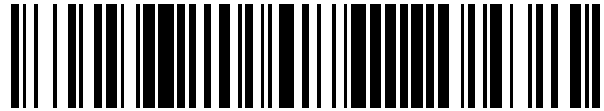


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 107**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2006 E 06735241 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 1849001**

54 Título: **Kit de ensayo de flujo lateral y método para detectar un analito**

30 Prioridad:

**18.02.2005 US 654292 P**

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

**19.08.2016**

73 Titular/es:

**CHARM SCIENCES, INC. (100.0%)  
659 Andover Street  
Lawrence, MA 01843-1032, US**

72 Inventor/es:

**SAUL, STEVEN, J.;  
TESS, MARK, E. y  
MARKOVSKY, ROBERT, J.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 580 107 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

Kit de ensayo de flujo lateral y método para detectar un analito

La solicitud se refiere a detectar un analito, tal como una molécula pequeña, en una muestra usando un soporte sólido tal como una tira de ensayo de tipo flujo lateral.

5 **Antecedentes**

Los ensayos para detectar analitos en las muestras son conocidas la técnica. Algunos ejemplos se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.985.675, expedida el 16 de noviembre de 1.999; la Patente de EE.UU. N° 6.319.466, expedida el 20 de noviembre de 2.001; la Solicitud de Patente de EE.UU. 10.289.089, presentada el 6 de noviembre de 2.002 (basada en la Solicitud Provisional de Patente de EE.UU. 60/332.877, presentada el 6 de noviembre de 2.001); la Solicitud de Patente de EE.UU. 09/961.998, presentada el 24 de septiembre de 2.001 y la Solicitud de Patente de EE.UU. 10/993.340, presentada el 19 de noviembre de 2.004 y la Patente Internacional WO 98/39657.

Según la invención se proporciona un método para la determinación de la concentración de un analito en una muestra líquida que comprende:

15 a) poner en contacto la muestra con un receptor marcado para formar una fase móvil, caracterizado el receptor marcado por una capacidad para unirse al analito para proporcionar, en la fase móvil, un complejo receptor marcado-analito;

20 b) poner en contacto la fase móvil con una primera zona de ensayo sobre un soporte sólido, caracterizado el soporte sólido por que el receptor marcado puede proporcionar una señal detectable cuando se une al mismo, configurado el soporte sólido para permitir que la fase móvil fluya desde la primera zona de ensayo a una segunda zona de ensayo y desde la segunda zona de ensayo a una zona de control, comprendiendo la primera zona de ensayo un agente de captura de la primera zona de ensayo, caracterizado el agente de captura de la primera zona de ensayo por que el agente de captura presenta mayor afinidad de unión hacia el receptor marcado que hacia el complejo receptor marcado-analito;

25 c) permitir que la fase móvil fluya desde la primera zona de ensayo a la segunda zona de ensayo y desde la segunda zona de ensayo a la zona de control, comprendiendo la segunda zona de ensayo un agente de captura de la segunda zona de ensayo caracterizado por que el agente de captura presenta mayor afinidad de unión hacia el receptor marcado que hacia el complejo receptor marcado-analito, siendo el agente de captura de la segunda zona de ensayo el mismo agente de captura que el agente de captura de la primera zona de ensayo, comprendiendo la zona de control un agente de captura de la zona de control caracterizado por que el agente de captura de la zona de control presenta una afinidad equivalente hacia el receptor marcado y el complejo analito-receptor marcado;

30 d) medir la intensidad de las señales en la primera zona de ensayo, la segunda zona de ensayo y la zona de control, en el que la intensidad de las señales en cada una de las zonas de ensayo está inversamente relacionada con la concentración de analito en la muestra.

La Figura 1 es una vista lateral de una realización con dos zonas 9,4 de ensayo y un zona/zona 5 de control.

35 La Figura 2A son gráficos que relacionan la intensidad del desarrollo del color sobre una tira de ensayo (eje Y) con 2 zonas de ensayo (fondo y medio) y un zona (parte superior) de control, con la concentración de aflatoxina en las muestras (eje X).

La Figura 2B son gráficos de los resultados de los mismos experimentos que en la Figura 2A con concentraciones adicionales incluidas.

40 La Figura 3A son gráficos que relacionan la intensidad del desarrollo del color sobre una tira de ensayo (eje Y), con 1 zona de ensayo (fondo) y un zona (parte superior) de control, con la concentración de aflatoxina en las muestras (eje X).

45 La Figura 3B son gráficos similares a 3A y que muestran que la reducción de la concentración del agente de captura en el zona de la parte superior reduce la intensidad del desarrollo de color en la línea superior pero no cambia significativamente la dispersión entre los resultados a varias concentraciones.

50 La Figura 4 es una gráfica que compara los resultados de un zona de ensayo única/ensayo de zona de control para aflatoxina (prom. 2 líneas) con una ensayo de dos zonas de ensayo/zona de control única para aflatoxina (prom. 3 líneas), donde sólo se usó la primera zona de ensayo, de la ensayo de dos zonas de ensayo, para calcular los resultados. Esta gráfica demuestra que incluso cuando no se usa la segunda zona de ensayo para calcular los resultados, la capacidad de unión añadida creada por la presencia de la segunda zona de ensayo puede ayudar a aumentar el intervalo de detección de la ensayo.

Un aspecto implica un método para el análisis de una muestra líquida para la presencia de un analito en el que la

muestra se pone en contacto con un receptor para formar una fase móvil. El receptor se puede caracterizar por una capacidad para unirse al analito para proporcionar, en la fase móvil, un complejo receptor-analito.

La fase móvil está en contacto, o se pone en contacto con, una primera zona de ensayo sobre un soporte sólido. El soporte sólido se puede configurar para permitir que la fase móvil fluya desde la primera zona de ensayo a una segunda zona de ensayo sobre el soporte sólido y, a la zona de control. La primera zona de ensayo puede incluir un agente de captura inmovilizado sobre el soporte sólido. El agente de captura de la primera zona de ensayo tendrá mayor afinidad de unión hacia el receptor que hacia el complejo receptor-analito. Como resultado de ese diferencial en afinidad de unión, el receptor capturado en el zona de ensayo disminuirá a medida que aumente la concentración de analito de la muestra. La segunda zona de ensayo también puede incluir un agente de captura inmovilizado sobre el soporte sólido. Como con el agente de captura de la primera zona, el agente de captura de la segunda zona de ensayo presentará mayor afinidad de unión hacia el receptor que hacia el complejo receptor-analito. El agente de captura puede ser el mismo en cada una de las zonas de ensayo y en concentraciones iguales o diferentes en cada zona.

El receptor se puede marcar con una marca, tal como una partícula coloreada, que pueda ser detectada cuando el receptor está ligado al soporte sólido por captura mediante el agente de captura inmovilizado sobre el soporte sólido. Se puede medir la intensidad de la señal detectable, por ejemplo una señal visible, en las zonas primera y segunda de ensayo para determinar un resultado. En un ensayo de diseño de inhibición la concentración (intensidad) de las señales está inversamente relacionada con la concentración de analito en la muestra. Las intensidades de las señales se pueden observar de manera visual o se pueden medir mediante un instrumento de ensayo electrónico. Por ejemplo, la intensidad de cada una de las dos zonas de ensayo se puede sumar para determinar un resultado que se pueda relacionar con la concentración de un analito en la muestra.

En otro aspecto se incluye una zona de control. La zona de control puede incluir un agente de captura de la zona de control sobre el soporte sólido. El agente de captura de la zona de control puede presentar afinidad hacia el receptor que sea equivalente a la afinidad del agente de captura de la zona de control hacia el complejo receptor-analito. Cuando el agente de captura de la zona de control presenta afinidad al receptor que es equivalente a su afinidad hacia el complejo receptor-analito, la señal en la zona de control aumentará a medida que aumente la concentración de analito en la muestra. La zona de control se puede comparar con las zonas de ensayo para determinar el resultado. En un ejemplo se proporciona una lectura digital, relacionada con la intensidad de la señal, por un instrumento electrónico que calcula las diferencias de intensidad entre la primera y la segunda zona de ensayo y la zona de control y suma los resultados para llegar a la concentración aproximada de analito en la muestra, por ejemplo por comparación del resultado de la ensayo con un valor predeterminado. Se puede empezar a variedad de métodos de lectura dependiendo de la marca usada. Cuando la marca es una partícula coloreada, tal como una partícula de oro, el lector puede ser un lector de reflectancia.

El soporte sólido puede ser una tira de ensayo de flujo lateral con una membrana de fase estacionaria en la que se ponen las zonas de ensayo y de control. La membrana puede permitir el flujo lateral por capilaridad de la muestra del primer extremo al segundo extremo y presenta las zonas de ensayo en la misma.

En algunas realizaciones, el receptor se marca previamente a la aplicación a la tira de ensayo. En otras realizaciones, la marca se puede contraer con el receptor durante la operación de ensayo. El receptor puede ser un anticuerpo tal como un anticuerpo para un analito tal como una micotoxina, por ejemplo aflatoxina u otras moléculas pequeñas tales como antibióticos.

Los agentes de captura de la zona de control pueden incluir proteínas de unión a anticuerpos tales como proteína A y/o anticuerpos tales como anticuerpo anti-especie. El agente de captura puede ser inmovilizado directamente sobre el soporte sólido o a través de unión a una proteína portadora. La zona de control se puede usar para comparación con las zonas de ensayo y también se puede usar para informar al usuario que la fase móvil ha fluido por la tira de ensayo y/o que la ensayo se está realizando apropiadamente. En ese sentido, la zona de control se puede usar como un control de flujo. La zona de control también puede estar implicada en una reacción que sea independiente de la reacción analito-receptor. De esa manera, la zona de control puede proporcionar, si se desea, una señal consistente que no varíe con la concentración de analito. Dicha reacción independiente puede incluir proporcionar un receptor marcado separado con afinidad sólo hacia el agente de captura de la zona de control.

