

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 391**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2007 PCT/US2007/061136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2007 WO07090058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2007 E 07762849 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 1977242**

54 Título: **Inmunoensayo de flujo lateral con modalidad de detección encapsulada**

30 Prioridad:

27.01.2006 US 763034 P

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

15.02.2017

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**NATAN, MICHAEL;
CROMER, REMY;
DOERING, WILLIAM y
CORISH, PETER**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 601 391 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

Inmunoensayo de flujo lateral con modalidad de detección encapsulada.

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un sistema y un método para realizar un inmunoensayo de flujo lateral (IFL), en particular un IFL que emplea partículas encapsuladas que usan etiquetas SERS como la modalidad de detección.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Un inmunoensayo de flujo lateral (IFL) es una plataforma popular para pruebas de diagnóstico cualitativo rápidas y sencillas. Los IFL se introdujeron a finales de la década de 1980. Un IFL típico incluye un sustrato o membrana fina fabricada a partir de nitrato de celulosa o un material similar. Normalmente, la aplicación de una muestra a una almohadilla de conjugación en una porción del sustrato rehidrata los reactivos secos e inicia inmunorreacciones necesarias para la detección de un antígeno de interés. Un representante de IFL básico es una prueba de embarazo de las cuales, varios cientos de miles de tiras de ensayo individuales se producen cada año. Después de aplicar la muestra a la almohadilla de conjugación de IFL, las partículas de muestra y detección unidas al antígeno avanzan por el sustrato de la tira de ensayo a través de la acción capilar hasta una porción del marcador de prueba del sustrato. Si el antígeno de interés está presente, los anticuerpos colocados situados en el marcador de prueba capturan las partículas de detección unidas previamente. En el caso de un resultado positivo, las partículas de detección unidas se hacen visibles en el marcador de prueba. El marcador de prueba visible es típicamente una línea de color, punto o símbolo.

25 Los dispositivos IFL típicos son bastante sencillos de usar en una diversidad de entornos, requieren una mínima o ninguna preparación de la muestra y producen un resultado rápido. Sin embargo, un IFL típico es una prueba relativamente imprecisa y puramente cualitativa. Los análisis cualitativos de alta sensibilidad o los resultados cuantitativos son difíciles o imposibles de obtener con los dispositivos IFL típicos de la técnica anterior.

30 Tradicionalmente, muchos dispositivos IFL han utilizado nanopartículas de Au con diámetros que oscilan entre 20-40 nanómetros como la modalidad de detección. Los anticuerpos apropiados se adsorben directamente a la superficie de Au antes de que las partículas se sitúen y se unan a la almohadilla de conjugación del IFL. Las pruebas positivas pueden indicarse por la captura de estas nanopartículas de Au en la línea de prueba. Después, puede usarse la detección visual para observar la alta naturaleza de dispersión de la luz de las nanopartículas unidas a la línea de prueba. Desafortunadamente, la detección visual de las partículas unidas a la línea de prueba puede oscurecerse por la sangre, el suelo u otros contaminantes.

El uso de nanopartículas de Au más grandes aumentará la sensibilidad de las pruebas de IFL dado que la dispersión y la absorbancia de las nanopartículas de Au aumentan ambas de una manera no lineal con el aumento de tamaño. Dado que el impedimento estérico de las propias nanopartículas limita la capacidad de que los anticuerpos pasivamente adsorbidos se unan eficazmente al antígeno, hay una compensación de sensibilidad asociada al simple aumento del tamaño de partícula. La mejor combinación de la técnica anterior de visibilidad de las partículas y la actividad de los anticuerpos normalmente viene con partículas de Au con un diámetro de aproximadamente 40 nm. Otros metales, tales como Ag, pueden aumentar la sensibilidad, así como una función de la mayor extinción de Ag. Las nanopartículas de Ag típicamente no sirven para absorber pasivamente anticuerpos, sin embargo, así como tampoco Au.

Una propiedad esencial de las partículas de detección en un IFL es su capacidad para liberarse completamente de un estado seco sobre la almohadilla de conjugado. Idealmente, esta liberación es algo lenta, permitiendo de esta manera que el antígeno y las partículas aglomeradas se unan posteriormente a la línea de captura antes de que las partículas se difundan más allá de la línea. Las nanopartículas de Au de la técnica anterior no ofrecen opciones de la química de superficies diseñadas para optimizar esta liberación. Además, la química de las nanopartículas de Au de la técnica anterior no puede adaptarse para minimizar la adsorción no específica de las partículas con respecto al sustrato en el que se realiza el ensayo. La práctica actual está algo limitada a la adición de bloqueantes y aditivos a los tampones y el sustrato usados en el ensayo.

Los dispositivos IFL de la técnica anterior típicos están limitados por el diseño a un único anticuerpo de captura. Por lo tanto, estos dispositivos están limitados en uso a la detección de una única especie. Hay ejemplos de pruebas de IFL con capacidades de multiplexación limitadas. Típicamente, los múltiples anticuerpos seleccionados para realizar

distintas pruebas están asociados cada uno a una línea de captura separada.

Por lo tanto, la técnica anterior enseña la multiplexación espacial. Durante el uso, la observación visual de las líneas de captura espacialmente separadas permite, de forma limitada, una sencilla prueba cualitativa multiplexada. Tal como se muestra en la figura 5, el formato espacialmente multiplexado, sin embargo, requiere que la modalidad de detección asociada a la línea de captura situada más lejana de la almohadilla de conjugado se difunda a través de las otras líneas de captura antes de poder leer una prueba. Por lo tanto, la multiplexación espacial puede ser problemática debido a problemas de interferencia que dan como resultado la disminución de la sensibilidad.

10 La presente invención se dirige a la superación de uno o más de los problemas que se han analizado anteriormente.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un inmunoensayo de flujo lateral que posee partículas de metal encapsuladas.

