapa b), al menos una parte del socio de unión es transferida a la zona de aplicación de la muestra.

10 14. El método de la reivindicación 10, en el que la etapa b) se produce sin flujo por capilaridad.

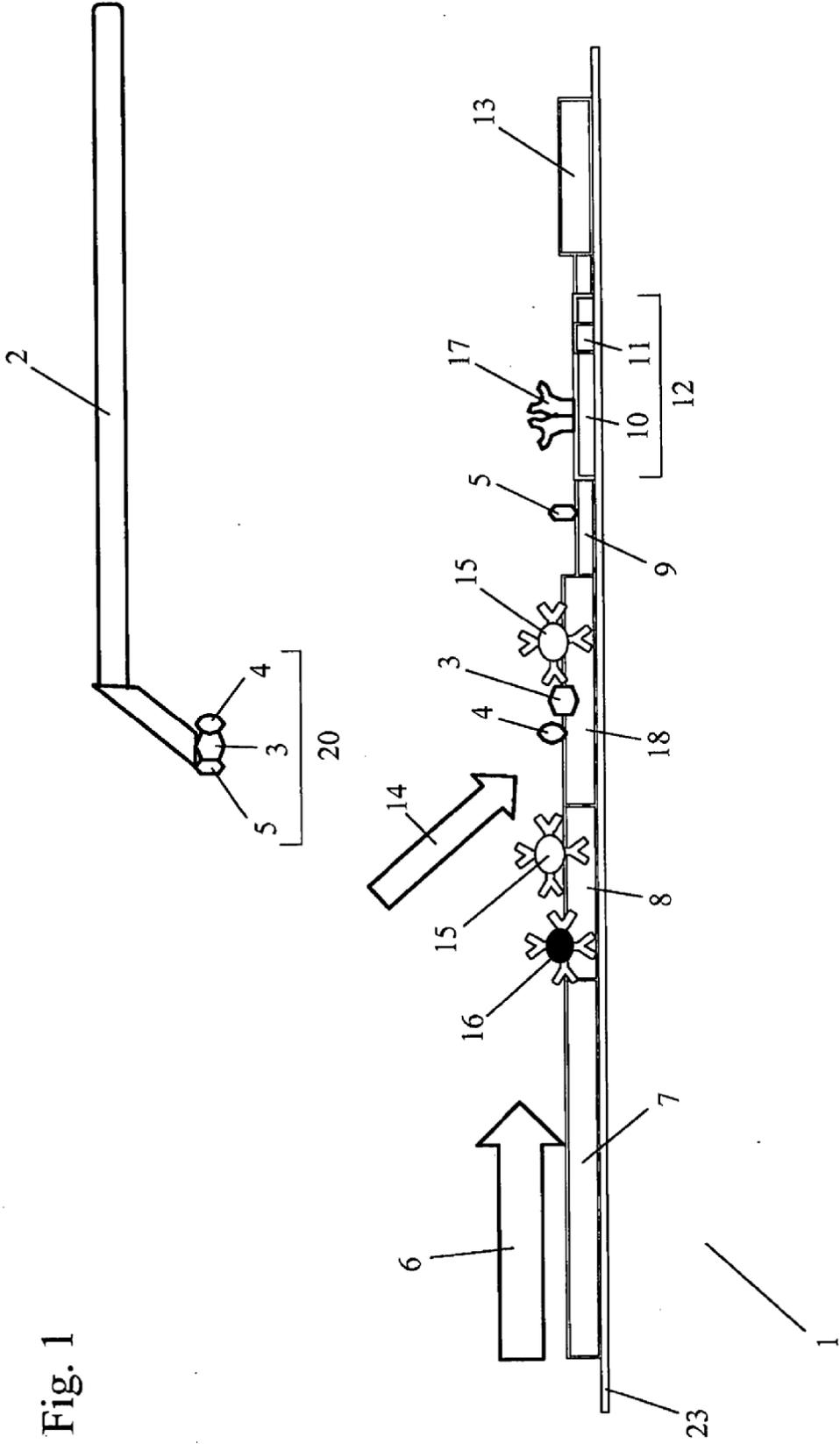


Fig. 1

Fig. 2A

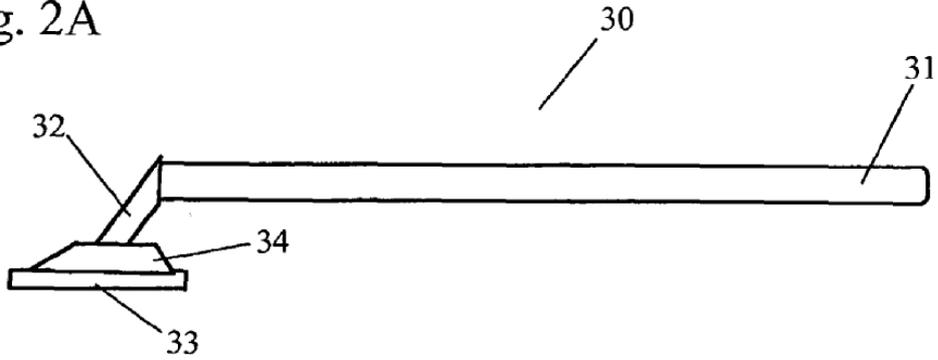


Fig. 2B

