

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 091**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2009 E 09765237 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2288916**

54 Título: **Procedimiento inmunocromatográfico y sistema de ensayo para la determinación de al menos un analito en una solución de ensayo a analizar**

30 Prioridad:

17.06.2008 AT 34308 U

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

14.08.2015

73 Titular/es:

**ERBER AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
Industriestrasse 21
3130 Herzogenburg (AT), AT**

72 Inventor/es:

**BAUMGARTNER, SABINE;
RUDOLF, JUDITH;
BINDER, EVA MARIA y
BINDER JOHANN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 091 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 inmunocromatográfico y sistema de ensayo para la determinación de al menos un analito en una solución de ensayo a analizar

Descripción

5 La presente invención se refiere a un procedimiento inmunocromatográfico para la determinación de al menos un analito en una solución de ensayo que se debe analizar, en el cual sobre una membrana inmunocromatográfica fijada a un soporte se dispone una zona de ensayo específica para el analito, en donde sobre la membrana, según un principio de separación inmunocromatográfica, se dispone una zona de control específica para el analito, que está separada de la zona de ensayo específica para el analito, y en la solución de ensayo que se debe analizar se dispone y hace reaccionar un anticuerpo contra el analito que se debe analizar, en donde dicho anticuerpo está acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción de color, así como a un sistema de ensayo para la determinación de al menos un analito en una solución de ensayo que se debe analizar.

10 Se conoce un gran número de procedimientos inmunocromatográficos, así como sistemas de ensayo con los que se pueden determinar analitos, en especial analitos biológicos, y la mayoría de estos procedimientos y sistemas de ensayo exigen tiempos prolongados de trabajo, o permiten una detección cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa de una muestra que se debe analizar. De manera particular, se conocen múltiples procedimientos y sistemas de ensayo en los que se utiliza una técnica de capa fina, en la que se ponen en contacto tiras de ensayo o placas de ensayo y membranas inmunocromatográficas aplicadas sobre las placas de ensayo o tiras de ensayo, con un eluyente en el que se transporta la muestra que se debe analizar para, seguidamente, someterlo a una valoración por comparación óptica directa o a una valoración cualitativa, cuantitativa o también semicuantitativa, mediante curvas de calibración.

15 Adicionalmente, el documento WO 03/058242 da a conocer, por ejemplo, un sistema provisto de un sistema de calibración interna para un ensayo de flujo. En este sistema o procedimiento se utiliza una membrana porosa que se encuentra en interacción fluida con los conjugados de ensayo, los cuales contienen un miembro de fijación específico para una muestra detectable. La membrana porosa define una zona de detección y una zona de calibración, en donde la zona de calibración comprende dos o múltiples regiones de calibración que contienen diferentes cantidades de un aglutinante, y que están configuradas para unirse con los conjugados de la muestra. Como resultado, se generan señales de calibración que se pueden comparar fácilmente de forma visual, cuantitativa o similar con una señal de detección para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra de ensayo.

20 El documento WO 03/08822 describe un procedimiento para la medición de un analito de interés en una muestra líquida, en el que sobre una tira de ensayo se aplica una muestra líquida tamponada en un punto inicial de la tira de ensayo y después de un tránsito, se analiza en la tira de ensayo, que está provista de una zona de ensayo y una zona de control, la cantidad de partículas de analito que se han fijado en la muestra líquida.

25 El documento WO 2007/027231 A1 da a conocer un sistema de ensayo diagnóstico para la detección precisa de un analito de ensayo sobre un amplio intervalo de concentraciones posibles.

Una característica de este sistema es que tiene la capacidad de indicar si un analito se encuentra dentro del intervalo de una concentración en exceso o en el intervalo del "efecto Hook" (gancho). En este caso, la concentración del analito se puede determinar usando una parte de una curva de respuesta a la dosis.

30 El documento EP 0171150 A2 describe un procedimiento y un dispositivo para analizar y medir al menos un analito en una muestra única, en el que sobre un soporte sólido que posee múltiples receptores se fijan de manera selectiva diferentes analitos a los receptores con el fin de poder llevar a cabo un análisis diferencial entre los diversos analitos.

35 El documento WO 97/38312 describe un dispositivo de diagnóstico en el que, sobre una matriz portadora está dispuesto un reactivo marcado de fijación específico para un analito, en donde el reactivo marcado de fijación específico puede moverse libremente en el interior de la matriz portadora cuando ésta se encuentra en estado húmedo o mojado; adicionalmente, tiene un hilo de absorción que posee un reactivo específico, no marcado, para el mismo analito, en donde para la detección del analito la muestra de ensayo, que se ha aplicado en el dispositivo de ensayo, puede movilizar el reactivo de fijación marcado para el analito que, a continuación, permea hacia el hilo de absorción, en donde el analito unido al reactivo es captado por medio del hilo de absorción de tal forma que se puede observar la presencia del analito.

40 El documento WO 2003/023371 A describe un procedimiento para agregar una línea de señal no evidente a un procedimiento de diagnóstico rápido, en el cual un soporte contiene una marca, así como, además, una matriz que define una trayectoria de flujo axial, fijados al soporte. Por último, el soporte tiene una zona de captación de la muestra, una zona de marcado y una región de observación, en donde la marca en el soporte es detectable a través de una ventana de observación.

En el documento WO 2003/31539 se da a conocer un procedimiento y un dispositivo para llevar a cabo un ensayo de flujo lateral, en el cual se lleva a cabo un análisis sobre una tira de ensayo que contiene una zona de aplicación, en la que se puede incorporar la muestra, una zona de medición del analito que contiene un agente de fijación del analito, una zona de control y una segunda zona de medición que contiene un segundo agente de control, en donde durante la actuación de la tira de ensayo el analito, que se ha incorporado en la zona de aplicación, difunde hacia la zona de medición del analito y el agente de fijación de control difunde hacia las primera y segunda zonas de medición de control.

Por último, el documento GB 2300914 A describe un dispositivo de detección de un analito para muestras líquidas, en el cual sobre una membrana, a lo largo de la que se puede mover el líquido, se aplican en primer lugar múltiples partículas detectables, que están asociadas con una región de muestra del dispositivo y que se han aplicado en ese líquido, que se mueven a lo largo del soporte, en donde sobre el soporte hay inmovilizado un primer agente de fijación que puede formar un complejo con la especie del analito. Adicionalmente, en el soporte existen una región de valor umbral así como una región de detección para detectar un complejo que se ha formado entre el primer agente de fijación, que se encuentra inmovilizado sobre el soporte, y la especie del analito. Finalmente, el documento EP 0987551 A2 da a conocer un procedimiento para determinar la concentración de un analito en un inmunoensayo tipo sándwich con flujo lateral, que desencadena un efecto de gancho a dosis elevadas. En este procedimiento, la concentración de un analito en un medio de ensayo líquido se determina utilizando una tira de ensayo inmunocromatográfica, en donde la tira de ensayo contiene al menos dos bandas de captación y, eventualmente, una o múltiples bandas de recolección que capturan anticuerpos anti-analito marcados para poner a disposición una señal detectable. Las señales de la marca se detectan de forma cuantitativa en cada una de las bandas con el fin de proporcionar un patrón de señales, que es exclusivo para la concentración del analito en un líquido de ensayo. A continuación, los patrones de las señales se combinan matemáticamente para ofrecer una curva de respuesta a la dosis monótona.

