

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 554**

51 Int. Cl.:

G01N 21/17 (2006.01)

G01N 29/24 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012** **PCT/GB2012/050772**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012** **WO12137009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012** **E 12718318 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2694946**

54 Título: **Dispositivo de detección de química óptica con transductor piroeléctrico o piezoeléctrico**

30 Prioridad:

06.04.2011 GB 201105828

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2017

73 Titular/es:

VIVACTA LIMITED (100.0%)
100 Guillat Avenue Kent Science Park
Sittingbourne, Kent ME9 8GU, GB

72 Inventor/es:

ROSS, STEVE;
RICHARDS, JULIE y
CARTER, TIM

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 599 554 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 de detección de química óptica con transductor piroeléctrico o piezoeléctrico

5 La presente invención se relaciona con un dispositivo para detectar un analito, y particularmente para mejorar la exactitud y precisión en un dispositivo que incorpora un transductor piezo/piroeléctrico.

10 El monitoreo de analitos en solución, tal como compuestos importantes biológicamente en bioensayos, tiene una amplia aplicabilidad. En consecuencia, está disponible una amplia variedad de dispositivos analíticos y de diagnóstico.

15 El documento WO 90/13017 divulga un transductor piroeléctrico u otro elemento transductor termoelectrónico en una forma de tira. Se proporcionan electrodos de película delgados y se depositan uno o más en la superficie transductora. Se somete el reactivo a un cambio colorimétrico cuando entran en contacto con la especie que está siendo detectada. El dispositivo es entonces típicamente insertado en un detector donde el transductor es iluminado usualmente a través del transductor por una fuente de luz LED y se detecta absorción de luz por el reactivo como calentamiento microscópico en la superficie transductora. Se procesa la salida de señal eléctrica del transductor para derivar la concentración de la especie que está siendo detectada.

20 El documento WO 2004/090512 divulga un dispositivo basado en la tecnología divulgada en el documento WO 90/13017, pero se basa en el hallazgo que se puede detectar la energía generada por desintegración no radiativa en una sustancia sobre irradiación con radiación electromagnética por un transductor incluso cuando la sustancia no está en contacto con el transductor, y que el retraso del tiempo entre la irradiación con radiación electromagnética y la señal eléctrica producida por el transductor es una función de la distancia de la sustancia desde la superficie de la película. Este hallazgo proporciona un dispositivo capaz de "generar perfil en profundidad" que permite al dispositivo distinguir entre un analito ligado a la superficie del transductor y un analito en el líquido a granel. Esta aplicación por lo tanto divulga un dispositivo que es capaz de ser usado en ensayos, típicamente bioensayos, sin tener que llevar a cabo un paso de lavado separado entre la realización de un evento de unión y la detección de resultados del evento (denominado un ensayo "homogéneo").

30 El sistema descrito en los documentos WO 90/13017 y WO 2004/090512 usan un transductor piezo/piroeléctrico para medir los eventos de unión. Los eventos de unión toman lugar en la superficie del transductor, y se inicia el procedimiento de medición mediante pulso de radiación electromagnética (luz) en el sistema. La absorción de luz causa calentamiento localizado de un reactivo etiquetado que, a su vez genera una carga eléctrica en el transductor. La salida eléctrica puede ser interrogada en una manera tal como para distinguir entre el reactivo unido y no unido, y por lo tanto caracteriza la cantidad de analito en una muestra fluida. Se puede determinar la rata de unión a la superficie in situ sin pasos de separación.

40 Cualquier procedimiento de medición sufrirá de imprecisión o inexactitud debido a las variaciones naturales en los componentes que constituyen el sistema. También puede haber interferencia en el procedimiento de medición de los factores ambientales, tal como temperatura o humedad. Las mediciones que se llevan a cabo en los fluidos corporales, tal como sangre o plasma, también pueden ser afectadas por la composición de aquellos fluidos. Esto se puede deber a factores de interferencia, tal como lípidos, bilirrubina y anticuerpos heterofílicos, o debido a variaciones naturales en viscosidad, hematocritos, etc.

45 Es común en analizadores de laboratorio realizar calibraciones en intervalos regulares, que confirman que el instrumento está funcionando apropiadamente, y también para calibrar el instrumento. El procedimiento de calibración mejora el procedimiento de medición mediante el ajuste del sistema para variabilidad en los componentes de diferentes lotes.

50 Sin embargo, en el sistema descrito en los documentos WO 90/13017 y WO 2004/090512, se monitorea la unión cinética de un reactivo etiquetado a la superficie del sensor in situ mediante el monitoreo de la rata de cambio de señal a lo largo del tiempo en la presencia del analito (o un complejo o derivado del analito) para ser medido. Esto es diferente para otros sistemas de inmunoensayo que usualmente miden alguna forma de posición de equilibrio que ha sido lograda después de un periodo de incubación de una longitud predeterminada. Adicionalmente, ya que el sistema descrito en los documentos WO 90/13017 y WO 2004/090512 puede medir el reactivo etiquetado en relación a la superficie del sensor, movimiento no deseado de reactivo etiquetado, o de hecho otras partículas en la cámara de medición, pueden interferir con la medición de señal. Sigue siendo por lo tanto una necesidad para sistemas proporcionar exactitud y precisión mejorada

60 En consecuencia, la presente invención proporciona un dispositivo para detectar un analito en una muestra que comprende:

65 una fuente de radiación adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética;

un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que son capaces de transducir energía generada por desintegración no radiativa en una señal eléctrica;

un detector que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor;

un primer reactivo próximo al transductor, el primer reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unir un reactivo etiquetado proporcionalmente a la concentración del analito en la muestra, cuyo reactivo etiquetado que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía mediante desintegración no radiativa;

un segundo reactivo próximo al transductor, el segundo reactivo que tiene una afinidad más baja por el reactivo etiquetado bajo las condiciones del ensayo, que el primer reactivo; y

un tercer reactivo próximo al transductor, el tercer reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unir el agente etiquetado, en el que el tercer reactivo tiene afinidad por el reactivo etiquetado que es menos influenciado que el primer reactivo por la concentración del analito o del complejo o del derivado del analito.

Así, la presente invención proporciona un dispositivo para detectar un analito que incorpora tanto los controles positivos (tercer reactivo) como negativos (segundo reactivo) para mejorar la exactitud y precisión en la detección (a través del primer reactivo).

Se describirá ahora la presente invención con referencia a los dibujos, en los que:

La Fig. 1 muestra una representación esquemática del dispositivo de detección química del documento WO 2004/090512 que es usado con la presente invención;

La Fig. 2 muestra un inmunoensayo intercalado que usa el dispositivo de la presente invención;

La Fig. 3 muestra un cartucho acuerdo con la presente invención;

La Fig. 4 muestra la salida cinética en un ensayo TSH;

La Fig. 5 muestra una curva de respuesta de dosificación TSH sin el uso de controles;

La Fig. 6 muestra una curva de respuesta de dosificación TSH que usa controles positivos y negativos;

La Fig. 7 muestra una curva de respuesta de dosificación digoxina sin usar controles;

La Fig. 8 muestra una curva de respuesta de dosificación digoxina que usa controles positivos y negativos;

La Fig. 9 muestra curvas de respuesta dosificación de ensayo digoxinas para un cartucho con múltiples rangos dinámicos;

Las Figs. 10-13 muestran un ensayo TSH en toda la sala que no usa control, únicamente control negativo, únicamente control positivo y ambos controles, respectivamente; y

La Fig. 14 muestra salidas de instrumento para determinación simultánea de TSH y niveles de digoxina que usan los mismos controles para cada ensayo

Se usa el dispositivo de la presente invención para detectar un analito en una muestra (que puede ser a través de la detección de un complejo o derivado del analito). El dispositivo comprende: una fuente de radiación adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética; un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que son capaces de transducir energía generada por desintegración no radiativa en una señal eléctrica; y un detector que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor. En una realización preferida, el dispositivo de la presente invención está basado en el dispositivo descrito en el documento WO 2004/090512.

La Fig. 1 muestra un dispositivo 1 de detección química para uso de acuerdo con la presente invención que se basa en la generación de calor en una etiqueta 2 en irradiación de la etiqueta con radiación electromagnética. Por el bien de la simplicidad, únicamente se muestra la etiqueta en la Fig. 1 (se describirán los componentes restantes del dispositivo de la presente invención en mayor detalle a continuación). La Fig. 1 muestra el dispositivo 1 de detección química en la presencia de una etiqueta 2. El dispositivo 1 comprende un transductor 3 piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene recubrimientos 4,5 de electrodos. El transductor 3 es preferiblemente una película de fluoruro de polivinilideno polarizado. Los recubrimientos 4,5 de electrodos son preferiblemente transparentes y más preferiblemente formados de óxido de estaño de indio. Los electrodos preferiblemente tienen un espesor de aproximadamente 35 nm, aunque casi cualquier espesor es posible desde un límite inferior de 1 nm por debajo de la

cual la conductividad eléctrica es muy baja y un límite superior de 100 nm por encima de la cual la transmisión óptica es muy baja (no debe ser menor de 80%T). En una realización particularmente preferida, el transductor es una película recubierta de óxido de fluoruro de polivinilideno de estaño indio.

- 5 La etiqueta 2 se mantiene próxima al transductor 3 por un evento de unión. Una característica preferida de la presente invención es que la etiqueta 2 genera calor cuando se irradia por una fuente 6 de radiación electromagnética (típicamente denominada "luz"), preferiblemente luz visible. La fuente de luz puede ser, por ejemplo, una LED. La fuente 6 de luz ilumina la etiqueta 2 con luz de la longitud de onda apropiada (por ejemplo, un color complementario). Aunque no se desea estar ligado por la teoría, se cree que la etiqueta 2 absorbe la luz para
10 generar un estado excitado que después se somete a desintegración no radiativa generando de esta manera energía, indicada por las líneas curvas en la Fig. 1. Esta energía está primariamente en la forma de calor (es decir, movimiento térmico en el medio ambiente), aunque también se pueden generar otras formas de energía, por ejemplo, una onda de choque. Sin embargo, se detecta la energía por el transductor y se convierte en una señal eléctrica. Se calibra el dispositivo de la presente invención para la etiqueta particular que se está midiendo y por lo
15 tanto, no es necesario determinar la forma precisa de la energía generada por la desintegración no radiativa. A menos que se especifique lo contrario, el término "calor" se usa aquí para indicar la energía generada por la desintegración no radiativa. Se posiciona la fuente 6 de luz de manera que ilumina la etiqueta 2. Preferiblemente, se posiciona la fuente 6 de luz opuesta al transductor 3 y los electrodos 4,5 y se ilumina la etiqueta 2 a través del transductor 3 y los electrodos 4,5. La fuente de luz puede ser una fuente de luz interna dentro del transductor en el
20 que la fuente de luz es un sistema de ondas guiadas. La guía de onda puede ser el propio transductor o la guía de onda puede ser una capa adicional unida al transductor. La longitud de onda de la iluminación depende de la etiqueta usada; por ejemplo, para etiquetas de oro de 40 nm la longitud de onda preferida es de 525 nm y para etiquetas de carbono la longitud de onda preferida es de 690 nm.
- 25 Se detecta la energía generada por la etiqueta 2 por el transductor 3 y se convierte en una señal eléctrica. Se detecta la señal eléctrica por un detector 7. La fuente 6 de luz y el detector 7 están ambos bajo el control del controlador 8. La fuente 6 de luz genera una serie de pulsos de luz (el término "luz" que se utiliza aquí indica cualquier forma de radiación electromagnética a menos que se mencione una longitud de onda específica) que se denomina "luz cortada". En principio, será suficiente un único destello de luz, es decir, un pulso de radiación electromagnética, para generar una señal del transductor 3. Sin embargo, con el fin de obtener una señal reproducible, se usa una pluralidad de destellos de luz que en la práctica requiere luz cortada. Puede variar la frecuencia a la cual se aplican los pulsos de radiación electromagnética. En el límite inferior, el retraso de tiempo entre los pulsos debe ser suficiente para el retraso de tiempo entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica que se va a determinar. En el límite superior, el retraso de tiempo entre cada pulso no debe ser tan grande de
35 manera que el período necesario para registrar los datos se vuelva injustificadamente prolongado. Preferiblemente, la frecuencia de los impulsos esta desde 1 hasta 50 Hz, más preferiblemente desde 1 hasta 10 Hz y lo más preferiblemente 2 Hz. Esto corresponde a un retraso de tiempo entre pulsos de 20-1.000 ms, 100-1.000 ms y 500 ms, respectivamente. Adicionalmente, la proporción llamada "marca-espacio", es decir, la proporción de la señal encendida a la señal apagada, es preferiblemente uno, aunque se pueden usar otras proporciones sin efecto perjudicial. Existen algunos beneficios para usar un pulso de encendido más corto con una señal de apagado más
40 larga, con el fin de permitir que el sistema se aproxime al equilibrio térmico antes de que el siguiente pulso perturbe el sistema. En una realización, un pulso de luz de 1-50 ms, preferiblemente 8 ms, seguido de un tiempo de relajación de 10-500 ms, preferiblemente 100 ms permite una medición más precisa de partículas unidas directamente a la superficie. Se conoce en la técnica fuentes de radiación electromagnética que producen luz cortada con diferentes frecuencias de corte o proporciones diferentes de marca-espacio. El detector 7 determina el tiempo de retraso entre cada pulso de luz desde la fuente 6 de luz y la señal eléctrica que corresponde detectada por el detector 7 desde el transductor 3. El solicitante ha encontrado que este tiempo de retraso es una función de la distancia, d. Se mide la señal preferiblemente desde 2-7 ms.
- 50 Se puede usar cualquier método para determinar el retraso de tiempo entre cada pulso de luz y la señal eléctrica correspondiente que proporciona resultados reproducibles. Preferiblemente, se mide el retraso de tiempo desde el inicio de cada pulso de luz hasta el punto en el que se detecta un máximo en la señal eléctrica que corresponde a la absorción de calor de la etiqueta de unión como por el detector 7.
- 55 El hallazgo de que la etiqueta 2 puede ser separada de la superficie del transductor y que aún puede ser detectada una señal fue sorprendente, ya que el experto en la técnica habría esperado que el calor se dispersara en el medio circundante y por lo tanto ser indetectable por el transductor 3, o al menos para ninguna señal significativa que va a ser recibida por el transductor. Se encontró, sorprendentemente, que no solamente la señal era detectable a través de un medio de intervención capaz de transmitir energía al transductor 3, pero que se pueden distinguir diferentes
60 distancias, d (esto ha sido denominado "generar perfilar en profundidad") y que la intensidad de la señal recibida es proporcional a la concentración de la etiqueta 2 en la distancia particular, d, de la superficie del transductor 3. Adicionalmente, se encontró que la naturaleza del medio por sí misma influye en el retraso de tiempo y la magnitud de la señal en un retraso de tiempo dado.
- 65 El dispositivo de la presente invención tiene una aplicabilidad particular en realización de inmunoensayos.

