

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 907**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2009 E 09729748 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2269067**

54 Título: **Dispositivo de ensayo que comprende medio formador de burbujas**

30 Prioridad:

12.04.2008 GB 0806771

26.11.2008 GB 0821552

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

30.04.2015

73 Titular/es:

**SPD SWISS PRECISION DIAGNOSTICS GMBH
(50.0%)**

**Route de Saint Georges 47 Petit-Lancy
1213 Geneva, CH y**

ALERE SWITZERLAND GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

**RAJ, BALBIR y
TOLLEY, DAVID**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 534 907 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 de ensayo que comprende medio formador de burbujas.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un dispositivo de ensayo, un método para controlar el flujo de un líquido por un dispositivo de ensayo durante la realización de un ensayo, un método para realizar un ensayo usando el dispositivo de ensayo y un método para fabricar un dispositivo de ensayo.

Antecedentes a la invención

10 Los dispositivos de ensayo desechables, baratos, por ej., de la clase usada de manera rutinaria en casa o punto de atención, tienden a encontrarse en uno de dos tipos: dispositivos de ensayo de flujo lateral y dispositivos microfluídicos.

15 Los dispositivos de ensayo de flujo lateral tal como se describen por la patente europea EP 291194, son los del tipo en que se aplica una muestra líquida, directamente o (más normalmente) indirectamente, a una matriz porosa, tal como una nitrocelulosa o filtro de papel. La muestra líquida migra por la matriz porosa, movilizándose en general un reactivo o componente de ensayo seco (típicamente un anticuerpo etiquetado tal como un anticuerpo etiquetado particularmente) inmovilizado de manera liberable sobre la matriz porosa. Típicamente, el anticuerpo etiquetado forma un complejo con el analito de interés en la muestra, complejo etiquetado que se captura después normalmente en una región de detección de la matriz porosa, mediante un segundo anticuerpo para el analito de interés. La acumulación del reactivo de unión etiquetado en la región o zona de detección es, por lo tanto, indicativo de la presencia, ausencia o extensión de analito en una muestra líquida. Se apreciará que existen otras variantes de ensayos de flujo lateral, en particular ensayos de formato de competición en que un reactivo etiquetado tiende a ser capturado en la zona de detección si el analito no está presente en la muestra. Los dispositivos de ensayo de flujo lateral se usan de manera rutinaria, por ejemplo, para determinar la presencia o ausencia de la hormona hCG del embarazo y para proporcionar al usuario una indicación de si hay o no embarazo.

25 La detección de reactivo etiquetado en la zona de detección se puede llevar a cabo de manera visual o mediante un fotodetector. Los dispositivos de ensayo no electrónicos de lectura visual presentan la ventaja de tener un coste bajo, sin embargo un problema asociado a dichos dispositivos de ensayo, especialmente los dispositivos de prueba del embarazo y/o los dispositivos de ensayo de uso doméstico, es que proporcionan un resultado de ensayo como una señal de intensidad variable, que puede requerir un grado de interpretación. Esto deja el resultado del ensayo abierto a malinterpretaciones, especialmente en el caso de que el usuario o lector del dispositivo de ensayo tenga un resultado de ensayo preferido en mente. Estos ensayos con frecuencia se proporcionan como ensayos de umbral, con niveles de reactivo etiquetado por debajo del umbral, en el caso de un ensayo sándwich, indicando un resultado negativo y niveles de reactivo etiquetado por encima del umbral indicando un resultado positivo. Como consecuencia, se han desarrollado dispositivos digitales electrónicos en los que la presencia o la cantidad del reactivo etiquetado se determina mediante un fotodetector y el resultado del ensayo se visualiza en una pantalla LCD. Dichos dispositivos digitales presentan la ventaja de que proporcionan un resultado no ambiguo tal como "SÍ" o "NO" que no requiere interpretación. Dichos dispositivos pueden ser de un solo uso y, por lo tanto, desechables. Es caro producirlos sin embargo ya que requieren típicamente uno o más fotodetectores, una o más fuentes de luz tales como un LED, una fuente de energía, un circuito electrónico y una pantalla digital. Además, la eliminación de dispositivos electrónicos presenta problemas medioambientales.

40 En un dispositivo de ensayo microfluídico, se pueden emplear muchos de los mismos principios que se usan en un ensayo de flujo lateral. Sin embargo, en lugar de que se aplique la muestra líquida a una matriz porosa, se aplica la muestra o se alimenta a un conducto o canal, a lo largo del cual avanza el líquido, normalmente mediante acción capilar. Se puede proporcionar una zona de detección sobre una superficie interna del canal en que se proporciona, por ejemplo, un reactivo de unión inmovilizado. Los dispositivos microfluídicos presentan ventajas particulares por que la trayectoria del flujo está bien definida y se puede diseñar que el dispositivo incorpore elementos microfabricados tales como bifurcaciones, regiones de mezcla, elementos de control del flujo, puertas de tiempo, filtros, etcétera. Se describen ejemplos de dispositivos de ensayo microfluídicos en la patente de EE.UU. 5458852.

Se conocen dispositivos de ensayo para medir un analito en los que la velocidad de flujo de un líquido por una trayectoria del flujo es indicativa de la presencia o extensión de un analito.

50 La patente de EE.UU. 4963498 describe un dispositivo microfluídico para la medición de un analito en, o una propiedad de una muestra de fluido en la que los reactivos presentes en el dispositivo afectan al caudal de la muestra. El dispositivo puede comprender tanto un capilar de ensayo como un capilar de referencia o de control.

55 La patente europea EP 456699 describe un aparato para ensayar la presencia de una sustancia en un líquido que comprende un puerto de aplicación de la muestra conectado a una serie de conductos de fluido aguas arriba de las cámaras indicadoras respectivas. De acuerdo con un ejemplo, los reactivos de aglutinación presentes en los conductos de fluido interactúan con la muestra para cambiar su caudal, por ejemplo, evitando que el líquido alcance una cámara indicadora dentro del marco de tiempo del ensayo.

Se describe también un dispositivo capilar para ensayo de la presencia de una sustancia por la patente internacional WO 2004/083859. El dispositivo actúa produciendo aglutinación de una muestra líquida en un capilar de ensayo en presencia de un analito de interés (típicamente, gonadotropina coriónica humana, hCG, por sus siglas en inglés), aglutinación que evita el flujo de muestra líquida en el capilar de ensayo pero no en un capilar de control (que no contiene reactivos de aglutinación). La presencia o ausencia de muestra líquida en porciones aguas abajo de los capilares de ensayo y de control es detectada por los electrodos.

También se conoce (por ejemplo, a partir de la patente internacional WO 2006/090144) proporcionar dispositivos de ensayo microfluídicos en que se forma una trayectoria de flujo con una discontinuidad en la misma, por ejemplo, en la forma de una porción de un canal de la trayectoria de flujo con un orificio o abertura demasiado grande para que se haga puente por la muestra líquida que avanza y en el que el orificio o abertura se puede llenar mediante el mismo líquido u otro (por ejemplo, habiendo fluido por una segunda trayectoria de flujo), actuando de ese modo como un "puente" que permite que la muestra líquida avance pasada la discontinuidad. Esta disposición puede formar la base de un "dispositivo de ensayo binario", en que la presencia o ausencia del analito de interés en una muestra influye en la velocidad de avance de la muestra líquida a lo largo de una o más de las trayectorias de flujo diferentes dentro de un dispositivo de ensayo, que a su vez puede determinar si un líquido que fluye a lo largo de una de las trayectorias de flujo particular entra en una región "indicadora" del dispositivo de ensayo, indicando de ese modo en términos cualitativos simples (por ej., "sí" o "no") el resultado del ensayo, retirando así cualquier elemento de subjetividad acerca de la interpretación del resultado del ensayo sin la necesidad de medios electrónicos sofisticados u otros medios de visualización.

Una variante de la disposición descrita anteriormente se describe en la patente internacional WO 2008/025945, en que hay una "competencia" entre líquido que fluye a lo largo de una trayectoria de flujo de "ensayo" y un líquido que fluye a lo largo de una trayectoria de flujo de referencia. Hay una región de unión en que las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia se ponen en contacto entre sí. Si el líquido que fluye a lo largo de la trayectoria de flujo de referencia "gana la competición" y alcanza la región de unión antes que el líquido que fluye a lo largo de la trayectoria de flujo de ensayo, entonces se evita el flujo adicional de líquido a lo largo de la trayectoria de flujo de ensayo.

La patente de EE.UU. 4713347 describe un dispositivo de ensayo en que se pueden formar burbujas, que tiene el efecto de disminuir la conductancia de un electrólito, pero no se describe que las burbujas así formadas tengan ningún efecto sobre el flujo de un líquido y no se describe que se pueda utilizar la medición de la velocidad de flujo de un líquido para detectar la presencia de un analito de interés.

La patente de EE.UU. 4311666 describe un aparato para "controlar el grado de corrosión" en un procedimiento para preparar pulpa de madera e implica medir el gas CO₂ del caudal. No hay descripción de la medición de la velocidad de flujo de un líquido o su modificación por formación de burbujas.

La patente de EE.UU. 5087556 describe un dispositivo de ensayo que, en una realización, genera peróxido de hidrógeno, pero no hay descripción de la formación de burbujas de gas ni de la modificación de un caudal de líquido por la formación de burbujas.

La patente japonesa JP 63222257 describe un dispositivo de ensayo inmunosensor con una celda de reacción en que se puede introducir un líquido. El documento no describe la formación de burbujas en el líquido ni la medición del caudal de un líquido para la detección de un analito de interés.

La patente de EE.UU. 2007/0248953 describe un sistema de ensayo con una cámara que recibe una tira de ensayo que soporta una muestra de analito. La cámara está en comunicación gaseosa con un sensor piezoeléctrico que genera una señal eléctrica como respuesta a un cambio de presión en la cámara.

La patente de EE.UU. 479160 describe un dispositivo para realizar inmunoensayos enzimáticos cualitativos que pueden generar un gas, pero esto es secundario al funcionamiento del dispositivo.

La patente internacional WO 2008/025945 describe un dispositivo de ensayo fluídico para análisis de muestras líquidas, pero no describe ni sugiere la formación de burbujas de gas de una manera dependiente del analito.

Sumario de la invención

En un primer aspecto la invención proporciona un dispositivo de ensayo como se define en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas. El dispositivo de ensayo comprende, entre otros, un medio de detección para detectar una modificación en la velocidad de flujo del líquido.

Una determinación de una modificación de flujo puede incluir determinar un resultado como una consecuencia de una modificación en el flujo de líquido. Dicho resultado puede ser, por ejemplo, una indicación de que el líquido ha llegado a una zona particular.

El líquido en que se determina una modificación del flujo puede ser la propia muestra de líquido. Alternativamente, puede ser un segundo líquido en el que la muestra líquida está conectada de manera fluida al segundo líquido de

manera que la generación de una o más burbujas de gas en la muestra líquida produce una modificación de flujo en el segundo líquido. El segundo líquido se puede aplicar a un dispositivo en que se puede llevar a cabo el método o puede comprender parte del dispositivo.

5 En un segundo aspecto, la invención proporciona un dispositivo de ensayo como se define en la reivindicación 4 de las reivindicaciones adjuntas.

Es un objeto de la invención proporcionar un dispositivo de ensayo relativamente económico que, en realizaciones preferidas, pueda proporcionar un resultado inequívoco o "binario" o digital de la determinación de un analito en una muestra líquida en la que el dispositivo de ensayo no tenga o tenga pocos componentes electrónicos. En una realización, la invención puede proporcionar un dispositivo de ensayo que puede proporcionar un resultado binario o digital detectable de manera óptica de un ensayo, en el que el dispositivo de ensayo no comprende elementos que requieran una fuente de energía o una fuente de energía de por sí. Los elementos incluyen uno o más de: un fotodiodo, un fotodetector, una pantalla electrónica y un circuito electrónico. Preferiblemente, el resultado es detectable de manera visual a simple vista.

15 Según un tercer aspecto, la invención proporciona un dispositivo de ensayo como se define en la reivindicación 7 de las reivindicaciones adjuntas.

El medio que genera gas puede comprender un primer reactivo que cuando se pone en contacto con un segundo reactivo adecuado, produce o participa de otro modo en una reacción que genera, directamente o indirectamente, un producto gaseoso. El dispositivo de ensayo comprenderá al menos uno de los reactivos requeridos en una reacción entre dos o más reactivos, reacción que tiene, como un producto directo o indirecto, la formación de un gas. Preferiblemente, el dispositivo de ensayo comprenderá todos los reactivos necesarios para que tenga lugar la reacción de producción de gas. Los reactivos pueden comprender, por ejemplo, dos o más agentes reaccionantes, o al menos un agente reaccionante y un catalizador (tal como una enzima) que catalicen la conversión del agente reaccionante o los agentes reaccionantes en un producto gaseoso.

25 La formación de una o más burbujas tiende a inhibir el flujo de líquido a lo largo de la trayectoria de flujo, típicamente en la región en que se sitúa una o más burbujas o aguas abajo de una o más burbujas. Se puede detener el flujo a lo largo de la trayectoria del flujo mediante la formación de una o más burbujas. Alternativamente, la formación de burbujas puede aumentar la velocidad de flujo de líquido a lo largo de la trayectoria de flujo.

30 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito de interés en una muestra líquida, siendo el método como se define en la reivindicación 14 de las reivindicaciones adjuntas.

El reactivo de unión etiquetado se puede acumular en una zona de acumulación de una manera dependiente del analito. El analito presente en el líquido puede formar un complejo de reactivo de unión de analito con el reactivo de unión etiquetado que se puede acumular con posterioridad en la zona de acumulación.

35 Se puede proporcionar un segundo reactivo de unión para el analito en una forma inmovilizada en la zona de acumulación para capturar el complejo de reactivo de unión etiquetado-analito. Alternativamente o adicionalmente, el analito puede ser capturado en la zona de acumulación por el segundo reactivo de unión inmovilizado previamente a la formación de un complejo con el reactivo de unión etiquetado.

40 Aún alternativamente, el segundo reactivo de unión se puede proporcionar en una forma movilizable que sea capaz de ser inmovilizado en la zona de acumulación. Por ejemplo, se puede etiquetar la zona de acumulación con reactivo de unión tal como biotina y el segundo reactivo de unión para el analito etiquetado con una pareja de unión complementaria para el reactivo de unión en la zona de acumulación, tal como estreptavidina.

45 En una realización más, el segundo reactivo de unión para el analito se puede unir a una partícula magnética. Se puede proporcionar un imán en la proximidad de la zona de acumulación para inmovilizar al segundo reactivo de unión etiquetado de manera magnética. Todo complejo de primer reactivo de unión/analito/segundo reactivo de unión formado se puede desplazar, por ejemplo, a la zona de acumulación mediante un imán.

50 Aún alternativamente, la zona de acumulación puede comprender un filtro de exclusión por tamaños en el que el segundo reactivo de unión no puede pasar por el filtro. El segundo reactivo de unión puede estar unido, por ejemplo, a una partícula cuyo diámetro sea mayor que el del diámetro de poro promedio de los poros en el filtro. Así, cualquier complejo de primer reactivo de unión etiquetado/analito/segundo reactivo de unión es retenido en el filtro mientras el reactivo de unión etiquetado no complejoado puede pasar a través de él.

55 La determinación del analito se puede llevar a cabo mediante una reacción de tipo competición o inhibición. El reactivo de unión etiquetado puede comprender un analito etiquetado o análogo de analito. Este método es adecuado para la detección de pequeños analitos, tales como haptenos. Por ejemplo, se puede inmovilizar un analito o análogo de analito en la zona de acumulación que puede servir para capturar el reactivo de unión etiquetado. Alternativamente, se puede proporcionar un reactivo de unión para el analito en la zona de acumulación y un analito etiquetado o análogo de analito proporcionado aguas arriba de la zona de acumulación que compite con

cualquier analito presente para el reactivo de unión en la zona de acumulación.

El reactivo de unión etiquetado se puede proporcionar en la zona de acumulación en vez de, o además de, ser proporcionado aguas arriba de la zona de acumulación.

5 El dispositivo puede comprender además un segundo reactivo proporcionado aguas arriba de la zona de acumulación de manera que en su uso, todo o sustancialmente todo del reactivo de unión etiquetado es transportado a la zona de acumulación previamente a la llegada de segundo reactivo a dicha zona.

De acuerdo con un quinto aspecto, la invención proporciona un método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito de interés en una muestra líquida, siendo el método como se define en la reivindicación 15 de las reivindicaciones adjuntas.

