

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 544**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2007** **E 07734035 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015** **EP 1996945**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo de prueba inmunocromatográfica magnética**

30 Prioridad:

21.03.2006 US 783856 P

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

12.05.2015

73 Titular/es:

**MAGNISENSE SE (100.0%)
140, rue du Faubourg Saint-Honoré
75008 Paris , FR**

72 Inventor/es:

**NIKITIN, PETR IVANOVICH;
LEGASTELOIS, STÉPHANE y
BILLIOTTE, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 535 544 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

Procedimiento y dispositivo de prueba inmunocromatográfica magnética

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección y cuantificación de un analito en una muestra. La invención también se refiere a un dispositivo de prueba de flujo lateral.

[0002] El documento WO2004/011942 describe una tira de prueba de ensayo en un casete en forma de C que permite que un detector acceda a la tira de prueba desde el lateral, en lugar de desde el eje longitudinal de la tira de
10 prueba.

[0003] El documento EP1262766 describe la detección y cuantificación de un analito en una muestra en la que se hace uso de partículas magnéticas como medio de detección. Este documento desvela particularmente el uso de microcolumnas rellenas de un material poroso que definen una zona de lectura en la que está inmovilizado
15 un ligando. Este ligando se escoge para retener específicamente el analito que ha de ser detectado. En primer lugar, la muestra se mezcla con partículas magnéticas unidas a un reactivo que puede reaccionar con el analito, conduciendo a la formación de un complejo que comprende el analito, el reactivo y la partícula magnética. Después, esta mezcla se coloca en la microcolumna y se permite que se difunda en la misma, y el complejo es retenido por los
20 ligandos inmovilizados. La emisión de un campo magnético apropiado permite que se determine la concentración de partículas magnéticas y, finalmente, la concentración del analito en la muestra. Las microcolumnas pueden vaciarse con una estructura capilar o porosa similar a una columna de cromatografía, por ejemplo, microgránulos. El documento también prevé el uso de una tira de material poroso.

[0004] El documento US-A-6518747 también se refiere al uso de eventos magnéticos para detectar una
25 reacción sobre una placa de soporte plana. Este documento enseña la medición de la acumulación de partículas magnéticas en una zona de lectura determinada en la superficie de la placa de soporte. La detección usa sensores Hall y necesita una colocación muy precisa y cercana de la zona de lectura sobre la placa con respecto al campo magnético y, de este modo, la precisión de la lectura se obtiene debido al uso de un espacio muy delgado dentro del cual ha de insertarse la placa de soporte. De este modo, la precisión de la lectura está estrechamente relacionada
30 con una colocación muy precisa de la placa con respecto al lector.

[0005] Además, las tiras o placas desnudas de acuerdo con los documentos EP-A-1262766 y US-A-6518747 son difíciles de manipular antes y después de que se haya aplicado la muestra sobre las mismas, y son susceptibles
35 de contaminaciones.

[0006] Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que es posible usar tiras de material poroso protegidas por su inserción en un estuche o similar en las que la marca comprende partículas magnéticas. De manera más sorprendente, el solicitante ha descubierto que esto es factible económicamente y en la práctica. A pesar de la presencia de un estuche que rodea la tira, es posible someter apropiadamente las partículas magnéticas
40 a un campo magnético, para detectar con gran sensibilidad las partículas magnéticas en una zona de reacción o de lectura y para cuantificar con precisión el analito que se haya presente en la muestra. No era de esperar a partir de los documentos EP1262766 y US-A-6518747 que el uso de un estuche que rodea la tira fuera compatible con la colocación del lector magnético y la lectura de la zona de lectura de tal manera que sea posible una cuantificación
45 precisa. De este modo, el dispositivo y procedimiento de la invención permiten la presencia de un estuche o similar en tanto que sin ser sustancialmente sensible a algunas variaciones de posición, incluyendo variaciones angulares, de la tira con respecto al campo magnético, sin la necesidad de colocar la tira en una posición predeterminada y muy cercana o equidistante con respecto a los generadores del campo magnético.

[0007] En este documento, las palabras "comprender/que comprende" son sinónimas (significan lo mismo
50 que) de "incluir/que incluye", "contener/que contiene", son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos adicionales no enumerados.

Resumen de la invención

55 **[0008]** Un primer objeto de la presente invención es un procedimiento para detectar y cuantificar un analito, con preferencia un compuesto biológico o químico, en una muestra líquida, usando una tira de prueba de 10 µm a 10 mm de grosor, que comprende una zona de recepción de muestra, una zona de lectura y una entidad móvil en forma de reactivo unido a una o varias partículas como marca detectable y basado en la detección de una cantidad de partículas magnéticas que se unen a una zona de lectura de una tira de prueba como resultado de la realización del

procedimiento, estando dicha cantidad vinculada por una función al contenido de analito de la muestra, en el que las partículas magnéticas presentan una característica de magnetización no lineal, tira de prueba la cual está fabricada de material poroso que permite que la muestra líquida y el analito fluyan desde la zona de recepción de muestra en la dirección de, y a través de la zona de lectura y está dispuesta dentro de un estuche o cartucho que está rodeando la tira de prueba y que está provisto de una ventanilla para muestra orientada a la zona de recepción de muestra que permite poner la muestra líquida en contacto con la tira para formar un dispositivo de ensayo, en el que el estuche está fabricado enteramente de un material opaco (no transparente) que es permeable a un campo magnético, en el que para la lectura de la reacción, el dispositivo de ensayo se coloca en una celda de medida de un dispositivo de lectura magnética el cual detecta la cantidad de partículas magnéticas en la zona de lectura sometiendo a al menos un campo magnético de excitación que tiene aproximadamente el 90 % de su potencia dentro de una banda de frecuencia o una pluralidad de bandas de frecuencia, y el dispositivo de lectura mide el campo de respuesta magnética inducida fuera de dicha banda de frecuencia o dicha pluralidad de bandas de frecuencia.

[0009] También se describe un procedimiento para detectar y cuantificar un analito, con preferencia un compuesto biológico o químico, en una muestra líquida, basándose en la detección de un evento de unión específico entre el analito vinculado a las partículas magnéticas (típicamente a un conjugado) o un conjugado y un ligando inmovilizado en una zona de lectura de una tira de prueba, en el que las partículas magnéticas presentan una característica de magnetización no lineal, tira de prueba la cual está fabricada de material poroso y está dispuesta dentro de un estuche o similar para formar un dispositivo de ensayo, en el que en su parte que rodea la zona de lectura, el estuche está fabricado de un material que es permeable a un campo magnético, en el que después de la finalización de la reacción entre ligando y analito, el dispositivo de ensayo se coloca en una celda de medida de un dispositivo de lectura magnética el cual detecta la cantidad de partículas magnéticas en la zona de lectura sometiendo a al menos un campo magnético de excitación que tiene aproximadamente el 90 % de su densidad espectral de potencia dentro de una banda de frecuencia o una pluralidad de bandas de frecuencia, y el dispositivo de lectura mide el campo de respuesta magnética inducida fuera de dicha banda de frecuencia o dicha pluralidad de bandas de frecuencia.