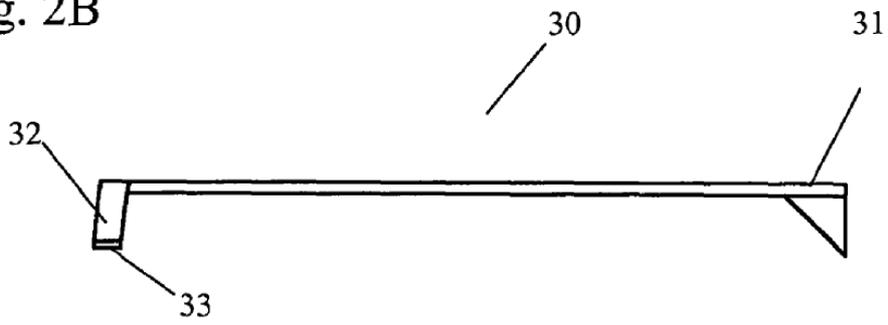


Fig. 2C

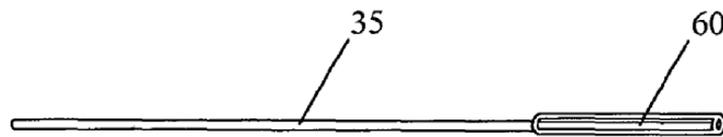


Fig. 3B

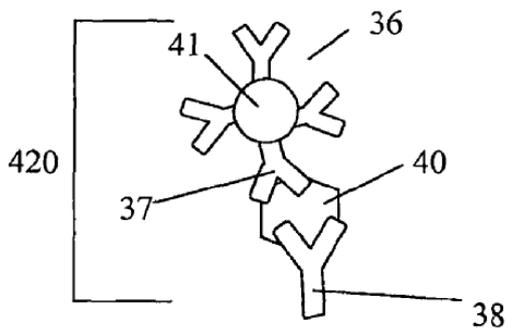


Fig. 4B

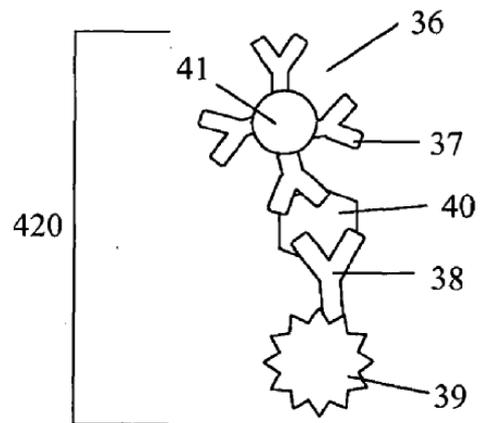


Fig. 3A

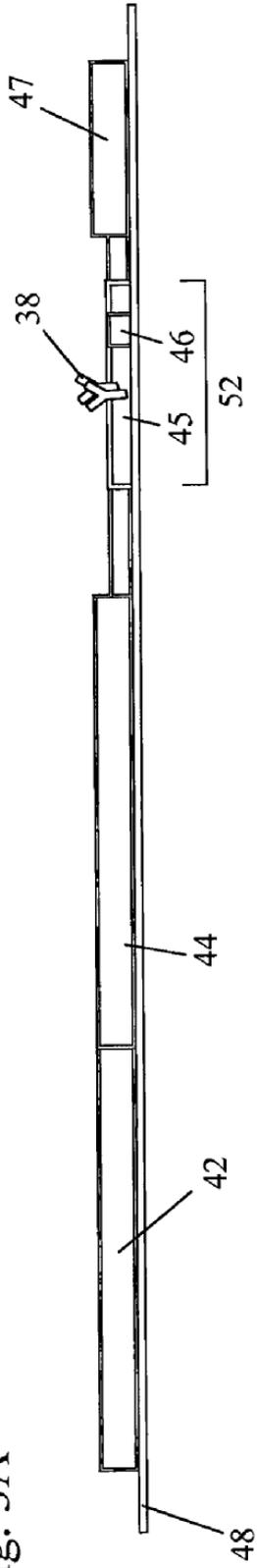


Fig. 3C

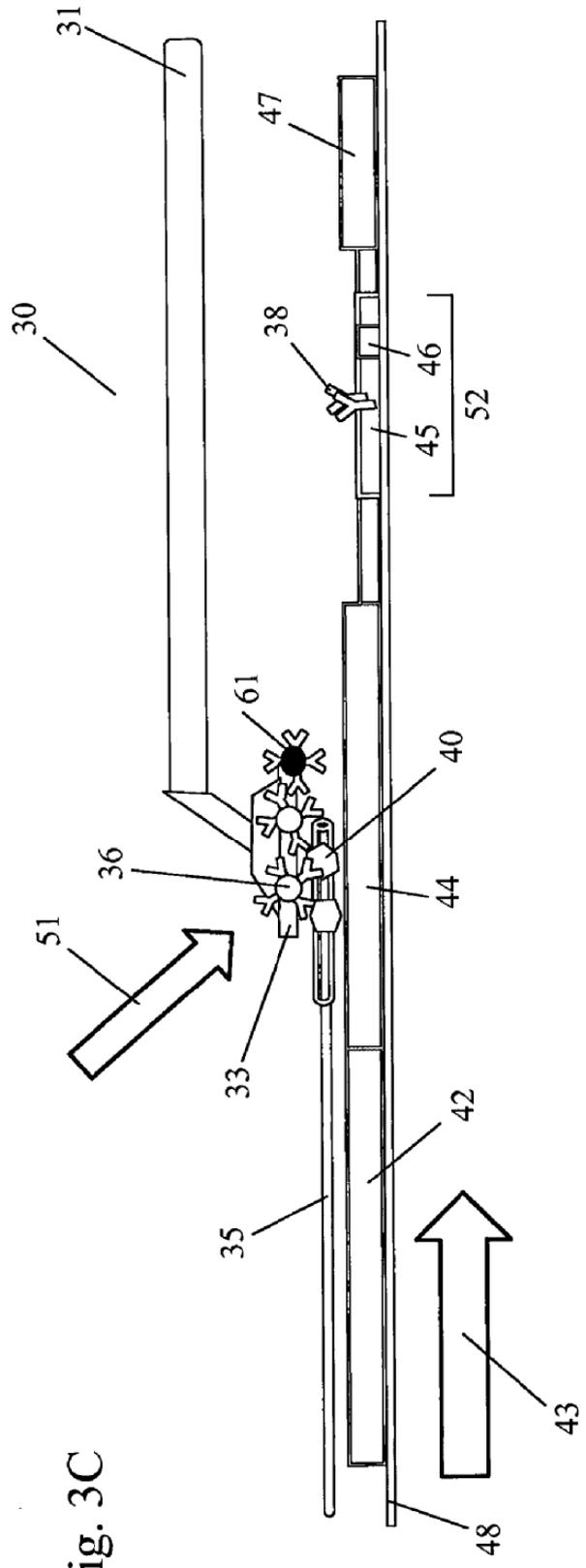


Fig. 4A

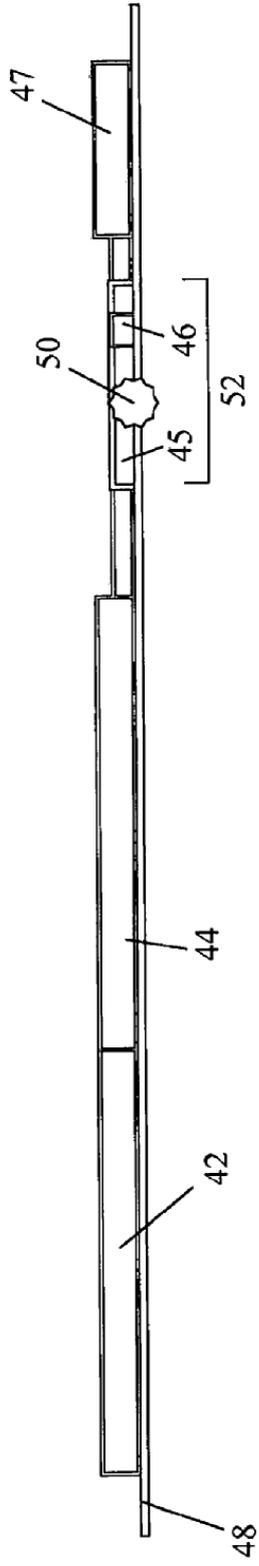


