

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 457**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010** **E 10805106 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015** **EP 2460009**

54 Título: **Dispositivo para detección de antígenos y usos del mismo**

30 Prioridad:

31.07.2009 US 533721

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

23.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 457 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para detección de antígenos y usos del mismo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un dispositivo y ensayo para detectar uno o más antígenos y métodos de uso de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 La detección de antígenos es importante para muchos campos de la investigación científica, uso diagnóstico y usos terapéuticos. Existen diversas maneras en las que se pueden detectar antígenos. Se describen diversos métodos en la patente de EE.UU. 5,160,701, patente de EE.UU. 5,141,850, publicación PCT WO 91/12336, patente de EE.UU. 5,451,504, patente de EE.UU. 5,559,041, solicitud de patente europea nº 0505636A1, publicación PCT nº WO 88/08534, solicitud de patente europea nº 0284 232A1, publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20070020768 y patente de EE.UU. nº RE39664. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2005277202 describe un dispositivo colector para cromatografía de flujo lateral. La publicación PCT nº WO 2007/097917 describe un dispositivo que combina ensayos de flujo vertical y lateral. La publicación PCT nº WO 2004/097419 describe un sistema de biosensor de tira de membrana para análisis en el lugar de atención. Los métodos y dispositivos disponibles anteriores a la presente invención pueden requerir todavía mejoras en la sensibilidad o la velocidad a la que se pueden obtener resultados. Estos factores pueden ser importantes cuando el tiempo es esencial a la hora de intentar determinar la presencia o ausencia de un antígeno.

20 Uno de estos campos es el campo de la detección de contaminantes patógenos de transmisión alimentaria. Aproximadamente setenta y seis millones de personas en los EE.UU. se ven aquejadas de una enfermedad de transmisión alimentaria. De estos setenta y seis millones, aproximadamente, 325.000 enfermarán gravemente, requiriendo hospitalización, y aproximadamente 5,000 fallecerán. La mayoría de las enfermedades de transmisión alimentaria son causadas por *Salmonella*, *E. coli* y *Campylobacter*, y suponen un coste de aproximadamente 35 mil millones de dólares.

25 Las medidas actuales para garantizar un suministro seguro de alimentos implican una combinación de autoridades locales, estatales y federales, así como un complejo sistema de inspectores y redes de vigilancia. Los fabricantes de alimentos se atienen a determinadas normativas del Departamento de Agricultura de EE. UU. (United States Department of Agriculture, USDA), la Administración de Alimentos y Fármacos (United States Food and Drug Administration) y el Servicio Nacional de Pesca Marina (National Marine Fisheries Service) que son exigibles por ley. El USDA ha creado un sistema de inspectores sanitarios que están encargados de realizar inspecciones diarias de carne, productos frescos y otros productos de consumo producidos o elaborados en instalaciones de producción y de elaboración. Estas inspecciones que se han implantado conllevan un detallado análisis estadístico que tiene por objeto garantizar al máximo la seguridad y la esterilidad del alimento antes de que llegue al consumidor. Por otra parte, la mayoría de la industria cárnica ha adoptado técnicas de irradiación para asegurar adicionalmente la esterilidad de los productos. A un nivel inferior, los departamentos de salud locales y municipales trabajan para asegurar que los distribuidores locales, restaurantes y minoristas sigan pautas estrictas que garanticen un suministro seguro de alimentos. Sin embargo, a pesar de esta compleja red, las infecciones de transmisión alimentaria siguen siendo comunes.

40 Cuando existen fundadas sospechas de un brote, se inicia una investigación. Se realiza una búsqueda de más casos entre las personas que puedan haber estado expuestas. Se determinan los síntomas y el momento de inicio y la ubicación de posibles casos, y se desarrolla una "definición del caso" que describe estos casos típicos. Se describe sistemáticamente el brote por tiempo, lugar y persona. Se dibuja un gráfico de la cantidad de personas que han enfermado día por día, para mostrar gráficamente cuándo ha ocurrido. El cálculo de la distribución de casos por edad y sexo indica quiénes han sido afectados.

45 A menudo no se conoce el microorganismo causante, por lo que se deben recoger muestras de heces o sangre de personas enfermas y enviarlas al laboratorio de salud pública para realizar un diagnóstico. Cada toma y muestreo pueden costar más de 500 dólares por prueba, y los análisis tardan a menudo 2-4 días (CDC "Food-borne Infections").

50 Antes de la presente invención, para identificar el alimento u otro origen del brote los investigadores entrevistan en primer lugar a algunas de las personas que presenten los casos más típicos, realizando preguntas acerca de a qué pueden haber estado expuestas en los días inmediatamente anteriores a la aparición de la enfermedad. Así se pueden excluir algunas exposiciones potenciales, mientras que otras que se mencionen repetidamente emergen como posibles orígenes. Combinadas con otras informaciones, tales como los orígenes probables del microorganismo específico involucrado, las hipótesis se prueban después en una investigación epidemiológica formal. Los investigadores realizan entrevistas sistemáticas acerca de una lista de posibles exposiciones a personas enfermas y a un grupo comparable de personas que no están enfermas. Mediante la comparación de la frecuencia con que las personas enfermas y sanas informan de una exposición, los investigadores pueden medir la asociación

de la exposición con la enfermedad. Utilizando estadísticas probabilísticas, se calcula directamente la probabilidad de la no asociación.

- 5 A medida que aparecen nuevos problemas de transmisión alimentaria surge la necesidad de nuevos dispositivos y métodos para detectar patógenos de transmisión alimentaria. La presente invención proporciona un dispositivo para la detección de antígenos, tales como antígenos de bacterias de transmisión alimentaria, y satisface la necesidad de disponer de un dispositivo y ensayo con sensibilidad y/o velocidad de detección incrementadas. La presente invención satisface otras necesidades, tal como se discutirá en la presente memoria.

Compendio de la invención

La presente invención se define en su sentido más amplio por las reivindicaciones adjuntas.

- 10 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo para detectar una molécula diana, que comprende: una carcasa que comprende un primer y segundo miembros de carcasa, en donde la carcasa comprende: una almohadilla de conjugado y una membrana de ensayo, en donde al menos una parte de la almohadilla de conjugado y la membrana de ensayo son sustancialmente paralelas entre sí, un miembro absorbente, en donde el miembro absorbente es sustancialmente paralelo a la membrana de ensayo y está en contacto fluido
15 con la misma; una abertura de entrada en contacto fluido con la almohadilla de conjugado; un miembro de fuerza, en donde el miembro de fuerza está configurado para aplicar presión sustancialmente de manera perpendicular a la membrana de ensayo; un miembro bloqueante deslizable que entra en contacto con el miembro de fuerza, y un miembro de conexión en contacto con el miembro bloqueante.

- 20 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un sistema que comprende dicho dispositivo y un recipiente de tampón o un colector de muestra.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende dicho dispositivo y uno o más de un testigo positivo, un testigo negativo, un folleto de instrucciones, un recipiente de tampón o un colector de muestra.

- 25 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar un antígeno, que comprende: poner en contacto una muestra con la almohadilla de conjugado de dicho dispositivo; en donde la muestra fluye verticalmente de la almohadilla de conjugado a la membrana de ensayo; e identificar una reacción positiva o negativa para la molécula diana.

- 30 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona dispositivos para detectar un antígeno. En algunas realizaciones, los dispositivos comprenden una carcasa que comprende un primer miembro de carcasa y un segundo miembro de carcasa, en donde dicha carcasa comprende: una abertura de entrada en el segundo miembro de carcasa; un miembro de fuerza conectado al primer miembro de carcasa; un miembro bloqueante deslizable que entra en contacto con el primer miembro de carcasa y entra en contacto con el miembro de fuerza; un sistema de membrana para detección de antígeno que comprende, en el siguiente orden: una almohadilla de conjugado; una membrana permeable; una membrana de ensayo; y un miembro absorbente; y un miembro de conexión flexible conectado al miembro bloqueante y la almohadilla de conjugado; en donde al menos una parte de cada uno de la
35 almohadilla de conjugado, membrana permeable, membrana de ensayo y miembro absorbente son sustancialmente paralelas entre sí; en donde la almohadilla de conjugado es capaz de ser comprimida contra el perímetro de la abertura de entrada del segundo miembro de carcasa; y en donde el miembro de fuerza entra en contacto con el miembro absorbente y es capaz de aplicar presión sustancialmente de manera perpendicular al sistema de membrana de detección de antígeno.

- 40 En algunas realizaciones de los dispositivos, los dispositivos comprenden además una membrana hidrófoba situada entre la membrana de ensayo y el miembro absorbente. En algunas realizaciones, el primer miembro de carcasa comprende además un botón deslizante que sobresale de la superficie externa del primer miembro de carcasa, en donde el botón deslizante está conectado al miembro bloqueante, en donde el movimiento del botón deslizante mueve el miembro bloqueante.

- 45 En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado comprende un primer anticuerpo específico de antígeno.

En algunas realizaciones, el antígeno reconocido por el primer anticuerpo específico de antígeno es un antígeno de patógeno de transmisión alimentaria.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas que comprenden un dispositivo tal como se describe en la presente memoria y un recipiente de tampón o un colector de muestra.

- 50 La presente invención también proporciona métodos para detectar un antígeno.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: representa una vista en perspectiva de un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

Figura 2: representa algunos componentes de un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

Figura 3: representa algunos componentes de un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

5 Figura 4: representa algunos componentes de un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

Figura 5: representa algunos componentes de un dispositivo representativo en diversas posiciones según algunas realizaciones de la presente invención.

10 Figura 6: representa una vista lateral de algunos componentes de un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

Figura 7: representa una vista lateral de algunos componentes de un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

Figura 8: representa una vista lateral de algunos componentes de un dispositivo representativo según algunas realizaciones de la presente invención.

15 Figura 9: representa un miembro de conexión flexible conectado a una almohadilla de conjugado.

Figura 10: representa membranas en un miembro de carcasa representativo.

Descripción de realizaciones

Tal como se usa en el presente documento y a menos que se indique otra cosa, se pretende que el término "aproximadamente" signifique $\pm 5\%$ del valor que modifica. Por tanto, aproximadamente 100 significa de 95 a 105.

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

25 La expresión "reactivo de captura" se refiere a un reactivo, por ejemplo un anticuerpo o proteína de unión a antígeno, capaz de unirse a una molécula diana o analito a detectar en una muestra biológica. Un reactivo de captura puede ser también, por ejemplo, un oligonucleótido o un peptido.

Los términos "detectar" o "detección" se utilizan en el sentido más amplio para incluir mediciones cualitativas y/o cuantitativas de un analito diana.

30 Los términos "conectado" o "conexión" pueden incluir tanto la conexión directa como la conexión indirecta. Dos componentes que están conectados directamente uno a otro también están en contacto físico entre sí. Dos componentes que están conectados indirectamente uno a otro están conectados a través de un componente intermedio. Por ejemplo, el Componente A puede estar conectado indirectamente al Componente B si el Componente A está conectado directamente al Componente C y el Componente C está conectado directamente al Componente B. Por lo tanto, en ese ejemplo, se diría que el Componente A está conectado indirectamente al Componente B.

35 El término "aislado" se refiere a una molécula que está sustancialmente separada de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada es una que está sustancialmente separada de la fuente de célula o tejido de la que se deriva.

40 El término "purificado" se refiere a una molécula que está sustancialmente exenta de otro material que se asocia con la molécula en su entorno natural. Por ejemplo, una proteína purificada está sustancialmente exenta de material celular u otras proteínas de la célula o tejido del que se deriva. El término se refiere a preparaciones en donde la proteína aislada es lo suficientemente pura para ser analizada, o al menos con 70% a 80% (peso/peso) de pureza, al menos 80%-90% (peso/peso) de pureza, 90-95% de pureza; y al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% (peso/peso) de pureza.

45 Las expresiones "unión específica", "se une específicamente" y similares, significan que dos o más moléculas forman un complejo que es medible en condiciones fisiológicas o de ensayo y es selectivo. Se dice que una proteína de unión a anticuerpo o a antígeno u otra molécula "se unen específicamente" a una proteína, antígeno o epítipo si, en condiciones adecuadamente elegidas, no se inhibe sustancialmente tal unión, mientras que al mismo tiempo se inhibe la unión no específica. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y es selectiva con respecto al compuesto, proteína, epítipo o antígeno. La unión no específica tiene habitualmente una afinidad baja. La unión de anticuerpos IgG, por ejemplo, se caracteriza generalmente por una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M o superior, por ejemplo al menos aproximadamente 10^{-8} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-9} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-10} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-11} M o superior, o al menos

aproximadamente 10^{-12} M o superior. El término es también aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que no es portado por numerosos antígenos, en cuyo caso la proteína de unión a anticuerpo o a antígeno que porta el dominio de unión a antígeno en general no se unirá a otros antígenos. En algunas realizaciones, el reactivo de captura tiene una K_d igual o inferior a 10^{-9} M, 10^{-10} M ó 10^{-11} M con respecto a su copartícipe de unión (por ejemplo, antígeno). En algunas realizaciones, el reactivo de captura tiene una K_a superior o igual a 10^9 M⁻¹ con respecto a su copartícipe de unión.