15 Las partículas encapsuladas usan nanoetiquetas SERS como la modalidad de detección. El uso de etiquetas SERS encapsuladas como una modalidad de detección, aumenta la sensibilidad de un IFL preparado para una lectura visual e introduce la capacidad de obtener sustancialmente resultados cualitativos o resultados cuantitativos más sensibles a través del análisis del espectro SERS leído de un IFL preparado de acuerdo con la presente invención. El uso de SERS como modalidad de detección también mejora la capacidad de un dispositivo IFL para usarse para una prueba multiplexada. Otros aspectos de la presente invención incluyen dispositivos IFL configurados específicamente para ensayar sangre entera, un lector para la detección y la interpretación de un ensayo multiplexado y los componentes de hardware y software usados para implementar el lector.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

25

La figura 1 muestra un IFL compatible con la presente invención que demuestra la eficiencia de la detección visual en comparación con un IFL de la técnica anterior disponible en el mercado en diversas diluciones de muestra;

30

la figura 2 muestra gráficamente la señal SERS relativa recogida en la línea de prueba de un dispositivo IFL compatible con la presente invención para diversas diluciones de muestra;

la figura 3 muestra gráficamente la señal SERS obtenida a partir de un kit IFL en función de la dilución de un control positivo para VSR;

35

la figura 4 muestra gráficamente la señal SERS obtenida a partir de un kit IFL en función de la dilución de un control positivo para Gripe A;

la figura 5 muestra gráficamente la señal SERS obtenida a partir de un kit IFL en función de la dilución de un control positivo para Gripe B;

40

la figura 6 muestra gráficamente la señal SERS de conjugados multiplexados en función de la concentración de antígeno de VSR;

la figura 7 muestra gráficamente la señal SERS de conjugados multiplexados en función de la concentración del antígeno de Influenza A; y

la figura 8 muestra gráficamente la señal SERS de conjugados multiplexados en función de la concentración del antígeno de Influenza B.

La figura 9 es una captura de pantalla de ordenador de espectros obtenidos durante la calibración del ensayo multiplexado.

45

La figura 10 es una captura de pantalla de ordenador que muestra datos de espectros representativos.

La figura 11 es una captura de pantalla de ordenador que muestra una curva de calibración representativa para Gripe B.

La figura 12 es una captura de pantalla de ordenador que muestra una curva de calibración representativa para Gripe A.

50

La figura 13 es una captura de pantalla de ordenador que muestra una curva de calibración representativa para VSR.

La figura 14 es un gráfico del rendimiento del ensayo con diversas etiquetas.

La figura 15 es un diagrama de exploración esquemático.

La figura 16 es un gráfico de un ensayo con calibración interna.

55

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, métodos de ensayo y equipo asociado. El presente IFL presenta el uso de partículas encapsuladas como la modalidad de detección en lugar de

las nanopartículas de metal de dispositivos IFL anteriores. En una realización de la presente invención, las partículas de detección encapsuladas son etiquetas SERS como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 6.514.767, titulada "surface Enhanced Spectroscopy-Active Composite Nanoparticles".

5 Las partículas encapsuladas pueden encapsularse en un vidrio de sílice como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 6.514.767. Pueden usarse otros materiales, incluyendo, pero sin limitación, diversos tipos de polímeros, como un encapsulante compatible con la presente invención. Una propiedad fundamental de las partículas en un dispositivo IFL eficaz es la capacidad de liberar completamente de un enlace en estado seco a la almohadilla de conjugado tras la aplicación de una muestra de fluido desconocida. El uso de partículas de sílice encapsulada,
10 polímero encapsulado u otras partículas de detección encapsuladas facilita una fácil liberación del secado seco. Las características de flujo de las partículas encapsuladas pueden contribuir al desarrollo de una línea de lectura más definida en los dispositivos IFL diseñados para una sencilla detección visual. Como se describe en el ejemplo a continuación, las características de flujo mejoradas de una partícula encapsulada pueden aumentar al menos siete veces la sensibilidad de los dispositivos IFL leídos visualmente.

15 Un formato de ensayo alternativo que ofrece el uso de partículas encapsuladas se puede fabricar sin el uso de partículas aglomeradas en un estado seco a la almohadilla de conjugado. En particular, las partículas, tal como se describe en el presente documento, se pueden incorporar en diluyentes de ensayo. En esta realización, descrita en detalle en los ejemplos a continuación, las partículas de analito y de detección se pueden mezclar fuera del sustrato
20 de ensayo y aplicarse posteriormente al sustrato. Por consiguiente, el tiempo de incubación de las partículas de detección con el analito puede controlarse para lograr el rendimiento más eficaz. Además, la cantidad de etiquetas de detección usadas en el ensayo puede controlarse con precisión. Esto puede ser de importancia si hay espacio limitado en una almohadilla de conjugación, o si se usan múltiples etiquetas de detección distintas en un formato multiplexado. El formato alternativo de etiquetas de detección aplicadas externamente podría eliminar la necesidad
25 de una almohadilla de conjugación, y por lo tanto, abordar los problemas asociados a una almohadilla, tales como una deposición o liberación de partículas de detección incompleta o no uniforme.

Además de las características mejoradas de dispersión y de flujo obtenidas mediante la preparación de un dispositivo IFL con partículas encapsuladas, es posible adaptar las propiedades de superficie de partículas
30 encapsuladas para mejorar y controlar adicionalmente las propiedades de flujo de las partículas. Por ejemplo, las partículas pueden estar revestidas con polímeros que se reconoce que tienen características de unión no específicas bajas, tales como dextranos o derivados de polietilenglicol (PEG), para disminuir la interacción de las partículas con proteínas exógenas o el sustrato de nitrocelulosa. Las propiedades de flujo de las partículas también pueden alterarse por la encapsulación con los polímeros seleccionados para hacer que las partículas sean más
35 hidrófilas o hidrófobas. Se espera que tales cambios causen cambios significativos en los caudales de las partículas y puedan usarse para adaptar un ensayo a los requisitos de caudal específicos.

Otro posible método para afectar al caudal de las partículas es crear revestimientos o encapsulados que alteren significativamente el tamaño de partícula o el radio hidrodinámico. Por ejemplo, una partícula más grande, o una con
40 una encapsulación de polímero de cadena larga, pueden tener más interacciones con una membrana y el flujo a una velocidad inferior que una partícula más compacta. La naturaleza del revestimiento también influirá en la velocidad de liberación de las partículas de la almohadilla de conjugado, tanto mediante la definición de la cantidad de interacción con la almohadilla de conjugado como por la solubilidad de las partículas en los diluyentes de ensayo. Por ejemplo, podría ser deseable ralentizar la liberación de partículas de la almohadilla de conjugado mediante la
45 reducción de la solubilidad de las partículas, permitiendo de este modo más tiempo para que el antígeno reaccione en la línea de prueba antes de la detección con partículas revestidas de anticuerpo. Además, la carga de la superficie de las partículas podría ser un factor muy importante en el rendimiento del ensayo. Mediante la modificación o la determinación del punto isoeléctrico de diversas partículas a través de la selección encapsulado; el comportamiento del flujo de las partículas en tampones de diferente pH podría verse afectado. Esto puede permitir el
50 uso de partículas en un tampón que no sea normalmente compatible con los conjugados, pero que tenga ventajas para la unión anticuerpo-antígeno o la liberación del antígeno de un complejo dentro de la matriz de muestra. De forma similar, pueden usarse tensioactivos para adaptar las propiedades de superficie de las partículas, afectando de este modo a las características del flujo.