Fig. 4C

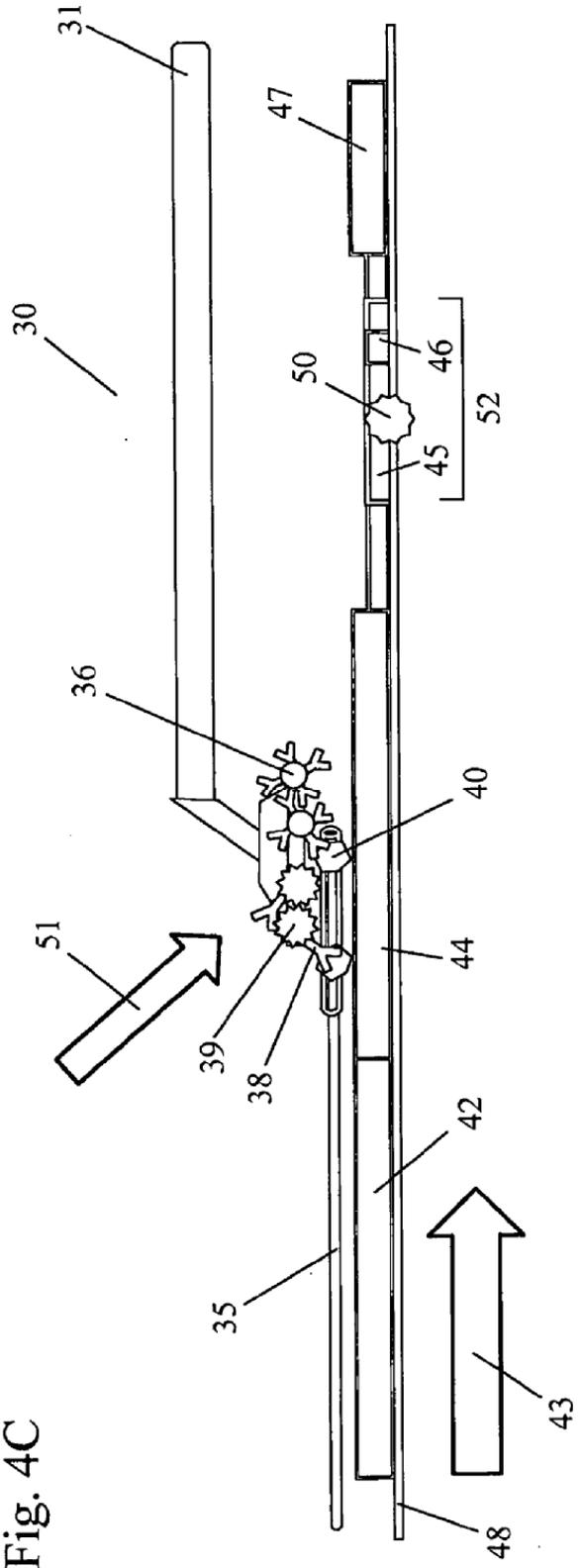


Fig. 5A

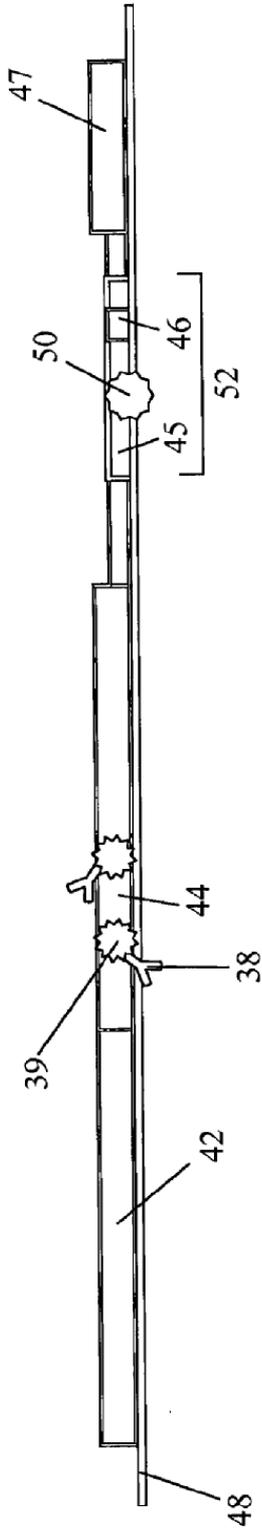


Fig. 5B

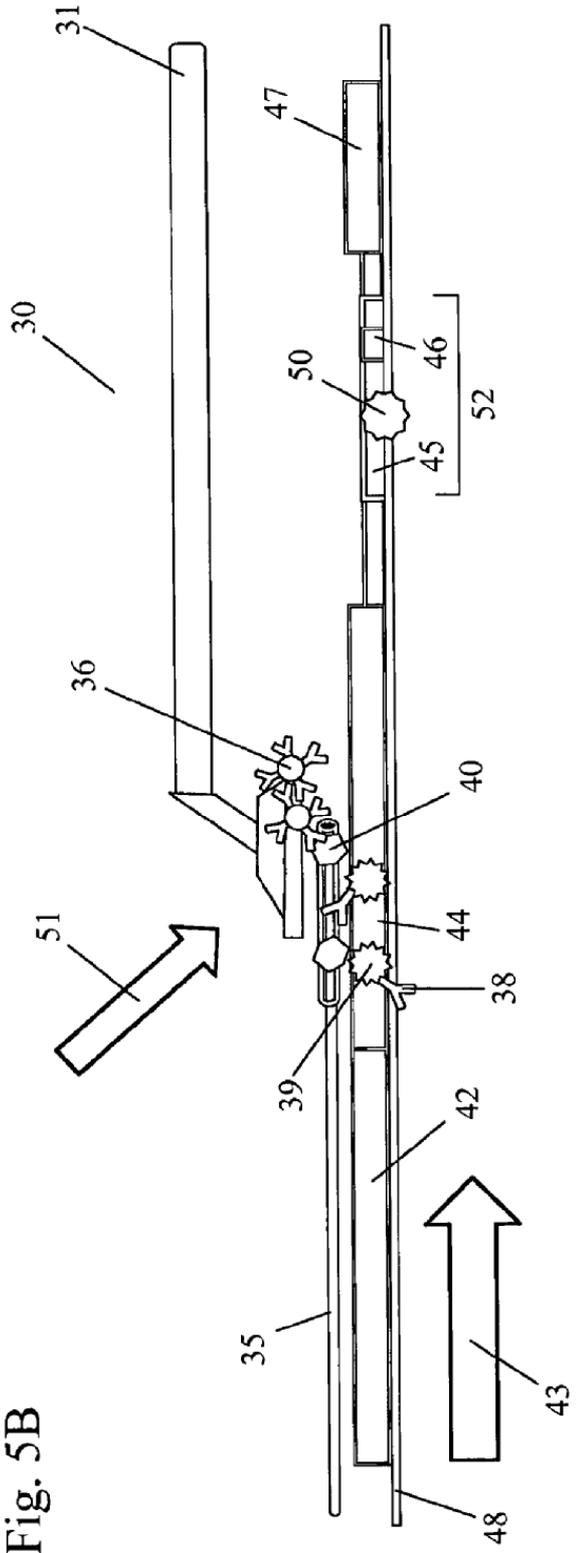


Fig. 6A

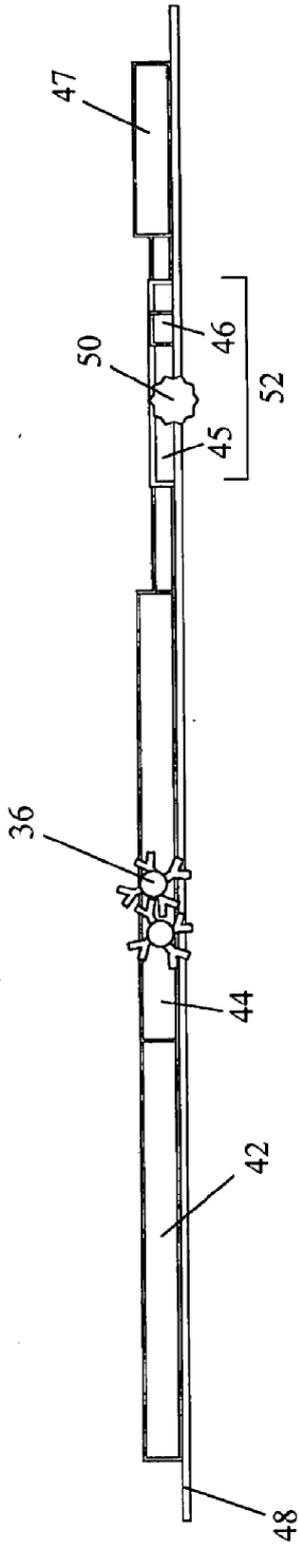
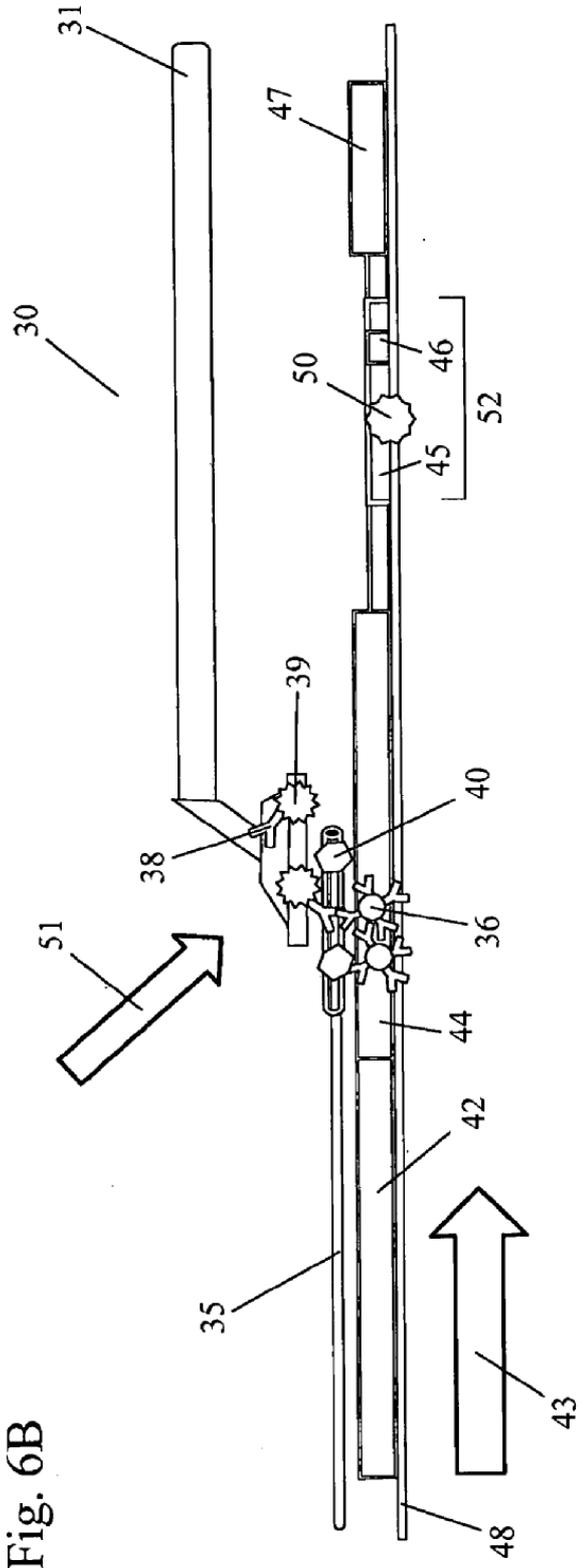
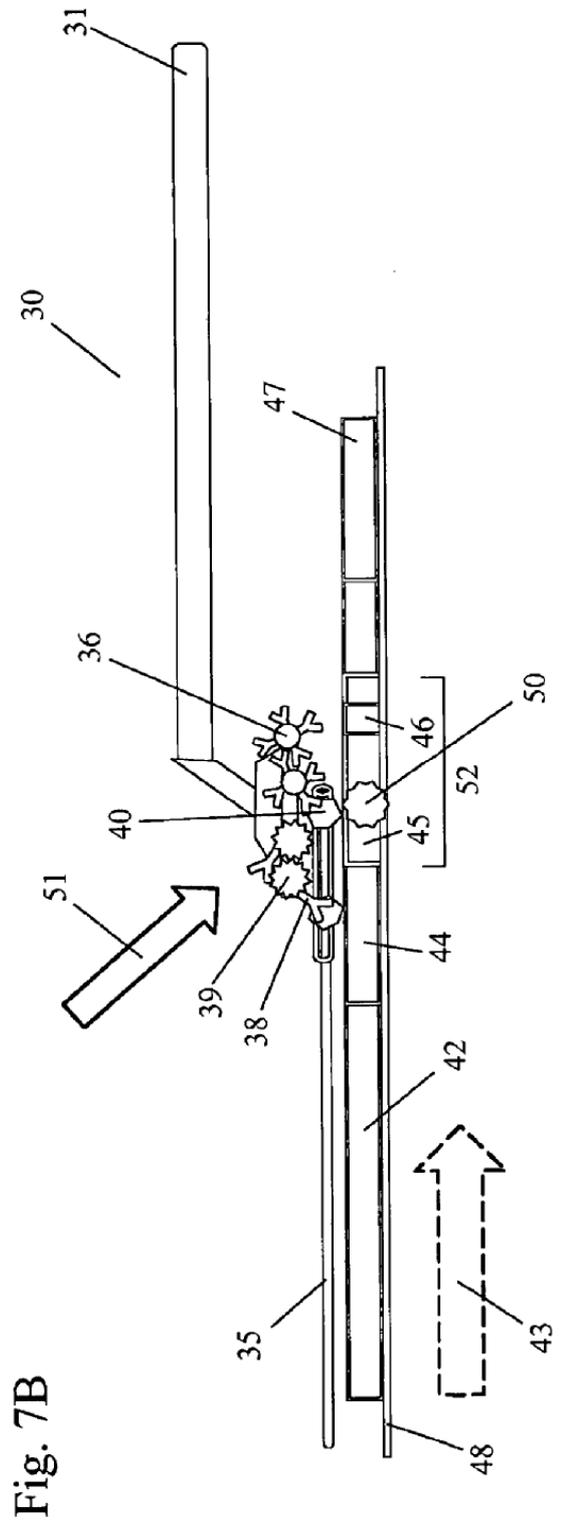
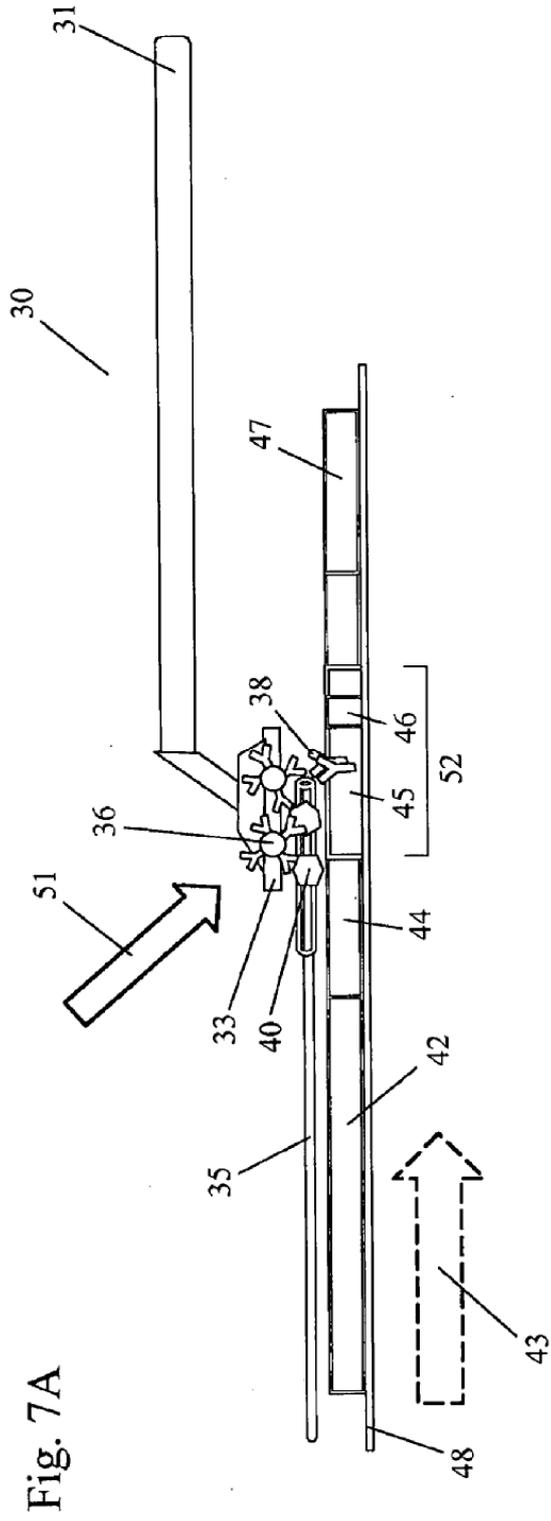


