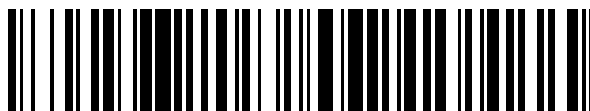


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 803**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2012** **E 12738592 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016** **EP 2734842**

54 Título: **Aparato y método para el flujo lateral de ensayos de afinidad**

30 Prioridad:

19.07.2011 GB 201112395

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

26.04.2016

73 Titular/es:

**THE BIO NANO CENTRE LIMITED (100.0%)
The Gridiron Building, One Pancras Square
London N1C 4AG, GB**

72 Inventor/es:

**CASS, ANTHONY EDWARD GEORGE;
CELAYA SANFIZ, ALMUDENA y
REHAK, MARIAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 567 803 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

Aparato y método para el flujo lateral de ensayos de afinidad

Antecedentes

5 Los ensayos de afinidad se usan ampliamente en investigación médica, alimentaria y medioambiental y se basan en el principio de un reactivo que se une a un analito diana. La interacción de unión se detecta por medio de algún cambio físico-químico, cuya magnitud es proporcional a la concentración del analito. Se han descrito muchos reactivos diferentes, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos, otras proteínas, ácidos nucleicos y receptores sintéticos.

10 Los anticuerpos se usan comúnmente como el reactivo y se han descrito muchos formatos diferentes de ensayo que utilizan anticuerpos. Se denominan colectivamente inmunoensayos. Un tipo de inmunoensayo que es particularmente adecuado para los ensayos en el punto de atención (abreviadamente POCT, por sus siglas en inglés *Point Of Care Test*) es el inmunoensayo de flujo lateral (abreviadamente LF, por sus siglas en inglés *Lateral Flow*) (denominado también ensayo inmunocromatográfico).

15 Los inmunoensayos de LF son una tecnología bien establecida y sólida para la detección de antígenos. Están adaptados para funcionar a lo largo de un solo eje adecuándose a un formato de tira de ensayo y típicamente emplean un formato de sándwich (denominado también en 2 sitios, con exceso de reactivo o no competitivo). En este formato está marcado uno de los dos anticuerpos, típicamente con partículas coloreadas y secado como una preparación soluble sobre una membrana de LF (típicamente una membrana hidrófoba de nitrocelulosa o acetato de celulosa). Este primer anticuerpo se disuelve en la muestra, mientras que un segundo anticuerpo se fija a la
20 membrana de LF a corta distancia del primer anticuerpo. La solución de la muestra lleva el primer anticuerpo hasta el segundo por flujo capilar y el complejo inmunológico que se forma durante este flujo es capturado por el segundo anticuerpo formando una línea visible. El exceso del primer anticuerpo marcado es llevado más allá de esta "línea de ensayo" para que reaccione en una línea de control. Esto proporciona una lectura cualitativa.

25 Más recientemente, el formato se ha modificado de tal manera que el segundo anticuerpo, marcado con biotina, sea también soluble, y el complejo en sándwich se forme en solución durante el LF antes de ser capturado en una línea de estreptavidina. El documento US2010/0267166 describe un dispositivo para detectar un analito, que comprende un conjugado marcado que comprende un miembro de unión que ha reaccionado con un primer epítipo del analito y un marcador y un componente de captura biotinilado que tiene un sitio reactivo con un segundo epítipo del analito.

30 Sería ventajoso adaptar más este formato de ensayo, con el fin de aumentar su sensibilidad y proporcionar una lectura numérica cuantitativa de la cantidad de complejo inmune en la segunda línea, conservando mientras la simplicidad y solidez esencial del formato de LF.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, un aparato para el análisis cuantitativo de un analito en una muestra comprende:

- 35 (i) una fase sólida; y
(ii) un detector,

en donde la superficie de la fase sólida comprende:

- (a) una primera posición para aplicación de la muestra; y
(b) una segunda posición distante de la primera posición,

40 en donde una primera molécula que se une al analito y es capaz de liberar una especie detectable está depositada bien sobre la fase sólida o bien se ha añadido a la muestra antes de la aplicación a la fase sólida, y

en donde una segunda molécula que se une al analito está inmovilizada en la segunda posición, y

en donde una enzima está inmovilizada, situada conjuntamente con la molécula inmovilizada en la segunda posición, y

45 en donde el detector está situado muy próximo a la molécula inmovilizada en la segunda posición.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, un método para la detección cuantitativa de moléculas diana en una muestra que contiene el sustrato comprende:

a) disolver una primera molécula de unión marcada soluble que sea capaz de liberar una especie detectable y una segunda molécula de unión marcada soluble en la muestra para formar un complejo;

b) aplicar el complejo formado en la etapa a) a una fase sólida, en la que la superficie de la fase sólida comprende:

- i) una primera posición para la aplicación del complejo; y
- ii) una segunda posición, distante de la primera posición

5 en donde una molécula que se une a la segunda molécula de unión marcada se inmoviliza en la segunda posición, en donde una enzima se inmoviliza situándola conjuntamente con la molécula inmovilizada en la segunda posición y en donde un detector se sitúa muy próximo a la molécula inmovilizada en la segunda posición; y

c) detectar la especie detectable en el detector,

en donde la detección de dicha especie es proporcional al contenido de molécula diana en la muestra.