[0010] Otro objeto de la presente invención es un dispositivo de ensayo para detectar y cuantificar un analito en una muestra líquida, el cual puede usarse en el procedimiento de acuerdo con la invención. Este dispositivo comprende una tira de prueba que tiene una zona de recepción de muestra y una zona de lectura y una entidad móvil en forma de un reactivo unido a una o varias partículas magnéticas como marca detectable, en el que las partículas magnéticas presentan una característica de magnetización no lineal. En una realización, está presente un almohadilla de conjugado en contacto de flujo con la tira. La tira de prueba está fabricada de material poroso que permite que la muestra líquida y el analito fluyan o se difundan desde la zona de recepción de muestra en la dirección de, y a través de la zona de lectura. La tira de prueba está dispuesta dentro de un estuche o cartucho que está rodeando la tira de prueba y que está provisto de una ventanilla para muestra orientada a la zona de recepción de muestra que permite poner la muestra líquida en contacto con la tira. El estuche está fabricado de un material que es permeable a un campo magnético. El estuche está fabricado enteramente de un material opaco (no transparente). La tira de prueba tiene un grosor comprendido entre 10 μm y 10 mm.

Descripción detallada de la invención

[0011] Con preferencia, dicha función que vincula la cantidad de partículas magnéticas al contenido de analito de la muestra, es una función estrictamente monótona creciente o decreciente en la zona de validez de la dosificación. La zona de validez de dosificación se define como el intervalo de concentraciones del analito que pueden medirse con precisión y exactitud aceptables.

[0012] Un material denominado ligando es inmovilizado en la zona de lectura. Este ligando es responsable de la unión de las partículas magnéticas a la zona de lectura. Esta unión depende de la cantidad de analito en la muestra. Tal como se explicará con más detalles en la siguiente descripción, las partículas magnéticas están presentes en un complejo con un reactivo para formar el denominado conjugado.

[0013] La técnica de diagnosis basada en tiras o de flujo lateral comprende diferentes principios de ensayo denominados ensayos de sándwich, bloqueo, similar al bloqueo o inhibición y competición. La presente invención puede aplicarse a cada uno de ellos.

[0014] Se hace uso de una entidad móvil que está marcada, es decir, está unida a una o varias partículas magnéticas, directamente o indirectamente a través de un ligante. El propio analito puede ser marcado cuando se une al ligando inmovilizado, en el que el marcado puede producirse después de poner la muestra en contacto con la

tira o puede producirse después de este contacto y durante el flujo de la muestra por la tira. Generalmente, la entidad que es marcada es un reactivo unido a una o más partículas magnéticas, directamente o indirectamente a través de un ligante. Este reactivo puede unirse al analito o competir con él para unirse al ligando inmovilizado. Este reactivo marcado se mencionará llamará conjugado en la siguiente descripción.

5

[0015] En algunas realizaciones, la tira de prueba tiene una de las características siguientes:

- una zona de recepción de muestra

10 - una zona de lectura en la que dicho ligando es inmovilizado

- la tira de prueba está fabricada de un material poroso que permite que la muestra líquida y el analito fluyan desde la zona de recepción de muestra en la dirección de, y a través de la zona de lectura

15 - la tira de prueba está dispuesta dentro de un estuche o cartucho provisto de una ventanilla de introducción de muestra orientada a la zona de recepción de muestra y que permite poner la muestra líquida en contacto con la tira

- el estuche está fabricado de un material que es permeable a un campo magnético - el estuche esté fabricado enteramente de material opaco (no transparente).

20

[0016] La tira de prueba puede tener además una, varias o todas las características siguientes:

- una zona de control

25 - un reactivo de control con una marca que no es una marca magnética, permitiendo dicho reactivo de control comprobar si la difusión de la muestra es correcta

- la marca para el control es una marca visual.

30 **[0017]** En algunas realizaciones, el procedimiento tiene una, varias o, con preferencia, todas las características siguientes:

- la muestra primero se pone en contacto con un conjugado que se une específicamente al analito cuando éste está presente en la muestra,

35

- dicho conjugado está presente sobre y/o dentro de la tira, con preferencia en forma seca,

- se permite que el complejo analito-conjugado así obtenido se difunda en la dirección de, y a través de la zona de lectura donde es inmovilizado debido a la unión al ligando, conduciendo a un complejo ligando-analito-conjugado inmovilizado.

40

[0018] En otras realizaciones, el procedimiento tiene una, varias o, con preferencia, todas las características siguientes:

45 - se usan la muestra y un conjugado capaces de unirse al analito así como al ligando inmovilizado,

- dicho conjugado está presente sobre y/o dentro de la tira, con preferencia en forma seca,

- se permite que el analito de la muestra y el conjugado se unan entre sí

50

- el ligando inmovilizado es un homólogo (el mismo analito o un análogo del mismo) del analito

- se permite que la muestra y el conjugado se difundan en la dirección de, y a través de la zona de lectura donde sólo se permite que el conjugado no unido al analito de muestra se una al ligando inmovilizado.

55

[0019] Puede usarse un líquido de migración para facilitar la migración de la muestra líquida.

[0020] En una realización preferente de la invención, el dispositivo de ensayo se coloca con respecto a un dispositivo de lectura magnética con el fin de someter la zona de lectura a:

- una etapa de excitación de las partículas magnéticas situadas en la zona de lectura con un campo magnético de excitación que tiene componentes a las frecuencias f_1 y f_2 en su densidad espectral de potencia, y

5 - una etapa de medición de la amplitud del campo magnético inducido por las partículas magnéticas en respuesta a la excitación a una componente de frecuencia específica f_i , estando relacionada la frecuencia f_i con las componentes de frecuencia f_1 y f_2 mediante la siguiente relación:

$$f_i = n \cdot f_1 \pm m \cdot f_2, \text{ donde } \underline{n} \text{ y } \underline{m} \text{ son números enteros } \geq 0, \text{ siendo al menos uno de } \underline{n} \text{ y } \underline{m} \text{ diferentes de } 0$$

10

siendo la amplitud de la componente de frecuencia f_i directamente proporcional a la cantidad de partículas magnéticas retenidas en la zona de lectura.

[0021] En una primera realización, \underline{n} es 1 y \underline{m} es ± 2 .

15

[0022] En una segunda realización, \underline{n} o \underline{m} es cero.

[0023] De acuerdo con una característica, las frecuencias f_1 y f_2 pueden tener un valor comprendido entre aproximadamente 10 Hz y aproximadamente 10 MHz, en particular de aproximadamente 10 Hz y aproximadamente 20 1 MHz, por ejemplo de aproximadamente 10 Hz y aproximadamente 10 kHz. Por ejemplo, una de las frecuencias puede ser 1 kHz y la otra 100 kHz.

[0024] De acuerdo con una característica, las partículas magnéticas presentan una característica de magnetización no lineal.

25

[0025] Las partículas magnéticas son típicamente de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 50 μm de tamaño, con preferencia de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 10 μm , con más preferencia de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 1 μm . Las partículas pueden tener una forma esférica o semiesférica, o cualquier otra forma. Las partículas pueden estar constituidas por el propio material magnético o de una mezcla de este material con una matriz sólida o semisólida. En el segundo caso, el material magnético está disperso en la 30 matriz.