La presente invención tiene como objetivo poner a disposición un procedimiento sencillo y especialmente rápido con el que sea posible determinar la ausencia, la presencia o una concentración excesiva de un analito, concretamente el efecto gancho, sin que se deban realizar al mismo tiempo complicados procedimientos de cálculo ni se deban utilizar membranas inmunocromatográficas extremadamente complejas.

Para resolver estas tareas, el procedimiento según la invención se distingue esencialmente por que, además de la solución de ensayo, se agrega una sustancia de control acoplada o marcada con una sustancia que desencadena una reacción cromática, por que la membrana inmunocromatográfica se sumerge durante 1 a 20 minutos en la solución de ensayo que se debe analizar, por que el analito y el anticuerpo marcado en exceso así como, eventualmente, el producto de reacción del analito y el anticuerpo marcado son capturados por la membrana inmunocromatográfica desde la solución de ensayo y se hacen pasar por la zona de ensayo específica y la zona de control específica, así como por una zona de control no específica que contiene un anticuerpo contra la sustancia de control, por que para valorar el procedimiento se determina, en primer lugar, la validez del resultado del ensayo por comparación de la intensidad del color con respecto a la o las zonas de control y/o a la zona de control no específica, usando una carta de colores, y/o se compara o mide la intensidad del color de la zona de ensayo específica por medio de dispositivos de medición fotométricos, y por que para la determinación cuantitativa del al menos un analito que se debe analizar, se mide por fotometría la intensidad de la zona de ensayo específica y la de la zona de control específica y se comparan con una curva de calibración. En la membrana inmunocromatográfica se aplica, además de una zona de ensayo específica para el analito que se debe determinar, también una zona de control específica, la cual está ajustada exactamente al analito que se debe analizar. De esta forma, mediante la simple adición de un anticuerpo contra el analito que se debe determinar, mezclado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática, resulta posible determinar de manera sencilla y sin necesidad de complicados cálculos matemáticos si el analito investigado o que se debe determinar está presente en la solución de ensayo analizada.

Asimismo, seleccionando el tiempo de tránsito de la solución de ensayo que se debe analizar sobre la membrana inmunocromatográfica dentro de un periodo de entre 1 y 20 minutos, es posible garantizar, por una parte, un tránsito lento y constante de la solución de ensayo que se investiga y, por otra parte, es posible obtener en cortos periodos de tiempo resultados específicos y, en especial, incluso resultados cuantitativos, de manera que se puede ofrecer un procedimiento rápido y fiable para determinar al menos un analito en una solución de ensayo que se debe investigar, independientemente de la concentración del analito en la solución de ensayo.

En caso afirmativo y con la condición de que el analito que se debe investigar esté contenido en la solución de ensayo en una concentración menor que la definida para el analito, en la zona de ensayo específica se forma una línea de detección, debida al anticuerpo fijado en la zona de ensayo específica, así como una línea adicional en la zona de control específica, generada por la sustancia fijada en la zona de control específica y el anticuerpo acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática. En caso de una concentración excesiva del analito que se debe investigar, no se produce ninguna reacción cromática ni en la zona de ensayo específica ni en la zona de control específica, dado que todos los puntos de fijación del anticuerpo acoplado con una sustancia que desencadena una reacción cromática, así como los puntos de fijación del anticuerpo presente en la zona de ensayo específica están ocupados por el analito que se debe investigar, por lo que, en ausencia de puntos de fijación libres tanto en la zona de ensayo específica como también en la zona de control específica, se desplazan los anticuerpos

acoplados a la sustancia que genera color, de manera que en estas zonas ya no se puede producir una reacción cromática.

Si el procedimiento se lleva a cabo de manera que, para valorar el procedimiento, se determina en primer lugar la validez del resultado experimental comparando la intensidad cromática de la zona de control específica y/o de la zona de control no específica con ayuda de una carta de colores, y/o se compara o mide la intensidad del color de la zona de ensayo específica con una carta de colores o por medio de dispositivos de medición fotométricos, es posible poner de manifiesto sin complicados procedimientos prolongados de cálculo y, en particular, de manera fiable, la presencia/ausencia y/o la concentración excesiva de un analito. Por ejemplo, a causa de una concentración excesiva se podría producir una señal falso negativa, aunque el analito esté contenido en una cantidad mucho mayor en la sustancia analizada. Comparando las intensidades medidas por fotometría de la zona de ensayo específica o de la zona de control específica, y mediante la comparación subsiguiente con la intensidad de una curva de calibración, conociendo la cantidad de anticuerpo contra el analito que se ha aplicado a la membrana inmunocromatográfica, así como la cantidad del anticuerpo acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática, es posible determinar rápidamente y de manera fiable y, por lo tanto, de forma cuantitativa y pertinente, la cantidad del analito que se investiga.

En caso de una concentración en exceso del analito que se investiga, es decir, en caso de ausencia de una reacción cromática tanto en la zona de ensayo específica como también en la zona de control específica, es decir, en presencia del llamado efecto gancho, la muestra puede o debe diluirse a continuación para llevar a cabo un nuevo ensayo, de manera que sea posible determinar cuantitativamente la cantidad del analito presente en la muestra.

Con el empleo de este sencillo procedimiento es posible establecer de inmediato, y sólo mediante comparación óptica, si el analito investigado se halla presente en la muestra que se analiza, no está presente o si en la muestra hay una concentración excesiva del analito.

Por medio de la adición a la solución de ensayo que se analiza de una sustancia de control acoplada o marcada con una sustancia que desencadena una reacción cromática, así como mediante una zona de control no específica dispuesta en la membrana inmunocromatográfica, que contiene un anticuerpo contra la sustancia de control, se puede generar en la membrana inmunocromatográfica una zona de reacción cromática adicional, a partir de la cual se puede determinar de inmediato si el ensayo es válido o no. A través del tránsito del eluyente que contiene una sustancia de control acoplada o marcada con una sustancia que desencadena una reacción cromática hasta la zona de control no específica, se puede determinar inmediatamente la validez del ensayo mediante la reacción cromática que tiene lugar en esta zona de control no específica, sin necesidad de ninguna otra valoración específica. En este caso, se consigue una simplificación adicional de la realización del procedimiento, puesto que se puede establecer de inmediato la validez del ensayo.

Con el fin de poder llevar a cabo el procedimiento inmunocromatográfico según la invención, en especial de manera también cuantitativa, el procedimiento se amplía para poder determinar cuantitativamente tanto la cantidad del anticuerpo contra el analito, que está acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática, así como también la cantidad del anticuerpo contra el analito que está fijada a la membrana inmunocromatográfica. Conociendo tanto la cantidad del anticuerpo contra el analito, que está acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática, como también la cantidad del anticuerpo contra el analito sobre la membrana inmunocromatográfica, se puede lograr también una sencilla conversión cuantitativa del analito que se investiga, sin necesidad de una elevada inversión en utillaje o técnicas procedimentales.