10 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, el aparato descrito en el primer aspecto de la invención se utiliza en el método para la detección cuantitativa de moléculas diana en una muestra que contiene sustrato de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática ampliada de la tira de ensayo de flujo lateral (LF) electroquímica;

15 La Figura 2 es una representación esquemática ampliada de la reacción electroquímica;

La Figura 3 es una representación gráfica del cambio de pH en función de la reacción enzimática entre ureasa y urea en una solución tampón Tris/HCl 2 mM;

20 La Figura 4 es una representación gráfica del cambio de pH en función de la reacción enzimática entre pirofosfato y pirofosfatasa en una solución con una baja capacidad tamponadora (tampón Tris/HCl 2 mM con adición de $MgCl_2$ 2 mM);

La Figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar el pH local sobre la liberación de un primer marcador encapsulado;

La Figura 6 muestra un efecto similar al de la Figura 5 pero usando ferricianato de potasio como primer marcador en lugar de ácido ferroceno-carboxílico; y

25 La Figura 7 muestra la producción de corriente en función de la liberación de ácido ferroceno-carboxílico a partir de perlas poliméricas en diferentes momentos.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención aborda los objetivos de aumentar la sensibilidad de los ensayos de unión y se describe en detalle con referencia al inmunoensayo de flujo lateral (LF). La invención proporciona una lectura numérica cuantitativa de la cantidad de complejo inmune presente en una muestra, manteniendo al mismo tiempo la simplicidad y solidez del formato de ensayo, por sustitución de la estimación visual de la formación del complejo inmune por una medición electroquímica.

35 Esto se consigue, por ejemplo, marcando una de las dos moléculas de unión, que pueden ser anticuerpos, con partículas que actúan como una fuente de reactivo redox que son detectadas en la línea de ensayo. Sin embargo, también son eficaces otras propuestas y éstas incluyen, aunque sin limitación: colorantes activos encapsulados para la dispersión Raman de resonancia mejorada en la superficie (abreviadamente SERRS, por la expresión en inglés *Surface Enhanced Resonance Raman Scattering*); mezcla encapsulada de una molécula fluorescente y un agente extintor; y sustrato de luciferasa encapsulado para producir emisión de luz en la línea de ensayo. Por tanto, aunque la invención se ilustra con respecto a los ensayos de flujo lateral, el alcance de la invención no está limitado al formato de ensayo de flujo lateral ni a la detección de la interacción anticuerpo-antígeno.

40 De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un aparato para el análisis cuantitativo de un analito en una muestra, que comprende:

- (i) una fase sólida; y
- (ii) un detector,

45 en donde la superficie de la fase sólida comprende:

- (a) una primera posición para aplicación de la muestra; y
- (b) una segunda posición, distante de la primera posición,

en donde una primera molécula que se une al analito y es capaz de liberar una especie detectable está depositada sobre la fase sólida o se ha añadido a la muestra antes de la aplicación a la fase sólida, y

en donde una segunda molécula que se une al analito está inmovilizada en la segunda posición, y

5 en donde una enzima está inmovilizada, situada conjuntamente con la molécula inmovilizada en la segunda posición, y

en donde el detector está situado muy próximo a la molécula inmovilizada en la segunda posición.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "distante de" significa que la segunda posición no está inmediatamente adyacente a la primera posición. Preferiblemente, la segunda posición se encuentra aguas abajo de la primera posición en la dirección del flujo.

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término "muy próximo" significa que el detector debe colocarse lo suficientemente cerca de la molécula inmovilizada en la segunda posición para que sea capaz de detectar cualquier cambio de la corriente o carga que pase por dicha segunda posición. Preferiblemente, el detector está situado lo más cerca posible a la molécula inmovilizada en la segunda posición.

15 La fase sólida puede ser cualquier material o membrana sólido adecuado, tales como superficies porosas y/o no porosas, tales como silicio, óxido de silicio, superficies metálicas y recubiertas de metal, superficies poliméricas y de polisacáridos. Preferiblemente, la fase sólida es una membrana de flujo lateral (LF), que comprende preferiblemente medios cromatógenos, que pueden ser poliméricos o celulósicos, tales como nitrocelulosa o acetato de celulosa hidrófobos.