55 Es importante señalar que la adaptación de la superficie de la partícula puede realizarse en paralelo con la conjugación, por ejemplo, la mitad de la superficie de una partícula podría revestirse con PEG y la otra mitad con un anticuerpo. Como alternativa, la adaptación de la superficie puede producirse antes de la conjugación del anticuerpo. Muchos de los efectos deseados se pueden conseguir de forma simultánea, por ejemplo, las partículas de revestimiento con un PEG terminado en amina para elevar el punto isoeléctrico, reducen la unión no específica y

aumentan la solubilidad.

Muchas sustancias pueden ser adecuadas para encapsular o revestir partículas con el fin de conseguir algunos o todos los efectos que se han descrito anteriormente. Las sustancias adecuadas incluyen, pero sin limitación, las siguientes: vidrio de sílice, proteínas, ADN, ARN, poliaminoácidos sintéticos (polilisina, ácido poliglútamico), polietilenglicoles, dendrímeros de copolímeros de bloque, poliamidas, polietileniminas, poliacrilatos y otros polímeros naturales tales como dextranos, otros polímeros a base de carbohidratos naturales y tensioactivos. Otros revestimientos adecuados se analizan en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 11/622.915, titulada POLYMER COATED SERS NANOTAG, presentada el 12 de enero de 2007. El uso de partículas de detección encapsuladas puede facilitar el uso de oligonucleótidos como restos de unión en lugar de los anticuerpos y antígenos de un IFL convencional.

Los dispositivos IFL de la técnica anterior que presentan partículas de detección no encapsuladas requieren una calidad de sustrato altamente controlada para asegurar las características del flujo repetibles y, por consiguiente, resultados de ensayo repetibles y precisos. Los rigurosos estándares de fabricación de sustrato que deben mantenerse se añaden significativamente al coste de los dispositivos de la técnica anterior. El uso de partículas de detección encapsuladas con mejores características de flujo como se ha descrito anteriormente, puede atenuar los estándares de calidad del sustrato necesarios para conseguir un nivel superior de rendimiento de ensayo. Además, el uso de técnicas de calibración y control como se describe en detalle a continuación, puede compensar la variabilidad inherente en los sustratos fácilmente disponibles.

Como se ha analizado anteriormente, los dispositivos IFL de la técnica anterior utilizan comúnmente nanopartículas de Au con diámetro que varía de 20-40 nm como una modalidad de detección. Los anticuerpos se adsorben directamente en la superficie de Au durante la preparación del dispositivo IFL. Dado que el impedimento estérico de las nanopartículas de Au limita la capacidad de los anticuerpos pasivamente adsorbidos para unirse eficazmente a los antígenos presentes en la muestra desconocida, hay un límite ascendente asociado con el aumento de tamaño de partícula. Sin embargo, el uso de partículas más grandes aumentará la sensibilidad de un IFL, ya que las capacidades de dispersión de luz, y por lo tanto la visibilidad, de la nanopartículas de Au aumentan con el tamaño.

Las nanoetiquetas SERS, en particular, o en general, cualquier partícula encapsulada, pueden emplear núcleos de metal de cualquier tamaño práctico sin pérdida de actividad del anticuerpo. Esto se debe a que la sílice, el polímero u otra envoltura permiten un acoplamiento covalente de anticuerpos que minimiza el impedimento estérico. Una partícula encapsulada con anticuerpos acoplados covalentemente también puede presentar enlaces largos, fijaciones de polímeros ramificados o estructuras de fijación similares, tales como hidrogeles o espaciadores de PEG que harán que haya más superficie disponibles para un antígeno y permitirán que se unan más anticuerpos por partícula. Si los anticuerpos están unidos con un espaciador, cualquier superficie que afecte a la unión antígeno-anticuerpo se reducirá al mínimo. Además, la envoltura proporciona un sustrato ideal para la modificación selectiva con el fin de manipular las propiedades de las nanopartículas. Por lo tanto, la sensibilidad de un IFL detectado visualmente se puede aumentar mediante el uso de partículas de detección encapsuladas más grandes.

La encapsulación también permite el uso de formas no tradicionales como partículas de detección. Como se usa en el presente documento, una forma no tradicional incluye cualquier forma distinta de una esfera. Las formas no tradicionales incluyen, pero sin limitación, prismas, cubos, pirámides, clavijas, cajas rectangulares, envolturas huecas o formas generalmente irregulares con superficies planas o curvas. Las formas no tradicionales pueden ser ventajosas para su uso en un dispositivo IFL detectado visualmente por las mismas razones que se han descrito anteriormente con respecto a las partículas más grandes. Las formas no tradicionales reflejan la luz mejor que las esferas simples y, por lo tanto, aumentan la sensibilidad de un dispositivo IFL detectado visualmente. Las nanopartículas de metal de la técnica anterior son inadecuadas para su uso con un dispositivo IFL en formas no tradicionales, debido a que las características de dispersión y de flujo de las partículas no encapsuladas y no esféricas comprometerían gravemente el funcionamiento de la prueba. Las características de monodispersidad y de flujo mejoradas de una partícula encapsulada permiten el uso de formas no tradicionales.

La encapsulación también permite el uso de metales distintos de Au como la modalidad de detección de un dispositivo IFL. El Au se ve favorecido en la técnica anterior a causa de sus características favorables de adsorción de anticuerpos. Estas características no son necesariamente compartidas por otros metales, tales como Ag, que de otro modo serán más adecuadas para la partícula de detección de un dispositivo IFL, ya que Ag es más reflectante que el Au. Debido a que la sílice, el polímero u otra envoltura de encapsulante permiten el acoplamiento covalente de anticuerpos a la partícula encapsulada, el metal seleccionado para el núcleo se vuelve menos importante. Por consiguiente, pueden usarse metales más brillantes y más reflectantes, tal como Ag, como el núcleo de las

partículas de recogida encapsuladas.