Tal como se ve en una realización preferida adicional, por medio de la dirección del tránsito que efectúa la solución de ensayo sobre la membrana inmunocromatográfica, en primer lugar la zona de ensayo específica y, dispuestas a continuación, la zona de control específica, así como, eventualmente, la zona de control no específica, es posible evitar de manera segura resultados erróneos en la valoración de la membrana inmunocromatográfica, sobre todo debidos a un tránsito irregular de la solución de ensayo que se investiga. Por la disposición por parejas de, respectivamente, una zona de ensayo específica y una zona de control específica secundaria, la probabilidad de que, en presencia de una reacción cromática positiva en la zona de control específica, se hayan producido errores en la membrana es mínima.

De acuerdo con el procedimiento según la invención, y tal como se muestra en una realización preferida del procedimiento, cabe la posibilidad de investigar simultáneamente una multiplicidad de analitos. Para ello, se aplican en la membrana inmunocromatográfica, una detrás de otra, parejas compuestas por una zona de ensayo específica y una zona de control específica, así como, eventualmente, una zona de control no específica en la región de la membrana inmunocromatográfica que está más alejada del punto inicial del recorrido de la sustancia que se debe investigar. En este caso, cada uno de los analitos investigados se puede analizar por separado y libre de las influencias de otro u otros analitos presentes en la solución de ensayo estudiada. Como consecuencia adicional de la citada disposición por parejas de zonas de ensayo y control específicas, es sencillo reconocer errores producidos en la membrana y decidir si se debe retirar la membrana o repetir el ensayo de inmediato.

Según un aspecto preferido de la presente invención, el procedimiento según la invención se puede perfeccionar disponiendo sobre múltiples tiras de ensayo, separables o, eventualmente, separadas entre sí, zonas de ensayo y

control adaptadas para la investigación simultánea de los diferentes analitos. Con una realización de este tipo, es posible, en particular, investigar simultáneamente una multitud de analitos o, eventualmente, separar una parte del sistema de ensayo, que está formado por tiras de ensayo separadas, y utilizar o evaluar esta parte de manera individual. De este modo, se puede no sólo investigar simultáneamente múltiples analitos, sino, en caso de necesidad, utilizar también estos sistemas de ensayo relativamente costosos de manera dirigida y económica.

Según una realización preferida del procedimiento según la invención, éste se lleva a cabo de manera tal que la membrana inmunocromatográfica se sumerge durante 2 a 15 minutos en la solución de ensayo que se debe analizar. Seleccionando un tiempo de tránsito para la solución de ensayo en la membrana inmunocromatográfica de entre 2 y 15 minutos se puede garantizar, por una parte, un tránsito lento y constante de la solución de ensayo que se debe investigar y, por otra parte, se pueden obtener resultados específicos e, incluso, cuantitativos en un corto periodo de tiempo, por lo cual se puede poner a disposición un procedimiento rápido y fiable para determinar al menos un analito en una solución de ensayo, independientemente de la concentración del analito en la solución de ensayo.

De manera adicional, un sistema de ensayo para la determinación de al menos un analito en una solución de ensayo que se debe investigar puede estar construido de tal forma que esté previsto un soporte sobre el cual se encuentra una membrana inmunocromatográfica de dimensiones definidas, en la que hay fijada una zona de ensayo específica que contiene, en particular, un anticuerpo contra el analito, en la membrana inmunocromatográfica y separada de la zona de ensayo específica existe una zona de control específica, que contiene el analito o un homólogo; hay al menos una zona de control no específica, y un dispositivo de medición por fotometría para determinar un analito que ha pasado por la zona de ensayo específica, así como el anticuerpo contra el analito, acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática. Mediante el uso de un sistema de ensayo para determinar al menos un analito en una solución que se debe investigar, en el cual en zonas de ensayo específicas de una membrana inmunocromatográfica hay fijados anticuerpos contra el analito o un homólogo y, adicionalmente, en la membrana inmunocromatográfica existe un control específico, que está separado de la zona de ensayo específica y al que está fijado el analito, y por medio de un anticuerpo contra el analito que se debe determinar, acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática, es posible obtener de manera rápida y fiable una reacción cromática relevante en la membrana inmunocromatográfica, en donde, a continuación, la reacción se puede valorar, de forma sencilla y sin complicados cálculos matemáticos, a través de un dispositivo de medición fotométrica, con el que se pueden llevar a cabo mediciones cuantitativas rápidas y fiables del analito que se investiga.

En este caso, para la medición se puede utilizar como dispositivo de medición fotométrica un dispositivo fotométrico de reflexión, un espectrómetro o una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada, por sus siglas en inglés). Utilizando un dispositivo de medición fotométrica, un dispositivo fotométrico de reflexión, un espectrómetro o una cámara CCD se pueden detectar diferencias finas de color, en especial finas diferencias en la intensidad de color, de manera clara y reproducible y, además de los resultados cualitativos, también resultados cuantitativos claramente reproducibles referidos a las cantidades del analito investigado en la muestra.

Si al dispositivo de medición se agrega un indicador capaz de mostrar inmediatamente el resultado de la medición, el sistema de ensayo se puede usar para ensayos rápidos en las que se puede detectar de manera clara e inequívoca, por ejemplo, la presencia de sustancias patógenas en alimentos para humanos y animales o elementos similares.

Tal como se indica en una realización adicional del sistema de ensayo, si el sistema está construido de manera que sobre una membrana inmunocromatográfica se dispone una multiplicidad de zonas de ensayo específicas y zonas de control específicas, ordenadas por parejas unas junto o detrás de otras, se pueden detectar simultáneamente de manera rápida y fiable múltiples analitos en una única membrana inmunocromatográfica, siendo posible detectar, además, una serie de sustancias que se deben analizar tales como, por ejemplo, proteínas, contenidos no deseados o contaminantes de productos agrarios, microorganismos modificados genéticamente y similares, tal como corresponde con un uso preferido de la presente invención.

En la valoración de estos tipos de sistemas de ensayo, con el fin de simplificar y obtener resultados experimentales más precisos, el sistema de ensayo se puede dividir antes de la valoración en tiras individuales para compararlas por separado con cartas de colores o similares, de modo que se pueda obtener un resultado fiable y preciso. Sin embargo, también es posible valorar la totalidad del sistema de ensayo introduciéndolo en un lector de cartillas de ensayo y obtener una lectura conjunta, mediante lo cual el sistema de ensayo no sólo se puede adaptar a una serie de aplicaciones posibles, sino que también puede ofrecer resultados rápidos y fiables.

Según una realización adicional, el sistema de ensayo está construido de manera que entre las tiras de ensayo dispuestas de forma adyacente entre sí, existen separaciones, en especial hendiduras o perforaciones, en cuyo caso y en función de los requisitos del análisis, resulta posible utilizar el ensayo simultáneamente para múltiples analitos o, como se ha mencionado anteriormente, después de haber efectuado el ensayo, separar el sistema de ensayo en tiras individuales por las líneas perforadas para, seguidamente, poder valorar por separado las tiras individuales.