20 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención proporciona también un método para la detección cuantitativa de moléculas diana en una muestra que contiene el sustrato. El método comprende las siguientes etapas:

a) disolver una primera molécula de unión marcada soluble que sea capaz de liberar una especie detectable y una segunda molécula de unión marcada soluble en la muestra para formar un complejo;

25 b) aplicar el complejo formado en la etapa a) a una fase sólida, en la que la superficie de la fase sólida comprende:

i) una primera posición para la aplicación del complejo; y

ii) una segunda posición distante de la primera posición

30 en donde una molécula que se une a la segunda molécula de unión marcada se inmoviliza en la segunda posición, en la que está inmovilizada una enzima situada conjuntamente con la molécula inmovilizada en la segunda posición, y en donde se coloca un detector muy próximo a la molécula inmovilizada en la segunda posición; y

c) detectar la especie detectable en el detector,

en donde la detección de dicha especie es proporcional al contenido de molécula diana de la muestra.

35 Preferiblemente, la molécula diana es un antígeno y la primera y segunda moléculas de unión marcadas son anticuerpos. En dicha realización, el complejo formado es un complejo inmune.

La etapa (c) puede tener lugar cuando el complejo es transportado a la segunda posición. Dicho transporte se puede realizar por acción capilar, microfluidos o migración electroforética.

El aparato descrito en el primer aspecto de la invención se puede utilizar en el método de detección cuantitativa de moléculas diana en una muestra que contiene el sustrato de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

40 El aparato y el método de la invención se ilustran por las combinaciones de enzima y sustrato que se muestran en la Tabla 1. Sin embargo, muchas otras combinaciones se encuentran también dentro del alcance de la invención y serán evidentes para un experto en la técnica de enzimología.

Tabla 1

Enzima	Sustrato
Ureasa	Urea

Enzima	Sustrato
Glucosa-oxidasa	Glucosa
Pirofosfatasa	Pirofosfato
Fosfatasa alcalina	Fenilfosfato
β -Lactamasa	Penicilina

El método utiliza la presencia de sustrato en la muestra para cambiar el pH local en la línea de ensayo por la deposición conjunta de una enzima correspondiente inmovilizada en la segunda posición. Como entenderán los expertos en la técnica, el término "enzima correspondiente" se refiere a una entidad que cataliza la reacción química con un sustrato dado. Ejemplos de composiciones de los complejos inmunes que se aplican a la membrana en fase sólida y la línea de ensayo (es decir, la segunda posición) se ilustran esquemáticamente en la Figura 1.

El primer marcador que es capaz de liberar una especie detectable es preferiblemente una sonda redox y se encapsula preferiblemente en un polímero. El polímero puede ser un material de revestimiento entérico que se disuelve cuando se somete a un cambio de pH, típicamente en condiciones alcalinas o, alternativamente, puede ser un polímero "inteligente" sensible a estímulos que se hincha en respuesta a un cambio de pH.

Los polímeros entéricos adecuados incluyen poli(acetato-ftalato de vinilo), ftalato de hidroxipropil-metilcelulosa, ácido metacrílico, acetato-trimetilato de celulosa, carboximetil-etilcelulosa y acetato-succinato de hidroxipropil-metilcelulosa.

Los polímeros "inteligentes" sensibles al pH adecuados incluyen poli(ácido propilacrílico) y quitosano.

Las sondas redox adecuadas experimentan un intercambio de electrones rápido, preferiblemente de difusión limitada, en el detector e incluyen complejos de hierro, osmio, cobre y rutenio, así como moléculas orgánicas, tales como flavinas, y colorantes. Ejemplos específicos incluyen, aunque sin limitación: ferroceno y sus derivados; complejos de hierro, tal como hexacianuro; complejos de rutenio, tal como hexamina; complejos de osmio, tal como tris(bipiridilo); colorantes de tiazina; colorantes de fenazina; riboflavina y sus derivados; y tetratiafulvaleno y sus derivados. Ejemplos adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica.

La segunda molécula de unión se marca preferiblemente con biotina y la molécula que se une a ella, y que se inmoviliza en la segunda posición, es preferiblemente avidina o estreptavidina.

El detector situado muy próximo a la molécula inmovilizada en la segunda posición se coloca preferiblemente por debajo de la línea de ensayo (es decir, en o por debajo de la segunda posición sobre la membrana de LF). El detector es preferiblemente un electrodo y preferiblemente un electrodo serigrafiado. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con el término "electrodo serigrafiado". Sin embargo, para evitar dudas, se define como una película conductora de tinta de carbono o pasta de metal depositada sobre un soporte inerte, tal como PVC, cerámica, y alúmina o poliéster, y que incorpora el electrodo de referencia y el contraelectrodo. El electrodo está preparado preferiblemente a un potencial en el que haya una reducción limitada de difusión de la sonda redox y una corriente de fondo mínima desde la muestra. El detector debe estar colocado suficientemente próximo a la molécula inmovilizada en la segunda posición (es decir, la línea de ensayo) para que sea capaz de detectar el cambio de corriente o carga que pasa.