[0026] En una realización preferente de la invención, las partículas son superparamagnéticas. En una característica, estas partículas están fabricadas de elementos ferromagnéticos en una matriz y la anchura máxima 35 de los elementos ferromagnéticos es suficientemente pequeña con el fin de que cada elemento tomado individualmente tenga un ciclo magnético $B(H)$ que tenga las mismas propiedades que el representado en la figura 6. Típicamente, la anchura máxima del elemento ferromagnético se escoge para que esté por debajo de aproximadamente 100 nm y, generalmente, por debajo de aproximadamente 20 nm. Esta anchura máxima del elemento por debajo de la cual el elemento se vuelve superparamagnético depende del material ferromagnético 40 usado. El superparamagnetismo así como los elementos superparamagnéticos se presentan en el documento de E. du Trémolet de Lacheisserie y col. "Magnetisme" tomo 1, Presses Universitaire de Grenoble, 1999.

[0027] Los óxidos de hierro son los elementos superparamagnéticos preferentes. Para ser más completo, puede especificarse que el elemento pueda escogerse entre los óxidos de hierro y óxidos mixtos de hierro y otro metal, 45 como un metal escogido entre el Mn, Ni, Zn, Bi, Cu, Co, Fe_3O_4 y Fe_2O_3 son las realizaciones preferentes de la invención. Otros ejemplos incluyen: perovskitas con propiedades superparamagnéticas, especialmente perovskitas a base de Fe; óxidos de níquel superparamagnéticos, óxidos de cobalto u óxidos mixtos de estos metales; así como aleaciones metálicas superparamagnéticas, por ejemplo del tipo FeNi o CoNi , especialmente $\text{Fe}_{20}\text{Ni}_{80}$.

[0028] En otra realización, las partículas son antiferromagnéticas. Un material antiferromagnético es uno en el que 50 los espines de los electrones magnéticos se alinean en un patrón regular con los espines vecinos apuntando en direcciones antiparalelas. Tales materiales incluyen metales tales como el cromo, aleaciones tales como el FeMn , óxidos tales como el NiO . También puede hacerse referencia al documento de E. du Trémolet de Lacheisserie y col. citado anteriormente.

55

[0029] En una realización, las partículas son las partículas de sílice comercializadas por Merck Chimie bajo el nombre comercial MagPrep® Silica Particles, las cuales contienen óxido de hierro.

[0030] La matriz sólida o semisólida se escoge para que no interfiera con las propiedades magnéticas del

elemento. En una característica, la matriz es diamagnética.

[0031] La matriz semisólida incluye una matriz que es deformable elásticamente de manera reversible, tal como un elastómero.

5

[0032] Los materiales para la matriz incluyen: polímeros naturales, sintéticos y artificiales, elastómeros y geles, sílice; por ejemplo, material plástico material celulósico.

[0033] La distribución de los elemento superparamagnéticos en la matriz es tal que las distancias entre los elementos dentro de la matriz son suficientes para que las partículas así formadas tengan las mismas, o sustancialmente las mismas, propiedades superparamagnéticas que el elemento.

10

[0034] Para la emisión del campo magnético de excitación y el procesamiento de señal, puede hacerse referencia a los documentos EP1262766 o WO-A-2004/077044, a los cuales puede hacer referencia el experto en la materia.

15

[0035] Para llevar a cabo el procedimiento de la invención, puede hacerse uso de un dispositivo de lectura magnética que comprende una celda de medida. La celda de medida tiene medios que permiten la colocación de la zona de lectura de la tira de manera que esta zona esté cubierta por el campo de excitación magnética. En una realización preferente de la invención, el estuche o similar y la celda tienen una forma y tamaño complementarios para permitir la colocación. De acuerdo con una característica del procedimiento, la zona de lectura en la tira se coloca para que esté cubierta por entero o sustancialmente por entero por el campo magnético. Con preferencia, sólo las partículas magnéticas unidas a la zona de lectura son sometidas al campo de excitación magnética y al procedimiento de lectura.

20

[0036] El lector magnético puede comprender una o varias de las características siguientes:

25

- una bobina montada en las inmediaciones de la celda de medida y capaz de generar en este espacio una excitación magnética (A/m) – (bobina de excitación)

30 - la bobina es capaz de generar una excitación magnética constituida por la superposición de dos señales monocromáticas de frecuencias f_1 y f_2

- las frecuencias pueden ser entre aproximadamente 10 Hz y aproximadamente 10 MHz (véase más arriba)

35 - una bobina de medición

- la misma bobina genera la excitación magnética y efectúa la medida (bobina de excitación/medición)

40 - la bobina o bobinas forman un denominado cabezal de lectura

- la celda de medida está diseñada de manera que el campo de excitación magnética está en un plano transversal a la longitud de la tira de prueba L

45 - la bobina de excitación/medición es cilíndrica y delimita un espacio de lectura cilíndrico en el cual puede ponerse en su sitio el dispositivo de ensayo para la medición

- el espacio de lectura y la bobina pueden estar separados por una pieza o material interno que forma dicho espacio,

50 - el procedimiento de excitación/medición es independiente de la orientación angular de la tira dentro de la celda de medida, en particular dentro del espacio de lectura cilíndrico (orientación angular significa que la tira puede colocarse en cualquier posición angular alrededor de su eje longitudinal)

- el diámetro del espacio cilíndrico delimitado por la bobina es hasta aproximadamente 10 mm, con preferencia comprendido entre aproximadamente 4 mm y aproximadamente 10 mm

55

- están provistos medios para colocar el dispositivo de prueba sustancialmente en el centro de la celda de medida o el espacio cilíndrico

- un filtro y un demodulador de amplitud, que permiten la medida de la intensidad de una o varias líneas espectrales

- amplificador sincrónico (digital y/o analógico) que permite determinar con precisión el volumen del material magnético no lineal en el volumen de lectura.

5 **[0037]** De acuerdo con características ventajosas, la celda de medida está formada por el espacio, con preferencia el espacio cilíndrico delimitado por la bobina de excitación y medición o la pieza o material interno, la tira se coloca dentro de la celda de medida para efectuar la medición de la cantidad de partículas magnéticas en la zona de lectura. La tira se coloca para que se extienda en paralelo con el eje longitudinal del espacio, con la zona de lectura sustancial o totalmente contenida dentro del espacio. Típicamente, la distancia entre la superficie de la tira y la cara
10 interna de la bobina o la pieza o material interno a lo largo de una línea perpendicular al eje longitudinal de la zona de lectura puede ser entre aproximadamente 0 y aproximadamente 5 mm, con preferencia entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 mm, por ejemplo entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4 mm.

[0038] El material poroso de la tira se escoge para que permita que las diferentes sustancias implicadas en la
15 prueba se difundan en la superficie y, posiblemente, profundamente en el material desde la zona de recepción de muestra a lo largo de la tira en la dirección del extremo de la tira opuesto a dicha zona de recepción. Pueden usarse materiales continuos habituales tales como polietileno, poliestireno, poliamida, por ejemplo Nylon®, celulosa o derivados de la misma, especialmente nitrocelulosa. Como siempre, este material puede colocarse en un soporte, tal como un soporte de plástico.

20 **[0039]** El grosor de la tira puede variar dentro de un gran intervalo. El grosor puede usarse para proporcionar una zona de lectura que tenga un cierto grosor o volumen, supongamos para formar una zona de lectura con un volumen tridimensional determinado, correlacionado con el grado de sensibilidad que se desee, y correlacionado en particular con el umbral de detección y cuantificación. Puede indicarse así que un aumento del volumen de la zona de lectura
25 facilita la detección y cuantificación de los analitos presentes en pequeña cantidad en la muestra. Una ventaja adicional de la presente invención es que puede ser innecesario concentrar el analito antes del análisis y, en cambio, es posible una detección directa y una cuantificación precisa.

