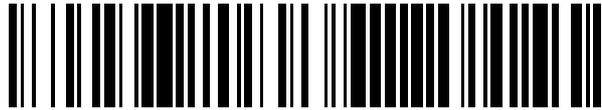


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 787**

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: **19.03.2013 E 13720436 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2828661**

54 Título: **Dispositivo para la determinación de por lo menos un analito susceptible de estar contenido en una muestra líquida**

30 Prioridad:

19.03.2012 US 201261612564 P

24.10.2012 FR 1260120

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

10.06.2016

73 Titular/es:

STANKOV, MILOVAN (100.0%)

**15 avenue de la Prairie Domaine de Carheil
44630 Plesse, FR**

72 Inventor/es:

STANKOV, MILOVAN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 573 787 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para la determinación de por lo menos un analito susceptible de estar contenido en una muestra líquida

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo para la determinación de por lo menos un analito susceptible de estar contenido en una muestra líquida.

10 La invención se refiere en particular a los dispositivos que utilizan una técnica inmunocromatográfica mediante migración lateral.

Técnica anterior

15 La mayoría de las técnicas para la determinación de analito(s) han evolucionado progresivamente hacia unos dispositivos cada vez más fáciles de usar, que permiten el desarrollo de métodos de diagnóstico de rutina, rápidos y de un coste moderado.

20 Esta evolución ha sido particularmente perceptible en el campo médico, con la emergencia del diagnóstico por "point of care" o "home testing", en el que un diagnóstico se realiza directamente cerca de la cama del paciente o en su domicilio, sin que sea necesario utilizar técnicas automatizadas de laboratorio de análisis.

Los inmunoensayos forman parte de las tecnologías utilizadas para este tipo de diagnóstico rápido.

25 Estos inmunoensayos agrupan los dispositivos y métodos de diagnóstico basados en reacciones de uniones por afinidad entre miembros de pares de uniones específicas.

Globalmente, estos inmunoensayos están divididos en dos grandes enfoques bien conocidos.

30 En el enfoque denominado "competición" el analito buscado y un reactivo de detección marcado están en competición para unirse específicamente a un reactivo de captura. La presencia o la ausencia del analito buscado en la muestra se miden, respectivamente, por la ausencia o por la presencia de una señal visible (o medible) a nivel del reactivo de captura.

35 En el enfoque denominado "sándwich", un reactivo de detección marcado se une al analito buscado, siendo este último inmovilizado sobre el soporte sólido por medio del reactivo de captura. La presencia o ausencia del analito en la muestra líquida se miden, respectivamente, por la presencia o por la ausencia de una señal visible (o medible) a nivel del reactivo de captura.

40 Entre estos inmunoensayos, se conocen unos dispositivos denominados "inmunocromatográficos" que se prestan particularmente a ciertos analitos.

La inmunocromatografía consiste en un método de diagnóstico en fase sólida, que utiliza la química seca y la migración lateral sobre una membrana inerte.

45 Este tipo de inmunoensayo utiliza un soporte poroso en forma de tira, en y/o sobre el cual se integran en forma seca los reactivos necesarios para la realización de la prueba.

50 El soporte poroso se trata de manera que una reacción de reconocimiento entre pares de unión específica (generalmente antígeno/anticuerpo) se produzca a nivel de una zona de captura y pueda ser revelada a este nivel.

En la práctica, cuando la muestra líquida a analizar se deposita sobre el soporte, ésta migra a lo largo de la membrana por un fenómeno de capilaridad. El analito buscado es generalmente capturado por un reactivo de captura específico inmovilizado sobre una zona determinada de la membrana.

55 La reacción se revela mediante un reactivo de detección específico marcado, según el principio del método sándwich.

60 Es posible asimismo utilizar una reacción de tipo competición. Se utiliza en este caso, generalmente, un reactivo de detección que consiste en un analito marcado que es competidor del analito buscado para la unión específica con el reactivo de captura inmovilizado.

65 Estos dispositivos inmunocromatográficos están generalmente adaptados para un uso único y doméstico. En efecto, son de uso fácil y rápido, requiriendo muy poca manipulación ya que todos los reactivos están integrados o comprendidos en el dispositivo.

Sin embargo, en algunas situaciones particulares, estos dispositivos inmunocromatográficos son susceptibles de dar unos resultados que no son totalmente fiables.

5 Por un lado, en la determinación de un analito por un ensayo en formato "sándwich" se observa para algunos analitos un efecto denominado de "gancho" (designado también por "hook effect" en inglés).

El efecto de gancho es un efecto indeseable bien conocido en los ensayos inmunológicos. Se produce cuando el analito está presente en la muestra a una concentración muy elevada.

10 El efecto de gancho puede entonces conducir a falsos negativos, lo cual lleva a concluir de manera aberrante la ausencia o una baja concentración del analito en la muestra.

Los analitos que presentan un efecto de gancho en dosificaciones inmunológicas de tipo sándwich generan unas curvas señal/concentración de tipo curva de Gauss.

15 Para una señal dada, son posibles entonces dos concentraciones para el analito buscado, una baja y la otra elevada, cuando tiene lugar la lectura del resultado en un tiempo definido.

20 Un ensayo por competición permite la obtención de dos señales diferentes para dos concentraciones respectivamente diferentes del analito a ensayar.

Sin embargo, los ensayos por competición muestran también muy rápidamente sus límites, ya que existe una extinción de la señal a concentraciones relativamente poco elevadas del analito de interés.

25 Una solución comúnmente adoptada para remediar los inconvenientes de estos ensayos de sándwich y de competición consiste en analizar el analito a partir de un intervalo de dilución de la muestra líquida.

30 Sin embargo, la utilización de un intervalo de dilución de este tipo no es conveniente para un uso doméstico. Además, la utilización de un intervalo de dilución de la muestra necesita unas manipulaciones suplementarias y un consumo incrementado de dispositivos de ensayo de uso único, ya que cada muestra se ensaya a diferentes diluciones.

35 Una solución para este efecto está, por ejemplo, descrita en el documento WO 2007/023372, que se refiere a un dispositivo de determinación de un analito en una muestra líquida, que comprende un medio de difusión capilar en el que se materializan:

a) una zona de depósito o recepción de la muestra;

40 b) una zona aguas arriba de liberación que comprende un reactivo de detección específico del analito conjugado con un marcador visible y/o medible, libre de migrar por difusión capilar en estado húmedo en el medio de difusión capilar; y

45 c) dos zonas aguas abajo de captura que comprenden, sucesivamente en la dirección de difusión capilar, por un lado, un reactivo de captura específico del analito y, por otro lado, el analito, o un análogo del analito, inmovilizado.

50 El reactivo de detección y el reactivo de captura, específicos del analito, permiten la determinación del analito en la muestra líquida mediante un ensayo sándwich; este mismo reactivo de detección específico del analito y el analito, o el análogo del analito, inmovilizado, permiten a continuación la determinación del analito de interés en la muestra líquida mediante un ensayo de competición.

En un dispositivo de este tipo, el reactivo de detección se deposita en exceso a nivel de una única zona de liberación que está dispuesta aguas arriba de las zonas de captura complementarias.

55 A pesar de su interés, los inventores han constatado que este exceso de reactivo de detección aguas arriba de las zonas de captura no es satisfactorio, en el sentido en el que es frecuente observar unas reacciones no específicas, un ruido de fondo pronunciado y unos problemas de migración.

60 Por otro lado, ciertos dispositivos inmunocromatográficos están estructurados para la determinación simultánea de varios analitos.

Un dispositivo inmunocromatográfico de este tipo, por ejemplo descrito en el documento EP 1 657 550, comprende ventajosamente un medio de difusión capilar en el que están materializados:

65 a) una zona de depósito o recepción de la muestra;

b) una zona aguas arriba de liberación que comprende una mezcla de reactivos de detección específicos, cada uno de uno de los analitos, conjugados con un marcador visible y/o medible, libres de migrar por difusión capilar en estado húmedo en el medio de difusión capilar; y

5 c) unas zonas aguas abajo de captura que comprenden cada una un reactivo de captura que es específico de uno de los analitos, estando dichas zonas de captura aguas abajo repartidas sucesivamente según el sentido de migración.

10 De nuevo, los reactivos de detección se depositan a nivel de la zona de liberación única que está materializada aguas arriba de las zonas de captura, teniendo en cuenta el sentido de migración capilar.

Ahora bien, los inventores han constatado de nuevo que esta mezcla de los reactivos de detección, aguas arriba de las diferentes zonas de captura, no es satisfactoria debido a reacciones cruzadas entre los diferentes reactivos de detección, y también de inhibición de la actividad específica mutua entre los reactivos.

15 Los dispositivos inmunocromatográficos que comprenden una zona de liberación del o de los reactivos de detección, que está dispuesta aguas arriba de una pluralidad de zonas de captura, no son así satisfactorios.

20 Existe por lo tanto una necesidad de nuevos dispositivos de determinación de difusión capilar, tanto para la determinación de un único analito como para la determinación de varios analitos, que permiten paliar los problemas generados en particular por el exceso y/o la mezcla de reactivo(s) de detección añadido(s) aguas arriba de una pluralidad de zonas de captura sucesivas.

25 Descripción de la invención

La presente invención se refiere así a un dispositivo para la determinación de la presencia y/o de la cantidad de por lo menos un analito susceptible de estar contenido en una muestra líquida, que comprende un medio de difusión capilar en el cual dicha muestra líquida está destinada a migrar lateralmente según una dirección y un sentido de migración capilar, tal como se define en las reivindicaciones.

30 Se materializan diferentes zonas en este medio de difusión capilar, en dicho sentido de migración capilar de aguas arriba hacia aguas abajo, a saber por lo menos:

- 35 - una zona de depósito de la muestra líquida,
- una zona aguas arriba de liberación que comprende por lo menos un reactivo de detección conjugado con un marcador visible y/o medible, siendo dicho reactivo de detección apto para desplazarse como consecuencia de la migración de la muestra líquida en dicho medio de difusión capilar, y
- 40 - por lo menos dos zonas de captura que comprenden cada una por lo menos un reactivo de captura, inmovilizado sobre dicho medio de difusión capilar.

45 Este dispositivo comprende también por lo menos una zona aguas abajo de liberación que está materializada sobre dicho medio de difusión capilar y que se sitúa aguas abajo de una por lo menos de dichas zonas de captura.

Esta zona aguas abajo de liberación comprende también por lo menos un reactivo de detección conjugado con un marcador visible y/o medible, siendo dicho reactivo de detección apto para desplazarse como consecuencia de la migración de la muestra líquida en el medio de difusión capilar.

50 El reactivo de detección de una zona de liberación y/o el reactivo de captura de la o de las zonas de captura complementarias, situadas directamente aguas abajo de dicha zona de liberación, son entonces aptos para unirse específicamente con dicho analito y/o unirse específicamente el uno con el otro, para formar un complejo que permita la determinación de dicho analito en dicha muestra líquida a nivel de dicha o de dichas zonas de captura complementarias.

55 La o las zonas aguas abajo de liberación están cada una intercalada entre dos zonas de captura.

60 De manera general, dicha disposición tiene en particular el interés de permitir una adaptación del reactivo de detección de una zona de liberación, en cantidad y/o en especificidad, en función del reactivo de captura que constituye la o las zonas de captura situadas directamente aguas abajo de dicha zona de liberación.

Otras características ventajosas, que pueden ser tomadas en combinación o independientemente las unas de las otras, se desarrollan a continuación:

- 65 - un grupo aguas arriba de zonas comprende una zona de captura aguas arriba situada directamente aguas abajo de la zona de liberación aguas arriba, ventajosamente adaptada para un ensayo en formato sándwich,

estando dicho grupo aguas arriba de zonas seguido a su vez de uno o varios grupos de zonas que comprenden cada uno una zona de liberación y una o varias zonas de captura complementarias; esta característica permite optimizar la concentración y la especificidad del o de los grupos de zonas aguas abajo en función de los umbrales de detección del o de los analitos a determinar.

5 Para la determinación de un único analito, el o los reactivos de detección de las zonas de liberación y/o el o los reactivos de captura de las zonas de captura son ventajosamente aptos para unirse específicamente con dicho analito.