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

Ejemplos no limitantes de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "anticuerpo específico de antígeno" utilizada en la presente memoria incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd consistente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv consistente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; y (vi) un CDR aislado. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden ser unidos de forma recombinante por un enlazador sintético, creando una única cadena proteica en la que los dominios VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). El enlazador utilizado más habitualmente es un péptido de 15 restos (Gly4Ser)₃, pero también se conocen en la técnica otros enlazadores. También se pretende que las expresiones "proteína de unión a anticuerpo o a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo abarquen anticuerpos de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, fragmento de unión a antígeno, fragmento Fc, anticuerpos de cadena sencilla, o cualquier de sus derivados.

Estos anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban en busca de utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. La diversidad de anticuerpos la crean múltiples genes de línea germinal que codifican dominios variables y una diversidad de eventos somáticos. Los eventos somáticos incluyen la recombinación de segmentos de gen variables con segmentos de gen de diversidad (D) y de unión (J) para constituir un dominio VH completo, y la recombinación de segmentos de gen variables y de unión para constituir un dominio VL completo. El proceso de recombinación en sí es impreciso, lo que origina la pérdida o adición de aminoácidos en las uniones V(D)J. Estos mecanismos de diversidad se producen en la célula B en desarrollo antes de la exposición al antígeno. Después de la estimulación antigénica, los genes de anticuerpo expresados en células B experimentan mutación somática. Basándose en el número estimado de segmentos de gen de línea germinal, en la recombinación aleatoria de estos segmentos y en el emparejamiento VH-VL aleatorio, se pueden producir hasta $1,6 \times 10^7$ anticuerpos diferentes (*Fundamental Immunology*, 3ª ed. (1993), compilado por Paul, Raven Press, Nueva York, NY). Cuando se tienen en cuenta otros procesos que contribuyen a la diversidad de anticuerpos (tales como la mutación somática), se cree que se pueden generar más de 1×10^{10} anticuerpos diferentes (*Immunoglobulin Genes*, 2ª ed. (1995), compilado por Jonio *et al.*, Academic Press, San Diego, Calif.). Debido a los muchos procesos implicados en la generación de diversidad de anticuerpos, es improbable que anticuerpos monoclonales derivados de manera independiente con la misma especificidad de antígeno tengan secuencias aminoácidas idénticas.

Se pueden producir moléculas proteicas de unión a antígeno o a anticuerpo capaces de interactuar específicamente con los antígenos, epítipos u otras moléculas descritas en la presente memoria por métodos bien

conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales por generación de hibridomas de acuerdo con métodos conocidos. Después se pueden cribar hibridomas así formados, utilizando métodos estándar, tales como ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) y análisis Biacore, para identificar uno o más hibridomas que produzcan un anticuerpo que interactúe específicamente con una molécula o compuesto de interés.

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal para un polipéptido de la presente invención por cribado de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatorias recombinantes (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpo) con un polipéptido de la presente invención para aislar así miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unan al polipéptido. Las técnicas y kits comercialmente disponibles para generar y cribar bibliotecas de presentación de fagos son bien conocidas para los expertos en la técnica. Además, en la bibliografía se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles para su uso en la generación y cribado de bibliotecas de presentación de proteína de unión a anticuerpo o a antígeno.

La expresión "reactivo de captura" también incluye anticuerpos quiméricos, por ejemplo anticuerpos humanizados, así como anticuerpos totalmente humanizados. En algunas realizaciones, el reactivo de captura es un anticuerpo anti-*E. coli* 0157:H7 de cabra, nº de catálogo: 70-XG13 (Fitzgerald Industries); *E. coli* 0157:H7 mono, nº de catálogo: 10-E13A (Fitzgerald Industries); *E. coli* 0157:H7, nº de catálogo: 10C-CR1295M3 (Fitzgerald Industries); *E. coli* 0157:H7 mono, nº de catálogo: 10-E12A (Fitzgerald Industries); o IgG anti-ratón, de cabra, nº de catálogo: ABSE-020 (DCN).

Los dispositivos de la presente invención comprenden una carcasa que comprende un primer miembro de carcasa y un segundo miembro de carcasa. En algunas realizaciones, los primer y segundo miembros de carcasa pueden estar contruidos como una sola unidad. La carcasa puede comprender una abertura de entrada. La abertura de entrada permite la introducción de una muestra en el ensayo cromatográfico. En algunas realizaciones, el primer miembro de carcasa comprende la abertura de entrada. La abertura de entrada puede tener tamaño suficiente para acoger una cantidad apropiada de volumen de una disolución que se añade al dispositivo. En algunas realizaciones, el tamaño de la abertura es suficientemente grande como para acoger aproximadamente de 0,1 a 3 ml, aproximadamente de 0,1 a 2,5 ml, aproximadamente de 0,5 a 2,0 ml, aproximadamente de 0,1 a 1,0 ml, aproximadamente de 0,5 a 1,5 ml, de 0,5 a 1,0 ml y de 1,0 a 2,0 ml.

En algunas realizaciones, la carcasa comprende una almohadilla de conjugado, una membrana permeable, una membrana de ensayo y/o un miembro absorbente. En algunas realizaciones, la carcasa comprende un sistema de membrana para detección de antígeno. En algunas realizaciones, el sistema de membrana para detección de antígeno comprende una almohadilla de conjugado, una membrana permeable, una membrana de ensayo y un miembro absorbente. En algunas realizaciones, el sistema de membrana para detección de antígeno está exento de una membrana permeable. En algunas realizaciones, el sistema de membrana para detección de antígeno comprende en el siguiente orden: una almohadilla de conjugado, una membrana permeable, una membrana de ensayo y un miembro absorbente.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "almohadilla de conjugado" se refiere a una membrana u otro tipo de material que puede comprender un reactivo de captura. La almohadilla de conjugado puede ser un acetato de celulosa, nitrato de celulosa, poliamida, policarbonato, fibra de vidrio, membrana, polietersulfona, celulosa regenerada (RC), politetrafluoroetileno (PTFE), poliéster (por ejemplo poli(tereftalato de etileno)), policarbonato (por ejemplo, 4,4-hidroxi-difenil-2,2'-propano), óxido de aluminio, éster mixto de celulosa (por ejemplo, mezcla de acetato de celulosa y nitrato de celulosa), nailon (por ejemplo, poliamida, hexametilendiamina y Nylon 66), polipropileno, PVDF, polietileno de alta densidad (HDPE) + agente nucleante "dibenzoato de aluminio" (DBS) (por ejemplo, 80u 0.024 HDPE DBS (Porex)) y HDPE. Los ejemplos de almohadillas de conjugado también incluyen Cyclopore® (poli(tereftalato de etileno)), Nucleopore® (poli(tereftalato de etileno)), Membra-Fil® (acetato y nitrato de celulosa), Whatman® (acetato y nitrato de celulosa), Whatman #12-S (rayón)), Anopore® (óxido de aluminio), Anodisc® (óxido de aluminio), Sartorius (acetato de celulosa, por ejemplo, de 5 µm), y Whatman Standard 17 (vidrio ligado).

En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado o membrana de ensayo comprende un reactivo de captura. En algunas realizaciones, se ponen en contacto la almohadilla de conjugado o membrana de ensayo con el reactivo de captura y después se dejan secar. La almohadilla de conjugado o membrana de ensayo también pueden comprender otras composiciones con el fin de conservar el reactivo de captura de manera que se pueda almacenar de forma estable a temperatura ambiente o bajo refrigeración o a temperaturas de congelación. En algunas realizaciones, se empapan con un tampón la almohadilla de conjugado o membrana de ensayo antes de que se aplique el reactivo de captura. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón bloqueo que se utiliza para evitar unión no específica. En algunas realizaciones, el tampón comprende borato, BSA, PVP40 y/o Tween-100. En algunas realizaciones, el tampón es borato 10 mM, BSA al 3%, PVP40 al 1% y Tween-100 al 0,25%. En algunas realizaciones, el reactivo de captura se aplica a la almohadilla o membrana en una solución que comprende trehalosa y sacarosa. En algunas realizaciones, el reactivo de captura se aplica a la almohadilla de conjugado o membrana de ensayo en una solución que comprende trehalosa, sacarosa y fosfato y/o BSA. En algunas realizaciones, el reactivo de captura se aplica en una solución que consiste en trehalosa al 5%, sacarosa al 20%, fosfato 10 mM, y BSA al 1%.

En algunas realizaciones, la almohadilla o membrana (por ejemplo almohadilla de conjugado o membrana de ensayo) comprenden de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0 μg de un reactivo de captura, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 μg de un reactivo de captura, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 μg de un reactivo de captura, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 μg de un reactivo de captura, aproximadamente 1,5 μg de un reactivo de captura, aproximadamente 2,5 μg de un reactivo de captura o aproximadamente 2,7 μg de un reactivo de captura.

En algunas realizaciones, la membrana permeable está unida o adherida a una membrana de ensayo. En algunas realizaciones, la membrana permeable está estratificada sobre la membrana de ensayo. La membrana permeable puede ser una membrana de cualquier material que permita a una muestra, por ejemplo una muestra fluida, fluir a través de la membrana de ensayo. Los ejemplos de membrana de ensayo incluyen, pero sin limitación, nitrocelulosa, celulosa, fibra de vidrio, poliéster, polipropileno, nailon y similares. En algunas realizaciones, la membrana permeable comprende una abertura. La abertura puede estar presente para permitir la visualización o detección de la membrana de ensayo. En algunas realizaciones, la abertura de la membrana permeable tiene sustancialmente el mismo tamaño que la abertura de entrada de la carcasa. Los ejemplos de membranas permeables incluyen, pero sin limitación, Protran BA83, Whatman y similares.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "membrana de ensayo" se refiere a una membrana en la cual se produce la detección de un copartícipe de unión a un reactivo de captura. Las membranas de ensayo incluyen, pero sin limitación, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de nailon, una membrana de poli(fluoruro de vinilideno), una membrana de polietersulfona y similares. La membrana de ensayo puede ser cualquier material que pueda ser utilizado por un experto en la técnica para detectar la presencia de un copartícipe de unión a un reactivo de captura (por ejemplo, antígeno o epítipo). La membrana de ensayo también puede comprender un reactivo de captura. En algunas realizaciones, se pone en contacto la membrana de ensayo con un reactivo de captura y se deja que el reactivo de captura se seque y se adhiera a la membrana de ensayo. Los ejemplos de membranas de ensayo incluyen, pero sin limitación, Protran BA83, Whatman, Opitran BA-SA83, y blanca corriente de 0,22 μm (producto Millipore nº SA3J036107). La membrana de ensayo puede comprender una pluralidad de reactivos de captura. En algunas realizaciones, la membrana de ensayo comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 reactivos de captura. En algunas realizaciones, la membrana de ensayo comprende una pluralidad de zonas, cada una con un reactivo de captura diferente. En algunas realizaciones, la pluralidad de zonas no se solapan o coinciden entre sí por completo. Mediante el uso de una pluralidad de reactivos de captura, se pueden detectar múltiples copartícipes de unión (por ejemplo, epítipos o antígenos).

En algunas realizaciones, la carcasa también comprende un miembro absorbente. También se puede denominar el miembro absorbente como una "almohadilla de mecha" o "almohadilla de capilaridad". El miembro absorbente absorbe el líquido que fluye a través del dispositivo cuando se aplica la muestra al dispositivo y proporciona la fuerza de capilaridad que ayuda al flujo de la muestra cuando se aplica ésta al dispositivo.

El miembro absorbente puede ser cualquier material que pueda facilitar el flujo de la muestra a través de la almohadilla de conjugado y hacia la membrana de ensayo. Los ejemplos de miembros absorbentes incluyen, pero sin limitación, celulosa, polímeros superabsorbentes, almohadillas de fibra de vidrio (por ejemplo, C083 (Millipore)), y similares. En algunas realizaciones, la carcasa comprende una pluralidad (por ejemplo, 2 o más) de miembros absorbentes. En algunas realizaciones, la carcasa comprende 2, 3, 4 o 5 miembros absorbentes. En algunas realizaciones, el miembro absorbente comprende una o más membranas de hasta 10 membranas individuales, y cada membrana puede ser del mismo material o de un material diferente.