La presente invención puede implementarse con partículas encapsuladas como se define en las reivindicaciones adjuntas. Ciertas ventajas analizadas a continuación se pueden lograr si la partícula encapsulada produce un espectro detectable de cualquier tipo tras la interrogación con luz de una longitud de onda adecuada. Un tipo de partícula encapsulada que es adecuado para la implementación de la presente invención es una nanopartícula activa en SERS, tales como las partículas descritas en la Patente de Estados Unidos n.º 6.514.767. Otros tipos de partículas descritos en el presente documento incluyen partículas activas en Raman, perlas de Raman tales como las descritas en Towards the DRED of Resin-Suported Combinatorial Libraries: A Non-Invasive Methodology Based on Bead Self-Encoding and Multispectral Imaging Fenniri, H.; Hedderich, H. G.; Haber, K. S.; Achkar, J; Taylor, B.; Ben-Amotz, D. Agnew. Chem. Int. Ed.; 2000; 39 (24); 4483-4485; y Barcoded Resins: A New Concept for Polymer-Supported Combinatorial Library Self-Deconvolution Fenniri, H.; Ding, L.; Ribbe, A. E.; Zyrianov, Y.J. Am. Chem. Soc.; (Communication); 2001; 123(33); 8151-8152. Otras partículas descritas en el presente documento incluyen sustancias de particulados que tienen actividad de Raman, más perlas, partículas o sustancias que muestran cualquier otro tipo de características espectroscópicas detectables en condiciones conocidas.

Como se analiza en detalle más adelante, cuando las nanopartículas activas en SERS fueron sustituidas por las nanopartículas de Au simples de un dispositivo IFL de la técnica anterior, se observaron resultados de detección visual sustancialmente mejorados. Además, el espectro SERS de una molécula indicadora asociada a una partícula de detección SERS puede leerse por un detector apropiado, mejorando en gran medida la sensibilidad, la precisión y la flexibilidad de una prueba de IFL. Además, son posibles la preparación y el análisis de pruebas altamente multiplexadas cuando se utilizan partículas activas en SERS u otras partículas espectroscópicamente activas como la modalidad de detección.

SERS permite la detección de moléculas unidas a la superficie de una única nanopartícula de Au o Ag. Un metal reforzador de Raman que tiene asociada o unida a él una o más moléculas indicadoras activas en Raman se denomina como una nanopartícula activa en SERS. Tales nanopartículas activas en SERS tienen utilidad como etiquetas ópticas. Sin embargo, las nanopartículas activas en SERS hechas de metales no encapsulados presentan enormes problemas prácticos al usarse en tales ensayos, tal como un IFL. Las nanopartículas metálicas son extremadamente sensibles a la agregación en solución acuosa; una vez agregadas, no es posible volver a dispersarlas. Además, las composiciones químicas de algunas moléculas activas en Raman son incompatibles con las químicas usadas para unir otras moléculas (tales como proteínas) a nanopartículas de metal. Esto restringe las opciones de moléculas activas en Raman, las químicas de unión, y otras moléculas que se unirán a la nanopartícula metálica.

Las nanopartículas compuestas activas en SERS (SACN) se componen de una nanopartícula metálica que tiene unidas o asociadas a su superficie una o más moléculas activas en Raman. Este complejo de metal reforzador de Raman y el analito (denominado una nanopartícula metálica activa en SERS) se recubre entonces o se encapsula por un encapsulante. El encapsulante puede ser un material de vidrio, y la SACN se denomina entonces como una nanopartícula cargada de analitos revestidos de vidrio (GAN). Las SACN pueden proporcionarse por el crecimiento o la colocación de una envoltura de un encapsulante adecuado sobre un núcleo de nanopartículas de metal activas en SERS. El núcleo de nanopartículas de metal es una esfera de Au o Ag de cualquier tamaño, o de otra forma, en la que se incluyen múltiples partículas de metal en el núcleo.

El uso de nanopartículas activas en SERS como la modalidad de detección encapsulada de la presente invención permite una multiplexación intrínseca. Un dispositivo IFL compatible con la presente invención se puede preparar con una línea de captura única que tiene una mezcla de múltiples anticuerpos de captura. Además, la almohadilla de conjugado se puede preparar con varios subconjuntos de nanoetiquetas SERS conjugadas con múltiples anticuerpos de detección separados. Cada tipo de partícula de detección SERS tendrá su propio tipo o molécula indicadora activa en SERS. Como se describe en detalle a continuación, pueden obtenerse múltiples espectros a partir de las diversas nanoetiquetas SERS unidas a una única línea de captura o punto después de realizar el examen.

Un dispositivo IFL con nanoetiquetas SERS multiplexadas, otro tipo de partícula activa en Raman, moléculas activas en Raman o cualquier otro tipo de partícula que pueda producir un espectro detectable durante la interrogación como modalidad de detección, también tiene la capacidad de informar la intensidad resultante calibrada. La intensidad resultante de la prueba calibrada permite que un IFL funcione como algo más que simplemente un indicador cualitativo. Con la intensidad calibrada, se pueden obtener mediciones cuantitativas del antígeno de interés. Por ejemplo, en una realización donde se utilizan nanoetiquetas SERS como la modalidad de detección, uno

o más de los diversos tipos de nanoetiquetas SERS en un formato multiplexado puede ser interrogado como control positivo para verificar que se ha logrado una cantidad o tasa de flujo de partículas mínimo necesario ha sido alcanzado para asegurar resultados significativos para las partículas de prueba primarias.