## 50 Descripción

Las tiras de ensayo de tipo flujo lateral son un ejemplo de una ensayo que utiliza un soporte sólido para capturar una señal detectable. Se pueden usar pruebas de flujo lateral para detectar una o más sustancias (analitos) en una muestra fluida. Las tiras de flujo lateral incluyen en general una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria puede incluir varios reactivos inmovilizados sobre la tira de ensayo. La fase móvil puede incluir la muestra de fluido que fluye por, y/o a través de, la tira de ensayo. La fase móvil también puede incluir una variedad de reactivos. A medida que fluye la fase móvil también puede transportar con ella reactivos que pueden ser reconstituidos desde la tira. La fase móvil puede incluir también disoluciones, tal como tampón de dilución. Como una alternativa a la reconstitución de la tira, se pueden mezclar reactivos de la fase móvil con la muestra previamente a la aplicación de la muestra a la tira.

La reacción de una sustancia en la fase móvil con un reactivo de fase estacionaria puede generar una señal detectable. Los reactivos de fase estacionaria, a veces referidos como agentes de captura, pueden ser inmovilizados sobre la tira de manera que capturen sustancias de la fase móvil. La señal puede ser generada por un reactivo de la fase móvil, referido con frecuencia como una marca, que se une a uno o más de los reactivos de fase estacionaria.

5 Varias marcas adecuadas incluyen cromógenos, catalizadores, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, marcas radiactivas, perlas magnéticas o partículas magnéticas, enzimas o sustratos, vesículas que contienen sustancias productoras de señales, marcas colorimétricas, marcas visuales directas incluyendo partículas metálicas coloidales y coloreadas metálicas y no metálicas, partículas de colorante o partículas coloreadas de látex poliméricas orgánicas.

10 Para detectar la presencia o ausencia de un analito se pueden diseñar tiras de ensayo para proporcionar una señal que pueda ser observada de manera visual, tal como cambios de color o diferencias de color sobre la tira de ensayo. También se puede observar la señal, medir y/o interpretar de manera visual o con un lector. Son apropiados una variedad de lectores incluyendo espectrofotómetros, cámaras LCD, lectores de reflectancia, luminómetros, fluorómetros, contadores de centelleo, detectores magnéticos y otros instrumentos capaces de leer, medir y/o  
15 interpretar cambios en una tira de ensayo de flujo lateral. Uno de dichos instrumentos se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.124.585, expedida el 26 de septiembre de 2.000. Otro de dichos instrumentos es un Lector ROSA (ROSA es una marca registrada de Charm Sciences, Inc., Lawrence, MA).

Los ensayos de presencia o ausencia, conocidos en la técnica como ensayos cualitativos, proporcionan un resultado sí o no. Las pruebas que detectan la presencia o ausencia de un analito fijado como objetivo por encima de o por  
20 debajo de un cierto nivel de umbral son conocidas como pruebas semicuantitativas. Las pruebas que determinan que está presente un analito fijado como objetivo en una concentración particular o dentro de un intervalo de concentraciones, son conocidas como cuantitativas. Aunque las pruebas cuantitativas pueden determinar que un analito esté presente dentro de un intervalo de concentraciones o a un nivel particular los resultados también presentan un intervalo de error. Por ejemplo, un resultado de que un analito esté presente a 25 partes por billón  
25 (ppb) puede estar dentro de un intervalo de error aceptable, por ejemplo un resultado de 25 ppb puede significar que el analito está presente en un intervalo de 20-30 ppb. Dicha ensayo se refiere como cuantitativa. Las pruebas que proporcionan resultados cuantitativos dentro de un intervalo limitado también se describen como cuantitativas. Por ejemplo, los resultados pueden indicar que un analito está presente dentro de un intervalo de 0 a 100 ppb pero por encima de 100 ppb no se puede extraer conclusión distinta de que el resultado esté por encima de 100 ppb.

30 A veces se prefieren o se requieren resultados cuantitativos. Por ejemplo, el Programa de Aviso FGIS-PN-04-15, del Servicio Federal de Inspección de Cereales, la Grain Inspection, Packers and Stockyard Administration, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, con fecha 16 de junio de 2.004, describe los criterios de realización para los kits de ensayo. Los criterios para la aflatoxina en maíz incluyen detección cuantitativa a 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb y 100 ppb de aflatoxina total (B1+B2+G1+G2). Una de las realizaciones descritas en la presente  
35 memoria incluye una tira de ensayo de flujo lateral que satisface esos criterios. Se pueden usar varias realizaciones con una variedad de matrices incluyendo aquellas en las que se ha encontrado la contaminación más acusada, incluyendo una variedad de nueces, incluyendo, por ejemplo, frutos secos y cacahuets y piensos y granos incluyendo maíz, subproductos del maíz, soja, arroz, sorgo, trigo y cebada, oleaginosas y semilla de algodón.

Aunque muchos a los ejemplos y las descripciones en la presente memoria se refieren a detectar aflatoxina, se  
40 pueden detectar y cuantificar otros analitos en una variedad de matrices usando los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden usar algunas realizaciones para detectar aflatoxina, incluyendo aflatoxina M1 y M2, en leche. Otros posibles analitos fijados como objetivo incluyen: hormonas, vitaminas, fármacos, metabolitos y sus receptores y se pueden determinar materiales de unión, anticuerpos, péptidos, proteínas, alérgenos, fungicidas, herbicidas, pesticidas y toxinas vegetales, animales y microbianas usando los presentes  
45 métodos y aparatos. Otros analitos que se pueden determinar por los métodos y aparatos descritos incluyen antibióticos, tales como beta-lactamas, cefalosporinas, eritromicina, sulfonamidas, tetraciclinas, nitrofuranos, quinolonas, vancomicina, gentamicina, amikacina, cloranfenicol, estreptomycin y tobramicina, toxinas, tales como micotoxinas, vomitoxina y drogas de abuso, tales como opioides y similares, así como los metabolitos de los mismos.

50 Una tira de flujo lateral en la que se aplican varios reactivos y/o muestra puede ser totalmente o parcialmente porosa o esponjosa de manera que pueda fluir una fase móvil sobre, o a través de, la tira. La tira puede ser también completamente o parcialmente de un material, por ejemplo nitrocelulosa, que pueda unir proteínas. Se puede usar una variedad de materiales en diversas porciones de la tira incluyendo materiales naturales o sintéticos incluyendo  
55 materiales celulósicos tales como papel, celulosa y derivados de celulosa tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa; fibra de vidrio, filtro de fibra de vidrio, por ejemplo membrana Fusion 5 WHATMAN (Whatman es una marca registrada de Whatman paper Limited, Kent, Inglaterra), paño, tanto natural como sintético; geles porosos tales como gel de sílice, agarosa, dextrano y gelatina; matrices fibrosas porosas; materiales a base de almidón, tales como cadenas de dextrano reticuladas; materiales cerámicos; películas de poli(cloruro de vinilo) y combinaciones de poli(cloruro de vinilo)-sílice; POREX (Porex es una marca registrada de Porex Technologies Corp., Fairburn, GA) y similares. En general, el material usado en la corriente de flujo debería permitir que el líquido fluyera sobre, o a  
60 través de, la tira. Si se usa una variedad de materiales pueden estar en comunicación/contacto de flujo de fluido o capaces de ser llevadas a comunicación/contacto de flujo de fluido. La tira debería presentar suficiente resistencia

inherente o se puede proporcionar resistencia adicional mediante un soporte suplementario tal como un refuerzo de plástico sobre el cual se unen componentes de la tira porosa o esponjosa.

5 Se puede usar una almohadilla de aplicación. La almohadilla de aplicación está en comunicación/contacto de flujo de fluido con un primer extremo de una tira de ensayo. El contacto puede ser por contacto directo o a través de un material intermedio que permita el flujo entre la almohadilla de aplicación y otras porciones de la tira de ensayo. La comunicación/contacto de flujo de fluido es de manera que la muestra de ensayo pueda migrar de la almohadilla de aplicación a las otras porciones de la tira de ensayo. Además de recibir la muestra, también se puede usar la almohadilla de aplicación para conducir flujo de fluido a lo largo de la tira. Las partículas que están por encima de un cierto tamaño pueden obstruir los poros de la tira o pueden interferir con el flujo debido a afinidad a componentes de la tira produciendo de ese modo resultados de la ensayo inválidos o incorrectos o reducir de otro modo la función de la ensayo. La almohadilla de aplicación y otros componentes de la tira, también pueden servir como un filtro para retirar, de la muestra, dichas partículas.

En vez de pipetear un volumen medido previamente sobre la tira, se puede disponer la tira de ensayo para que se sumerja en una muestra para absorber una cantidad seleccionada de la muestra.

15 Se pueden aplicar reactivos de fase móvil a la almohadilla de aplicación o a otras porciones de la tira de ensayo, por ejemplo una tira POREX o una membrana de nitrocelulosa, previamente a la aplicación de la muestra. Alternativamente, se pueden premezclar reactivos de fase móvil con la muestra previamente a aplicar la muestra a la tira.

20 Cuando los reactivos de la fase móvil se aplican previamente a la tira, la aplicación de la muestra reconstituye los reactivos para que fluyan a porciones de la tira de ensayo tal como una zona donde se inmovilizan los reactivos de fase estacionaria sobre la tira de ensayo. Las zonas de fase estacionaria de la tira pueden incluir zonas de ensayo y zonas de control.

25 Los reactivos de fase móvil pueden incluir uno o múltiples receptores. Los receptores se pueden seleccionar por su afinidad a un analito fijado como objetivo. El receptor puede ser cualquier agente, por ejemplo, un receptor, enzima, proteína de membrana, hormona, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se una con la especificidad apropiada al analito en la muestra de ensayo para formar un complejo analito-receptor. El receptor se puede detectar por una marca unida. Las partículas de oro coloidal son un ejemplo de una marca útil.

30 El receptor se puede disponer para que fluya en la fase móvil y sea capturado por un reactivo de fase estacionaria. Las posiciones sobre la tira de ensayo donde pueden ser capturados los receptores incluyen una zona de ensayo y una zona de control. Cualquiera de la zona de ensayo o la zona de control puede incluir una o múltiples zonas de captura. Las zonas de ensayo y/o de control pueden tener una variedad de configuraciones incluyendo, como se describe comúnmente, líneas, puntos u otras configuraciones.