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un miembro de fuerza. Se puede utilizar el miembro de fuerza para aplicar presión o para comprimir uno contra otro los demás componentes del sistema de membrana para detección de antígeno. En algunas realizaciones, el miembro de fuerza puede comprender un vástago y una cabeza. El miembro de fuerza puede tener una forma de tipo de seta en donde la cabeza es más ancha que el vástago. En algunas realizaciones, la cabeza es más estrecha que el vástago. El miembro de fuerza que comprende una cabeza y un vástago puede ser una sola unidad o bien puede estar constituido por múltiples piezas que entran en contacto entre sí para formar el miembro de fuerza. Por ejemplo, la cabeza podría ser una unidad que podría estar separada del vástago. Tras el montaje, la cabeza y el vástago están en contacto mutuo para constituir el miembro de fuerza. En otro ejemplo, la cabeza y el vástago son una unidad cohesiva y se fabrican juntos y no como piezas separadas que luego se ensamblan para formar el miembro de fuerza. El miembro de fuerza permite que el dispositivo funcione con flujo vertical en lugar de basarse en flujo lateral.

Los dispositivos descritos en la presente memoria se pueden usar en ensayos para detectar la presencia de copartícipe de unión de reactivo de captura. Por ejemplo, se puede detectar un antígeno mediante un anticuerpo utilizando los dispositivos de la presente invención. Los dispositivos de la presente invención emplean flujo vertical. "Flujo vertical" se refiere a la dirección con que fluye la muestra a través de las diferentes membranas y miembros presentes en el dispositivo. Flujo vertical se refiere a una muestra que fluye a través de la membrana (por ejemplo, de arriba a abajo) por contraposición a flujo lateral, que se refiere a una muestra que fluye a través (por ejemplo, de lado a lado) de una membrana, almohadilla o miembro absorbente. En un dispositivo de flujo lateral, las membranas y almohadillas se encuentran horizontalmente una junto a otra sustancialmente en el mismo plano. En un dispositivo de flujo vertical, cada membrana o almohadilla son sustancialmente paralelas o completamente paralelas entre sí y

ocupan planos espaciales sustancialmente diferentes en el dispositivo. Las membranas y almohadillas pueden ocupar planos similares cuando están comprimidas o puestas bajo presión. En algunas realizaciones, al menos una parte de cada membrana o almohadilla está dispuesta en forma de capa sobre otra. En algunas realizaciones, al menos una parte de cada capa de membrana o almohadilla es sustancialmente paralela a otra. En algunas realizaciones, al menos una parte de cada capa está en un plano espacial diferente de otra capa.

Para permitir que el flujo vertical se produzca de manera eficiente, en algunas realizaciones la almohadilla de conjugado, membrana permeable, membrana de ensayo y miembro absorbente son sustancialmente paralelos entre sí. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado, membrana permeable, membrana de ensayo y miembro absorbente están presentes en planos espaciales diferentes. Se describen adicionalmente carcacas que también comprenden una membrana hidrófoba que puede ralentizar o detener el flujo vertical de la muestra. La membrana hidrófoba puede estar en contacto con la membrana de ensayo, lo que permitiría a la muestra permanecer o descansar sobre la membrana de ensayo. La permanencia puede permitir una mayor sensibilidad y detección. El flujo vertical es modulado por la presión que se aplica a las membranas. En algunas realizaciones, se aplica la presión perpendicularmente a la membrana de ensayo y/o a la almohadilla de conjugado. Se puede aplicar la presión de manera que se comprima la almohadilla de conjugado contra la carcaca. La compresión contra la carcaca puede ser tal que el conjugado esté en contacto directo con la carcaca, junta tórica o aro, o a través de un intermedio, de modo que la almohadilla de conjugado y la membrana de ensayo estén comprimidas una contra otra.

El miembro de fuerza puede aplicar presión que es sustancialmente perpendicular a la membrana de ensayo. La presión facilita el flujo vertical. La presión permite que cada capa de la pila de membranas esté en contacto con otra capa. También se puede aliviar la presión para detener el flujo de manera que la muestra de ensayo pueda permanecer o descansar sobre la membrana de ensayo, lo que puede permitir una mayor sensibilidad. Después se puede volver a aplicar la presión para permitir que el flujo vertical continúe y permita que la muestra fluya hacia el miembro o miembros absorbentes. El miembro de fuerza puede aplicar presión tal que la almohadilla de conjugado entre en contacto con una parte de la carcaca. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado entra en contacto con la carcaca cuando no se encuentra bajo la presión ejercida por el miembro de fuerza, pero, cuando el miembro de fuerza ejerce presión, la almohadilla de conjugado es comprimida contra una parte de la carcaca.

En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado está en contacto con el perímetro de la abertura de entrada. La abertura de entrada puede comprender también un aro u otra característica similar, tal como una junta tórica. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado está en contacto con el perímetro de un aro y/o una junta tórica. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado es capaz de ser comprimida contra el perímetro de la abertura de entrada, que puede incluir, en algunas realizaciones, un aro y/o una junta tórica.

"Capaz de ser comprimida contra el perímetro de la abertura de entrada" se refiere a una membrana o almohadilla (por ejemplo almohadilla de conjugado) que está siendo comprimida, ya sea directamente en contacto con el perímetro de la abertura de entrada o bien está siendo comprimida contra otra capa o material (por ejemplo membrana) que está en contacto con el perímetro de la abertura de entrada.

En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado no está en contacto físico directo con la carcaca, pero está en contacto fluido con la carcaca. "Contacto fluido" significa que si se aplica una muestra al dispositivo a través de la abertura de entrada u otra abertura, el fluido entrará en contacto con la almohadilla de conjugado. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado puede estar separada de la carcaca por otra membrana, tal como una membrana permeable, en donde la otra membrana está en contacto físico directo con la carcaca o en contacto físico directo con el aro o junta tórica. Cuando se aplica la muestra al dispositivo el fluido puede entrar primeramente en contacto con la otra membrana y después entrar en contacto con la almohadilla de conjugado. Esto es sólo un ejemplo de que la almohadilla de conjugado esté en contacto fluido con la carcaca. Existen muchas otras realizaciones en donde la almohadilla de conjugado no está en contacto físico directo con la carcaca, el aro o la junta tórica, pero está en contacto fluido con la carcaca.

El miembro de fuerza puede aplicar cualquier presión que sea suficiente para facilitar el flujo vertical a través de las diferentes capas de membrana. En algunas realizaciones, las capas del dispositivo (por ejemplo almohadilla de conjugado, membrana permeable, membrana de ensayo y miembro absorbente) son comprimidas bajo una fuerza seleccionada aproximadamente de 22,2 N a 444 N, aproximadamente de 22,2 N a 222 N, aproximadamente de 44,4 N a 178 N, aproximadamente de 66,7 N a 178 N, aproximadamente de 66,7 N a 11 N, o aproximadamente de 133 N a 178 N. La fuerza también puede comprimir una membrana hidrófoba o impermeable si estuviera alguna presente en el dispositivo.

En algunas realizaciones, el miembro de fuerza entra en contacto con una primera superficie de un miembro absorbente. En algunas realizaciones, una almohadilla de conjugado entra en contacto con una membrana de ensayo. En algunas realizaciones, una primera superficie de una membrana de ensayo entra en contacto con una membrana permeable. En algunas realizaciones, una segunda superficie de la membrana de ensayo entra en contacto con una segunda superficie de la almohadilla absorbente. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una membrana hidrófoba, y, por ejemplo, la membrana hidrófoba entra en contacto con una segunda superficie de la membrana de ensayo. En algunas realizaciones, la membrana hidrófoba entra en contacto con una primera superficie de la almohadilla absorbente.

- En algunas realizaciones, una primera superficie de la almohadilla de conjugado entra en contacto con la carcasa y una segunda superficie de la almohadilla de conjugado entra en contacto con una primera superficie de la membrana permeable, en donde la segunda superficie de la membrana permeable entra en contacto con una primera superficie de la membrana de ensayo, en donde una segunda superficie de la membrana de ensayo entra en contacto con una primera superficie de la almohadilla absorbente, en donde una segunda superficie de la almohadilla absorbente entra en contacto con el miembro de fuerza. En algunas realizaciones, la primera superficie de la almohadilla de conjugado entra en contacto con un perímetro de la abertura de entrada de dicha carcasa. En algunas realizaciones, la primera superficie de la almohadilla de conjugado entra en contacto con un perímetro de un aro o una junta tórica.
- El dispositivo comprende un miembro de conexión. En algunas realizaciones, el miembro de conexión es flexible o está hecho de un material flexible. El material flexible puede ser, por ejemplo, un material elástico o elastómero. Un miembro de conexión puede estar, por ejemplo, conectado a una almohadilla de conjugado y/o una membrana hidrófoba. El miembro de conexión también puede estar conectado a cualquier membrana o miembro del dispositivo. Los ejemplos de miembros de conexión incluyen, pero sin limitación, cinta de elastómero, cinta de goma, resorte y similares. En algunas realizaciones, el miembro de conexión puede estar hecho de un material con memoria de forma. El miembro de conexión hace posible crear un retraso entre el movimiento del miembro bloqueante y el movimiento de la almohadilla de conjugado o cualquier otro tipo de membrana o almohadilla al que esté conectado el miembro de conexión. El movimiento de la almohadilla o membrana no ocurre en el mismo momento en que se mueve el botón deslizante o el miembro bloqueante. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, a medida que se mueve el botón deslizante o miembro bloqueante se acumula energía en el miembro de conexión y, después de que se haya liberado la presión, esta energía se utiliza para tirar de una almohadilla o membrana que está conectada al miembro de conexión. En algunas realizaciones, el miembro bloqueante se mueve alejándose del miembro de fuerza (es decir, el miembro de fuerza ya no está en contacto con el miembro bloqueante) antes de se mueva o se retire la almohadilla de conjugado. La almohadilla de conjugado, en algunas realizaciones, se mueve una vez que la compresión o presión ejercida por el miembro de fuerza son eliminadas por completo.
- El miembro de conexión también puede estar conectado, bien a un botón deslizante o bien a un miembro bloqueante. El miembro de conexión puede estar conectado a través de cualquier medio, tal como adhesivos, grapas, atadura y similares, a los otros componentes. En algunas realizaciones, la membrana o almohadilla tiene muescas en la membrana o almohadilla que permiten que el miembro de conexión se conecte a la membrana o almohadilla. Un ejemplo no limitante se puede ver en la Figura 9.
- La carcasa comprende un miembro bloqueante deslizante que puede moverse dentro del dispositivo. Se puede utilizar el miembro bloqueante para bloquear el miembro de fuerza en una posición tal que se mantenga la fuerza creada por el miembro de fuerza sobre las diferentes capas. Por ejemplo, el miembro bloqueante está bloqueando el miembro de fuerza en su lugar de modo que no se pueda aliviar la presión a menos que se mueva el miembro bloqueante para permitir que el miembro de fuerza cambie de posición (es decir, se baje). El miembro bloqueante puede, por ejemplo, encajar bajo la cabeza del miembro de fuerza, lo que mantendría al miembro de fuerza en la posición alzada. El miembro bloqueante también puede estar situado de manera que mantenga al miembro de fuerza en una posición particular (por ejemplo, alzada o bajada). El miembro bloqueante puede estar hecho de cualquier material, con inclusión de, pero sin limitación, plástico y similares. Por ejemplo, el miembro bloqueante puede entrar en contacto con el miembro de fuerza, sea de manera directa o bien indirectamente a través de otro componente que impida que el miembro de fuerza libere la presión. En algunas realizaciones, el miembro bloqueante entra en contacto con el miembro de fuerza para comprimir la almohadilla de conjugado.
- El miembro bloqueante entra en contacto con el miembro de conexión de manera que el movimiento del miembro bloqueante mueve el miembro de conexión, cualquier otra membrana (por ejemplo almohadilla de conjugado, membrana hidrófoba, membrana de ensayo o miembro absorbente) u otro componente que esté conectado al miembro de conexión. Por ejemplo, si se mueve el miembro bloqueante para aliviar la presión del miembro de fuerza, permitiendo así que el miembro de fuerza cambie de posición (por ejemplo, de alzado a una posición más baja), el movimiento del miembro bloqueante también deformará/acumulará energía en el miembro de conexión de manera que éste pueda mover la membrana o almohadilla una vez que la presión se haya reducido suficientemente. Cuando la almohadilla de conjugado está unida al miembro de conexión y el miembro bloqueante se mueve, esto también se moverá la almohadilla de conjugado una vez que la presión se haya reducido suficientemente. En algunas realizaciones, la presión se elimina por completo. La almohadilla de conjugado se puede mover, por ejemplo, de manera que es extraída del dispositivo. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado se mueve para dejar descubierta la membrana de ensayo a través de la abertura de entrada. La porción de la membrana de ensayo que quede descubierta dependerá del tipo de detección que se use. Para una detección visual se puede requerir que se descubra más porción de la membrana de ensayo en la abertura de entrada. Para una detección no visual, por ejemplo fluorescente, infrarroja, radiactiva o quimioluminiscente, se puede requerir que se descubra menos porción de la membrana de ensayo. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado se mueve de manera que ya no puede ser vista o detectada a través de la abertura de entrada. En algunas realizaciones, el movimiento de la almohadilla de conjugado puede crear otra abertura distinta de la abertura de entrada para visualizar o detectar la membrana de ensayo.