En un inmunoensayo típico, se une un anticuerpo específico para un antígeno de interés a un soporte polimérico tal como una lámina de cloruro de polivinilo o poliestireno. Se coloca una gota de extracto de célula o una muestra de suero u orina en la lámina, que se lava después de la formación del complejo anticuerpo-antígeno. Se añade entonces el anticuerpo específico para un sitio diferente en el antígeno, y se lava nuevamente la lámina. Este segundo anticuerpo lleva una etiqueta de modo que puede ser detectado con alta sensibilidad. La cantidad de segundo anticuerpo unido a la lámina es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. Son bien conocidos este ensayo y otras variaciones en este tipo de ensayo, véase, por ejemplo, "The Immunoassay Handbook, 2da ed." David Wild, Ed., Nature Publishing Group, 2001. El dispositivo de la presente invención se puede usar en cualquiera de estos ensayos. Los inmunoensayos de anticuerpos intercalados, competitivos, desplazados y anticomplejos también merecen mención particular.

A modo de una explicación del principio subyacente de la presente invención, la Fig. 2 muestra un ensayo de anticuerpo de captura típica que usa el dispositivo de la presente invención (aunque sólo se muestra el primer reactivo). El dispositivo incluye un transductor 3 y una cámara 9 de muestra para mantener un líquido 10 que contiene un analito 11 disuelto o suspendido en la misma. El transductor 3 tiene un primer reactivo, es decir, anticuerpo 12, unido al mismo. Se muestra el primer reactivo 12 unido a la película en la Fig. 2 y esta unión puede ser a través de un enlace covalente o mediante adsorción no covalente sobre la superficie, tal como por enlaces de hidrógeno. Aunque se muestra el primer reactivo como unido al transductor, es aplicable cualquier técnica para mantener el primer reactivo 12 próximo al transductor 3. Por ejemplo, una capa adicional puede separar el primer reactivo 12 y el transductor 3, tal como una capa de polímero de parileno, o puede ser unido el anticuerpo a partículas inertes y se unen entonces las partículas inertes al transductor 3. Alternativamente, se puede atrapar el primer reactivo 12 dentro de una capa de gel que cubre la superficie del transductor 3.

En uso, la cámara de muestra está llena con líquido 10 (o cualquier fluido) que contiene un analito 11. El analito 11 se une entonces al primer reactivo 12. El reactivo 13 etiquetado adicional está presente en el líquido y se forma un complejo llamado "intercalado" entre el primer reactivo 12 unido, el analito 11 y el reactivo 13 etiquetado. Se incluye un exceso de reactivo 13 etiquetado de manera que todo el antígeno 11 unido forma un complejo intercalado. La muestra contiene por lo tanto reactivo 13a etiquetado unido y reactivo 13b etiquetado unido libre en solución.

Durante o después de la formación del complejo intercalado, se irradia la muestra usando una serie de pulsos de radiación electromagnética, tal como luz. Se detecta el retraso de tiempo entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica por el transductor 3 por un detector. Se selecciona el retraso de tiempo apropiado para medir primariamente el calor generado por el reactivo 13a etiquetado unido. Ya que el tiempo de retraso es una función de la distancia de la etiqueta desde el transductor 3, el reactivo 13a etiquetado unido puede ser distinguido del reactivo 13b etiquetado no unido. Esto proporciona una ventaja significativa sobre el inmunoensayo de tipo intercalado convencional en que se elimina la necesidad de etapas de lavado. En un inmunoensayo de tipo intercalado convencional, el reactivo etiquetado no unido debe ser separado del reactivo etiquetado unido antes de tomar cualquier medida ya que el reactivo marcado no unido interfiere con la señal generada por el reactivo etiquetado unido. Sin embargo, a causa de la "generación perfil en profundidad" proporcionado por la presente invención, se puede distinguir el reactivo etiquetado unido y no unido. De hecho, la capacidad de distinguir entre las etiquetas próximas al transductor (es decir, unida) y las etiquetas en la solución a granel (es decir, no unida) es una ventaja particular de la presente invención.

La presente invención también proporciona un método para detectar un analito, o un complejo o derivado del analito, en una muestra que comprende los pasos de exponer la muestra al dispositivo como se describió aquí, que transduce la energía generada en una señal eléctrica y que detecta la señal. Preferiblemente, el método se lleva a cabo sin la eliminación de la muestra desde el transductor entre los pasos de exponer la muestra al transductor y transducir la energía generada en una señal eléctrica, es decir, el método es un ensayo homogéneo.

La presente invención proporciona controles que compensan para variabilidad natural en los componentes del sistema de medición, la variabilidad en las muestras que se mide, y la variabilidad en las condiciones ambientales durante la medición. Esto se puede lograr mediante la exposición de la muestra a los reactivos en la superficie del transductor. Los diferentes reactivos están típicamente localizados en diferentes áreas de la superficie del transductor, estando estas áreas recubiertas con diferentes reactivos. Estos controles están definidos como controles "positivos" "negativos" y, en el sentido de que el control negativo debe aproximar la señal esperada en ausencia de analito, y el control positivo debe aproximar la señal esperada cuando el analito ha saturado el sistema.

Para lograr la detección con estos controles, el dispositivo de la presente invención comprende un primer, segundo y tercer reactivos, cada uno de los cuales está próximo al transductor.

El primer reactivo tiene un sitio de unión que es capaz de unir un reactivo etiquetado proporcionalmente a la concentración del analito en la muestra. La proporcionalidad es importante para el funcionamiento del ensayo ya que la unión debe ser dependiente de la concentración del analito para cualquier medida significativa de la concentración del analito que va a ser determinada. La unión puede ser directamente proporcional o indirectamente proporcional a la concentración del analito que depende del tipo de ensayo que se realiza. En el caso de un ensayo no competitivo,

por ejemplo, un ensayo inmunométrico, la unión es directamente proporcional a la concentración del analito, pero para un ensayo competitivo, la unión es indirectamente proporcional a la concentración del analito.

5 El primer reactivo puede ser adaptado para unirse al analito, o un complejo o derivado del analito, en cuyo caso el reactivo etiquetado se unirá al primer reactivo en la presencia del analito, o el complejo o derivado del analito. En este caso, el primer reactivo tiene un sitio de unión que es capaz de unirse al reactivo etiquetado en presencia del analito o el complejo o derivado del analito. La unión es, sin embargo, aún proporcional a la concentración del analito.

10 Alternativamente, el primer reactivo puede en sí mismo ser un análogo del analito y el reactivo etiquetado se une directamente al primer reactivo (es un análogo porque está unido a la superficie del transductor ya sea a través de interacciones de enlaces covalentes o no covalentes). En este caso, el primer reactivo competirá con el analito no unido, o un complejo no unido o derivado del analito, para la unión del reactivo etiquetado. En consecuencia, el primer reactivo será simplemente capaz de unirse al reactivo etiquetado.

15 La determinación de la extensión de la unión del reactivo etiquetado para el primer reactivo (ya sea directamente o mediada por el analito/complejo o derivado del analito) proporciona una medida de la concentración del analito en la muestra.

20 El segundo reactivo tiene una afinidad más baja por el reactivo etiquetado bajo las condiciones del ensayo que el primer reactivo. En consecuencia, el segundo reactivo proporciona el control negativo. Es importante que la afinidad se considere bajo las condiciones del ensayo. La razón es que en el caso de un ensayo no competitivo, la afinidad del primer reactivo por el reactivo etiquetado está mediada por la presencia del analito, o el complejo o derivado del analito. De esta manera, en ausencia del analito, o el complejo o derivado del analito, ni el primero ni segundo reactivo tiene ninguna afinidad por el reactivo etiquetado. Sin embargo, en presencia del analito, o el complejo o derivado del analito, el segundo reactivo tiene una afinidad más baja por el reactivo etiquetado que el primer reactivo.

30 Adicionalmente, en las realizaciones donde el primer reactivo se une al analito, o al complejo o derivado del analito, el segundo reactivo tiene preferiblemente una afinidad más baja por el analito o, si se usa, el complejo o derivado del analito que el primer reactivo. El segundo reactivo es preferiblemente una proteína y más preferiblemente un anticuerpo. El segundo reactivo típicamente tiene propiedades químicas y físicas similares al primer reactivo, pero proporciona poca o ninguna afinidad por el reactivo etiquetado bajo las condiciones del ensayo. En una realización particularmente preferida, el segundo reactivo esencialmente no tiene afinidad por el reactivo etiquetado bajo las condiciones del ensayo. Preferiblemente, el segundo reactivo proporciona esencialmente ninguna afinidad por el analito o el complejo o derivado del analito. Es decir, la unión del reactivo etiquetado, o, donde corresponda, el analito o el complejo o derivado del analito, no es específico para el segundo reactivo. De esta manera, el segundo reactivo puede compensar por unión no específica del reactivo etiquetado al primer reactivo, y también puede compensar por el movimiento no deseado del reactivo etiquetado en relación con el transductor, por ejemplo, por sedimentación bajo gravedad, que puede interferir con el procedimiento de medición.

40 El tercer reactivo se une al reactivo etiquetado y tiene una afinidad por el reactivo etiquetado que está menos influenciada por la concentración en la muestra del analito o, si se usa, el complejo o derivado del analito que el primer reactivo y por consiguiente proporciona el control positivo. Preferiblemente, el tercer reactivo tiene una afinidad por el reactivo etiquetado que es esencialmente independiente de la concentración del analito o del complejo o derivado del analito. Más preferiblemente, el tercer reactivo tiene una afinidad más alta por el reactivo etiquetado bajo las condiciones del ensayo que el primer reactivo. De esta manera, el tercer reactivo mide la rata de difusión limitada de la unión del reactivo etiquetado al transductor y por consiguiente determina la señal máxima obtenible bajo difusión. En concentraciones extremadamente altas del analito o del complejo o derivado del analito, se pueden ver efectos de concentración, pero siempre que la afinidad está menos influenciada por la concentración que aquella del primer reactivo, el tercer reactivo todavía puede aún proporcionar un control positivo incluso en altas concentraciones.

50 Mediante interrogación de la salida del detector, se puede obtener una señal radiométrica que define la magnitud de la señal de la unión al primer reactivo (es decir, la señal de medición) en relación a la unión del segundo y tercer reactivo (es decir, los controles positivos y negativos, respectivamente) como una salida fraccional entre 0.000 y 1.000.

60 El primer, segundo y tercer reactivos pueden estar unidos al transductor usando técnicas conocidas en la técnica. Preferiblemente, la unión es a través de la unión no covalente, por ejemplo, se absorbe una capa primaria en el transductor y los reactivos se unen a la capa primaria por un evento de unión.

65 El ensayo también requiere la presencia de un reactivo etiquetado. Por reactivo "etiquetado" se indica un reactivo que está unido a una etiqueta, cuya etiqueta es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía por desintegración no radiativa. Es en esta desintegración no radiativa en la que se transduce en una señal eléctrica por el transductor.