10 En segundo reactivo se puede proporcionar en una trayectoria de flujo separado al primer reactivo. El dispositivo de ensayo puede comprender dos trayectorias de flujo en las que se proporciona el primer reactivo en una primera trayectoria de flujo y se proporciona el segundo reactivo en una segunda trayectoria de flujo. La primera y segunda trayectorias de flujo pueden converger en una intersección, en o aguas arriba de, la zona de acumulación. Se puede proporcionar la primera y la segunda trayectorias del flujo de manera que el tiempo que tarda en alcanzar el reactivo de unión etiquetado la zona de acumulación sea menor que el tiempo que le lleva al segundo reactivo alcanzar dicha zona. Hay muchas maneras diferentes de conseguir esto. Las dos trayectorias de flujo pueden, por ejemplo, diferir entre sí en sus respectivas longitudes, anchuras, recubrimientos de superficie o combinaciones de los mismos. Una de las trayectorias de flujo se puede proporcionar con una o más restricciones de flujo o elementos de promoción del flujo, etcétera, de manera que el segundo reactivo llegue a la zona de acumulación después de todo de, o después de sustancialmente todo de, el reactivo de unión etiquetado.

20 En su uso, la muestra de líquido aplicada al dispositivo volverá a suspender el primer y segundo reactivo proporcionados respectivamente en la primera y segunda trayectorias del flujo y, dependiendo de la extensión de analito presente, dan como resultado la acumulación de reactivo de unión etiquetado en la zona de acumulación. Debido a las diferencias entre la primera y segunda trayectorias de flujo, todo o sustancialmente todo del reactivo de unión etiquetado llegará a la zona de acumulación previamente a la llegada de segundo reactivo. Todo reactivo de unión etiquetado no acumulado en la zona de acumulación pasará aguas abajo junto con muestra líquida. Así, la formación de una o más burbujas de gas en la zona de acumulación será principalmente debido a reacción entre el segundo reactivo y cualquier primer reactivo acumulado en la zona de acumulación y así indicativo de la presencia y/o la cantidad de analito presente.

30 La intersección entre la primera y segunda trayectorias de flujo permite que las dos corrientes de fluido de las trayectorias de flujo separadas se lleven juntas a una única trayectoria de flujo. Preferiblemente, la intersección se diseña de manera que no se introduzca un bloqueo de aire que pueda impedir el paso de líquido desde cualquier trayectoria de flujo aguas abajo de la intersección.

35 El dispositivo de ensayo puede comprender una región de aplicación de la muestra común que conecte la primera y segunda trayectorias de flujo. Así, una muestra de líquido única aplicada o de otro modo introducida en el dispositivo de ensayo podrá fluir a lo largo de la primera y segunda trayectorias de flujo simultáneamente.

40 Se pueden prever otras maneras de suministrar el primer y segundo reactivo secuencialmente a la zona de acumulación. Por ejemplo, el dispositivo de ensayo puede comprender una zona de aplicación de la muestra situada en alguna parte a lo largo de una trayectoria de flujo de manera que la muestra líquida aplicada al dispositivo fluya en dos direcciones, respectivamente lejos y hacia la zona de acumulación. Se puede proporcionar primer y segundo reactivo en el dispositivo de manera que la muestra líquida que fluye lejos de la zona de acumulación movilice el segundo reactivo y la muestra líquida que fluye hacia la zona de acumulación movilice el primer reactivo. El dispositivo de ensayo puede comprender un sumidero líquido que cuando se ponga en contacto por la muestra líquida, típicamente la porción que comprende el primer reactivo, sea capaz de extraer toda la muestra líquida aplicada al dispositivo hacia la zona de acumulación. Así en su uso, todo o sustancialmente todo del primer reactivo puede llegar a la zona de acumulación previamente a la llegada de segundo reactivo.

El dispositivo de la invención puede comprender un medio para determinar la modificación del flujo de líquido. Determinar una modificación en el flujo se puede llevar a cabo midiendo el caudal del

50 El dispositivo de ensayo puede comprender un medio para detectar la presencia de muestra líquida en la trayectoria de flujo, por ejemplo aguas abajo de la zona de acumulación. Por ejemplo, el dispositivo de ensayo puede comprender uno o más pares de electrodos para detectar la presencia de muestra líquida. Se puede determinar una velocidad de flujo entre pares de electrodos respectivos. Esto se puede conseguir por ejemplo proporcionando una pluralidad de pares de electrodos en uno o más intervalos espaciados, pudiendo determinar cada par de electrodos la presencia de muestra líquida. El dispositivo de ensayo puede comprender además un temporizador simple para registrar el tiempo que le lleva a la muestra líquida desplazarse a lo largo de la trayectoria de flujo.

La determinación de la modificación en el flujo también se puede llevar a cabo por comparación del flujo de líquido en la trayectoria de flujo de ensayo, que por conveniencia también se puede referir como la trayectoria de flujo "de

ensayo", relativa al flujo de líquido en una trayectoria de flujo de referencia.

El dispositivo de ensayo puede comprender una o más regiones indicadoras para indicar la llegada de líquido a una o más zonas aguas abajo. La región indicadora es detectable preferiblemente de manera visual y puede comprender, por ejemplo, un medio de cambio de color tal como un producto químico que reacciona con el líquido para producir un color. El medio de cambio de color se puede inmovilizar en la trayectoria del flujo o puede comprender, por ejemplo, un tinte coloreado seco que se puede disolver en el líquido.

El medio de cambio de color puede ser sensible al pH. La región indicadora se proporciona típicamente aguas abajo de la zona de acumulación. La región indicadora puede comprender, por ejemplo, una cámara en que puede entrar líquido y por la que puede pasar líquido. La cámara se puede proporcionar en el extremo de una trayectoria de flujo de manera que el fluido entra en la cámara y cesa de fluir más.

El dispositivo de ensayo puede comprender además dos regiones indicadoras proporcionadas respectivamente aguas abajo de la zona de acumulación de la trayectoria de flujo de ensayo y hacia o en el extremo distal de la trayectoria de flujo de referencia. Una zona de aplicación de la muestra común puede conectar las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia de manera que una muestra líquida aplicada al dispositivo puede fluir a lo largo de las trayectorias de flujo respectivas.

Las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia pueden comprender cada una una región indicadora. Las regiones de indicación pueden diferir entre sí de manera que proporcionen un resultado diferente de manera visual. Por ejemplo, las regiones indicadoras de las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia respectivas pueden generar diferentes colores debido a la provisión de diferentes medios de cambio de color. Alternativamente, las dos regiones indicadoras pueden indicar palabras o símbolos que reflejen por ejemplo "positivo" o "negativo".

El flujo de líquido se puede modificar reduciendo o deteniendo el flujo de líquido o una porción del mismo. Alternativamente, el flujo de líquido se puede modificar aumentando o reanudando el flujo de líquido o una porción del mismo.

Sorprendentemente, los autores han encontrado que las burbujas de gas se generan sólo en una extensión significativa cuando el segundo reactivo se pone en contacto con una cantidad relativamente concentrada del reactivo de unión etiquetado inmovilizado en la zona de acumulación. Optimizando las cantidades de reactivo de unión etiquetado y de segundo reactivo, las dimensiones fluidicas del dispositivo y las posiciones relativas del reactivo de unión etiquetado y el segundo reactivo dentro del dispositivo, cualquier reacción entre el segundo reactivo y el reactivo de unión no inmovilizado se puede mantener a un mínimo y no es necesariamente perjudicial para la realización del ensayo.

Una o más trayectorias de flujo pueden comprender o consistir en un canal microfluídico, una matriz porosa (tal como una membrana cromatográfica) o una combinación de los dos. Las matrices porosas preferidas incluyen nitrocelulosa y papel de filtro. El canal microfluídico es preferiblemente de dimensiones capilares, de manera que la muestra líquida pueda avanzar a lo largo del canal por flujo capilar. Los canales microfluídicos típicos presentan una dimensión transversal interna de entre 0,1 y 500 μm , mas típicamente entre 1 y 100 μm . El canal o los canales microfluídicos pueden estar formados, por ejemplo, de materiales de plástico sintéticos tales como policarbonato, poliéster, resina epoxídica o vidrio o metal. El canal o los canales se pueden formar por grabado, fundición, moldeado, etcétera, usando técnicas convencionales.

Un dispositivo puede comprender un canal microfluídico con una anchura típica de 1 mm y una altura típica de 100 μm . El dispositivo puede comprender una serie de materiales laminados tales como, una capa de base inferior, una capa intermedia que comprende las estructuras del canal y una capa superior que sirve para sellar el canal o los canales microfluídicos.

El analito de interés puede comprender, por ejemplo, un esteroide, una hormona, un péptido o polipéptido, un carbohidrato, un lípido, una proteína, una lipoproteína, un polinucleótido, una enzima, un marcador de grupo sanguíneo, un marcador de enfermedad, un indicador de diagnóstico o de pronóstico, un catión, un anión o un complejo molecular tal como un virus, bacteria, levadura, hongo, espora o célula eucariota. En una realización preferida, el analito de interés comprende hCG. En otra realización, el analito es glucosa. El dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención es adecuado para la detección de analitos incluyendo moléculas pequeñas tales como haptenos. Los haptenos se pueden definir como determinantes antígenos pequeños capaces de obtener una respuesta inmunitaria sólo cuando se acoplan con un portador. Los haptenos se unen a anticuerpos pero por sí mismos no pueden obtener una respuesta de anticuerpo, por ejemplo, por inyección del hapteno en el cuerpo de un animal. Ejemplos no limitantes de haptenos incluyen drogas de abuso a base de anfetaminas tales como MDA (3,4-metilendioxi-anfetamina), MDMA también conocido como "Éxtasis" (3,4-metilendioxi-N-metil-anfetamina), MDEA (3,4-metilendioxi-N-etil-anfetamina), BDB (3,4-metilendioxi-fenil-2-butanamina), MBDB (3,4-metilendioxi-fenil-N-metilbutanamina) y MDPA (3,4-metilendioxi-N-propil-anfetamina); opiáceos tales como morfina y codeína, así como sus análogos sintéticos que incluyen heroína, hidromorfona, hidrocodona, oxicodona y oximorfona; dietilamida del ácido lisérgico (LSD) así como metabolitos de los mismos; tetrahidrocanabinol y cocaína; fármacos tóxicos tales como diazepam, nicotina, acetaminofeno, cafeína, risperidona, fenobarbitol; hormonas tales como progesterona,

estradiol y metabolitos de los mismos, testosterona; pesticidas; tintes tales como isocianato de fluoresceína, rojo Texas, etc.

La muestra líquida puede ser cualquier líquido adecuado, tal como agua, muestra de aguas residuales o un extracto acuoso (por ejemplo, una muestra acuosa de alimento o bebida) o una muestra biológica, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, pus, sudor, saliva, fluido vaginal o lágrimas. Una muestra preferida es la orina. La muestra líquida se puede aplicar al dispositivo "neto" o puede ser sometido a una etapa de pretratamiento (por ejemplo, incluyendo uno o más de lo siguiente: mezclado; agitación; ultrasonidos; dilución; incubación; desnaturalización o reacción con uno o más reactivos).

El líquido en que se forma la burbuja o las burbujas puede ser convenientemente el líquido de muestra, sustancialmente como se aplica al dispositivo (pero permitiendo cualquier modificación de la composición del líquido como resultado del contacto con el dispositivo de ensayo, por ejemplo, la resuspensión o disolución en el líquido de la muestra de un reactivo u otra sustancia depositada o proporcionada de otro modo en la trayectoria de flujo del dispositivo de ensayo). Alternativamente, o adicionalmente, la burbuja o las burbujas se pueden formar en algún otro líquido, tal como un líquido de lavado tampón o disolución de reactivo adicional aplicada por separado al dispositivo de ensayo. En cualquier caso, el líquido será en general acuoso (es decir, más del 50% de H₂O v/v).

Se entenderá que el gas formado por el reactivo o los reactivos puede ser al menos parcialmente insoluble en el líquido, en las condiciones de temperatura y presión en que se realiza el ensayo, durante para la duración del tiempo por el que se tiene que evitar o reducir el flujo de líquido. Normalmente, el ensayo se realizará a temperatura ambiente (es decir, aproximadamente 18-25°C), pero el ensayo se podía realizar en una habitación fría o refrigerador (a aproximadamente 3-6°C) o se podía realizar en una incubadora (a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40°C). Típicamente, el ensayo se realizará a presión atmosférica (en general, esto será en la región 97 kPa (970 milibares) a aproximadamente 103 kPa (1.030 milibares) a nivel del mar). De acuerdo con esto, la concentración de gas formado debe estar por encima de la solubilidad del gas en el líquido relevante, durante al menos una porción del tiempo que lleva realizar el ensayo. Se prefieren los gases que tengan niveles bajos de solubilidad en la muestra líquida, tal como oxígeno.

Dentro de las restricciones anteriores, el gas usado para formar la burbuja de gas puede ser cualquier gas adecuado, aunque obviamente se prefieren menos los materiales altamente tóxicos o altamente reactivos. Los gases adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, oxígeno, ozono, dióxido de carbono, monóxido de carbono, metano, etano, nitrógeno, óxidos de nitrógeno, hidrógeno, helio, gases nobles o cualquier combinación de dos o más cualesquiera de los anteriores. Los gases preferidos en general incluyen oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno e hidrógeno.

El primer reactivo es uno que puede reaccionar con el segundo reactivo para generar un gas. Los reactivos primero y/o segundo se pueden proporcionar al dispositivo de ensayo como parte del líquido de muestra o como una adición separada de un líquido al dispositivo de ensayo o más preferiblemente formará un componente integral del dispositivo de ensayo, por ejemplo, depositado sobre o en el dispositivo de ensayo, típicamente sobre o en una o más trayectorias del flujo, en forma seca o liofilizada). El primer reactivo puede ser una enzima.

Enzimas adecuadas para uso como un primer reactivo incluyen oxorreductasas tales como catalasa o glucosa oxidasa. La catalasa (EC 1.11.1.6) cataliza la degradación de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. Esta reacción es útil puesto que, aparte de generar el gas necesario (en este caso, oxígeno), el otro único producto es agua, que no tendrá efecto significativo sobre la realización del ensayo o su resultado. La catalasa está extensamente comercialmente disponible con alta pureza y se puede liofilizar. Otra ventaja de usar un sistema de generación de gas a base de catalasa es que sólo se requiere un único reactivo adicional, tal como peróxido de hidrógeno. Así, para generar gas es necesario sólo poner en contacto peróxido de hidrógeno con una cantidad enzimáticamente activa de catalasa.

En el caso en que el primer reactivo sea una oxorreductasa tal como catalasa, el segundo reactivo puede comprender una fuente de gas oxígeno. Ejemplos de fuentes de gas oxígeno son peróxidos o perácidos tales como peróxido de hidrógeno, peróxido de carbamida, peróxidos de metal alcalino, peróxido de hidrógeno de urea, carbonatos de metal alcalino, perboratos de metal alcalino y percarbonatos de metal alcalino. Una fuente sólida de oxígeno tal como peróxido de hidrógeno de urea presenta la ventaja de que se puede proporcionar como parte del dispositivo de ensayo en el estado seco.

La glucosa oxidasa (E. C. 1.1.3.4) cataliza la oxidación de β-D-glucosa a D-glucono-1,5-lactona con la formación conjunta de peróxido de hidrógeno. Así, este sistema se puede usar para la generación *in situ* de peróxido de hidrógeno en el dispositivo de ensayo, que se puede hacer actuar después por una catalasa. Así, en una realización el dispositivo de ensayo de la invención puede comprender tanto una glucosa oxidasa como una catalasa. La glucosa se puede proporcionar fácilmente como un depósito seco sobre el dispositivo de ensayo, que se rehidrata fácilmente y se disuelve mediante líquido de la muestra. Puede haber presentes pequeñas cantidades de oxígeno en el dispositivo de ensayo (disuelto en el líquido de la muestra o presente en el aire en la trayectoria del flujo antes del líquido que avanza), que debería ser suficiente para reaccionar con la glucosa para formar peróxido de hidrógeno, que a su vez se convierte en oxígeno mediante una catalasa.

Otras enzimas generadores de gas que se pueden usar incluyen las que generan dióxido de carbono tales como deshidrogenasas y descarboxilasas, por ejemplo, piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, aminoácido descarboxilasa, oxalato descarboxilasa, piruvato descarboxilasa y ureasa, la última capaz de catalizar la hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amoníaco.

5 El reactivo de unión puede ser uno que presenta una afinidad de unión por el analito de interés y forma un par de unión. Los pares de unión son conocidos para los expertos en la materia e incluyen anticuerpo-antígeno, ligando/receptor, oligo- o polinucleótidos complementarios u otros pares de moléculas que se unen entre sí. El reactivo de unión puede ser un anticuerpo para el analito de interés. El reactivo de unión puede ser un analito o análogo del analito.