A continuación, la invención se explicará de forma más detallada por medio de los ejemplos de realización representados en los dibujos, en los que:

Figura 1a representa una disposición esquemática de un ensayo según la presente invención, en donde Figura 1a representa un resultado experimental válido, aunque negativo, y Figura 1b muestra la misma disposición de ensayo, en la cual, sin embargo, se representa un resultado experimental negativo válido;

Figura 2 representa una disposición de ensayo similar en la que, sin embargo, la solución de ensayo contiene dos analitos diferentes que se deben investigar y, adicionalmente, la membrana inmunocromatográfica contiene una zona de control no específica, en donde

Figura 2a representa un ensayo, que es válido, en el cual un primer analito muestra un resultado válido y positivo, y un segundo analito investigado muestra un resultado que se debe repetir después de diluir la muestra debido a una sobrecarga;

Figura 2b representa un caso en el que el ensayo es válido, pero en el cual tanto el primer como el segundo analito muestran un resultado válido, pero negativo;

Figura 2c representa, por último, una disposición de ensayo en la cual el ensayo es válido y el analito 1 es válido y positivo y el analito 2 es válido y negativo;

Figura 3a muestra el ejemplo de una tarjeta de ensayo en la que se encuentran dos líneas de ensayo;

Figura 3b muestra el ejemplo de una tarjeta en la que se encuentran tres líneas de ensayo;

Figura 4 representa una tarjeta de ensayo de doble anchura, en la que se pueden detectar dos analitos en cada parte;

Figura 5a muestra una tarjeta de ensayo divisible en tres secciones, sobre la que se pueden aplicar tres analitos de forma adyacente;

Figura 5b muestra una tarjeta de ensayo divisible en tres secciones, en la que se pueden investigar simultáneamente tres analitos que pueden aparecer en una matriz.

De forma concreta, en la Figura 1 se representa esquemáticamente con 1 un recipiente que contiene una solución de ensayo 2 que se debe analizar. En esta solución de ensayo 2 se designa con 3 el analito que se debe investigar y, por otra parte, con 4 se designa un anticuerpo acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática. Específicamente, los símbolos seleccionados para la Figura 1 son habituales en el campo de la bioquímica y tienen el siguiente significado:

◇ Analito

Y Anticuerpo contra el analito



Sustancia que desencadena una reacción cromática



Anticuerpo contra el analito, acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática específica.

A continuación, en el recipiente de reacción 1 se introduce una tira de ensayo, designada esquemáticamente con 5, a la que se encuentra fijada una membrana inmunocromatográfica 6. En la membrana inmunocromatográfica 6 existe, por una parte, una zona de ensayo específica en una cantidad cuantitativa con un anticuerpo 7 contra un analito 3 que se debe investigar y, por otra parte, separada de esta zona de ensayo 7 específica, en una zona de control específica 8 hay una cantidad cuantitativa de un analito cuya presencia cabe esperar en la muestra, o de su homólogo.

Cuando la solución 2 que se analiza se desplaza en la dirección de tránsito 9 de la tira de ensayo 5, en la zona de ensayo específica 7, en caso de una detección positiva, se fijan al anticuerpo contra el analito, por una parte, el analito 3 y, por otra parte, al analito 3 se fija el anticuerpo contra el analito 4 que está acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática. Seguidamente, al continuar el desplazamiento de la solución de ensayo 2 en la dirección de tránsito 9, se fijan el anticuerpo contra el analito 4, que está acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática, al que se ha fijado también el analito 3, a la zona de control específica 8, concretamente al analito fijado a la membrana inmunocromatográfica 6, y desencadenan una reacción cromática, en cuyo caso al valorar la tira de ensayo 5 se pueden detectar dos barras que exhiben una reacción cromática, las cuales están separadas espacialmente entre sí. A continuación, a partir de la intensidad del color se puede deducir la concentración del analito 3 contenido en la solución de ensayo 2, puesto que, por una parte, tanto la dimensión de la membrana inmunocromatográfica 6 como la cantidad del anticuerpo 7 contra el analito, así como también la cantidad del analito u homólogo 8 aplicado sobre la membrana inmunocromatográfica 6, y la cantidad del anticuerpo 4 acoplado a la sustancia que desencadena la reacción cromática en la solución de ensayo 2 son conocidas, por lo

que mediante una sencilla comparación con una curva de calibración no sólo se puede determinar la validez, sino que también se puede llevar a cabo la detección positiva del analito 3 contenido en la solución de ensayo 2.

La Figura 1b hace referencia al caso de que la solución de ensayo 2 no contiene el analito 3, sino solamente el anticuerpo contra el analito 4, acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática. Cuando se sumerge la tira de ensayo 5 en esta solución de ensayo 2 y se permite el paso en la dirección de tránsito 9, en el punto 7, en donde está fijado el anticuerpo contra el analito, no se produce ninguna reacción, dado que la muestra 2 no contiene analito. Además, en el punto 8, en donde está fijado el analito o su homólogo a la membrana inmunocromatográfica 6, se produce una reacción cromática muy intensa del anticuerpo contra el analito 4, que está acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática, de manera que se pueden extraer conclusiones inmediatas acerca de la validez del ensayo, determinando al mismo tiempo que el ensayo ha tenido un desarrollo negativo debido a la ausencia de reacción en el punto 7.

La disposición del ensayo según la Figura 2 es similar a la de la Figura 1, si bien la solución de ensayo 2, además del analito 3, contiene otros analitos 10, así como, respectivamente, un anticuerpo contra el analito 3 o 10, acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática, a saber 4 u 11. Por último, la solución de ensayo 2 contiene también una sustancia 12 adicional que, una vez más, es un anticuerpo 12 acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática, en donde sin embargo este anticuerpo no es específico y solamente se utiliza para demostrar si el ensayo o la ensayo es válida o no.

De manera concreta, los símbolos seleccionados en la Figura 2 son habituales en el campo de la bioquímica y tienen el siguiente significado:

◇ Primer analito

Y Anticuerpo contra el analito

□ Segundo analito



Sustancia que desencadena una reacción cromática



Primer anticuerpo contra el analito, acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática específica



Segundo anticuerpo contra el analito, acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática específica



Anticuerpo contra una sustancia de control, acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática específica.

En las Figuras 2a, 2b y 2c, en las tiras de ensayo 5 están dispuestas las siguientes sustancias de forma sucesiva: un anticuerpo 7 contra el analito 3, el analito en la zona de control específica 8, un anticuerpo contra el analito 10, que se designa con el número 13, un analito 14 en la zona de control específica, así como un anticuerpo contra el analito 12 no específico, que está fijado a una sustancia que desencadena una reacción cromática y que se designa con el número 15. Cuando la tira de ensayo 5 se sumerge en la solución 2 analizada y se desplaza a lo largo de la dirección de tránsito 9 de la solución de ensayo que se analiza, en el caso de la Figura 2a, la tira se fija al anticuerpo 7 del analito 3, así como al analito 3 del anticuerpo 4 que está acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática. Al analito o al homólogo 8 se fijará nuevamente el anticuerpo 4, que está adsorbido o acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática, estando acopladas a dicho anticuerpo 4 partículas del analito 3 adicionales. Finalmente, el analito 10 se acopla al anticuerpo 13, y en el analito 14 no se produce ninguna reacción, dado que todos los puntos de fijación del anticuerpo 11 acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática están ocupados por partículas del analito 10, de modo que es imposible el acoplamiento del anticuerpo 11, que está acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática, y al analito 14. Al final, en la dirección de tránsito 9 sobre la membrana inmunocromatográfica 6, tiene lugar una reacción cromática entre el anticuerpo 15 fijado a la misma y el analito 12 no específico, que se ha agregado a la muestra durante el ensayo para poder demostrar la validez del ensayo.