Fig. 6B





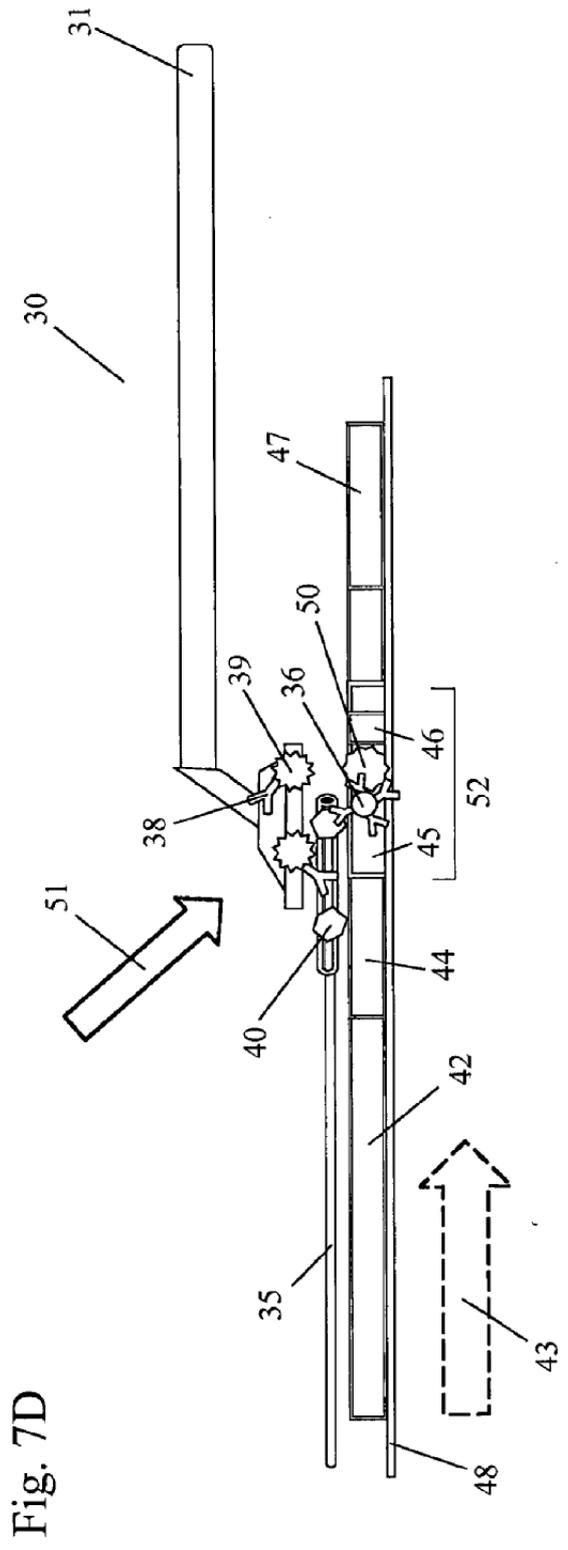
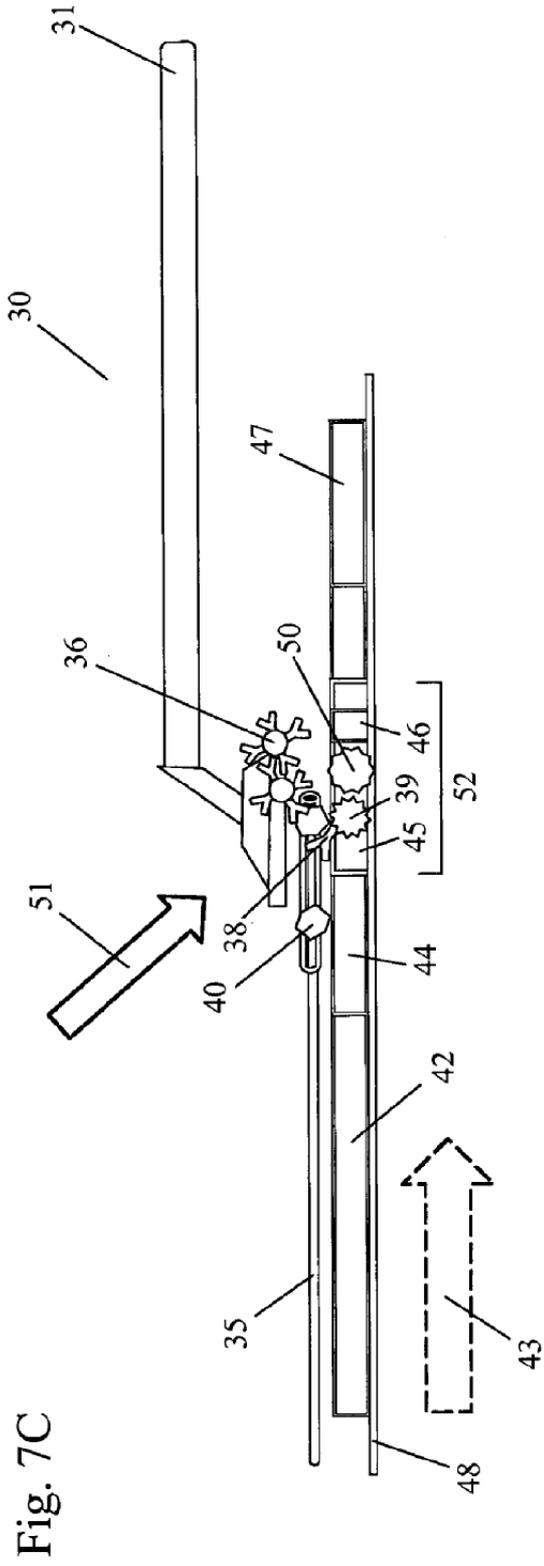