5 En algunas realizaciones, el miembro de conexión también está conectado a la membrana impermeable o hidrófoba. Cuando se mueve el miembro de conexión, el movimiento también moverá o retirará la membrana impermeable o hidrófoba. Tal como se discute en la presente memoria, la presencia de la membrana impermeable o hidrófoba puede permitir que la muestra de ensayo permanezca o descansa sobre la membrana de ensayo mediante la ralentización o detención del flujo vertical. Cuando se mueve o se retira la membrana impermeable o hidrófoba, ya sea por su conexión al miembro de conexión o por otros medios, el flujo vertical ya no se ve dificultado o inhibido.

10 En algunas realizaciones, la carcasa comprende un botón deslizante. El botón deslizante también puede ser denominado miembro deslizante. El botón deslizante puede cruzar las superficies interna y externa de la carcasa. En algunas realizaciones, el botón deslizante o miembro deslizante sobresale de una superficie externa de la carcasa. En algunas realizaciones, el botón deslizante está conectado directa o indirectamente al miembro bloqueante. Cuando el botón deslizante está conectado (directa o indirectamente) al miembro bloqueante, el movimiento del botón deslizante también mueve el miembro bloqueante. En algunas realizaciones, el miembro de conexión puede estar conectado al botón deslizante. El miembro de conexión está conectado tanto al botón deslizante como al miembro bloqueante. El botón deslizante y el miembro bloqueante también pueden estar
15

20 En algunas realizaciones, la abertura de entrada comprende una abertura seleccionada de un intervalo de aproximadamente 0,2-20 cm². En algunas realizaciones, la abertura de entrada tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 cm de diámetro. En algunas realizaciones, la abertura de entrada tiene aproximadamente 1 o aproximadamente 1,5 cm de diámetro. En algunas realizaciones, la abertura de entrada tiene aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 cm de diámetro.

25 Tal como se discute en la presente memoria, la almohadilla de conjugado puede comprender un reactivo de captura específico de antígeno. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado comprende una pluralidad de reactivos de captura específicos de antígeno. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado comprende 1, 2, 3, 4 o 5 reactivos de captura específicos de antígeno. El antígeno puede ser cualquier molécula que pueda ser reconocida específicamente por un reactivo de captura. Los ejemplos de antígeno incluyen una molécula de polinucleótido (por ejemplo, DNA, RNA, siRNA, oligonucleótidos antisentido), un péptido, una proteína, un sacárido, un polisacárido, un hidrato de carbono y similares. El antígeno también puede referirse a diferentes epítopos presentes en la misma proteína o polipéptido.

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

30 En algunas realizaciones, la proteína es una proteína patógena. Una proteína patógena se refiere a una proteína que procede de un patógeno. Los ejemplos de patógenos incluyen, pero sin limitación, virus, procariotas y organismos eucariotas patógenos tales como organismos patógenos unicelulares y parásitos multicelulares. Los patógenos también pueden incluir agentes patógenos protozoarios que incluyan una etapa en el ciclo vital en la cual sean patógenos intracelulares. Tal como se utiliza en la presente memoria, se entiende que la expresión "patógeno intracelular" se refiere a un virus u organismo patógeno que, por lo menos en parte de su ciclo reproductivo o vital,
35

40 Los patógenos bacterianos incluyen, pero sin limitación, patógenos bacterianos tales como cocos gram positivos, que incluyen, pero sin limitación: neumococos; estafilococos y estreptococos. Los cocos gram negativos patógenos incluyen: meningococos y gonococos. Los bacilos gram negativos entéricos patógenos incluyen: enterobacterias; pseudomonas, acinetobacteria y eikenella; melioidosis; salmonella; shigelosis; haemophilus; chancroide; brucelosis; tularemia; yersinia (pasteurella); streptobacillus moniliformis y spirillum; listeria monocytogenes; erysipelothrix rhusiopathiae; difteria; cólera; ántrax; donovanosis (granuloma inguinal); y bartonellosis. Las bacterias anaerobias patógenas incluyen: tétanos; botulismo; otros clostridios; tuberculosis; lepra; y otras micobacterias. Las enfermedades por espiroquetas patógenas incluyen: sífilis; treponematosi: pián, pinta y sífilis endémica; y leptospirosis. Otras infecciones causadas por bacterias patógenas superiores y hongos patógenos incluyen: actinomycosis; nocardiosis; criptococosis, blastomycosis, histoplasmosis y coccidioidomycosis; candidiasis, aspergilosis y mucormycosis; esporotricosis; paracoccidioidomycosis, petriellidiosis, torulopsosis, micetoma y cromomycosis; y dermatofitosis. Las infecciones rickettsiales incluyen rickettsiales y rickettsiosis. Los ejemplos de infecciones por micoplasmas y clamidiales incluyen: mycoplasma pneumoniae; linfogranuloma venéreo; psitacosis; e
50

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

55 Los ejemplos de virus incluyen, pero sin limitación, VIH, hepatitis A, B, y C, FIV, lentivirus, pestivirus, virus del Nilo occidental, sarampión, viruela, viruela vacuna, ébola, coronavirus y similares. También se describen otros patógenos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20080139494.

En algunas realizaciones, el patógeno es un patógeno de transmisión alimentaria. El antígeno puede estar presente en un patógeno de transmisión alimentaria. Son patógenos de transmisión alimentaria los patógenos (por ejemplo, víricos o bacterianos) que causan enfermedad después de haber ingerido alimento contaminado. El alimento en sí no causa directamente la enfermedad, sino que es más bien el consumo del patógeno de transmisión alimentaria que está presente en el alimento lo que causa la enfermedad. En algunas realizaciones, el patógeno de transmisión alimentaria es *E. coli*, *Campylobacter*, o *Salmonella*. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno seleccionado de un antígeno de patógeno de transmisión alimentaria. Por ejemplo, el antígeno de patógeno de transmisión alimentaria puede estar seleccionado, pero sin limitación, de un antígeno de *E. coli*, un antígeno de *Campylobacter* o un antígeno de *Salmonella*. En algunas realizaciones, el antígeno es el O-antígeno específico de especie. En algunas realizaciones, el O-antígeno es el O-antígeno de *E. coli* y/o de *Salmonella*, y se puede utilizar para detección de *E. coli* y *Salmonella*. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno de flagelina. En algunas realizaciones, el antígeno es antígeno de flagelina de *Campylobacter*.

En algunas realizaciones, el reactivo de captura comprende un reactivo de detección. El reactivo de detección puede ser cualquier reactivo que se pueda utilizar para detectar la presencia de la unión del reactivo de captura a su copartícipe específico de unión. El reactivo de captura puede comprender directamente un reactivo de detección, o bien el reactivo de captura puede comprender una partícula que comprende el reactivo de detección. En algunas realizaciones, el reactivo de captura y/o la partícula comprenden un color, oro coloidal, marca radiactiva, marca fluorescente o un sustrato quimioluminiscente. La partícula puede ser, por ejemplo, una partícula vírica, una partícula de látex, una partícula lipídica o una partícula fluorescente. En algunas realizaciones, el oro coloidal tiene un tamaño de diámetro de: aproximadamente 20 nm, aproximadamente 30 nm o aproximadamente 40 nm, o bien estar en el intervalo de aproximadamente 20-30 nm, aproximadamente 20-40 nm, aproximadamente 30-40 nm o aproximadamente 35-40 nm.

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

Los reactivos de captura de la presente invención pueden incluir también un anti-anticuerpo, es decir, un anticuerpo que reconoce otro anticuerpo pero no es específico para un antígeno, tal como, pero sin limitación, anticuerpo anti-IgG, anti-IgM o anti-IgE. Cuando la membrana de ensayo comprende un anti-anticuerpo, tal como anticuerpo anti-IgG, anti-IgM o anti-IgE, se puede utilizar este anticuerpo no específico como un testigo positivo para detectar si el conjugado ha sido liberado de la almohadilla de conjugado. Cuando se aplica la muestra al dispositivo, esto permite que de la almohadilla de conjugado se libere un primer reactivo de captura. Cuando el reactivo de captura es liberado y fluye a través del dispositivo, ya sea unido al antígeno o no, puede entrar en contacto con el anti-anticuerpo, por ejemplo anticuerpo anti-IgG o anti-IgM, que puede ser detectado posteriormente. Esta detección se puede emplear para demostrar que el dispositivo está funcionando correctamente.

En algunas realizaciones, la membrana de ensayo comprende un segundo reactivo de captura específico de antígeno. En algunas realizaciones, la membrana de ensayo comprende una primera zona que comprende un primer reactivo de captura que comprende un reactivo de captura anti-IgG; y una segunda zona que comprende un segundo reactivo de captura específico de antígeno, en donde las primera y segunda zonas no se superponen o coinciden por completo una con otra. Esta realización no limitante se puede emplear para demostrar que el dispositivo está funcionando correctamente y emplearse para detectar la presencia del antígeno de interés.

En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado comprende un primer reactivo de captura específico de antígeno y la membrana de ensayo comprende un segundo reactivo de captura específico de antígeno, en donde los primer y segundo reactivos de captura específicos de antígeno se unen a epítomos no competitivos presentes sobre el antígeno. El dispositivo puede utilizar, por ejemplo, un ensayo de tipo sándwich que tiene lugar en dos pasos. El primer paso es la unión del antígeno al reactivo de captura presente en la almohadilla de conjugado. Después de unirse al primer reactivo de captura específico de antígeno, el antígeno puede fluir a través de o entrar en contacto con la membrana de ensayo, en donde está presente un segundo reactivo de captura específico de antígeno. Tras la interacción con la membrana de ensayo, si el antígeno de prueba puede unirse al segundo reactivo de captura específico de antígeno podrá ser detectado, ya sea mediante visualización o mediante el uso de otro dispositivo de detección tal como, pero sin limitación, un lector fluorescente. La membrana de ensayo y la almohadilla de conjugado pueden comprender reactivos de captura específicos de antígeno adicionales que reconozcan diferentes antígenos o diferentes epítomos. En algunas realizaciones, la membrana de ensayo o la almohadilla de conjugado comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 reactivos de captura específicos de antígeno. En algunas realizaciones, la membrana de ensayo o la almohadilla de conjugado comprenden una pluralidad de reactivos de captura específicos de antígeno. En algunas realizaciones, cada reactivo de captura específico de antígeno reconoce un antígeno diferente o un epítopo diferente sobre el mismo antígeno.

La expresión "diferentes antígenos" también se puede referir a la misma proteína, pero una proteína que proceda de diferentes cepas del mismo organismo. Diferentes antígenos también se puede referir a antígenos procedentes de diferentes organismos. Por ejemplo, existen muchas cepas de *E. coli*. No todas las cepas de *E. coli* provocan una enfermedad de transmisión alimentaria. La presente invención se puede utilizar, por ejemplo, para detectar un antígeno de una cepa patógena de *E. coli* por contraposición a la detección de un antígeno procedente de una cepa no patógena de *E. coli*. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado y/o la membrana de ensayo comprenden un primer y un segundo reactivos de captura específicos de antígeno, en donde dichos primer y

segundo reactivos de captura reconocen diferentes antígenos. En algunas realizaciones, la membrana de ensayo y/o la almohadilla de conjugado comprenden una pluralidad de zonas que comprenden una pluralidad de reactivos de captura específicos de antígeno, en donde la pluralidad de reactivos de captura específicos de antígeno reconocen diferentes antígenos. En algunas realizaciones, la pluralidad de áreas no se solapan o coinciden por completo una con otra. En algunas realizaciones, la pluralidad de antígenos se seleccionan cada uno, de manera independiente, de un antígeno de *E. coli*, un antígeno de *Campylobacter* y un antígeno de *Salmonella*. En algunas realizaciones de la presente invención, la pluralidad de antígenos es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 antígenos.