Por lo tanto, el ensayo según la Figura 2a es válido y positivo con respecto al analito 3, y es posible detectar el analito 3. Con respecto al analito 10, no es válido, puesto que la solución de ensayo 2 que se debe analizar contiene un exceso del analito 10, de manera que no se puede observar una reacción cromática ni en la zona de ensayo específica ni en la zona de control específica en relación con el analito 10. A partir de esta ausencia de reacción

cromática se puede concluir, en la valoración del ensayo, que hay una cantidad excesiva del analito y, en consecuencia, diluir correspondientemente la solución de ensayo 2 y repetir el ensayo con una solución diluida en consonancia.

La valoración del ensayo según la Figura 2b muestra un ensayo válido, dado que la sustancia de control no específica o el anticuerpo 15 contra la sustancia de control no específica 12 no muestran reacción, en la zona de ensayo específica, concretamente en el anticuerpo 7, no tiene lugar ninguna reacción, en la zona de control específica 8 se produce una reacción con el anticuerpo contra el analito, que está acoplado con una sustancia que desencadena una reacción cromática, en la segunda zona de ensayo específica 13 no se produce ninguna reacción cromática, dado que la solución de ensayo 2 que se debe analizar tampoco contiene el segundo analito 10 que se debe investigar, y en una segunda zona de control específica 14 se puede detectar una reacción cromática, puesto que el anticuerpo 11 contra el analito 10, que está acoplado a una sustancia que desencadena una reacción cromática, se ha acoplado al analito 10 fijado en la posición 14. Por consiguiente, el ensayo según la Figura 2a es válido y también es válido con respecto al analito 3, así como también con respecto al analito 10, aunque es negativo.

Por último, la Figura 2c muestra un caso en el que el ensayo, que se lleva a cabo de la forma que se ha descrito anteriormente, es válido y positivo con respecto al analito 3 y, en relación con el analito 10, es válido y negativo, dado que este último no está contenido en la solución 2 que se analiza. Evidentemente, además de las variantes con uno y dos analitos que se deben investigar, la muestra que se analiza puede contener, por ejemplo, cinco o más analitos y, tal como ya se ha mencionado, la valoración del resultado experimental se puede llevar a cabo tanto de forma óptica, evaluando de manera puramente visual las intensidades de color de las barras de reacción obtenidas, como también a través de los correspondientes dispositivos de medición y por comparación con las curvas de calibración, por ejemplo, de manera cuantitativa.

La Figura 3a muestra una tira de ensayo sobre la que se ha aplicado una membrana inmunocromatográfica 6. En la dirección de tránsito 9 de la membrana, que se indica con una flecha, existen dos líneas de ensayo dispuestas de forma adyacente para los analitos A1/1 y A2/1 que se deben investigar, con los cuales se pueden detectar, por ejemplo, alfa-lactoalbúmina (analito A1) y caseína (analito A2).

Separadas de las dos líneas de ensayo A1/1 y A2/1, se aplican las correspondientes líneas de control específicas A1/1 y A2/2. Al final de la tira de ensayo 5 se encuentra la zona de control no específica 12.

Del mismo modo, la Figura 3b muestra una tarjeta de ensayo 5 en la que en la dirección de flujo 9 hay dispuestos, uno tras otro, tres pares de analitos juntos, en líneas de control específicas. De esta forma, por ejemplo A1/1 muestra el analito que se investiga, por ejemplo alfa-lactoalbúmina, la línea A1/2 muestra las líneas de control específicas correspondientes, la línea A2/1 muestra un segundo analito que se debe investigar, por ejemplo caseína, la línea A2/2 muestra la línea de control específica correspondiente, y la línea A3/1 muestra un tercer analito que se debe investigar tal como, por ejemplo, beta-lactoglobulina, y la línea A3/2 muestra la correspondiente línea de control específica. Con el número 12 se representa nuevamente la línea de control no específica.

Figura 4 muestra nuevamente una tarjeta de ensayo 5 que, a diferencia de las realizaciones anteriores, está formada por dos partes. En este caso, la tarjeta de ensayo 5 se puede separar mediante una línea perforada 16 central en dos secciones 17 y 18. En las dos secciones de la tarjeta de ensayo se pueden aplicar, respectivamente, dos pares de analitos, de manera que con una única tarjeta de ensayo 5 se puede investigar simultáneamente un total de cuatro analitos. Debido a la configuración de este tipo es posible valorar al mismo tiempo los cuatro analitos de forma cuantitativa o, según las necesidades, solamente los dos situados respectivamente en una tira de las secciones 17 o 18 de la tarjeta de ensayo 5. Además, en función de la disponibilidad de los dispositivos de valoración utilizables, el procedimiento se puede llevar a cabo de manera que se realice simultáneamente una valoración cuantitativa de los cuatro analitos en un dispositivo de lectura correspondiente o, después de separar las tiras de ensayo 5 en sus secciones 17 o 18, las cuales son portadoras, respectivamente, de una membrana inmunocromatográfica 6, efectuar la valoración por separado.

Del mismo modo, tal como se muestra en las Figuras 5a y 5b, la tarjeta de ensayo puede estar formada por múltiples secciones, por ejemplo tres. La tarjeta de ensayo 5 comprende en este caso tres secciones, 17, 18 y 19, y en cada una de las secciones de la tarjeta de ensayo 5 se aplican, respectivamente, un analito así como la correspondiente línea de control específica, a saber A1/1 o A1/2, A2/1 o A2/2 y A3/1 o A3/2.

En este caso, para una facilitar la lectura, en la Figura 5a las líneas de ensayo y de control específicas están dispuestas separadas entre sí en las tarjetas individuales 17, 18 y 19 de forma que con un sistema de este tipo, no sólo se puede lograr una mejor lectura del ensayo, sino que se consigue también una disposición más clara. Para completar el ensayo, en las tres tarjetas parciales 17, 18 y 19 de la tira de ensayo 5 existe una línea de control no específica 12.

En este caso, resulta posible, por ejemplo, después de un resultado positivo en una de las tiras, llevar a cabo un análisis adicional en otra tira para obtener un resultado perfeccionado.