35 Los agentes de captura de fase estacionaria se pueden inmovilizar previamente sobre la tira de ensayo en cualquiera o ambas, la zona de ensayo y la zona de control. La inmovilización del agente de captura a la tira de ensayo puede ser a través de interacción de proteínas con el soporte sólido u otras varias técnicas de inmovilización conocidas en la técnica. Por ejemplo, se emplea nitrocelulosa por su capacidad de unión a proteínas. La inmovilización del agente de captura también puede ser a través de inmovilización por limitación de tamaño.

40 La marca, por ejemplo una marca ligada al receptor, puede ser detectada cuando es capturada por el agente de captura inmovilizado. Para detectar múltiples analitos, una tira de ensayo puede presentar múltiples zonas de ensayo con diferentes agentes de captura en cada una o zonas de ensayo combinadas con diferentes agentes de captura en la misma zona de ensayo, para detectar analitos de manera colectiva. También se pueden emplear múltiples zonas de ensayo con los mismos agentes de captura o similares en concentraciones iguales o diferentes para detectar un único analito. Cuando se usan agentes de captura iguales o similares se pueden emplear las múltiples zonas de ensayo para aumentar el potencial de unión de la zona de ensayo. Un potencial de unión aumentado significa que se puede unir más receptor marcado dentro de la zona de ensayo.

50 En una realización de una ensayo de unión de inhibición competitiva, se marca un receptor para el analito con un marcador visible. El receptor fluye con la muestra en la fase móvil a una zona de ensayo. El agente de captura inmovilizado en la zona de ensayo tiene afinidad hacia el receptor que es el mismo o similar que el del analito en la muestra de ensayo. Dicho agente de captura puede ser, por ejemplo, un analito representativo o análogo del mismo que se una a la misma porción en general, o sitio de unión, en el receptor como hace el analito. Debido a esa afinidad, el agente de captura en la zona de ensayo puede unir receptor de la fase móvil más eficazmente si el receptor no es ligado por el analito de la muestra. Cuando la muestra contiene analito, se formará un complejo analito-receptor que evite completamente o parcialmente la captura del receptor en la zona de ensayo. A medida que aumenta la cantidad de analito en la muestra, se captura menos receptor en la zona de ensayo hasta que la unión en la zona de ensayo se compara sólo con la señal de fondo.

55 Cuando el potencial de unión en la zona de ensayo es alto, el intervalo de concentraciones de analito detectables puede ser amplio. Cuando el potencial de unión en la zona de ensayo es bajo, el intervalo de detección total tiende a ser más estrecho y las concentraciones distinguibles máximas tienden a ser menores. Minimizar el potencial de

unión de la zona de ensayo puede, sin embargo, ayudar a aumentar la sensibilidad del ensayo.

Un método para minimizar el potencial de unión de la zona de ensayo incluye minimizar la cantidad de receptor y/o marca. Otro método incluye minimizar la cantidad de agente de captura de la zona de ensayo. Estos métodos también se pueden emplear juntos para valorar la cantidad de materiales de pareja de unión (receptor/agente de

5 captura) para generar un ensayo para detectar el analito en un intervalo de ensayo definido.

Cuando se minimiza el potencial de unión de la zona de ensayo, una menor cantidad de analito puede dar como resultado una relación relativamente mayor de complejo de analito-receptor comparado con receptor no complejado y, por lo tanto, relativamente menos captura en la zona de ensayo. Aunque se puede maximizar la sensibilidad de ensayo el intervalo de detección puede ser también más estrecho.

10 Un método para maximizar el intervalo disponible de unión de la zona de ensayo es maximizar el potencial de unión en la zona de ensayo, por ejemplo maximizando la cantidad de receptor/marca y/o maximizando la cantidad de agente de captura. Un posible problema con esta propuesta es que da como resultado que el intervalo de sensibilidad bajo pueda no ser distinguible. Por ejemplo, una muestra negativa tendrá unión máxima en la zona de ensayo y un nivel bajo de analito puede inhibir alguna unión en la zona de ensayo. Sin embargo, puede mantenerse

15 tanto potencial de unión en exceso que la diferencia en la unión comparado con una muestra negativa puede no ser fácilmente discernible.

Una realización es un método para maximizar el potencial de unión, mientras se mantiene la sensibilidad de la ensayo. Dicha realización incluye usar múltiples zonas de ensayo, en la zona de ensayo, pudiendo cada zona de ensayo capturar el receptor. Las múltiples zonas de ensayo pueden contener cada una concentraciones iguales o similares de agente de captura. Alternativamente, las zonas de ensayo pueden contener diferentes concentraciones de agente de captura. Por ejemplo, la primera zona de ensayo puede presentar una concentración menor de agente de captura comparado con la segunda zona de ensayo. Dicha configuración puede adaptar que el receptor llegue a la primera zona de ensayo más temprano y, por lo tanto, todo lo demás sea igual, tenderá a tener lugar más unión en la primera zona de ensayo comparado con el segundo. Esto es, con una cantidad igual de agente de captura en

20 cada zona, habría más receptor disponible para la unión a la primera zona de ensayo que daría como resultado más unión a la primera zona de ensayo cuando se compara con la segunda zona de ensayo. Si eso no es deseable entonces se puede valorar de acuerdo con eso el agente de captura.

Otro método para maximizar el potencial de unión en la zona de ensayo, mientras se mantiene la sensibilidad de la zona de ensayo, incluye usar una zona de ensayo más amplia. La extensión del agente de captura por un zona mayor, similar a usar múltiples zonas de ensayo, puede permitir una mayor discriminación de resultado y baja detección del nivel.

30

Cuando los receptores son anticuerpos o fragmentos de los mismos, los agentes de captura pueden incluir antígenos con afinidad al anticuerpo, incluyendo analito, análogos del mismo, o cualquier sustancia que presente afinidad hacia el receptor que sea similar a la del analito.

35 Se puede usar una zona de control para comparación con una o más zonas de ensayo o como una señal de que la ensayo funcionó adecuadamente y está completada. La zona de control puede incluir una sustancia como agente de captura que presenta afinidad equivalente hacia el receptor de fase móvil se ligue o no el receptor mediante analito de la muestra. Por ejemplo, la zona de control puede incluir una sustancia que se una a una porción diferente de receptor que a la que se una el analito. Como resultado, la unión de analito a receptor para formar un complejo no

40 cambiará significativamente la afinidad de unión del agente de captura de la zona de control al receptor. En particular cuando dicha zona de control está en una tira de ensayo en la que la fase móvil se pone en contacto con la zona de control después de poner en contacto la zona de ensayo, se puede valorar la ensayo para unir menos receptor en una muestra negativa y más receptor a medida que aumenta la concentración de analito en la muestra.

Cuando la cantidad de receptor en el sistema de ensayo se ha aumentado el potencial de unión de la marca a la unión de la zona de ensayo también aumenta. Se puede añadir una segunda zona de ensayo que una algo del potencial aumentado y reduzca de ese modo la cantidad de receptor disponible para unirse en la zona de control. Con el aumento de analito en la muestra la zona de control oscurecerá por consiguiente a medida que se una menos marca a la zona de ensayo y con posterioridad más marca llega a estar disponible para unirse en la zona de control. El empleo de múltiples zonas de ensayo dentro de la zona de ensayo para capturar receptor se puede emplear de

50 manera útil para permitir que se use la zona de control para aumentar el intervalo de detección del sistema de ensayo.

En otra realización, el agente de captura de la zona de control puede incluir un agente de captura que capturaré una sustancia, conjugada al receptor o marca, que no reacciona con el analito. En un ejemplo para detección de aflatoxina, en el que el anticuerpo de aflatoxina se conjuga a una marca detectable, se puede conjugar un segundo anticuerpo, u otra sustancia, a una marca diferente. De esta manera la zona de control se puede diseñar para unirse a ese segundo anticuerpo que no reaccione con aflatoxina y, por lo tanto, proporcione una señal consistente que cambie poco si la muestra es positiva o negativa.

55

Algunos agentes de captura de la zona de control útiles incluyen proteínas de unión de anticuerpo tales como

5 proteína A, proteína G o proteína AG y formas recombinantes de las mismas. Los agentes de captura de la zona de control también pueden incluir un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-especie, sólo o junto con otras proteínas de unión de anticuerpo. Cuando los agentes de captura de la zona de control son proteínas y se usa un soporte sólido que une proteína, tal como nitrocelulosa, el agente de captura se puede aplicar directamente al soporte. Para unión mejorada al soporte, la línea de control también puede incluir un conjugado proteína-proteína siendo uno el agente de captura y siendo el otro una proteína portadora. Las proteínas portadoras útiles incluyen, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), hemocianina modificada de lapa, tiroglobulina, ovoalbúmina y varios polipéptidos sintéticos tales como poli-L-lisina, ácido poli-L-glutámico y polietilenimina.

10 En un ensayo cuantitativo, los cambios en las zonas de ensayo y, cuando esté presente una zona de control, la extensión de la diferencia entre la zona de control y la zona de ensayo o zonas de ensayo, puede determinar el nivel de detección del intervalo de ensayo de analito. Para valorar con precisión y/o de manera numérica las diferencias y la unión en la zona de control y la zona de ensayo, en particular en un ensayo cuantitativo, se puede usar un lector, tal como un espectrofotómetro u otro lector de reflectancia/absorbancia para detectar y/o medir la señal proporcionada por un cromógeno tal como oro coloidal.

15 Hay una serie de posibles métodos para leer un resultado sobre una tira. En una tira con sólo un zona de ensayo y un zona de control, el zona de control puede ser comparado con el zona de ensayo. En una tira que contiene múltiples zonas de ensayo los métodos de lectura posibles incluyen: encontrar la diferencia en intensidades de señal entre el zona de control y cada una de las zonas de ensayo y añadir los resultados; encontrar la diferencia en las intensidades de las señales entre un zona de ensayo y el zona de control; encontrar la diferencia en intensidades de  
20 señal entre sólo un zona de ensayo y el zona de control para una serie de condiciones y la otra zona de ensayo y el zona de control para otra serie de condiciones.