Los dispositivos pueden estar alojados individualmente, en parejas o en configuraciones múltiples. La carcasa puede ser estanca para evitar fugas, y puede fabricarse a partir de una variedad de materiales inertes, tales como materiales poliméricos. La abertura de entrada, en algunas realizaciones, puede tener un volumen suficiente para contener cualquier cantidad requerida de muestra o reactivos que se vayan a utilizar con la invención.

Dado que las membranas o almohadillas del dispositivo son de preferencia químicamente inertes, puede que tengan que ser activadas en cualquier sitio de reacción donde se desee inmovilizar un reactivo de unión específico contra el transporte por disolvente. Pueden ser necesarios diversos métodos para inmovilizar el reactivo según la naturaleza química particular del reactivo. En general, cuando el medio es nitrocelulosa o un éster mixto de nitrocelulosa, no se requiere ninguna unión química especial para la inmovilización de reactivos. Para otros materiales y reactivos se pueden utilizar diversas técnicas ser que incluyen la funcionalización con materiales tales como carbonildiimidazol, glutaraldehído o ácido succínico, o el tratamiento con materiales tales como bromuro de cianógeno. Otras reacciones adecuadas incluyen tratamiento con bases de Schiff y borohidruro para la reducción de grupos aldehído, carbonilo y amino. El ADN, ARN y determinados antígenos pueden ser inmovilizados frente al transporte por disolvente calentándolos en estufa sobre el material cromatográfico. El calentamiento en estufa se puede llevar a cabo a temperaturas que abarcan de aproximadamente 60°C a aproximadamente 120°C durante tiempos que abarcan de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente 12 horas y, en algunas realizaciones, a aproximadamente a 80°C durante aproximadamente dos horas.

La presente invención también proporciona sistemas que comprenden los dispositivos descritos en la presente memoria y un recipiente de tampón. El recipiente de tampón puede ser cualquier tampón que pueda mezclarse con la muestra que está siendo ensayada y después aplicarse al dispositivo. Por ejemplo, se puede tomar la muestra de una fuente y se puede mezclar la muestra con el tampón. El tampón puede ser un tampón de lisis que lise las células, o bien un tampón que mantenga el pH de la muestra de modo que se pueda realizar correctamente el análisis. El contenedor de tampón puede tener cualquier forma y puede estar incluido fuera o dentro de la carcasa del dispositivo.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un sistema que comprende un colector de muestra. El colector de muestra puede ser cualquier material que pueda tomar una muestra de una fuente y permitir que la muestra sea ensayada. Por ejemplo, el colector de muestra puede ser un bastoncillo, por ejemplo un bastoncillo de algodón. En algunas realizaciones, el colector de muestra es un inoculador. En algunas realizaciones, la carcasa comprende el colector de muestra y una parte del colector de muestra se encuentra en el interior de la carcasa. En algunas realizaciones, el colector de muestra está parcialmente fuera y parcialmente dentro de la carcasa. En algunas realizaciones, el colector de muestra está por completo fuera de la carcasa.

La presente invención también proporciona kits que comprenden los dispositivos descritos en la presente memoria. El kit incluye un dispositivo tal como se describe en el presente documento y uno o más de un colector de muestra, un recipiente de tampón, un manual de instrucciones, un testigo positivo o un testigo negativo. En relación con el kit, un testigo positivo es una muestra que se sabe contiene el antígeno que puede ser detectado con el dispositivo presente en el kit. Contrariamente, el testigo negativo no contendría un antígeno que pudiera ser detectado por el kit. El testigo negativo, utilizado junto con el anti-anticuerpo, podría demostrar que el dispositivo está funcionando correctamente.

También se pueden incluir tampones en la presente invención. Los ejemplos de tampones incluyen, pero sin limitación, 1X PBS (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM), un tampón de lavado (por ejemplo, fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,5%, azida sódica al 0,05%), un tampón de membrana (por ejemplo, fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 0,1%, BSA al 0,1%, PVP-40 al 0,2%, pH 7,21, filtrado con filtro de 0,2 µm), tampón de bloqueo de conjugado policlonal (por ejemplo borato 50 mM, BSA al 10%, pH 8,93); diluyente de conjugado policlonal (por ejemplo borato 50 mM, BSA al 1%, pH 9,09), o tampones de bloqueo (por ejemplo, fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 0,1%, Silwet al 0,025%, pH 7,42; fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 1%, trehalosa al 1%, BSA al 0,01%, Tween-20 al 0,025%; azida sódica al 0,05%, Silwet al 0,025%, pH 7,4; fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 0,1%, BSA al 0,1%, PVP-40 al 0,2%, pH 7,21). El tampón puede ser también, pero sin limitación, un tampón de bloqueo (por ejemplo, BSA al 10% en agua desionizada, pH 7,4, o BSA al 1% en agua desionizada, pH 7,4); borato 10 mM, BSA al 3%, PVP40 al 1% y Tween-100 al 0,25%; y similares.

Se pueden poner en contacto la almohadilla de conjugado y la membrana de ensayo con cualquiera de los tampones descritos en la presente memoria, ya sea en presencia o en ausencia de un reactivo de captura, y, en algunas realizaciones, dejarse secar.

Los ejemplos de tampones que son tampones de lisis incluyen por ejemplo, pero sin limitación, Tween al 2% (v/v) y Triton al 0,1% (v/v); Tween al 2% (v/v) y SDS al 0,1% (p/v); Tween al 2% (v/v) y BSA al 0,1% (p/v); Tween al 2% (v/v) y BSA al 1% (p/v), SDS al 0,1% (p/v), BSA al 1% (p/v), o cualquier combinación de los mismos. Los tampones de lisis también pueden ser, por ejemplo, Tween al 5%/PBS; Tween al 2%/PBS + SDS al 0,1%; Tween al 2%/PBS + BSA al 1%. Otros ejemplos de tampones de lisis incluyen, pero sin limitación, Tween-80 al 5% (v/v); Triton X-100 al 5% (v/v); NP40 al 5% (v/v); Tween-80 al 2% (v/v); Triton X-100 al 2% (v/v); NP40 al 2% (v/v); Tween-80 al 1% (v/v); Triton X-100 al 1% (v/v); y NP40 al 1% (v/v). Los detergentes y otros componentes de los tampones se pueden preparar con cualquier tampón adecuado para proteínas, e incluyen, pero sin limitación, agua y solución salina tamponada con fosfato. Los tampones de lisis se pueden utilizar para preparar las muestras antes de que las muestras entren en contacto con los dispositivos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, no se utiliza un tampón de lisis. No se utiliza un tampón de lisis en una muestra cuando se desea detectar una proteína de superficie o antígeno de superficie. Por consiguiente, en algunas realizaciones la muestra no es sometida a lisis o a condiciones que podrían causar que una célula se lisase.

La presente invención también proporciona métodos para detectar un antígeno que comprenden poner en contacto una muestra con un dispositivo tal como se describe en la presente memoria, en donde la muestra entra en contacto con la almohadilla de conjugado y la membrana de ensayo, en donde una reacción positiva con la membrana de ensayo indica la presencia del antígeno, en donde la almohadilla de conjugado comprende un primer reactivo de captura específico de antígeno y la membrana de ensayo comprende un segundo reactivo de captura específico de antígeno. Una reacción positiva se evidencia por la unión del reactivo de captura presente en la membrana de ensayo a un antígeno de la muestra de ensayo. El reactivo de captura de la membrana de ensayo se aplica a la membrana de ensayo para que indique una reacción positiva cuando se una a su antígeno específico. El reactivo de captura específico se puede aplicar de cualquier manera tal que cuando se detecte pueda formar una línea, un círculo, un signo más, una línea quebrada, una "X" o cualquier otro patrón. En algunas realizaciones, la línea de control que indica que el dispositivo está funcionando correctamente cruzará la línea específica de antígeno, y cuando el reactivo de captura específico de antígeno se una al antígeno, el marcador detectable formará un signo más.

En algunas realizaciones, una muestra entra en contacto con el dispositivo, lo que va seguido después por la aplicación de un tampón al dispositivo después que la muestra haya entrado en contacto con el dispositivo. Por ejemplo, se puede poner en contacto con la almohadilla de conjugado una muestra que comprenda un antígeno, de manera que la muestra sea transferida a la almohadilla de conjugado. Tras el contacto con la almohadilla de conjugado, se puede aplicar al dispositivo una solución separada, a fin de facilitar o iniciar el flujo vertical a través de los dispositivos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, tal como se describe en la presente memoria, el reactivo de captura es un anticuerpo. En algunas realizaciones, la muestra que se ensaya es una solución, pero también puede ser una mezcla de solución o tampón y material sólido que puede ser aplicada al dispositivo. La solución solubilizará entonces el antígeno y permitirá que el reactivo de captura de la almohadilla de conjugado entre en contacto con los antígenos presentes en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra comprende un lisado celular. En algunas realizaciones, el lisado celular ha sido clarificado por centrifugación u otros medios, para eliminar materiales no solubles.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una muestra de ensayo con un colector de muestra y poner en contacto el colector de muestra con el dispositivo. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto el colector de muestra con una solución o tampón, en donde la solución o tampón se aplica al dispositivo. En algunas realizaciones, se ponen en contacto las muestras con la almohadilla de conjugado antes de que la muestra entre en contacto con la membrana de ensayo. En algunas realizaciones, se pone en contacto la muestra con la almohadilla de conjugado y la membrana de ensayo de forma simultánea.

En algunas realizaciones, el método comprende mover la almohadilla de conjugado de los dispositivos descritos en el presente documento, en donde el movimiento de los dispositivos expone la membrana de ensayo para la detección. En algunas realizaciones, el miembro bloqueante mueve la almohadilla de conjugado. En algunas realizaciones, la almohadilla de conjugado está conectada al miembro bloqueante y/o al miembro de botón deslizante. El antígeno para cuya detección se puede utilizar el método puede ser cualquier antígeno. El antígeno puede ser los que se describen en la presente memoria o bien cualquier otro antígeno que pueda ser detectado utilizando los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el método comprende aplicar la muestra al dispositivo y permitir que la muestra fluya a través del dispositivo mediante flujo vertical.

En algunas realizaciones, la detección o indicación de la presencia o ausencia de un antígeno se produce en menos de 60 segundos. En algunas realizaciones, la detección o indicación de la presencia o ausencia de un antígeno se produce en aproximadamente 30 a aproximadamente 60 segundos. En algunas realizaciones, la detección o indicación de la presencia o ausencia de un antígeno se produce en menos de 2 minutos. En algunas realizaciones, la detección o indicación de la presencia o ausencia de un antígeno se produce en aproximadamente 30 segundos.