10 Convenientemente, el reactivo de unión es una molécula de inmunoglobulina o una porción de unión de antígeno de dicha molécula, término que se pretende que incluya scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, anticuerpos de dominio único, multímeros de cualquiera de éstos y similares. Los métodos de reticulación o unión de inmunoglobulinas (o porciones de las mismas) a otras moléculas están establecidos. En particular es conocido para los expertos en la materia unir inmunoglobulinas (o porciones de las mismas) a otros polipéptidos tales como enzimas. En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo/método de ensayo comprende una molécula de inmunoglobulina (o una porción de unión de antígeno de la misma o un multímero de inmunoglobulinas o porciones de unión de antígeno de la misma), unida a una enzima, especialmente una enzima que cataliza una reacción de formación de gas.

20 El reactivo de unión puede estar unido al primer reactivo que participa en, o cataliza, la reacción de formación de gas. De manera deseable la pareja de unión, tal como una molécula de inmunoglobulina u otra pareja de unión (o porción de unión de antígeno de la misma) se une a una enzima, tal como catalasa, por ejemplo. Alternativamente, el reactivo de unión etiquetado se puede transformar in situ por unión del primer reactivo a la pareja de unión.

25 La aplicación de un líquido (preferiblemente líquido de la muestra) a una región de aplicación de líquido (por ejemplo, una zona o puerto de aplicación de la muestra) hace que el líquido fluya (preferiblemente por acción capilar) a lo largo de una trayectoria de flujo en el dispositivo de ensayo. Ocluido en el líquido que fluye (por ej., contenido en el líquido aplicado al dispositivo o ya presente en el dispositivo y movilizado por contacto con el líquido) hay un primer reactivo que participa en una reacción formadora de gas cuando se pone en contacto o se mezcla con un segundo reactivo.

30 El dispositivo de ensayo puede comprender una generación de resultados de ensayo y/o región indicadora no electrónica, binaria o digital, es decir no requiere una fuente de energía para generar y/o visualizar el resultado del ensayo. Preferiblemente, el dispositivo de ensayo no comprende componentes electrónicos de ningún modo. Un resultado binario o digital es uno en el que el resultado proporcionado no es ambiguo. Puede ser una única respuesta proporcionada a partir de dos posibles resultados, por ejemplo "positivo" o "negativo", "sí" o "no", mayor o menor que un valor de umbral, etcétera. Puede ser una única respuesta proporcionada a partir de más de dos posibles resultados. El resultado se puede proporcionar con respecto a un umbral. Así, un resultado positivo puede ser proporcionado por un nivel de analito que es mayor que un valor umbral particular. Un resultado binario o digital es distinto de, por ejemplo un resultado de lectura visual de un dispositivo de ensayo de flujo lateral de lectura visual, tal como el dispositivo de embarazo ClearBlue™, en el que el resultado depende de la intensidad del color de un tubo de ensayo y está sometido, por lo tanto, a interpretación por el usuario.

40 Se describen ensayos binarios o digitales en las patentes internacionales WO 2008/025945 y WO 2006/090144. Los ensayos binarios se ilustran además en la Figura 8 y se describen con más detalle a continuación.

Una trayectoria de flujo de referencia en el caso de que se proporcione estará típicamente exenta de cualquier reactivo generador de gas.

45 El dispositivo de ensayo puede comprender una trayectoria de flujo de ensayo y una trayectoria de flujo de referencia que se cruzan en una región de unión aguas abajo de la zona de acumulación. La región de unión también puede comprender una salida, un conducto, una cámara u otra porción que permita el flujo hacia adelante del líquido.

50 La región de unión puede permitir sólo el paso hacia adelante del líquido en la trayectoria de flujo de ensayo o el líquido en la trayectoria de flujo de referencia. La región de unión puede comprender una válvula de fluido o estrangulamiento de manera que el líquido que fluye a lo largo de la trayectoria de flujo de referencia, a la llegada a la región de unión, tenga el efecto de evitar el flujo del líquido a lo largo de la trayectoria de flujo de ensayo o viceversa. Así, la detección de líquido o aguas abajo de la zona de unión es indicativa del líquido de la trayectoria de flujo de referencia o la trayectoria de flujo de ensayo.

55 Las trayectorias de flujo de ensayo o de referencia pueden converger en una región de unión que permite el flujo hacia adelante de un líquido contenido dentro de un depósito en una de dos regiones indicadoras, una asociada de manera operable con la trayectoria de flujo de referencia y la otra asociada de manera operable a la trayectoria de flujo de ensayo. El líquido del depósito fluirá a una de estas regiones indicadoras dependiendo de si el líquido de la trayectoria de flujo de ensayo o de la trayectoria de flujo de referencia alcanzar la unión primero.

Una región de unión es útil cuando es necesario detener el flujo de un canal de flujo por el otro o proporcionar el flujo hacia adentro adicional de un canal de depósito. Sin embargo, en algunas circunstancias, el flujo en el canal de ensayo se puede detener completamente en el tiempo del ensayo o flujo se puede detener en tal extensión que el líquido en el canal de ensayo no alcance la unión y por lo tanto una región de unión puede no ser un requerimiento esencial. Sin embargo, se prefiere una región de unión en una serie de realizaciones.

En algunas realizaciones, se puede preferir derivar el dispositivo de ensayo de manera que se evite que el líquido de las trayectorias de flujo de referencia y de ensayo lleguen a la región de unión simultáneamente. Esto se puede conseguir proporcionando trayectorias de flujo de referencia y de ensayo de diferentes anchuras, diferentes longitudes, etc. El dispositivo de ensayo se puede desviar de manera que en ausencia de generación de gas en la trayectoria de flujo de ensayo, el líquido llegue a la región de unión de la trayectoria de flujo de ensayo previamente a la llegada de líquido de la trayectoria de flujo de referencia o viceversa. El dispositivo se puede adaptar para proporcionar un resultado positivo o negativo con respecto a un valor umbral. Así, para un ensayo de tipo sándwich, en presencia de analito por debajo de un cierto umbral, y por lo tanto en presencia de alguna generación de gas, el líquido de la trayectoria de flujo de ensayo puede llegar a la región de unión previamente a la llegada de líquido de la trayectoria de flujo de referencia o viceversa.

Se puede proporcionar una o más regiones indicadoras aguas arriba o aguas abajo de la región de unión.

Según una realización, el dispositivo de ensayo puede comprender una región indicadora proporcionada aguas abajo de la región de unión que es capaz de indicar cuál de los líquidos de las trayectorias de flujo de ensayo o de referencia alcanzó primero la región de unión. Hay muchas maneras por las cuales se puede efectuar un cambio de color en esta región indicadora.

Por ejemplo, se puede proporcionar un tinte coloreado en la trayectoria de flujo de ensayo o de referencia o se pueden proporcionar tintes de diferentes colores en las respectivas trayectorias de flujo de ensayo y de referencia, de manera que la presencia de un tinte de un color particular en la región indicadora revele por qué ruta (la trayectoria de flujo de ensayo o de referencia) alcanzó primero el líquido la región indicadora. Alternativamente, la región indicadora puede comprender un primer agente reaccionante y se puede proporcionar un segundo agente reaccionante para producir un cambio de color. Se pueden proporcionar diferentes agentes reaccionantes en las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia que sean capaces de reaccionar con un agente reaccionante en la región indicadora para diferentes cambios de color proporcionados de manera que el color resultante difiera dependiendo de si tiene lugar el flujo hacia adelante del líquido de la trayectoria de flujo de ensayo o la trayectoria de flujo de referencia. En un ejemplo adicional, se pueden proporcionar dos enzimas diferentes (por ejemplo, peroxidasa de rábano y glucosa oxidasa) en la región indicadora y se podía proporcionar un respectivo sustrato para una de las enzimas en una de las trayectorias de flujo que reacciona, en presencia del catalizador enzimático relevante, para producir un producto coloreado. El color del producto revela qué sustrato se introdujo en la región indicadora (y, por lo tanto, mediante qué trayectoria de flujo llegó primero el líquido allí). En términos generales, la región indicadora (si está situada aguas abajo de la región de unión) puede comprender componentes de dos diferentes medios generadores de señal que generen señales diferentes de manera detectable, con uno o más componentes adicionales de cada medio generador de señales dispuesto de manera móvil aguas arriba, estando dispuesto el componente adicional de un medio generador de señales en la trayectoria de flujo de ensayo y estando dispuesto el componente adicional del otro medio generador de señales en la trayectoria de flujo de referencia, requiriéndose que el componente adicional se ponga en contacto con el otro componente en la región indicadora para generar una señal.Cuál de los dos medios generadores de señales se activa depende de cuál de los componentes adicionales alcanza la región indicadora primero, que a su vez depende de las velocidades relativas de flujo de líquido a lo largo de las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia.

En una realización, la región indicadora comprende un indicador sensible al pH y las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia comprenden cada una un agente que afecta al pH diferente, por ejemplo, uno comprende un tampón a pH relativamente ácido y uno comprende un tampón a pH relativamente alcalino. La trayectoria de flujo por la cual el líquido llega primero a la región indicadora determinará, por lo tanto, el pH en la región indicadora y, por lo tanto, el color del indicador. El indicador proporcionado en una región indicadora se puede proporcionar en una forma inmovilizada, por ejemplo, en la superficie de un canal o en o dentro de una matriz porosa tal como papel proporcionado en una región indicadora.

Las realizaciones de este tipo general, con una región indicadora aguas abajo, presentan la ventaja de que puede no ser necesario modificar el flujo de líquido a lo largo de la trayectoria de flujo de ensayo por una gran cantidad para que el líquido fluya a lo largo de la trayectoria de flujo de referencia para alcanzar la región indicadora primero o viceversa, - puede ser suficiente un tiempo diferencial de tan poco como 1 ó 2 segundos.

En otras realizaciones, se proporciona una región indicadora, aguas arriba de la región de unión, en cada una de las trayectorias de flujo de referencia y de ensayo. En una realización, el flujo de líquido a lo largo de la trayectoria de flujo de referencia hasta un cierto punto actúa bloqueando el flujo de líquido a lo largo de la trayectoria de flujo de ensayo antes de que el líquido alcance la región indicadora en la trayectoria de flujo de ensayo, de manera que se visualiza un cierto resultado de ensayo en la región indicadora. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso proporcionar una sustancia indicadora, tal como un tinte, aguas arriba de la región indicadora, de manera que se

pueda observar un cambio visible si/cuando el líquido alcance la región indicadora de las trayectorias de flujo de ensayo y/o de referencia.

De acuerdo con una realización, el dispositivo de ensayo comprende regiones indicadoras proporcionadas en las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia aguas arriba de la región de unión. En presencia de analito, que para un ensayo de tipo sándwich dará como resultado la generación de una o más burbujas de gas, el flujo a lo largo de la trayectoria de flujo de ensayo disminuye o cesa, permitiendo que el líquido de la trayectoria de flujo de referencia alcance su región indicadora primero e indica la presencia de analito. En ausencia de analito, las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia se pueden configurar de manera que la muestra de líquido de la trayectoria de flujo de ensayo alcance la región de unión antes que el líquido de la trayectoria de flujo de referencia. Una vez que el líquido de la trayectoria de flujo de ensayo alcanza la región de unión bloquea el flujo en la trayectoria del flujo de referencia de manera que el líquido en la trayectoria de referencia nunca alcanza, al menos en el tiempo del ensayo, la región indicadora de referencia.

En algunas realizaciones, la región indicadora comprende un canal microfluídico, tal como un capilar, que es visible para el usuario (por ejemplo, por una ventana o abertura en una caja opaca de otro modo). En una realización, la región indicadora comprende dos canales o capilares, uno formando parte de la trayectoria de flujo de ensayo y uno formando parte de la trayectoria de flujo de referencia. En una realización, los canales o capilares microfluídicos en la región indicadora llegan a llenarse con un líquido coloreado durante la realización del ensayo. El color del líquido puede indicar el resultado del ensayo. Alternativamente, el líquido coloreado puede servir simplemente para modificar la visibilidad del canal o capilar. Por ejemplo, un plástico claro o capilar de vidrio frente a un fondo claro o blanco puede no ser fácilmente evidente. La introducción de un líquido coloreado en dicho canal o capilar aumentará el contraste y hará fácilmente visible el canal o capilar. Alternativamente, si el canal o capilar es inicialmente de alto contraste con su fondo (por ejemplo, un capilar blanco frente a un fondo rojo), entonces la introducción de un líquido coloreado en el canal o capilar que sea del mismo color que el fondo reducirá el contraste y hará difícil de observar el capilar o canal. Todos estos representan diferentes métodos para transferir o visualizar una señal visible referente al resultado del ensayo.

En algunas realizaciones, la región indicadora puede comprender uno o más canales o capilares que forman una o más palabras o símbolos (tal como "EMBARAZADA" o un símbolo más o menos". En una realización particular, en que se proporciona un dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención como un dispositivo de ensayo de embarazo, una trayectoria de flujo comprende una región indicadora en que un canal o capilar forma la palabra "NO" y otra trayectoria de flujo comprende una región indicadora en que un canal o capilar forma la palabra "EMBARAZADA". Típicamente, la palabra "NO" se forma en la trayectoria de flujo de ensayo y la palabra "EMBARAZADA" se forma en la trayectoria de flujo de referencia. Si se aplica una muestra el dispositivo que no contiene ningún hCG (es decir, el individuo no está embarazado), el líquido es libre para fluir a lo largo de las trayectorias de flujo tanto de ensayo como de referencia. Una etiqueta coloreada, por ejemplo, un tinte, es transportado a lo largo de ambas trayectorias de flujo, haciendo que aparezcan las palabras "NO" y "EMBARAZADA" como un mensaje en una pantalla. Si se aplica una muestra que comprende hCG al dispositivo, los reactivos de aglutinación (aglutinación? no gas?) (por ejemplo, partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-hCG) presentes en la trayectoria de flujo de ensayo reducen la velocidad de flujo tanto que el líquido en la trayectoria de flujo de referencia alcanza la unión antes que el líquido en la trayectoria de flujo de ensayo pueda alcanzar la región indicadora. Esto bloquea eficazmente la trayectoria de flujo de ensayo, de manera que la palabra "NO" no llega a ser visible y en su lugar la pantalla proporciona el mensaje "EMBARAZADA".

La trayectoria o las trayectorias de flujo en el dispositivo de ensayo pueden ser esencialmente lineales. Alternativamente, para proporcionar una configuración compacta, la trayectoria de flujo puede seguir un serpentin u otra trayectoria intrincada. La trayectoria de flujo puede comprender un medio que retenga burbujas, tal como un cuello o una o más porciones estrechadas, que facilite atrapar las burbujas de gas y ayude por lo tanto a la formación de un bloque en la trayectoria de flujo para reducir o detener el flujo. La trayectoria de flujo puede comprender un medio que atrape o retenga burbujas de gas. Por ejemplo, la trayectoria de flujo puede comprender un canal con dos o más dedos o proyecciones superpuestas en la base del mismo. Dicha realización se puede formar convenientemente mediante una porción "dentada", en que una pluralidad de dedos interdigitados se proyecta desde lados puestos del canal en la trayectoria de flujo, disposición que se ha demostrado que es muy eficaz para atrapar burbujas de gas. La trayectoria de flujo puede comprender una o proyecciones o elementos que sirven para aumentar la formación de burbujas de gas. Las proyecciones, por ejemplo, pueden ser elementos de tipo dientes mellados. La trayectoria de flujo puede comprender sitios de nucleación, química o física, que sirven para mejorar la generación de burbujas de gas. Otras maneras en que mejorar la disminución o cese de flujo debido a las burbujas son proporcionar uno o más elementos de restricción de flujo para estrechar la trayectoria de flujo en su anchura o altura, una región hidrófoba y una superficie grabada para aumentar la superficie del canal de flujo. La superficie puede ser grabada, por ejemplo, en un patrón de rejilla o comprender una serie de líneas grabadas paralelas.

Se pueden usar estructuras porosas para reducir el flujo. Por ejemplo, la trayectoria de flujo puede comprender un canal microfluídico y una cámara que comprende un material poroso tal como fibra de vidrio u otro material inerte poroso.