30 **[0040]** También se describe que la muestra se mezcla con el conjugado y luego la mezcla se pone en contacto con la tira.

[0041] El conjugado está presente sobre la tira o dentro de la tira, opcionalmente sobre o en una almohadilla de conjugado en contacto de flujo con la tira, donde ésta ha sido impregnada y secada. La muestra se pone sobre la tira o la almohadilla e impulsa la migración del conjugado.

35 **[0042]** La zona de reacción contiene un ligando inmovilizado. Este ligando puede unirse específicamente al analito de muestra. Como alternativa, el ligando inmovilizado puede unirse al conjugado pero no puede unirse al analito o el complejo analito-conjugado. Como otra alternativa, el ligando inmovilizado puede unirse al analito de muestra y un conjugado de competición, por ejemplo un conjugado que es capaz de competir con el analito para unirse al ligando.
40

[0043] El conjugado puede unirse al analito de muestra y/o al ligando inmovilizado. Puede ser de unión específica en el sentido de que el conjugado está diseñado específicamente para unirse sólo a este objetivo (por ejemplo un anticuerpo marcado específico de un antígeno u otro anticuerpo, o un antígeno marcado específico de un anticuerpo). La unión a dicha muestra objetivo también puede ser de una naturaleza no específica en el sentido de
45 que el conjugado es capaz de unirse a diferentes materiales del mismo tipo (por ejemplo una inmunoglobulina marcada que esté diseñada para unirse a anticuerpos humanos).

[0044] En una realización, el conjugado es homólogo a dicho analito de muestra, es decir, puede ser igual o un análogo del mismo, y compite con el analito de muestra para la unión al ligando inmovilizado.
50

[0045] En otra realización, el ligando inmovilizado es homólogo a dicho analito de muestra, es decir, puede ser igual o un análogo del mismo, y el conjugado puede unirse al analito de muestra y también al ligando inmovilizado cuando el conjugado no está unido al analito.

55 **[0046]** En una realización, se lleva a cabo un ensayo de tipo sándwich.

[0047] En otra realización, se lleva a cabo un ensayo de bloqueo, similar al bloqueo o de tipo competición.

[0048] De acuerdo con una característica, la muestra se diluye con un tampón o disolvente aceptable antes de

entrar en contacto con la tira.

[0049] Otras características acerca del material de la tira, su estructura, sus dimensiones, especialmente su grosor y la relación de grosor/longitud se desvelarán en la siguiente descripción de un dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención.

[0050] El dispositivo de ensayo comprende una tira de prueba que tiene una zona de recepción de muestra y una zona de lectura. En una realización, está presente una almohadilla de conjugado en contacto de flujo con la tira. La tira de prueba es de un material tal que permite que la muestra líquida y el analito fluyan o se difundan desde la zona de recepción de muestra en la dirección de, y a través de la zona de lectura. La tira de prueba está dispuesta dentro de un estuche o similar provisto de una ventanilla para muestra orientada a la zona de recepción de muestra que permite poner la muestra líquida en contacto con la tira. El estuche está fabricado de un material que es permeable a un campo magnético. La tira de prueba puede tener un grosor (t) comprendido entre aproximadamente $10\ \mu\text{m}$ y aproximadamente $10\ \text{mm}$. En una realización, el grosor de la tira es entre aproximadamente $0,1\ \text{mm}$ y aproximadamente $0,5\ \text{mm}$, típicamente entre aproximadamente $0,1$ y aproximadamente $0,3\ \text{mm}$. En otra realización de una tira gruesa, el grosor es superior a $0,5\ \text{mm}$ e inferior o igual a aproximadamente $2\ \text{mm}$.

[0051] Típicamente, la anchura de la tira (W) puede ser entre aproximadamente 1 y aproximadamente $20\ \text{mm}$, con preferencia entre aproximadamente 2 y aproximadamente $10\ \text{mm}$, típicamente entre aproximadamente 3 y aproximadamente $7\ \text{mm}$.

[0052] En una característica, la anchura de la zona de lectura (Z_R) es entre aproximadamente $0,5$ y aproximadamente $5\ \text{mm}$, con preferencia entre aproximadamente 2 y aproximadamente $5\ \text{mm}$. Esta anchura coincide idealmente con el tamaño del cabezal de lectura o de su área de lectura.

[0053] La parte del estuche está fabricada de un material opaco (no transparente), es decir, no es posible ver la zona de lectura con los ojos. Tal como aquí se describe, el estuche tiene una ventanilla para la lectura visual de una zona de control.

[0054] Para obtener el grosor correcto (t), la tira puede estar fabricada de diferentes modos. Puede estar fabricada de una pluralidad de capas (pliegues) superpuestas. Puede obtenerse plegando una lámina fabricada del material de la tira. Puede ser una lámina enrollada, supongamos constituida por una lámina enrollada sobre sí misma con o sin partes superpuestas. También puede fabricarse directamente de un material continuo grueso que tenga el grosor seleccionado.

[0055] De acuerdo con una característica, un compuesto pensado para que esté presente sobre la tira es impregnado y después secado o inmovilizado en el área correspondiente antes del plegado en el caso de una lámina plegada o antes de superponer las capas en el caso de una tira fabricada de una pluralidad de capas superpuestas o antes del enrollamiento para obtener una tira enrollada. Este modo de preparar la tira facilita la distribución del compuesto en profundidad en toda la zona. Este compuesto puede ser, por ejemplo, el ligando que ha de ser inmovilizado en la zona de lectura o cualquier conjugado móvil o cualquier otro compuesto adsorbido móvil.

[0056] En una realización, la tira de prueba tiene una zona, posiblemente una zona tridimensional, que contiene un conjugado móvil que es un ligando que se une a, por ejemplo, específico para el analito y que comprende una partícula magnética. Esta zona puede ser igual o diferente de la zona de recepción de muestra.

[0057] En otra realización, se coloca una almohadilla en contacto de flujo sobre una superficie de la tira y esta almohadilla contiene o soporta sobre su superficie el conjugado móvil. Esta almohadilla de conjugado puede estar situada entre la zona de recepción de muestra y la zona de lectura o puede adoptar el papel de zona de recepción de muestra.

[0058] En otra realización, la tira de prueba o una almohadilla de recepción de muestra en contacto de flujo con la tira tiene una zona tridimensional que contiene un conjugado móvil que es el analito o un análogo del mismo.

[0059] En una realización, un extremo de la tira se extiende por fuera o cerca de un extremo abierto del estuche. Este extremo forma la zona de recepción de muestra que puede ponerse en contacto con la muestra.

[0060] En una realización preferente de la invención, la tira de prueba tiene una zona de lectura (posiblemente

tridimensional) que contiene un ligando inmovilizado el cual es específico para el analito o un análogo del mismo, teniendo dicha zona tridimensional el grosor (t) de la tira y teniendo una anchura (Z_R) tal como se mencionó anteriormente.

5 **[0061]** De acuerdo con una característica, una almohadilla absorbente se coloca en contacto con la tira por su extremo opuesto a la zona de recepción de muestra, con el fin de facilitar el flujo de la muestra.

[0062] Tal como se describe en este documento, se hace uso de un kit que comprende dicho dispositivo de ensayo y una jeringa o un dispositivo similar pensado para mezclar la muestra y el conjugado. La mezcla puede ser
10 expulsada entonces sobre la tira o dentro de la tira desde un extremo del mismo.