25 Usar la suma de la diferencia en reflectancia entre el zona de control y las dos zonas de ensayo puede proporcionar una mayor separación entre los resultados de un intervalo de concentraciones cuando se compara con usar sólo la diferencia entre el zona de control y una única zona de ensayo. Usar la suma de las diferencias entre las zonas de control y cada una de las dos zonas de ensayo, puede también ayudar a reducir el error de ensayo. Por ejemplo, si tiene lugar un resultado anómalo en una o las otras zonas de ensayo ese resultado puede ser moderado por combinación con una segunda serie de resultados. Esto puede ser particularmente útil cuando tiene lugar la cuantificación en una concentración particular o dentro de un intervalo de concentraciones.

30 Para cuantificación, los resultados de reflectancia se pueden convertir en un valor de concentración para una cantidad de analito. Un método para convertir la reflectancia en concentración puede emplear ajuste de datos a una curva usando una fórmula, tal como:

$$\text{concentración} = e^{\left(\frac{\text{Result} - c}{a}\right)} - b,$$

donde a, b y c son constantes determinadas por ajuste de los datos a una curva.

35 El resultado es el valor determinado por comparación de la reflectancia en el zona de control con la reflectancia en cada una de las zonas de ensayo. Por ejemplo, los valores de intensidad en cada una de las zonas de ensayo se pueden deducir por separado a partir del valor de la intensidad en el zona de control y las dos diferencias añadidas juntas para llegar al resultado. También se puede usar una tabla de consulta para convertir el resultado matemático en un valor de concentración para el analito.

40 En otra realización, se puede usar el ensayo no sólo como un ensayo cuantitativo en el que un lector proporciona un resultado en, por ejemplo, niveles de partes por billón (ppb) sino también un resultado cualitativo. Por ejemplo, el zona de control se puede comparar de manera visual con la primera zona de ensayo para determinar que un analito esté presente por encima de un cierto nivel de umbral, por ejemplo por encima de 10 ppb o por encima de 20 ppb.

45 Muchas matrices de muestra, tales como materiales sólidos o granulares, requieren una extracción de analito en una matriz líquida antes de aplicación a un soporte sólido tal como una tira de ensayo. Por ejemplo, el maíz se puede moler para que pase por un tamiz de malla 20. La muestra molida, por ejemplo 10 gramos (g) o 50 g, se puede extraer con metanol al 70% en una relación 2:1 (2 ml por 1 g de muestra). También se pueden usar otros disolventes de extracción incluyendo, por ejemplo, acetonitrilo, etanol u otras concentraciones de metanol, por ejemplo a 50%, 60%, 80% etc. Se pueden usar también otras relaciones de extracción, por ejemplo extracción 5:1.

50 Puede tener lugar una extracción usando una variedad de métodos incluyendo: agitar la muestra en un envase, mezclar la muestra con un agitador o mezclar la muestra con una batidora.

Se puede obtener un extracto también usando una variedad de métodos incluyendo filtración para recoger el extracto, permitir que se deposite la muestra para formar una capa de extracto por encima de la muestra molida o centrifugar una porción de la muestra para obtener una capa de extracto y capa de muestra.

Para ensayos de flujo lateral, la muestra o, si se requiere extracción, el extracto de muestra, se puede mezclar con un tampón de dilución que permita que una fase móvil fluya de manera uniforme por la tira de ensayo y/o permita la reconstitución de los reactivos secos sobre la tira de ensayo. El extracto se puede diluir por una serie de métodos y una variedad de posibles relaciones de dilución del extracto con el tampón de dilución. El tampón de dilución puede consistir en, por ejemplo, disolución de BSA, tampón o agua. Cuando el analito es un líquido de muestra, tal como leche fluida, la muestra puede no requerir dilución o extracción. Las diluciones o extracciones, sin embargo, pueden ser aún deseables de manera que se modifique el intervalo de sensibilidad de ensayo o se permita consistencia entre muestras.

La membrana que contiene las perlas se puede tratar previamente con disolución de bloqueo que se disuelva cuando se añada la muestra diluida. La membrana de nitrocelulosa también puede ser tratada previamente y/o bloqueada.

La colocación del zona de ensayo y el zona de control sobre la tira se puede variar para ajustar el tiempo de ensayo. Por ejemplo, una tira de ensayo utilizando una incubación de 12 minutos puede tener las zonas de ensayo y de control inmobilizadas además desde la almohadilla de aplicación de la muestra comparado con una tira de ensayo usando sólo un tiempo de incubación de 10, 8 minutos o menos. Para acortar el tiempo de incubación, puede ser posible desplazar las diversas zonas más próximas al punto de aplicación de la muestra. Ejemplos de posibles posiciones, medidas desde el extremo de aplicación de la tira de ensayo, incluyen líneas respectivas para el fondo (1<sup>er</sup> zona de ensayo), medio (2<sup>o</sup> zona de ensayo) y parte superior (zona de control) a un espaciamiento de líneas de 13 milímetros (mm)/17 mm/21 mm o espaciamiento de líneas de 17 mm/21 mm/25 mm. Aunque el espaciado mostrado es igual, puede no ser necesario igual espaciamiento. La sensibilidad del ensayo puede cambiar dependiendo de la posición de la línea y, por lo tanto, se puede ajustar la valoración de reactivos para adaptar estas diferencias o requerimientos del ensayo.

Ejemplo 1: Método cuantitativo de flujo lateral para la detección de cero a 100 ppb de aflatoxina.

Vista general de la tira de ensayo.

En este ejemplo la tira de ensayo incluía nitrocelulosa, una membrana de POREX, una esponja y una almohadilla desechable todo en contacto/comunicación de flujo de fluido. Los materiales se dispusieron como se muestra en la Figura 1 y se aseguraron a un refuerzo de plástico para soporte. El conjunto de la tira se encerró dentro de una cubierta de plástico en la que la porción de esponja de la cubierta era menor que la esponja completamente expandida.

La esponja fue la almohadilla de aplicación de la muestra. Se pusieron las tiras de ensayo en un bloque incubador de acero inoxidable tallado para ajustar las tiras de ensayo y se calentó a 4°C. Cuando se aplicó la muestra, incluyendo tampón de dilución, a la esponja se expandió dentro de los límites de la cubierta permitiendo que fluyera la muestra líquida a, y a lo largo de, la porción POREX de la tira. A medida que fluía la muestra a lo largo de la tira POREX se puso en contacto con partículas de oro coloidal con anticuerpo de aflatoxina (el receptor) ligado a la superficie (oro-AB), creando la fase móvil. La fase móvil, con oro-AB y muestra, fluyó sobre el material de membrana de nitrocelulosa del POREX. En la membrana de nitrocelulosa había dos zonas de ensayo y un zona de control. Las dos zonas de ensayo presentaron cada una concentraciones de agente de captura inmobilizado que uniría los sitios del oro-AB en ausencia de unión previa a analito en la muestra. Con aflatoxina presente en una muestra, los sitios del oro-AB se ligaron a aflatoxina en la muestra. Esta unión disminuyó la unión de oro-AB a las zonas de ensayo y, por lo tanto, disminuyó la intensidad como se midió por el lector en cada una de las zonas de ensayo. La inhibición de oro-AB para capturar en las zonas de ensayo dio como resultado más oro-AB disponible para unión al zona de control y, por lo tanto, aumentó la intensidad del zona de control. El agente de captura del zona de control incluía proteína de unión a anticuerpo.

Detalle de la tira de ensayo.

La porción AB (receptor) del oro-AB fue una inmunoglobulina de conejo creada a partir de inyección a un conejo de inmunógeno de aflatoxina *Bacillus Thuringensis* (BTI). El anticuerpo se purificó partiendo de 5 ml de suero de conejo. A 5 ml de suero se añadieron 5 ml de tampón de unión PIERCE (Pierce es una marca registrada de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) y se añadió la mezcla a una columna de proteína A. Después de lavar la columna, se eluyó el anticuerpo del gel con tampón de elución PIERCE. Se mezclaron las fracciones activadas y se sometieron a un fraccionamiento de sulfato de amonio al 50% (29,1 gramos por 100 ml a 0°C). Se recogió el precipitado por centrifugación y se disolvió el botón en tampón de dietanolamina 2 mM, pH 8,0 y después se desaló la disolución en una columna de desalación BIO-RAD 10DG (BIO-RAD es una marca registrada de BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA) equilibrada con tampón de dietanolamina 2 mM, pH 8,0. Al anticuerpo desalado se añadieron 1,6 ml de BIO-LYTE 6/8 AMPHOLYTE (BIO-LYTE es una marca registrada de BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA) y se añadió esta muestra a una célula ROTOFOR (ROTOFOR es una marca registrada de BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA) para isoelectroenfoque preparatorio. Después de la primera realización del ROTOFOR, se recogieron fracciones de aproximadamente pH 7,0 a pH 7,8 y se sometieron a una segunda realización en el sistema ROTOFOR. Las fracciones de aproximadamente pH 7,0 a pH 7,7 se mezclaron para unir las perlas de oro (la marca).



Para formar las perlas de oro, se añadió 1 ml de una disolución de cloruro de oro de 40 mg/ml, filtrada, a 360 ml de agua hirviendo en un matraz de un litro limpio. A 35 ml de agua se añadieron 3,5 ml de disolución de citrato de sodio al 1%. La disolución de citrato se añadió a la disolución de oro mientras hervía. Después de calentar para hacerlo hervir a reflujo durante 20 a 30 minutos se enfrió la disolución de perlas y se llevó a pH 8 con carbonato de potasio.

5 Se preparó oro-AB por combinación de partículas de oro coloidal con el anticuerpo anti-aflatoxina de conejo a 4.000 U de actividad por 400 ml de perlas de oro coloidal a pH 8,0 mientras se agitaba. Se determina una unidad de actividad de anticuerpo por unión de 1.000 cpm de aflatoxina B1 tritiada en un ensayo de unión de 5 minutos a 35°C usando IGSORB (IGSORB es una marca registrada de The Enzyme Center, Lawrence, MA). IGSORB incluye células *Staphylococcus aureus* fijadas con formalina conteniendo proteína A como agente de captura para el  
10 complejo de aflatoxina tritiada-anticuerpo.