Haciendo referencia a los dibujos, en algunas realizaciones, las Figuras 1 a 10 representan dispositivos representativos, componentes de un dispositivo y diversas vistas de un dispositivo. La Figura 1 representa un

- dispositivo que comprende un primer miembro (10) de carcasa, un recipiente (15) de tampón, un segundo miembro (20) de carcasa, una ranura (25) para el botón deslizante, un botón deslizante (30), una abertura (35) de entrada, un aro (40) y una membrana (45) de ensayo. La Figura 1 representa una membrana (45) de ensayo que comprende dos reactivos de captura. El primer (10) y segundo (20) miembros de carcasa también pueden ser denominados miembros de carcasa inferior y superior, respectivamente. En la Figura 1, la muestra sería aplicada a través de la abertura (35) de entrada y puede permitirse que fluya verticalmente a través de la membrana (45) de ensayo. En la Figura 1, la ranura (25) permite que el botón deslizante se mueva, lo cual, cuando está conectado al miembro bloqueante, mueve el miembro bloqueante y puede, en algunas realizaciones, mover la almohadilla de conjugado y cambiar la posición del miembro de fuerza.
- La Figura 2 representa un dispositivo que comprende un primer miembro (10) de carcasa, un segundo miembro (20) de carcasa, una ranura (25) para el botón deslizante, un botón deslizante (30), una abertura (35) de entrada, un aro (40), una membrana (45) de ensayo, una almohadilla (50) de conjugado, una pluralidad de miembros absorbentes (por ejemplo, almohadillas) (55), un miembro (60) de conexión, un miembro bloqueante (65) y un miembro (70) de fuerza. La Figura 2 representa la almohadilla (50) de conjugado, membrana (45) de ensayo y la almohadilla absorbente (55) dispuestas sustancialmente paralelas entre sí. El miembro (70) de fuerza, cuando está en contacto con el miembro absorbente, estaría aplicando presión que es sustancialmente perpendicular a la almohadilla de conjugado. Como puede verse en la Figura 2, una muestra que fuera puesta en contacto con el dispositivo a través de la abertura (35) de entrada fluiría verticalmente a través de la almohadilla (50) de conjugado hacia la membrana (45) de ensayo. No se muestra explícitamente en la Figura 2, pero, en algunas realizaciones, una membrana permeable es también sustancialmente paralela a la almohadilla (50) de conjugado y a la membrana (45) de ensayo, con una primera superficie de la membrana permeable que entra en contacto con una superficie de la almohadilla (50) de conjugado, una segunda superficie de la membrana permeable que entra en contacto con una superficie de la membrana (45) de ensayo.
- La Figura 3 representa una almohadilla (45) de conjugado, una membrana permeable (75), una membrana (45) de ensayo y una pluralidad de miembros absorbentes (55). La Figura 3 muestra los componentes sustancialmente paralelos entre sí. La Figura 3 representa la membrana permeable (75) que comprende una abertura. Esta abertura se puede utilizar para permitir la visualización y detección de los resultados de la membrana de ensayo.
- La Figura 4 representa un dispositivo que comprende un primer miembro (10) de carcasa, un recipiente (15) de tampón, un segundo miembro (20) de carcasa, un botón deslizante (30), una membrana (45) de ensayo, una almohadilla (50) de conjugado, una membrana permeable (75), una pluralidad de miembros absorbentes (55) (por ejemplo, almohadillas), un miembro (60) de conexión, un miembro bloqueante (65) y un miembro (70) de fuerza. La Figura 4 también representa el miembro (70) de fuerza que comprende un vástago (72) y una cabeza (71), en donde la cabeza (71) es más ancha que el vástago (72).
- La Figura 5 representa una vista parcial de un dispositivo que comprende un primer miembro (10) de carcasa, un miembro bloqueante (65), un botón deslizante (30) y el miembro (70) de fuerza. La Figura 5 representa el miembro bloqueante (65) en contacto con el miembro (70) de fuerza de manera que el miembro (70) de fuerza está en una posición alzada. La Figura 5 también representa el movimiento del miembro bloqueante (65) y del botón deslizante (30) alejándose del miembro (70) de fuerza, lo que permite al miembro de fuerza cambiar de posición. En algunas realizaciones, el cambio de posición consiste en que el miembro de fuerza se baja.
- La Figura 6 representa una vista lateral en sección de un dispositivo que comprende un primer miembro (10) de carcasa, un segundo miembro (20) de carcasa, un botón deslizante (30), un miembro bloqueante (65), un aro (40), una junta tórica (41), un miembro (70) de fuerza y un soporte (73) para el miembro de fuerza. El soporte para el vástago puede ser, por ejemplo, parte del primer miembro (10) de carcasa, y está sombreado diferente sólo con fines ilustrativos. La Figura 6 representa el botón (30) en contacto con el miembro bloqueante (65) de manera que el movimiento del botón (30) mueve el miembro bloqueante (65). El movimiento del miembro bloqueante (65) quitará el apoyo del miembro (70) de fuerza, lo que permitirá que el miembro (70) de fuerza cambie de posición. La Figura 6 también representa el vástago (72) y la cabeza (71) del miembro de fuerza. La cabeza (71) crea un labio debajo del cual puede deslizarse el miembro bloqueante (65) y soportar el miembro (70) de fuerza.
- La Figura 7 representa una vista parcial de un dispositivo que comprende un primer miembro (10) de carcasa, un segundo miembro (20) de carcasa, una abertura de entrada (35), una membrana (45) de ensayo, una almohadilla (50) de conjugado, una pluralidad de miembros absorbentes (55), un miembro (60) de conexión, un miembro bloqueante (65) y un miembro (70) de fuerza. La Figura 8 representa el miembro (60) de conexión conectado a la almohadilla (50) de conjugado y al miembro bloqueante (65). La Figura 8 también representa la almohadilla de conjugado que está siendo comprimida contra el segundo miembro (20) de carcasa y el perímetro de la abertura (35) de entrada. La Figura 7 representa la cabeza (71) del miembro de fuerza aplicando la presión al entrar en contacto con la pluralidad de miembros absorbentes (55). En la Figura 9, se puede aplicar una muestra al dispositivo a través de la abertura (35) de entrada de manera la muestra entre en contacto con la almohadilla (50) de conjugado y, debido a la presión, la muestra entre en contacto, mediante flujo vertical, con la membrana (45) de ensayo.
- La Figura 8 representa una vista parcial de un dispositivo que comprende un primer miembro (10) de carcasa, un segundo miembro (20) de carcasa, una abertura (35) de entrada, una membrana (45) de ensayo, una almohadilla

5 (50) de conjugado, una pluralidad de miembros absorbentes (55), un miembro (60) de conexión, un miembro bloqueante (65) y un miembro (70) de fuerza. La Figura 8 representa el movimiento del miembro bloqueante (65), que está unido al miembro (60) de conexión. El movimiento del miembro (60) de conexión, que está unido a la almohadilla (50) de conjugado, mueve la almohadilla de conjugado. La Figura 8 representa el miembro (70) de fuerza de ensayo cambiando de posición, y una disminución o eliminación de la presión y/o compresión de la membrana (45) de ensayo. La Figura 9 también representa el movimiento de la almohadilla (50) de conjugado alejándose de la abertura (35) de entrada, descubriendo la membrana (45) de ensayo para visualización y/o detección.

10 La Figura 9 representa un miembro (60) de conexión unido a una almohadilla (50) de conjugado. La Figura 9 representa muescas (51) en la almohadilla (50) de conjugado como lugares para que se conecte el miembro (60) de conexión. El miembro de conexión también se puede conectar por otros medios tales como mediante adhesivos, grapas y otras formas de conexión.

15 La Figura 10 representa una vista parcial del dispositivo que comprende un segundo miembro (20) de carcasa, una pluralidad de almohadillas o membranas (80), en donde la pluralidad de almohadillas comprende una membrana de ensayo, una membrana permeable, y uno o más miembros absorbentes, y miembros (85) de retención que pueden retener la pluralidad de almohadillas o membranas (80). La Figura 10 representa las estructuras tales que, cuando se mueve la almohadilla de conjugado, la pluralidad de almohadillas permanecen en su lugar. Se puede utilizar cualquier medio u otra estructura para mantener la pluralidad de almohadillas en su lugar.

20 Se describe ahora la invención con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan exclusivamente con fines ilustrativos.

Ejemplos

Se calentó en estufa y se secó sobre la almohadilla de conjugado anticuerpo específico para E. coli 0157:H7 conjugado a oro coloidal. Se aplicó en forma de banda sobre una membrana de ensayo un segundo anticuerpo específico para E. Coli 0157:H7, y se montó en un dispositivo de detección de antígeno.

25 Una muestra que contenía LPS E. Coli 0157 se diluyó en serie en PBS a concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,56 µg/ml y 0,78 g/ml. Se aplicaron las muestras al dispositivo para detectar la presencia de LPS E. Coli 0157. Se calificaron los experimentos en base a la intensidad de la señal, y los resultados se muestran a continuación. Se utilizó PBS como testigo negativo. TL se refiere a la línea de ensayo (específico de antígeno) y CL se refiere a la línea testigo (no específico de antígeno). La detección se produjo en el transcurso de 30 a 60 segundos desde la aplicación de la muestra sobre la almohadilla de conjugado. El dispositivo
30 podría detectar la presencia de un antígeno de transmisión alimentaria.

Concentración de muestra	Calificación	
	TL	CL
100 µg/ml	6	8
50 µg/ml	6	8
25 µg/ml	4	8
12,5 µg/ml	4	8
6,25 µg/ml	3	8
3,125 µg/ml	3	8
1,56 µg/ml	1	8
0,78 µg/ml	1	8
1XPBS (testigo negativo)	1	8

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para detectar una molécula diana, que comprende:
una carcasa que comprende un primer y segundo miembros de carcasa, en donde la carcasa comprende:
5 una almohadilla de conjugado y una membrana de ensayo, en donde al menos una parte de la almohadilla de conjugado y la membrana de ensayo son sustancialmente paralelas entre sí;
un miembro absorbente, en donde el miembro absorbente es sustancialmente paralelo a la membrana de ensayo y está en contacto fluido con la misma;
una abertura de entrada en contacto fluido con la almohadilla de conjugado;
10 un miembro de fuerza, en donde el miembro de fuerza está configurado para aplicar presión de manera sustancialmente perpendicular a la membrana de ensayo;
un miembro bloqueante deslizable que entra en contacto con el miembro de fuerza, y
un miembro de conexión en contacto con el miembro bloqueante.
2. El dispositivo según la reivindicación 1, en donde los primer y segundo miembros de carcasa son una sola unidad.
3. El dispositivo según las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el miembro de conexión es flexible.
- 15 4. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el miembro de conexión entra en contacto con la almohadilla de conjugado.
5. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la almohadilla de conjugado y membrana de ensayo son comprimidas por el miembro de fuerza.
- 20 6. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la carcasa comprende además un botón deslizante conectado al miembro bloqueante.
7. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la almohadilla de conjugado comprende un primer reactivo de captura.
8. El dispositivo según la reivindicación 7, en donde la molécula diana detectada por el primer reactivo de captura es un polinucleótido, un péptido, una proteína, una proteína patógena, un polinucleótido patógeno, un sacárido o un hidrato de carbono.
- 25 9. El dispositivo según la reivindicación 7, en donde el primer reactivo de captura es un anticuerpo.
10. El dispositivo según la reivindicación 7, en donde el primer reactivo de captura comprende además oro coloidal, una molécula fluorescente, una marca radiactiva o un sustrato quimioluminiscente.
- 30 11. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la almohadilla de conjugado comprende una pluralidad de reactivos de captura, en donde la pluralidad de reactivos de captura se unen a diferentes moléculas diana.
12. El dispositivo según la reivindicación 11, en donde las diferentes moléculas diana se seleccionan cada una, de manera independiente, de una molécula diana de E. coli, una molécula diana de Campylobacter y una molécula diana de Salmonella.
- 35 13. El dispositivo según la reivindicación 1, en donde el miembro de fuerza está configurado para aplicar presión de manera perpendicular a la membrana de ensayo.
14. Un sistema que comprende un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, y un recipiente de tampón o un colector de muestra.
- 40 15. Un kit que comprende un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, y uno o más de un testigo positivo; un testigo negativo, un manual de instrucciones, un recipiente de tampón o un colector de muestra.
16. Un método para detectar una molécula diana que comprende que comprende:
poner en contacto una muestra con la almohadilla de conjugado del dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la muestra fluye verticalmente de la almohadilla de conjugado a la membrana de ensayo; e
45 identificar una reacción positiva o negativa para la molécula diana.