La etiqueta puede por lo tanto estar compuesta de cualquier material que es capaz de interactuar con la radiación electromagnética de esta manera. Preferiblemente la etiqueta es seleccionada de, pero no limitado a, una partícula de carbono, una partícula de polímero coloreada (por ejemplo, látex coloreado), una molécula tenida, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica (por ejemplo, oro), una molécula de hemoglobina, un glóbulo rojo, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cáscara metálica, una partícula compuesta de polipirrol o un derivado del mismo, y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la etiqueta es una partícula de carbono o una partícula de oro y lo más preferentemente una partícula de carbono.

En el caso de una partícula magnética, la radiación electromagnética es una radiación de frecuencia de radio. Todas las otras etiquetas mencionadas anteriormente emplean la luz, que puede incluir radiación IR o UV. Las partículas de oro están disponibles comercialmente o se pueden preparar usando métodos conocidos (véase por ejemplo G. Frens, *Nature*, 241, 20-22 (1973)). Para una explicación más detallada de la etiqueta de nanopartícula véanse los documentos US 6.344.272 y WO 2007/141581.

Preferiblemente, la presente invención usa una partícula que tiene un tamaño de partícula desde 20 hasta 1000 nm, más preferiblemente desde 100 hasta 500 nm. Por tamaño de partícula se indica el diámetro de la partícula en su punto más ancho. La densidad de la partícula dependerá del tipo de ensayo. Cuando se controla el ensayo por difusión, la partícula preferiblemente tiene una densidad desde 0,5 hasta 3,0 g / ml, más preferiblemente 1,5 hasta 2,0 g / ml y lo más preferiblemente 1,8 g / ml. En este tipo de ensayo, la partícula es una partícula de carbono que tiene el tamaño de partícula mencionado anteriormente y densidad. Cuando el ensayo es de gravedad asistida, la partícula preferiblemente tiene una densidad desde 1,5 hasta 23 g / ml, más preferiblemente 15-20 g / ml y lo más preferiblemente 19 g / ml. En este tipo de ensayo, la partícula es una partícula de oro que tiene el tamaño de partícula mencionado anteriormente y densidad.

La etiqueta está próxima al transductor cuando ha ocurrido el evento de unión. Es decir, la etiqueta está suficientemente cerca de la superficie del transductor para que el transductor sea capaz de detectar la energía generada por la etiqueta en la irradiación de la muestra. La distancia real entre la etiqueta y la superficie del transductor, sin embargo, dependerá de un número de variables, tales como el tamaño y naturaleza de la etiqueta, el tamaño y naturaleza de los anticuerpos y el analito, la naturaleza del medio de muestra, y la naturaleza de la radiación electromagnética y la configuración correspondiente del detector. El dispositivo de la presente invención puede incluir una fuente de radiación que está adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética y el detector está adaptado para determinar el retraso de tiempo entre cada pulso de radiación electromagnética desde la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica permitiendo de este modo una determinación precisa de la posición de la etiqueta con respecto al transductor como se discutió con referencia a la Fig. 1.

La naturaleza del primer, segundo y tercer reactivos, así como el reactivo etiquetado, dependerá de la naturaleza del analito, pero son preferiblemente anticuerpos. En una realización particularmente preferida, el reactivo etiquetado comprende un anticuerpo levantado al analito o el complejo o derivado del analito, el primer reactivo es un anticuerpo levantado al analito o el complejo o derivado del analito, el segundo reactivo es un anticuerpo de control de isotipo, y el tercer reactivo es un anticuerpo antiespecie. En principio, una molécula individual podría ser usada para cada reactivo, pero en la práctica, el primer, segundo y tercer reactivos, así como el reactivo etiquetado, son una población de moléculas. El término "anticuerpo" preferiblemente incluye dentro de su alcance un fragmento Fab, un fragmento variable de cadena individual (scFv), y un fragmento de unión recombinante.

En una realización preferida, particularmente pero no limitada a donde los reactivos son anticuerpos, la constante de afinidad del tercer reactivo es $\geq 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, más preferiblemente $\geq 10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. La afinidad se puede determinar usando la ecuación de Scatchard con la absorbancia medida en un ELISA, un método común para la determinación de las afinidades de anticuerpos, como se describe en "Immunoassays" Ed. J. P. Gosling, Oxford University Press, 2000, páginas 80-83. El segundo reactivo tiene preferiblemente una afinidad tal que la rata de unión cinética es $\leq 10\%$ del tercer reactivo y más preferiblemente $\leq 5\%$.

Como alternativas a las reacciones anticuerpo-antígeno, los reactivos y analito puede ser un primer y segundo ácido nucleico, donde el primer y segundo ácidos nucleicos son complementarios, o un reactivo que contiene avidina o derivados de los mismos y un analito que contiene biotina o derivados de los mismos, o viceversa. Los reactivos también pueden ser aptámeros. El sistema tampoco está limitado a ensayos biológicos y puede aplicarse, por ejemplo, para la detección de metales pesados en el agua. El sistema tampoco tiene que limitarse a líquidos y se puede usar cualquier sistema de fluidos, por ejemplo, la detección de enzimas, células y virus etc. en el aire.

La señal observable máxima es la señal máxima que se puede lograr cuando se monitorea la unión de la etiqueta a una superficie. En la ausencia de fenómenos de transporte de masas alternativos (por ejemplo, convección, movimiento magnético, capacidad de flotar, sedimentación, etc.), la unión de las partículas al transductor se rige por la rata de difusión del analito y el reactivo etiquetado que es, a su vez, gobernado en gran parte por el radio

hidrodinámico de estos componentes y la viscosidad/temperatura de la muestra. Los controles positivos y negativos deben dar señales que son independientes de la ausencia o presencia del analito que se va a medir.

Se ha encontrado que para ensayos inmunométricos (es decir intercalado o reactivo en exceso), las mejoras en el rendimiento se pueden lograr mediante el uso de un anticuerpo antiespecie como el control positivo (que reconoce un anticuerpo antianalito en el reactivo etiquetado), y un anticuerpo de control isótopo no reactivo (o simplemente una superficie no reactiva) como el control negativo. Cuando se usa en combinación, estos controles definen los límites superior e inferior del rango de medición del sistema. Así, la salida del sistema se define como la proporción de dónde se encuentra la medición entre estos dos límites. Sorprendentemente se puede usar esta combinación para tener en cuenta variaciones en los componentes del sistema (por ejemplo, el material que forma el transductor), las condiciones ambientales, la variabilidad de la muestra y el movimiento de partícula no deseado (por ejemplo, sedimentación) en combinación. Los controles proporcionados por la presente invención se han encontrado para compensar todos estos parámetros al mismo tiempo.

Si una molécula es suficientemente pequeña que no se logra la formación de un intercalado de anticuerpo, se deben considerar diferentes tipos de ensayo. Una clase de ensayo para moléculas pequeñas es el "ensayo competitivo", en el que el analito de interés compite con otro componente en el sistema para prevenir la unión. En ensayos competitivos la señal está relacionada inversamente con la concentración de analito. Un tipo particular de ensayo se presenta en el que se inmoviliza un anticuerpo para el analito en el transductor, y se introduce un análogo etiquetado del analito en la muestra. El analito y el análogo etiquetado del analito a continuación "compiten" por el anticuerpo en la superficie. En ausencia de analito, entonces el análogo etiquetado se unirá a la máxima rata posible. Sin embargo, en la presencia del analito, el anticuerpo en el transductor se puebla con el analito y se disminuye la rata de unión del análogo. La presente invención tiene aplicabilidad para tales ensayos en los que los controles reducen la variabilidad en el sistema.

Se puede lograr la incorporación del análogo del analito en la partícula uniendo primero el análogo a un vehículo para formar un conjugado de análogo-vehículo, y luego unir el conjugado a la superficie de la etiqueta. El vehículo es preferiblemente una proteína, un polisacárido o un polímero sintético. La unión del análogo al vehículo es preferentemente mediante unión covalente. La unión del conjugado a la superficie del vehículo se consigue preferiblemente mediante la adsorción del conjugado a la superficie de la etiqueta. Una aproximación para imitar la rata de unión máxima es usar un tercer reactivo en la superficie del transductor, que reconoce el vehículo, por ejemplo, un anticuerpo levantado a la proteína vehículo. Sin embargo, la rata de unión en este control puede ser subóptima, debido a que el análogo puede enmascarar la superficie del vehículo, haciéndolo estéricamente impedido. Las poblaciones relativas de vehículos y análogos en la partícula también podrían ser muy diferentes.

Así, para los ensayos competitivos, el reactivo etiquetado comprende preferiblemente una etiqueta que tiene un vehículo unido a la misma, en la que el vehículo tiene dos moléculas diferentes unidas a la misma. La primera molécula es un análogo del analito y la segunda molécula no está relacionada, pero de tamaño similar al análogo/analito. Las dos moléculas diferentes, podrán ser preferiblemente conjugadas al vehículo en una proporción molar 1: 1 entre sí. El tercer reactivo unirá entonces el reactivo etiquetado a una rata similar a la del segundo reactivo en la ausencia de analito.

Se diseñó específicamente el reactivo etiquetado para uso en tal ensayo (es decir, un ensayo competitivo) para uso con el dispositivo de la presente invención. Así, la presente invención proporciona adicionalmente un reactivo etiquetado que comprende una etiqueta capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por desintegración no radiativa, un vehículo unido la etiqueta, y unido al vehículo, un primer miembro de un primer par de unión complementario y un primer miembro de un segundo par de unión complementario. El primer miembro del primer par de unión complementario es un análogo del analito que va a ser detectado y por lo tanto el segundo miembro del primer par de unión complementario será el primer reactivo, por ejemplo, un anticuerpo levantado al analito. El primer miembro del segundo par de unión complementario es una molécula que no se encuentra normalmente en la muestra, y que es capaz de unirse al tercer reactivo. El segundo miembro del segundo par de unión complementario será el tercer reactivo. El vehículo es preferiblemente una proteína. El primer y segundo pares de unión complementarios son diferentes, en el sentido en que los miembros primero y segundo de los respectivos pares no tendrían ninguna afinidad por el otro. A modo de ejemplo, el analito es el medicamento de digoxina, la etiqueta es una partícula de carbono, el vehículo es albúmina de suero bovino, el primer miembro del primer par de unión complementario es digoxigenina (un análogo de digoxina), el segundo miembro del primer par de unión complementario es un anticuerpo de antidigoxina, el primer miembro del segundo par de unión complementario es isotiocianato de fluoresceína y el segundo miembro del segundo par de unión complementario es un anticuerpo de antilfluoresceína.

Los Ejemplos del primer miembro del primer par de unión complementario son medicamentos terapéuticos (por ejemplo, carbamazepina, ciclosporina, digoxina, teofilina y gentamicina), medicamentos de abuso (por ejemplo, opiáceos, cocaína y anfetamina), vitaminas (por ejemplo, vitamina D, vitamina B12 y folato) y hormonas (T3, T4, cortisol, progesterona, estradiol y testosterona); y los ejemplos del primer miembro del segundo par de unión complementaria son BODIPY FL, Dansyl, AlexaFluor 405, AlexaFluor 488, Amarillo Lucifer, Rodamina, Rojo Texas,

biotina (a menos que se use para la inmovilización del primer, segundo y/o tercer reactivo) y ácido de dinitrofenilo aminohexanoico.

Con el fin de aumentar el rango dinámico de un ensayo realizado de acuerdo con la presente invención, al tiempo que también mejora la precisión, se prefiere tener el primer reactivo en una pluralidad de ubicaciones en el transductor. Estas ubicaciones pueden ser sintonizadas para diferentes sensibilidades, variando la concentración del primer reactivo en cada lugar. Cada ubicación también puede tener sus propios segundo y tercer reactivos para actuar como controles para los diferentes rangos dinámicos. Esto es particularmente aplicable a ensayos competitivos que son particularmente sensibles a la concentración de cada uno de los componentes individuales que componen el sistema.

El dispositivo también puede tener una pluralidad de ubicaciones como se describió anteriormente, y el reactivo etiquetado también tiene dos sitios de unión diferentes. En este caso el analito bloquea un sitio en la etiqueta en una sola ubicación, pero esto no inhibe la unión al reactivo en el control.

El analito puede ser una macromolécula o una molécula pequeña. La macromolécula es típicamente una proteína, tal como una hormona basada en proteína, y también puede ser parte de una partícula más grande, tal como un virus, una bacteria, una célula (por ejemplo, un glóbulo rojo) o un prión. La molécula pequeña puede ser un medicamento.

El término "molécula pequeña" usado aquí es un término de la técnica y se usa para distinguir la molécula de macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Una molécula pequeña se indica usualmente en el campo de los inmunoensayos como un "hapteno", que es una molécula pequeña que, cuando se une a una molécula vehículo grande tal como una proteína, puede provocar una respuesta inmune e incluye moléculas tales como hormonas y medicamentos de síntesis. Una pequeña molécula de este tipo tendrá típicamente un peso molecular de 2.000 o menos, usualmente 1.000 o menos e incluso 500 o menos. El primer reactivo puede estar adaptado para unirse al mismo analito, aunque se puede someter el analito a una reacción química o evento complejo inicial antes de la unión al primer reactivo. Por ejemplo, el analito puede estar protonado/desprotonado en el pH de las condiciones del ensayo. De este modo, el analito que está unido al primer reactivo puede ser el mismo analito o un derivado del analito; ambos están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

En una realización preferida, la presente invención se puede usar para detectar la presencia de una molécula pequeña y una macromolécula en la misma muestra al mismo tiempo. Es decir, la muestra incluye al menos dos analitos, uno que es una molécula pequeña y uno que es una macromolécula. Se usan al menos dos primeros reactivos, uno para unirse a la molécula pequeña en un ensayo competitivo y uno para unirse a la macromolécula en un ensayo inmunométrico. El segundo y tercer reactivos son preferiblemente el mismo, es decir, los controles positivos y negativos son los mismos para ambos tipos de ensayo.