Se mezclaron las perlas de oro-AB a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se bloquearon con un tampón de bloqueo (fosfato de potasio 20 mM, pH 7,2, conteniendo 5% de BSA, 0,05% de Bioterge, 0,025% de Tween 20 y 0,0155% de PROCLIN 5000 (PROCLIN es una marca registrada de Rohm and Haas Company, Philadelphia, PA)) durante al menos una hora. Se centrifugaron las perlas a 995 rad/s (9.500 rpm) durante 50  
15 minutos en un rotor SLA-3000. Se disolvió el botón de perlas en agua y después tampón de almacenamiento de perlas y después se diluyó a una absorbancia de 0,167 por 10 microlitros en 3 ml de un tampón de almacenamiento. Se añadió glicerol a la disolución de perlas a una concentración final de 16,7%. Esta disolución de perlas se diluyó además a 30% con disolución de pulverización de perlas (fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,4, conteniendo 10% de BSA y 40% de sacarosa). Por ejemplo, el 25% de las perlas contendría 1 parte de perlas a 3 partes de disolución de  
20 pulverización de perlas. El tampón de almacenamiento incluye: fosfato de potasio 0,02 M, pH 7,2, conteniendo 0,2% de BSA, 0,05% de BIOTERGE, 0,025% de TWEEN 20 y 0,155% de PROCLIN 5000.

Se pulverizó oro-AB (4 líneas a 0,8 µl/cm) usando un pulverizador BIODOT sobre POREX. Se trató previamente el POREX con borato 2 mM a pH 7,4, conteniendo NaCl 0,1 M, 1% de sacarosa, 0,0025% de SDS y 0,05 mg/ml de glutatión reducido y se secó.

25 Se pulverizaron la zona de ensayo con las zonas de ensayo y la zona de control con un zona de control sobre una membrana de nitrocelulosa SARTORIUS UNISART CN-140 (Sartorius y Unisart son marcas registradas de Sartorius AG, Göttingen, Alemania). Se pulverizaron las zonas de ensayo y de control sobre la nitrocelulosa con un pulverizador BIODOT. En este ejemplo, se pusieron las zonas de ensayo a 17 mm y 21 mm cuando se mide desde el primer extremo de la membrana de nitrocelulosa. Cada zona presentó una anchura de 0,6 a 1,0 mm. La disolución  
30 de pulverización del zona de ensayo contenía BSA conjugado a un derivado de aflatoxina B1 (BSA-B1). En este ejemplo, la línea de 21 mm contenía una concentración mayor del conjugado (0,0525 mg/ml de BSA-aflatoxina para la primera zona de ensayo y 0,084 mg/ml para la segunda zona de ensayo).

Para preparar la disolución de pulverización del zona de ensayo se añadió aflatoxina BSA-B1 a un tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 6,95, que contenía sacarosa al 20% y PROCLIN 5000. Para preparar el conjugado de BSA-B1,  
35 se convirtió la oxima de aflatoxina B1 en un aminoderivado usando química de carbodiimida con 1,3 diamino-2-hidroxiopropano. Este derivado de amino-aflatoxina se convirtió después en un compuesto de sulfhidrilo con 2-iminotiolano y se hizo reaccionar con BSA activado con sulfo-SMCC para preparar el conjugado. Se pulverizó el conjugado, en las diluciones especificadas anteriormente, en una línea sobre nitrocelulosa a 0,8 µl/cm usando un pulverizador BIODOT.

40 Se pulverizó el zona de control a 25 mm del fondo de la nitrocelulosa a 0,5 a 1,0 mm de ancho. La disolución de pulverización del zona de control incluyó proteína A conjugada a BSA (BSA-PA) en una relación de 0,6 a 2 moléculas de proteína A a BSA. La disolución de pulverización del zona de control incluyó 0,42 mg/ml de proteína.

Para preparar el reactivo del zona de control se disolvieron 200 mg de proteína A en 3 ml de tampón de borato 0,16 M, pH 8,1, que contenía AEDT 2 mM. Se disolvió Sulfo-SMCC en DMSO y se añadieron 3,2 mg a la disolución de  
45 proteína A. Se incubó esta mezcla con agitación durante en 1,5 horas y después se enfrió. Se añadió la reacción de S-SMCC activada con proteína A a 2,4 ml de tampón de fosfato de sodio 0,4 M frío, pH 5,9, que contenía 2,1 gramos de BSA. Se ajustó el pH de la disolución a 6,5-7,0 y se hizo reaccionar durante la noche a 4°C con agitación. Se desaló la reacción usando una columna de desalación de alta prep frente a tampón de fosfato 10 mM, pH 6,9, que contenía NaCl 50 mM y sacarosa al 4% en una concentración de proteína final de 50 mg/ml.

50 Para pulverizar como un zona de control, se diluyó la reacción 40 veces en tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2, que contenía sacarosa al 5% y PROCLIN 5000. Se pulverizó el zona en una línea sobre nitrocelulosa, usando un pulverizador BIODOT, a 1,0 µl/cm y se secó. El zona de control se pulverizó y se secó al mismo tiempo que las zonas de ensayo.

55 Los resultados se leyeron usando un lector ROSA para leer la reflectancia sobre la tira. Se comparó la intensidad del zona de control única para cada una de dos intensidades de zona de ensayo y se sumaron los resultados.

#### Resultados

En la Tabla 1, B (fondo) y M (medio) son la primera y segunda zonas de ensayo y T (parte superior) es el zona de

## ES 2 580 107 T3

control, respectivamente. Los resultados, valores de intensidad determinados usando un Lector ROSA, fueron como sigue:

Tabla 1

Conc., ppb	B	M	T	T-B	T-M	Resultado Suma (T-B) + (T-M)
0	3.496	3.164	2.102	-1.394	-1.062	-2.456
5	3.806	3.812	3.175	-631	-637	-1.268
10	3.005	3.137	3.266	261	129	390
20	2.466	2.823	3.269	803	446	1.249
100	1.742	2.591	4.043	2.301	1.452	3.753

- 5 La curva de los datos se puede representar por la siguiente fórmula por calibración del lector y conversión de los resultados del lector en un valor de ppb.

$$\text{ppb} = e^{\frac{(\text{Resultado} - c)}{a}} - b,$$

donde a=1.832; b=3; c= -4.654.

- 10 Las constantes a, b y c se determinaron por un ajuste de curva para una serie de datos de modelo y el resultado es el valor de la ecuación [ T menos B más T menos M] de la Tabla 1.

### Ejemplo 2

- 15 Se puede ajustar el intervalo de resultados absolutos, por ejemplo de manera que los resultados por encima de un cierto umbral proporcionen resultados en el intervalo de números positivos, mediante ajuste de las zonas de ensayo y el potencial de unión del zona de control. La tabla 2 a continuación es un ejemplo de los resultados donde las muestras por encima de 10 ppb proporcionan un valor de intensidad positivo que muestra que la ensayo no está limitada a justo determinar un valor cuantitativo.

Tabla 2

Concentración ppb	Resultado
0	-2.500
2,5	-1.200
5	-1.000
10	0
20	1.200
37,5	2.200
50	2.700
75	3.400
100	4.000

En la tabla anterior la dispersión total entre 0 ppb (-2.500) y 100 ppb (4.000) es 6.500.

Ejemplo 3

5 En este ejemplo se compararon varios métodos para lectura e interpretación de los resultados de la ensayo, por ejemplo en el caso de que se use un zona de ensayo para calcular un valor de intensidad total y en el caso de que se usen dos zonas de ensayo para calcular un valor de la intensidad total. Resultados. Los resultados en la tabla 3 son, en la mayoría de los casos, el promedio de tres resultados. La primera columna muestra concentración en partes por billón (ppb) de aflatoxina. La segunda columna muestra los resultados de una ensayo de un zona de ensayo/un zona de control con interpretación de los resultados por comparación del zona de ensayo con el zona de control (diferencia en valor de intensidad entre el zona de control y el zona de ensayo). La tercera columna muestra los resultados de una tira de dos zonas de ensayo/un zona de control con interpretación de resultados utilizando sólo el resultado del zona de ensayo de fondo para comparación con el zona de control e ignorando el resultado del zona media. Las columnas cuarta y quinta muestran los resultados convertidos a diferencias de resultado de 0 ppb. Las diluciones para ensayo de un zona de ensayo fueron 0,035 mg/ml de BSA-B1 para el zona de ensayo y 0,25 mg/ml de BSA-PA para el zona de control. Las diluciones para dos zonas de ensayo fueron 0,035 mg/ml de BSA-B1, 0,07 mg/ml de BSA-B1 y 0,33 de BSA PA para zonas del fondo/medio/parte superior, respectivamente. Los resultados muestran una dispersión aumentada en la ensayo de dos zonas de ensayo/un zona de control (3.266) cuando sólo se usa el zona de ensayo del fondo cuando se compara con la ensayo de zona de ensayo única (2.314) como resultado de aumentar la capacidad de unión de la zona de ensayo con la adición de la segunda línea de ensayo de BSA-B1.