- 5 La calibración puede realizarse mediante el uso de una forma de patrón interno. Un subconjunto de las nanoetiquetas SERS (con espectro SERS "A") se conjuga con un anticuerpo de detección contra el antígeno de interés ("desconocido"). Otro subconjunto de nanoetiquetas SERS (con espectro SERS "B") se puede conjugar con un anticuerpo de detección contra un antígeno que está dopado en el tampón de muestra a una concentración conocida. Los anticuerpos de captura para ambos antígenos se mezclan y se depositan sobre el sustrato de flujo lateral, y los dos subconjuntos de partículas conjugadas se depositan sobre la almohadilla de conjugado. Cuando se procesa una muestra, la relación de los dos espectros SERS ("A"/"B") se puede utilizar para determinar la concentración del desconocido. De manera similar, el antígeno "conocido" se puede omitir por completo si el anticuerpo de captura une directamente las especies conjugadas al subconjunto "B".
- 10
- 15 La calibración y el análisis multiplexado que se han descrito anteriormente se pueden realizar como funciones automáticas de un analizador de SERS configurado específicamente para leer los resultados del IFL. Un lector dedicado incluirá un receptáculo configurado para recibir con precisión y posicionar una tarjeta de IFL. El lector dedicado también incluirá un láser situado para excitar los espectros SERS de moléculas indicadoras asociadas a etiquetas SERS unidas a un área específica en el sustrato IFL. Por lo tanto, la línea de captura tradicional del dispositivo IFL detectado visualmente puede reemplazarse por un punto de captura o captura que permita la preparación de dispositivos IFL adecuadamente precisos sin el uso de un exceso de modalidad de recogida o anticuerpos, lo que da como resultado un menor coste unitario total. En otras realizaciones de la presente invención, la capacidad de indicar un resultado calibrado o cuantificado se puede lograr con partículas de detección encapsuladas distintas de las nanoetiquetas SERS. Las partículas adecuadas incluyen, pero sin limitación, perlas Raman y otros tipos de partículas o moléculas que tienen características espectrales detectables tras la interrogación con dispositivos adecuados.
- 20
- 25

Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que un nuevo tipo de IFL es posible cuando se utiliza la modalidad de detección que tiene características espectrales que pueden detectarse por un dispositivo adecuado.

- 30 Por ejemplo, en una realización en la que se usan nanoetiquetas SERS como la modalidad de detección, pueden prepararse dispositivos IFL que proporcionan procesos de detección de dos etapas o de etapas alternativas. En particular, un dispositivo puede detectarse visualmente o con un lector de espectro SERS o ambos, como se ha descrito anteriormente. Durante el uso, un dispositivo IFL que proporciona un resultado positivo después de una inspección visual puede leerse adicionalmente con el lector espectro SERS para obtener datos cuantitativos preliminares o para confirmar el resultado visual positivo. Las partículas distintas de nanoetiquetas SERS, tales como perlas Raman, pueden usarse con resultados similares.
- 35

El uso de nanoetiquetas SERS como modalidad de detección también permite preparar un dispositivo IFL que recibe sangre entera para su análisis. Los dispositivos IFL de la técnica anterior son típicamente inadecuados para el análisis de sangre entera debido a que la intensa coloración impartida por las células de sangre oculta cualquier intento de leer visualmente la prueba al interferir con o bloquear toda la luz que puede reflejarse a partir de las nanopartículas de Au de la técnica anterior. Las nanopartículas SERS, por el contrario, pueden excitarse con la luz de la porción de infrarrojo cercano del espectro, en el que la interferencia de longitud de onda de la hemoglobina se reducirá al mínimo. En una realización de un dispositivo IFL adecuado de sangre entera, puede colocarse una cubierta transparente de color rojo sobre el sustrato para minimizar el impacto visual negativo de la sangre difundida a través del sustrato de prueba. En otra realización adecuada para su uso con sangre entera u otros fluidos, se puede utilizar un filtro con una banda de paso en el rango de longitud de onda de IR cercano, permitiendo el paso de la luz IR cercano para la interrogación de las nanoetiquetas SERS, sin embargo, evitando simultáneamente la observación visual potencialmente indeseable del sustrato de ensayo.

40

45

50

Ejemplos

- Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Aunque los ejemplos descritos a continuación antígeno presentan eventos de unión a antígenos y anticuerpos, pueden prepararse sistemas IFL comparables usando oligonucleótidos como restos de unión en lugar de los anticuerpos y antígenos de un IFL convencional.
- 55

Ejemplo 1.

- Se obtuvieron kits de inmunoensayo de flujo lateral (IFL) comerciales para el virus sincitial respiratorio (VSR) y se modificaron para usar nanoetiquetas SERS para detectar la presencia de antígeno de VSR. Además, se usaron varios kits según se recibieron para determinar la sensibilidad del producto comercial. Para usar las nanoetiquetas SERS con el dispositivo, la almohadilla de conjugado dentro del kit se eliminó antes del uso. En un experimento típico, un control positivo se diluyó con el diluyente de muestra del kit (160 μ l de volumen total) y se mezcló con nanoetiquetas SERS (15 μ l de OD \sim 5) que se habían conjugado con un anticuerpo de detección del VSR. Después de aproximadamente 2 minutos, esta mezcla se añadió al kit. La prueba se realizó a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min antes de la lectura visual y la recopilación de los espectros de Raman.
- 10 Mediante la detección visual en solitario, la sensibilidad de las pruebas comerciales frente a las pruebas modificadas con nanoetiquetas SERS se muestra en la figura 1. El límite de detección visual con nanoetiquetas SERS es tan bueno o mejor que el kit comercial: una muestra positiva diluida 27 veces 102 dio como resultado una línea visible, mientras que la línea de color rosado-rojo se desvanece con una muestra diluida 9 veces 104 en el formato comercial.
- 15 Después de la detección visual, los espectros de Raman de los dispositivos modificados con SERS se recopilaron. Se usó un láser y un espectrómetro disponibles en el mercado. La potencia del láser en la muestra fue de aproximadamente 200 mW, enfocado a un tamaño de punto de 100 μ m. La adquisición fue un promedio de cuatro integraciones de 1 s. Después, se usó un software de integración para analizar la contribución de las nanoetiquetas SERS a la señal global (que también incluye el fondo de la membrana de nitrocelulosa).
- 20

La figura 2 muestra un gráfico 106 de la señal de Raman relativa recogida en la línea de prueba de una serie de kits modificados por SERS incubados con una muestra positiva diluida en serie. Se determinó un límite de detección (LOD) correspondiente a aproximadamente un positivo diluido 400 veces. Se tomaron mediciones de fondo en 8 ubicaciones de 8 tarjetas diferentes que se procesaron con un espacio en blanco (el LOD se calculó como fondo medio más 3 desviaciones estándar). La precisión del ensayo, determinada en 3 tarjetas duplicadas (leídas en la línea de prueba), fue mejor del 12 %.