La muestra que se sospecha que contiene el analito de interés será generalmente una muestra de fluido, por ejemplo, una muestra líquida, y usualmente una muestra biológica, tal como un fluido corporal, por ejemplo, sangre, plasma, saliva, suero u orina. La muestra puede contener partículas suspendidas y puede incluso ser sangre entera. Una ventaja del método de la presente invención es que el ensayo puede realizarse en una muestra que contiene partículas suspendidas, sin influir indebidamente los resultados del ensayo. La muestra típicamente estará en el orden de microlitros (por ejemplo 1 a 100 μL , preferiblemente de 1 a 10 μL). Con el fin de mantener una muestra de fluido, se sitúa preferiblemente el transductor en una cámara de muestra que tiene una o más paredes laterales, una superficie superior y una superficie inferior. En consecuencia, el dispositivo de la presente invención preferiblemente comprende adicionalmente una cámara para mantener una muestra líquida que contiene el analito o el complejo o derivado del analito en contacto con el transductor. En una realización preferida, el transductor es integral con la cámara, es decir, que forma una de las paredes laterales, o superficie superior o inferior que definen la cámara. Preferiblemente, el transductor forma la superficie superior como se muestra en la Fig. 3. Claramente, el primer, segundo y tercer reactivos y el reactivo etiquetado estarán en las superficies interiores de la cámara para permitir el contacto con la muestra. La muestra puede simplemente ser retenida por fuerzas de tensión superficial, por ejemplo, dentro de un canal capilar.

El dispositivo contiene preferiblemente una primera cámara que contiene el primer reactivo, una segunda cámara que contiene el segundo reactivo y tercera cámara que contiene el tercer reactivo. La primera, segunda y tercera cámaras están preferiblemente en comunicación fluida. El dispositivo preferiblemente contiene adicionalmente un canal capilar que tiene un extremo de recepción de muestra que es el contacto con el exterior del dispositivo y un extremo de suministro de muestra que está en comunicación fluida con las cámaras de la muestra, como se muestra en el núcleo 21 en la Fig. 3.

El reactivo etiquetado y opcionalmente uno o más reactivos adicionales se almacenan preferiblemente en una cámara incorporada en el dispositivo de la presente invención. El reactivo etiquetado también se puede suministrar como parte del kit que incorpora el dispositivo y el reactivo etiquetado. En consecuencia, la presente invención también proporciona un kit que comprende el dispositivo como se describió aquí y el reactivo etiquetado. El reactivo etiquetado se puede depositar sobre la superficie del transductor.

El dispositivo de la presente invención no se limita a detectar únicamente un analito y se pueden detectar diferentes analitos mediante el empleo de diferentes primeros reactivos que selectivamente unen cada analito, o un derivado o complejo del analito, que son detectados. Se pueden llevar a cabo múltiples pruebas usando sólo una conexión eléctrica con el transductor, iluminando diferentes locaciones del transductor y que interroga las salidas secuencialmente.

Una fuente potencial adicional de la interferencia de fondo es la sedimentación de partículas suspendidas en la superficie del transductor piezo/piroeléctrico, que incluyen el reactivo etiquetado y componentes celulares de la muestra. Esta fuente de interferencia se puede reducir posicionando el transductor por encima de la solución a granel, por ejemplo, en la superficie superior de la cámara de reacción. Así, si ocurre cualquier sedimentación, no interferirá con el transductor. Alternativamente, las partículas podrían ser menos densas que el medio y por lo tanto flotan en la superficie de la solución a granel en lugar de sedimentarse en la superficie del transductor. Se incluyen ésta y otras modificaciones en el alcance de la presente invención.

En una realización preferida, el dispositivo de la presente invención consiste esencialmente en las características descritas anteriormente. Por "esencialmente" se indica que no se requieren otras características para realizar el ensayo. El dispositivo puede tomar la forma de un lector independiente y cartucho, o un dispositivo integrado. En el anterior, el dispositivo está formado de un lector y un cartucho, en el que el cartucho es acoplable de forma desmontable con el lector, y en el que el lector incorpora la fuente de radiación y el detector, y el cartucho incorpora el transductor y el primer, segundo y tercer reactivos. El lector es preferiblemente un lector portátil. La presente invención también proporciona el cartucho que comprende el transductor y el primer, segundo y tercer reactivos como se definió aquí. El cartucho es, preferiblemente, un cartucho desechable.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Película de PVDF

Se usó una película bimorfa de fluoruro de polivinilideno (PVDF) piezo/piroeléctrica polarizada, recubierta con óxido de estaño indio como el dispositivo de detección en los siguientes ejemplos. Se recubrió la superficie de óxido de estaño indio con una capa de parileno (de espesor aproximado de 1 micra) por un proceso de deposición de gas de fase de vapor. Este método implicó la sublimación y la subsiguiente pirólisis de un precursor de paraciclofano, seguido por una polimerización de radicales libres en la superficie. Véase el documento WO 2009/141637 para más detalles. A continuación, la película resultante se recubrió con solución de polistreptavidina (200 µg/mL en PBS - 10 mmol/L de amortiguador de fosfato que contiene 2,7 mmol/L de KCl, 137 mmol/L de NaCl y 0,05% de Tween) por incubación a temperatura ambiente durante la noche. Se preparó la polistreptavidina como se describió por Tischer et al (US 5,061,640).

Ejemplo 2

Materiales

Los anticuerpos monoclonales se levantaron esencialmente como se describe en "Monoclonal Antibodies: Properties, Manufacture and Applications" por J. R. Birch y E. S. Lennox, Wiley-Blackwell, 1995, y biotinilados por métodos conocidos en la técnica. Se prepararon conjugados de reportero de carbono etiquetados esencialmente como se describió por Van Doorn et al. (US 5.641.689).

Ejemplo 3

Preparación del cartucho

Como se muestra en la Fig. 3, se fabricó un cartucho 14 para realizar el ensayo. El cartucho 14 se fabricó a partir de un anticuerpo recubierto de piezo/piropelícula 15 soportado sobre un rigidizador 16. Se aplicó a la superficie un troquel 17 de película de poliéster recubierta con adhesivo sensible a la presión para formar tres cámaras 18 de muestras. Se hizo una provisión para permitir conexiones eléctricas en las superficies superior e inferior de la piezo/piropelícula 15 con el fin de detectar la carga generada. El cartucho 14 se forma entonces intercalando los componentes anteriores entre una cubierta superior 19, a la que se aplicó una etiqueta 20, y una cubierta 21 de núcleo, el sello 22 y la parte inferior 23.

Los ensayos se llevaron a cabo mediante carga de las cámaras de muestra con la muestra a través del canal capilar en el núcleo 21. La piezo/piropelícula 15 se irradió a través de los agujeros en la cubierta 19 superiores con luz LED

cortada de forma secuencial con LED. Para cada pulso LED, se mide un voltaje a través de la piezo/piropelícula 15 usando un amplificador y convertidor análogo a digital (ADC). La señal de ADC se representa en el tiempo.

Ejemplo 4

Un ensayo inmunométrico con controles

Se recubrieron las tiras de película de polímero piroeléctrico PVDF en tres áreas separadas con un recubrimiento de estreptavidina universal. Se separaron las tres áreas por un espaciador adhesivo unido a la superficie del sensor, que permite la posterior incubación de diferentes anticuerpos biotinilados en cada área sin contaminación cruzada de las superficies. Se recubrieron las tres superficies (punto 1, punto 2 y punto 3 etiquetados) con tres anticuerpos diferentes a una concentración de 1 µg/mL durante 2 horas, a continuación se lavaron las superficies y se secaron en presencia de estabilizante de sacarosa.

Se recubrió el punto 1 con un anticuerpo de control negativo (Abcam, cat. No. AB37358, isotipo de IgG de ratón, biotinilado), se recubrió el punto 2 con un anticuerpo antiTSH monoclonal y se recubrió el punto 3 con un anticuerpo antiratón de cabra policlonal que actuó como control positivo. Una vez que se prepararon las bandas se ensamblaron en los cartuchos mediante la eliminación del recubrimiento de liberación del espaciador adhesivo y uniendo cada tira a una pieza moldeada por inyección, el ensamblaje final que genera tres cámaras interconectadas. Estas cámaras son discoideas, con un diámetro de aproximadamente 6 mm y una profundidad de aproximadamente 200 micras, con un volumen interno de aproximadamente 6 µL. Cada cartucho contiene también una cantidad previamente medida de partículas de carbono recubiertas de un anticuerpo antiTSH que coincide. Se secaron hacia abajo las partículas de carbono en el cartucho y el cartucho tenía un mecanismo para mezclar una muestra líquida con estos reactivos secos para dar una mezcla homogénea y luego se mueve la mezcla para llenar las tres cámaras como se describió anteriormente. La concentración final de partículas de carbono en la muestra después de la mezcla fue de aproximadamente 0,03%. Se preparó previamente un rango de estándares con concentraciones conocidas de hormona estimulante del tiroides (TSH) en el plasma humano reunido y se confirmaron los niveles de TSH en un analizador de laboratorio. Se llevó a cabo un número (15) de mediciones repetidas en cada lote de plasma. Cada medición usa uno de los cartuchos prepreparados; se introdujo la muestra en el cartucho, a continuación se inserta el cartucho en un instrumento diseñado para medir la salida eléctrica de la película piroeléctrica.

El instrumento contiene una bomba de desplazamiento que mezcla la muestra, volumen total de 30 µL, con las partículas de carbono y luego vacía la mezcla homogénea en las cámaras. El instrumento entonces ilumina cada cámara secuencialmente durante un período de 10 minutos usando tres LED de alta potencia que pulsan durante aproximadamente 10 milisegundos, seguido de un período de descanso de 90 milisegundos. El instrumento amplifica la salida eléctrica que resulta del sensor piezo/piroeléctrico tras la iluminación por los LED. Se genera una señal por la absorción de luz por las partículas de carbono, seguido por la disipación de calor de las partículas en el sensor piezo/piroeléctrico. El movimiento de partículas de carbono en la cámara, ya sea por eventos de unión directos o efectos de sedimentación no deseados, dio lugar a cambios en la salida eléctrica con el tiempo. La salida eléctrica se convirtió en una señal digital y se manipularon los datos por un procesador a bordo para dar la salida de cada cámara como un cambio de rata de la señal en una escala digital arbitraria, como se muestra en la Fig. 4.

Se llevaron a cabo aproximadamente 15 mediciones repetidas en muestras frescas en seis concentraciones de TSH diferentes (0, 1.19, 2.54, 5.24, 10.27 y 24.9 mUI/L), que da aproximadamente 90 mediciones independientes en 90 cartuchos, con tres salidas individuales de cada cartucho. Los resultados se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de puntos individuales para un ensayo inmunométrico TSH

Concentración (mIU/L)	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Concentración (mIU/L)	Punto 1	Punto 2	Punto 3
0	-430,863	-279,172	5136,154	5,24	-361,523	1214,043	6143,862
0	-296,232	-307,677	5159,129	5,24	-256,606	1292,465	7382,176
0	-380,79	-300,006	5059,33	5,24	-293,167	1405,229	6389,369
0	-425,025	-312,423	5185,2	5,24	-444,116	1205,073	5563,494
0	-350,304	-201,163	5710,019	5,24	-223,645	1366,035	6994,522
0	-451,426	-393,822	5078,857	5,24	395,689	2030,376	7792,629
0	-318,709	-247,329	5412,108	5,24	-140,611	1260,19	7006,528