10 En este caso, las zonas de liberación comprenden preferentemente uno o unos reactivos de detección idénticos entre sí, y las zonas de capturas comprenden preferentemente uno o unos reactivos de captura idénticos entre sí.

Incluso en este caso, el medio de difusión capilar comprende ventajosamente:

- 15
- la zona aguas arriba de liberación,
 - una primera zona de captura o dos primeras zonas de captura, complementaria(s) de dicha zona aguas arriba de liberación, y después o bien
- 20
- una zona aguas abajo de liberación, y
 - por lo menos dos segundas zonas de captura, complementarias de dicha zona aguas abajo de liberación, o bien por lo menos dos pares sucesivos de zonas que comprenden cada una:
- 25
- una zona de liberación, y
 - por lo menos una zona de captura, complementaria de dicha zona de liberación asociada.

30 Para la detección de por lo menos dos analitos, los reactivos de detección de una zona de liberación y/o el reactivo de captura de la o de las zonas de captura complementarias, inmediatamente aguas abajo de dicha zona de liberación, son ventajosamente aptos para unirse específicamente con uno de dichos analitos.

Según también otras características ventajosas, que pueden ser tomadas en combinación o independientemente las unas de las otras:

- 35
- la o las zonas aguas abajo de liberación materializadas sobre el medio de difusión capilar, cada una intercalada entre dos zonas de captura, están en número de 1 a 4, por ejemplo en número de 2 para un formato de soporte capilar estándar de 25 mm;
- 40
- la o las zonas de captura materializadas sobre el medio de difusión capilar, complementarias de una de las zonas de liberación situada directamente aguas arriba, están en número de 1 a 10, preferentemente en número de 5 para un formato de soporte capilar estándar de 25 mm;
- 45
- el reactivo de detección de una por lo menos de las zonas de liberación y el reactivo de captura de la o de una de zonas de captura complementarias son aptos para unirse específicamente con el analito o uno por lo menos de los analitos, para constituir un ensayo en formato sándwich;
- 50
- el reactivo de detección de una por lo menos de las zonas de liberación y el reactivo de captura de la o de una por lo menos de las zonas de captura complementarias consisten, uno, en un análogo del analito a determinar y, el otro, en un reactivo apto para unirse específicamente con dicho analito o con dicho análogo del analito, para constituir un ensayo en formato competición;
- 55
- la zona de depósito de la muestra líquida (i) se fusiona con la zona aguas arriba de liberación o (ii) se sitúa aguas arriba de la zona aguas arriba de liberación.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para la determinación cuantitativa de un analito en una muestra líquida depositada en un dispositivo de determinación; este procedimiento comprende las etapas sucesivas siguientes:

- 60
- una etapa de medición de la intensidad de la señal a nivel de cada zona de captura,
 - en cada grupo de zonas, una etapa de adición de dichas intensidades medidas,
- 65
- una etapa de cálculo de una relación de intensidad que corresponde a las intensidades añadidas para un grupo de zonas con respecto a las intensidades añadidas para otro grupo de zonas, y

- una etapa de asociación de dicha relación de intensidad calculada a un valor cuantitativo del analito en dicha muestra líquida teniendo en cuenta una curva patrón que corresponde a la relación de intensidad calculada en función de una cantidad de analito en dicha muestra líquida.

5 **Figuras**

La presente invención se ilustrará también, sin estar de ninguna manera limitada, por la descripción siguiente de diferentes dispositivos de acuerdo con la invención, en relación con los dibujos adjuntos, en los que:

- 10 - la figura 1 representa, de manera esquemática, un primer dispositivo según la invención para la determinación de un único analito, que comprende dos grupos de zonas compuestos cada uno por una zona de liberación y por una zona de captura;
- 15 - la figura 2 representa, también de manera esquemática, un segundo dispositivo según la invención, para la determinación de un único analito que comprende un primer grupo de zonas compuesto por una zona de liberación y por una zona de captura, y después un segundo grupo de zonas compuesto por una zona de liberación seguida de varias zonas de captura;
- 20 - la figura 3 ilustra, también de manera esquemática, un tercer dispositivo según la invención para la determinación de un único analito, que comprende varios grupos de zonas compuestos por una zona de liberación y por una zona de captura;
- 25 - la figura 4 muestra, también de manera esquemática, un cuarto dispositivo según la invención para la determinación de dos analitos, que comprende dos grupos de zonas compuestos cada uno por una zona de liberación y por una zona de captura, dedicadas cada una a uno de dichos analitos;
- 30 - la figura 5 representa, todavía de manera esquemática, un quinto dispositivo según la invención para la determinación de varios analitos, que comprende varios grupos de zonas compuestos cada uno por una zona de liberación y por dos zonas de captura, dedicadas cada una a uno de los analitos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere así a un dispositivo para la determinación de por lo menos un analito susceptible de estar contenido en una muestra líquida.

La estructura general de este dispositivo según la invención se ilustra muy esquemáticamente a través de los diversos modos de realización representados en las figuras 1 a 5 antes citadas.

De manera general, las referencias numéricas empleadas se conservan para designar los elementos estructurales idénticos o similares durante la descripción de los diferentes modos de realización.

Tal como se representa en las figuras 1 a 5, cada dispositivo 1 comprende un medio de difusión capilar 2 en el que dicha muestra líquida (no representada) está destinada a ser depositada y después a migrar lateralmente según una dirección y un sentido de migración capilar aguas arriba hacia aguas abajo.

La dirección y el sentido de migración se ilustran esquemáticamente mediante la flecha designada por la referencia A en la figura 1.

De manera general, los conceptos de "aguas arriba y "aguas abajo" se refieren a esta dirección y a este sentido de migración de la muestra líquida en la longitud del medio de difusión capilar 2.

Se materializan diferentes zonas sucesivas en este medio de difusión capilar 2, en dicho sentido de migración capilar aguas arriba hacia aguas abajo A, a saber por lo menos:

- 55 - una zona 3 para el depósito de la muestra líquida,
- una zona aguas arriba de liberación 4 que comprende por lo menos un reactivo de detección conjugado con un marcador visible y/o medible, siendo dicho reactivo de detección apto para desplazarse como consecuencia de la migración de la muestra líquida en dicho medio de difusión capilar 2, y
- 60 - por lo menos dos zonas de captura 5 que comprenden cada una por lo menos un reactivo de captura, inmovilizado sobre dicho medio de difusión capilar.

Según la invención, este dispositivo 1 comprende también por lo menos una zona suplementaria de liberación 6, que se materializa sobre dicho medio de difusión capilar 2 y que se sitúa aguas abajo de una por lo menos de dichas zonas de captura 5.

Esta zona suplementaria de liberación 6, aguas abajo, comprende también por lo menos un reactivo de detección conjugado con un marcador visible y/o medible, siendo dicho reactivo de detección apto para desplazarse como consecuencia de la migración de la muestra líquida en el medio de difusión capilar.

5 El medio de difusión capilar 2 comprende así varios grupos sucesivos de zonas 7 que se componen cada uno por lo menos por dos zonas sucesivas:

- 10 - una zona de liberación 4 o 6, aguas arriba, y
- una o varias zonas de captura 5, denominada "complementaria" situadas directamente aguas abajo de dicha zona de liberación 4, 6 asociada.

15 El reactivo de detección de una zona de liberación 4, 6 y/o el reactivo de captura de la o de las zonas de captura complementarias 5 se seleccionan para unirse específicamente con dicho analito y/o unirse específicamente el uno con el otro.

20 Este enfoque asegura la formación de complejo(s) que permite(n) la determinación de dicho analito en dicha muestra líquida a nivel de dicha o dichas zonas de captura complementarias 5.

Los reactivos de detección y de captura de cada grupo de zonas 7 se seleccionan en particular mediante la realización de ensayos inmunológicos en formato sándwich y/o en formato competición.

25 La presencia de zona(s) adicional(es) de liberación 6 permite así una distribución óptima del o de los reactivos de detección dentro de cada grupo de zonas 7, que pueden entonces estar dispuestas con respecto a las diferentes zonas de captura 5 asociadas.

30 El reactivo de detección dentro de cada zona de liberación 4, 6 se puede ajustar así, en cantidad y en especificidad, con respecto a la o a las zonas de captura 5 complementarias, situadas directamente aguas abajo.

De manera general, el dispositivo según la presente invención permite la determinación de analito(s) tanto muy poco concentrado(s) como muy altamente concentrado(s), en una muestra líquida sin obtener resultados falsos positivos o falsos negativos.

35 Además, el dispositivo según la presente invención puede estar estructurado para la dosificación semi-cuantitativa de un analito o de varios analitos en una muestra líquida.

40 El dispositivo según la invención está particularmente adaptado para el análisis de analitos que presentan un efecto de gancho importante, como la hormona del embarazo (hCG), el antígeno prostático específico (PSA o "Prostate-Specific Antigen") y la hemoglobina (por ejemplo para una detección de hemoglobina en las heces, denominado también ensayo "FOB" por "Fecal Occult Blood").

Las otras ventajas de la invención, relacionadas con la presencia de varias zonas de liberación, son en particular:

- 45 - una optimización de los reactivos de detección y de los reactivos de captura en función de las concentraciones diana a detectar,
- un grado de precisión más elevado.

50 Como consecuencia de los dos puntos anteriores, se obtiene un aumento de la sensibilidad y de la especificidad del dispositivo de determinación, así como del valor de interpretación de la señal visible y medible.

Los diferentes aspectos de la presente invención se presentan más en detalle a continuación.

55 Analito(s) y muestra líquida

Por "analito" se entiende cualquier entidad química, bioquímica o biológica, que se desea detectar en una muestra.

60 Esta entidad química consiste ventajosamente en una entidad procedente del mundo vivo, preferentemente del mundo vegetal o del mundo animal, preferentemente también presente en el ser humano.

Entre los analitos detectados por los dispositivos y los procedimientos según la presente invención, se citarán en particular las proteínas, los péptidos, los anticuerpos, las hormonas, los esteroides, los antígenos derivados de agentes infecciosos o de células tumorales, los agentes infecciosos tales como las bacterias, los virus, o los parásitos, los ácidos nucleicos (ADN o ARN), los compuestos terapéuticos, los profármacos o también los antibióticos.

El analito se selecciona en particular de entre los conocidos por generar un efecto de gancho durante su detección mediante técnica inmunocromatográfica.

5 Por "efecto de gancho" (o "Hook effect" en inglés), se entiende en particular un resultado falso negativo obtenido mediante la técnica inmunocromatográfica, que concluye de manera aberrante en la ausencia del analito en la muestra, que aparece cuando el analito está presente en la muestra a una concentración muy elevada.

10 Generalmente, el efecto de gancho produce un debilitamiento de la señal de respuesta, visible y medible, inversa al aumento de la concentración de analito a determinar, que conduce (i) a una señal idéntica (de misma intensidad) para dos concentraciones diferentes, una baja y la otra alta, y (ii) una inhibición de la señal para una concentración de analito extremadamente alta.

15 Por ejemplo, en la mayoría de los ensayos inmunocromatográficos dedicados a la hormona hCG, el efecto de gancho empieza alrededor de 5000 mIU/ml y seguirá hasta aproximadamente 250000 mIU/ml, lo que implica una intensidad de la señal idéntica, en particular para una concentración baja (25 mIU/ml) y alta (200000 mIU/ml).

20 A este respecto, el analito se selecciona así ventajosamente de entre la hormona coriónica gonadotrópica (o "hCG"), el antígeno prostático específico (PSA o "Prostate-Specific Antigen"), la hemoglobina, el FOB ("Fecal occult blood"), los marcadores oncogénicos (tales como ferritina, AFP (alfa feto-proteína), CA15-3/CA27.29 (cáncer de mama), CA19-9 (cáncer pancreático), CA-125 (cáncer de ovarios)), la proteína C-reactiva ("CRP" o "C Reactive Protein"), la troponina I ("TNI" o "Troponin I"), unos marcadores cardíacos (tales como troponina T, CK-MB, mioglobina, péptido natriurético de tipo B (t-BNP)), los DOA (por "drugs of abuse"), los biomarcadores para el seguimiento de terapia ("Therapy monitoring biomarkers") (TnF-alfa (factor de necrosis tumoral), otras terapias asociadas a biomarcadores oncogénicos circulantes, otros biomarcadores celulares, intracelulares o tejidos específicos, etc), la hormona luteinizante ("LH") o la hormona foliculoestimulante ("FSH").