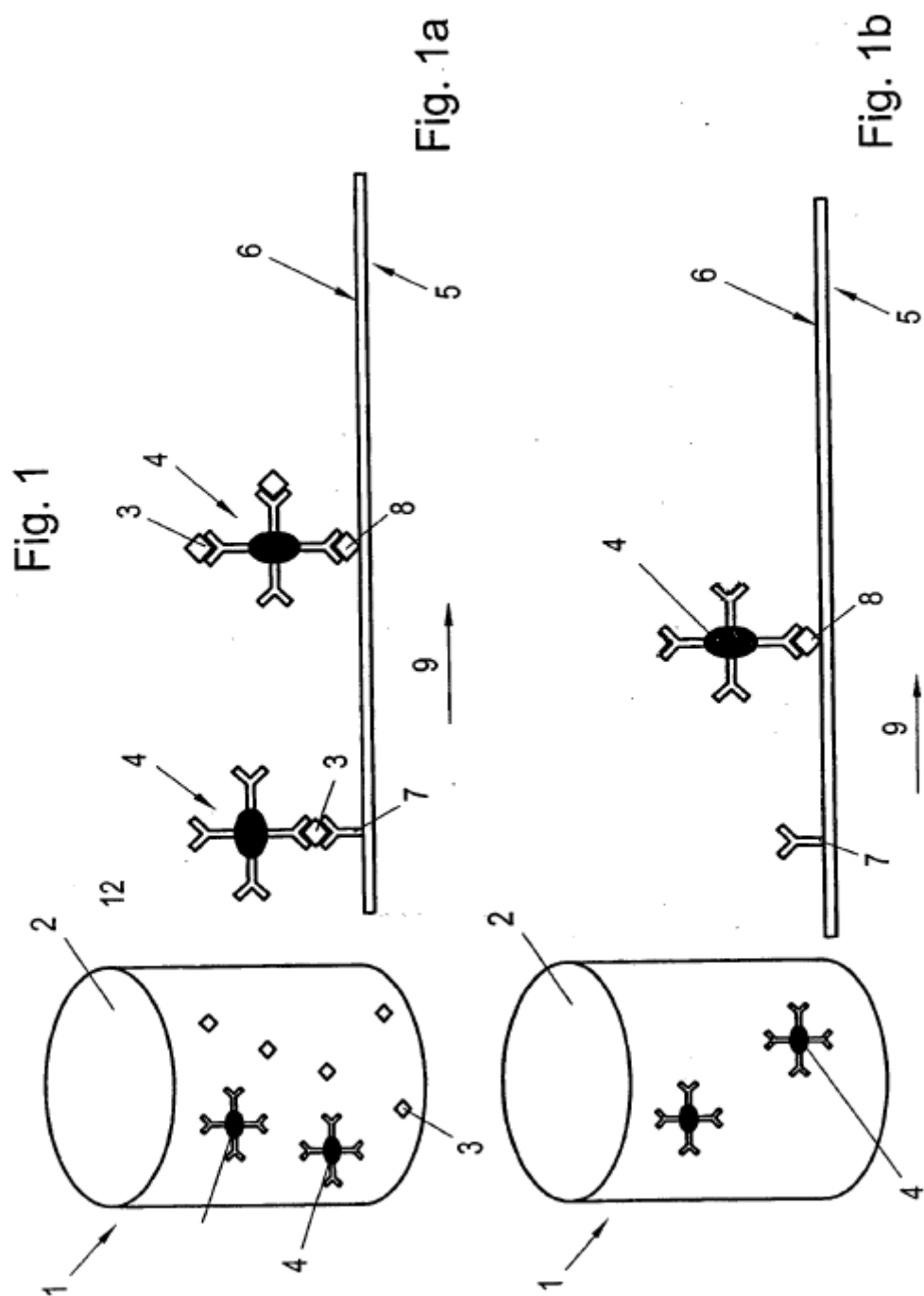
Figura 5b muestra nuevamente una tarjeta de ensayo 5 en la que se pueden investigar tres analitos diferentes entre sí, en donde la realización según la Figura 5b es especialmente adecuada para el estudio de analitos que se encuentran en una matriz; como ejemplo, se puede citar la leche que puede contener diferentes componentes alérgicos tales como alfa-lactoalbúmina, caseína o beta-lactoalbúmina. En este caso, la tarjeta de ensayo 5 también está dividida en tres secciones 17, 18 y 19 y en la dirección del tránsito 9 del medio líquido, todas las líneas de ensayo y control específicas, así como una línea de control no específica 12 están dispuestas a la misma altura. La tarjeta de ensayo según la Figura 5b, a diferencia de la representada en la Figura 5a, está construida de tal manera que solamente hay prevista una perforación 21 en la parte superior, especialmente en la zona por la que sujeta 20, de forma que las tiras se pueden desprender fácilmente. La zona inferior de las tiras de ensayo 17, 18 y 19, es decir, la región donde se lleva a cabo el ensayo, están completamente separadas entre sí y no muestran ninguna perforación.

En una realización de este tipo, las tiras 17, 18 o 19 de la tarjeta de ensayo 5 se pueden separar entre sí de forma segura y fiable, sin perjudicar el ensayo.

Evidentemente, el sistema se puede configurar de manera diferente, en donde en la tarjeta de ensayo 5 solamente se detecte un analito en las diversas secciones 17, 18 o 19 de la tarjeta de ensayo; para ello, en las distintas tiras de la tarjeta de ensayo 5 se aplican concentraciones diferentes de un mismo analito, con el fin de obtener inmediatamente un resultado cuantitativo, seguro y fiable.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento inmunocromatográfico para la determinación de al menos un analito en una solución de ensayo que se debe analizar, en el cual en una membrana inmunocromatográfica situada sobre un soporte se dispone una zona de ensayo específica para el analito, en donde sobre la membrana (6), y separadas según un principio de separación inmunocromatográfica de las zonas de ensayo específicas (7, 13) para el analito (3, 10), se dispone una zona de control específica (8, 14) para el analito, y en la solución de ensayo (2) que se debe analizar hay presente y se hace reaccionar un anticuerpo (4, 11) contra el analito (3, 10) que se debe investigar, acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática, caracterizado por que además de la solución de ensayo (2), se agrega una sustancia de control (12) acoplada o marcada con una sustancia que desencadena una reacción cromática, por que la membrana inmunocromatográfica (6) se sumerge durante 1 a 20 minutos en la solución de ensayo que se debe analizar, por que el analito (3, 10) y el anticuerpo (4, 11) marcado en exceso, así como eventualmente el producto de reacción del analito y el anticuerpo marcado, son captados por la membrana inmunocromatográfica (6) desde la solución de ensayo (2), y se hacen pasar por la zona de ensayo específica (7, 13) y la zona de control específica (8, 14), así como por una zona de control no específica (15), que contiene un anticuerpo contra la sustancia de control (12), por que para la valoración del procedimiento se determina, en primer lugar, la validez del resultado experimental comparando o midiendo la intensidad del color de la o las zonas de control específicas (8, 14) y/o de la zona de control no específica (15) con una carta de color, y/o por la intensidad del color de la zona de ensayo específica mediante dispositivos de medición fotométrica, y por que para la determinación cuantitativa del al menos un analito (3, 10) que se debe investigar se miden por fotometría la intensidad de la zona de ensayo (7, 14) y la de la zona de control específica (8, 14), y se comparan con una curva de calibración.
2. Procedimiento inmunocromatográfico según la reivindicación 1, caracterizado por que se determinan cuantitativamente tanto la cantidad del anticuerpo (4, 11) contra el analito (3, 10), que está acoplado o marcado con una sustancia que desencadena una reacción cromática, como la cantidad del anticuerpo contra el analito que se fija sobre la membrana inmunocromatográfica (6).
3. Procedimiento inmunocromatográfico según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que en la dirección de tránsito (9) de la solución de ensayo (2) por la membrana inmunocromatográfica (6), se disponen en primer lugar la o las zonas de ensayo específicas (7, 13) y, a continuación, se encuentran la o las zonas de control específicas (8, 14) y, eventualmente, la zona de control no específica (15).
4. Procedimiento inmunocromatográfico según las reivindicaciones 1, 2 o 3, caracterizado por que se analizan simultáneamente múltiples analitos (3, 10) que se deben investigar.
5. Procedimiento inmunocromatográfico según la reivindicación 4, caracterizado por que en la investigación simultánea de múltiples analitos (3, 10) que se deben investigar, se disponen sobre una membrana inmunocromatográfica múltiples zonas de ensayo (7, 13) y de control (8, 14) específicas, situadas por parejas de manera adyacente o sucesiva y adaptadas a los analitos (3, 10) que se deben investigar.
6. Procedimiento inmunocromatográfico según las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado por que las zonas de ensayo (7, 13) y de control (8, 14) adaptadas a los múltiples analitos (3, 10) que se deben investigar simultáneamente, están dispuestas sobre múltiples tiras de ensayo situadas de manera adyacente y que, eventualmente, se pueden separar entre sí.
7. Procedimiento inmunocromatográfico según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la membrana inmunocromatográfica (6) se sumerge durante 2 a 15 minutos en la solución de ensayo (2) que se debe analizar.