El aparato y el método de la invención se pueden usar para el análisis cuantitativo *in vitro* de muchos analitos, incluyendo antígenos, anticuerpos, otras proteínas y los productos de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. La muestra de ensayo se puede seleccionar del grupo siguiente no limitativo de muestras corporales obtenidas de un sujeto o paciente: orina; saliva; suero; plasma; sangre completa; heces; y exudados (por ejemplo, de heridas o lesiones). Alternativamente, la muestra puede ser un material no clínico, tal como tierra, aire, agua o materia alimentaria.

El aparato y el método de la invención se pueden utilizar como herramienta para ayudar al diagnóstico y tratamiento de un paciente. Por ejemplo, el ensayo se puede usar para identificar, confirmar o descartar una enfermedad en pacientes sintomáticos, o para prescribir con precisión fármacos terapéuticos y para controlar el tratamiento, por ejemplo, para controlar los niveles de azúcar en sangre en pacientes diabéticos o para determinar un embarazo. Otros usos incluyen también en epidemiología, en donde se puede utilizar el ensayo rápido para detectar y controlar la incidencia o prevalencia de una enfermedad para la detección y evaluación de programas sanitarios, así como en la selección para determinar la prevalencia de una enfermedad en individuos asintomáticos.

Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un caballo, un perro, un gato, una rata y un ratón) y un primate (por ejemplo, un mono y un ser humano) y preferiblemente un ser humano.

5 Como ejemplo, los autores de la presente invención ilustran una realización de la invención, tal como un inmunoensayo de flujo lateral, en el que la primera y segunda moléculas de unión son anticuerpos, el analito diana es un antígeno y la fase sólida es una membrana de flujo lateral.

10 Después de la adición de la muestra que contiene el sustrato, los dos anticuerpos se disuelven y forman el complejo inmune que es llevado por el flujo lateral a la línea de ensayo. El complejo inmune se desplaza con el frente del líquido y es capturado en la línea de ensayo por la reacción entre el componente de biotina del complejo inmune y la avidina/estreptavidina presente en la línea de ensayo. Una vez que el sustrato llega a la línea de ensayo se produce un cambio local en el pH debido a la conversión del sustrato dentro de la muestra de ensayo. Esto puede ser un cambio hasta un entorno más ácido (es decir, una disminución del pH) o hasta un entorno más alcalino (es decir, un aumento del pH) dependiendo de la enzima específica utilizada.

15 La reacción electroquímica ampliada que tiene lugar en la línea de ensayo se ilustra esquemáticamente en la Figura 2.

20 En una realización, la muestra que contiene el sustrato es preferiblemente orina y por tanto la enzima correspondiente es preferiblemente ureasa. La concentración de urea en la orina es alrededor de 10-20 veces el valor de K_m de la ureasa; por tanto, la enzima estará actuando a su velocidad máxima. El cambio de pH da como resultado que la sonda redox experimente una reducción y liberación de la especie redox, que se detecta a partir de la corriente (o carga que pasa) en el electrodo subyacente. La corriente resultante de la especie redox liberada es proporcional al contenido de antígeno de la muestra. Por tanto, midiendo la corriente (o carga que pasa) en el electrodo, se puede determinar cuantitativamente el contenido de antígeno de la muestra. La Figura 3 ilustra el cambio de pH en función de la reacción enzimática entre ureasa y urea en una solución con una baja capacidad tamponadora (tampón Tris/HCl 2 mM).

25 Alternativamente, la muestra que contiene el sustrato puede ser pirofosfato y la enzima correspondiente es por tanto preferiblemente pirofosfatasa. La Figura 4 ilustra el cambio de pH en función de la reacción enzimática entre pirofosfato y pirofosfatasa en una solución con una baja capacidad tamponadora (tampón Tris/HCl 2 mM con adición de $MgCl_2$ 2 mM).

30 El efecto del aumento del pH local sobre la liberación del primer marcador encapsulado (una sonda redox, específicamente un derivado de ferroceno) se ilustra en la Figura 5. Este gráfico muestra la determinación espectrofotométrica de la liberación de ácido ferroceno-carboxílico a partir de perlas poliméricas en función del tiempo, a un pH alcalino de 9. Como puede verse a partir de los valores de control, cuando el pH se mantiene a un pH ligeramente ácido de 5 el polímero no se disuelve y no se produce aumento de la absorbancia.

35 La Figura 6 ilustra un efecto similar, sin embargo en este experimento la sonda redox es ferricianato de potasio. El gráfico muestra la determinación espectrofotométrica de la liberación de la sonda encapsulada a partir de perlas poliméricas en función del tiempo, a un pH alcalino de 9. Como se puede ver a partir de los valores de control, cuando el pH se mantiene a un pH ligeramente ácido de 5 el polímero no se disuelve y no se produce aumento de la absorbancia.