ES 2 599 554 T3

0	-299,058	-191,774	6147,915	5,24	-556,551	1173,356	6982,299
0	-389,291	-288,363	5185,041	5,24	-503,66	1115,905	5657,636
0	-310,501	-231,196	5758,596	5,24	-334,672	1136,085	6463,521
0	-327,634	-250,329	5383,575	5,24	-266,012	1116,454	5936,568
0	-444,138	-401,929	5236,325	5,24	-736,863	917,7635	7117,094
0	-187,659	-42,5472	6279,682	5,24	-322,266	1447,608	6757,25
0	-372,483	-272,93	5778,189	5,24	-360,08	1224,651	6324,574
0	-476,934	-321,148	5225,461	5,24	4,649984	1650,931	6305,24
1,19	-201,299	319,0674	6474,52	10,27	-388,176	2481,799	6262,157
1,19	-481,461	19,62871	6740,012	10,27	-254,328	2468,424	7132,248
1,19	52,09882	444,9094	6247,385	10,27	-340,157	2810,874	6898,286
1,19	-53,6086	368,0161	6393,713	10,27	-122,522	2352,549	6612,683
1,19	-208,354	298,7357	6489,471	10,27	525,3487	3602,455	7480,42
1,19	-308,557	153,4231	6519,541	10,27	-8,61887	2605,52	6656,873
1,19	-421,218	26,96297	6350,21	10,27	-169,62	2891,513	6812,896
1,19	-397,324	60,92422	5678,382	10,27	-96,4464	3015,453	6644,907
1,19	-209,928	296,8847	6632,587	10,27	-424,326	2359,531	6447,036
1,19	-490,974	118,0116	6837,468	10,27	-284,951	2364,508	6354,903
1,19	-96,5631	384,0316	6567,408	10,27	-82,7793	2763,07	7170,986
1,19	80,95813	518,0436	7282,508	10,27	-144,016	2706,903	6631,797
2,54	-188,86	604,9265	6593,611	10,27	-282,749	2311,535	6301,425
2,54	-185,094	712,4469	6208,82	10,27	-267,324	3138,583	6741,278
2,54	-76,4958	796,7206	6393,329	10,27	-334,896	2456,141	5712,895
2,54	-175,388	707,2111	5886,147	24,9	-69,9036	4419,074	6317,318
2,54	-510,367	479,456	6125,135	24,9	-55,5322	4513,409	6582,04
2,54	-378,367	535,6407	5848,956	24,9	-170,798	4718,44	6472,349
2,54	-265,587	539,303	6027,396	24,9	-135,12	5067,31	6306,789
2,54	-93,8712	864,2397	7658,574	24,9	-97,5404	4741,483	6936,42
2,54	-272,236	614,9602	6126,295	24,9	-291,587	4297,627	6426,706
2,54	-188,466	497,0843	6108,217	24,9	-220,074	4174,713	6430,509
2,54	-369,535	535,506	5996,976	24,9	-83,8839	5296,298	7413,253
2,54	-667,347	243,174	6624,185	24,9	-227,478	4265,226	6072,64
2,54	-102,437	873,7737	6793,541	24,9	-107,843	5074,911	7078,268
2,54	-2,66799	972,6595	6854,81	24,9	-30,7539	4531,776	6582,249
				24,9	187,5346	4842,325	6938,801

				24,9	100,3582	5020,915	6818,821
				24,9	-160,695	4690,446	7000,276
				24,9	543,4999	5328,066	6631,408

Se manipularon los datos de la Tabla 1 en una de cuatro maneras para cada cartucho

- 5 Método de análisis 1: Para cada concentración de TSH, se promedió la salida del punto 2, y se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) para cada concentración.

10 Método de análisis 2: Para cada concentración de TSH, se restó la salida del punto 1 de la salida en el punto 2 (es decir, punto 1 se usó como una línea base para la medición), a continuación se promediaron las salidas, y se calculó la desviación estándar media y el CV en cada concentración.

15 Método de análisis 3: Para cada concentración de TSH, se dividió la salida del punto 2 por la salida del punto 3 (es decir, punto 3 se usó como un factor de escala para la medición), a continuación, se calculó la media, la SD y CV para cada concentración

20 Método de análisis 4: Para cada concentración de TSH, se restó la salida del punto 1 de las salidas en ambos punto 2 y punto 3 (es decir, ambas medidas eran la línea base corregida). A continuación la línea base de medición corregida en el punto 2 se dividió por la línea base corregida de medición en el punto 3. Se calculó la media, SD y CV en cada concentración.

Se resumen los valores de CV, que son una medida de la precisión del ensayo, para cada uno de los cuatro métodos de análisis de datos en la Tabla 2.

Tabla 2. Medidas de precisión para los métodos de análisis de datos en un ensayo inmunométrico.

Concentración del analito (mIU/L)	CV			
	Sin controles	Control punto 3	Control punto 2	Ambos controles
0	-	-	-	-
1,19	67,64	11,75	66,19	9,30
2,54	30,19	9,31	26,50	9,04
5,24	20,23	6,93	17,17	5,97
10,27	13,43	8,77	10,15	8,37
24,9	7,79	6,11	6,26	5,63

30 Se puede ver claramente de la Tabla 2 que el método que usa ambos controles da los CV más bajos en todas las concentraciones. La curva dosificación-respuesta para los datos que usan los controles se muestra en la Fig. 5, y la curva similar que usa ambos controles se muestran en la Fig. 6.

Ejemplo 5

Un ensayo competitivo con controles

35 Los cartuchos se prepararon de una manera similar al Ejemplo 4, con el mismo anticuerpo recubierto en el punto 1. El punto 2 se recubrió en un anticuerpo antidigoxina monoclonal y el punto 3 se recubrió en un anticuerpo antifluoresceína monoclonal. En este ejemplo las partículas de carbono se recubrieron en la albúmina de suero bovino (BSA) que había sido secuencialmente pretratada con N-hidroxisuccinimida de digoxigenina e isotiocianato de fluoresceína, ambas a una proporción molar de cinco veces con respecto a la BSA. El coconjugado de BSA-digoxigenina-fluoresceína se recubrió sobre las partículas de carbono por adsorción pasiva. Digoxigenina es un análogo de digoxina (un medicamento cardíaco), y también se une al anticuerpo de antidigoxina, aunque con una constante de unión más baja que la misma digoxina.

45 Los ensayos se llevaron a cabo por niveles de digoxina en plasma reunido que había sido pinchado previamente con digoxina, los niveles de los cuales se confirmaron en un analizador de laboratorio. La presencia de la digoxina en la muestra perturbó la unión de las partículas de carbono al anticuerpo de antidigoxina en el punto 2 del cartucho. Sin embargo, la digoxina no interfirió con la unión de las partículas en el punto 3 (nótese que la fluoresceína no está

normalmente presente en muestras de sangre humana). Así, el punto 3 actuó como un control, que era independiente de la concentración de digoxina.

Se dan los datos de cada punto en diferentes concentraciones de digoxina en la Tabla 3.

5

Tabla 3. Salidas puntuales individuales para un ensayo competitivo de digoxina.

Concentración de Digoxina (ng/mL)	Punto 1	Punto 2	Punto 3
0	-102,874	1844,799	3147,182
0	-99,816	1869,622	3212,036
0	-78,5547	2070,562	3573,290
0	-50,2311	1887,335	3278,480
0	-142,978	1944,553	3460,877
0	-8,78611	2034,704	3254,373
0	-77,914	1870,201	3145,893
0	-72,6845	1726,972	2991,395
0	-101,010	1670,998	2997,364
0	-131,198	1945,936	3252,535
1	-124,4	1003,399	3088,815
1	-91,8898	1041,466	2867,851
1	-134,676	949,030	2999,202
1	-111,209	1193,582	3435,829
1	-141,90	947,375	2856,940
1	-67,0826	893,142	2743,814
1	-142,696	830,243	2655,475
1	-127,007	1057,096	3066,226
1	-185,634	874,879	2455,256
1	-134,237	1056,875	3218,095
2	-113,134	637,866	3059,223
2	-113,204	526,357	2544,044
2	-95,2290	577,691	2805,049
2	-129,459	449,852	2713,950
2	-111,356	486,723	2709,436
2	-130,665	780,706	3213,256
2	-143,007	654,540	2829,456
2	-114,48	652,834	2985,415
2	-84,9757	551,450	2523,342
2	-90,4291	538,168	2305,948
4	-86,9180	248,068	2707,177
4	-147,824	273,873	2824,922
4	-117,217	287,317	2566,885

4	-124,834	413,651	3144,755
4	-53,6179	199,637	2427,738
4	-90,009	325,360	2903,013
4	-24,9996	383,641	2784,562
4	-98,0232	249,801	2565,939
4	-134,032	150,454	2402,826
4	-157,303	118,269	2259,995

Los datos se analizaron por los mismos métodos descritos en el Ejemplo 4, es decir, sin controles, simplemente utilizando el control 1, simplemente usando el control 3, o el uso de ambos controles. Nótese que el punto 3 fue designado el control positivo en el Ejemplo 4, debido a que imita la respuesta esperada cuando el sistema está saturado con el analito. En un ensayo competitivo la curva de dosificación-respuesta es inversamente proporcional al analito, por lo que el control en el punto 3 imita la respuesta cuando no hay analito presente

Se observa claramente que la precisión en el proceso de medición se ha mejorado mucho mediante el uso de ambos controles, tal como se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Mediciones de precisión de los métodos de análisis de datos en un ensayo competitivo.

Concentración del analito (mIU/L)	CV			
	Sin controles	Control punto 1	Control punto 3	Ambos controles
0ng/ml	6.53	6.15	3.30	2.79
1ng/ml	10.94	9.28	5.06	5.16
2ng/ml	16.62	15.07	11.30	9.30
4ng/ml	35.53	23.47	27.99	14.96

Los gráficos de dosificación-respuesta con barras de error de 1 desviación estándar para el ensayo sin controles y con los dos controles se muestran en las figuras. 7 y 8, respectivamente.

Ejemplo 6

El aumento de rango dinámico conseguido por el uso de superficies de medición múltiple en combinación con controles

Se prepararon los cartuchos como en el Ejemplo 5, excepto que se recubrieron las cuatro áreas de medición, en vez de tres. Los puntos 1 y 4 fueron los mismos controles como en el Ejemplo 5, y se recubrieron ambos puntos 2 y 3 en anticuerpo de antidigoxina, con el punto 2 recubierto en anticuerpo a una concentración de 0.5 µg/mL y el punto 3 recubierto con un anticuerpo a 2 µg/mL. Se realizaron los ensayos entonces en muestras de plasma humano reunido que había sido pinchado con digoxina en un rango de concentraciones. Los datos son presentados en la Fig. 9, que muestra la media de señal instrumental que se observa, junto con barras de error de 1 SD para mediciones repetidas. Los datos para el punto 2 (0.5 µg/mL de recubrimiento de antidigoxina) se analizaron en relación con los dos punto de control (puntos 1 y 4) y los datos para el punto 3 (1.0 µg/mL de recubrimiento de antidigoxina) se analizaron en relación con dos controles (puntos 1 y 4) en cada cartucho. La metodología de usar los puntos de control fue la misma como en los Ejemplos 4 y 5 anteriores, es decir la salida es la señal de la línea base corregida en el punto de medición dividida por la señal de línea base corregida en el punto de control máximo de unión (punto 4 en esta instancia).

Los datos se muestran en la Fig. 9, y se puede observar claramente que la curva de dosificación es marcadamente diferente para las dos concentraciones de anticuerpos de anti-digoxina. Para el recubrimiento de 0,5 µg/mL, la superficie se satura con digoxina en concentraciones más bajas, de manera que la curva de respuesta a la dosificación es más pronunciada en concentraciones más bajas, dando mediciones mejoradas. Sin embargo, la discriminación se pierde en concentraciones por encima de aproximadamente 15 ng/mL. Para el recubrimiento de 2 µg/mL, la curva de dosificación-respuesta es menos empinada, de manera que la discriminación no es tan buena en las concentraciones bajas, pero el ensayo aún da buena discriminación en concentraciones más altas, de hasta 40 ng/mL. De esta manera, este ensayo con los controles tiene el beneficio de un mejor rango dinámico sobre ensayos competitivos convencionales.

Ejemplo 7

Ensayo con los controles a través de diferentes tipos de muestras

5 Se prepararon otros 100 cartuchos como en el Ejemplo 4, para la medición de TSH. Estos fueron usados como en el Ejemplo 4, pero para medir los niveles de TSH desde aproximadamente 75 donantes humanos sanos. Las mediciones en este ejemplo se llevaron a cabo en sangre completa sin separar que había sido tratada con heparina para prevenir la coagulación de la muestra. En paralelo, se tomaron muestras de plasma de los mismos donantes y éstos se analizaron en un analizador de laboratorio validado para determinar los niveles de TSH de plasma en aquellos donantes. Se manipularon las mediciones de sangre entera llevadas a cabo en el sistema de sensor piroeléctrico de la misma manera que en el Ejemplo 4, es decir, las salidas se calcularon usando el punto 2, una combinación de los puntos 1 y 2, una combinación de los puntos 2 y 3, o una combinación de los puntos 1,2 y 3. Dado que la medición cinética se hizo por difusión desde el componente de plasma de la sangre entera, la salida del instrumento fue la concentración de plasma del analito y es independiente del hematocrito de la muestra de sangre.

15 Las mediciones de acuerdo con los cuatro métodos de manipulación de datos se muestran como gráficos de dispersión contra las concentraciones reportadas por el hospital en las Figs. 10-13. Sólo los datos de punto 2 se usaron en la Fig. 10. Se usaron los datos desde el punto 2 de línea base corregida hasta el punto 1 en la Fig. 11. Los datos del punto 2 dividido por el punto 3 se usaron en la Fig. 12. Los datos desde el punto 2 de línea base hasta el punto 1 expresados como una proporción relativa al punto 3 de línea base al punto 1 se muestra en la Fig. 13. Los coeficientes de correlación (R^2) para estos cuatro métodos fueron 0,42, 0,85, 0,25 y 0,88, respectivamente, que muestran que la manipulación de datos utilizando ambos controles dio la mejor correlación con el resultado medido por el hospital.