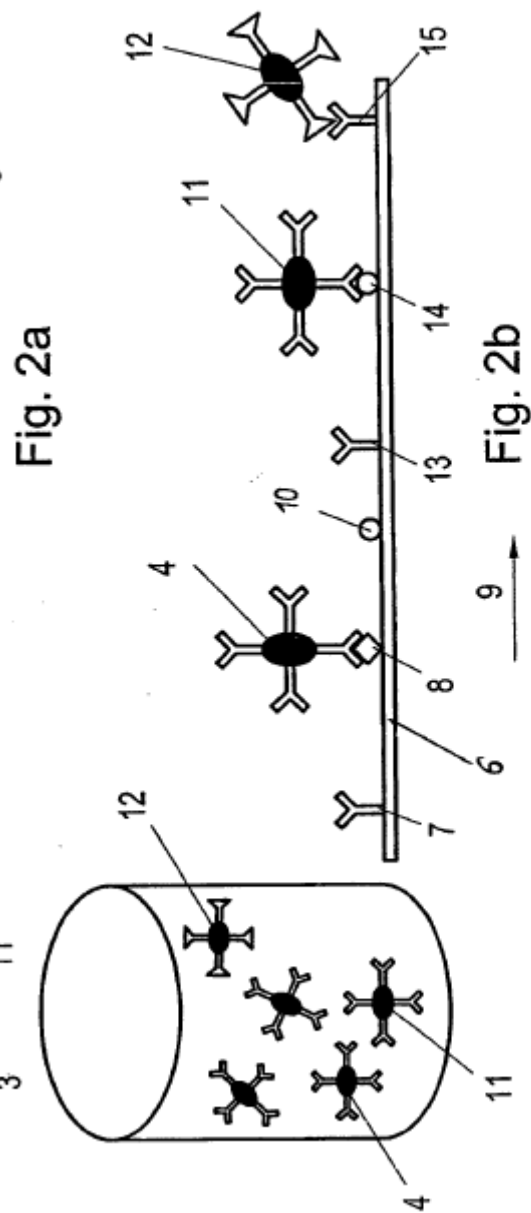
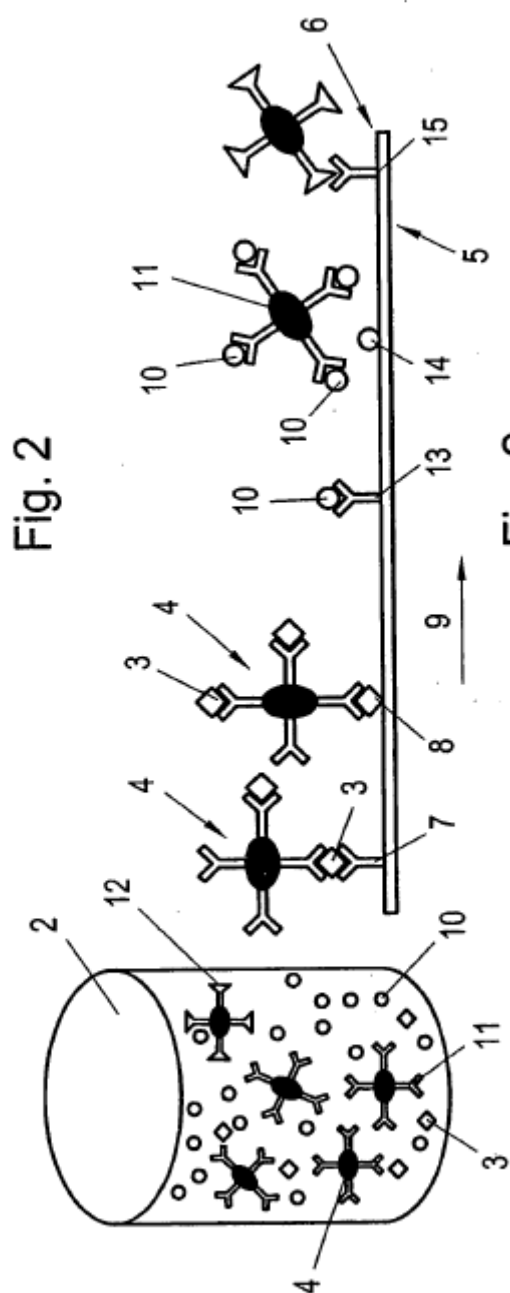