40 La Figura 7 ilustra la producción de corriente en función de la liberación de ácido ferroceno-carboxílico a partir de perlas poliméricas en diferentes momentos y a un pH alcalino de 9 y un pH de control ligeramente ácido de 5. El gráfico muestra que a pH 9 se liberaron más moléculas electro-activas de las perlas de polímero en función de la disolución de polímero a pH elevado. Esta liberación se refleja en el aumento de la corriente detectada. No se observó aumento de corriente a pH 5.

REIVINDICACIONES

1. Aparato para el análisis cuantitativo de un analito en una muestra, que comprende:
 - (i) una fase sólida; y
 - (ii) un detector,
- 5 en donde la superficie de la fase sólida comprende:
 - (a) una primera posición para aplicación de la muestra; y
 - (b) una segunda posición distante de la primera posición,

en donde una primera molécula que se une al analito y es capaz de liberar una especie detectable está depositada bien en la primera posición o bien se ha añadido a la muestra antes de la aplicación a la fase sólida, y

- 10 en donde una segunda molécula que se une al analito está inmovilizada en la segunda posición, y

en donde una enzima está inmovilizada, situada conjuntamente con la molécula inmovilizada en la segunda posición, y

en donde el detector está situado muy próximo a la molécula inmovilizada en la segunda posición,

en donde un sustrato para la enzima está bien normalmente presente en la muestra, bien se ha añadido a la muestra antes de la aplicación a la fase sólida o bien ha sido depositada en la primera posición sobre la fase sólida antes de la aplicación, y
- 15 en donde la interacción entre la enzima y el sustrato da como resultado la liberación de una especie detectable de la primera molécula.
2. Aparato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además medios para convertir la detección de dicha especie por el detector en un valor de concentración de analito en la muestra.
- 20 3. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el detector es un electrodo y la especie detectable es una especie redox encapsulada.
4. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enzima es ureasa y el sustrato es urea.
- 25 5. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fase sólida es una membrana de flujo lateral.
6. Un método para la detección cuantitativa de moléculas diana en una muestra que contiene un sustrato, que comprende:
 - a) disolver una primera molécula de unión marcada soluble que sea capaz de liberar una especie detectable y una segunda molécula de unión marcada soluble en la muestra para formar un complejo;
 - 30 b) aplicar el complejo formado en la etapa a) a una fase sólida, en la que la superficie comprende:
 - i) una primera posición para la aplicación del complejo; y
 - ii) una segunda posición, distante de la primera posición

en donde una molécula que se une a la segunda molécula de unión se inmoviliza en la segunda posición, en la que está inmovilizada una enzima situada conjuntamente con la molécula inmovilizada en la segunda posición, y en donde se coloca un detector muy próximo a la molécula inmovilizada en la segunda posición; y

 - 35 c) detectar la especie detectable en el detector a medida que el complejo es transportado a la segunda posición,

donde la detección de dicha especie es proporcional al contenido de molécula diana de la muestra.
- 40 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la molécula diana es un antígeno.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde la primera y/o segunda moléculas de unión son anticuerpos, preferiblemente en donde el primer anticuerpo está marcado con una sonda redox encapsulada y preferiblemente en donde el segundo anticuerpo está marcado con biotina y la molécula que se une a él y se inmoviliza en la segunda posición es avidina.

9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la etapa (c) comprende detectar el cambio de corriente o carga que pasa por el detector debido al cambio del pH local y la liberación resultante de la sonda redox, preferiblemente en donde la corriente resultante de la oxidación o reducción de la sonda redox es proporcional al contenido de antígeno de la muestra.
- 5 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde el detector es un electrodo, preferiblemente en donde el electrodo es un electrodo serigrafiado.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde la sonda redox está encapsulada en un polímero.
- 10 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el polímero es un recubrimiento entérico que se disuelve en condiciones alcalinas.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el polímero se hincha en condiciones ácidas o alcalinas.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en donde la muestra es una muestra que contiene urea y preferiblemente en donde la enzima es ureasa.
- 15 15. Uso de un aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14.