En la región en que se producen burbujas de gas, la trayectoria de flujo puede ser ventajosamente sellada sustancialmente al medio ambiente inmediato de manera que se evite que las burbujas escapen de la muestra de fluido al entorno circundante. Así, las burbujas pueden ser retenidas dentro del dispositivo durante al menos la duración del ensayo de manera que puedan modificar el caudal del líquido o porción del mismo. La trayectoria del flujo (o una o más secciones de la misma) puede ser, por ejemplo, un canal microfluídico rodeado por paredes constituidas por un material que es sustancialmente impermeable al gas. Típicamente, el dispositivo está completamente sellado al medio ambiente inmediato aparte de la zona o las zonas de aplicación de la muestra líquida y todas las ventilaciones de aire que puedan estar presentes dentro del dispositivo.

El dispositivo de ensayo puede comprender reactivos adicionales tales como azúcares y o proteínas tales como albúmina de suero bovino (BSA) que sirven para estabilizar o influir en la resuspensión o solubilización de uno o más reactivos presentes en el dispositivo de ensayo.

La presente memoria descriptiva también incluye un método para realizar un ensayo, comprendiendo el método la etapa de aplicar una muestra líquida a un dispositivo de ensayo de acuerdo con aspectos de la invención y un método para preparar un dispositivo de ensayo, comprendiendo el método la etapa de depositar en o sobre un dispositivo de ensayo al menos un reactivo que, durante la realización del ensayo, participa en o cataliza una reacción de producción de gas.

De acuerdo con una realización, el dispositivo de ensayo puede comprender inhibidor inmovilizado proporcionado inmediatamente aguas arriba y/o aguas abajo de la zona de acumulación para inhibir la reacción entre cualquier primer reactivo no ligado y segundo reactivo. Como tal, el gas sólo se genera como consecuencia de que el segundo reactivo reacciona con primer reactivo en la zona de acumulación.

Un inhibidor adecuado es azida que inhibe la reacción entre catalasa y peróxido para formar gas oxígeno. Por ejemplo, en un ensayo sándwich cuando se usan muestras líquidas sin analito presente, mucho del reactivo etiquetado no se une en la zona de acumulación y se transporta por lo tanto aguas abajo de la zona de acumulación. El sustrato próximo (peróxido en el caso de catalasa) reacciona con el reactivo etiquetado presente aguas abajo de la zona de acumulación y genera burbujas. Las burbujas formadas de esta manera son contraproducentes ya que reducen o detienen el flujo en el canal de ensayo cuando el analito no está presente en la muestra. La inclusión de un inhibidor de la enzima aguas abajo de la zona de acumulación reduce la formación de burbujas aguas abajo de la zona de acumulación. El mismo efecto se podía conseguir cambiando el pH en el canal aguas abajo del sitio de acumulación a muy ácido o alcalino de manera que la actividad enzimática se suprima o se reduzca significativamente.

El dispositivo de ensayo puede comprender además un ensayo de control que pueda indicar que el ensayo se ha realizado correctamente. Un ensayo de control es útil para determinar si, por ejemplo, el propio dispositivo de ensayo ha funcionado correctamente o si el usuario ha usado el dispositivo de la manera correcta. Puede contribuir una serie de factores, solos o en asociación con un dispositivo que proporciona un resultado equivocado. Puede haber por ejemplo un defecto en una o más de las trayectorias de ensayo, por ejemplo un bloqueo, un deterioro o ausencia de uno o más reactivos proporcionados en el dispositivo de ensayo, etcétera. El fin de un ensayo de control es así indicar que es válido el resultado de ensayo.

El ensayo de control puede ser análogo a las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia y puede comprender por ejemplo una trayectoria de flujo de ensayo de control y/o una trayectoria de flujo de referencia de control, en el que la trayectoria de flujo de referencia de control se puede comparar al flujo en la trayectoria de flujo de ensayo de control. La trayectoria de flujo de ensayo de control puede comprender, por ejemplo, uno o más reactivos que generen una cantidad predeterminada de gas para proporcionar una o más burbujas, independiente de la cantidad de analito presente en la muestra de fluido. Uno o más reactivos generadores de gas puede ser el mismo que se emplea en la trayectoria de flujo de ensayo. La trayectoria de flujo de referencia de control no comprenderá típicamente ningún reactivo generador de gas. Las trayectorias de flujo de control de ensayo y de referencia se pueden cruzar en una región de unión aguas abajo. El ensayo de control puede comprender una o más regiones indicadoras proporcionadas aguas arriba o aguas abajo de la zona de unión.

En una realización, las regiones indicadoras se proporcionan respectivamente aguas arriba de la región de unión en las trayectorias de flujo tanto de ensayo de control como de referencia de control. En su uso, el flujo en la trayectoria de flujo de ensayo de control se reducirá o detendrá permitiendo que el flujo en el canal de referencia de control alcance la unión primero bloqueando así el flujo en el canal de ensayo de control. Haciendo eso el indicador en el canal de referencia de control indicará al usuario que el ensayo ha funcionado correctamente. A la inversa, si el flujo en el canal de ensayo de control no se reduce o se detiene debido al funcionamiento defectuoso del dispositivo y a la no generación de burbujas en el canal de ensayo de control, el flujo en el canal de referencia de control alcanza la unión primero e indica así un funcionamiento defectuoso del dispositivo en virtud de un indicador presente en el canal de referencia de control aguas arriba de la unión. Una región de aplicación de la muestra común puede conectar las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia así como las trayectorias de flujo de ensayo de control y de referencia de control en el caso de que existan.

El dispositivo de ensayo puede comprender un depósito de muestra de fluido a la que se puede aplicar la muestra.

Así la muestra de líquido aplicada al dispositivo se puede suministrar de manera continua a una o más trayectorias de flujo.

5 Para evitar la duda, se indica expresamente mediante esto que cualquier característica de la invención descrita en la presente memoria como "típica", "preferida", "conveniente", "deseable", "ventajoso" o similar puede estar presente en la invención en aislamiento o en cualquier asociación con otra u otras características más cualesquiera así descritas, a menos que el contexto lo indique de otro modo. Igualmente, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, las características descritas en relación a un aspecto de la invención serán aplicables en general en relación a otros aspectos de la invención.

10 La invención se describirá ahora además por medio de ejemplos ilustrativos y con referencia a los dibujos adjuntos, en que:

La figura 1 muestra esquemáticamente la generación de burbujas de gas por el contacto de peróxido con catalasa inmovilizada;

la figura 2 muestra un gráfico de caudal frente a concentración de analito para un dispositivo de ensayo preparado según el Ejemplo 1 a continuación;

15 la figura 3 muestra un dispositivo preparado según el del Ejemplo 2 a continuación;

la figura 4 muestra un canal de referencia y de ensayo ambos con una trayectoria de serpentín preparado según el Ejemplo 3;

la figura 5 muestra esquemáticamente una porción de un dispositivo de ensayo preparado de acuerdo con el Ejemplo 3;

20 la figura 6 muestra un gráfico de caudal frente a concentración de analito para dispositivos de ensayo preparados según el Ejemplo 3;

la figura 7 muestra un dispositivo de ensayo adicional de acuerdo con una realización de la invención;

las figura 8-11 son representaciones esquemáticas de otras posibles realizaciones de la invención;

la figura 12 es un gráfico de distancia de detención media ("Nº de bucles") frente a cantidad relativa de conjugado;

25 la figura 13 muestra un dispositivo adicional según una realización de la presente invención;

las figuras 14 y 15 muestran subcapas respectivamente de un dispositivo y el dispositivo completado de acuerdo con una realización de la presente invención y

la figura 16 muestra un gráfico del tiempo de detención medio para muestras tampón que contienen hCG de diversas concentraciones aplicadas al dispositivo como se muestra en la figura 15 y como se describe en el Ejemplo 6.

30 Lo siguiente describe las Figuras con mayor detalle.

La figura 1 muestra una porción de un dispositivo durante el uso para la detección de hCG. Una catalasa etiquetada con complejo de reactivo de unión de hCG se inmoviliza en la zona de acumulación previamente a ponerse en contacto con reactivo de peróxido de hidrógeno. En el contacto por el peróxido de hidrógeno, la catalasa después cataliza la formación de gas oxígeno.

35 La figura 2 muestra un gráfico de caudal frente a concentración de analito para diversos dispositivos de ensayo preparados de acuerdo con el Ejemplo 1. Se observó un cambio acusado en el caudal de muestra de líquido por el dispositivo de ensayo a medida que se variaba la cantidad de hCG en la muestra de líquido.

40 La figura 3 muestra un dispositivo preparado de acuerdo con el Ejemplo 2 que comprende un canal (A) de ensayo microfluídico y un canal (B) de referencia. El dispositivo comprende para cada ensayo un puerto (32) de aplicación, un canal (31) y un sumidero (33). El reactivo de unión etiquetado con catalasa se proporciona a lo largo de la longitud del canal del ensayo. Se añadió una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno y tinte visible al dispositivo en el que reaccionó el peróxido de hidrógeno con el reactivo de unión etiquetado en el ensayo - canal para generar burbujas de gas. Esto dio como resultado una disminución en el flujo de la muestra de líquido a lo largo de la trayectoria de flujo. El canal de referencia no comprendió catalasa etiquetada y no se observó disminución en flujo de muestra líquida a lo largo del canal de referencia. Por lo tanto, el tinte ha llenado casi completamente el sumidero 45 33 en el canal de referencia, mientras el tinte había llenado sólo una pequeña porción del sumidero en el canal de ensayo.

La figura 5 muestra una porción de un dispositivo de ensayo de acuerdo con una realización que comprende proyecciones para atrapar burbujas de gas.

La figura 7 muestra una realización de un dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención que comprende una puerta X microfluídica (puerta del beso) que permite que dos corrientes de fluido se lleven juntas desde los canales A y B sin introducir un bloqueo del aire.

- 5 Las figuras 8-10 son representaciones esquemáticas de diversas realizaciones de dispositivos de ensayo según la invención. En la Figura 8, se representa un dispositivo de ensayo capaz de dar lugar a un resultado de ensayo digital o binario (una respuesta "sí" o "no"), sin el uso de sistemas electrónicos y sin un suministro de energía eléctrica u otro suministro de energía. El dispositivo comprende una cámara o depósito 20 que tiene un volumen definido. La cámara 20 presenta una entrada 22 por la que se puede introducir una muestra de ensayo líquida que se tiene que analizar. Dos trayectorias 24a y 24b de flujo de ensayo se separan por ramificación desde la cámara 20 en puntos equidistantes desde la entrada 22, de manera que el líquido introducido en la cámara 20 empezará con posterioridad a entrar en las dos trayectorias 24 a, b de flujo de ensayo, simultáneamente.

10 Se proporcionan dos trayectorias de flujo de líquido indicadoras en el dispositivo: una desde la cámara 20 a la región 26a indicadora aguas abajo y una desde la cámara 20 a la región 26b indicadora. Sin embargo, se evita que el líquido en la cámara 20 avance por capilaridad a cualquiera de las regiones 26a, b, indicadoras aguas abajo por los obstáculos 28a, b, respectivos. En este ejemplo, el obstáculo se crea mediante una rotura formada por el orificio de las respectivas trayectorias 24a, b de flujo de ensayo, que forman uniones T con las trayectorias de flujo de líquido indicadoras respectivas.

15 En el ejemplo ilustrado, la misma muestra líquida actúa tanto como líquido de ensayo (que fluye por los capilares 24a, b de ensayo) y como líquido indicador (que fluye, eventualmente, desde la cámara 20 a una de las regiones 26a o 26b indicadoras). La muestra líquida puede ser, por ejemplo, sangre, orina u otro fluido corporal. En una de las trayectorias 24a, b de flujo de ensayo se pueden depositar reactivos generadores de gas que, por ejemplo, generen un gas en presencia del analito de interés. El gas forma una burbuja que bloquea el avance adicional de líquido a lo largo de la trayectoria de flujo. Esto se representa por la Figura 8 por la trayectoria 24b de flujo que es serpentin.

20 El líquido de la muestra restante en la cámara 20 actúa como un líquido indicador. Llena sustancialmente la cámara pero no puede avanzar pasados los obstáculos 28a, b proporcionados por las roturas capilares constituidas por los orificios de las trayectorias 24a, b de flujo de ensayo. Como se explicó anteriormente, el líquido de ensayo alcanza el final de la trayectoria 24a de flujo de ensayo antes de que alcance el final de la trayectoria 24b de flujo de ensayo, debido a la formación de una burbuja de gas en la trayectoria 24b de flujo. La llegada del líquido de ensayo al final de la trayectoria 24a de flujo suprime la rotura, retirando eficazmente de ese modo el obstáculo 28a, que permite que el líquido indicador avance desde la cámara a la región 26a indicadora aguas abajo (que está separada y discreta de la región 26b indicadora). La entrada del fluido indicador en la región 26a indicadora produce la formación o el aspecto de una señal visual. Esto se puede conseguir de numerosas maneras, típicamente mediante un cambio de color.

25 El volumen de la región 26a indicadora es suficiente para aceptar sustancialmente todo del líquido de la cámara 20.

A medida que el líquido empieza a desplazarse a la región 26a indicadora, el líquido en la cámara 20 es eliminado del contacto con el obstáculo 28b, aumentando con eficacia el tamaño de la rotura.

30 De acuerdo con esto, si/cuando el líquido de ensayo alcanza eventualmente el final de la trayectoria 24b de flujo de ensayo, no tendrá efecto y el líquido indicador en la cámara 20 será aún inestable para entrar en la región 26b indicadora aguas abajo.

Las figuras 9 y 10 ilustran esquemáticamente variantes de este concepto, que proporcionan de nuevo un ensayo de "Competición" proporcionando una lectura del resultado del ensayo digital o binaria.

35 El dispositivo mostrado en la Figura 9 presenta una región 2 de aplicación de la muestra conectada de manera fluida a la trayectoria 4 de flujo de ensayo y una trayectoria 6 de flujo de referencia, ambas de las cuales comprenden un canal capilar. Se puede proporcionar opcionalmente un filtro 8 en una o en ambas de las trayectorias de flujo. Las trayectorias de flujo convergen aguas abajo en una región 10 de unión que conduce a un canal 12 común. Se puede proporcionar una región 14 indicadora aguas abajo de la región 10 de unión.

40 La muestra de líquido aplicada al dispositivo vía un puerto de aplicación de la muestra en la región 2 de aplicación de la muestra es capaz de fluir respectivamente a lo largo de las trayectorias 4, 6 de flujo de ensayo y de referencia y hacia la región 10 de unión. Se proporciona uno o más conductos de ventilación en el canal 12 común y la región 14 indicadora para permitir que se desplace el aire del dispositivo por el avance de líquido a lo largo de los capilares. Sin embargo, una vez que uno de los frentes de fluido ha alcanzado la región 10 de unión, bloquea la otra trayectoria de flujo de los conductos de ventilación, evitando más avance del líquido por la otra trayectoria de flujo. Así, el dispositivo sólo permite la llegada en la región 14 indicadora de fluido que fluye a lo largo de la trayectoria de flujo cuyo frente de fluido llega primero a la región 10 de unión. Se puede proporcionar una región indicadora en los canales de fluido para permitir que un observador determine qué fluido llega primero en el respectivo canal. Por ejemplo, se pueden proporcionar tintes de diferentes colores en cada canal de manera que la muestra de fluido

pueda interactuar con el tinte para producir líquido de un color particular. Así, la presencia de un tinte coloreado particular en la región indicadora permitiría que un usuario determinara qué fluido llegaba primero a la puerta de fluido.

5 La velocidad relativa de avance de líquido a lo largo de las trayectorias 4, 6 de flujo puede verse afectada por ocasionar la formación de una burbuja de gas en un analito – manera específica en una de las trayectorias de flujo, por ej., proporcionando medios generadores de gas inmovilizados en la trayectoria de flujo que genera un gas como respuesta a la presencia del analito de interés.

Otra realización se ilustra en la Figura 10.

10 Como en la realización previa, el dispositivo de ensayo comprende un puerto de aplicación de la muestra en una región 2 de aplicación de la muestra común, del que puede fluir la muestra líquida en una parte formadora de capilar de la trayectoria 4 de flujo de ensayo y una parte formadora de capilar separada de la trayectoria 6 de flujo de referencia. Alternativamente, se puede proporcionar cada trayectoria de flujo con una región de aplicación de la muestra única, separada. Los expertos en la materia apreciarán que se puede proporcionar el dispositivo de ensayo descrito en los ejemplos presentes con trayectorias de flujo de ensayo adicionales para ensayar la presencia de
15 analitos adicionales de interés. La trayectoria o cada trayectoria de flujo de ensayo adicional se puede proporcionar, si se desea, con una trayectoria de flujo de referencia correspondiente.

En la realización representada en la Figura 2, cada trayectoria de flujo comprende un elemento 8 de filtro y una región 14 indicadora, aguas arriba de una región 10 de unión.