25 En función de su estructura, los dispositivos según la presente invención permiten la determinación de un analito único (mono-analito) o la determinación de varios analitos (poli-, o multi- o pluri-analitos).

30 Por "varios analitos" se entiende por lo menos dos analitos, más preferentemente 2, 3, 4 o 5 analitos.

35 Este enfoque multi-analitos puede ser interesante para el estudio de las enfermedades autoinmunes ("Auto immune disease panel") para el estudio de las alergias ("Allergies panel"), para el seguimiento de las terapias ("therapy monitoring") en el campo del medicamento, de la toxicología, de la respuesta del paciente a un tratamiento o marcadores inflamatorios, para los ensayos de diagnóstico de infección múltiple (por ejemplo virus de la inmunodeficiencia humana o VIH/hepatitis C/hepatitis B).

40 Por ejemplo, el dispositivo según la invención se puede adaptar para la determinación de diferentes anticuerpos en una misma muestra líquida, a saber por ejemplo anti-VIH (virus de la inmunodeficiencia humana o VIH), anti-HCV (virus de la hepatitis C), anti-HB (marcador de la hepatitis viral crónica), anti-TB (tuberculosis).

Por "muestra líquida" se entiende cualquier muestra en la que el analito buscado está en solución o en suspensión.

45 Esta muestra líquida puede ser en particular cualquier fluido biológico o corporal.

La muestra líquida puede también ser obtenida directa o indirectamente a partir de un fluido biológico o corporal.

50 La muestra puede también ser un extracto líquido de una muestra sólida.

Típicamente, la muestra líquida es orina, sangre total, plasma o suero.

55 En algunos procedimientos según la presente invención, se utiliza un diluyente cuando la muestra líquida es plasma, suero o sangre total por ejemplo.

El diluyente se deposita sobre el soporte sólido poroso con la muestra. Alternativamente, el diluyente se deposita sobre el soporte sólido poroso antes o después de la muestra.

60 Este diluyente migra en el soporte sólido, conllevando, o facilitando la migración de la muestra en el soporte poroso, con el reactivo de detección marcado.

Típicamente, este diluyente está compuesto por una solución salina tamponada, puede también comprender un detergente o cualquier otro componente necesario para la reacción.

65 El dispositivo según la invención es interesante por que puede ser adecuado tanto para la determinación de la presencia de por lo menos un analito como para la determinación de su cantidad.

Por "detectar" o "determinar" se entiende así la determinación cualitativa (ventajosamente la presencia o la ausencia) de uno o varios analitos en una muestra líquida.

5 Por "detectar" o "determinar" se entiende también la medición y la cuantificación de uno o varios analitos en una muestra.

10 En efecto, los rendimientos de los dispositivos y procedimientos según la invención permiten también unos modos de realización para la realización de mediciones cuantitativas o semi-cuantitativas de un analito o de por lo menos dos analitos diferentes en una muestra líquida.

Medio de difusión capilar

15 Según la presente invención, se entiende por "medio de difusión capilar 2", cualquier medio que constituye o que actúa como unidad de difusión capilar continua, por migración lateral (es decir perpendicularmente al grosor del o de los materiales capilares utilizados para la difusión capilar).

20 Este medio de difusión capilar consiste ventajosamente en un soporte sólido poroso que permite la migración de un líquido por simple difusión capilar.

La porosidad de este soporte permite la difusión capilar (o migración lateral) de la muestra y/o de los reactivos en estado líquido o húmedo.

25 Unos medios de difusión capilar de este tipo se utilizan ampliamente en todas las técnicas de inmunocromatografía de migración lateral en particular.

Un medio de difusión capilar de este tipo es, por ejemplo, un soporte alargado según la dirección y/o el sentido de la difusión capilar (migración lateral).

30 Este medio de difusión capilar está constituido por:

- un solo y único material capilar o poroso, o
 - varios elementos o materiales capilares o porosos diferentes, convenientemente dispuestos los unos con respecto a los otros (por ejemplo por superposición), para obtener una continuidad de flujo capilar de un elemento o de un material a otro, según la dirección de difusión capilar.
- 35

40 Un medio de difusión capilar de este tipo determina una dirección y sentido de difusión capilar de cualquier líquido que es recibido o depositado en un extremo aguas arriba, y que se desplaza entonces hacia un extremo aguas abajo de dicho medio.

45 La difusión capilar considerada según la presente invención, también denominada "inmunocromatografía por migración lateral" se debe distinguir de la utilizada en las técnicas de inmunofiltración, según las cuales los líquidos pasan por el grosor del o de los materiales de filtración, porosos.

A título de ejemplo, estos medios de difusión capilar pueden estar constituidos por diversos soportes inmunocromatográficos, por ejemplo de celulosa, de nylon, de nitrocelulosa, de polietileno o de fibra de vidrio.

50 El medio de difusión capilar puede estar constituido por una o varias partes distintas. Las diferentes partes del soporte pueden estar constituidas por materiales diferentes. Cuando el medio de difusión capilar está constituido por diferentes partes o por diferentes materiales, estos elementos están dispuestos de tal manera que permitan la continuidad del flujo capilar en el medio de difusión capilar.

55 Típicamente, el medio de difusión capilar está constituido por un soporte sólido poroso alargado según la dirección de difusión capilar. Preferentemente, el medio de difusión capilar de los dispositivos según la invención comprende un soporte sólido poroso en forma de tira inmunocromatográfica.

60 El medio de difusión capilar se presenta por ejemplo en forma de una tira inmunocromatográfica constituida por varias tiras superpuestas o solapadas.

65 El dispositivo según la invención puede estar, por ejemplo, constituido por una tira cromatográfica fijada sobre un soporte rígido.

El soporte rígido puede estar constituido por materiales diversos tales como cartón, cartón plastificado o más preferentemente por materiales plásticos. Preferentemente, el soporte rígido está constituido por poliestireno.

Ventajosamente, el medio de difusión capilar puede estar incorporado en un soporte de agarre. Este soporte de agarre facilita la manipulación del medio de difusión capilar, y puede también proteger éste, en particular de la humedad.

5 El soporte de agarre puede recubrir parcial o totalmente el medio de difusión capilar.

El soporte de agarre puede estar constituido por materiales diversos tales como cartón, cartón plastificado o, más preferentemente, materiales plásticos. De manera ventajosa, el soporte de agarre está constituido por un material rígido e impermeable.

10 Estos soportes de agarre o cajas están descritos en particular en las patentes WO-2007/023372, EP-0 291 194, EP 0 560 411, EP-0 560 410 y EP-1 091 808.

Habitualmente, el soporte de agarre está en forma de caja.

15 Este soporte de agarre está ventajosamente provisto de por lo menos una ventana de observación que permite observar las zonas de captura.

20 Estas ventanas de observación están ventajosamente dispuestas de manera que ofrezcan un acceso visual directo únicamente a las zonas de captura a analizar para la determinación de un analito, o, llegado el caso, para la determinación de por lo menos dos analitos.

Zona de depósito

25 La zona de depósito 3 corresponde a una zona aguas arriba del medio de difusión capilar 2 sobre la cual se añade la muestra líquida.

Esta zona de depósito puede cooperar con un elemento de captación realizado en un material absorbente.

30 Este elemento de captación puede ser puesto directamente en contacto con un flujo de orina, por ejemplo.

Como se describe en el documento WO-00/00288, el elemento de captación puede ser móvil entre dos posiciones, una de recogida de la muestra líquida, separada del medio de difusión capilar, y la otra en continuidad o en contacto capilar con la zona de depósito del medio de difusión capilar.

35 En un modo de realización de la invención, el medio de difusión capilar puede comprender una zona de depósito o de recogida de la muestra, sobresaliente con respecto al soporte de agarre, para la recepción de la muestra líquida.

40 En otro modo de realización de la invención, el soporte de agarre o la caja comprenden por lo menos una abertura para el depósito de la muestra líquida.

Reactivo de detección y reactivo de captura

45 En su longitud, el medio de difusión capilar 2 comprende, por un lado, por lo menos un reactivo de detección distribuido para materializar las zonas de liberación 4, 6 y, por otro lado, por lo menos un reactivo de captura para materializar las zonas de captura 5.

50 Por "zona de liberación" o "zona de captura", descritas más en detalle a continuación, se entiende una parte localizada y delimitada del medio de difusión capilar 2 en la que se ha depositado una cantidad de por lo menos un reactivo de detección o de por lo menos un reactivo de captura, respectivamente.

55 Cada una de las zonas de liberación 4, 6 y zonas de captura 5 consiste ventajosamente en una línea o banda transversal (que se extiende perpendicularmente a la dirección de migración), que presenta por ejemplo una anchura comprendida entre 1 y 2 mm, y una superficie comprendida entre 3 y 5 mm².

De manera general, el "reactivo de detección" o el "reactivo de captura" consiste en cualquier entidad química, bioquímica o biológica, capaz de unirse específicamente para formar un complejo que permite la determinación de dicho analito en la muestra líquida.

60 El reactivo de detección y/o el reactivo de captura constituyen también unos reactivos denominados de "unión".

Unos reactivos de unión de este tipo, que permiten la determinación del analito o de varios analitos en la muestra líquida, son bien conocidos y se pueden seleccionar para la realización de la invención.

65 Estos reactivos de unión se seleccionan ventajosamente de entre los que son capaces de unirse específicamente con dicho analito y/o unirse específicamente el uno con el otro.

Según el formato de ensayo utilizado, los reactivos de unión complementarios están destinados a formar unos complejos diferentes:

- 5 - los reactivos de unión son capaces de fijarse concomitantemente al analito, para formar un ensayo en formato sándwich,
- uno de los reactivos de unión (detección o captura) es capaz de fijarse al analito pero también al otro reactivo de unión (respectivamente captura o detección), para formar un ensayo en formato competición.

10 En este ámbito, uno por lo menos de los reactivos de unión se selecciona ventajosamente de entre las entidades químicas, bioquímicas o biológicas, capaces de unirse específicamente con el analito y/o unirse específicamente con un análogo del analito.

15 Por "unir" o "unión" se entiende cualquier enlace fuerte, por ejemplo covalente, pero también cualquier enlace débil, por ejemplo de tipo antígeno/anticuerpo o analito/anti-analito.

20 Por "anti-analito" se entiende cualquier entidad química, bioquímica o biológica, susceptible de unirse específicamente con el analito, o con el reactivo de captura en competición con el analito, por ejemplo un anticuerpo, un antígeno o un ácido nucleico.

25 Por "análogo adecuado del analito" se entiende ventajosamente cualquier entidad química, bioquímica o biológica, capaz de unirse de manera específica al reactivo de captura o al reactivo de detección, según el caso, en competición con el analito.

Los reactivos de unión se seleccionan ventajosamente de entre los anticuerpos, los antígenos o los ácidos nucleicos.

30 El analito y el reactivo de unión forman así típicamente un par capaz de unirse específicamente el uno con el otro, como por ejemplo un par ligando/anti-ligando, un par antígeno/anticuerpo, un par ADN/ARN o un par ADN/ADN.

Así, si el analito es un antígeno o un hapteno, uno por lo menos de los reactivos de unión (el reactivo de detección y/o el reactivo de captura) es ventajosamente un anticuerpo específico del analito.

35 Por "anticuerpo específico del analito" se entiende un anticuerpo capaz de unirse específicamente con el analito en una unión de tipo antígeno/anticuerpo.

40 Se trata típicamente de un anticuerpo policlonal o de un anticuerpo monoclonal, que tiene una fuerte afinidad para el analito. Preferentemente, se trata de un anticuerpo monoclonal.

Si el analito es un anticuerpo, uno por lo menos de los reactivos de unión es ventajosamente el antígeno reconocido por el anticuerpo.

45 Si el analito es un ácido nucleico, uno por lo menos de los reactivos de unión es ventajosamente una sonda ADN complementaria.