[0063] Ventajosamente, la tira de prueba tiene una zona de residuos para el material que no se une en la zona de lectura, estando dispuesta esta zona de residuos en el lado de la tira opuesto a la zona de recepción de muestra con la zona de lectura entre ellas. La zona de residuos puede estar constituida por la almohadilla absorbente
15 mencionada anteriormente.

[0064] En otra realización, la zona de residuos simplemente está suficientemente alejada de la zona de lectura como para no interferir con la lectura. Típicamente, la distancia entre el centro de la zona de lectura y la zona de residuos es igual o superior a 5 mm, con preferencia del orden del tamaño de un cabezal de lectura del dispositivo
20 de lectura magnética.

[0065] En aún otra realización, el dispositivo está provisto de una pantalla, por ejemplo una pantalla metálica, al nivel de la zona de residuos que aísla la zona de residuos con respecto al campo magnético y evita o limita las interferencias magnéticas debidas a las partículas magnéticas que están presentes en la zona de residuos. Esta
25 pantalla puede estar fabricada de una lámina de material en contacto directo o no en contacto directo con la tira; puede fijarse, por ejemplo, a la tira o al estuche, delante en contacto directo de la zona de residuos. También puede ser un material que haya sido rociado o similar sobre la zona de residuos de la tira o una superficie del estuche delante de la zona de residuos. El material metálico es, con preferencia, Cu o Al o cualquier metal que tenga una conductividad similar o superior al Cu o el Al.

30 **[0066]** En aún otra realización, la zona de residuos y posiblemente la parte correspondiente del estuche es extraíble.

[0067] El procedimiento y dispositivo de la invención puede usarse para detectar y cuantificar componentes biológicos en una muestra de fluido corporal, por ejemplo sangre, plasma, orina. Puede usarse para detectar y
35 cuantificar la presencia de un antígeno (por ejemplo bacterias, virus, parásitos, proteínas y fragmentos de las mismas), un anticuerpo o cualquier otro compuesto biológico tal como haptenos, proteínas, sondas genéticas, oligo- o polinucleótidos naturales o sintéticos, mono-, oligo- o polisacáridos naturales o sintéticos, lectinas, avidina, estreptavidina, biotina, factores de crecimiento, hormonas, moléculas receptoras, alérgenos.

40 **[0068]** En el caso de la reacción anticuerpo-antígeno, el conjugado puede ser o bien un antígeno o bien un anticuerpo, por ejemplo un antígeno que reconoce específicamente un anticuerpo que ha de ser detectado en la muestra o un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno que ha de ser detectado en la muestra.

45 **[0069]** El ligando inmovilizado puede ser un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno que ha de ser detectado en la muestra y que está presente en el complejo antígeno-conjugado o puede ser un antígeno que reconoce específicamente un anticuerpo que ha de ser detectado en la muestra y que está presente en el complejo anticuerpo-conjugado.

50 **[0070]** El procedimiento y dispositivo de la invención permite así que se lleve a cabo cualquier tipo de ensayo tipo sándwich o de competición. La invención permite que se establezca una relación directa entre la concentración de la muestra para el analito y la lectura magnética efectuada, dando esto acceso a la detección y cuantificación del analito.

55 **[0071]** Como es bien sabido, los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, o pueden ser fragmentos de anticuerpos, y los antígenos pueden ser naturales o preparados mediante síntesis química o ingeniería genética. Alguien experto en la materia tiene acceso a anticuerpos y antígenos que pueden usarse para detectar y cuantificar un analito dado en una muestra dada.

[0072] El procedimiento y dispositivo de la invención también puede usarse para detectar y cuantificar entidades o compuestos químicos, tales como antibióticos, drogas, contaminantes químicos, alérgenos.

[0073] A continuación se describirá la presente invención con más detalles por medio de ejemplos no limitativos y por referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- La figura 1 es una representación esquemática de una tira (1) que explica las siguientes definiciones dimensionales: longitud de la tira L, anchura de la tira W, grosor de la tira t y anchura Z_R de la zona de lectura 2.

10 - La figura 2 es una representación esquemática de la construcción y el uso de una primera realización del dispositivo de prueba.

- La figura 3 es una representación en despiece ordenado de una segunda realización del dispositivo de prueba.

15 - La figura 4 es una representación esquemática de una tercera realización del dispositivo de prueba.

- La figura 5 es un gráfico que representa los resultados del análisis de antígenos de hepatitis B de los subtipos Ay y Ad usando dos tiras, expresándose los resultados en intensidades magnéticas medidas en tres puntos a lo largo de la tira.

20

- La figura 6 es un gráfico que representa la característica de la inducción magnética (\vec{B}) de un material superparamagnético dependiendo del campo magnético (\vec{H}) inducido en el material.

[0074] La figura 2 representa en forma de despiece ordenado los diversos componentes de un dispositivo de ensayo de acuerdo con una primera realización, el dispositivo de ensayo una vez ensamblado y su cooperación con un dispositivo de lectura magnética. El dispositivo de ensayo (3) está constituido por un estuche dividido en fases (4) de sección semicircular y que tiene una parte (5) y una parte (6) en el que la parte (6) es de menor sección con un resalte (7); una tapa (8) que tiene una abertura (9) y que tiene una forma complementaria de la del estuche; una tira (10) y una almohadilla absorbente (11). Una zona de reacción (12) se ha representado usando líneas discontinuas. El número de referencia (13) designa un lector magnético que tiene una abertura semicircular (14) en la cual puede introducirse la parte (6) del estuche hasta el apoyo del resalte (7).

[0075] La figura 3 representa en forma de despiece ordenado un dispositivo de prueba que comprende un contenedor de tampón (15), un colector de muestra (16), un filtro (17), una tira de prueba (18) y un estuche de tira de prueba (19).

[0076] El contenedor (15) tiene una membrana perforable (20), es hueco y contiene un fluido tampón. El colector de muestra (16) puede conectarse al contenedor (15) a través de porciones complementarias enroscables. Enroscando ambas partes más allá de una posición dada, la membrana (20) es perforada por medios (no representados) presentes en el colector (16). Esto permite que el líquido tampón diluya la muestra en el colector 16.

[0077] El filtro (17) comprende una abertura (21) que sirve para asegurar la tira de prueba y el material de filtro (no mostrado) que filtra las impurezas de la muestra, absorbe y contiene la solución tampón y la muestra, y proporciona un flujo controlado de fluido a la tira. El filtro (17) y el colector (16) tienen medios complementarios (22, 23) para ponerlos en contacto y permiten que el fluid fluya a través del material de filtro, después hacia la tira (18).

[0078] El estuche (19) es un contenedor generalmente cilíndrico fabricado de un material no transparente cerrado por su extremo inferior (24) y abierto por su extremo opuesto (25) para permitir cargar con todos los componentes descritos anteriormente del dispositivo de prueba. La colocación precisa de estos componentes dentro del estuche (19) se asegura mediante formas internas complementarias. Este dispositivo requiere un dispositivo de lectura que tenga una abertura circular complementaria.