25 Los Ejemplos 4-6 expuestos anteriormente todos muestran el beneficio de una precisión mejorada en el uso de los controles cuando la matriz de la muestra es un suero humano agrupado. Las mejoras deben por lo tanto ser debido a la compensación de la variabilidad en los componentes del cartucho, la instrumentación, las condiciones ambientales y similares, pero no debido a la variabilidad en el tipo de muestra. Es bien conocido que las muestras de sangre y plasma humanos son variables en términos de viscosidad, hematocrito, factores de interferencia y la composición general. El Ejemplo 7 muestra el beneficio de usar dos controles en la mejora de la exactitud de las mediciones realizadas a través de una población de pacientes.

Ejemplo 8

35 Repetir usando plasma

Las mismas muestras de los pacientes usados en el Ejemplo 7 se centrifugaron para separar los glóbulos rojos del plasma, a continuación la medición de TSH se realizó en la fracción de plasma exactamente cómo se describió en el Ejemplo 7. Se manipularon las salidas exactamente como en el Ejemplo 7, a continuación correlacionada frente a los valores de plasma de hospital. Los coeficientes de correlación para punto 2, punto 2 de línea base, el punto 2 escalado y tanto la línea base como el punto 2 escalado fueron de 0,61, 0,76, 0,62 y 0,79, respectivamente.

Los ejemplos 7 y 8 indican que la metodología del uso de ambos controles puede compensar las variaciones entre los diferentes tipos de muestras, adicionalmente a otros factores tales como los componentes usados en los cartuchos y/o factores ambientales durante la medición.

Los ejemplos 4-8 usan una metodología similar para proporcionar una mejor precisión y exactitud en ya sea un sistema inmunométrico o un sistema de ensayo competitivo. Hay ocasiones en las que sería beneficioso para medir tanto una molécula pequeña como una molécula grande de forma simultánea en la misma muestra. Por ejemplo, puede ser deseable para monitorear la concentración plasmática de un medicamento de una molécula pequeña para asegurarse de que está en el rango terapéutico correcto y también medir una proteína u hormona para medir la eficacia del medicamento. Sería beneficioso ser capaz de utilizar los mismos controles para cada ensayo al mismo tiempo, con el fin de limitar la cantidad de muestra que se toma o para evitar la necesidad de ejecutar múltiples pruebas en serie, en lugar de en paralelo. El siguiente ejemplo demuestra el uso de 2 controles que mejoran simultáneamente la realización de un ensayo competitivo y un ensayo inmunométrico.

Ejemplo 9

60 Dos ensayos, uno competitivo, el otro inmunométrico, se ejecutan simultáneamente usando los mismos controles

Los cartuchos se prepararon esencialmente como se describió en los Ejemplos 4-8. Estos tenían seis superficies de sensor individuales que habían sido recubiertas con una superficie de estreptavidina universal. El punto 1 se recubre entonces con un anticuerpo de control negativo biotinilado, el punto 6 se recubrió con un anticuerpo de antirratón de cabra, los puntos 2 y 3 se recubrieron con un anticuerpo anti-TSH de ratón monoclonal y los puntos 4 y 5 se recubrieron con una molécula de digoxigenina biotinilada. Aunque hubo seis áreas en este ejemplo, las áreas superficiales de cada punto se redujeron en estos cartuchos de tal manera que el volumen total de la muestra se

mantuvo en 30 µL, un volumen que se puede obtener a partir de sangre de un pinchazo en el dedo. Los puntos 2/3 y 4/5 dieron mediciones repetidas de TSH y digoxina, respectivamente, en este ejemplo, aunque esto no fue un requisito específico para que el ensayo funcionara. Debe tenerse en cuenta que el formato para mediciones de digoxina en este ejemplo se invirtió al presentado en los Ejemplos 5 y 6, en que el análogo de digoxina se une a la superficie del sensor y el anticuerpo antidigoxina se une a las partículas de carbono. Sin embargo, el principio sigue siendo el mismo y el ensayo podría llevarse a cabo en cualquier configuración.

Un rango de estándares de plasma reunido pinchados con concentraciones conocidas de TSH únicamente, se habían preparado previamente únicamente con digoxina o tanto TSH como digoxina en concentraciones conocidas y las concentraciones se confirmaron en un analizador de laboratorio. Determinaciones separadas para TSH y digoxina tuvieron que ser llevadas a cabo para cada muestra en el analizador de laboratorio. Se llevaron a cabo los ensayos repetidos (n = 10) en cada muestra diferente usando cartuchos que habían sido preparados con concentraciones iguales de partículas de carbono recubiertas ya sea anticuerpo anti-TSH o anticuerpos anti-digoxina, aunque también es posible corecubrir los dos anticuerpos simultáneamente en el mismo conjunto de partículas.

La salida del instrumento se analizó esencialmente como se describió en los Ejemplos 4 y 5. Para TSH, la salida de los puntos se promedió 2 y 3, y a continuación los datos fueron manipulados usando las dos mediciones de control de los puntos 1 y 6. No se usaron los puntos 4 y 5. Los cuatro métodos de análisis fueron los mismos como se describió en el Ejemplo 4. Para la digoxina, se promedió la salida de los puntos 4 y 5, a continuación los datos también se manipularon usando las mismas medidas de control de los puntos 1 y 6. No se usaron los puntos 2 y 3. Los cuatro métodos de análisis fueron los mismos como se describió en el Ejemplo 5.

Se muestra la precisión en cada medición de repetición que usa los cuatro métodos de análisis de datos en la Tabla 5. Se puede observar claramente que la mejora de la precisión se consigue en todos los casos por el uso de las dos medidas de control para definir los límites superior e inferior del rango de medición.

Tabla 5. Mediciones de precisión de los métodos de análisis de datos de un ensayo múltiple en ambos formatos inmunométricos y competitivos

Concentración del analito		%CV							
		TSH				Digoxina			
TSH (mIU/L)	Digoxina (ng/mL)	Sin controles	Control punto 1	Control punto 6	Ambos controles	Sin controles	Control punto 1	Control punto 6	Ambos controles
0	0				-	4,61	4,58	4,22	3,87
5,58	0	28,87	20,39	24,86	17,04	7,41	6,55	5,12	4,87
0	1				-	7,98	7,36	10,62	6,53
5,58	1	14,11	12,22	13,87	11,64	6,52	5,00	8,06	4,58
2,75	10	27,11	12,42	31,32	11,61	144,41	22,59	140,43	21,74
27	2	6,72	5,75	7,41	4,06	12,82	8,40	9,85	6,81

Las salidas del instrumento (como las señales radiométricas, que usan ambos controles) se muestran en la Fig. 14, junto con las barras de error de 1 desviación estándar. La salida del instrumento, ya sea para analito fue independiente de la presencia o ausencia de la otra.

El Ejemplo 9 indica que ambos controles se pueden usar en paralelo para mejorar el rendimiento de una combinación ensayo competitivo multiplexado / inmunométrico.

Reivindicaciones

1. Un dispositivo para realizar un ensayo en un analito en una muestra que comprende:

5 una fuente de radiación adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética;

un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que son capaces de transducir energía generada por desintegración no radiativa en una señal eléctrica;

10 un detector que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor;

un primer reactivo próximo al transductor, el primer reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unir un reactivo etiquetado proporcionalmente a la concentración del analito en la muestra, cuyo reactivo etiquetado que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía mediante desintegración no radiativa;

15 un segundo reactivo próximo al transductor, el segundo reactivo que tiene una afinidad más baja por el reactivo etiquetado bajo las condiciones del ensayo, que el primer reactivo; y

20 un tercer reactivo próximo al transductor, el tercer reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unir el agente etiquetado, en el que el tercer reactivo tiene afinidad por el reactivo etiquetado que es menos influenciado que el primer reactivo por la concentración del analito o del complejo o del derivado del analito.

25 2. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el primer, segundo y tercer reactivos están unidos al transductor a través de un enlace no covalente.

3. Un dispositivo como se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2, en el que el segundo reactivo no tiene afinidad por el reactivo etiquetado bajo las condiciones del ensayo.

30 4. Un dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tercer reactivo tiene una afinidad por el reactivo etiquetado que es independiente de la concentración del analito o del complejo o derivado del analito.

35 5. Un dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primero, segundo y tercer reactivos son anticuerpos.

6. Un dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el analito o el complejo derivado del analito es una molécula pequeña que tiene un peso molecular de 2,000 o menos.

40 7. Un dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el reactivo etiquetado comprende un anticuerpo levantado al analito o el complejo o derivado del analito, el primer reactivo es un anticuerpo levantado al analito o el complejo o derivado del analito, el segundo reactivo es un anticuerpo de control isótopo, y el tercer reactivo es un anticuerpo anti-especie.

45 8. Un dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo adicionalmente comprende una cámara para contener una muestra líquida que contiene el analito o el complejo o derivado del analito en contacto con el transductor

50 9. Un dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo es formado de un lector y un cartucho, en el que el cartucho es acoplable de forma desmontable con el lector, y en el que el lector incorpora la fuente de radiación y el detector, y el cartucho incorpora el transductor y el primer, segundo y tercer reactivos

55 10. Un kit que comprende el dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y el reactivo etiquetado.

11. Un método para detectar un analito, o un complejo o derivado del analito, en una muestra que comprende los pasos de exposición de la muestra al dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que transduce la energía generada en una señal eléctrica y que detecta la señal.

60 12. Un método como se reivindica en la reivindicación 11, en el que el método se lleva a cabo sin la eliminación de la muestra desde el transductor entre los pasos de exposición de la muestra al transductor y que transduce la energía generada en una señal eléctrica.