El o los reactivos de detección se conjugan ventajosamente con un marcador visible y/o medible, ventajosamente un marcador particular.

50 Por "marcador visible y/o medible" se entiende cualquier marcado que permite una detección directa o indirecta a simple vista, o con la ayuda de un aparato, debido a la emisión de una señal a nivel de las zonas de captura.

La señal es, por ejemplo, una fluorescencia, una coloración, una presencia de isótopo o una señal magnética.

55 Se citarán, por ejemplo, los marcadores particulares coloreados como el oro coloidal, o fluorescentes, las partículas de látex coloreadas, las partículas de látex fluorescentes y las partículas conjugadas con la avidina y la estreptavidina.

60 Los marcadores particulares, coloreados o fluorescentes, consisten así en partículas de pequeño tamaño insolubles en agua y que forman por lo tanto suspensiones, dispersiones o soluciones, en fase líquida.

Entre los marcadores que permiten una observación directa a simple vista, se citarán también los marcadores de tipo dextrano (Hansen T.M., IVD Technology 4, 35-40, 2003). El reactivo de unión se conjuga entonces con una cadena de dextrano (derivado de polisacárido) que lleva fluoróforos.

65 Los marcadores pueden también consistir en unas enzimas (la fosfatasa alcalina o AP, la peroxidasa de rábano

picante o HRP, en particular), en colorantes (o "dyes") o en compuestos quimioluminiscentes (en particular isotiocianato de fluoresceína o FITC).

5 Para aumentar la sensibilidad, se puede haber recurrido, por ejemplo, a un anticuerpo marcado según unas técnicas conocidas por el experto en la materia para una detección indirecta, como por ejemplo un anticuerpo biotinilado, que permite indirectamente una detección mediante la formación de las entidades avidina-biotina y estreptavidina-biotina.

10 Este anticuerpo marcado y biotinilado puede también o bien ser directamente ya depositado sobre una línea de ensayo, en la zona de captura, para aumentar la sensibilidad, o bien ser depositado con el anticuerpo de detección específico, para aumentar el tiempo de contacto y también la sensibilidad, en particular, por ejemplo, debido al número de sitios de fijación.

15 Por su parte, el reactivo de captura específico del analito se inmoviliza sobre el soporte sólido según unas técnicas conocidas por el experto en la materia.

Este reactivo de captura se inmoviliza de tal manera que no sea móvil en estado húmedo.

Esta inmovilización puede efectuarse, por ejemplo, por absorción o por un acoplamiento covalente.

20 Composición de los grupos de zonas sucesivas

El medio de difusión capilar 2 comprende así una o varias zonas de captura 5 que son complementarias de una zona de liberación 4, 6 situada directamente aguas arriba (teniendo en cuenta el sentido de migración capilar).

25 Por "directamente aguas arriba" se entiende en particular la primera zona de liberación 4, 6 que se sitúa aguas arriba de la zona de captura 5.

30 Por "complementaria" se entienden las zonas de liberación y de captura, constitutivas de un grupo de zonas, cuyos reactivos de unión constitutivos se seleccionan de manera que permitan la realización de un ensayo para la determinación del analito de interés, ventajosamente un ensayo en formato competición y/o un ensayo en formato sándwich.

35 Cada grupo de zonas comprende así una zona de liberación seguida de por lo menos una zona de captura complementaria (llegado el caso, antes de la zona de liberación de un nuevo grupo de zonas).

40 Tal como se ha mencionado anteriormente, esta disposición tiene en particular el interés de permitir una adaptación lo mejor posible y lo más justa posible, en cantidad y/o en especificidad, del reactivo de detección de una zona de liberación en función del reactivo de captura que constituye la o las zonas de captura situadas directamente aguas abajo.

De manera general, el medio de difusión capilar 2 puede comprender:

- 45 - exclusivamente unos grupos de zonas cuyos reactivos de unión constitutivos se seleccionan de manera que permitan la realización del ensayo en formato competición; o
- exclusivamente unos grupos de zonas cuyos reactivos de unión constitutivos se seleccionan de manera que permitan la realización del ensayo en formato sándwich; o
- 50 - por lo menos un grupo de zonas cuyos reactivos de unión constitutivos se seleccionan de manera que permitan la realización del ensayo en formato competición, y por lo menos un grupo de zonas cuyos reactivos de unión constitutivos se seleccionan de manera que permitan la realización del ensayo en formato sándwich; o
- 55 - por lo menos un grupo de zonas cuyos reactivos de unión constitutivos se seleccionan de manera que permitan la realización de ensayos en formato competición y en formato sándwich, y por lo menos un grupo de zonas cuyos reactivos de unión constitutivos se seleccionan de manera que permitan la realización del ensayo en formato competición y/o en formato sándwich.

60 En cada grupo de zonas, la zona de liberación y la zona de captura, o la primera zona de captura de una serie, pueden estar fusionadas.

De manera alternativa, la zona de captura, o la primera zona de captura de una serie, está separada de la zona de liberación según una distancia ventajosamente de algunos milímetros, por ejemplo comprendida entre 2 y 4 mm.

65 Las zonas de captura de una serie están además separadas las unas de las otras según una distancia ventajosamente de algunos milímetros, por ejemplo comprendida entre 1 y 4 mm.

También de manera general, la zona aguas arriba de la liberación puede estar localizada en la zona de depósito o de recepción de la muestra.

5 Sin embargo, esta zona aguas arriba de liberación puede también ser depositada en estado seco, aguas abajo de la zona de depósito o recepción de la muestra, para evitar cualquier pérdida de reactivo de detección por un efecto de lavado durante el depósito de la muestra.

10 También de manera general, las zonas de captura materializadas sobre el medio de difusión capilar, complementarias de una zona de liberación situada directamente aguas arriba, están ventajosamente en número de 1 a 10, preferentemente en número de 2 a 5 (es decir también un número seleccionado de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

15 Un enfoque de este tipo es particularmente útil para la obtención de resultados de tipo semi-cuantitativo o cuantitativo.

20 En efecto, tal como se ilustra en los Ejemplos, el perfil de la señal obtenida en las zonas de captura sucesivas puede ser atribuido a un rango de concentración de analito en la muestra líquida. Tal como se ilustra en los Ejemplos, el perfil de la señal obtenida en las zonas de captura sucesivas puede ser atribuido también a un valor preciso de concentración de analito en la muestra líquida.

25 Asimismo, la parte Ejemplo muestra también que, de manera sorprendente, el efecto de gancho puede ser significativamente reducido con una disposición particular de las zonas de liberación y de captura adaptadas para la realización de un ensayo sándwich.

A este respecto, se demuestra que una forma de realización interesante comprende:

- 30 - un grupo aguas arriba de zonas que comprende el par zona de liberación/zona de captura o dos zonas de captura, y después
- un grupo aguas abajo de zonas que comprenden por lo menos una nueva zona de liberación seguida de una serie de zonas de captura.

35 Este grupo aguas arriba está ventajosamente basado en un formato sándwich, de manera que se garantice la captura aguas arriba de analito(s):

- o bien una parte significativa de analito(s),
- 40 - o bien una parte que corresponde a un umbral de detección que tiene un valor de diagnóstico (el "valor de diagnóstico" se refiere a cualquier concentración de analito (o biomarcador) científicamente reconocida como umbral que permite una interpretación médica).

45 Esta captura aguas arriba programada permite en particular controlar la concentración en la muestra líquida que avanza dentro del o de los grupos de zonas posteriores.

La presencia de este grupo aguas arriba de zonas presentaría el interés de controlar el efecto de gancho en el o los grupos de zonas aguas abajo.

50 Todavía de manera general, la concentración de reactivo de detección dentro de la zona de liberación y de reactivo de captura dentro de las zonas de captura complementarias se ajusta ventajosamente en particular en función de los intervalos de concentración de valor diagnóstico buscados, según la nomenclatura de concentración expresada en ng por ml o en unidad internacional (IU o UI) por ml.

55 Esta concentración está por ejemplo comprendida entre 0,1 y 1 ng/cm lineal del soporte poroso, en función de las especificidades de los reactivos de unión.

60 Por otro lado, las zonas de liberación, y por lo tanto los grupos de zonas correspondientes, están en número de 1 a 4 (es decir también un número seleccionado de entre 1, 2, 3 o 4). El intervalo preferido sería por ejemplo de dos grupos para una longitud de soporte capilar de 25 mm.

La elección de los reactivos de unión para las zonas asociadas se efectúa de manera clásica en sí misma.

65 En un ensayo por competición, las zonas de liberación 4, 6 y de captura 5 complementarias comprenden ventajosamente:

- (i) un reactivo de detección marcado en forma de analito en sí mismo, o un análogo adecuado del analito,

conjugado con un marcador visible y/o medible, y

- (ii) un reactivo de captura inmovilizado, ventajosamente un anti-analito del tipo anticuerpo, capaz de unirse de manera específica al analito presente en la muestra y al reactivo de detección antes citado.

5 Este modo de realización permite la detección del analito de la muestra líquida mediante un ensayo en el se efectúa una competición a nivel de la o de las zonas de captura complementarias entre, por un lado, el analito de la muestra y, por otro lado, el analito marcado o el análogo de analito marcado.

10 De manera alternativa, siempre en un ensayo por competición, las zonas de liberación 4, 6 y de captura 5 complementarias comprenden ventajosamente:

- (i) un reactivo de detección marcado en forma de un anti-analito, por ejemplo un anticuerpo específico del analito o del análogo del analito, conjugado con un marcador visible y/o medible, y

15 (ii) un reactivo de captura en forma del analito en sí mismo, o un análogo del analito, inmovilizado en una por lo menos de las zonas de captura 5 del medio de difusión capilar 2.

20 Este modo de realización permite la detección del analito de la muestra líquida mediante un ensayo de competición en el que el reactivo de detección es apto para fijarse, en competición, o bien con el analito de la muestra o bien con el reactivo de captura.

25 En estos diferentes ensayos por competición, el complejo reactivo de detección marcado/reactivo de captura, inmovilizado, se forma en ausencia del analito de interés en la muestra. Estos complejos inmovilizados generan así una señal visible y/o medible tal como se ha definido anteriormente, en ausencia de analito.

En presencia de analito, no hay inmovilización del reactivo de detección marcado a nivel del reactivo de captura. La ausencia de señal a nivel de la zona de captura corresponde así a la presencia del analito en la muestra.

30 En un ensayo de tipo sándwich, las zonas de liberación 4, 6 y de captura 5 complementarias comprenden ventajosamente:

- (i) un reactivo de detección marcado en forma de un anti-analito conjugado con un marcador visible y/o medible, que se une de manera específica al analito, y

35 (ii) un reactivo de captura inmovilizado que se une de manera específica al analito, ventajosamente también un anti-analito.

40 Según una forma de realización preferida de este modo de realización en formato sándwich, una por lo menos de las zonas de liberación 4, 6 de un grupo de zonas 7 comprende uno o varios anticuerpos específicos del analito o por lo menos un analito, conjugados con un marcador visible y/o medible, que se depositan en estado seco en o sobre el medio de difusión capilar, pero que son libres de migrar por difusión capilar en estado húmedo.

45 En este caso, la o las zonas de captura 5 complementarias de este grupo de zonas 7 comprenden uno o unos anticuerpos específicos del analito que son inmovilizados según unas técnicas conocidas. Estos anticuerpos se inmovilizan de tal manera que no sean móviles en estado húmedo.

50 Los anticuerpos de una zona de liberación 4, 6 y de la o de las zonas de captura complementarias 5 se unen respectiva y específicamente con el analito, por ejemplo sobre dos sitios epitópicos, idénticos o diferentes del analito.

55 Los complejos analito/anticuerpo obtenidos se inmovilizan a nivel de la o de las zonas de captura 5 del grupo de zonas 7. Estos complejos inmovilizados generan así una señal visible y/o medible tal como se ha definido anteriormente.

Para la detección de un único analito, el o los reactivos de detección de las zonas de liberación y/o el o los reactivos de captura de las zonas de captura son ventajosamente aptos para unirse específicamente con dicho analito.