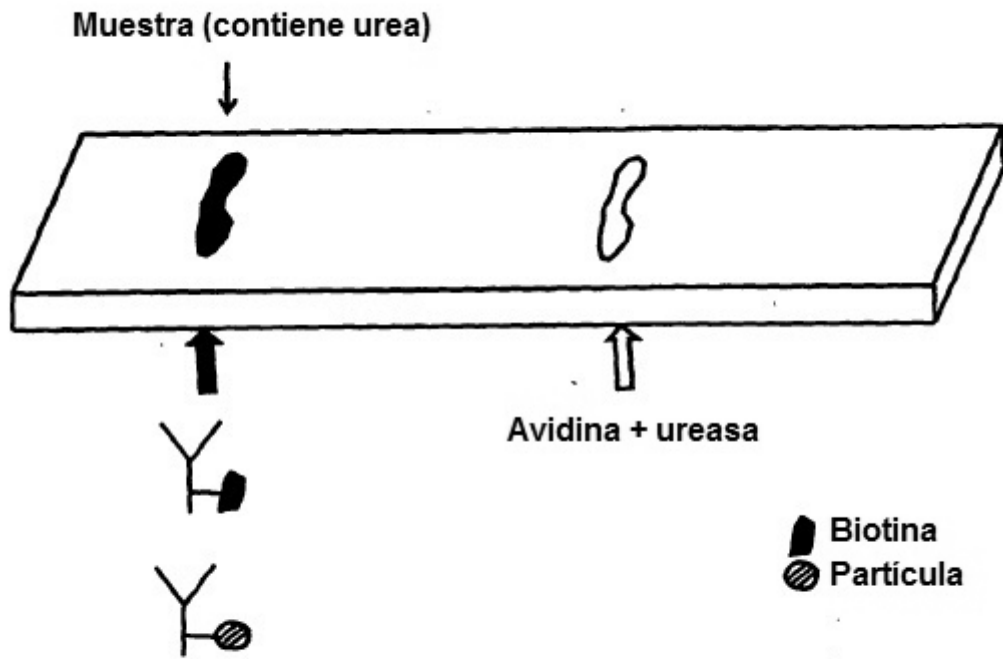


FIGURA 1

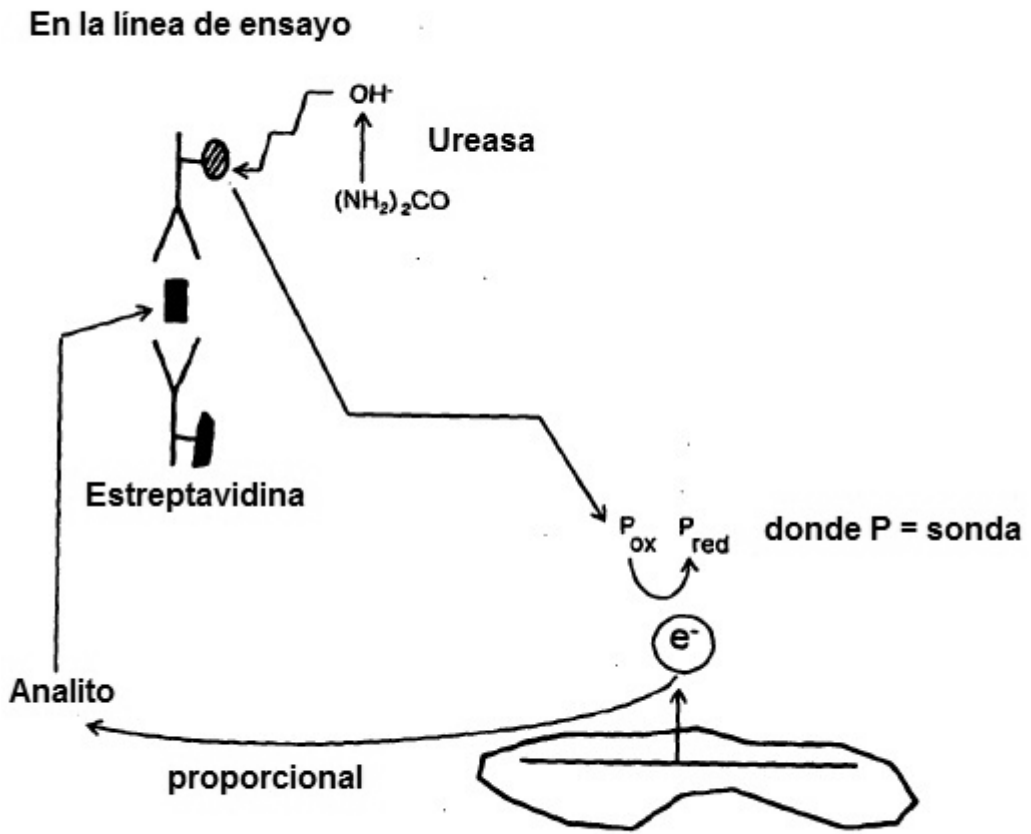


FIGURA 2