Tabla 3

Conc., ppb	1 zona de ensayo	2 zonas de ensayo sólo fondo	línea de 1 zona de ensayo dif 0 ppb	línea de 2 zonas de ensayo dif 0 ppb
0	-973	-1.104	0	0
4,3	-580	-689	393	415
9,1	-129	43	844	1.147
12,5	129	495	1.102	1.599
25	723	1.045	1.696	2.149
25,7	502	1.212	1.475	2.316
50	1.005	1.603	1.978	2.706
100	1.341	2.162	2.314	3.266

20 La Tabla 4 compara los resultados usando una ensayo de un zona de ensayo/un zona de control doblando la diferencia entre las intensidades del zona de control y el zona de ensayo (segunda columna), para resultados usando una tira de dos zonas de ensayo/un zona de control calculando la suma de la diferencia entre el zona de ensayo del zona de control (tercera columna). Los resultados muestran una dispersión aumentada en la ensayo de dos zonas de ensayo/un zona de control. Las columnas cuarta y quinta muestran los resultados convertidos en diferencias de cero. Las diluciones de la tira de ensayo fueron, como se describió anteriormente, 0,035 mg/ml de BSA-B1, 0,07 mg/ml de BSA-B1 y 0,33 de BSA PA para las zonas de fondo/medio/parte superior, respectivamente, para la ensayo de dos zonas de ensayo y 0,03 mg/ml de BSA-B1 para zona de ensayo y 0,25 mg/ml de BSA-PA para zona de control para un zona de ensayo. Aunque la dispersión aumenta doblando la diferencia del zona de control y el zona de ensayo para el resultado de un zona de ensayo, también aumenta el error en la medición.

30

Tabla 4

Conc., ppb	2 x dif 2 zonas de ensayo	Suma de diferencias de 2 zonas de ensayo	dif de 0 1 zona de ensayo	dif de 0 2 zonas de ensayo
0	-1.946	-2.856	0	0
Conc., ppb	2 x dif 2 zonas de ensayo	Suma de diferencias de 2 zonas de ensayo	dif de 0 1 zona de ensayo	dif de 0 2 zonas de ensayo
4,3	-1.160	-1.558	786	1.299
9,1	-258	-1.049	1.688	1.807
12,5	258	-385	2.204	2.471
25	1.446	724	3.392	3.580
25,7	1.004	999	2.950	3.855
50	2.009	1.362	3.955	4.219
100	2.683	2.256	4.629	5.112

5 La Tabla 5 muestra intensidades de zona individuales en cada una de las zonas de ensayo y de control en una ensayo de un zona de ensayo/un zona de control comparado con la ensayo de dos zonas de ensayo/ensayo de un zona de control. La cuarta columna muestra la diferencia en intensidad entre las zonas de la parte superior y del fondo en la ensayo de un zona de ensayo y la octava columna muestra la suma de la diferencia entre los resultados de intensidad entre las zonas de la parte de arriba/media y parte superior/fondo.

Tabla 5

Conc., ppb	1 zona de ensayo			2 zonas de ensayo			
	Parte superior	Fondo	Resultado	parte superior	media	fondo	Resultado
0	3.206	4.179	-973	2.111	3.863	3.214	-2.856
4,3	3.476	4.056	-580	2.590	4.237	3.279	-2.337
9,1	3.039	3.168	-129	3.065	4.158	3.022	-1.049
12,5	3.414	3.285	129	3.186	4.067	2.691	-385
25	3.361	2.638	723	2.942	3.263	1.897	724
25,7	3.170	2.668	502	3.352	3.565	2.139	999
50	3.505	2.689	815	3.162	3.403	1.560	1.362
100	3.478	2.137	1.341	3.354	3.260	1.191	2.256

Ejemplo 4

- 10 El espaciamiento de zonas descrito en el Ejemplo 1 (17, 21 y 25 mm - respectivamente, para las líneas de fondo/medio/superior) se comparó con el espaciamiento de zona a 13, 17 y 21 mm de fondo/medio/superior, respectivamente. Las dos series de zonas se pulverizaron con el zona 1 de ensayo (zona de fondo)/zona 2 de ensayo (zona media) / zona de control (zona superior) con concentraciones respectivas de 0,0525 mg/ml de BSA-B1, 0,084 mg/ml de BSA-B1 y 0,42 mg/ml de BSA-PA abd ensayadas con 25%, 4.000 U de perlas.
- 15 La incubación a 40°C, en un bloque de incubadora de acero inoxidable tallado para fijar las tiras de ensayo, durante

- 5 10 minutos para la tira de 13, 17 y 21 mm y 12 minutos para la tira de 17, 21 y 25 mm. A los 10 minutos de incubación con la tira de 17, 21 y 25 mm, la dispersión en los resultados (diferencia entre el zona de control y de ensayo) de 0-100 ppb cuando se compara con la incubación de 12 minutos, fue menor, por lo tanto, se aumentó el tiempo de incubación para permitir más tiempo para que fluyeran las perlas por la tira de ensayo. Cuando se desplazaron las zonas más próximas a las perlas (13, 17 y 21 mm) el flujo por las zonas de ensayo y de control es más rápido de manera que es posible un tiempo de ensayo más corto.

Tabla 6: espaciamento del zona de 17 mm/21 mm/ 25 mm

Conc. Ppb	Incubación de 10 minutos	Incubación de 12 minutos
0	-2.501	-2.502
10	261	668
100	3.083	3.830

Tabla 7: espaciamento del zona de 13 mm/ 17 mm/ 21 mm

Conc. Ppb	Incubación de 10 minutos	Incubación de 12 minutos
0	-2.462	-2.150
10	961	881
100	4.941	4.879

Ejemplo 5

- 10 Se compararon los resultados del ensayo usando el espaciamento de zona de 13, 17 y 21 mm con incubación de 10 minutos en el mismo espaciamento de zona con incubación de 8 minutos, ambas a 40°C en un bloque de incubadora de acero inoxidable tallado para fijar las tiras de ensayo. Se pulverizaron las zonas con 25%, 4.000 U de perlas y las respectivas concentraciones del zona 1 de ensayo (zona de fondo)/zona 2 de ensayo (zona media)/zona de control (zona superior) son, respectivamente de 0,057 mg/ml de BSA-B1, 0,091 mg/ml de BSA-B1 y 0,417 mg/ml de BSA-PA, respectivamente.
- 15

Los resultados en las siguientes tablas muestran que los resultados de 8 minutos o los resultados de 10 minutos son posibles y que la incubación a temperatura ambiente durante unos 2 minutos adicionales tuvo poco impacto sobre la sensibilidad. Aunque los ejemplos usaron incubación a 40°C, también se pueden usar otras temperaturas.

Tabla 8: espaciamento de zona de 13 mm/17 mm/21 mm con una incubación de 10 minutos.

Conc., ppb	Área superior	Área media	Área de fondo	Resultado
0	1.999	4.214	3.933	-4.150
5	2.651	3.996	3.396	-2.091
10	3.089	3.889	3.062	-774
20	3.494	3.558	2.528	901
50	3.866	2.991	1.671	3.069
100	3.749	2.479	992	4.027
200	4.263	2.368	739	5.420

20

Tabla 9: espaciamento de zona de 13 mm/17 mm/21 mm con una incubación de 8 minutos.

Conc., ppb	Área superior	Área media	Área de fondo	Resultado
0	1.740	4.019	3.913	-4.452
5	2.521	3.959	3.491	-2.409
10	3.094	3.771	3.196	-779
20	3.141	3.440	2.417	425
50	3.524	2.731	1.425	2.892
100	3.975	2.743	1.275	3.933
200	4.170	2.131	751	5.459

Tabla 10: espaciamento de zona de 13 mm/17 mm/21 mm con una incubación de 8 minutos más 2 minutos.

Conc., ppb	Área superior	Área media	Área de fondo	Resultado
0	1.941	4.211	4.095	-4.423
5	2.892	4.170	3.630	-2.016
10	3.591	4.030	3.441	-289
20	3.421	3.518	2.465	860
50	3.752	2.769	1.420	3.315
100	4.209	2.823	1.298	4.297
200	4.442	2.153	764	5.967

5 La Figura 1 muestra un aparato **8** de tira de ensayo, constituido por membrana **3** de nitrocelulosa, POREX **7**, almohadilla **1** de aplicación de muestra y almohadilla **6** de desecho unida a soporte **2** sólido. Se pone en contacto la muestra con almohadilla de muestra-esponja **1**. La muestra fluye de la almohadilla **1** de aplicación de la muestra a receptor de fase móvil que contiene POREX **7**. Una porción de receptor unirá analito de la muestra y fluirá por la membrana **3** de nitrocelulosa a las zonas **9** y **4** de ensayo. Una porción de receptor no ligado por analito de la muestra se unirá a las zonas de ensayo. El receptor no ligado restante y complejo analito-receptor fluirán al zona **5** de control. Una porción de dicho receptor no ligado y una porción de complejo analito-receptor, se unirá al zona de control. El receptor no ligado restante o complejo analito-receptor fluirá a la almohadilla **6** absorbente. El zona de control se compara con las zonas de ensayo para determinar un resultado. Aunque no está claro a partir de la Figura 1, las dos zonas de ensayo y un zona de control se pueden espaciar uniformemente entre sí o espaciarse en otras variaciones.

La Figura 2A es una gráfica que relaciona la intensidad del desarrollo de color sobre una tira de ensayo con la concentración de aflatoxina en las muestras. El zona de ensayo del fondo de la tira de ensayo, indicado con una forma de diamante en la gráfica, es la primera zona de ensayo puesta en contacto por la fase móvil en el flujo sobre la tira. El zona media, indicado con una forma cuadrada, es la segunda zona de ensayo puesto en contacto por la fase móvil en el flujo sobre la tira. El zona superior, indicado con una forma de triángulo, es el zona de control y es la última zona que entra en contacto por la muestra en el flujo sobre la tira. La línea de resultado, indicada por una forma circular, muestra los resultados que se calculan midiendo la diferencia en intensidad de señal entre cada zona de ensayo y el zona de control y sumando las diferencias. El zona de fondo, a 0 ppb, presenta la intensidad más alta y el zona del medio presenta la segunda intensidad más alta. A medida que aumenta la concentración de analito, en este ejemplo aflatoxina, hay una pérdida constante en intensidad en las dos, el zona de fondo y el zona del medio (las zonas de ensayo), que refleja la inhibición de receptor marcado de unión a las zonas de ensayo. Los resultados a 50 ppb muestran una inhibición relativamente constante en las zonas de ensayo. Esto es, en esta serie de datos, hay poca diferencia en las intensidades del zona de ensayo entre 50 ppb y 100 ppb mientras que la intensidad del zona de control cambia significativamente de 50 ppb a 100 ppb, proporcionando la diferencia de resultados de la ensayo de 50 ppb a 100 ppb. Como se muestra por la línea de los resultados (calculado deduciendo la intensidad del zona de fondo de la intensidad del zona superior y deduciendo la intensidad del zona superior de la intensidad del

zona media y añadiendo después las dos diferencias), la diferencia de intensidad entre cada una de las zonas de ensayo y el zona de control proporciona la sensibilidad para distinguir, en esta tira de ensayo particular, entre concentraciones de aflatoxina entre 0 ppb y 100 ppb.