[0079] La figura 4 muestra un estuche (26) fabricado de un material no transparente y provisto de un capilar (27) que tiene un extremo abierto del capilar (28) y una parte superior abierta (29) con una cámara (30) dispuesta entre ellos. La cámara (30) aloja una tira de prueba que se mantiene en su sitio por medios internos (no representados). El capilar (27) se pone en contacto con un líquido de muestra tocando el líquido con el extremo abierto del capilar (28). El líquido del capilar se diluye entonces y es evacuado al interior de la cámara (30) con un tampón contenido en un

contenedor de tampón (32) que está sellado con una hoja (33) que es perforable con el capilar (27). Después de la difusión de la muestra se extrae el contenedor de tampón para permitir que se coloque el estuche dentro del lector magnético. Antes del uso, el contenedor (32) se dispone sobre el extremo abierto superior del estuche, en la parte superior abierta (29).

5

Ejemplo: detección de antígeno de la hepatitis B (por razones de comparación)

I. Materiales y equipos

10 **[0080]**

Tubo de 0,5 ml

Microplaca de 96 pocillos

15

Dispositivos de prueba: dos tiras fabricadas de nitrocelulosa

Material magnético: partículas magnéticas Estapor® (Merck KGaA)

20 **[0081]** Lector magnético: se construye de acuerdo con el documento EP1262766. Comprende una celda de medida dentro de la cual puede colocarse para la operación de lectura un dispositivo de ensayo que incluye una tira. Una bobina cilíndrica delimita el espacio de lectura y es capaz de generar en este espacio una excitación magnética (A/m) constituida por la superposición de dos frecuencias monocromáticas f_1 y f_2 . Esta bobina también sirve como bobina de medición. Existen medios para colocar la zona de lectura de la tira en el espacio cilíndrico delimitado por la bobina. La distancia entre la bobina y la zona de lectura en la tira puede alcanzar 5 mm. La presencia del material magnético en la zona de lectura provoca una deformación de la densidad espectral de potencia de la inducción magnética. Por lo tanto, los espectros de inducción magnética contienen líneas de espectro a las frecuencias combinadas de las frecuencias de excitación ($f_{línea} = n_1 f_1 \pm n_2 f_2$, donde n_1 y n_2 son números enteros positivos). La intensidad de estas líneas es proporcional al volumen de material magnético en el volumen de lectura. El lector comprende además un filtro y un demodulador de amplitud, que permiten medir la intensidad de una o varias líneas espectrales (aquí, $f_1 \pm 2f_2$). Un amplificador sincrónico (digital y/o analógico) permite determinar con precisión el volumen de material magnético no lineal en la zona de lectura.

35 **[0082]** En el ejemplo, las frecuencias f_1 y f_2 fueron respectivamente 100 kHz y 100 Hz.

35

II. Reactivos

[0083]

40 1^{er} conjugado: partículas magnéticas vinculadas a un anticuerpo monoclonal frente a HBsAg subtipo Ay

2^o conjugado: partículas magnéticas vinculadas a un anticuerpo monoclonal frente a HBsAg subtipo Ad

Tampón de migración

45

[0084]

1^{er} antígeno: HBsAg subtipo Ay

50 2^o antígeno: HBsAg subtipo Ad

III. Protocolo

a. Preparación de la suspensión de migración

55

[0085] En un tubo de 0,5 ml, se diluyó el primer conjugado al 0,2 % en tampón de migración y se realizó la mezcla mediante sonicación. Se añadieron en un pocillo 75 μ l de la suspensión de antígeno Ay. Se añadieron en el pocillo 5 μ l del conjugado diluido y se mezclaron.

[0086] El mismo procedimiento para el 2º conjugado y el antígeno Ad.

b. Migración.

5 **[0087]** Cada una de las tiras se puso en contacto con una de las suspensiones de los pocillos y se realizó la migración durante 20 minutos.

c. Lectura magnética

10 **[0088]** Después de la migración, cada uno de los dispositivos de prueba fue introducido en la celda de medición. Se analizó la señal a lo largo de la tira 2 mm antes de la línea de prueba, sobre la línea de prueba y 2 mm después de la línea de prueba. Los resultados se presentan en la figura 5.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar y cuantificar un analito en una muestra líquida, usando una tira de prueba de 10 μm a 10 mm de grosor, que comprende una zona de recepción de muestra, una zona de lectura y una entidad móvil en forma de reactivo unido a una o varias partículas como marca detectable y basado en la detección de una cantidad de partículas magnéticas que se unen a una zona de lectura de una tira de prueba como resultado de la realización del procedimiento, estando dicha cantidad vinculada por una función al contenido de analito de la muestra, en el que las partículas magnéticas presentan una característica de magnetización no lineal, tira de prueba la cual está fabricada de material poroso que permite que la muestra líquida y el analito fluyan desde la zona de recepción de muestra en la dirección de, y a través de la zona de lectura y está dispuesta dentro de un estuche o cartucho que está rodeando la tira de prueba y que está provisto de una ventanilla para muestra orientada a la zona de recepción de muestra que permite poner la muestra líquida en contacto con la tira para formar un dispositivo de ensayo, en el que el estuche está fabricado enteramente de un material opaco (no transparente) que es permeable a un campo magnético, en el que para la lectura de la reacción, el dispositivo de ensayo se coloca en una celda de medida de un dispositivo de lectura magnética el cual detecta la cantidad de partículas magnéticas en la zona de lectura sometiéndola a al menos un campo magnético de excitación que tiene aproximadamente el 90 % de su potencia dentro de una banda de frecuencia o una pluralidad de bandas de frecuencia, y el dispositivo de lectura mide el campo de respuesta magnética inducida fuera de dicha banda de frecuencia o dicha pluralidad de bandas de frecuencia.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, el cual usa un conjugado constituido por un reactivo vinculado a partículas magnéticas y está basado en la detección de un evento de unión específico entre el analito vinculado al conjugado o el conjugado y un ligando inmovilizado en una zona de lectura de una tira de prueba.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el dispositivo de ensayo se coloca en la celda de medida con el fin de someter la zona de lectura a:
- una etapa de excitación de la partículas magnéticas situadas en la zona de lectura con un campo magnético de excitación que tiene una componente de frecuencia f_1 y una componente de frecuencia f_2 , y
 - una etapa de medición de la amplitud del campo magnético inducido por las partículas magnéticas en respuesta a la excitación a una componente de frecuencia específica f_i , estando relacionada la frecuencia f_i con las componentes de frecuencia f_1 y f_2 mediante la siguiente relación:
- $$f_i = n.f_1 \pm m.f_2, \text{ donde } \underline{m} \text{ y } \underline{n} \text{ son números enteros } \geq 0, \text{ siendo al menos uno de } \underline{m} \text{ y } \underline{n} \text{ diferentes de } 0$$
- siendo la amplitud de la componente de frecuencia f_i directamente proporcional a la cantidad de partículas magnéticas retenidas en la zona de lectura.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que \underline{n} es 1 y \underline{m} es ± 2 .
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que \underline{n} o \underline{m} es cero.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas magnéticas son/comprenden un material superparamagnético.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las partículas superparamagnéticas están fabricadas de o comprenden un material superparamagnético escogido entre el grupo constituido por Fe_2O_3 , Fe_3O_4 y mezclas de los mismos.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la celda de medida comprende una bobina de excitación y/o medición que delimita un espacio de lectura cilíndrico, el dispositivo de ensayo se coloca en este espacio, el campo de excitación magnética se emite en un plano transversal a la tira de prueba de manera que la zona de lectura esté sometida por entero o sustancialmente por entero al campo magnético.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el analito es un antígeno o un anticuerpo.