Figura 1

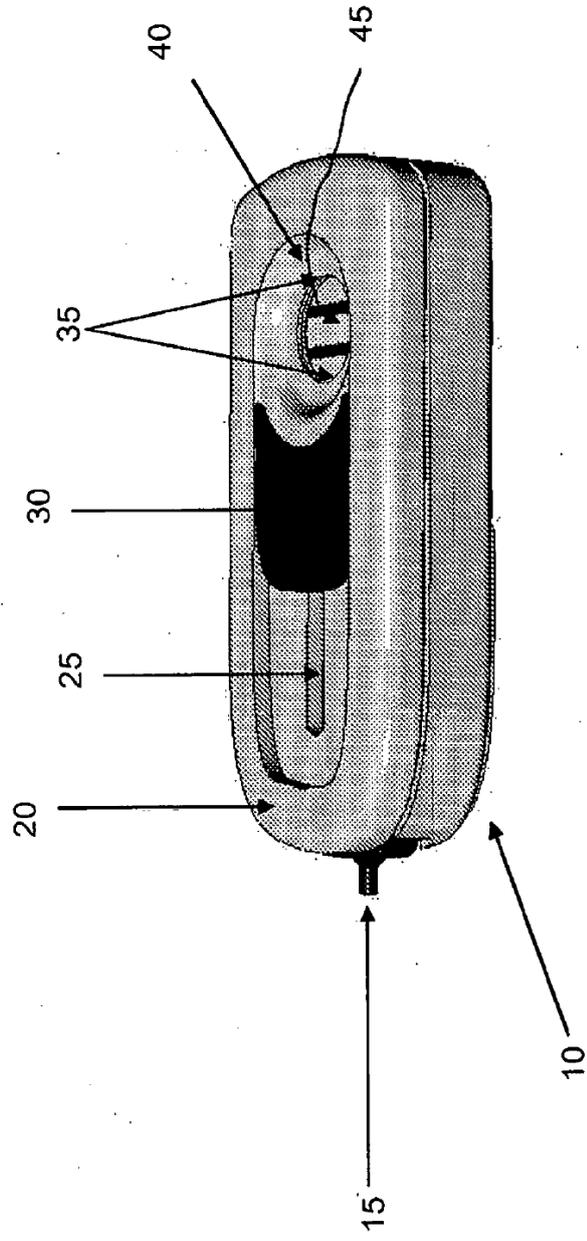


Figura 2

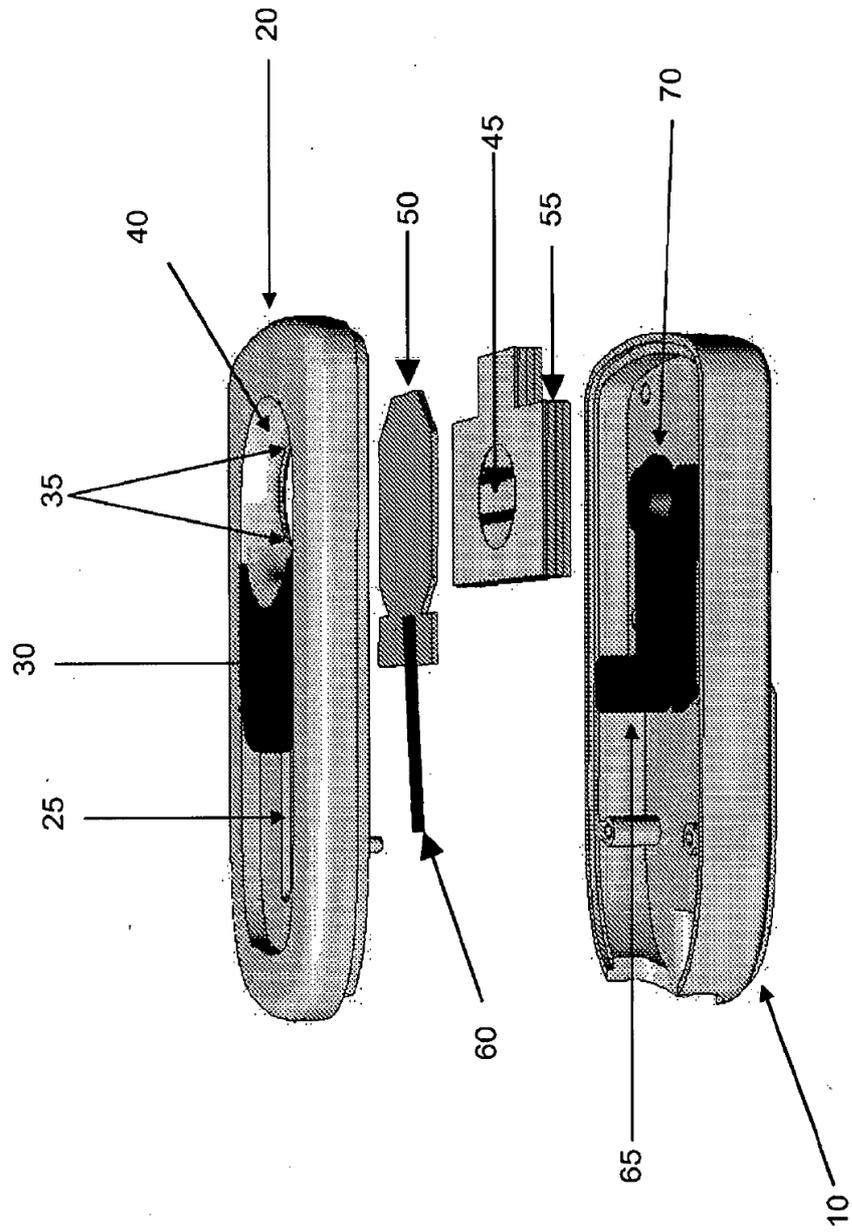


Figura 3

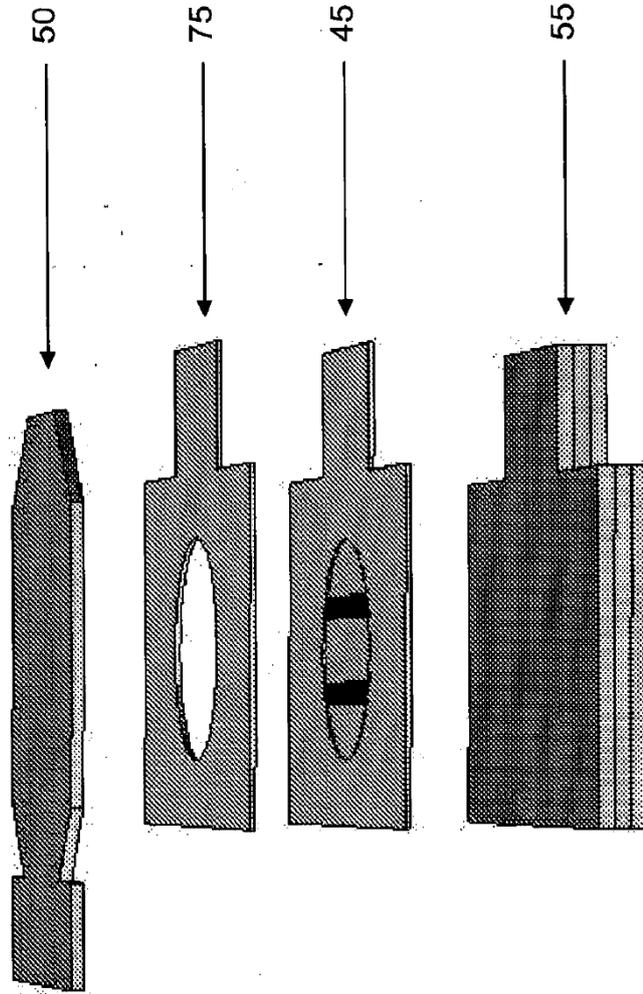


Figura 4

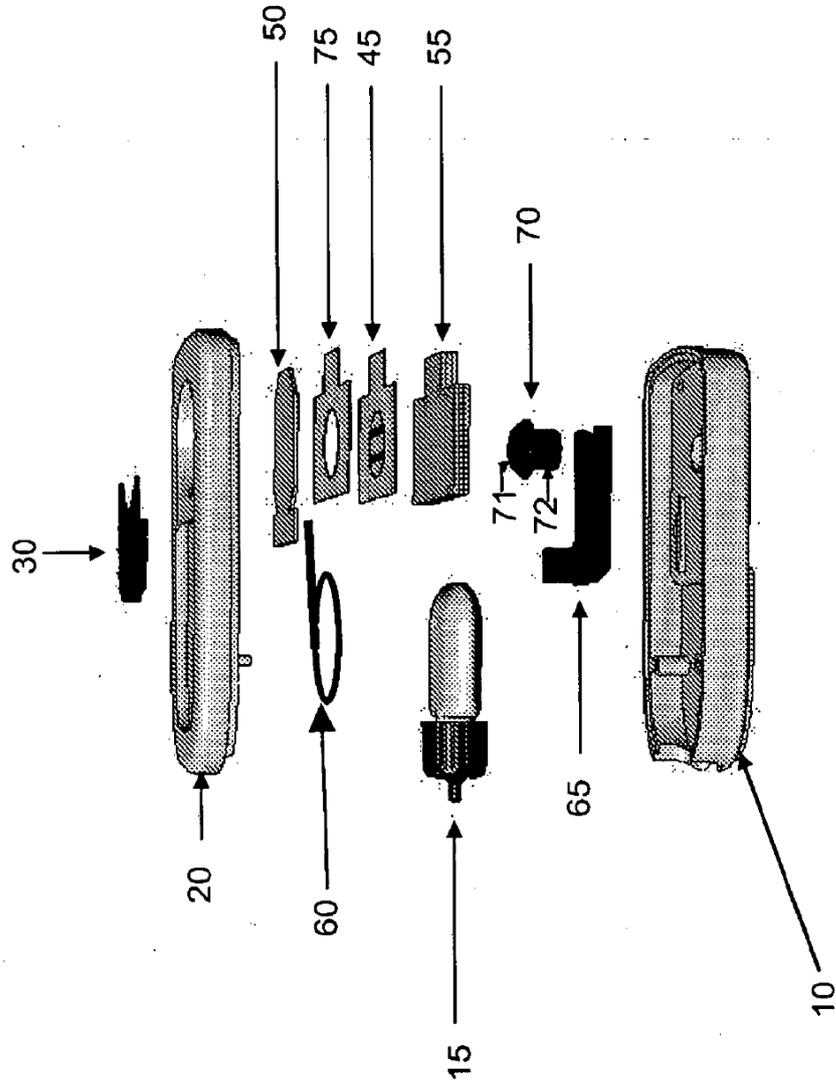
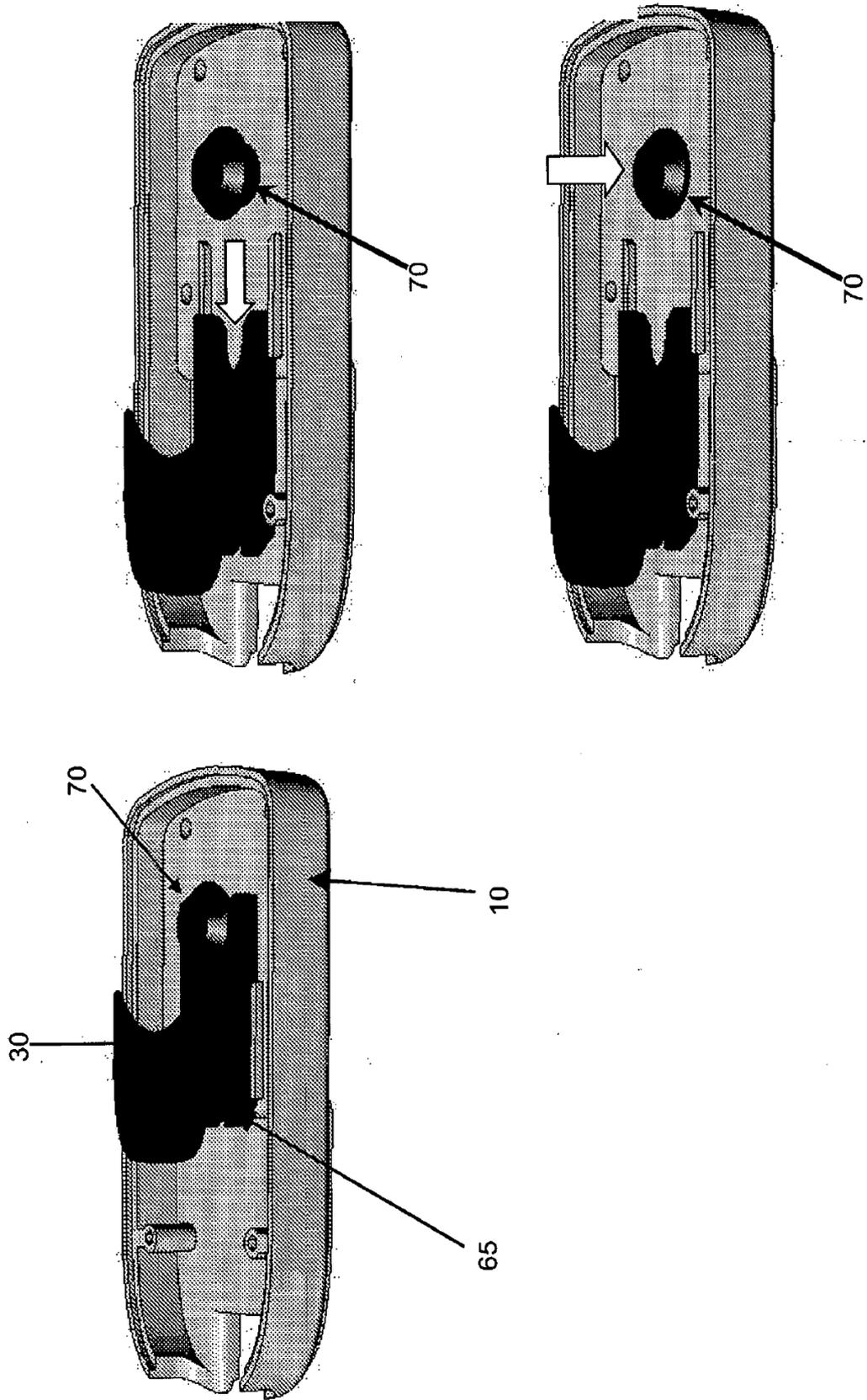