5 La Figura 2B es una gráfica de los resultados de los mismos experimentos que en la Figura 2A con concentraciones adicionales incluidas. Los puntos de datos adicionales muestran que los resultados son corregidos para variaciones en intensidad de zona que pueden haber resultado de diferencias de flujo dentro de la tira de ensayo o de variación de muestra resultante de diferentes fuentes de materias primas ensayadas. Por ejemplo, los resultados (círculo) a alrededor de Intensidad/Resultado -1.000 son corregidos de los resultados anómalos en las zonas de control y de ensayo.

10 La Figura 3A es una gráfica de los resultados de los experimentos con un zona de ensayo y zona de control únicas usando 0,035 mg/ml de conjugado-BSA-B1 en el zona de ensayo y 0,025 mg/ml de BSA-PA) en el zona de control. El zona de resultado (superior-fondo), indicado por el triángulo, refleja menor sensibilidad que la línea de resultado en las Figuras 2A y 2B. Esto es, hay una dispersión menos significativa (diferencia entre zona de control y zona de ensayo), en la ensayo de un zona de ensayo, a concentraciones variables cuando se compara con la ensayo de dos zonas de ensayo.

15 La Figura 3B demuestra cómo cambiar la concentración del zona superior, de 0,025 mg/ml a 0,016 mg/ml de BSA-PA, indicado por el diamante, afecta a los resultados de la ensayo, indicado por el triángulo. La intensidad del zona superior a 0 ppb empieza a 2.000, en vez de 3.000 (como en la Figura 3A). Como con la Figura 3A, la línea de resultado, indicado por el triángulo, es menos sensible que la línea de resultado en la Figura 2A y Figura 2B. Hay, por lo tanto, dispersión (diferencia) menos significativa entre los resultados a concentraciones variables cuando se compara con el uso de dos zonas de ensayo. La comparación entre la Figura 3A y Figura 3B muestra que cambiando la concentración en el zona de control se desplazan las líneas - la intensidad del zona superior a 0 ppb (intercepta y) empieza a 2.000, en vez de 3.000. Cambiar la concentración en el zona de control, sin embargo, no cambia significativamente la dispersión entre resultados a varias concentraciones. Por ejemplo, en la Figura 3A, el resultado a 0 ppb es -1.000 y el resultado a 100 ppb es 2.000, proporcionando una dispersión de puntos de 3.000. En la Figura 3B el resultado a 0 ppb es -2.000 y el resultado a 100 ppb es 1.000, proporcionando de nuevo una dispersión de 3.000 puntos. Esto se compara con, en la Figura 2A y Figura 2B, una dispersión de aproximadamente 6.000 puntos entre 0 ppb y 100 ppb. Así, la segunda zona de ensayo puede proporcionar un aumento significativo en la dispersión y, por lo tanto, puede proporcionar más precisión de concentración a concentración. Esto es, una dispersión mayor permite un mayor margen de error sin afectar a los resultados de la ensayo. El mayor margen de error es particularmente importante, por ejemplo, cuando las muestras y los resultados son variables y cuando se requiere cuantificación.

20 La Figura 4 es una gráfica que compara los resultados de un zona de ensayo única/ensayo del zona de control para aflatoxina con una ensayo de dos zonas de ensayo/única zona de control para aflatoxina, en el caso de que sólo se use la primera zona de ensayo para calcular los resultados. Esta gráfica demuestra que incluso cuando no se usa la segunda zona de ensayo para calcular los resultados, la capacidad de unión añadida creada por la presencia de la segunda zona de ensayo puede ayudar a aumentar el intervalo de detección del ensayo. La inconsistencia en los datos - la ensayo de un zona de ensayo muestra una caída en la intensidad de 25 ppb a 25,7 ppb - demuestra la importancia de una mayor dispersión cuando se ensayan múltiples lotes de muestras.

35  
40

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la determinación de la concentración de un analito en una muestra líquida que comprende:

- 5 a) poner en contacto la muestra con un receptor marcado para formar una fase móvil, caracterizado el receptor marcado por una capacidad para unirse al analito para proporcionar, en la fase móvil, un complejo receptor marcado-analito;
- 10 b) poner en contacto la fase móvil con una primera zona de ensayo sobre un soporte sólido, caracterizado el soporte sólido por que el receptor marcado puede proporcionar una señal detectable cuando se une al mismo, configurado el soporte sólido para permitir que la fase móvil fluya desde la primera zona de ensayo a una segunda zona de ensayo y desde la segunda zona de ensayo a una zona de control, comprendiendo la primera zona de ensayo un agente de captura de la primera zona de ensayo, caracterizado el agente de captura de la primera zona de ensayo por que el agente de captura presenta mayor afinidad de unión al receptor marcado que al complejo receptor marcado-analito;
- 15 c) permitir que la fase móvil fluya desde la primera zona de ensayo a la segunda zona de ensayo y desde la segunda zona de ensayo a la zona de control, comprendiendo la segunda zona de ensayo un agente de captura de la segunda zona de ensayo caracterizado por que el agente de captura presenta mayor afinidad de unión al receptor marcado que al complejo receptor marcado-analito, siendo el agente de captura de la segunda zona de ensayo el mismo agente de captura que el agente de captura de la primera zona de ensayo, comprendiendo la zona de control un agente de captura de la zona de control caracterizado por que el agente de captura de la zona de control presenta una afinidad equivalente hacia el receptor marcado y el complejo de analito-receptor marcado;
- 20 d) medir la intensidad de las señales en la primera zona de ensayo, la segunda zona de ensayo y la zona de control, en el que la intensidad de las señales en cada una de las zonas de ensayo está inversamente relacionada con la concentración de analito en la muestra.
- 25 2. El método según la reivindicación 1, en el que se determina un resultado por comparación de las intensidades de la señal en una de cualquiera de, la primera zona de ensayo o la segunda zona de ensayo con la intensidad de la señal en la zona de control.
- 3. El método según la reivindicación 1, en el que se determina un resultado sumando las intensidades de la señal en la primera zona de ensayo y la segunda zona de ensayo y comparando las intensidades de las señales sumadas con la intensidad de la señal en la zona de control.
- 30 4. El método según la reivindicación 1, en el que se determina un resultado por comparación de la intensidad de la señal en la primera zona de ensayo con la intensidad de la señal en la zona de control y comparando la intensidad de la señal en la segunda zona de ensayo con la intensidad de la señal en la zona de control.
- 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la señal detectable es una señal visible que se puede medir y que comprende además un instrumento electrónico que tanto mide la señal como proporciona un resultado numérico relacionado con la concentración de analito.
- 35 6. El método según la reivindicación 1, en el que la intensidad de la señal se mide mediante un instrumento de ensayo electrónico que proporciona una lectura digital relacionada con la intensidad de la señal y en el que el instrumento: (i) determina las intensidades de las señales; (ii) calcula la diferencia entre la intensidad de la primera zona de ensayo y la intensidad de la zona de control; (iii) calcula la diferencia entre la intensidad de la segunda zona de ensayo y la intensidad de la zona de control; (iv) suma los resultados de (ii) y (iii) para llegar a un resultado de la ensayo; (v) estima la concentración aproximada de analito en la muestra comparando el resultado de ensayo con un valor predeterminado y (vi) muestra la concentración de analito aproximada.
- 40 7. El método según la reivindicación 6, en el que la concentración aproximada se estima usando una fórmula, comprendiendo la fórmula:

$$\text{concentración} = e^{\left(\frac{\text{res. prueba}-c}{a}\right)} - b,$$

donde:

45 “resultado de la ensayo” es la suma de:

la diferencia entre la intensidad de la primera zona de ensayo y la intensidad de la zona de control y

la diferencia entre la intensidad de la segunda zona de ensayo y la intensidad de la zona de control;

e es la base del logaritmo natural;



a, b y c son constantes determinables por un ajuste de la curva para una serie de datos de modelo.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente de captura de la zona de control comprende un anticuerpo.
- 5 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el agente de captura de la zona de control comprende una proteína de unión a anticuerpo.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente de captura de la primera zona de ensayo y el agente de captura de la segunda zona de ensayo están en la misma concentración.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el agente de captura de la primera zona de ensayo y el agente de captura de la segunda zona de ensayo están en concentraciones diferentes.
- 10 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente de captura de la primera zona de ensayo y el agente de captura de la segunda zona de ensayo son analito representativo o análogo del mismo.
13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha muestra líquida comprende un extracto líquido de una muestra sólida.
- 15 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el analito comprende una micotoxina.
15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la señal detectable comprende una señal visible.
- 20 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la formación de la fase móvil comprende mezclar la muestra con receptor previamente a la aplicación al soporte sólido.
17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el receptor se aplica al soporte sólido previamente al contacto del soporte sólido con la muestra y en el que la fase móvil se forma por contacto de la muestra con receptor sobre el soporte sólido.