10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se hace uso de un dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17.
- 5 11. Un dispositivo de ensayo para detectar y cuantificar un analito en una muestra líquida que comprende una tira de prueba que tiene una zona de recepción de muestra y una zona de lectura y una entidad móvil en forma de un reactivo unido a una o varias partículas magnéticas como marca detectable, en el que las partículas magnéticas presentan una característica de magnetización no lineal, estando la tira de prueba fabricada de material poroso que permite que la muestra líquida y el analito fluyan o se difundan desde la zona de recepción de muestra
- 10 en la dirección de, y a través de la zona de lectura, tira de prueba que está dispuesta dentro de un estuche o cartucho que está rodeando la tira de prueba y que está provisto de una ventanilla para muestra orientada a la zona de recepción de muestra que permite poner la muestra líquida en contacto con la tira, en el que el estuche está fabricado enteramente de un material opaco (no transparente) que es permeable a un campo magnético y en el que la tira de prueba tiene un grosor (t) comprendido entre 10 μm y 10 mm.
- 15 12. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el grosor de la tira (t) es entre 0,1 mm y 0,5 mm.
13. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el grosor de la tira (t) es superior a 0,5 mm
- 20 e inferior o igual a 2 mm.
14. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la tira de prueba está constituida por una pluralidad de capas (pliegues) superpuestas.
- 25 15. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la tira de prueba está constituida por una lámina enrollada.
16. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la tira de prueba tiene una zona de lectura tridimensional que contiene un ligando inmovilizado que es específico para el
- 30 analito o análogo, teniendo dicha zona tridimensional la anchura (Z_R) entre 0,5 y 5 mm.
17. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la zona de lectura tridimensional tiene una anchura (Z_R) entre 2 y 5 mm.