20 El elemento 8 de filtro comprende uno o más reactivos generadores de gas. En presencia del analito de interés (en este ejemplo, hCG) los reactivos generan un gas que forma una burbuja, que bloquea la trayectoria 4 de flujo.

Cada trayectoria de flujo se proporciona también como un tinte coloreado que se moviliza por contacto y migra, con la muestra líquida.

25 La región 14 indicadora de cada trayectoria de flujo comprende un canal capilar formador de la palabra "NO" en la trayectoria 4 de flujo de ensayo y la palabra "EMBARAZADA" en la trayectoria de flujo de referencia. Estos capilares se forman de material plástico, sintético, claro, y son contra un fondo de contraste bajo (por ejemplo, material de plástico sintético blanco o claro). De acuerdo con esto, previamente a la realización del ensayo, los capilares no son muy visibles.

30 Sin embargo, una vez que se inicia el ensayo, el tinte situado en las trayectorias de flujo aguas arriba de la región indicadora se moviliza por la muestra de líquido que avanza. Si la muestra no contiene hCG, el líquido está libre para fluir por las dos trayectorias de flujo. El líquido que contiene tinte rellena así ambos capilares, mostrando el resultado de ensayo "NO EMBARAZADA". Se pueden proporcionar conductos de ventilación en diversos puntos a lo largo de la trayectoria de flujo de referencia para estimular el flujo de líquido ahí. En particular estos conductos de ventilación se pueden proporcionar para ayudar al líquido a llenar la región indicadora de la trayectoria de flujo de referencia. Preferiblemente, no hay tales conductos de ventilación en la trayectoria de flujo de ensayo, siendo el aire ventilado
35 del capilar 4 de la trayectoria de flujo de ensayo solo vía uno o más conductos de ventilación aguas abajo de la región 10 de unión, en el canal 12 común, de manera que si el líquido que fluye a lo largo de la trayectoria 6 de flujo de referencia llega a la región 10 de unión antes que el frente de líquido que fluye por la trayectoria 4 de flujo de ensayo, el aire ya no puede desplazarse desde el capilar de la trayectoria de flujo de ensayo y se evita el avance adicional del líquido por ese canal.

40 La velocidad de flujo de líquido a lo largo de las trayectorias de flujo de ensayo y de referencia, y/o la longitud de las respectivas trayectorias de flujo, se ajusta de manera que, en ausencia de hCG, el líquido fluye a lo largo de ambas trayectorias 4, 6 de flujo y llena las respectivas regiones indicadoras. Típicamente, en ausencia de hCG en la muestra, el líquido que fluye a lo largo de la trayectoria de flujo de referencia llegará a la región 10 de unión simultáneamente con el líquido que fluye a lo largo de la trayectoria de flujo de ensayo o justo 1 ó 2 segundos
45 previamente al mismo.

50 Si, sin embargo, la muestra aplicada comprende hCG, tendrá lugar generación de gas y formación de burbujas en la trayectoria 4 de flujo de ensayo que retarda sustancialmente el avance de líquido a lo largo del capilar de la trayectoria de flujo de ensayo hacia la región indicadora. Esto permite que el líquido fluya a lo largo de la trayectoria de flujo de referencia para "ganar la competición" a la región de unión fácilmente. El líquido que fluye por la trayectoria de flujo de referencia llega a la región 10 de unión antes de que el líquido que fluye por la trayectoria 4 de flujo de ensayo llegue a la región indicadora. En este ejemplo, la palabra "NO" no llega a llenarse con tinte y permanece indistinta, mientras la palabra "EMBARAZADA" llega a ser muy visible y así se visualiza el resultado del ensayo.

55 La figura 13 muestra el dispositivo 1 que comprende una trayectoria 4 de flujo de referencia y una trayectoria 5 de flujo de ensayo con las regiones 2 y 3 de aplicación de la muestra conectando respectivamente las trayectorias de flujo de referencia y de ensayo. También se muestra una región 6 de atrapamiento de burbujas y las regiones 8 y 7 indicadoras de ensayo y de referencia. Se indica una región de unión en 10 y una zona de acumulación mostrada en

9. Se describe un ensayo llevado a cabo usando el dispositivo de la Figura 13 en el Ejemplo 5. El canal de referencia como se muestra en la figura es principalmente lineal con una forma de serpentín en su extremo distal mientras el canal de ensayo es de forma de serpentín principalmente. La forma intrincada de ambos canales se empleó en este caso para hacer más compacto el dispositivo.

- 5 Las figuras 14 y 15 muestran respectivamente los sublaminaados de un dispositivo A, B y C y el dispositivo 30 completado. El dispositivo 30 comprende dos canales 32 de ensayo de idéntica forma y dimensiones comprendiendo cada uno una trampa 31 de burbujas grabada y zonas 34 de aplicación de la muestra.

Ejemplo 1: Un inmunoensayo de restricción de flujo para hCG que comprende un portador poroso de nitrocelulosa.

Se preparó un dispositivo de ensayo como sigue:

- 10 Preparación de reactivos:

La inmovilización conjunta de anti-hCG y catalasa sobre partículas de látex de poliestireno azul.

Materiales

- Partículas de látex de poliestireno azul Duke Scientific de 400 nm de diámetro sólidas al 10% (p/v) lote CB1860
- Etanol al 95% BDH Analar más acetato de sodio al 0,5% (Sigma)
- 15 • Albúmina de Suero Bovino (BSA) Intergen Cohn 5YT 19202 preparada como 200 mg/ml en agua desionizada.
- Clon 3299 interno Anti- α hCG lote PL 1257 3,4 mg/ml en PBSA
- Catalasa Sigma de eritrocitos humanos 90% puro SDS-PAGE C3556 lote 116K1463 a 52.200 unidades/mg de proteína suministrada en Tris 50 mM pH 8,0.
- tampón de borato 10 mM pH 8,5

- 20 Método

1. Diluir partículas de látex a 0,5% de sólidos (p/v) en tampón de borato 10 mM (preparar 1 ml de látex diluido en un tubo Eppendorf de 1,7 ml).
2. Centrifugar el tubo Eppendorf a 1.832 rad/s (17.500 rpm) (25.848 rcf) @ 15°C en una centrífuga Heraeus Biofuge 17RS durante 5 minutos.
- 25 3. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón en 1 ml de tampón de borato 10 mM.
4. Poner 100 μ g de catalasa en un tubo Eppendorf de 1,7 ml fresco y añadir 100 μ g de anti-hCG.
5. Añadir el látex lavado de la etapa 3 al tubo Eppendorf de la etapa 4 y mezclar bien llenando y vaciando repetidamente la micropipeta (~6 ciclos de llenado y vaciado).
6. Inmediatamente añadir 200 μ l de etanol-acetato y mezclar bien en un mezclador durante ~ 5 segundos.
- 30 7. Poner el tubo Eppendorf en una mezcladora de tambor vertical (~6 rad/s (60 rpm)) durante 60 minutos a temperatura normal.
8. Añadir 50 μ l de BSA 200 mg/ml y continuar mezclando en una mezcladora de tambor vertical (~6 rad/s (60 rpm)) durante 30 minutos.
- 35 9. Repetir la etapa 2, retirar y desechar el sobrenadante. Volver a suspender el botón en 1 ml de tampón de borato 10 mM. Añadir 50 μ l de BSA 200 mg/ml y mezclar bien.
10. Repetir la etapa 2, retirar y desechar el sobrenadante. Volver a suspender el botón en 1 ml de tampón de borato 10 mM. Añadir 50 μ l de BSA 200 mg/ml y mezclar bien.
11. Repetir la etapa 2, retirar y desechar el sobrenadante. Volver a suspender el botón en 1 ml de tampón de borato 10 mM. Añadir 50 μ l de BSA 200 mg/ml, mezclar bien y almacenar durante la noche a 4°C.
- 40 12. Repetir la etapa 2, retirar y desechar el sobrenadante. Volver a suspender el botón en 1 ml de tampón de borato 10 mM. Añadir 50 μ l de BSA 200 mg/ml y mezclar bien.

La preparación de membrana de nitrocelulosa con una zona inmovilizada de anti- β hCG.

Materiales

Membrana de nitrocelulosa 8 µm sobre un soporte Mylar

Clon 3468 interno anti-β hCG monoclonal a 3 mg/ml

5 Alcohol polivinílico (PVA) al 1% (p/v) Sigma m 10.000 más sacarosa al 3% (p/v) (Sigma S8501) en agua desionizada (tampón de bloqueo)

Método

1. Depositar el anti-β hCG a 3 mg/ml usando una bomba dosificadora y jeringa para producir una zona en la membrana de nitrocelulosa ~1 mm de ancho y ~ 300 mm de longitud (depositado a ~ 0,1 µls/mm).

10 2. Secar la membrana de nitrocelulosa a 50°C en aire caliente durante ~ 10 minutos. Aplicar el tampón de bloqueo en un extremo de la membrana y permitir que se humedezca la membrana corriendo paralela a la longitud del tubo de ensayo hasta que se satura la membrana.

3. Secar la membrana de nitrocelulosa a 75°C en aire caliente durante ~ 10 minutos.

4. Cortar la membrana en tiras ~ 6 mm de ancho y 40 mm de longitud con una zona de ensayo de anti-β hCG corriendo por su anchura (6 mm), estando el tubo de ensayo ~10 mm de la base de la tira.

15 Protocolo para conducir un inmunoensayo de restricción de flujo para hCG.

1. Disponer tiras de membrana de nitrocelulosa sobre un soporte vertical con el extremo proximal de la tira de ensayo tocando la base del banco de laboratorio (tubo de ensayo colocado ~ 10 mm para la base). Aplicar papel secante de gel como sumidero al extremo distal de las tiras de ensayo.

20 2. Preparar una mezcla de 10 µls de látex recubierto en anti-α hCG más 50 µls de estándar tamponado (PBSA) que contiene 0 mUI/ml hCG. Aplicar esta mezcla a la base de la tira de ensayo y permitir cromatografiar hasta que se seca en la base. Aplicar 50 µls de tampón de borato a la base de la tira y permitir cromatografiar hasta que está seco en la base.

3. Secar las tiras de ensayo a temperatura normal durante ~ 3 horas.

25 4. Aplicar una película de material laminado adhesivo (ARCare 7759 co #D9012) a la superficie de la membrana de nitrocelulosa, corriendo ~2 mm desde el extremo proximal de la membrana en el extremo distal de manera que cubra la anchura completa de la tira.

5. Formar un sándwich con la tira de ensayo entre dos portaobjetos y mantener estos juntos con pinzas de cocodrilo. Poner la tira de ensayo verticalmente con el extremo proximal en contacto con el banco de laboratorio.

30 6. Aplicar 50 µls de H₂O₂ al 5% (v/v) (diluido de una disolución madre de H₂O₂ al 30% Sigma H-1009 lote 021K3250 usando agua desionizada más 5 mg/ml de BSA) a la base de la tira de ensayo y permitir cromatografiar. Observar el movimiento del frente del disolvente y registrar el tiempo que le lleva al frente de disolvente desplazarse una distancia de 32 mm desde el instante de aplicar el H₂O₂.

7. Repetir lo anterior para generar 3 replicados más de tiras de ensayo actuando con 0 mUI/ml de hCG.

35 8. Repetir lo anterior para generar 4 tiras de ensayo actuando cada una con 10, 25 y 50 mUI/ml de hCG de patrones tamponados.

Se representó un gráfico para la cantidad de analito hCG presente en la muestra frente al tiempo que le lleva al frente de disolvente de la muestra líquida desplazarse por la matriz porosa.

El gráfico se ilustra en la Fig 1. A partir de la Fig. 1 se puede ver que la presencia de analito hCG en la muestra líquida da como resultado una disminución del caudal de la muestra líquida.

40 Ejemplo 2: Ensayo de capilar usando burbujas de oxígeno para detener el flujo en un modo dependiente del analito.

Construcción del capilar:

Base: Portaobjetos de poliestireno.

Medio: cinta PSA blanca de doble lado ~10 µm (Adhesive Research ARCare 7840)

Parte superior: 175 µm de película de poliéster (tratado antiestático)

45 Se prepararon capilares de 2 x 1 mm en la cinta PSA blanca por la longitud del portaobjetos, (véase a continuación).

Cámara de recogida de volumen:

Base y parte superior: 175 µm de película de poliéster (tratado antiestático)

Medio: cinta PSA blanca de doble lado ~10 µm (Adhesive Research ARCare 7840)

5 Cámara de 6 mm que disminuye gradualmente a 1 mm en cada extremo, que puede quedar bloqueada en el porta capilar para la última etapa del protocolo, (véase a continuación)

Formato de ensayo:

Protocolo para ambos canales.

1. Aplicar 15 µl de 3.468 a 2,03 mg/ml Lote PL 1322 por la longitud del canal y dejar durante diez minutos.

2. Aplicar 20 µl de 5 mg/ml de betacaseína en PBS. Dejar durante diez minutos.

10 3. Aplicar 5 mg/ml de betacaseína más, 10x 5 µl/canal.

4. Cargar con 5 x5 µl de 5K mUI/ml de hCG estd o 0 estd preparado en 5 mg/ml de betacaseína. Dejar cinco minutos.

5. En cuanto a 3.

6. Cargar 5 x 5 µl de 0,05% (BR101007) 3299-partículas de látex de catalasa (400 nm). Dejar 20 minutos.

15 7. Lavar 20 x 5 µl de PBS, después 2 x 5 µl de tinte rojo/canal.

8. Unir la cámara de recogida y empezar el video.

9. Añadir 5 µl de peróxido de hidrógeno al 1% en PBS con tinte azul 1/6. Dejar durante 10 minutos después sigue con lotes de 5 µl adicionales de peróxido de hidrógeno.

Ejemplo 3: Ensayo de capilar usando burbujas de oxígeno para detener el flujo en un modo dependiente del analito.

20 Se construyó un ensayo de capilar de tipo microfluídico en el que se inmovilizó el complejo de primer reactivo de unión-reactivo de unión etiquetado de analito o capturado en una zona de reacción mediante un imán. Según este ejemplo, se etiquetó el primer reactivo de unión con una partícula magnética.

Construcción de capilar:

Base y parte superior: 175 µm de película de poliéster (tratado antiestático) HiFi PMX 715

25 Medio: cinta PSA blanca de doble lado ~10 µm (Adhesive Research ARCare 7840)

Se prepararon capilares de 2 x 1 mm en la cinta PSA blanca por la longitud del dispositivo en un patrón de serpiente. En el extremo de aplicación de la muestra se cortó un círculo grande y en el canal recto antes del patrón hay una serie de dientes "de tiburón". Debajo del dispositivo justo enfrente de los dientes se dispuso una grapa y un imán de manera que se orientara el campo magnético para permitir la captura de perlas magnéticas de 1 µm.

30 Protocolo

1. Preparar muestras de ensayo y de control:

Reactivos: estds hCG, sin azida. En 1 mg/ml de BSA + 0,05% de ProClin 300 3.468 perlas magnéticas (Dynabeads - MyOne tosilactivadas)

3299-Conjugado de catalasa (glutaraldehído DT CI 29/11/07)

35 Control: 5 µl de perlas magnéticas, 5 µl de conjugado C1 y 10 µl 0hCG

Ensayo : 5 µl de perlas magnéticas, 5 µl de conjugado C1 y 10 µl 500 mUI/ml de hCG

2. Añadir 2 µl de disolución de tinte. (1/4 tinte alimentario azul)

3. Añadir 2 µl de mezcla partícula/conjugado/hCG a canal T o C

4. Añadir 60 µl de peróxido de hidrógeno al 1% a cada canal

40 5. Vigilar el frente de tinte por los capilares (video)

Se preparó una serie de dichos dispositivos y se ensayó con una serie de muestras líquidas comprendiendo concentraciones variables de analito hCG y se midió la distancia en mm que el frente de fluido líquido fluyó a lo largo del canal (distancia de detención). El gráfico de distancia de detención frente a concentración de hCG se muestra en la Fig. 6.

- 5 El dispositivo de ensayo mostrado en la Fig. 7 se puede usar para permitir que fluya un primer fluido en el depósito A y un segundo fluido en el depósito B a lo largo de sus respectivos canales y se encuentren en una unión o puerta (x). Además, la construcción es tal que el líquido de un primer depósito (A) fluye a lo largo de la trayectoria de flujo para llegar a una zona (Y) de inmovilización previamente a la llegada de líquido a la zona de inmovilización del segundo depósito (B). El depósito B (o la trayectoria de flujo aguas abajo del mismo) puede contener el segundo reactivo y el depósito A (o la trayectoria de flujo aguas abajo del mismo) puede contener el primer reactivo etiquetado. También se proporciona un canal C de referencia.