60 Los grupos de zonas sucesivos están así ventajosamente dedicados a un mismo analito.

En este caso, las zonas de liberación comprenden ventajosamente uno o unos reactivos de detección idénticos entre sí, y las zonas de captura comprenden uno o unos reactivos de captura idénticos entre sí.

65 Los diferentes grupos de zonas sucesivos son así todos adecuados para la realización de un ensayo en el mismo formato, a saber de competición o sándwich.

De manera alternativa, las zonas de liberación comprenden ventajosamente cada una un reactivo de detección específico, y las zonas de captura complementarias comprenden un reactivo de captura complementario.

5 En este caso, los diferentes grupos de zonas sucesivos pueden ser adecuados para la realización de ensayos idénticos o diferentes los unos de los otros, a saber de competición o sándwich.

10 Para la detección de por lo menos dos analitos, el reactivo de detección de una zona de liberación y/o el reactivo de captura de la o de las zonas de captura complementarias, inmediatamente aguas abajo de dicha zona de liberación y que forman juntos un grupo de zonas, son ventajosamente capaces de unirse específicamente con uno de dichos analitos a determinar.

En este caso, cada grupo de zonas está ventajosamente dedicado a uno de los analitos.

15 Los diferentes grupos de zonas sucesivos pueden ser adecuados para la realización de ensayos idénticos (de competición o sándwich) o diferentes los unos de los otros (de competición y sándwich).

Según una forma interesante de realización, cada grupo de zonas comprende una zona de captura final, situada aguas abajo de las zonas de captura de dicho grupo de zonas.

20 Esta zona de captura final comprende un reactivo inmovilizado que es apto para unirse de manera específica al reactivo de detección marcado que proviene de la zona de liberación de dicho grupo de zona.

25 Esta forma de realización puede servir de zona de control; tiene asimismo el interés de permitir una captura del reactivo de detección marcado al final de este grupo de zonas, de manera que no alcanza un grupo de zonas situado aguas abajo y con el fin de prevenir los eventuales fenómenos de interferencia.

También de manera general, las zonas de liberación 4, 6 y de captura 5 complementarias de un grupo de zonas 7 comprenden ventajosamente:

- 30 (i) un reactivo de detección marcado en forma de un anti-analito, por ejemplo un anticuerpo específico del analito o del análogo del analito, conjugado con un marcador visible y/o medible,
- 35 (ii) un reactivo de captura en forma del analito en sí mismo, o un análogo del analito, inmovilizado en una por lo menos de las zonas de captura 5 del medio de difusión capilar 2, y
- (iii) un reactivo de captura inmovilizado que se une de manera específica al analito, ventajosamente también un anti-analito, inmovilizado en otra de las zonas de captura 5 del medio de difusión capilar 2.

40 Esta última forma de realización permite la realización simultánea de un ensayo en formato sándwich y de un ensayo en formato competición, dentro de un mismo grupo de zonas 7.

Modos de realización particulares

45 Un primer modo de realización de acuerdo con la invención se ilustra en la figura 1.

Este dispositivo es adecuado para la determinación cualitativa de un analito de interés susceptible de estar presente en la muestra líquida.

50 El medio de difusión capilar 2 comprende dos grupos de zonas 7:

- un grupo aguas arriba 71, que está compuesto por la zona aguas arriba de liberación 4 y por una zona de captura aguas abajo 51, complementarias la una de la otra, y
- 55 - un grupo aguas abajo 72, que está compuesto por la zona aguas abajo de liberación 6 y por una zona de captura aguas abajo 52, complementarias la una de la otra.

60 En cada grupo de zonas 7, los reactivos de unión respectivos se seleccionan para la realización de una detección del analito de interés mediante un ensayo de competición o mediante un ensayo sándwich, tal como se ha desarrollado anteriormente.

Estos dos grupos de zonas 7 son así adecuados para realizar:

- un mismo ensayo de competición o un mismo ensayo sándwich,
- 65 - un ensayo de competición para uno, y un ensayo sándwich para el otro.

En todos los casos, la presencia de una zona de liberación 4, 6 aguas arriba de cada zona de captura 5 permite

adaptar lo mejor posible la concentración en el par zona de liberación/zona de captura.

La determinación de un único analito puede todavía ser llevada a cabo mediante diferentes dispositivos de acuerdo con la invención, que tienen sus ventajas específicas.

5 Las figuras 2 y 3 presentan estos otros dispositivos, de los cuales el medio de difusión capilar 2 comprende un grupo de zonas aguas arriba 71 que comprende:

- la zona aguas arriba de liberación 4, y
- 10 - una primera zona de captura 51, complementaria de dicha zona aguas arriba de liberación 4.

Según el caso, se pueden considerar dos variantes para el o los grupos de zonas 72 situados directamente aguas abajo.

15 En una primera variante según la figura 2, el medio de difusión 2 comprende también un grupo de zonas aguas abajo 72 que comprende:

- una zona aguas abajo de liberación 6, y después
- 20 - varias segundas zonas de captura 52 sucesivas, en este caso en número de tres, complementarias de dicha zona aguas abajo de liberación 6.

Esta forma de realización presenta el interés de ofrecer un resultado semi-cuantitativo particularmente fiable, que se libra del efecto de gancho.

25 Según esta forma de realización, para la determinación de la hormona hCG, se puede considerar un grupo de zonas aguas arriba 71 cuya concentración y especificidad de los reactivos se ajustan para detectar únicamente la concentración de la hormona hCG, que corresponde al primer día de ausencia de menstruación ("missed period"), es decir alrededor de 20 mIU/ml.

30 La zona aguas abajo de liberación 6 contiene un reactivo de detección cuya concentración es más elevada que la presente a nivel de la zona aguas arriba de liberación 4, que permite la detección y la distinción de diferentes concentraciones del analito a nivel de las segundas zonas de captura 52 sucesivas aguas abajo.

35 En este formato, para una concentración de la hormona hCG que corresponde al primer día de ausencia de menstruación ("missed period"), se muestra así una señal visual y medible de detección únicamente a nivel de la primera zona de captura 51.

40 Para una concentración de la hormona hCG que corresponde a una o varias semanas de embarazo, la señal visual y medible aparecerá sucesivamente a nivel de las segundas zonas de captura 52 aguas abajo de la zona aguas abajo de liberación 6, que ofrece un análisis semi-cuantitativo de la concentración de la hormona hCG de la muestra estudiada.

45 Según el mismo formato de realización, partiendo de reactivos adecuados para la determinación del antígeno prostático específico (o PSA), se puede detectar y distinguir la "concentración umbral de valor diagnóstico" (4 ng/ml), con respecto a otras concentraciones más elevadas del mismo analito (hasta 200 ng/ml), que permiten de nuevo un enfoque semi-cuantitativo.

50 Aún según el mismo formato, mediante reactivos adecuados para la determinación de sangre (hemoglobina) en las heces (ensayo FOB por "Fecal Occult blood"), se puede detectar y distinguir la "concentración umbral de valor diagnóstico" (40 ng/ml), con respecto a concentraciones más elevadas del mismo analito (hasta 1000 ng/ml y más), ofreciendo así un resultado semi-cuantitativo.

55 Según una alternativa no representada de la primera variante según la figura 2, el grupo de zonas aguas arriba 71 comprende una segunda zona de captura, también complementaria de la zona aguas arriba de liberación 4.

Esta segunda zona de captura está situada aguas abajo de la zona aguas arriba de liberación 4 y de la primera zona de captura 51, pero también aguas arriba del grupo de zonas aguas abajo 72.

60 En este caso, el medio de difusión capilar 2 comprende un primer grupo de zonas 7, aguas arriba, que comprende:

- la zona aguas arriba de liberación 4,
- 65 - dos zonas de captura aguas arriba 51 sucesivas, complementarias de dicha zona aguas arriba de liberación 4,

y después un segundo grupo de zonas 7, aguas abajo, que comprende:

- la zona aguas abajo de liberación 6, y
- 5 - varias segundas zonas de captura 52 sucesivas, en este caso en número de tres, complementarias de dicha zona aguas abajo de liberación 6.

En una segunda variante, según la figura 3, el medio de difusión 2 comprende también unos grupos de zonas aguas abajo 72 sucesivos, en este caso en número de tres, que comprenden cada uno:

- 10 - una zona de liberación 6, y
- una zona de captura 52, complementaria de dicha zona de liberación 6 asociada.

En el caso de una determinación de un solo analito, esta forma de realización presenta el interés de optimizar el umbral de detección en las zonas de liberación y de captura sucesivas.

En esta variante, puede ser interesante aumentar progresivamente la concentración de reactivo de detección dentro de zonas de liberación 4, 6 sucesivas de aguas arriba a aguas abajo, manteniendo al mismo tiempo una concentración de reactivo de captura en cada una de la zonas de captura 52.

Este enfoque tiene un interés en el ámbito de una detección de analito que tiene un valor de diagnóstico de diferentes valores (umbrales) de concentración (por ejemplo hCG, PSA o hemoglobina).

Según otro enfoque de la invención, las zonas de liberación y las zonas de captura pueden ser adecuadas para la determinación de varios analitos.

A este respecto, según un modo de realización representado en la figura 4, el medio de difusión capilar 2 comprende varios grupos de zonas 7 sucesivos, en este caso en número de dos, compuestos cada uno por una zona de liberación 4, 6 y por una zona de captura complementaria 5.

En este caso, el grupo de zonas aguas arriba 71 es adecuado para la determinación de un primer analito mediante un ensayo adecuado (de competición o sándwich); el grupo de zonas aguas abajo 72 es adecuado para la determinación de un segundo analito mediante un ensayo adecuado (de competición o sándwich).

Un dispositivo de este tipo podría comprender también uno o varios otros grupos de zonas 7 suplementarias, adecuados cada uno para un analito a determinar.

De manera alternativa, según un modo de realización representado en la figura 5, el medio de difusión capilar 2 comprende unos grupos de zonas 7, en este caso en número de tres, compuestos cada uno por una zona de liberación 4, 6 seguida de varias zonas de captura complementarias 5 (en este caso en número de dos).

De nuevo, cada grupo de zonas 7 es adecuado para la determinación de uno de los analitos mediante un ensayo adecuado (de competición y/o sándwich).

45 La presencia de varias zonas de captura 5 dentro de cada grupo de zonas 7 permite la obtención de un valor semi-cuantitativo para cada uno de estos analitos.

Estas diferentes formas de realización no son de ninguna manera limitativas. Pueden ser adecuados los diferentes grupos de zonas 7, y sus composiciones respectivas.

50 Zona control

En un modo de realización preferido de la invención y tal como se ilustra en las figuras 1 a 5, el dispositivo 1 comprende también una zona control 10 que está dispuesta aguas abajo y que comprende un reactivo de captura de control.

Esta zona control 10 permite disponer de un control con el fin de asegurar la difusión capilar efectiva de la muestra líquida desde la zona de depósito 3 hasta las zonas de captura 5 del medio de difusión capilar 2.

60 Esta zona control 10 está constituida por un reactivo de captura que se inmoviliza de manera permanente aguas abajo del medio de difusión capilar 2.

Puede tratarse, por ejemplo, de un anticuerpo que se une al (o a los) reactivo(s) de detección constitutivos de las zonas de liberación 4, 6. En este caso, este reactivo de captura de control permite verificar la migración del o de los reactivos de detección a través de las zonas de captura 5.

Alternativamente, este reactivo de captura de control es independiente del analito y permite simplemente verificar la difusión de la muestra líquida a lo largo del medio de difusión capilar 2.

Realización

5 Un dispositivo de este tipo se puede llevar a cabo mediante el procedimiento o modo de uso definido a continuación:

a) se deposita la muestra líquida en la zona de depósito 3 del medio de difusión capilar 2,

10 b) se espera un tiempo suficiente para la migración por difusión capilar de la muestra líquida hasta las zonas de captura 5, llegado el caso hasta la zona control 10,

c) se observa a nivel de las zonas de captura 5, en cuya medida:

15 c.1) el reactivo de detección, complejo con el analito, se fija al reactivo de captura complementario de su grupo de zonas 7 (formato sándwich), y/o

c.2.) el reactivo de detección se fija al reactivo de captura de su grupo de zonas 7 (en formato competición), y después

20 d) se determina cualitativamente y/o semi-cuantitativamente y/o cuantitativamente el analito o los analitos a partir de los resultados obtenidos.