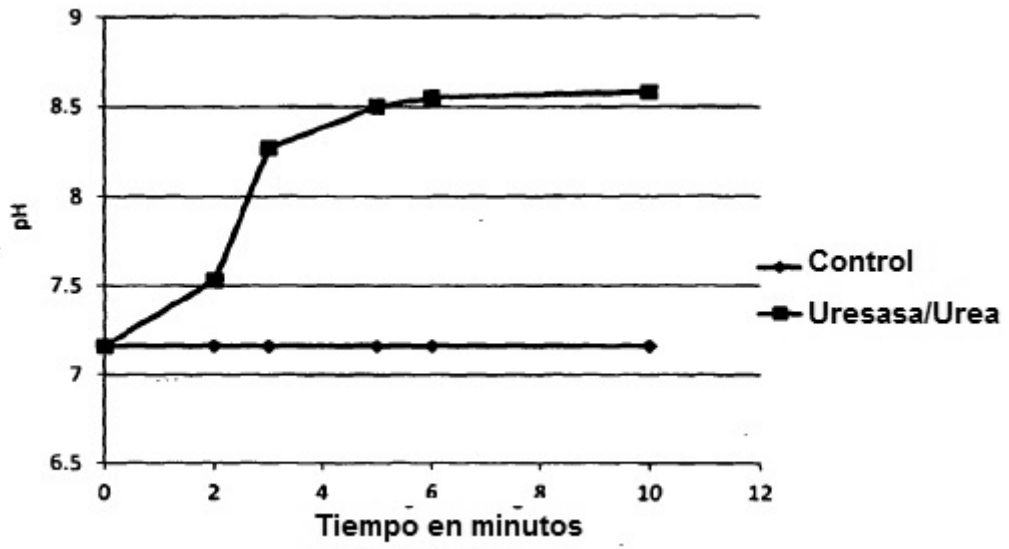


FIGURA 3

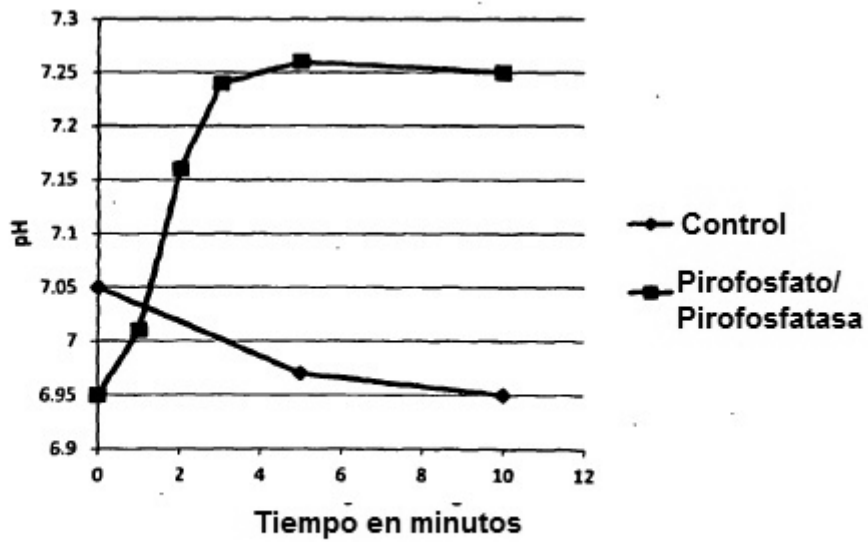


FIGURA 4

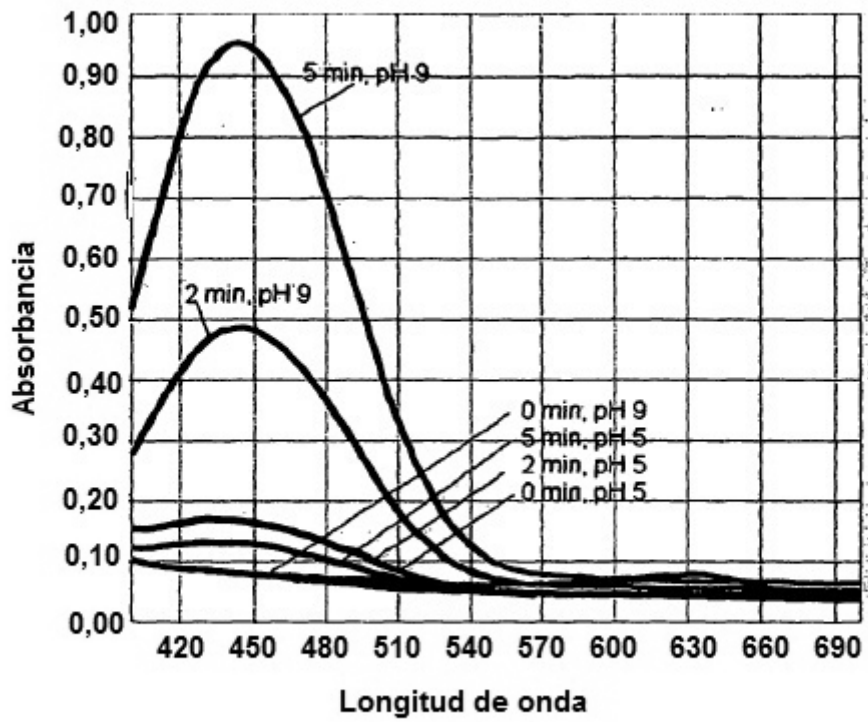