Fig. 8A

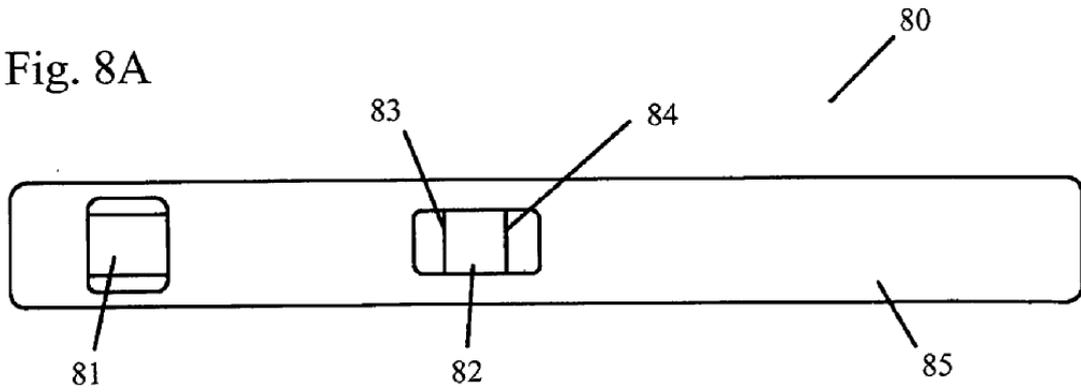


Fig. 8B

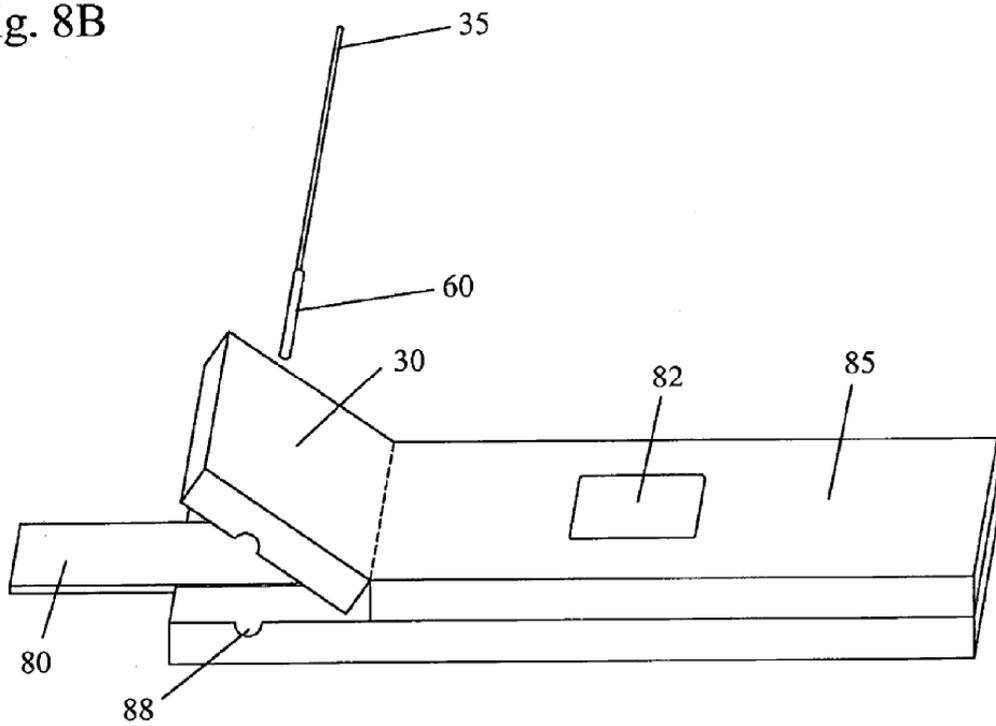


Fig. 9

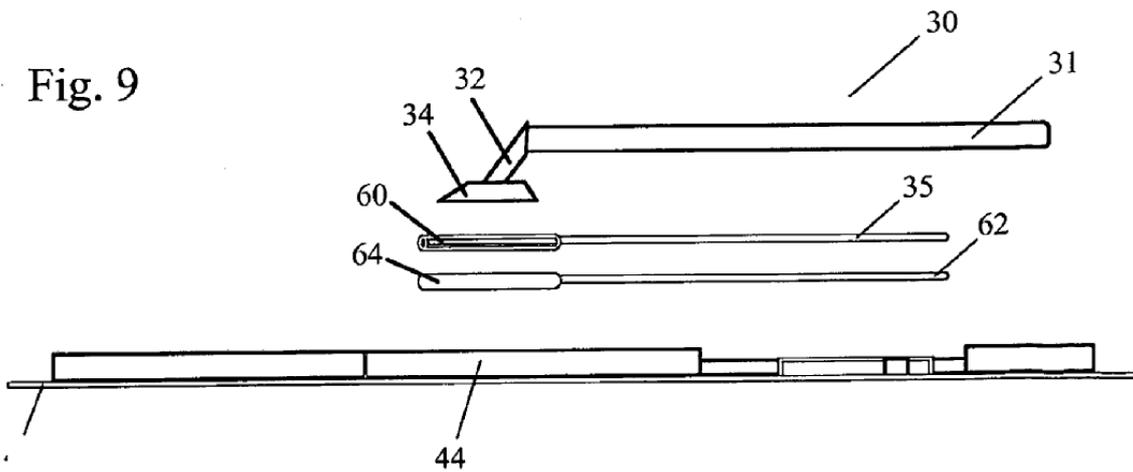


Fig. 10

TÉCNICA ANTERIOR

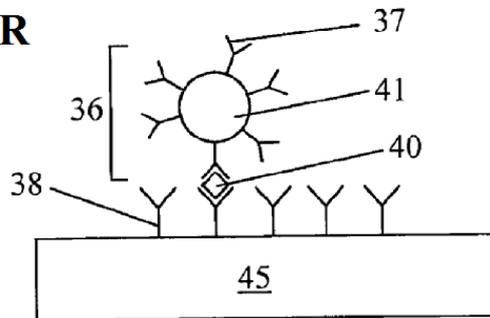


Fig. 11

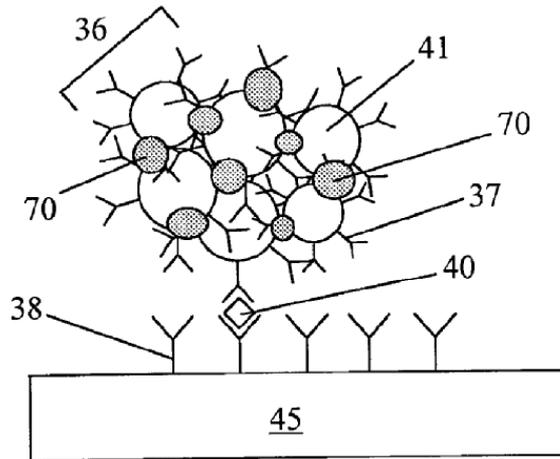
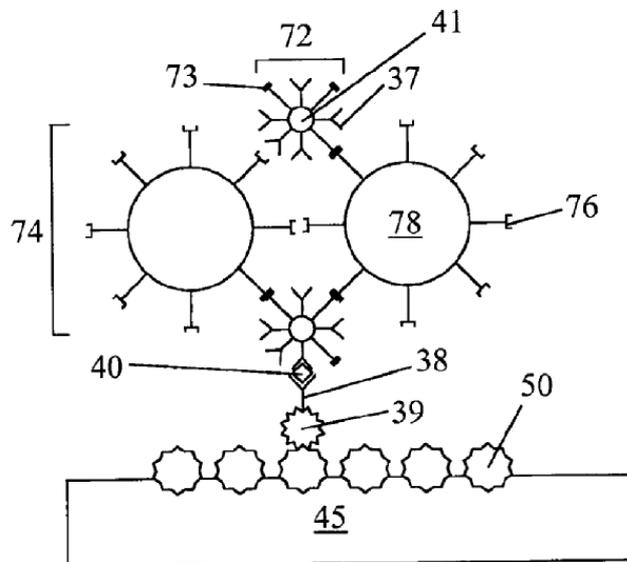