65

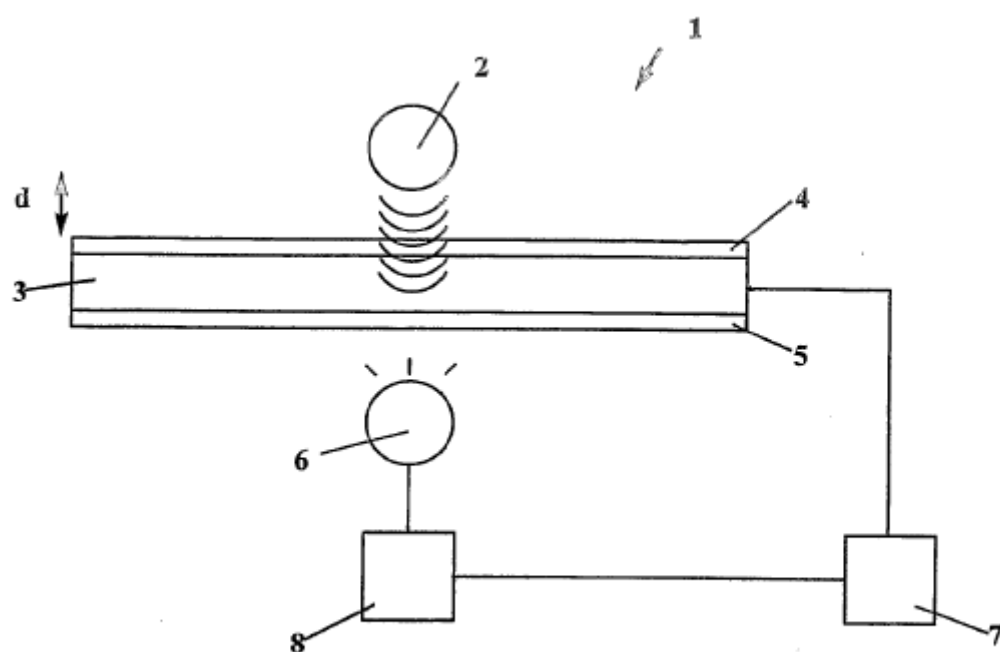


Fig. 1

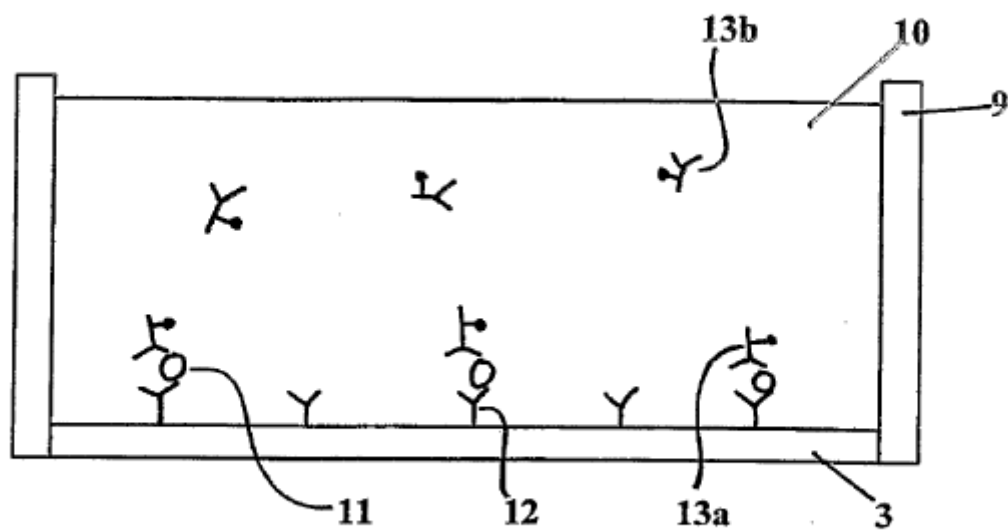


Fig. 2

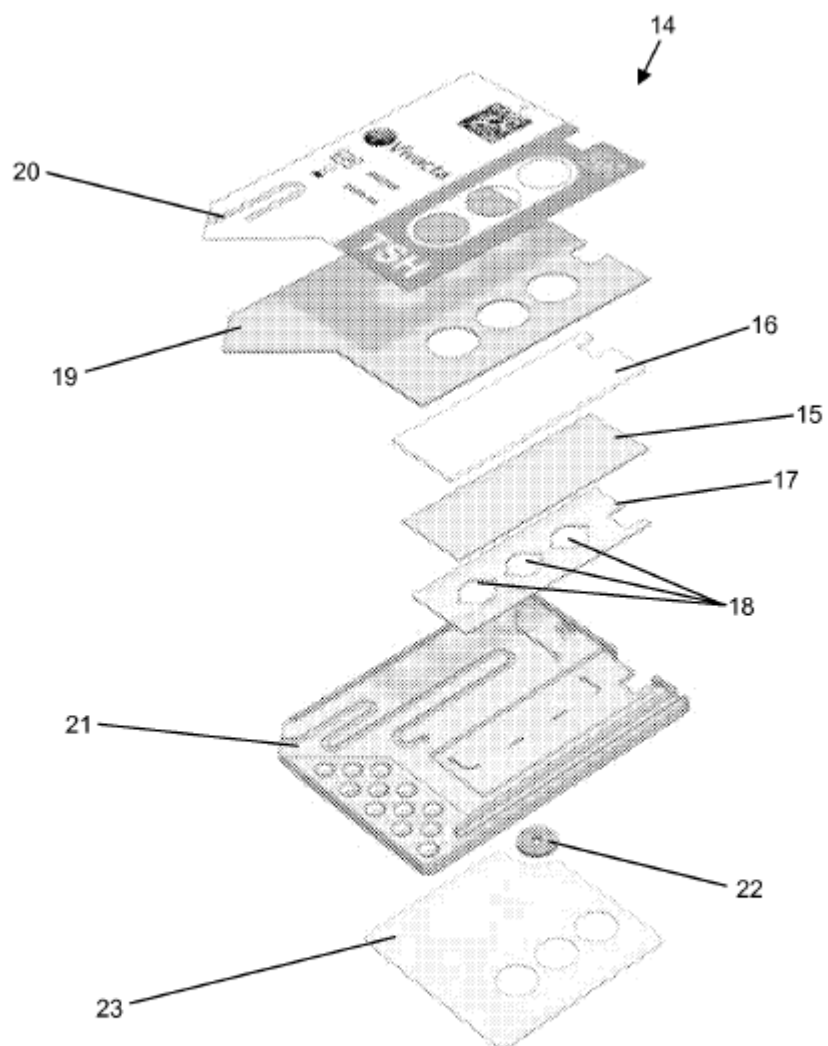


Fig. 3

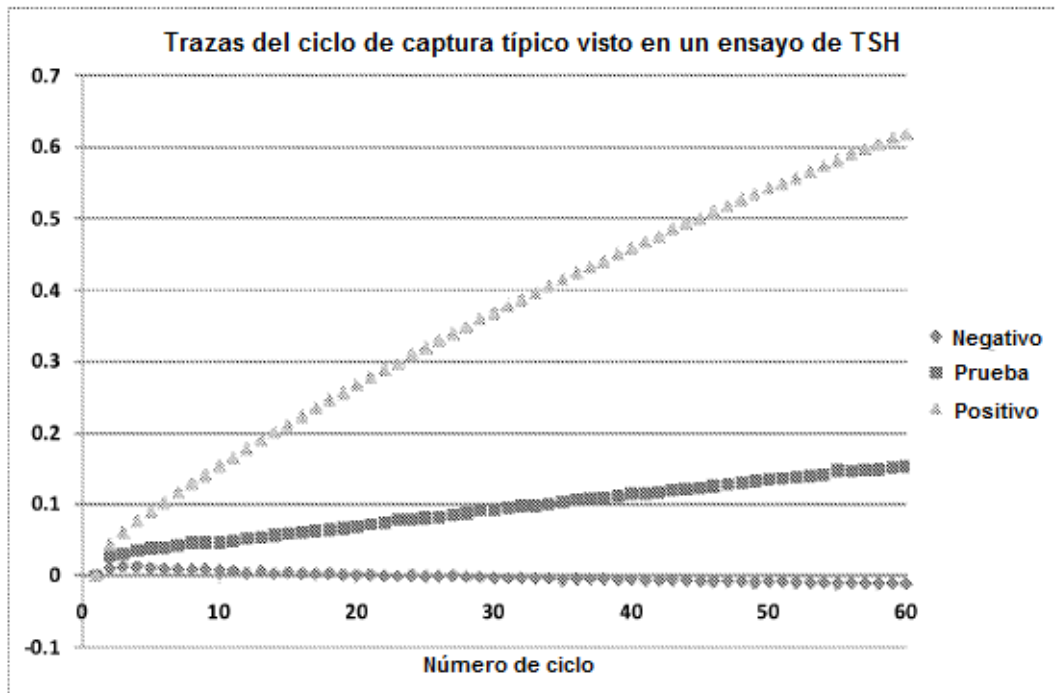


Fig. 4

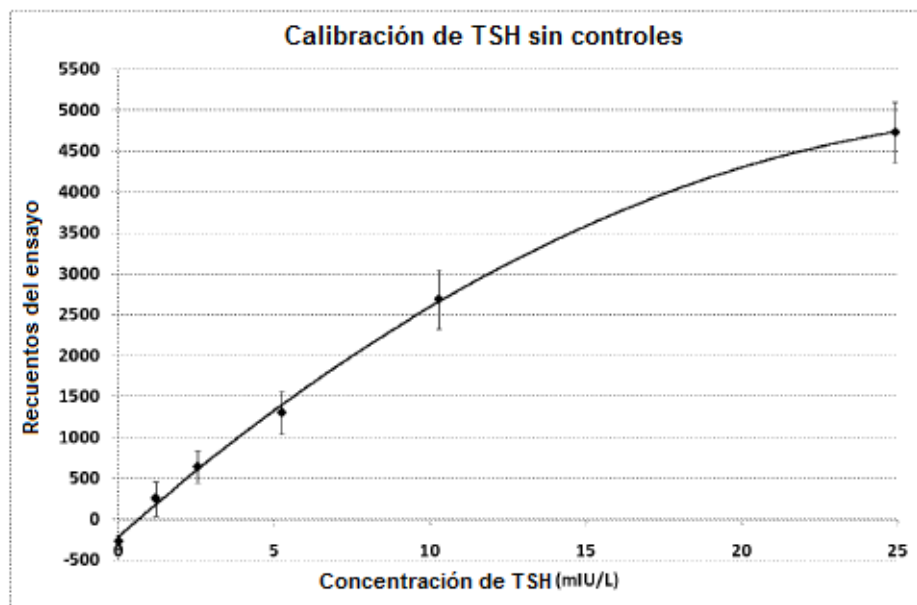


Fig. 5

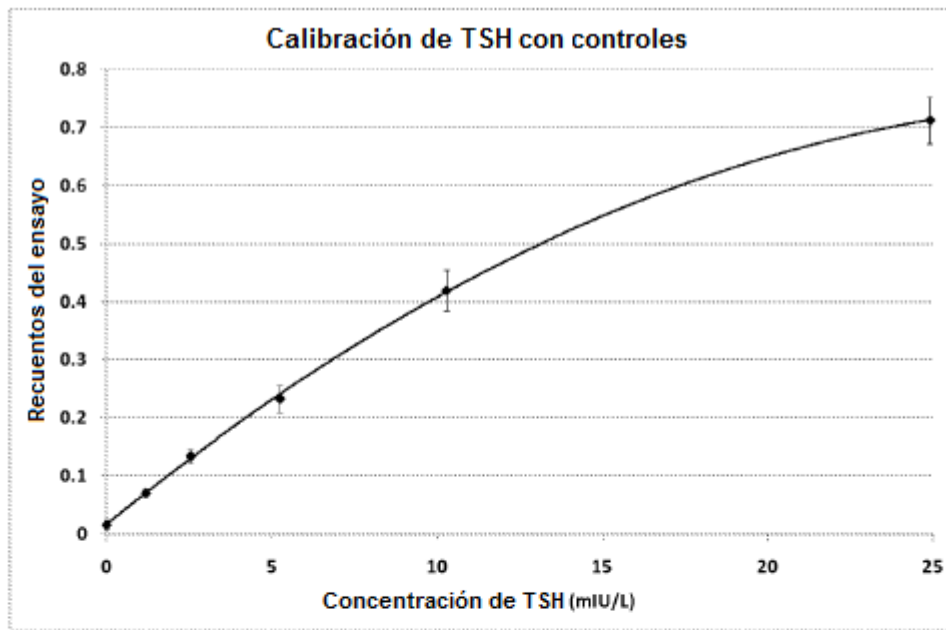


Fig. 6

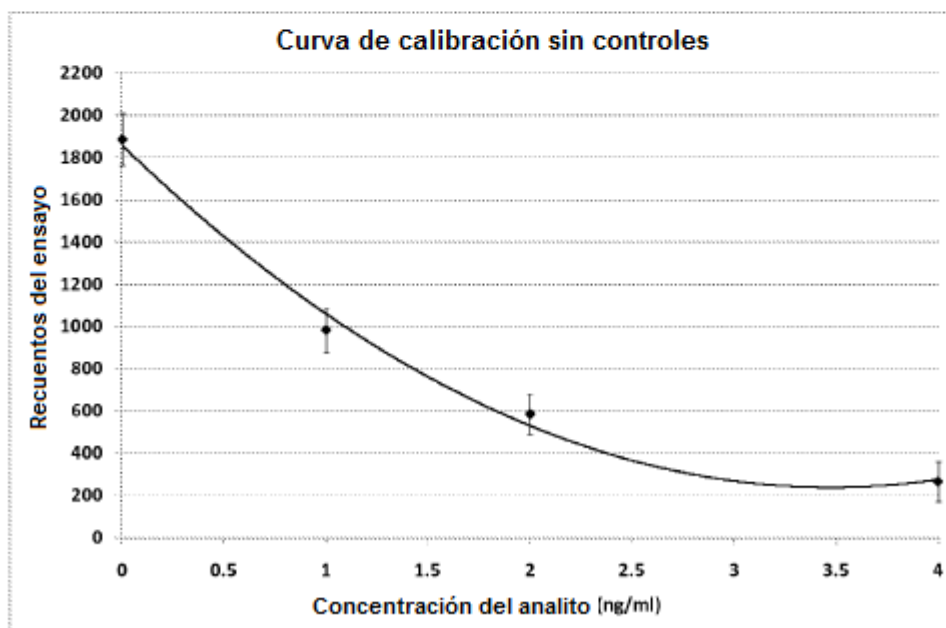


Fig. 7