FIGURA 5

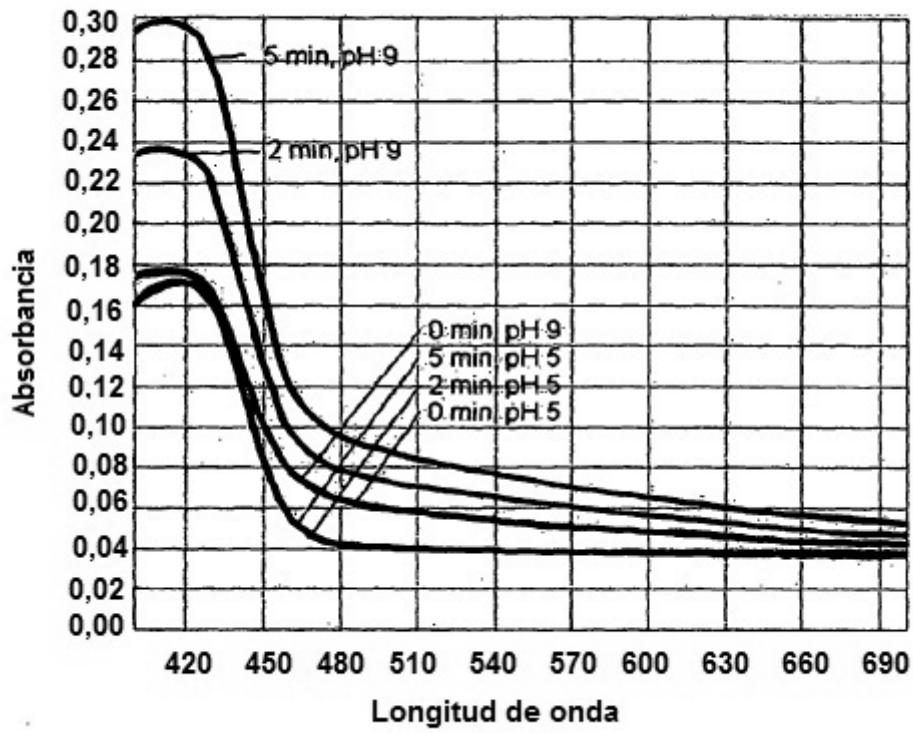


FIGURA 6

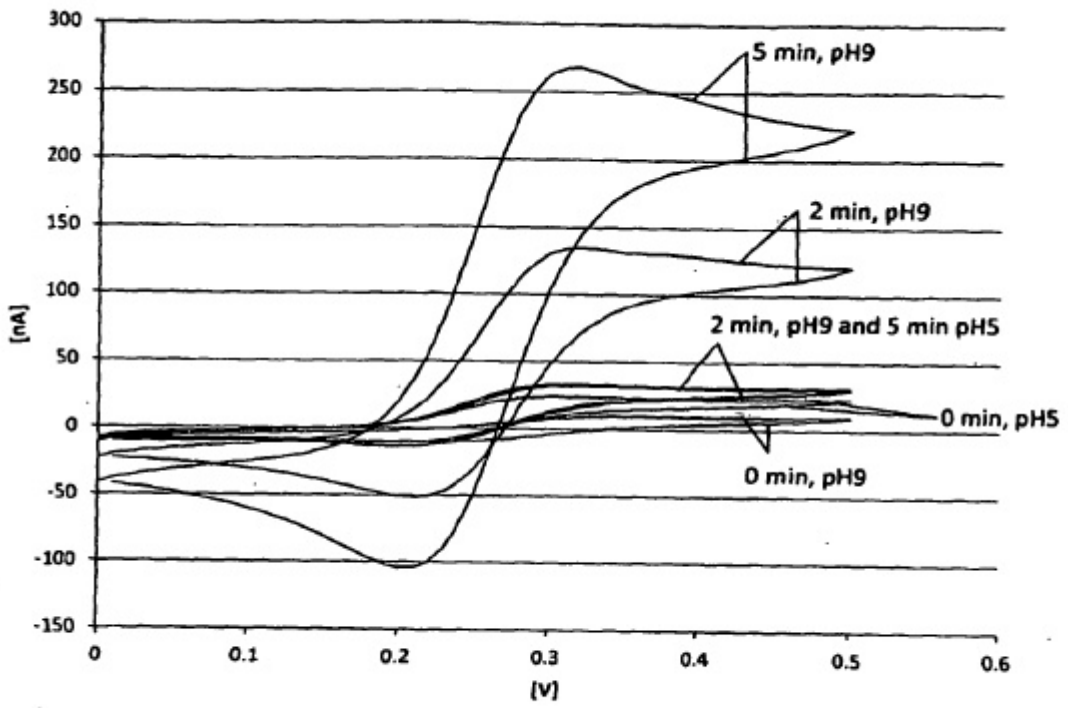


FIGURA 7