25 En la práctica, durante la migración capilar según la etapa c), la muestra líquida atraviesa sucesivamente cada uno de los grupos de zonas 7 dispuestos en serie.

En cada grupo de zonas 7 que utiliza un ensayo en formato sándwich, los eventuales analitos presentes forman un complejo con los reactivos de detección procedentes de su zona de liberación 4 o 6.

30 Los complejos así formados avanzan hasta la zona de captura complementaria 5 en la que son inmovilizados por los reactivos de captura correspondientes.

Los complejos así retenidos crean una señal visible y/o medible a nivel de esta zona de captura, que permite la determinación de la presencia del analito de interés en dicha muestra líquida.

35 Llegado el caso, la intensidad de la señal aumenta a nivel de las zonas de captura sucesivas, repartidas sobre el o los grupos de zonas, hasta el agotamiento progresivo de los complejos marcados.

40 La intensidad de la señal se mide ventajosamente mediante un lector óptico adaptado. Esta intensidad de la señal está, por ejemplo, expresada en número de píxeles, detectado en todo o parte de la zona de captura 5.

En este ámbito, el dispositivo según la invención es en particular interesante cuando comprende varias zonas de captura sucesivas para un mismo analito, destinado a paliar el efecto de gancho y para la obtención de un resultado semi-cuantitativo.

45 A este respecto, la intensidad de la señal a nivel de cada zona de captura se compara con respecto a la de las otras zonas de captura sucesivas.

50 Una parte de los complejos formados entre los reactivos de detección de la zona de liberación y el analito se captura por cada zona de captura sucesiva, hasta el agotamiento progresivo del analito en la muestra líquida durante la migración.

La intensidad de la señal a nivel de cada zona de captura aumenta así con respecto a la zona de captura anterior, hasta una zona de captura en la que esta intensidad es máxima.

55 Esta zona de captura va seguida después de zonas de captura en las que la intensidad de la señal disminuye.

Se utilizan previamente unas soluciones patrones en un dispositivo idéntico de manera que se pueda atribuir un perfil de resultado con un resultado semi-cuantitativo de analito en la muestra líquida.

60 Es posible entonces transformar este resultado en un valor semi-cuantitativo, mediante una atribución previa de cada zona de captura a un intervalo de concentración del analito en una muestra líquida.

65 En un grupo de zonas 7 que utiliza un ensayo en formato competición, los eventuales analitos presentes impiden la formación de complejos entre el reactivo de detección procedente de su zona de liberación 4 o 6, y el reactivo de captura de la o de las zonas de capturas complementarias 5.

En ausencia de analito, los complejos se forman y crean una señal visible y/o medible a nivel de la zona de captura correspondiente.

5 De nuevo, el dispositivo según la invención es en particular interesante cuando comprende varias zonas de captura sucesivas para un mismo analito, destinado a paliar al efecto de gancho y para la obtención de un resultado semi-cuantitativo.

10 Los resultados pueden ser interpretados semi-cuantitativamente en función de la concentración de analito, como por ejemplo baja, media, alta y muy alta.

Se utilizan previamente unas soluciones patrones en un dispositivo idéntico de manera que se pueda atribuir también un perfil de resultado con un resultado semi-cuantitativo de analito en la muestra líquida.

15 Es entonces posible transformar este resultado en un valor semi-cuantitativo, mediante una atribución previa de cada zona de captura a un dominio de concentración del analito en la muestra. De manera general, el dispositivo de determinación puede también permitir la determinación cuantitativa de un analito.

20 El resultado visual obtenido se puede así transformar por ejemplo en una concentración, expresada por ejemplo en ng por ml o en mUI por ml. del analito en la muestra líquida a analizar.

Para ello, se utilizan unas soluciones patrones en el dispositivo de determinación de manera que se pueda atribuir un perfil de intensidad con un valor cuantitativo de analito en la muestra líquida.

25 Por ejemplo, la intensidad de la señal (número de píxeles) se mide a nivel de cada zona de captura.

Para cada grupo de zonas, se añaden después las intensidades de la señal medidas en estas zonas de captura.

30 Las intensidades añadidas respectivamente de los diferentes grupos de zonas se transforman en una relación que corresponde a las intensidades añadidas de un grupo de zona con respecto a las intensidades añadidas de otro grupo de zonas.

35 Si es necesario, estas relaciones son después objeto de interpolación, por ejemplo una interpolación lineal, asociada ventajosamente a un coeficiente de proporcionalidad para cada intervalo predeterminado de la concentración de analito, para la obtención de una curva patrón que corresponde a la relación de intensidad (en las abscisas) en función de la concentración de analito en la muestra líquida (en las ordenadas).

40 Es posible entonces asociar una relación de intensidad obtenida para una muestra analizada a un valor cuantitativo del analito en dicha muestra líquida, teniendo en cuenta la curva patrón antes citada.

En una forma de realización particular, los reactivos de detección y de captura se aplican sobre el soporte, de manera que se obtenga:

- 45 - un grupo de zonas aguas arriba que comprende dos zonas de captura T1 y T2, y después de una 1ª zona de liberación L1, y
- un grupo de zonas aguas abajo que comprende tres zonas de captura T3, T4 y T5, después de la 2ª zona de liberación L2.

50 En este caso, la relación de intensidad acumulativa se aprecia ventajosamente según la fórmula (I) siguiente:

$$\text{Relación de intensidad acumulativa} = (\text{Suma de la intensidad de las tres zonas de captura T3, T4 y T5 aguas abajo}) / (\text{suma de la intensidad de las dos zonas de captura T1 y T2 aguas arriba})$$

55 La relación de intensidad acumulativa permite construir una curva de señal (intensidad) en función de la concentración de analito en una muestra líquida a analizar.

Un analito cuantitativo de este tipo se ilustra también en el Ejemplo 2 siguiente.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Dispositivo inmunocromatográfico por flujo lateral para la determinación de un analito que presenta un efecto de gancho

65 Una evaluación del efecto de gancho se ha realiza a través de ensayos de determinación de valores de concentración semi-cuantitativa de hCG por inmunocromatografía por flujo lateral.

Se recuerda que, con el fin de combatir el efecto de gancho, los dispositivos de determinación se dotan habitualmente de un exceso de anticuerpos marcados a nivel de la zona de liberación única.

5 Por exceso de anticuerpos, se entiende una concentración de anticuerpos significativamente superior a la concentración necesaria para determinar el umbral de interés diagnóstico.

Se han construido diferentes dispositivos a partir de anticuerpos "hCG matched pairs antibodies" propuestos por ejemplo por la compañía Fitzgerald (anticuerpos mono/policlonal).

10 Los anticuerpos anti-hCG se han marcado con oro coloidal (Aldirch Sigma) según la metodología estándar (por ejemplo la técnica desarrollada por la compañía Organon Teknika).

15 Los anticuerpos anti-hCG se han impreso en la membrana de nitrocelulosa (NC) de la compañía Millipore según diferentes disposiciones desarrolladas a continuación (Ensayos 1 a 5).

La concentración depositada de estos anticuerpos se ajusta de manera que se obtenga una concentración de 0,5 a 1 µg/ml.

20 Las tiras de 4 mm de ensayaron con diferentes concentraciones de hormonas hCG (Sigma) diluidas en orina hCG negativa. Las diluciones ensayadas son 0, 25, 50, 100, 1000, 5000, 50000, 100000, 250000 y 500000 mIU/ml.

Estas diferentes concentraciones corresponden cada una a un estado avanzado de un embarazo en condiciones normales (respectivamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 a 12, 13 a 16 semanas de embarazo).

25 El protocolo de ensayo consiste en la aplicación de 150 µl de cada dilución en la zona de depósito de la tira; y después de 3 a 5 minutos, se realiza una observación de la presencia y la intensidad de coloración sobre la o las zonas de captura de cada tira.

30 Los resultados se registran e interpretan según los criterios generalmente adaptados para la lectura de este tipo de ensayos cualitativos, a saber:

- 0: ausencia de coloración
- ±: ligera coloración, dudosa, "border-line", "ghost-line", difícilmente visible
- 35 +: coloración pálida pero claramente visible
- ++: línea claramente visible
- +++ : coloración de línea intensa
- ++++: coloración de línea muy intensa

40 Ensayo 1: Dispositivo con una zona de liberación única y una zona de captura única (línea de ensayo 1)

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla nº 1 siguiente.

Tabla 1

45

Semana de embarazo	Concentración HCG mIU/ml	Intensidad de coloración					
		Línea de ensayo 1					
		∅	±	+	++	+++	++++
0	0	X					
1	25		X				
2	50			X			
3	100				X		
4	1000					X	
5	5000					X	
6	50000				X		
9-12	100000			X			
13-16	250000		X				
	500000		X				

El ensayo rápido mediante inmunocromatografía por flujo lateral muestra una linealidad de la curva dosis/respuesta situada entre 1000 y 5000 mIU/ml de hCG.

50 A partir de esta concentración máxima, la pérdida de intensidad de la señal empieza a manifestarse a causa del efecto de gancho («high dose hook effect»).

En consecuencia, este tipo de ensayo no permite diferenciar, en ciertas intensidades de coloración del resultado, si la concentración en hCG sería de 50 mIU/ml o de 100000 mIU/ml.

5 Ensayo 2: Dispositivo con una zona de liberación única y dos zonas de capturas sucesivas (línea de ensayo 1 y línea de ensayo 2)

Se han producido unas tiras que contienen una segunda línea de captura (línea de ensayo 2), y después se han ensayado con el mismo panel de concentración de hCG.

10 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla nº 2 siguiente.

Tabla 2

Concentración HCG mIU/ml	Intensidad de coloración											
	Línea de ensayo 1						Línea de ensayo 2					
	∅	±	+	++	+++	++++	∅	±	+	++	+++	++++
0	X						X					
25		X					X					
50			X					X				
100				X					X			
1000					X					X		
5000					X						X	
50000				X							X	
100000			X						X			
250000		X						X				
500000		X						X				

15 El efecto de gancho se detalla a una concentración superior. En efecto, parece que la introducción de una segunda línea de captura desplaza el umbral de concentración del efecto de gancho a una zona de concentración superior.

20 Ensayo 3: Dispositivo con una zona de liberación única y tres zonas de captura sucesivas (línea de ensayo 1, línea de ensayo 2 y línea de ensayo 3)

Se han producido unas tiras que contienen una tercera línea de captura (línea de ensayo 3), después se han aislado con el mismo panel de concentración de hCG.

25 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla nº 3 siguiente.

Tabla 3

Semana de embarazo	Concentración HCG mIU/ml	Intensidad de coloración																	
		Línea de ensayo 1						Línea de ensayo 2					Línea de ensayo 3						
		∅	±	+	++	+++	++	∅	±	+	++	+++	++	∅	±	+	++	+++	++
0	0	X						X						X					
1	25		X					X						X					
2	50			X				X						X					
3	100				X				X					X					
4	1000					X				X					X				
5	5000					X					X					X			
6	50000				X						X						X		
9-12	100000			X						X						X			
13-16	250000		X						X					X					
	500000		X						X					X					

30 La tercera línea de captura (línea de ensayo 3) ya no desplaza el efecto de gancho. Esto se debe probablemente a un agotamiento de los anticuerpos marcados de la zona de liberación.

Ensayo 4: Dispositivo con una zona de liberación única y tres zonas de captura sucesivas

35 Según la conclusión del ensayo nº 3, se han mantenido las tres zonas de captura duplicando al mismo tiempo la concentración de los anticuerpos marcados de la zona de liberación única.

Esta configuración se mostró sujeta a un fuerte ruido de fondo, haciendo el ensayo ilegible e inexplorable.

Ensayo 5: Dispositivo con dos zonas de liberación y cuatro zonas de captura

5 Se ha introducido una segunda zona de liberación después de la primera línea de captura (línea de ensayo 1), sucedida por 3 líneas complementarias de anticuerpos de captura. Esta configuración corresponde a la forma de realización tal como se ha descrito anteriormente en relación con la figura 2.