Fig. 12



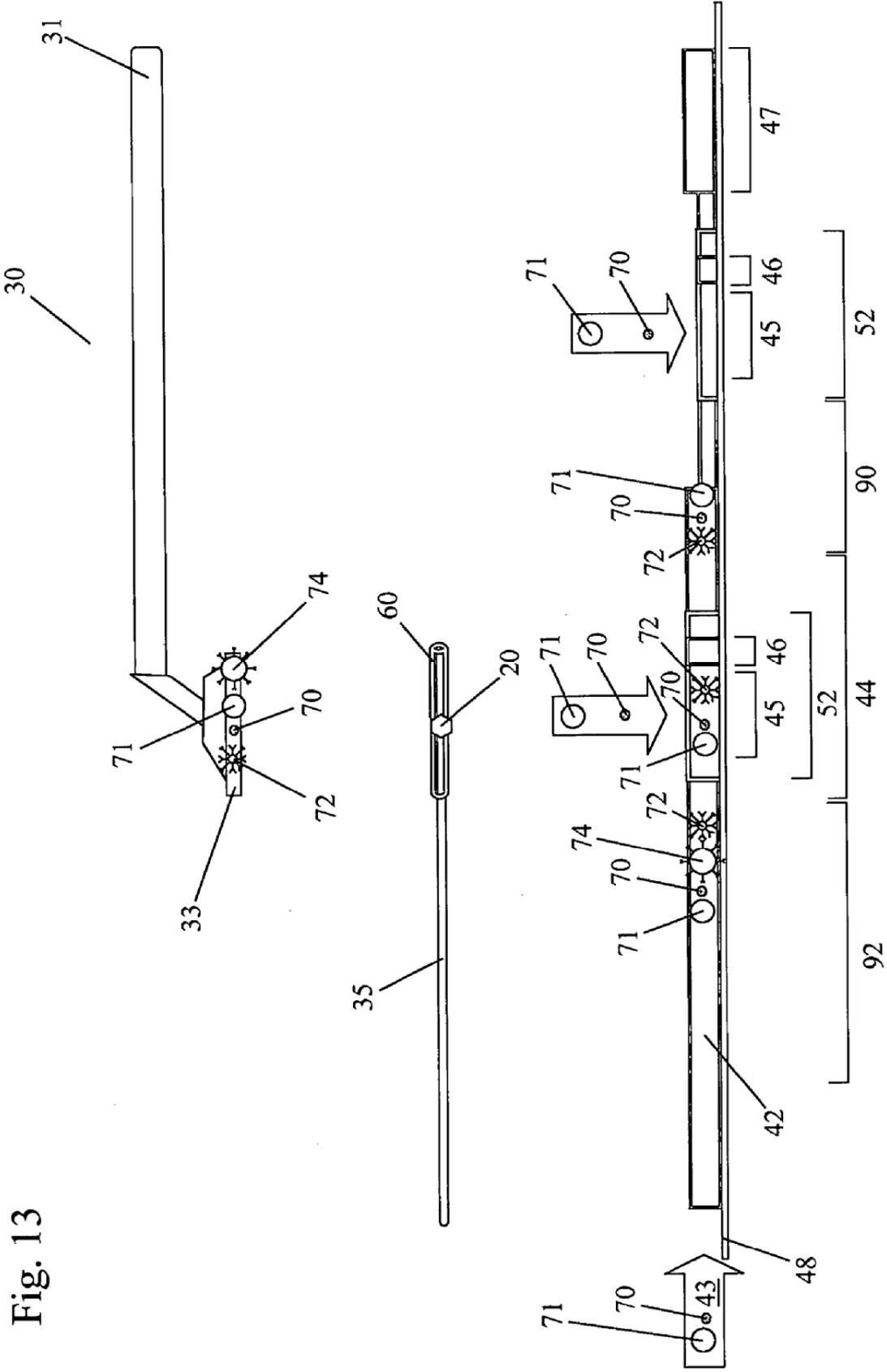


Fig. 13

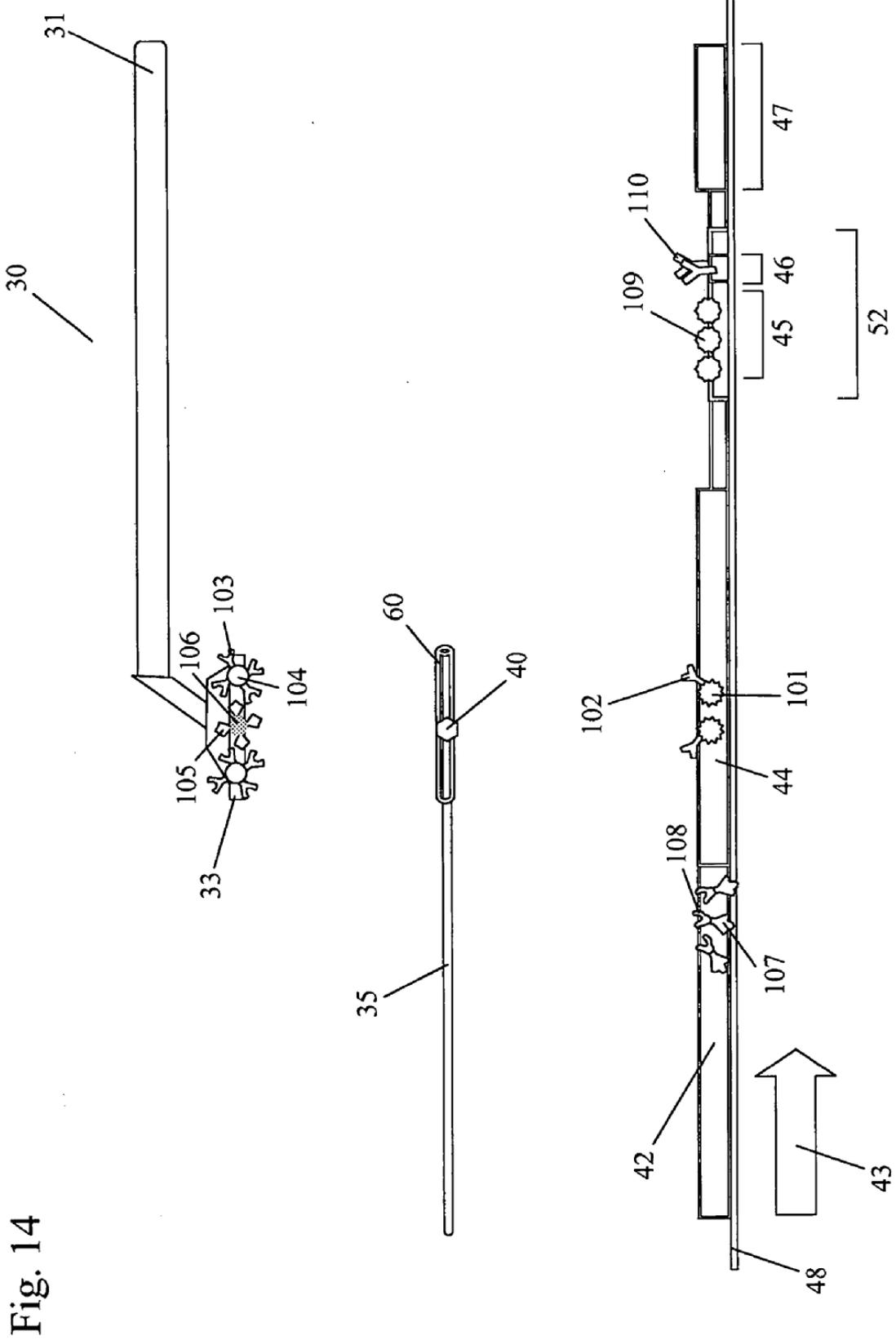


Fig. 15A

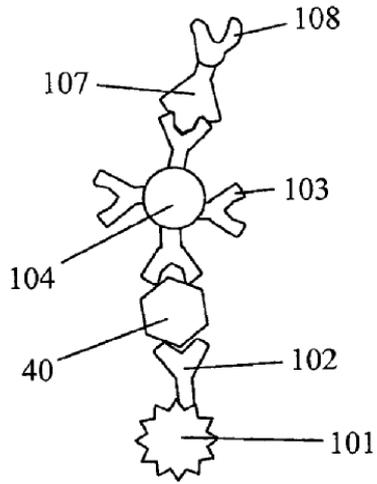


Fig. 15B

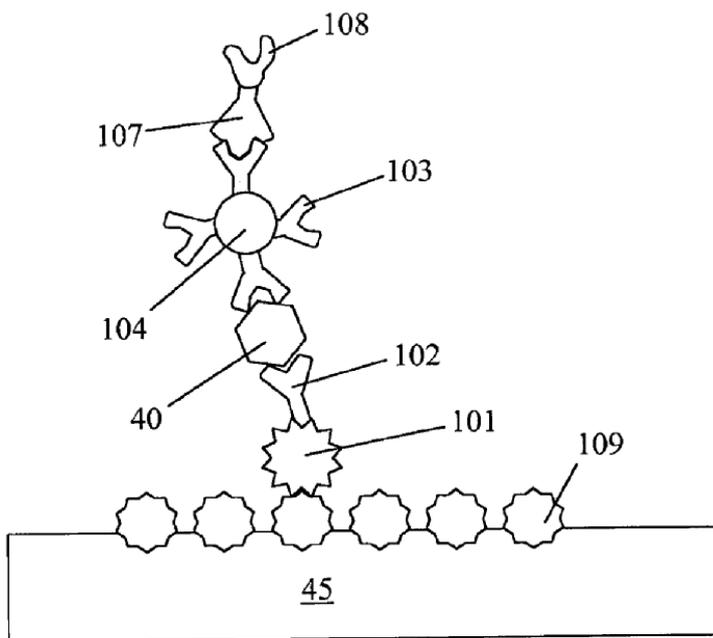
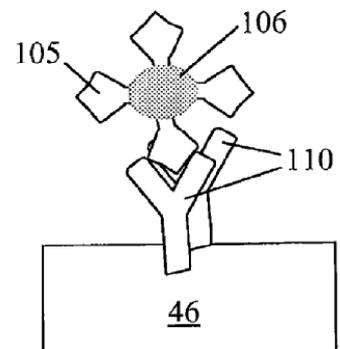