Figura 5



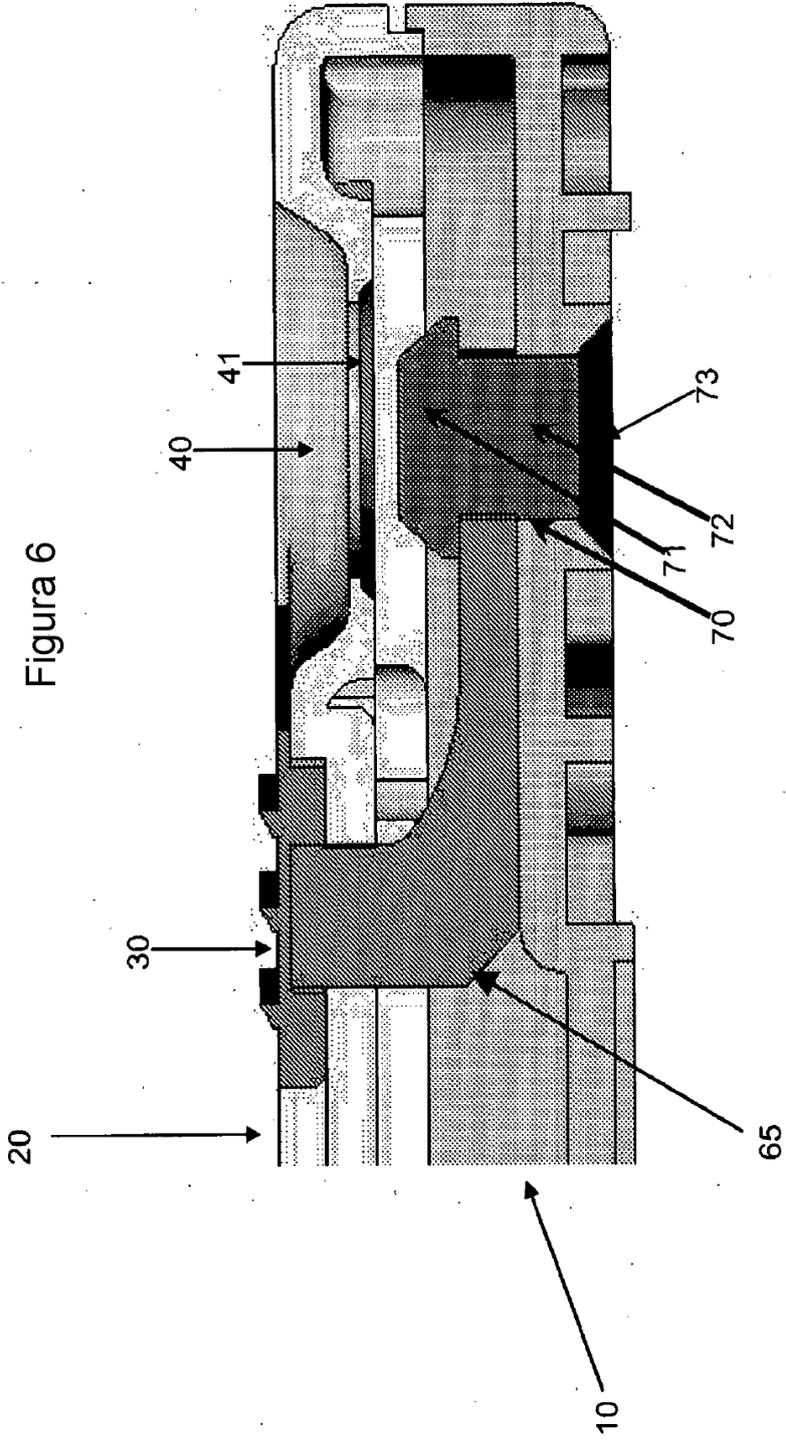


Figura 7

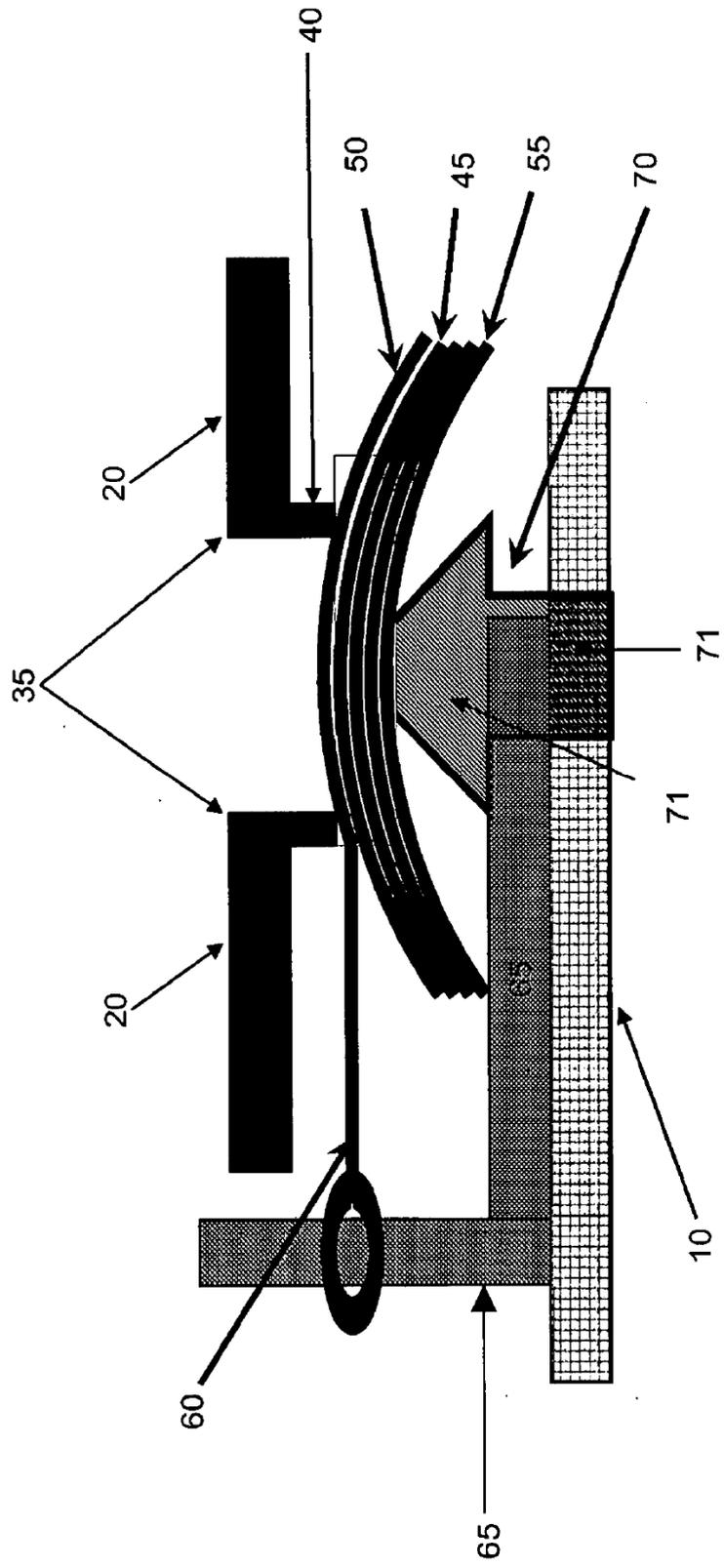


Figura 8

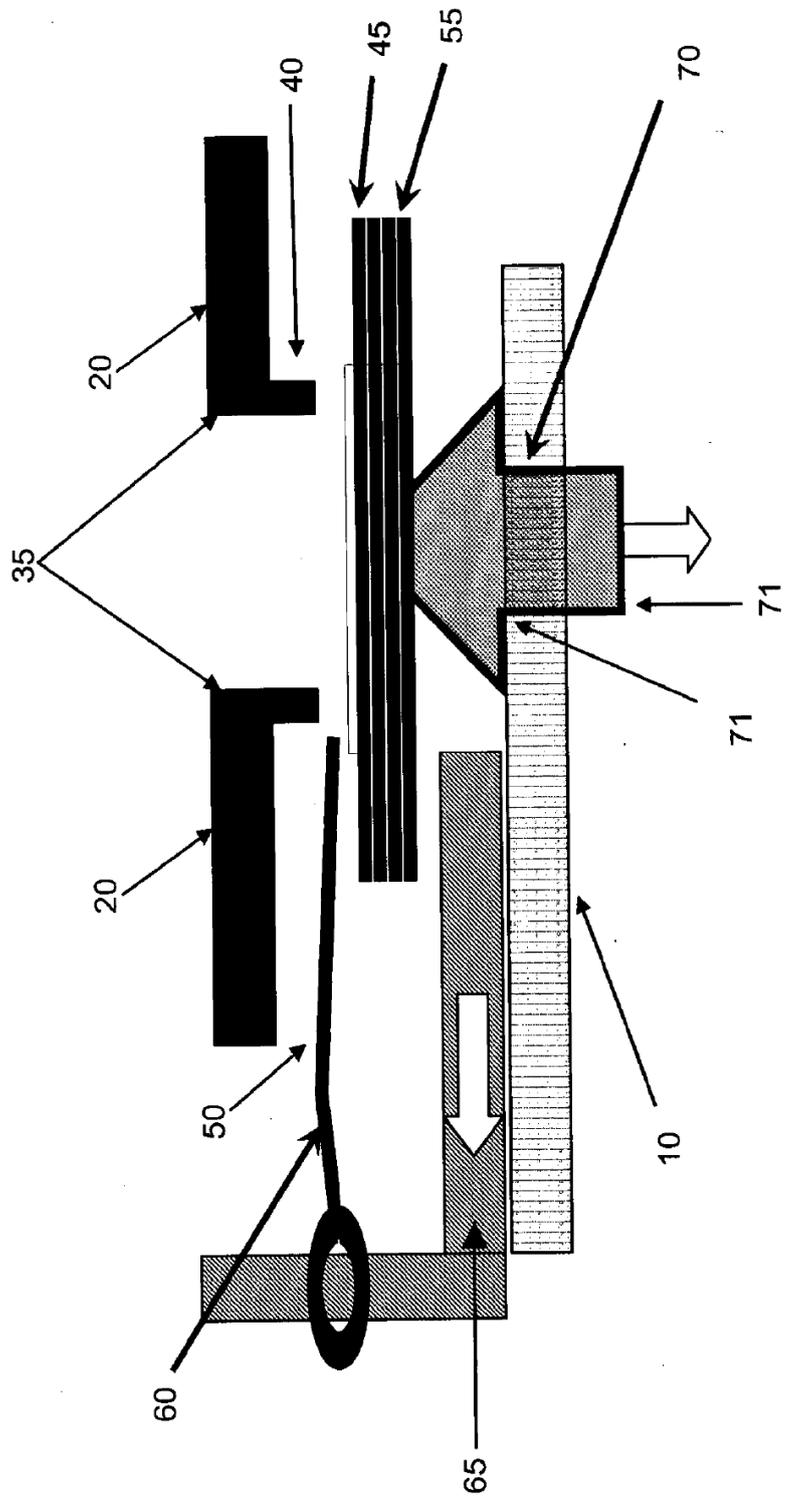


Figura 9

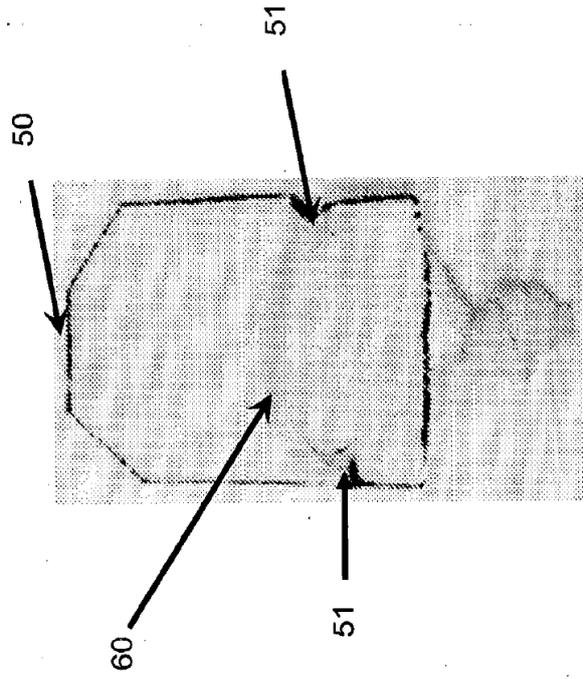


Figura 10