10 Esta nueva plataforma se ensayó con el mismo panel de concentraciones de hCG. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla nº 4 siguiente.

15 La introducción de una segunda zona de liberación, complementada con 3 líneas de captura sucesivas, permite afirmar en qué intervalo de concentración se sitúa la señal obtenida en la primera línea de captura (línea de ensayo 1) y, por lo tanto, pronunciarse en el intervalo de concentración que se refiere al estado de avance del embarazo de manera semi-cuantitativa.

Este enfoque aporta una solución al problema de efecto de gancho.

Tabla 4

		Intensidad de coloración																							
		ZONA DE ENSAYO 1												ZONA DE ENSAYO 2: líneas de captura dispuestas después de la segunda zona de liberación											
		Línea de ensayo 1						Línea de ensayo 2						Línea de ensayo 3						Línea de ensayo 4					
Semana de embarazo	Concentración HCG mIU/ml	Ø	±	+	++	+++	++++	Ø	±	+	++	+++	++++	Ø	±	+	++	+++	++++	Ø	±	+	++	+++	++++
0	0	X						X						X						X					
1	25		X					X						X						X					
2	50			X					X					X						X					
3	100				X					X					X						X				
4	1000					X					X					X						X			
5	5000						X					X					X						X		
6	50000						X						X					X						X	
9-12	100000			X															X					X	
13-16	250000		X								X							X					X		X
	500000		X							X							X						X		X

Ejemplo 2: Dispositivo inmunocromatográfico por flujo lateral para la determinación cuantitativa de un analito que presenta un efecto de gancho

5 Material

El dispositivo inmunocromatográfico comprende un soporte poroso en forma de una membrana nitrocelulosa, preferentemente con un tamaño de poro de entre 8 y 15 micrómetros, y entre 2 y 3 cm de anchura.

10 Los materiales porosos para tira de muestra ("sample pad"), para cinta conjugada ("conjugate pad) y para cinta absorbente ("absorbent pad") se seleccionaron de entre una múltiple selección de proveedores de papeles de celulosa y de fibra de vidrio, con un grosor de entre 0,2 y 1,0 mm según la aplicación y una porosidad de entre 100 y 200 micrómetros.

15 Los anticuerpos se construyeron a partir de "hCG matched pairs antibodies", propuestos por la compañía BiosPacific (anticuerpo mono/policlonal).

20 Los anticuerpos monoclonales y policlonales anti-hCG y anti-beta-hCG están preferentemente a una concentración de 1 mg/ml en una solución tampón PBS.

Los anticuerpos anti-hCG se marcaron con oro coloidal (Aldrich Sigma) según la metodología estándar (por ejemplo la técnica desarrollada por la compañía Organon Teknika).

25 Los anticuerpos anti-hCG se han impreso en la membrana de nitrocelulosa (NC) de la compañía Millipore.

La concentración depositada de estos anticuerpos se ajusta de manera que se obtenga una concentración de 0,5 a 1 µg/ml.

30 El oro coloidal para la preparación de los reactivos de liberación (marcador) está preferentemente a una concentración de 10 a 15 OD/ml, y de tamaño de partícula de entre 20 y 60 micrómetros.

35 Se ha preparado y calibrado una gama de controles hCG (Sigma) (según el estándar internacional NIBSC), de manera que se obtengan unas concentraciones de hCG comprendidas entre 0 mIU/ml y 1000000 mIU/ml, necesarias para la evaluación de rendimientos del ensayo y su control calidad.

Las diluciones ensayadas son 0, 25, 250, 2500, 25000, 250000, 500000 y 1000000 mIU/ml.

Método

40 Los reactivos de detección y de captura se aplican sobre el soporte en nitrocelulosa de manera que se obtenga:

- una 1ª zona de liberación L1, ventajosamente sobre una tira conjugada ("conjugate pad") interpuesta entre una tira de muestra ("sample pad") y una membrana impresa en soporte en PVC,
- 45 - dos zonas aguas arriba de captura T1 y T2, después de la 1ª zona de liberación L1,
- una 2ª zona de liberación L2, y
- tres zonas aguas abajo de captura T3, T4 y T5, después de la 2ª zona de liberación L2.

50 La segunda zona de liberación L2 está dispuesta entre la segunda zona aguas arriba de captura T2 y la primera zona aguas abajo de captura T3, de manera que se asegure ventajosamente una distancia de como mínimo dos milímetros entre ellas.

55 Las concentraciones de los reactivos de las zonas de liberación y de las zonas de captura se ajustan de manera que se asegure la detección del analito hCG buscado a las concentraciones determinadas (0 a 1000000 mIU/ml).

60 Después de la aplicación de los reactivos, el soporte de nitrocelulosa se seca en condiciones de temperatura y de humedad programadas (generalmente 1h a 37°C).

Después del secado, el soporte de nitrocelulosa impreso con reactivos se utiliza para la construcción de un ensayo en formato "banda a ensayar a cortar en la tira" ("mastersheet"), que comprende un soporte PVC, la membrana de nitrocelulosa impresa, una "conjugate pad" (1ª zona de liberación), una "sample pad" y "absorbent pad".

65 La tira de muestra ("sample pad"), la tira conjugada (conjugate pad") y la tira absorbente (absorbent pad") son unos materiales porosos que están dispuestos sobre el soporte de PVC con una membrana de nitrocelulosa impresa,

adaptada y eventualmente tratada inmunológicamente, de manera que se recoja efectivamente la muestra ("sample pad"), se filtre, se garantice su reacción con reactivos en la 1ª zona de liberación ("conjugated pad"), se garantice la migración uniforme en la membrana y finalmente se absorba el exceso de reactivos y se detenga la migración ("absorbent pad").

5 La banda de ensayo "mastersheet" se corta después para obtener unas tiras de 2 a 6 mm de anchura, preferentemente de 4 mm o 5 mm de anchura.

10 Las tiras se alojan después en una caja de plástico de forma rectangular (dispositivo en formato casete), listas para ser utilizadas.

Procedimiento de ensayo

15 Se preparan diferentes concentraciones de hCG para obtener una gama de controles que cubren unas concentraciones de entre 0 y 1 millón mIU/ml de hormona hCG.

Cada concentración se ensaya por duplicado.

20 Generalmente, se aplican entre 100 y 200 microlitros de muestra de cada concentración de hCG sobre las diferentes unidades de ensayo.

La reacción se observa durante un periodo máximo de 10 minutos.

25 Los resultados obtenidos son evaluados a simple vista (intervalo de concentración).

Después, los resultados obtenidos se registran mediante unos medios de lectura óptica (instrumento o lector) que permiten medir la intensidad de cada línea de captura (expresada en píxeles).

30 El resultado cuantitativo (cifrado) proporcionado por el lector se calcula a partir de un algoritmo cuyo cálculo de base tiene en cuenta la relación de intensidad acumulativa según la fórmula siguiente (I):

$$\text{Relación de intensidad acumulativa (RIC)} = (\text{suma de la intensidad de las tres zonas de captura aguas abajo T3, T4 y T5}) / (\text{Suma de la intensidad de las dos zonas de captura aguas arriba T1 y T2})$$

35
$$\text{Fórmula (I)}$$

Los resultados obtenidos en las presentes condiciones experimentales se presentan en la tabla 5 siguiente.

40 La relación de intensidad acumulativa aumenta con el aumento de la concentración del analito en la muestra líquida.

Por interpolación, la relación de intensidad acumulativa permite construir una curva de la señal (intensidad) en función de la concentración de analito en la muestra líquida.

45 Después, es posible determinar la concentración de hCG en una muestra líquida en un intervalo comprendido entre 0 y 1000000 mIU/ml, teniendo en cuenta esta curva de señal y la relación de intensidad acumulativa medida en dicho dispositivo de determinación en presencia de dicha muestra líquida.

Tabla 5

Concentración de analito hCG en mIU/mL	INTENSIDAD EN PÍXELES / LÍNEA DE CAPTURA							
	0	25	250	2500	25000	250000	500000	1000000
Línea de captura T1	18886	108928	234085	278087	176567	29346	16915	10131
Línea de captura T2	17316	81398	173706	246662	146653	41915	24346	10415
Total 2 líneas	36202	190326	407791	524749	323220	71261	41261	20546
Línea de captura T3	6295	33339	113129	229576	142516	45046	28946	13308
Línea de captura T4	1965	28398	111021	164484	164342	42531	34208	15331
Línea de captura T5	3502	30833	61406	99659	121671	36346	38123	22162
Total 3 líneas	11762	92570	285556	493719	428529	123923	101277	50801
Relación Total Píxel (T3+T4+T5)/(T1 +T2)	0,325	0,486	0,700	0,941	1,326	1,739	2,455	2,473

50

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la determinación de la presencia y/o de la cantidad de por lo menos un analito susceptible de estar contenido en una muestra líquida, que comprende un medio de difusión capilar (2) en el cual dicha muestra líquida está destinada a migrar lateralmente según una dirección y un sentido de migración capilar, y en el cual se materializan, en dicho sentido de migración capilar de aguas arriba hacia aguas abajo, por lo menos:
- una zona (3) de depósito de la muestra líquida,
 - una zona aguas arriba (4) de liberación que comprende por lo menos un reactivo de detección conjugado con un marcador visible y/o medible, siendo dicho reactivo de detección apto para desplazarse como consecuencia de la migración de la muestra líquida en dicho medio de difusión capilar, y
 - por lo menos dos zonas de captura (5) que comprenden cada una por lo menos un reactivo de captura, inmovilizado en dicho medio de difusión capilar,
- caracterizado por que dicho dispositivo (1) comprende también por lo menos una zona aguas abajo de liberación (6) que está materializada sobre dicho medio de difusión capilar (2) y que se sitúa aguas abajo de una por lo menos de dichas zonas de captura (5),
- estando cada una de dicha o dichas zonas aguas abajo de liberación (6) intercaladas entre dos zonas de captura (5),
- comprendiendo dicha zona aguas abajo de liberación (6) también por lo menos un reactivo de detección conjugado con un marcador visible y/o medible, siendo dicho reactivo de detección apto para desplazarse como consecuencia de la migración de la muestra líquida en el medio de difusión capilar (2), y
- por que el reactivo de detección de una zona de liberación (4, 6) y/o el reactivo de captura de la o de las zonas de captura (5) complementarias, situadas directamente aguas abajo de dicha zona de liberación (4, 6), son aptas para unirse específicamente con dicho analito y/o unirse específicamente el uno con el otro, para formar un complejo que permite la determinación de dicho analito en dicha muestra líquida a nivel de dicha o de dichas zonas de captura (5) complementarias.
2. Dispositivo de determinación según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende un grupo aguas arriba de zonas (71) que comprende una zona de captura aguas arriba (51) situada directamente aguas abajo de la zona de liberación aguas arriba (4), estando dicho grupo aguas arriba de zonas (71) seguido a su vez de uno o varios grupos de zonas (72) que comprenden cada uno una zona de liberación (6) y una o varias zonas de captura (5) complementarias.
3. Dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para la determinación de un único analito, caracterizado por que el o los reactivos de detección de las zonas de liberación (4, 6) y/o el o los reactivos de captura de las zonas de captura (5) son aptas para unirse específicamente con dicho analito.
4. Dispositivo de determinación según la reivindicación 3, caracterizado por que las zonas de liberación (4, 6) comprenden uno o varios reactivos de detección idénticos entre sí, y por que las zonas de captura (5) comprenden uno o unos reactivos de captura idénticos entre sí.
5. Dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por que el medio de difusión capilar (2) comprende:
- la zona aguas arriba de liberación (4),
 - una o dos zonas de captura aguas arriba (51), complementarias de dicha zona aguas arriba de liberación (4), y después
 - una zona aguas abajo de liberación (6), y
 - por lo menos dos segundas zonas de captura (52), complementarias de dicha zona aguas abajo de liberación (6).
6. Dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por que el medio de difusión capilar (2) comprende:
- la zona aguas arriba de liberación (4),
 - una o dos zonas de captura aguas arriba (51), complementarias de dicha zona aguas arriba de liberación (4),

y después

- por lo menos dos grupos de zonas (72) sucesivas que comprenden cada uno:

- 5 - una zona de liberación (6), y
- por lo menos una zona de captura (52), complementaria de dicha zona de liberación (6) asociada.