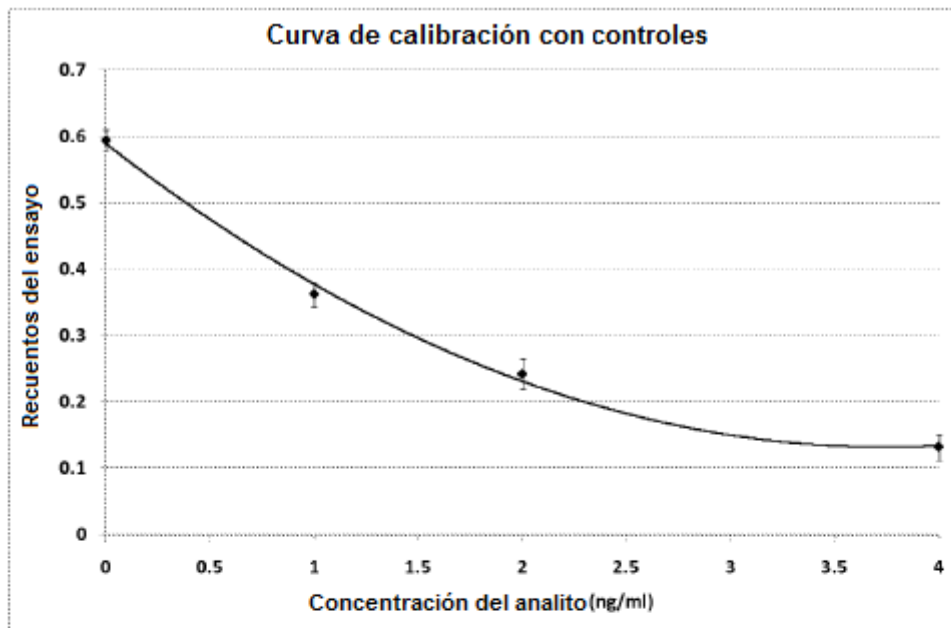


Fig. 8

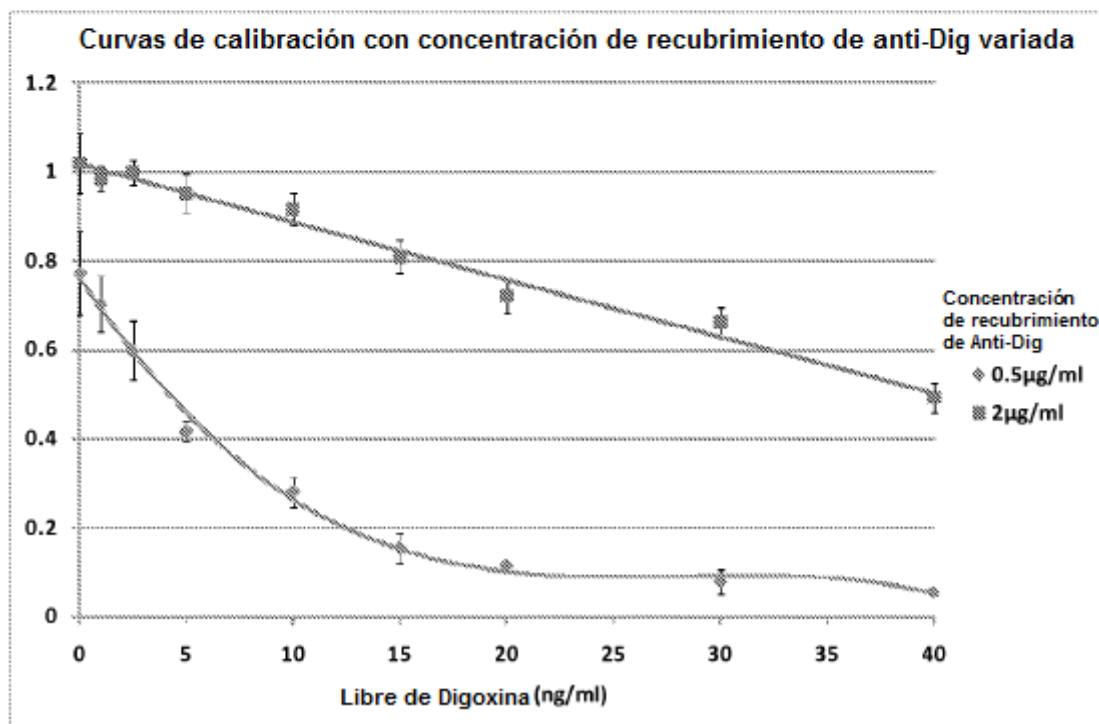


Fig. 9

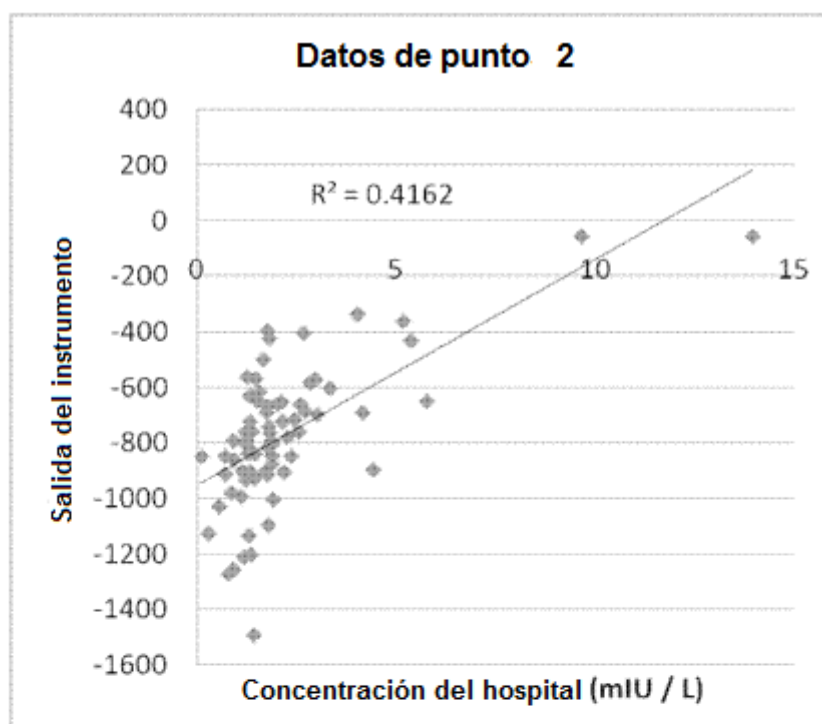


Fig. 10

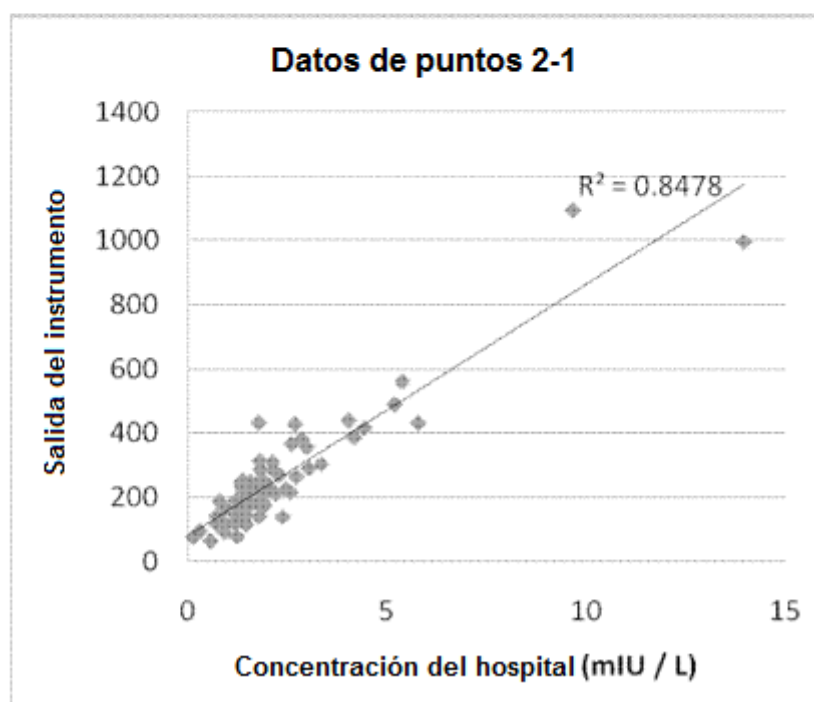


Fig. 11

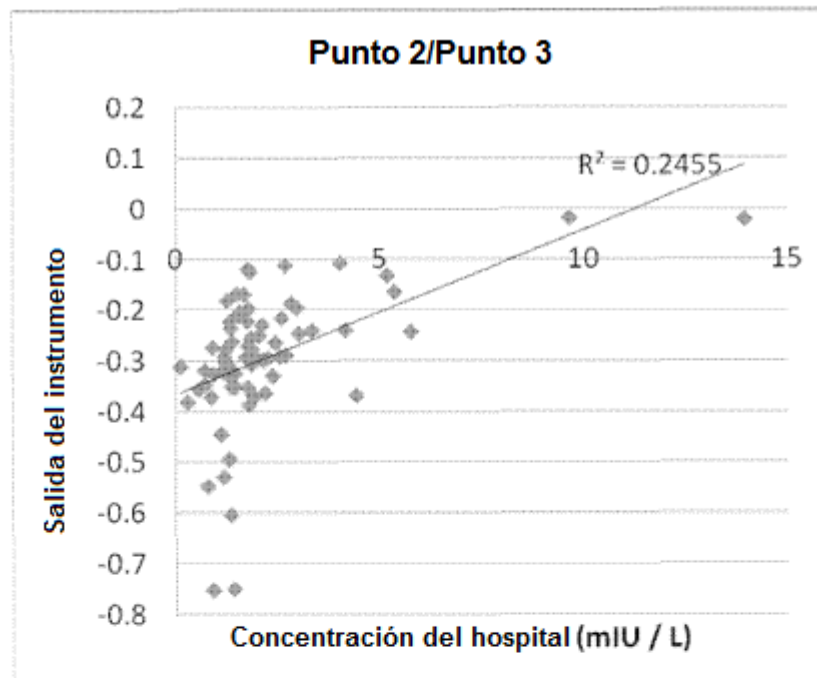


Fig. 12

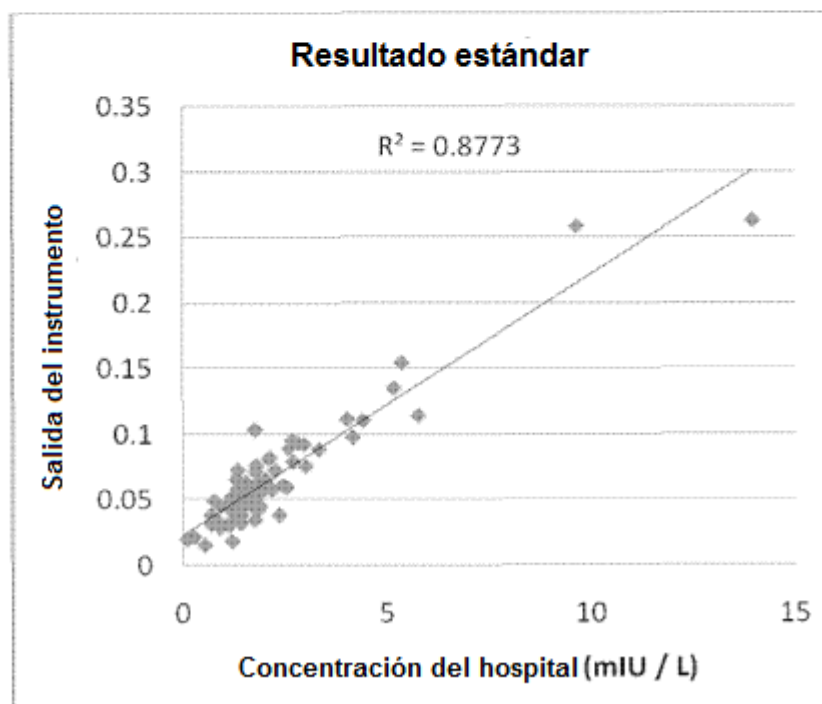


Fig. 13

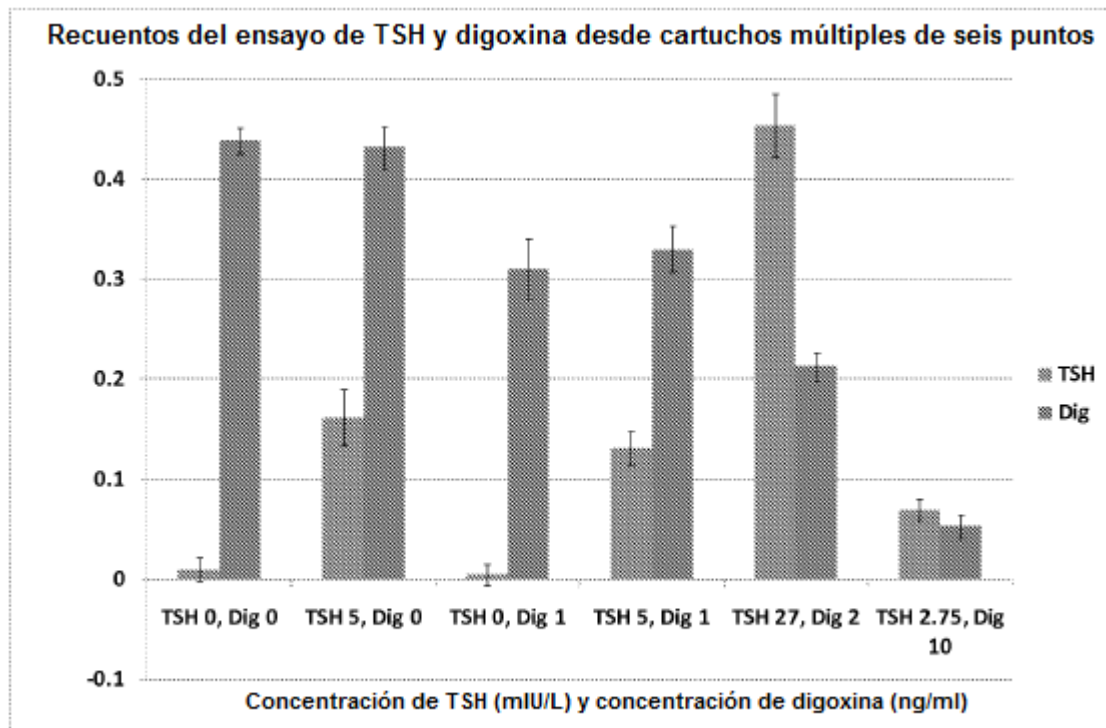


Fig. 14