Fig. 15C



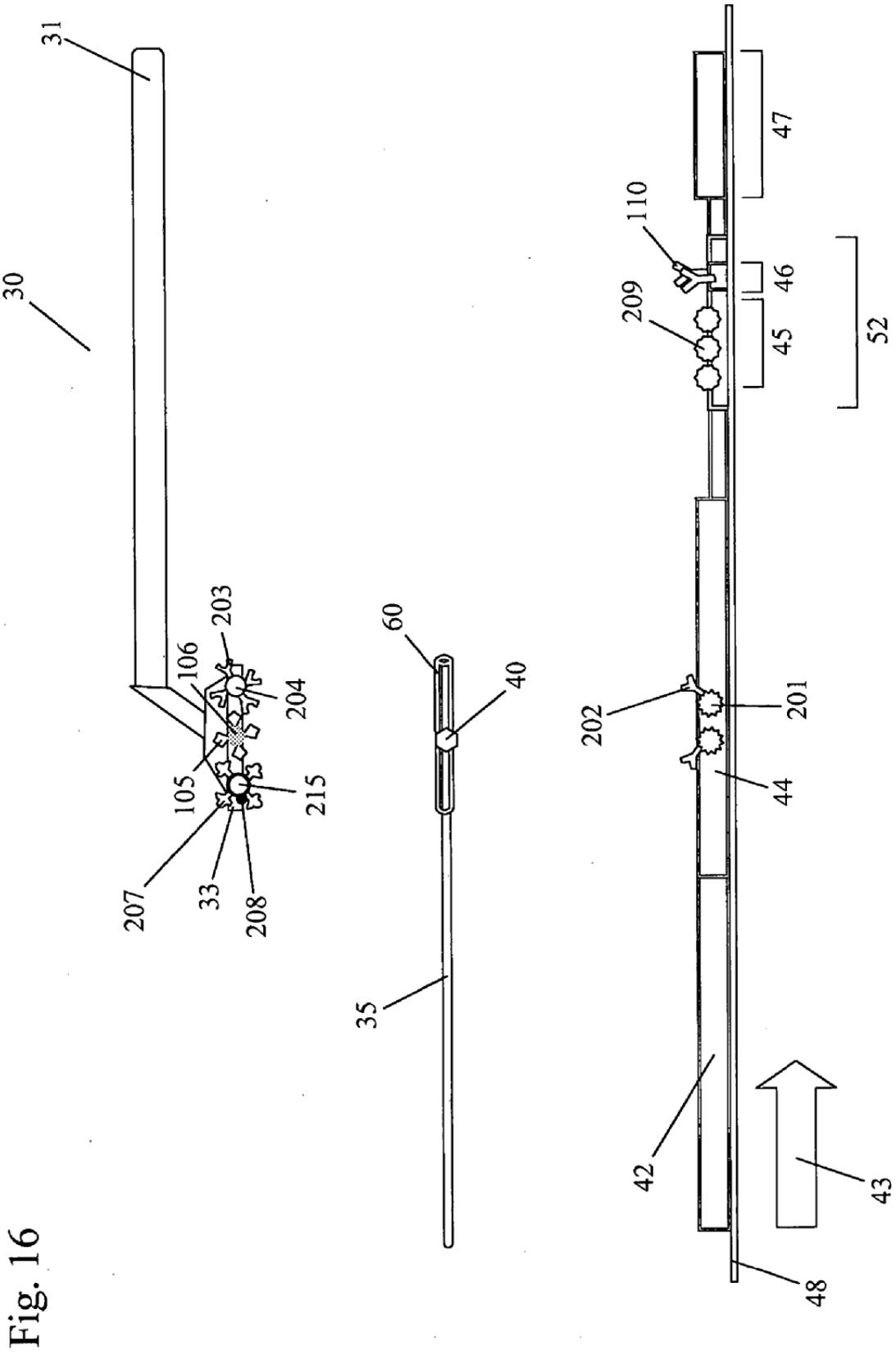


Fig. 17A

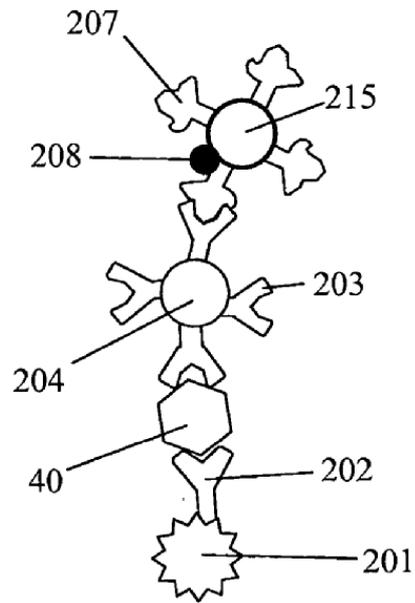


Fig. 17B

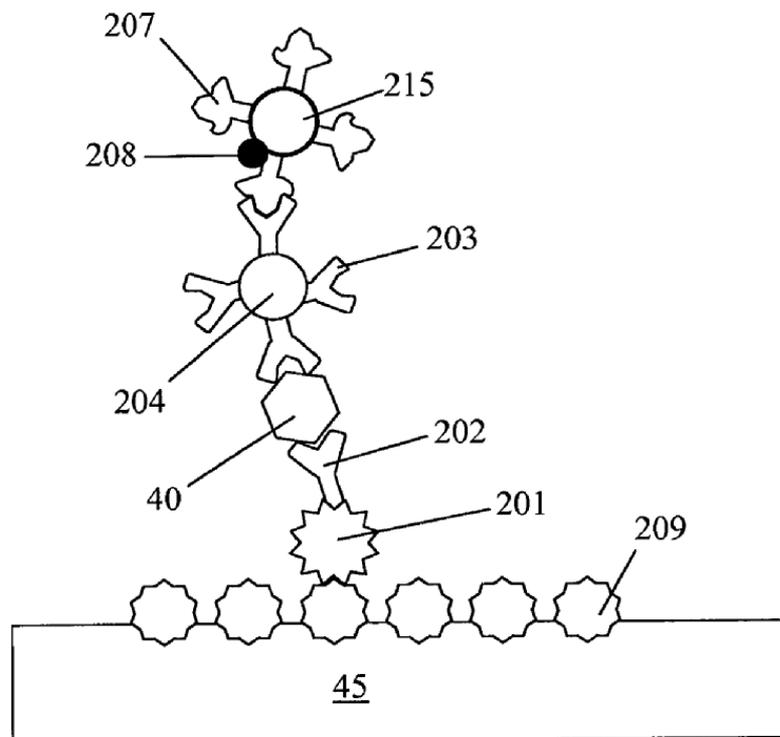


Fig. 18

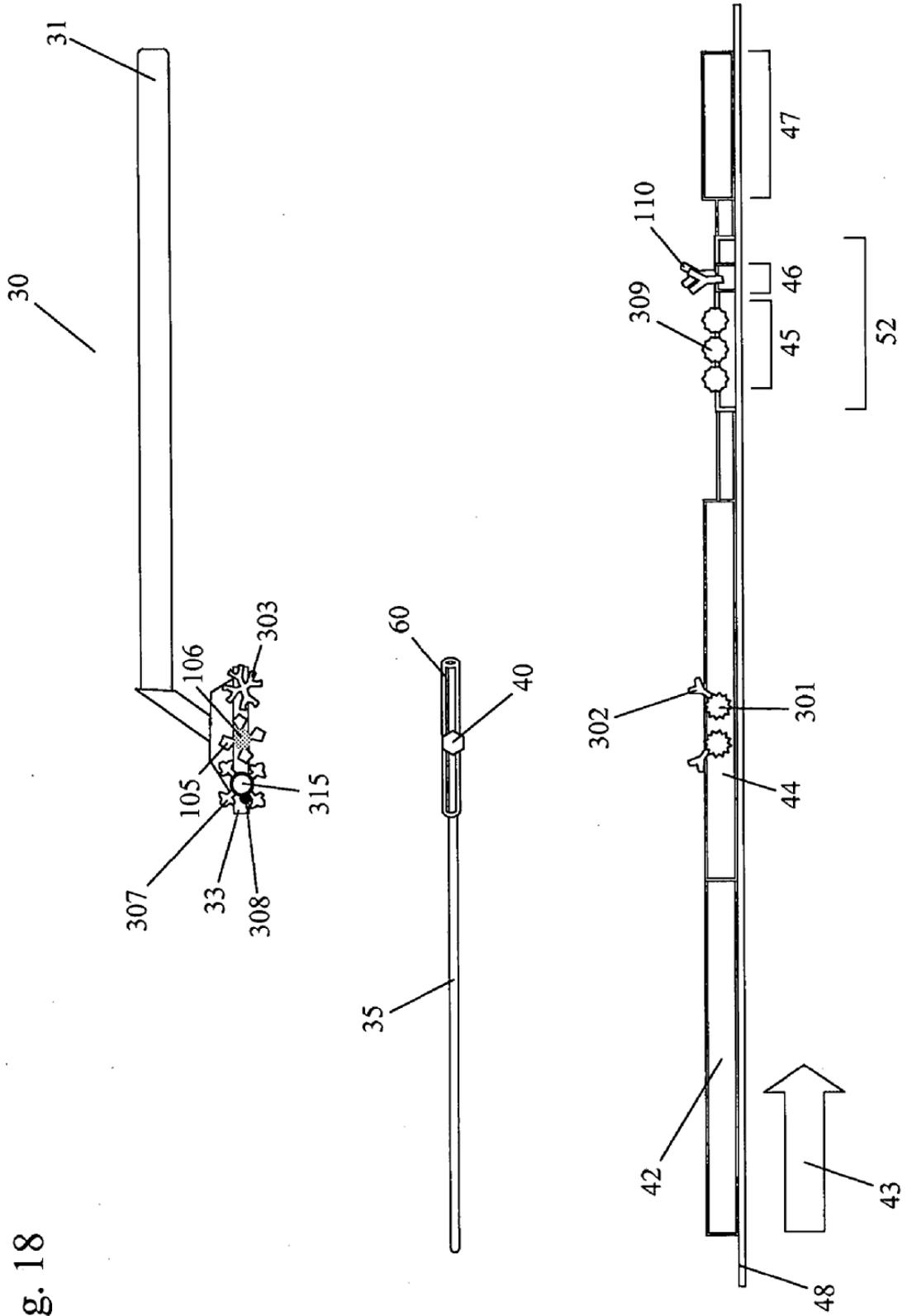


Fig. 19A

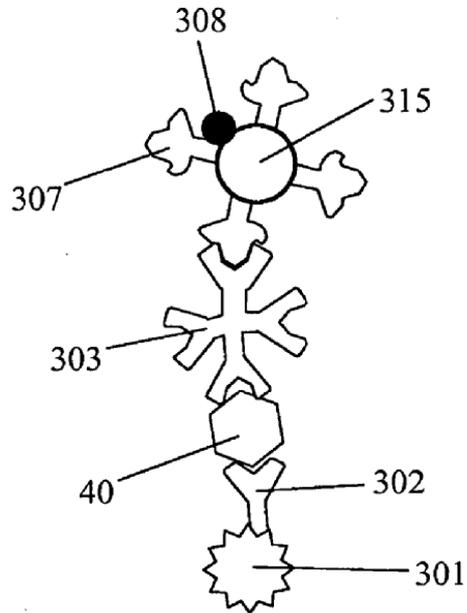