Fig. 2b

Fig. 2

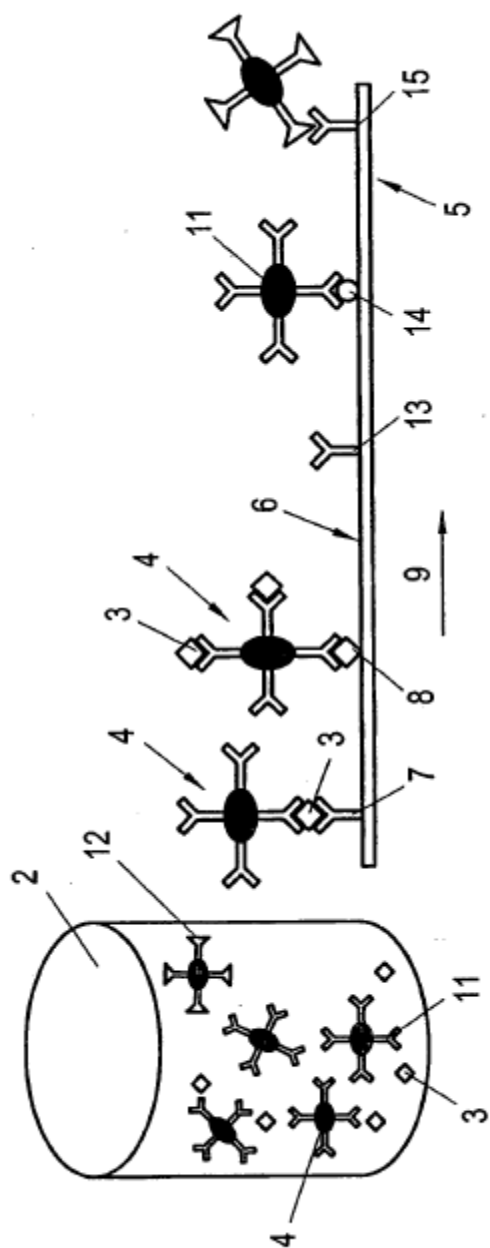


Fig. 2c

Fig. 3a

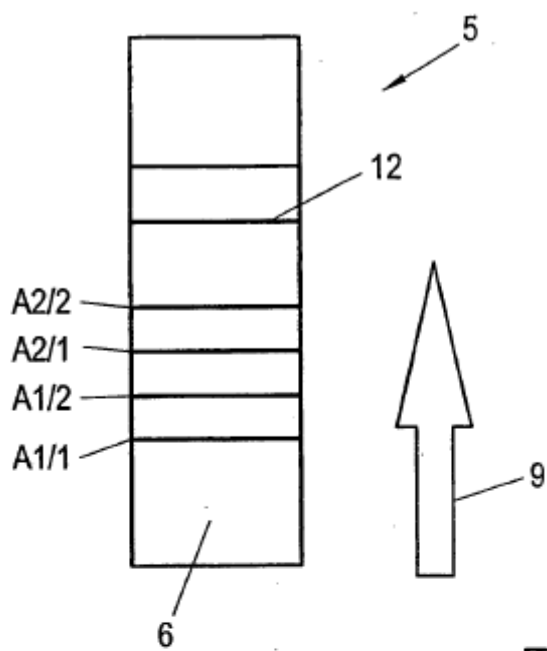
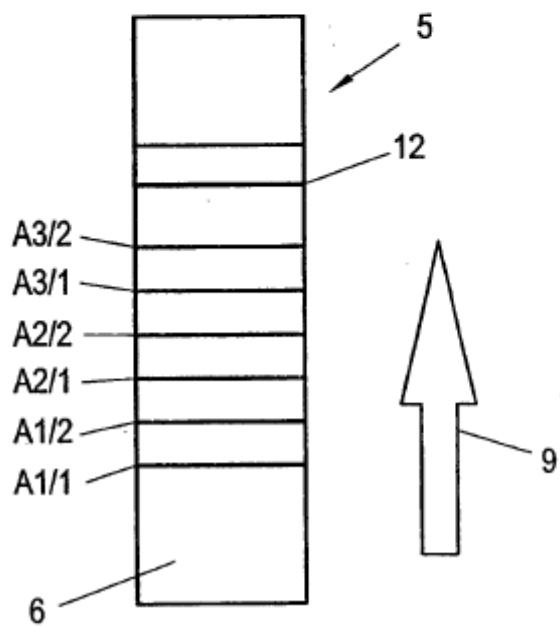


Fig. 3

Fig. 3b



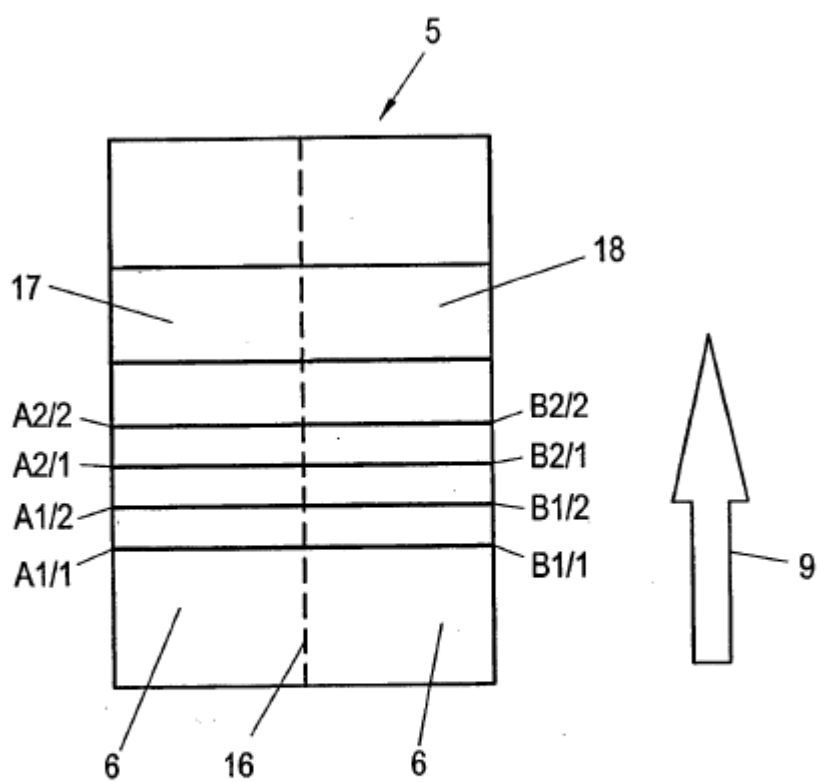


Fig. 4

Fig. 5a

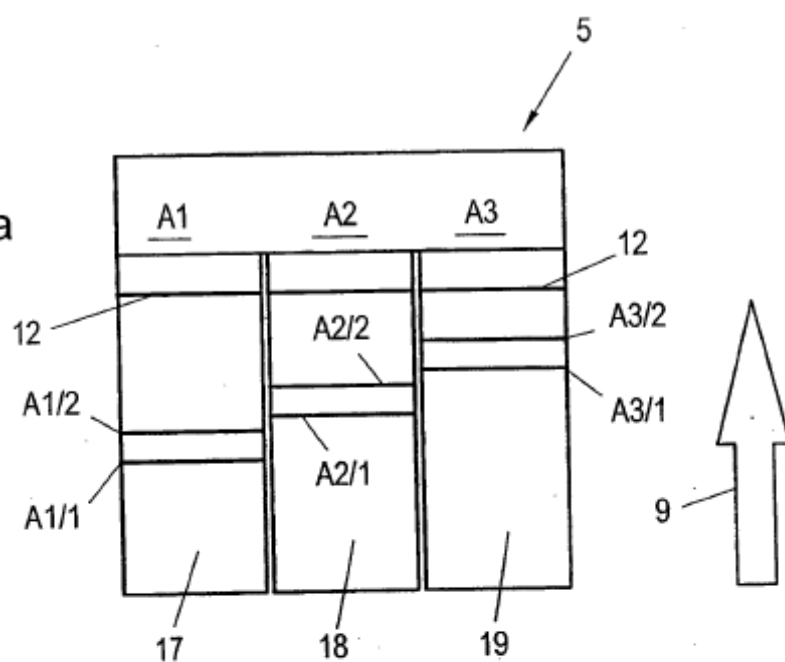


Fig. 5

Fig. 5b