La Figura 7 muestra esquemáticamente las tres capas usadas para construir una puerta microfluidica (puerta del beso) que permite que dos corrientes de fluido se lleven juntas sin introducir una bolsa de aire.

Base y parte superior (71 y 73): 175 μm de película de poliéster (tratada antiestática) HiFi PMX 715

- 15 Medio (72): cinta de PSA blanca de doble lado de $\sim 100 \mu\text{m}$ (Adhesive Research ARCare 7840)

La capa (71) de base presenta una ranura marcada en la misma sobre el lado hidrófilo de la película de poliéster en la posición en que se encuentran las dos corrientes de fluido. La capa (72) media se usa para construir canales que tienen una anchura de $\sim 1 \text{ mm}$ que comprende el canal de ensayo con dos alimentaciones A y B y un canal C de referencia. La capa (73) superior está adherida a la superficie hidrófoba hacia abajo sobre la capa media de PSA y presenta agujeros cortados en la misma para permitir que la muestra se aplique simultáneamente a los canales A, B y C de fluido. La capa 73 superior presenta también una abertura que actúa como un conducto de ventilación en el extremo del canal A.

Se secan reactivos de inmunoensayo en el depósito A y se secan reactivos generadores de peróxido de hidrógeno (por ejemplo, peróxido de hidrógeno de urea) en el depósito B.

- 25 Cuando se aplica muestra simultáneamente a los tres depósitos, tiene lugar flujo en las tres trayectorias de flujo.

Los reactivos de inmunoensayo (por ejemplo, perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo y catalasa - conjugado de anticuerpo en un ensayo por ejemplo para hCG) se vuelven a hidratar por la muestra y pasan el canal A. Cuando llegan a la intersección con el canal B la línea de marca en la base hidrófila evita que el líquido cruce al canal B y así el flujo continúa bajando al extremo del canal. En presencia de analito el inmunocomplejo formado es capturado en la parte dentada del canal (zona de ensayo o de captura Y), aguas abajo de la puerta del beso.

Se vuelven a hidratar los reactivos generadores de peróxido de hidrógeno en la cámara B y pasan el canal B más largo a la intersección con el canal A (puerta del beso). Cuando el fluido en la cámara B alcanza la puerta del beso la presencia de fluido del canal A permite que el peróxido de hidrógeno generado ahora cruce al canal A. Los volúmenes de muestra suministrados a los depósitos A y B son tales que el depósito A llega a agotarse para el instante en que el fluido en el canal B llega a la puerta del beso, esto de manera que el flujo cambia de flujo de A al 100% a flujo de B del 100%. Cuando el peróxido de hidrógeno pasa por el inmunocomplejo en Y, se genera oxígeno que forma una burbuja que retarda o detiene el flujo.

Se pueden introducir estructuras en los depósitos para ayudar al secado uniforme y liberación lenta de los reactivos en la rehidratación. La forma, altura, propiedades superficiales y densidad de estas estructuras influye en el proceso de secado y rehidratación. La adición de un pilar (altura completa, círculo de $\sim 1 \text{ mm}$ de diámetro de PSA de $100 \mu\text{m}$) al depósito justo enfrente de la entrada al canal se puede usar para canalizar el complejo rehidratado bajo el centro del canal y no bajo los lados donde el flujo se ve influenciado por las paredes del canal. Esto permite la evacuación más completa y más rápida de los reactivos del depósito.

Ejemplo 4

- 45 Reactivo de conjugado seco.

Esto consistió en un látex magnético de 1 micrómetro de diámetro con anti-beta hCG adsorbido (clon 3468) – 3.468 perlas magnéticas, un conjugado preparado de catalasa de eritrocito humano ligada a anti-alfa hCG (clon 3299) y que comprende además BSA, sacarosa, disolución salina tamponada de fosfato, pH 7,4 que contiene ProClin 300 al 0,05% se mezclaron según la tabla 1.

50

Mezcla	6A	6B	6C	6D
3.468-perlas mag (40 µg 3.468) 10 mg/ml /µl	70,4	91,5	70,4	70,4
sacarosa al 50% p/p /µl	21,12	27,5	21,12	21,12
BSA 200 mg/ml en PBS, PC300 0,05% /µl	14,4	18,2	14,4	14,4
1 mg/ml BSA en PBS, PC300 0,05% /µl	12,6	14	7,2	0
Conjugado 11 /µl	1,8	4,7	7,2	14,4
conjugado rel amt	1	2	4	8
Estado seco: sacarosa % p/p	74,7	75,1	74,7	74,7
Estado seco: BSA	20,4	19,9	20,4	20,4
Estado seco: perlas mag	5,0	5,0	5,0	5,0

Tabla 1:

5 Para cuatro microlitros de reactivo se secaron en áreas apropiadas de las tapas de dispositivos de ensayo, se secaron al aire después se dejaron secar durante la noche en un desecador cargado con un tamiz molecular. Se montaron los dispositivos y se ensayaron por rehidratación primero del reactivo con 3 µl de disolución de hCG en PBS, 0,1% de ovalbúmina, azida de sodio al 0,1% pH 7,4 durante 60 s expulsando después esto a la zona de captura magnética y después 10 µl de peróxido de hidrógeno en 1 mg/ml de BSA en PBS, se añadió PC300 al 0,05% a la zona de reactivo de peróxido y se dejó en contacto con el lecho de partículas capturadas durante 60 s antes de fomentar el flujo con una segunda adición de 35 µl de la misma disolución de peróxido a la zona de reactivo de peróxido. La distancia desplazada por el menisco de líquido a lo largo del canal de serpentín se midió y se representó gráficamente el promedio de diversas mediciones de replicados en la Figura 12. La figura 11 es una vista esquemática de un dispositivo de ensayo similar al empleado en este ejemplo.

10 En la Figura 12 los datos en 8 bucles o más indicaron que el menisco se desplazaba al final del dispositivo (1 bucle = 20 mm de longitud). Claramente el reactivo movilizado, que forma un lecho de material magnético, puede capturar catalasa en presencia de hCG y detener el flujo de fluido.

15 Peróxido de hidrógeno reactivo.

20 Una disolución de 131 mg de polvo de urea:peróxido (preparado moliendo un comprimido de producto Fluka 95314, lote 1326053) y 47 mg de sacarosa disueltos en 0,75 ml de PBS, ProClin 300 al 0,05%, pH 7,4 se fijó a pH 6,9 con NaOH 2 M. Se secaron dos volúmenes de 4 µl sobre la base del dispositivo en la región B y se secó en una corriente de aire a temperatura ambiente (ca 22°C), después se puso en un desecador que contenía un tamiz molecular desecante. La base en la región B se raspó para permitir que se asiriera el reactivo y localizarlo cuando se pipetea sobre él.

Para ensayo:

25 1. Añadir 8 µl de perlas de látex magnético de 1 mm de diámetro (50 ml de 10 mg/ml) con anti-beta hCG ligado, 75 ml de 0,0054 mg/ml de perlas magnéticas de 1 mm de diámetro con catalasa ligada y 75 ml de 1 mg/ml de albúmina de suero bovino en disolución salina tamponada con fosfato, (ProClin 300 al 0,05%, pH 7,4) a la región A para suministrar algunas partículas de catalasa y partículas anti- beta hCG a la grapa magnética de captura donde forman una línea en C. Marcar la posición del menisco.

30 2. Añadir 7 ml de 1 mg/ml de BSA, en PBS, ProClin300 al 0,05%, pH 7,4 (tampón A) al reactivo urea:peróxido seco en la región B, dejar 60 s para hidratar. El menisco se detiene por debajo de la puerta del beso.

3. Añadir 30 ml de tampón A a la región B para expulsar urea:peróxido disuelto por el lecho de perlas magnéticas. Marcar la posición en la que el menisco deja de moverse.

Resultado:

35 Se generan burbujas en y cerca del lecho de perlas magnéticas que detuvo el flujo, indicando que se había suministrado peróxido al lecho. Las distancias de detención fueron 1; 1,3; 0,8; 1,3; 1,7; 0,6 bucles (1 bucle = 20 mm de longitud el capilar de serpentín).

El trabajo adicional indicó que había alguna dependencia en el % de sacarosa en el reactivo seco, el volumen de

reactivo seco y la profundidad de la texturización en la base. A partir de este trabajo inicial la receta detallada anteriormente, con sacarosa al 26 % en la formulación seca, fue la mejor de tres ensayadas (las muestras contenían 0, 26 % y 42% de sacarosa respectivamente en la formulación seca).

Ejemplo 5

5 Se preparó un dispositivo según la Figura 13 como sigue:

Se prepararon dos capas de poliéster no tratadas de dimensiones 25 mm de ancho x 90 mm de longitud x 175 μ m de altura y una de 25 mm de ancho x 90 mm de longitud x 100 μ m de altura (HiFi PMX 739) para formar respectivamente la base, la tapa y la junta del dispositivo de diagnóstico.

10 Se trató la superficie inferior de la tapa con un recubrimiento hidrófilo antiestático (HiFi PMX 715) y el diseño microfluídico como se muestra en la Fig 13 se cortó de la junta usando un plotter Graphtec. Se aplicó cola a las superficies superior e inferior de la junta y las tres capas laminadas juntas. El dispositivo resultante presentaba canales microfluídicos con un techo hidrófilo y paredes no tratadas y un suelo.

15 La altura de los canales fue 100 μ m y la anchura 1 mm. La longitud del canal de referencia desde la zona 2 de aplicación de la muestra a la región 7 indicadora fue aproximadamente 12 mm y la longitud del canal de ensayo desde la zona 3 de aplicación de la muestra a la región 8 indicadora fue aproximadamente 11,5 mm. La trampa 6 de burbujas comprendía fibra de vidrio (Millipore G028) de magnitudes 1 mm de ancho x 5 mm de longitud. La zona 9 de acumulación estaba situada 1 mm aguas arriba de la trampa de burbujas. Las zonas indicadoras comprendían cada una un papel de cromatografía de 4 mm² Whatman N° 1 que contenía indicador de color Brillinat Blue R.

20 Se añadió una mezcla incubada de 2 μ l de anticuerpo a hCG (clon 3468 propio) unido a una partícula magnética de 1 μ m, hCG (10.000 mUI/ml) y un segundo anticuerpo a hCG (clon 3299 propio) etiquetado con catalasa a la región 3 de aplicación de la muestra. Se retiraron las partículas magnéticas y se mantuvieron en la zona 9 de acumulación mediante un imán. Se añadieron después de eso 6 μ l de tampón PBS a la zona 3 de aplicación de la muestra para lavar el complejo etiquetado. Se añadieron simultáneamente 10 μ l de peróxido al 0,5% en PBS y 10 μ l de PBS a las regiones 3 y 2 de aplicación de la muestra respectivamente. El peróxido reaccionó con la catalasa en la zona de acumulación para generar burbujas que fueron atrapadas en la trampa 6 de burbujas y que detuvo el flujo en el canal de ensayo. El flujo continuó en el canal de referencia que se indicó mediante el cambio de color en la región 7 indicadora. No se observó cambio de color en la región 8 indicadora. Se detuvo el flujo en el canal de ensayo entre 34 y 40 segundos después de aplicación de peróxido a la zona 3 de aplicación de la muestra.

Ejemplo 6

30 Se preparó un dispositivo de acuerdo con el dispositivo mostrado las figuras 14 y 15. Las dimensiones externas del dispositivo y la altura, anchura, longitud y materiales de los materiales laminados A, B y C fueron iguales que los usados en el dispositivo según el Ejemplo 5.

35 Una porción de 3 mm x 2 mm de la superficie superior del material laminado C se grabó con un plotter Graphtec en un diseño en hash que comprendía una serie de líneas grabadas con una separación de 0,2 mm para proporcionar una trampa de burbujas. La trampa de burbujas resultante en el dispositivo acabado fue 1 mm de ancho x 2 mm de longitud.

El canal en 36 en la Figura 15 estaba restringido en su anchura en un área pequeña aguas arriba de la trampa de burbujas para ayudar a la recogida de las burbujas y mejorar su restricción en el flujo.

El protocolo de ensayo fue como sigue:

- 40
- Partículas magnéticas de Ademtech (pre-recubiertas de Estreptavidina) recubiertas con anti- β hCG biotinilado.
 - Tampón de ensayo PBS más 1 mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino)
 - Patrones de hCG tampón en tampón de ensayo
 - Tampón pulverizador (Tris 100 mM más BSA al 10% y sacarosa al 20% pH 9)
 - Anti- α - hCG ligado a catalasa por conjugación de glutaraldehído C12 : diluido 1:4 en tampón de ensayo
- 45
- Disolución de peróxido patrón Sigma al 30% (p/v)

1. Preparar las perlas magnéticas en tampón de pulverización @ sólidos al 1%.

2. Mezclar 5 μ l de perlas magnéticas en tampón de pulverización con 5 μ l de patrón tampón que contiene 0 hCG. Añadir 2,5 μ l de conjugado diluido C12 e incubar la mezcla durante 90 segundos a temperatura ambiente.

3. Disponer un dispositivo laminado con una trampa magnética colocada ~ 1 mm aguas arriba del área restringida

del canal.

4. Aplicar 2 μ l de la mezcla anterior al canal y dejar esto actuar a su través. Se observó que las perlas magnéticas se recogían en el área de la trampa.
5. Aplicar 6 μ l de tampón de ensayo al dispositivo y dejar que esto actúe a su través. Marcar el punto alcanzado por el frente del disolvente una vez que se detiene el flujo.
6. Añadir 40 μ l de peróxido a 0,5% (v/v) (preparado en tampón de ensayo) al dispositivo y observar el tiempo que lleva detener el flujo.
7. Repetir lo anterior usando reactivos frescos y un dispositivo laminado nuevo.
8. Repetir lo anterior usando patrones de hCG que contenían 20.000 ó 2.500 ó 312 ó 156 mUI/ml de hCG de manera que se produjeran dos replicados para cada nivel de hCG.

Resultados

El flujo en los dispositivos barridos con 0 hCG no se detuvo, se observó que el líquido se movía hasta el final del canal de ensayo. El flujo del dispositivo barrido con los niveles de hCG ensayados se pudo discriminar de los dispositivos barridos con 0 hCG (sobre +/-2 d.e.).

- 15 El tiempo de detención medio en segundos para una serie de muestras tampón que contenían hCG se muestra en la Figura 16. Las concentraciones de hCG indicadas en la gráfica son los niveles de hCG reales producidos en la dilución como se crea en la etapa 2 anterior. Como se puede observar a partir de esta Figura, aumentar el nivel de hCG dio como resultado una disminución en el tiempo de detención medio.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de ensayo para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito de interés en una muestra líquida aplicada, o introducida de otro modo, al dispositivo, comprendiendo el dispositivo:
- al menos una trayectoria de flujo de ensayo a lo largo de la cual fluye un líquido;
- 5 un medio generador de gas que comprende al menos un reactivo que interactúa con al menos un segundo reactivo para generar un gas dependiente de la presencia, ausencia o cantidad de un analito, cuyo gas crea una o más burbujas en la muestra líquida que actúan modificando la velocidad de flujo del líquido a lo largo de la trayectoria de flujo a una zona aguas abajo y
- 10 un medio de detección para detectar la modificación de la velocidad de flujo del líquido, en el que la modificación de la velocidad de flujo del líquido a lo largo de la trayectoria del flujo es indicativa de la presencia y/o la cantidad de un analito.
2. El dispositivo de ensayo según la reivindicación 1, en el que el medio generador de gas genera gas oxígeno y/o en el que uno de los reactivos es etiquetado con un reactivo de unión para el analito o para un reactivo de unión para el analito.
- 15 3. El dispositivo de ensayo según la reivindicación 1, que comprende un medio indicador para detectar la presencia o llegada de líquido a la zona aguas abajo.
4. Un dispositivo de ensayo para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito de interés en una muestra líquida, comprendiendo el dispositivo:
- a) zona de aplicación de la muestra para aplicación de muestra líquida al dispositivo;
- 20 b) al menos una trayectoria de flujo de ensayo a lo largo de la cual fluye un líquido;
- c) un reactivo de unión etiquetado con un primer reactivo y proporcionado aguas arriba de una zona de acumulación proporcionada dentro de dicha trayectoria de flujo, siendo capaz dicho reactivo de unión de unirse al analito o a un reactivo de unión para el analito;
- 25 d) una zona de acumulación capaz de inmovilizar el reactivo de unión etiquetado en la que la acumulación de reactivo etiquetado en la zona de acumulación depende de la presencia, ausencia o cantidad de analito en la muestra líquida; siendo el dispositivo de manera que, en su uso, tiene lugar una reacción entre cualquier reactivo de unión etiquetado inmovilizado en la zona de acumulación y un segundo reactivo para producir un gas, formando dicho gas una o más burbujas en la muestra líquida, burbujas que actúan modificando la velocidad de flujo del líquido por la trayectoria del flujo, en la que la modificación del caudal de flujo del líquido es indicativa de la presencia o la cantidad de analito en la muestra líquida y
- 30 e) un medio de detección para detectar la modificación en la velocidad de flujo del líquido.
5. El dispositivo de ensayo según la reivindicación 4, en el que el segundo reactivo se proporciona aguas arriba de la zona de acumulación de manera que en su uso, todo o sustancialmente todo el reactivo de unión etiquetado es transportado a la zona de acumulación previamente a la llegada de segundo reactivo a dicha zona.
- 35 6. El dispositivo de ensayo según la reivindicación 4, que comprende un medio indicador proporcionado aguas abajo de la zona de acumulación para detectar la presencia o llegada de líquido.
7. Un dispositivo de ensayo para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito de interés en una muestra líquida, comprendiendo el dispositivo:
- a) una zona de aplicación de la muestra para aplicación de muestra líquida al dispositivo;
- 40 b) al menos una trayectoria de flujo de ensayo a lo largo de la cual fluye un líquido;
- c) un reactivo de unión etiquetado con un primer reactivo y proporcionado aguas arriba de una zona de acumulación proporcionada dentro de dicha trayectoria de flujo, siendo capaces dichos reactivos de unión de unirse al analito o a un reactivo de unión para el analito;
- d) un segundo reactivo proporcionado aguas arriba de la zona de acumulación y
- 45 e) una zona de acumulación capaz de inmovilizar el reactivo de unión etiquetado, en la que la acumulación de reactivo etiquetado a la zona de acumulación depende de la presencia, ausencia o cantidad de analito en la muestra líquida; siendo el dispositivo de manera tal, en su uso, que todo o sustancialmente todo el reactivo de unión etiquetado es transportado a la zona de acumulación previamente a la llegada de segundo reactivo a dicha zona, con lo cual la llegada del segundo reactivo a la zona de acumulación tiene lugar una reacción entre cualquier