FIGURA 1

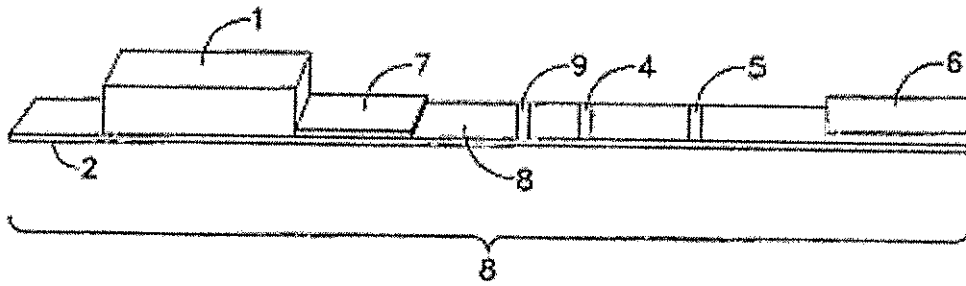


FIGURA 2A

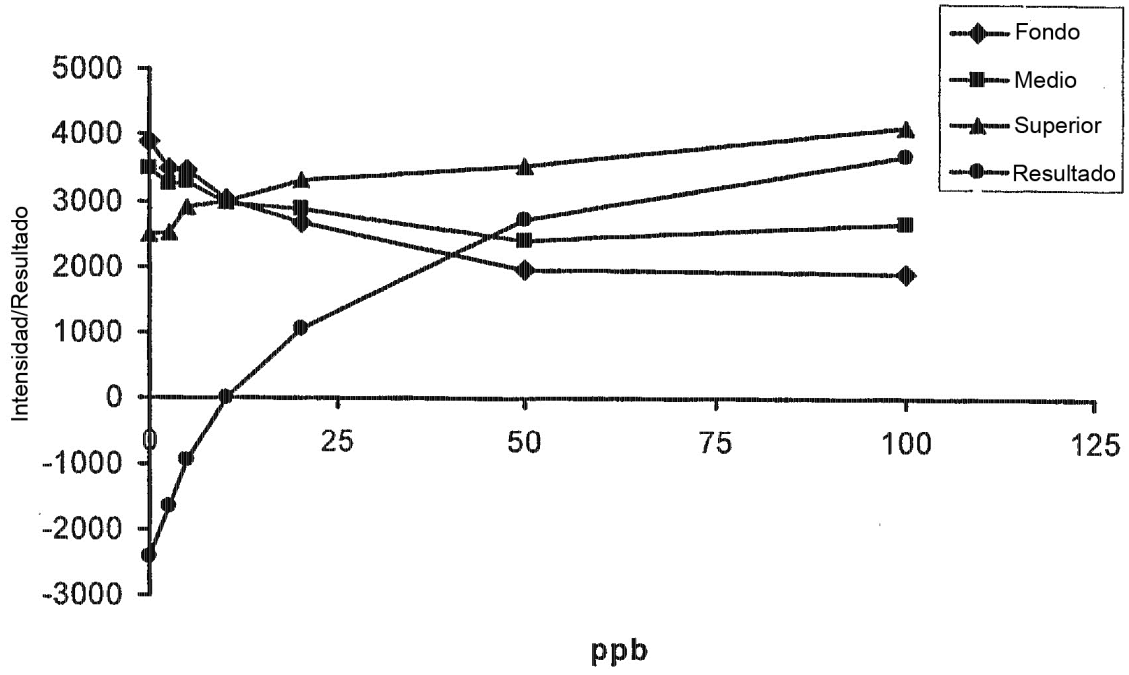


FIGURA 2B

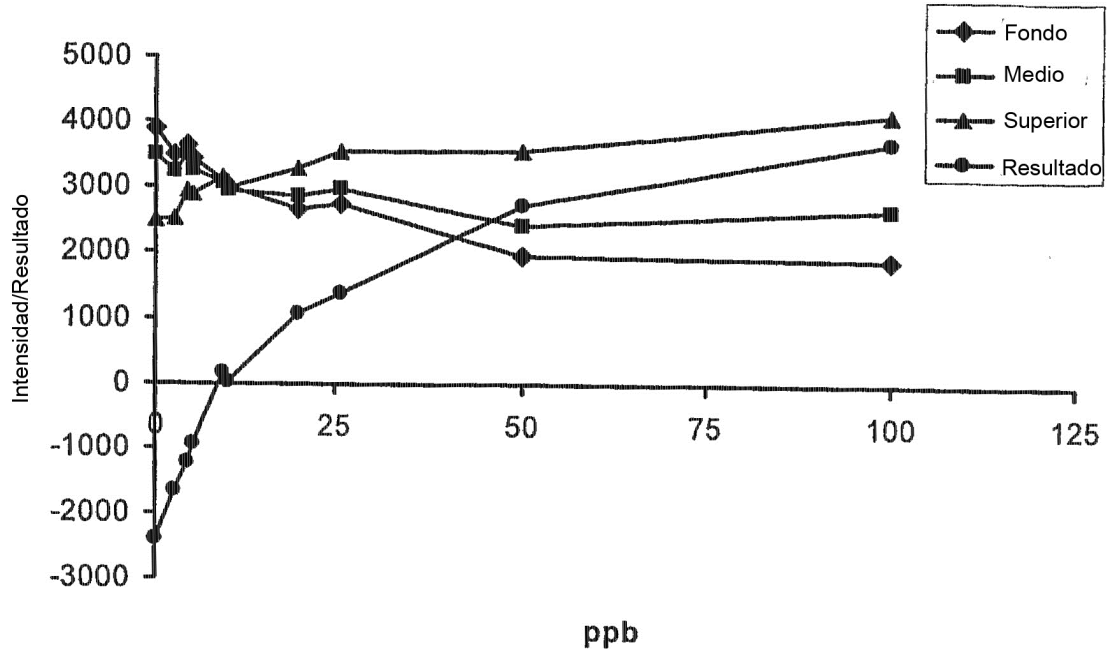


FIGURA 3A

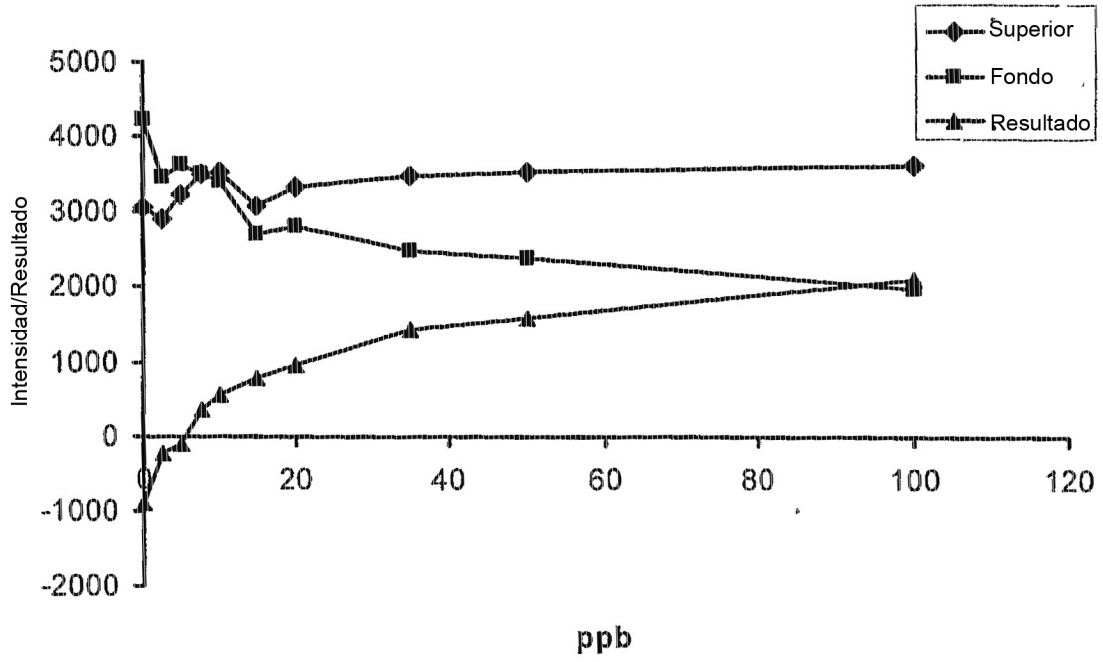


FIGURA 3B

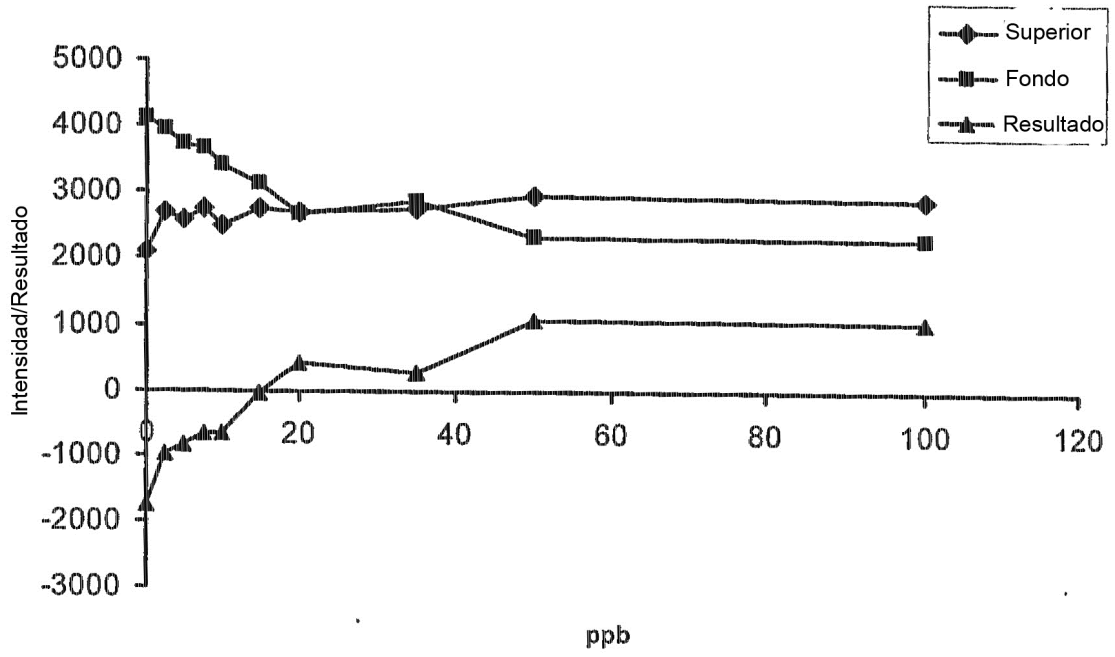


FIGURA 4