25

Los datos muestran una unión no específica mínima, y la captura con éxito del conjugado en presencia de antígeno, con un límite de detección basado en nanoetiquetas SERS que aumenta aproximadamente de 40 a 50 veces sobre el producto comercial usando detección visual de Au coloidal.

30

Ejemplo 2. Experimentos Singleplex:

35 Como una etapa preliminar al desarrollo de una prueba de IFL multiplexado para VSR, Influenza A e Influenza B, se desarrollaron en primer lugar una serie de pruebas single-plex para cada antígeno. Para cada, se adquirió un par de anticuerpos. Cada anticuerpo se conjugó con nanoetiquetas SERS de un "sabor" seleccionado y se ensayó en tiras de IFL como conjugados líquidos, en lugar de almohadillas de conjugado seco, para determinar la mejor combinación de anticuerpo de captura en la tira de nitrocelulosa y el anticuerpo de detección conjugado con las nanoetiquetas SERS. Una vez se encontró el mejor par, las nanoetiquetas SERS apropiadas se secaron sobre almohadillas de conjugado y se ensamblaron en pruebas completas.

40

Estas pruebas se realizaron usando estándares obtenidos para VSR, Influenza A e Influenza B. Para el VSR, el control positivo (concentración desconocida) se realizó sin dilución en diversas diluciones usando un tampón de realización de IFL comercial. Los antígenos de Influenza A y B eran de concentración conocida y también se diluyeron en el tampón de realización para la prueba. Los cartuchos se montaron en una fase XYZ y la posición de la muestra se ajustó manualmente para obtener la mejor señal para cada cartucho. Los espectros se adquirieron usando un tiempo de integración de 1 s de un espectrómetro de Raman disponible en el mercado. Se usó software de integración para extraer la cantidad de señal de SERS de los espectros. Las muestras se analizaron únicamente para determinar la presencia de nitrocelulosa (fondo) o el único sabor de las nanoetiquetas SERS usadas en cada prueba respectiva. Los resultados de estas pruebas de sensibilidad se muestran en el gráfico 108 de la figura 3 (VSR), el gráfico 110 de la figura 4 (Gripe A) y el gráfico 112 de la figura 5 (Gripe B).

45

50

Cada una de las tres pruebas single-plex muestra un aumento casi lineal en la señal con un aumento de la concentración de antígeno, y de manera importante, cada una tiene una señal muy baja sin antígeno. Adicionalmente, todas las pruebas fueron visualmente positivas a la mayor dilución de antígeno y visualmente negativas con el blanco (tampón de realización únicamente). Mediante comparación, todas las pruebas comerciales fueron negativas en el blanco y en la mayor dilución del antígeno. Esto indica que las nanoetiquetas SERS son más sensibles tanto con una lectura visual como usando un lector Raman dedicado. También vale la pena destacar el

55

tiempo de lectura experimental de sólo 1 s, y ningún promedio de señal. Pueden esperarse resultados más sensibles promediando las señales tomadas con un láser de barrido a través de la línea de prueba (para minimizar el ruido del lector) y usando tiempos de integración más largos.

5 Ejemplo 3. Experimentos múltiplex:

Una vez que las condiciones apropiadas se han determinado para las pruebas singleplex, el primer intento en un IFL multiplexado fue básicamente sólo una combinación de todas las partes en una prueba. El 3-plex usó el mismo conjugado d8-dpy-RSV tal como se utiliza para la prueba singleplex, pero tuvieron que hacerse nuevos conjugados para la Gripe A (DPy) y la Gripe B (BPE). Todos los conjugados se mezclaron para su deposición en almohadillas de conjugado. Asimismo, los tres anticuerpos de captura se marcaron en una única en las tarjetas de nitrocelulosa. Después del ensamblaje de las tiras en cartuchos, cada antígeno se ensayó usando un intervalo de concentración similar. Únicamente se usó un antígeno a la mezcla para la prueba preliminar. Sin embargo, los datos se analizaron frente a la presencia de nitrocelulosa de fondo y las 3 variedades de etiquetas. Además, el instrumento de detección/interrogación se modificó con un portacartuchos dedicado. Por lo tanto, las muestras se insertaron en el soporte y los espectros se adquirieron sin ninguna manipulación para asegurar que la línea de prueba estaba siendo probada por el punto láser. Para cada concentración de antígeno, los datos para la cantidad de las 3 etiquetas se representan en el gráfico 114 de la figura 6 (VSR), el gráfico 116 de la figura 7 (Gripe A) y el gráfico 118 de la figura 8 (Gripe B). Las señales de fondo de todas las muestras son muy bajas, lo que indica que el flujo no se impide significativamente por la captura de las etiquetas unidas específicamente. Cabe apreciar que la escala vertical es de magnitud equivalente para las figuras 6-8.

Ejemplo 4. Experimentos de calibración de ensayo multiplexado:

25 Para cada uno de los tres analitos (Gripe A, Gripe B, y VSR), se prepararon diluciones seriadas de un control positivo y se realizaron en un kit IFL multiplexado para generar curvas de calibración. Los datos de calibración y las curvas de calibración se muestran en las figuras 9-13. Todos los puntos de datos se adquirieron 15 minutos después de que la muestra se añadiese a un kit de ensayo. Después, se usaron estándares junto con software de interrogación para ajustar los datos con la señal SERS relativa de cada tipo de conjugado. Únicamente se representaron las especies de interés, y se ajustó una curva apropiada a los datos usando modelos lineales o isotérmicos.