10 7. Dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para la detección de por lo menos dos analitos, caracterizado por que el reactivo de detección de una zona de liberación (4, 6) y/o el reactivo de captura de la o de las zonas de captura (5) complementarias, inmediatamente aguas abajo de dicha zona de liberación (4, 6) son aptos para unirse específicamente con uno de dichos analitos.

15 8. Dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la o las zonas aguas abajo de liberación (6) materializadas sobre el medio de difusión capilar (2), cada una intercalada entre dos zonas de captura (5), están en número de 1 a 4.

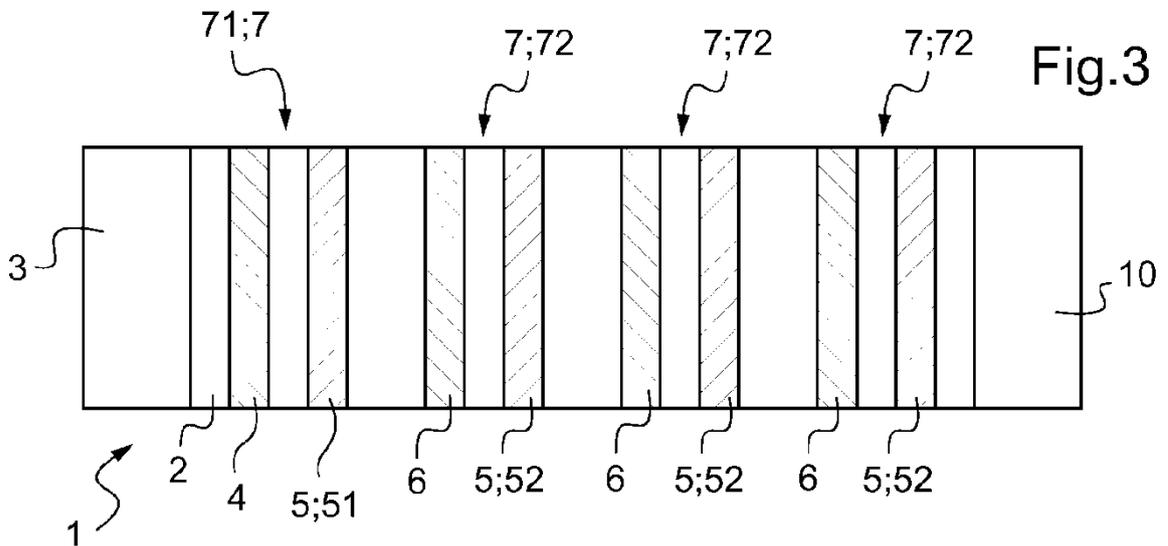
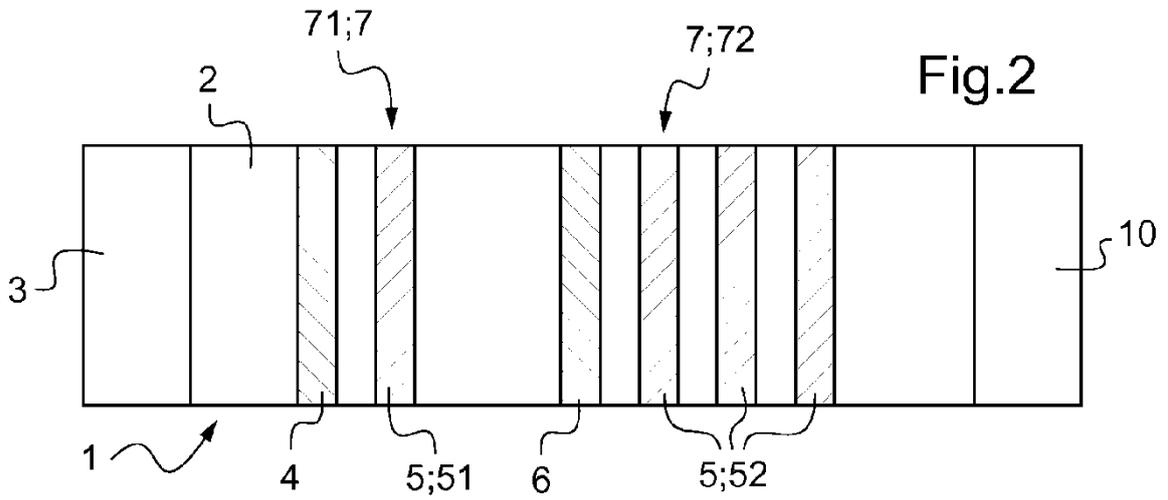
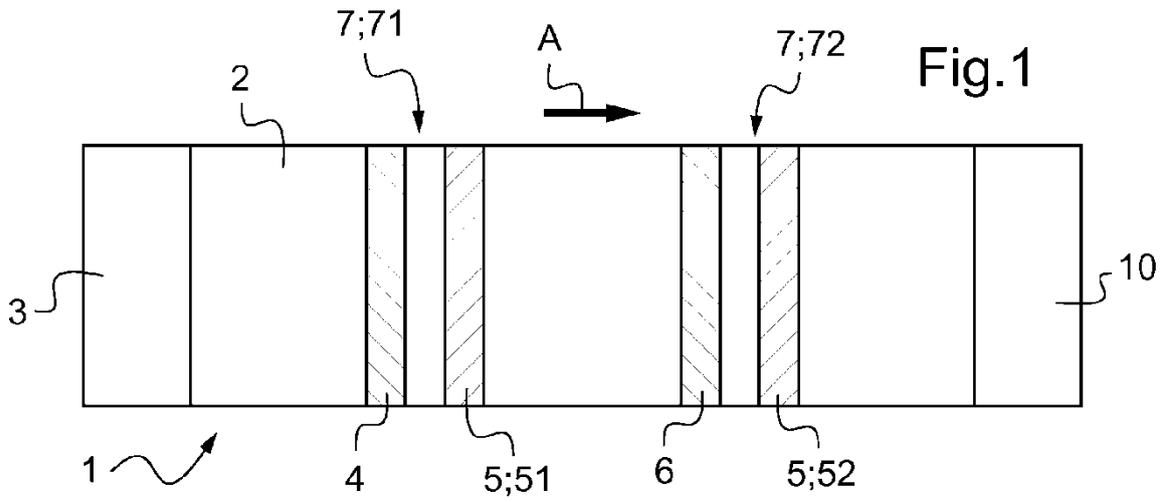
20 9. Dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la o las zonas de captura (5) materializadas sobre el medio de difusión capilar (2), complementarias de una de las zonas de liberación (4, 6) situada directamente aguas arriba, están en número de 1 a 10.

25 10. Dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el reactivo de detección de una zona de liberación (4, 6) y el reactivo de captura de la o de una por lo menos de las zonas de captura complementarias (5) son aptos para unirse específicamente con el analito o uno por lo menos de los analitos, para constituir un ensayo en formato sándwich.

30 11. Dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que el reactivo de detección de una por lo menos de las zonas de liberación (4, 6) y el reactivo de captura de la o de una por lo menos de las zonas de captura (5) complementarias consisten, uno, en un análogo del analito a determinar y, el otro, en un reactivo apto para unirse específicamente con dicho analito o con dicho análogo del analito, para constituir un ensayo en formato competición.

35 12. Procedimiento para la determinación cuantitativa de un analito en una muestra líquida depositada sobre un dispositivo de determinación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado por que comprende las etapas sucesivas siguientes:

- una etapa de medición de la intensidad de la señal a nivel de cada zona de captura (51, 52),
- 40 - en cada grupo de zonas (7), una etapa de adición de dichas intensidades medidas,
- una etapa de cálculo de una relación de intensidad que corresponde a las intensidades añadidas para un grupo de zonas con respecto a las intensidades añadidas para otro grupo de zonas, y
- 45 - una etapa de asociación de dicha relación de intensidad calculada a un valor cuantitativo del analito en dicha muestra líquida partiendo de una curva patrón que corresponde a la relación de intensidad calculada en función de una cantidad de analito en dicha muestra líquida.



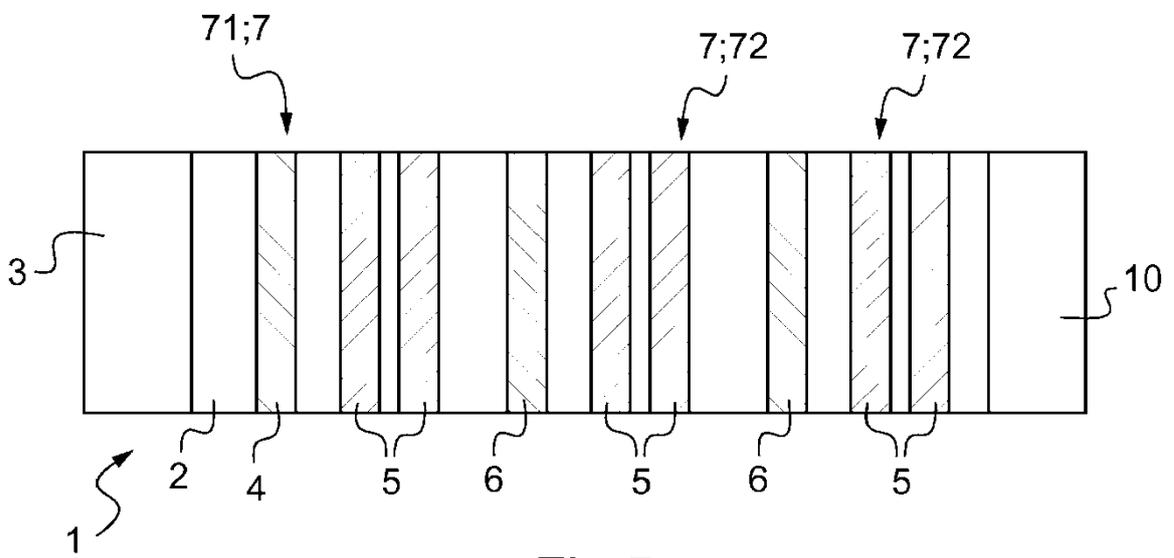
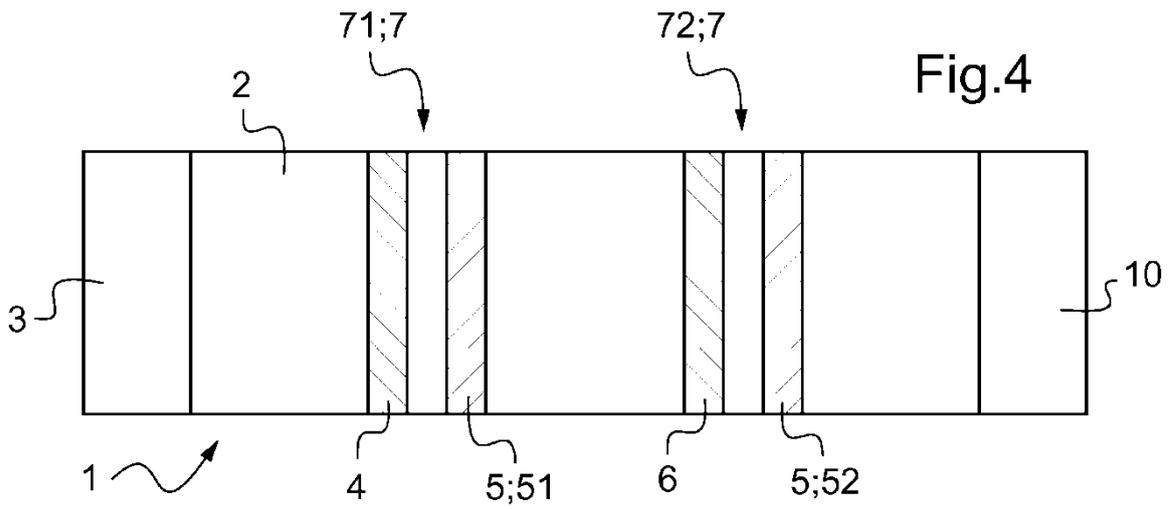


Fig.5