Fig. 19B

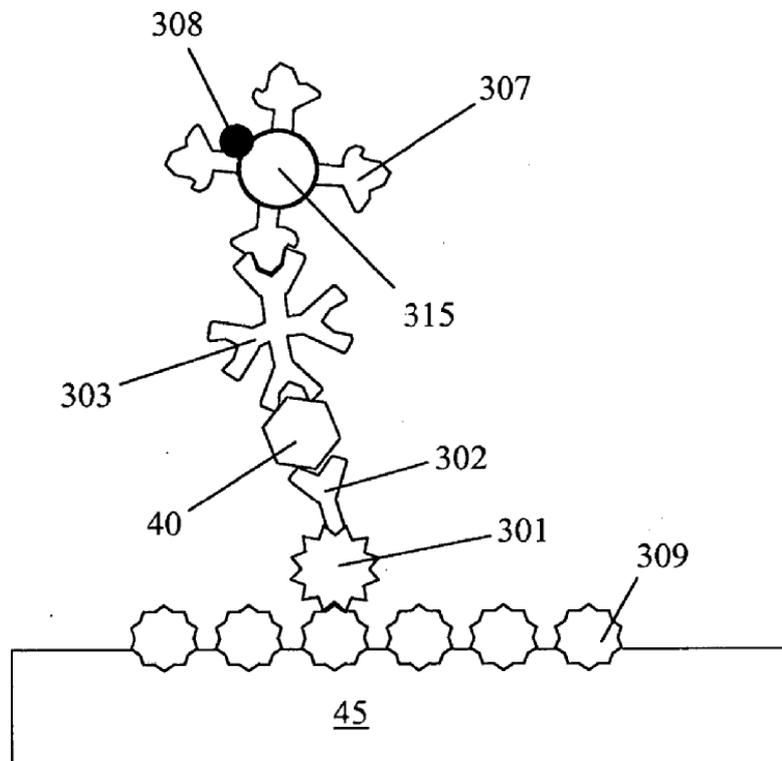


Fig. 20A

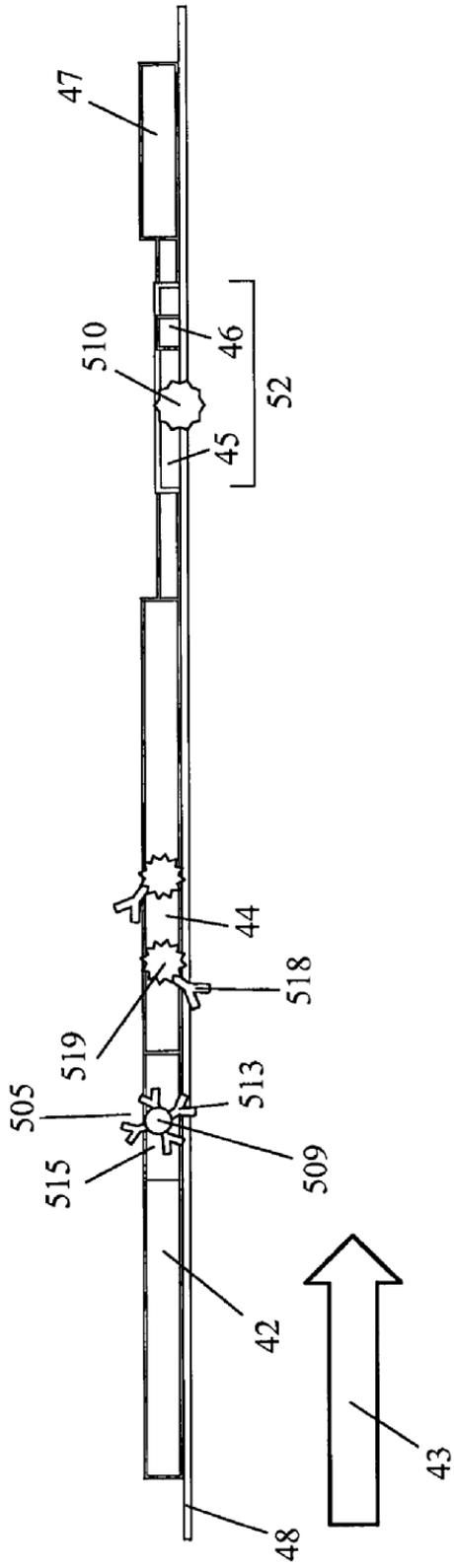


Fig. 20B

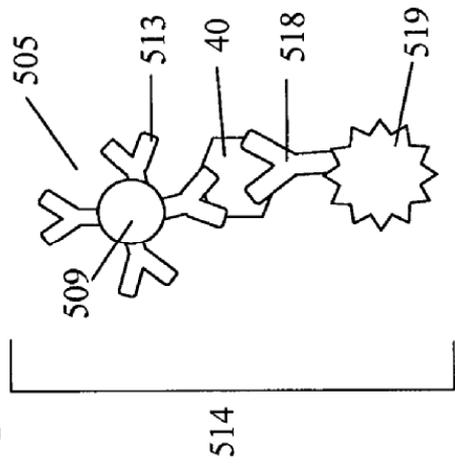


Fig. 21A

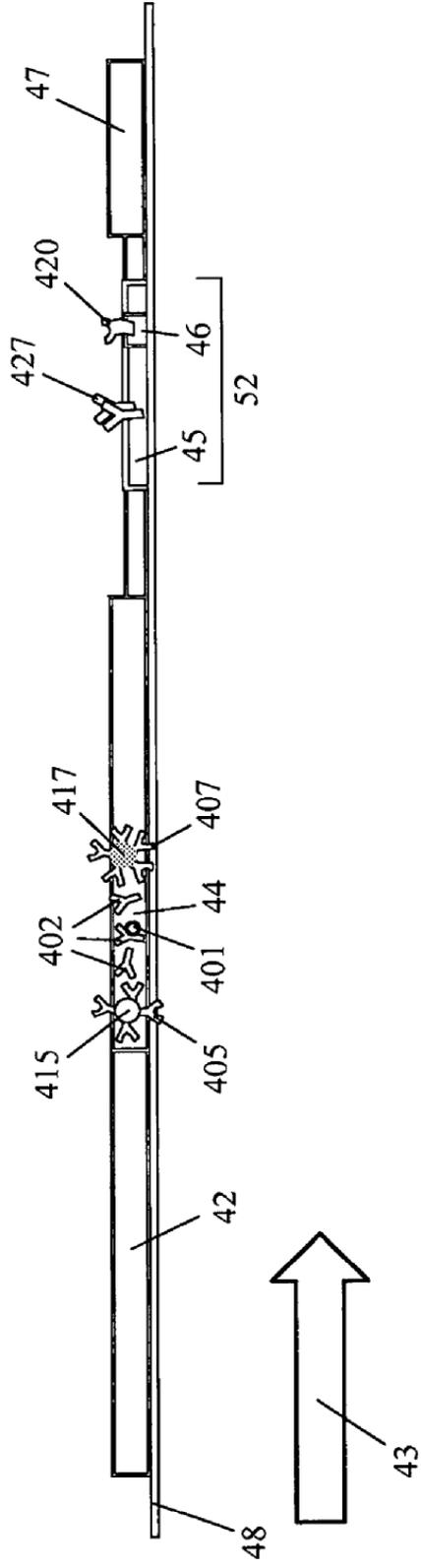


Fig. 21B

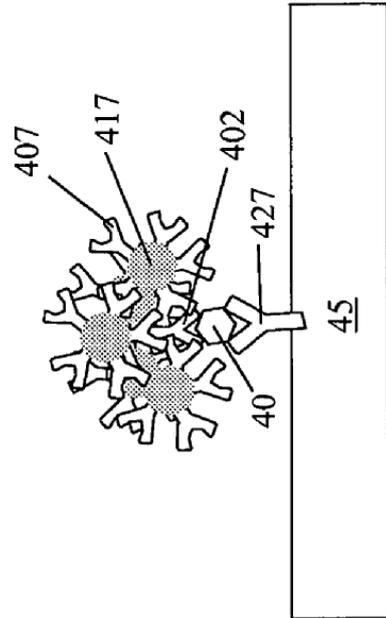


Fig. 21C