- reactivo de unión etiquetado inmovilizado en la zona de acumulación y el segundo reactivo para producir un gas, formando dicho gas una o más burbujas en un líquido, estando formadas dichas burbujas o estando producidas de otro modo para estar presentes en el líquido en la trayectoria de flujo, burbujas que actúan modificando la velocidad de flujo del líquido a lo largo de la trayectoria de flujo, en la que la modificación de la velocidad de flujo del líquido es indicativa de la presencia y/o cantidad de analito en la muestra líquida.
- 5
8. El dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que el primer reactivo se proporciona en una primera trayectoria de flujo y el segundo reactivo se proporciona en una segunda trayectoria de flujo y en el que la primera y la segunda trayectoria de flujo convergen en la región de, o aguas arriba de, la zona de acumulación, comprendiendo el dispositivo preferiblemente una zona de aplicación de la muestra común proporcionada aguas arriba de ambas trayectorias de flujo.
- 10
9. El dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en el que el primer y segundo reactivos comprenden un agente reaccionante y un catalizador que cataliza la conversión del agente reaccionante en un producto gaseoso.
10. El dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en el que: el primer reactivo es una enzima, preferiblemente catalasa y/o el segundo reactivo se elige de un perácido o un compuesto de peróxígeno.
- 15
11. El dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, que comprende además un medio de detección para detectar la modificación en la velocidad de flujo del líquido y/o una región indicadora proporcionada aguas abajo de la zona de acumulación para detectar la presencia o la llegada de líquido.
- 20
12. El dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 4-11, que comprende además una trayectoria de flujo de referencia, preferiblemente en el que la trayectoria de flujo de referencia converge en una región de unión con la trayectoria de flujo de ensayo aguas abajo de la zona de acumulación, preferiblemente además en el que se proporciona una región indicadora aguas abajo de la región de unión o respectivamente en cada una de las trayectorias de flujo de referencia y de ensayo aguas arriba de la región de unión.
- 25
13. El dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 4-12, que comprende además un ensayo de control, preferiblemente en el que el ensayo de control comprende una trayectoria de flujo de ensayo de control y/o una trayectoria de flujo de referencia de control y en el que preferiblemente la trayectoria de flujo de ensayo de control se cruza con la trayectoria de flujo de referencia de control en una región de unión aguas abajo.
- 30
14. El dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dispositivo: i) comprende un medio indicador de resultados del ensayo binario o digital, no electrónico y/o ii) no comprende elementos que requieran una fuente de energía y/o una fuente de energía.
15. Un método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito de interés en una muestra líquida que comprende las etapas de:
- poner en contacto la muestra líquida que se sospecha que contiene analito con un medio generador de gas, medio generador de gas que comprende al menos un reactivo que interactúa con al menos un segundo reactivo para formar un gas que depende de la presencia, ausencia o cantidad de analito, gas que crea una o más burbujas en la muestra líquida que actúan modificando la velocidad de flujo del líquido a lo largo de la trayectoria de flujo y determinar la modificación de la velocidad de flujo en el líquido en el que la modificación de la velocidad de flujo del líquido a lo largo de la trayectoria de flujo es indicativa de la presencia y/o cantidad de analito en la muestra líquida.
- 35
16. Un método para determinar la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra líquida, comprendiendo las etapas de:
- 40
- a) poner en contacto la muestra líquida que se sospecha que contiene analito con un reactivo de unión etiquetado con un primer reactivo, en el que el reactivo de unión es capaz de unirse al analito o a un reactivo de unión para el analito;
- 45
- b) ocasionar la acumulación, en una zona de acumulación, del reactivo de unión etiquetado, en el que la acumulación de reactivo etiquetado en la zona de acumulación depende de la presencia, ausencia o cantidad de analito en la muestra líquida y
- 50
- c) poner en contacto el reactivo de unión etiquetado en la zona de acumulación con un segundo reactivo de manera que los reactivos primero y segundo reaccionen para formar un gas, gas que crea una o más burbujas en la muestra líquida, que actúa modificando la velocidad de flujo del líquido a lo largo de la trayectoria de flujo, en el que la modificación de la velocidad de flujo del líquido a lo largo de dicha trayectoria de flujo es indicativa de la presencia y/o cantidad de un analito en la muestra líquida.
17. El método según la reivindicación 15 ó 16, en el que: i) el flujo de líquido se reduce o se detiene y/o ii) el flujo se compara al flujo de líquido en una trayectoria de flujo de referencia.

18. El método según cualquiera de las reivindicaciones 15, 16 ó 17, en el que la muestra líquida comprende una muestra biológica, preferiblemente en el que la muestra biológica comprende orina y/o en el que el analito se elige de uno cualquiera de un hapteno, hCG o LH.