Se preparó una muestra con los tres analitos presentes. Esta muestra se procesó usando un software de interrogación que tenía una interfaz de usuario optimizada para su uso con un formato de ensayo IFL. El cartucho que sostenía los sustratos de prueba se insertó en el instrumento 3 minutos después de la aplicación de la muestra. Esto permitió un tiempo adecuado para que la solución comenzase su difusión a la tira de nitrocelulosa. Asegurar que la difusión se estaba produciendo era muy importante en el formato de ensayo, ya que el cartucho se insertó en vertical para las lecturas, lo que puede causar que el líquido se derrame por el sustrato, invalidando la prueba. El ensayo se controló entonces cada minuto hasta la marca de 15 minutos desde la adición de la muestra. Únicamente se usó el punto de datos final para la determinación de la concentración de analitos. La captura de pantalla 120 de la figura 9 muestra los espectros adquiridos en cada punto temporal, en base a un promedio de tres integraciones de 1 s, con el criterio de valoración dibujado en negrita. La captura de pantalla 122 de la figura 10 ilustra los datos de ensayo, que muestra tanto niveles relativos en cada punto temporal, así como las concentraciones finales en base a las curvas de calibración calculadas. La captura de pantalla 124 de la figura 11 muestra una curva de calibración para la Gripe B y la posición del criterio de valoración en la curva. La captura de pantalla 126 de la figura 12 muestra una curva de calibración para la Gripe A y la posición del criterio de valoración en la curva. La captura de pantalla 128 de la figura 13 muestra una curva de calibración para el VSR y la posición del criterio de valoración en la curva.

Ejemplo 5.

50 Como se ha descrito anteriormente, las partículas de detección encapsuladas tienen beneficios de sensibilidad inherente para aplicaciones de IFL sobre el conjugado de oro de 40 nm usado tradicionalmente. Se cree que gran parte de esta sensibilidad proviene de la capacidad de utilizar de oro de mayor tamaño (que se ve más fácilmente) sin perder la actividad de los anticuerpos, ya que los anticuerpos se pueden conjugar covalentemente con la envoltura de encapsulante. Este concepto se ensayó mediante el desarrollo de 3 pruebas para Gripe A, que fueron idénticas que la otra partícula de detección que se usaba. La primera muestra usó la sol. de Au de 40 nm estándar con el anticuerpo adsorbido pasivamente. Las otras dos muestras usaron etiquetas SERS encapsuladas de sílice como se ha descrito anteriormente, teniendo una muestra partículas que tenían núcleos de Au de 50 nm y teniendo la otra partículas con núcleos de Au de 90 nm. Se adquirió un estándar de influenza A y se usó para ensayar la

sensibilidad de cada dispositivo. Los dispositivos fueron leídos por interrogatorio visual y aquellos con etiquetas SERS también se leyeron usando un lector de Raman de exploración. Los resultados se muestran en el gráfico 130 de la figura 14.

- 5 Las pruebas preparadas con conjugados de oro de 40 nm eran razonablemente sensibles, y comparables con los resultados obtenidos a partir de pruebas disponibles en el mercado. Sin embargo, las etiquetas SERS con núcleo de 50 nm tenían un límite de detección que era aproximadamente 1,3 veces más sensible, y las partículas con núcleo de 90 nm tenían 2 veces más sensibilidad. Cuando se usó el lector Raman de exploración, las partículas con núcleo de 50 nm eran 4 veces más sensibles, y las partículas con núcleo de Au de 90 nm fueron 21 veces más sensibles
10 que los dispositivos leídos normalmente utilizando conjugados de 40 nm.

Aunque el tamaño del núcleo de las partículas era responsable de una parte del impulso de sensibilidad merecido, el uso de un lector Raman de exploración también era influyente. Debido a las inconsistencias que acompañan a los dispositivos de flujo lateral, cada dispositivo tiene unas características de liberación de partículas y de flujo
15 ligeramente diferentes. Se descubrió que un lector Raman de exploración ayudaba permitiendo mapear un área del dispositivo que contenía ambas áreas de la línea de prueba y las áreas adyacentes que no debían estar contribuyendo a un resultado positivo. Por lo tanto, los dispositivos se analizaron usando una técnica de sustracción de fondo. Se asumió que la fila más intensa (perpendicular al flujo de partículas) era la señal, y la fila menos intensa se presume que era el fondo. En este ejemplo particular, se empleó una exploración de que consistía en 11 filas (5
20 puntos cada una) que se separaron a intervalos de 130 μm , como se muestra esquemáticamente por el diagrama de exploración 132 de la figura 15. También pueden utilizarse otros patrones de exploración.

Ejemplo 6.

25 Se demuestra un ensayo IFL de partículas encapsuladas con una calibración interna en la figura 16. Los dispositivos de flujo lateral se fabricaron para contener 3 variedades seleccionadas de conjugados. Los conjugados de Gripe A y anticuerpo monoclonal del VSR se complementaron con conjugados de etiquetas SERS revestido con IgG de conejo normal. Una línea de prueba se separó sobre una membrana de nitrocelulosa usando una combinación de anticuerpos de captura de Gripe A y VSR y un anticuerpo de IgG anti-conejo. Por lo tanto, incluso en ausencia de
30 cualquier antígeno de Gripe A o VSR, las partículas de IgG de conejo se capturarán en la línea de prueba. En presencia del antígeno, tanto los conjugados de IgG de conejo como los conjugados de Gripe A y/o VSR también se aglomerarán en la línea de prueba. De esta manera, el conjugante de calibración; (conjugados de IgG de conejo) ayuda a explicar las variaciones en el flujo y la liberación de conjugados que son inherentes de todos los inmunoensayos de flujo lateral. Un posible formato de prueba utilizará una única lectura de la línea de prueba con un
35 punto láser que es mucho más pequeño que la línea. Por lo tanto, ligeras variaciones dentro de una línea de prueba o introducidas por tolerancias de fabricación, podrían dar lugar a imprecisiones. La calibración interna puede usarse para compensar la imprecisión inherente en cualquier prueba IFL. Como alternativa, puede usarse una exploración láser de toda la línea con una lectura promediada para aumentar la precisión.

40 Debido a la idoneidad del uso multiplexado de etiquetas SERS, un espectro puede analizarse fácilmente para determinar la cantidad de cualquier número de diferentes partículas dentro de un dispositivo. La figura 16 y la tabla adjunta demuestran que si se analizan los dispositivos sin normalizarse para la cantidad de compuesto de calibración, la CV para una dilución dada puede ser de hasta el 30 %. Sin embargo, si los mismos dispositivos están normalizados para el calibrante, los dispositivos tienden a tener CV de menos del 20 %.

45 La calibración interna puede extenderse para funcionar como un control para la prueba. La mayor parte de los IFL usan dos líneas, una de las cuales está diseñada para desarrollar siempre una señal que indica el flujo de partículas apropiado. Dado que un instrumento desacopla una señal debido a la presencia de antígeno a partir de la señal de un calibrante, simplemente la detección de un calibrante puede funcionar para asegurar que la prueba se realizó y
50 se leyó adecuadamente.