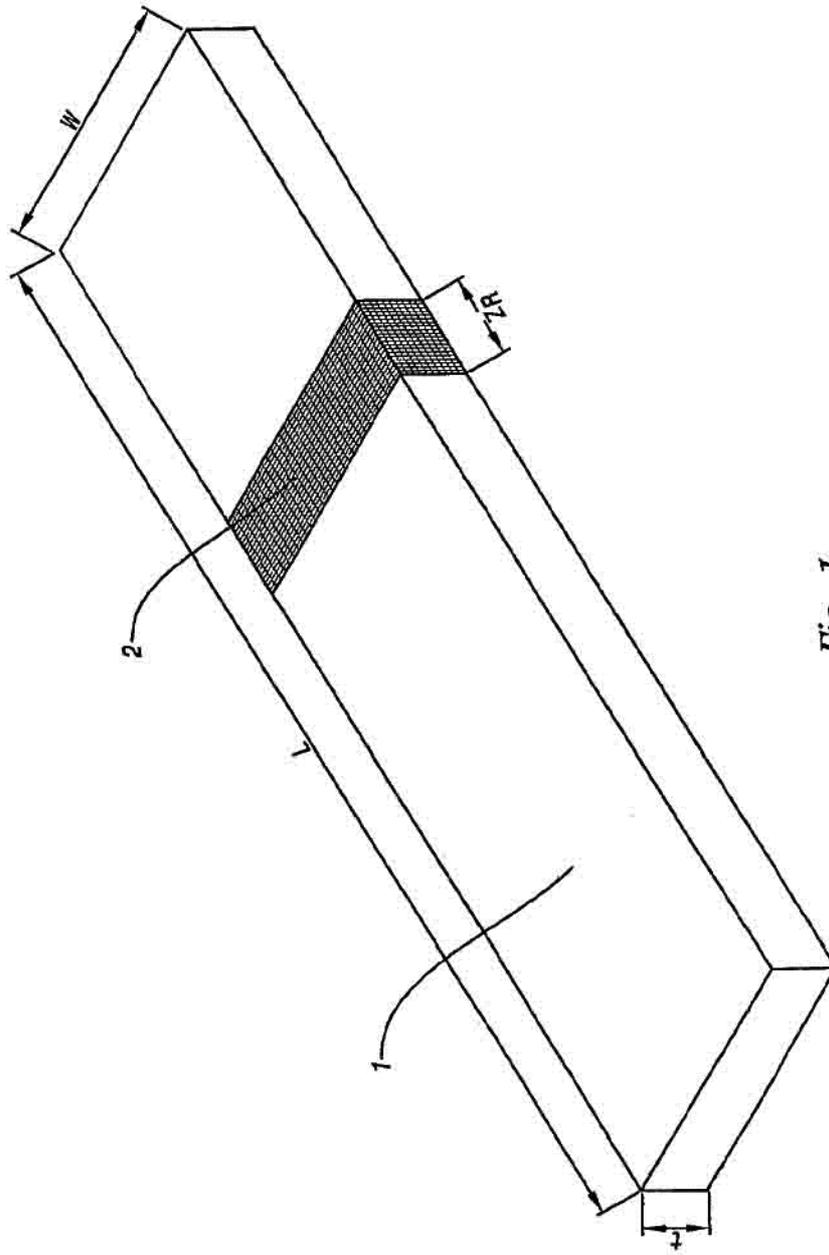


Fig. 1

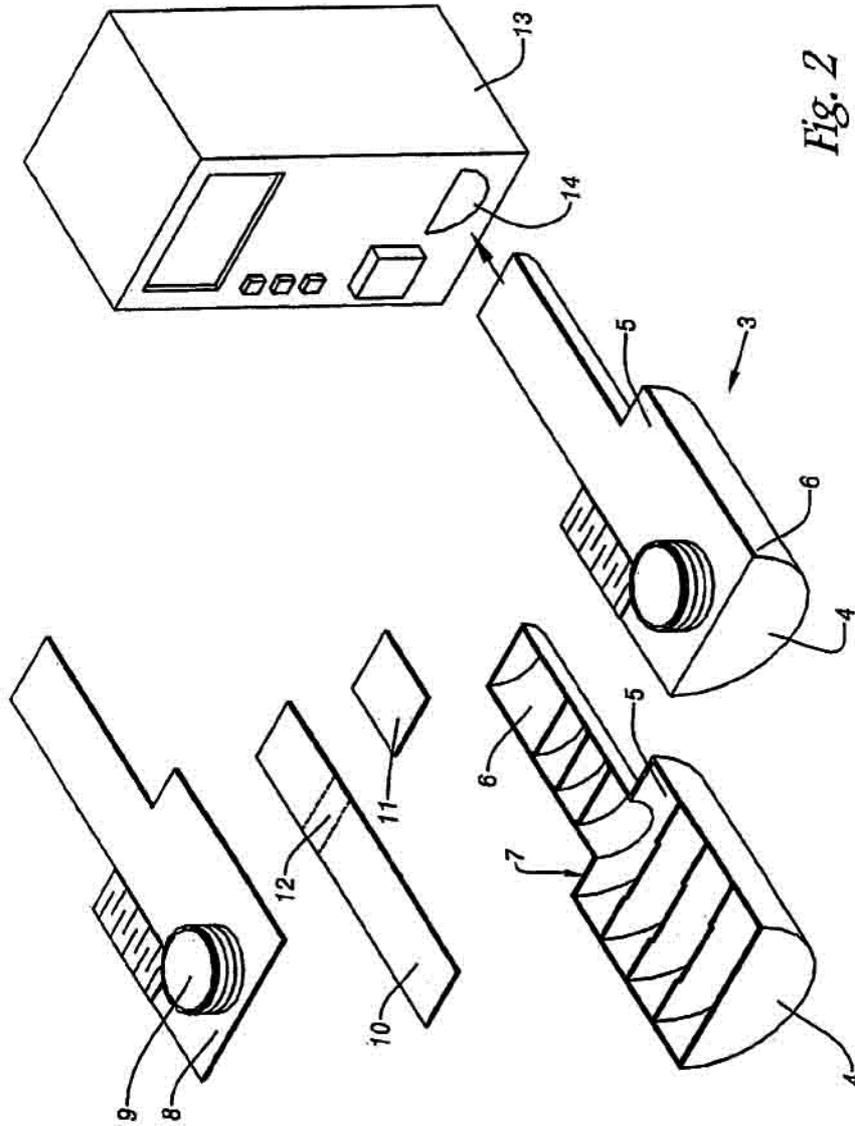


Fig. 2

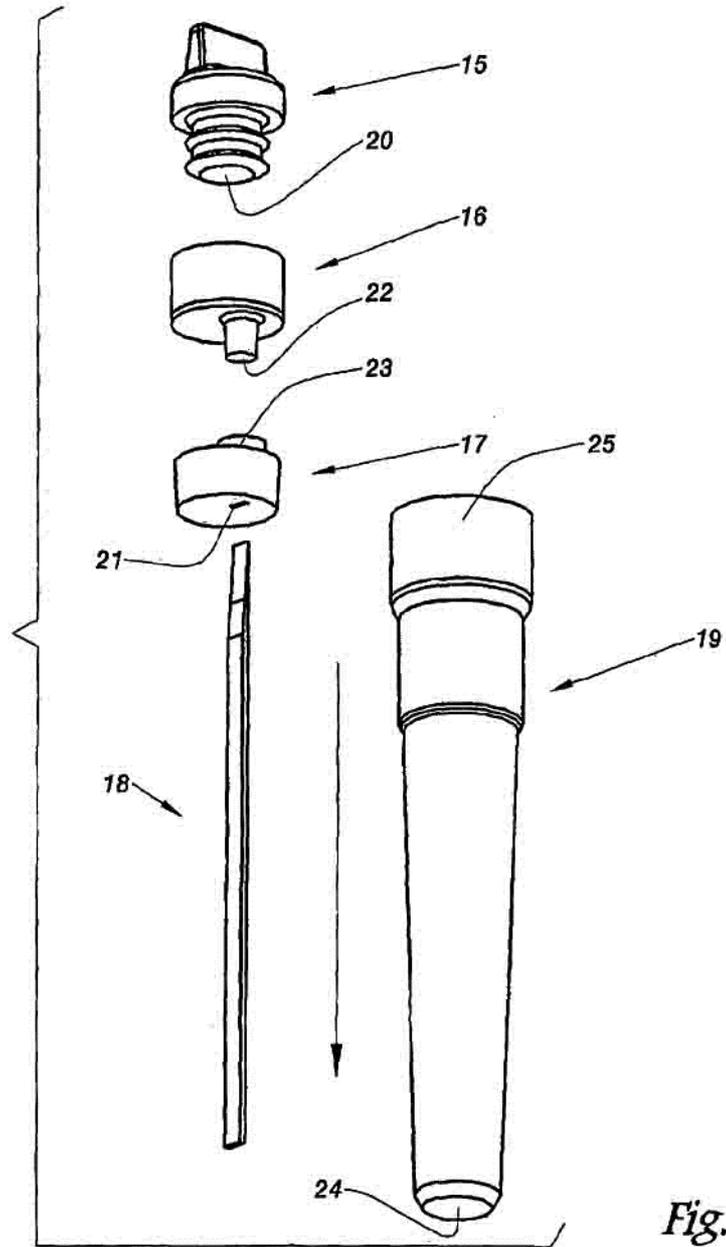


Fig. 3

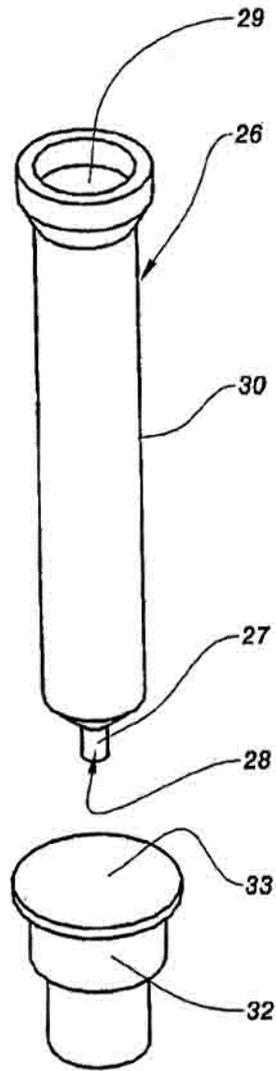


Fig. 4

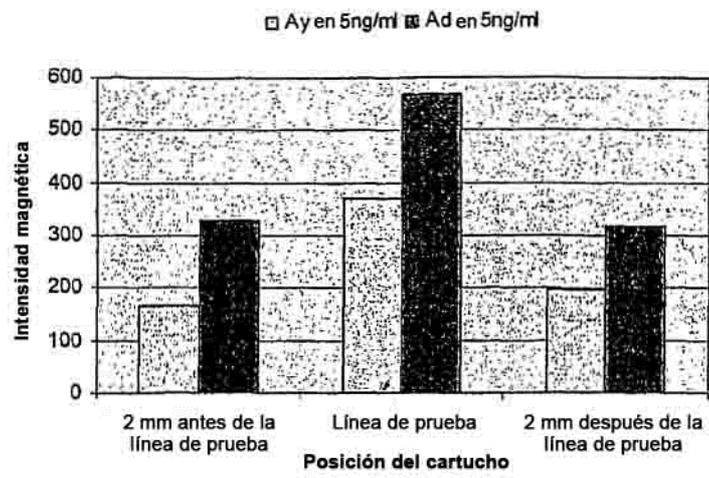


Fig.5

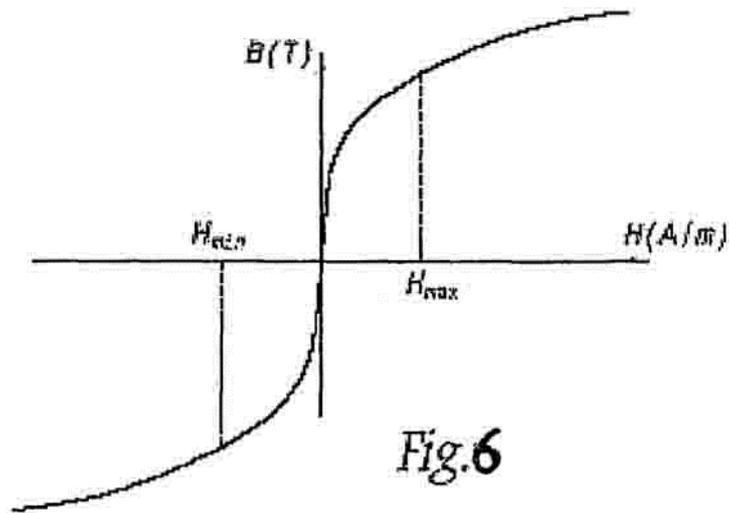


Fig.6