Fig 1

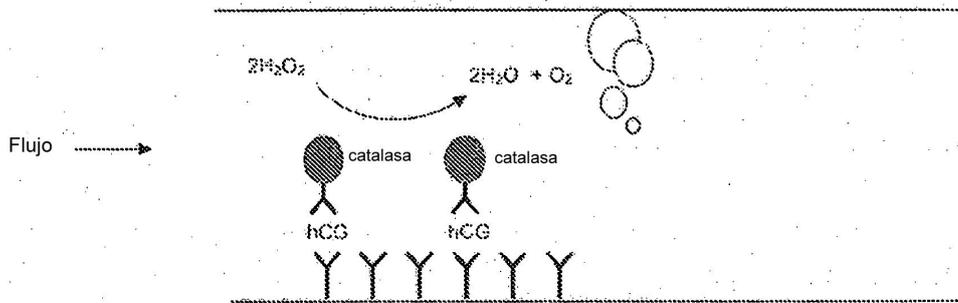


Fig 2

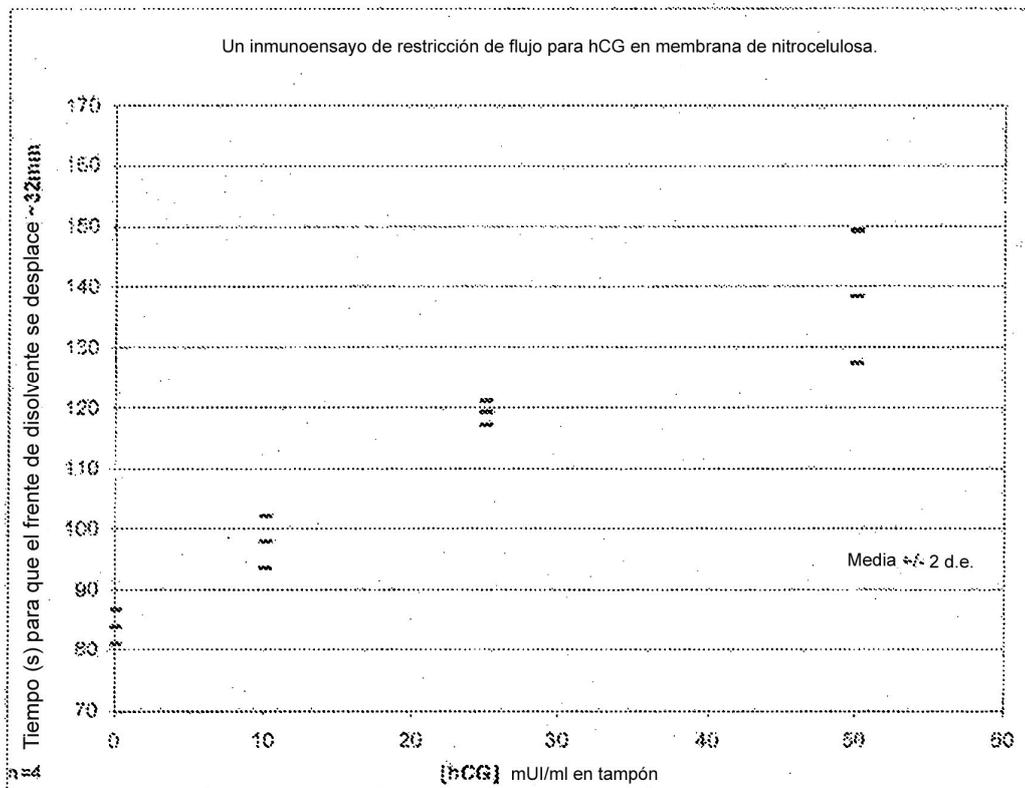


Fig 3

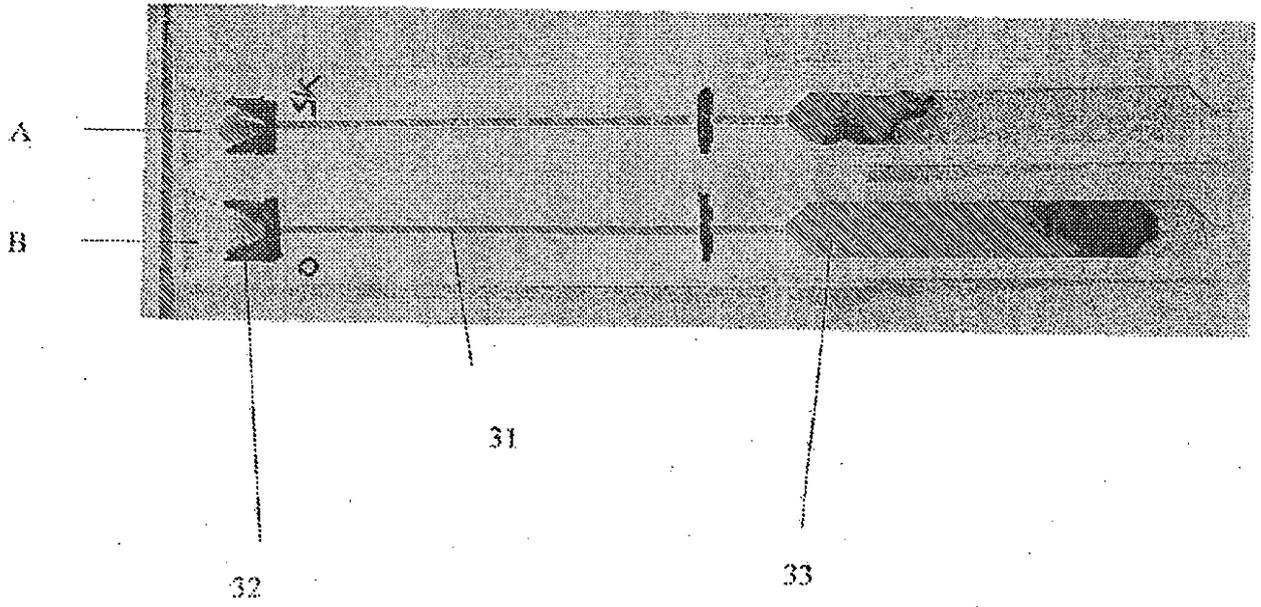


Fig 4

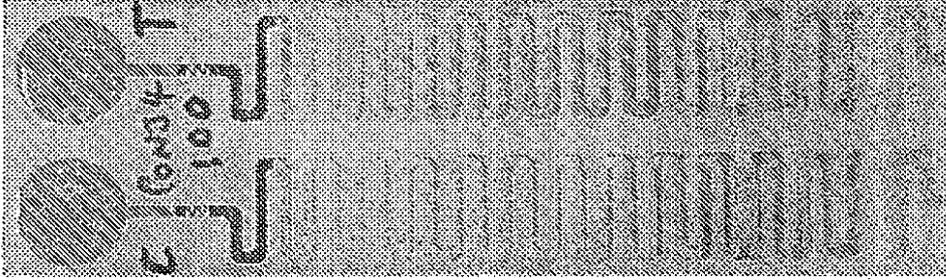


Fig 5

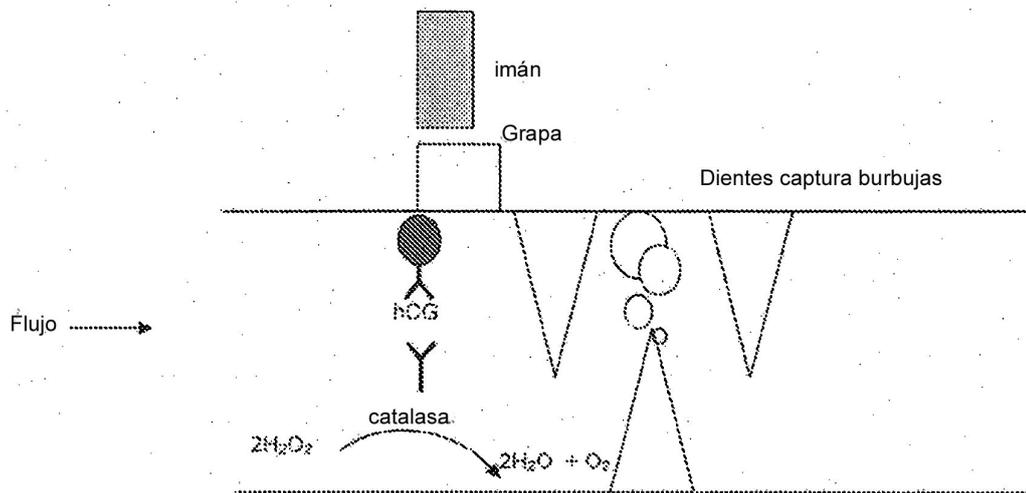


Fig 6

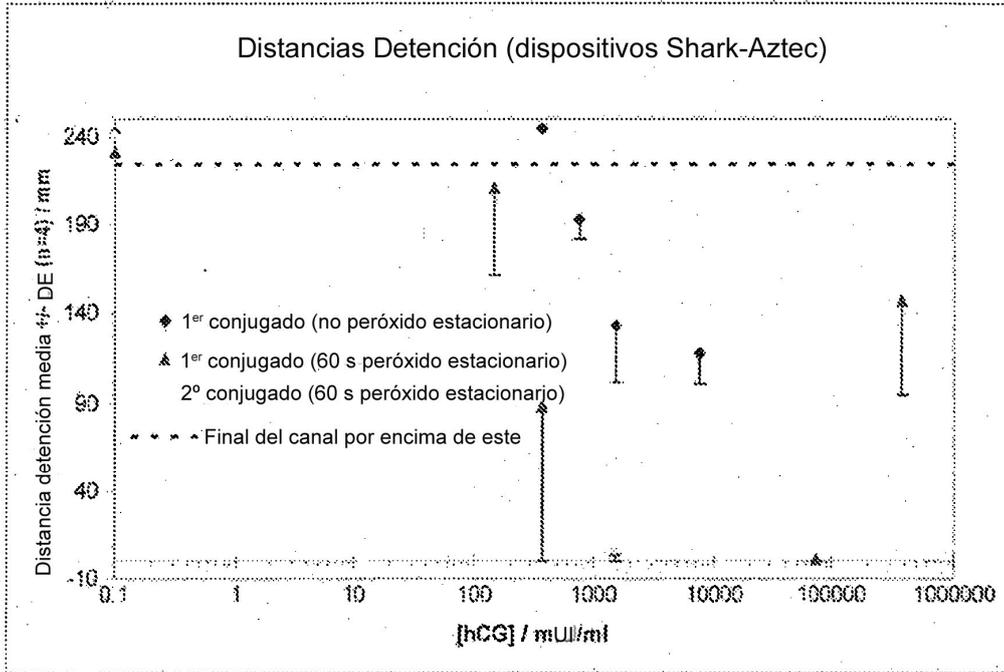
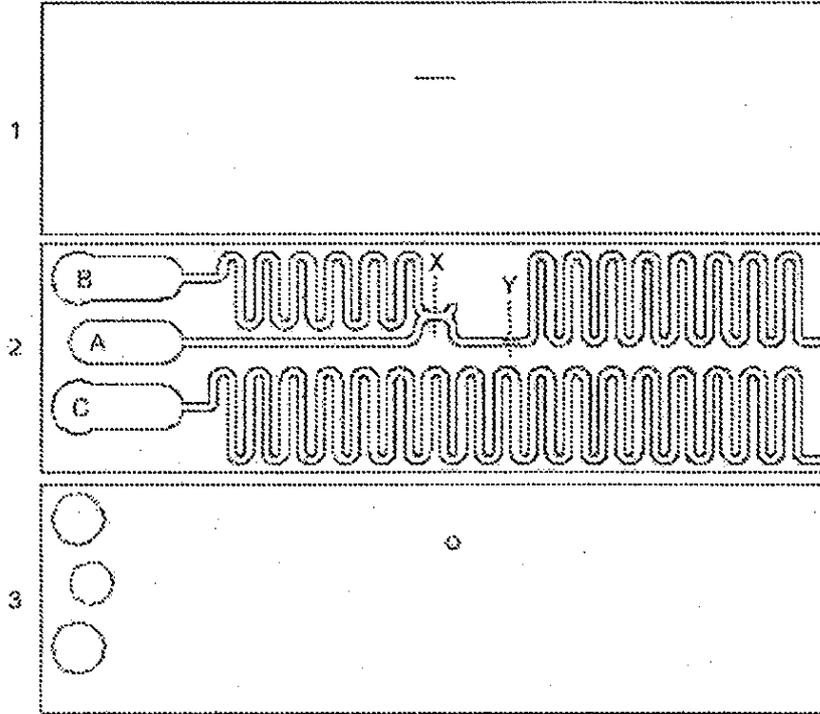


Fig 7



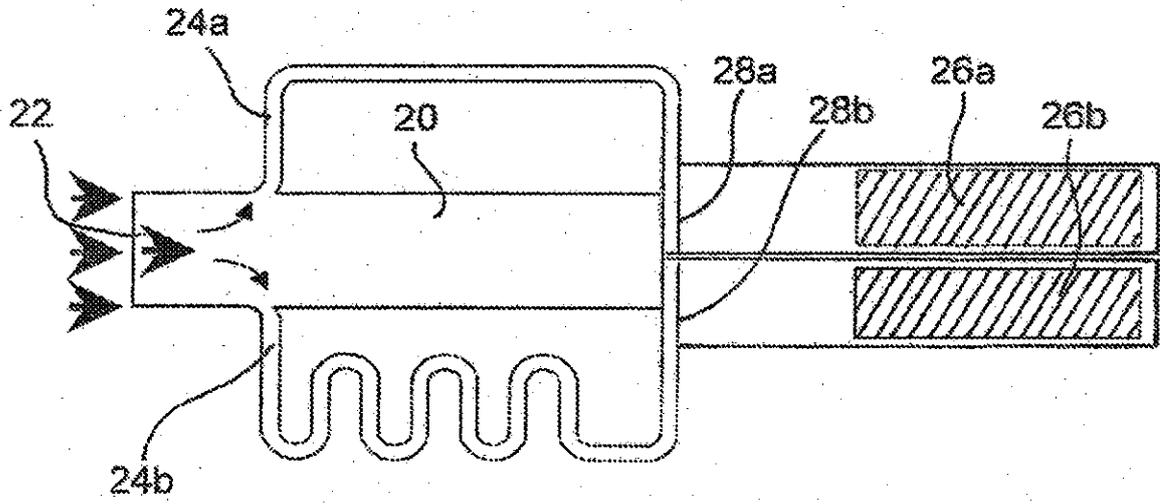


Fig. 8

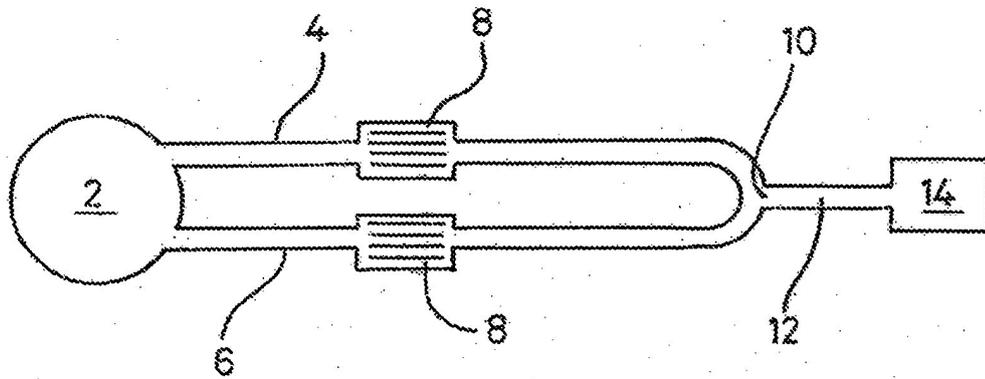


Fig. 9

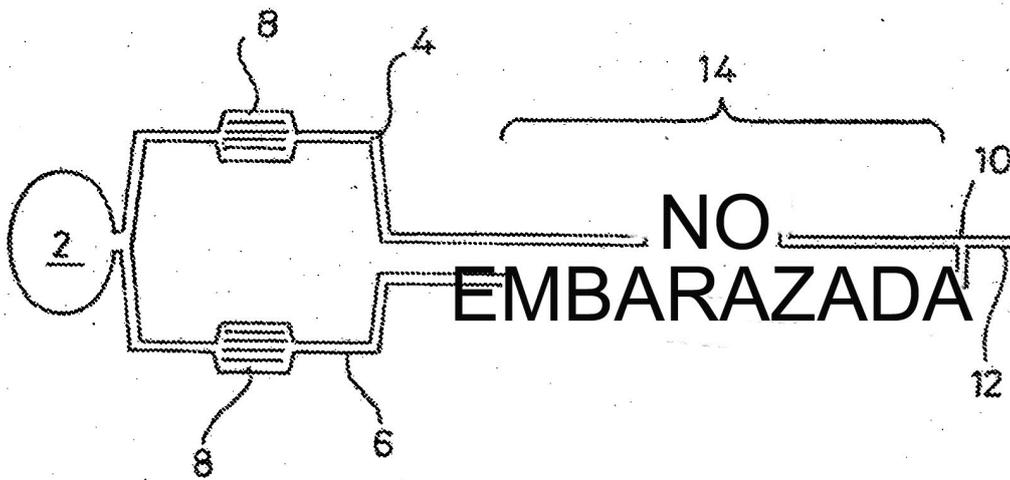


Fig. 10

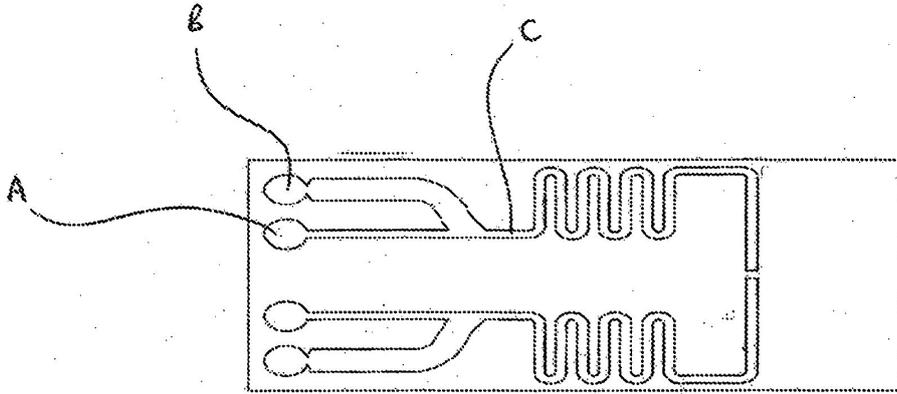


Fig. 11

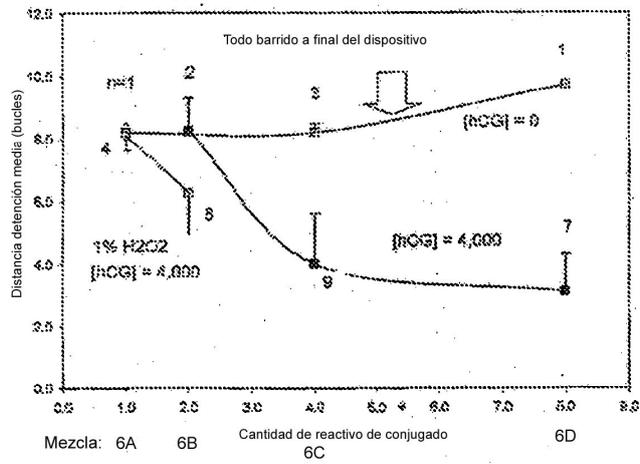


Figura 12: Cese de flujo en un canal capilar como una función de [hCG], catalasa 3299 y [H₂O₂]

Figura 13

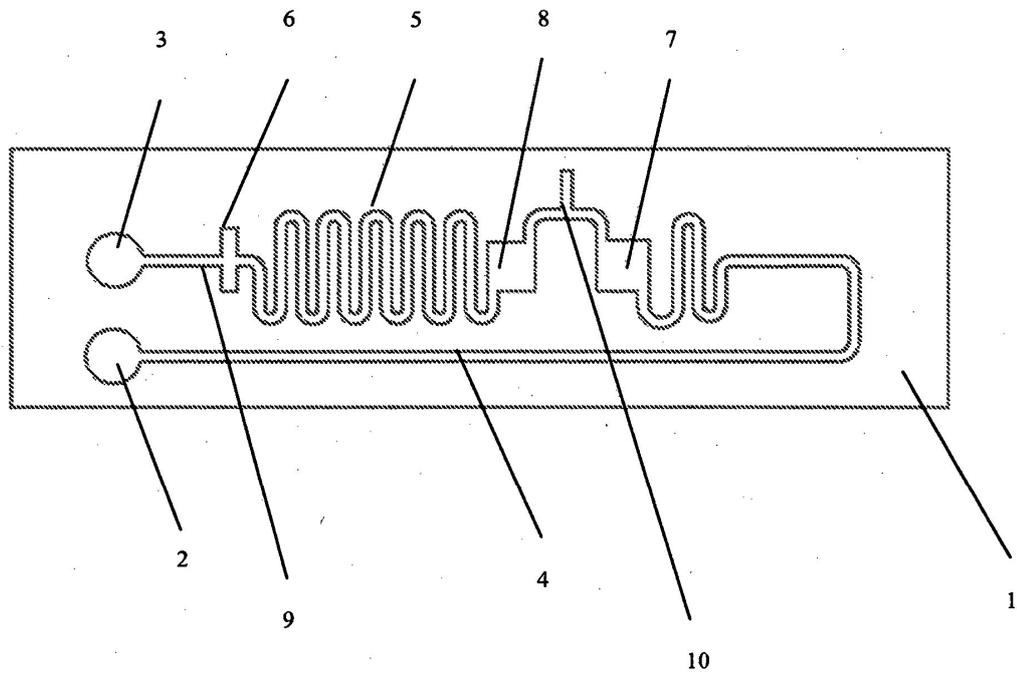


Figura 14

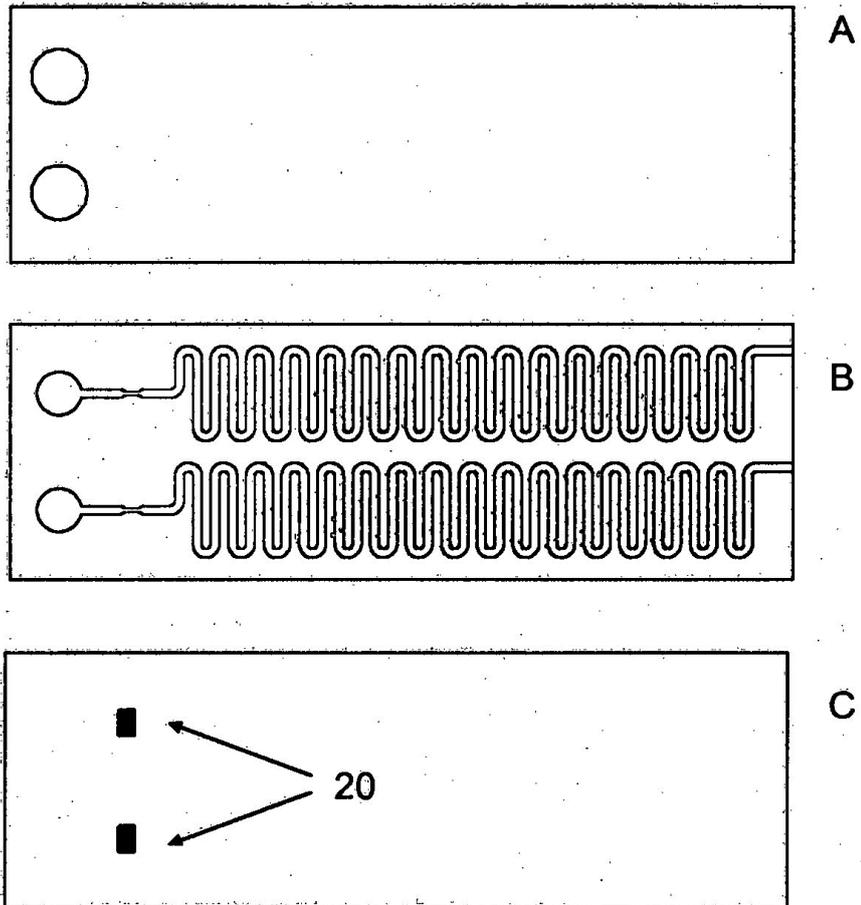


Figura 15

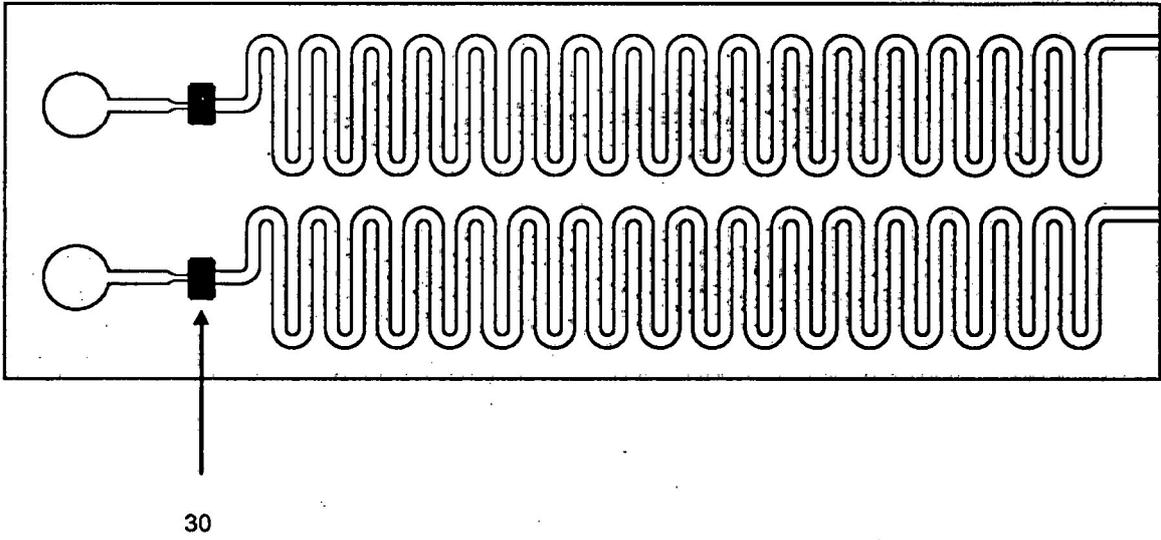


Figura 16