Aunque la invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a varias realizaciones, se entenderá por los expertos en la técnica que pueden hacerse cambios en la forma y detalles con respecto a las diversas realizaciones desveladas en el presente documento, y que las diversas realizaciones desveladas en el presente
55 documento no pretenden actuar como limitaciones en el alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar un inmunoensayo de flujo lateral (IFL) que comprende:
 - 5 proporcionar un sustrato;
proporcionar partículas de detección encapsuladas conjugadas con un anticuerpo de detección;
proporcionar anticuerpos de captura en una porción de prueba del sustrato en el que tanto los anticuerpos de detección como los anticuerpos de captura tienen afinidad de unión para un antígeno de interés;
unir las partículas encapsuladas al antígeno de interés con el anticuerpo de detección;
 - 10 difundir una muestra de fluido y partículas encapsuladas unidas al antígeno a través del sustrato a la porción de prueba del sustrato;
capturar las partículas encapsuladas y los antígenos en la porción de prueba del sustrato con los anticuerpos de captura; y
observar las partículas encapsuladas en la porción de prueba del sustrato;
 - 15 en el que

las partículas de detección encapsuladas tienen un núcleo de nanopartículas de metal activas en SERS seleccionado entre Au y/o Ag;
20 se incluyen múltiples partículas de metal en el núcleo; y
las nanopartículas de metal tienen fijadas o asociadas a su superficie una o más moléculas activas en Raman.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de unión se produce en una almohadilla de conjugación; o lejos del sustrato, antes de la difusión de la muestra de fluido y partículas encapsuladas a través del sustrato; o al mismo tiempo que se difunde la muestra de fluido y las partículas encapsuladas a través del sustrato.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el encapsulante comprende un material seleccionado entre el grupo que consiste en sílice, vidrio, proteínas, ADN, ARN, poliaminoácidos sintéticos, polilisina, ácido poliglutámico, polietilenglicoles, dendrímeros de copolímeros de bloque, poliamidas, polietileniminas, poliacrilatos, otros polímeros naturales, dextranos, otros polímeros a base de carbohidratos naturales y tensioactivos.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las partículas de detección encapsuladas tienen un núcleo de Ag.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las partículas de detección encapsuladas tienen una forma que no es sustancialmente esférica, preferiblemente una forma seleccionada entre un prisma, una pirámide, un cubo, una caja, una clavija, una envoltura hueca y una forma irregular.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las partículas de detección encapsuladas tienen un espectro detectable tras la iluminación con luz de una longitud de onda seleccionada.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa de observación comprende:
 - 45 opcionalmente observar visualmente la porción de prueba del sustrato;
iluminar las SACN unidas a la porción de prueba con luz capaz de excitar la molécula indicadora de Raman, preferiblemente la luz usada en la etapa de iluminación tiene una longitud de onda de infrarrojo cercano; y
detector el espectro de Raman de la molécula indicadora de Raman.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la muestra comprende sangre entera.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende adicionalmente:
 - 55 proporcionar más de un tipo de SACN donde cada tipo de SACN tiene un tipo separado de molécula indicadora activa en Raman y cada tipo de SACN se conjuga con un tipo distinto de anticuerpo de detección; y
proporcionar más de un tipo de anticuerpo de captura en una porción de prueba del sustrato.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la etapa de observación comprende adicionalmente:
5 iluminar las SACN unidas a la porción de prueba con luz capaz de excitar cada tipo de molécula indicadora de Raman; y
detectar el espectro de Raman de cada tipo de molécula indicadora de Raman.
11. El método de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente calibrar el espectro de Raman de un tipo de molécula indicadora con el espectro de Raman de otro tipo de molécula indicadora.
- 10 12. Un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral (IFL) que comprende:
15 un sustrato que tiene una porción de conjugación y una porción de prueba;
partículas de detección encapsuladas conjugadas con un anticuerpo de detección como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1, y de 3 a 6, asociadas operativamente a la porción de conjugación;
anticuerpos de captura asociados operativamente a la porción de prueba; y
uno de un filtro rojo y un filtro de infrarrojo cercano asociados al sustrato.
13. El dispositivo IFL de la reivindicación 12, en el que el dispositivo IFL comprende adicionalmente más
20 de un tipo de SACN, donde cada tipo de SACN tiene un tipo separado de molécula indicadora activa en Raman y cada tipo de SACN se conjuga con un tipo distinto de anticuerpo de detección, y opcionalmente el dispositivo IFL comprende adicionalmente un lector de espectro Raman.
14. Un método para realizar un inmunoensayo de flujo lateral (IFL) que comprende:
25 proporcionar un sustrato;
proporcionar partículas de detección encapsuladas conjugadas con un oligonucleótido de detección;
proporcionar oligonucleótidos de captura en una porción de prueba del sustrato en el que tanto los oligonucleótidos de detección como los oligonucleótidos de captura son complementarios con respecto a un
30 oligonucleótido diana de interés;
unir las partículas encapsuladas al oligonucleótido diana de interés con el oligonucleótido de detección;
difundir una muestra de fluido y partículas encapsuladas unidas al oligonucleótido de interés a través del sustrato a la porción de prueba del sustrato;
35 capturar las partículas encapsuladas y el oligonucleótido de interés en la porción de prueba del sustrato con el oligonucleótidos de captura; y
observar las partículas encapsuladas en la porción de prueba del sustrato
- en el que
40 las partículas de detección encapsuladas tienen un núcleo de nanopartículas de metal activas en SERS seleccionado entre Au y/o Ag;
se incluyen múltiples partículas de metal en el núcleo; y
las nanopartículas de metal tienen unidas o asociadas a su superficie una o más moléculas activas en Raman.
- 45 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o la reivindicación 14, en el que las partículas de detección encapsuladas comprenden un encapsulante y un revestimiento.
16. El método de la reivindicación 15, en el que el revestimiento comprende un material seleccionado
50 entre el grupo que consiste en sílice, vidrio, proteínas, ADN, ARN, poliaminoácidos sintéticos, polilisina, ácido poliglutámico, polietilenglicoles, dendrímeros de copolímeros de bloque, poliamidas, polietileniminas, poliacrilatos, otros polímeros naturales, dextranos, otros polímeros a base de carbohidratos naturales y tensioactivos.

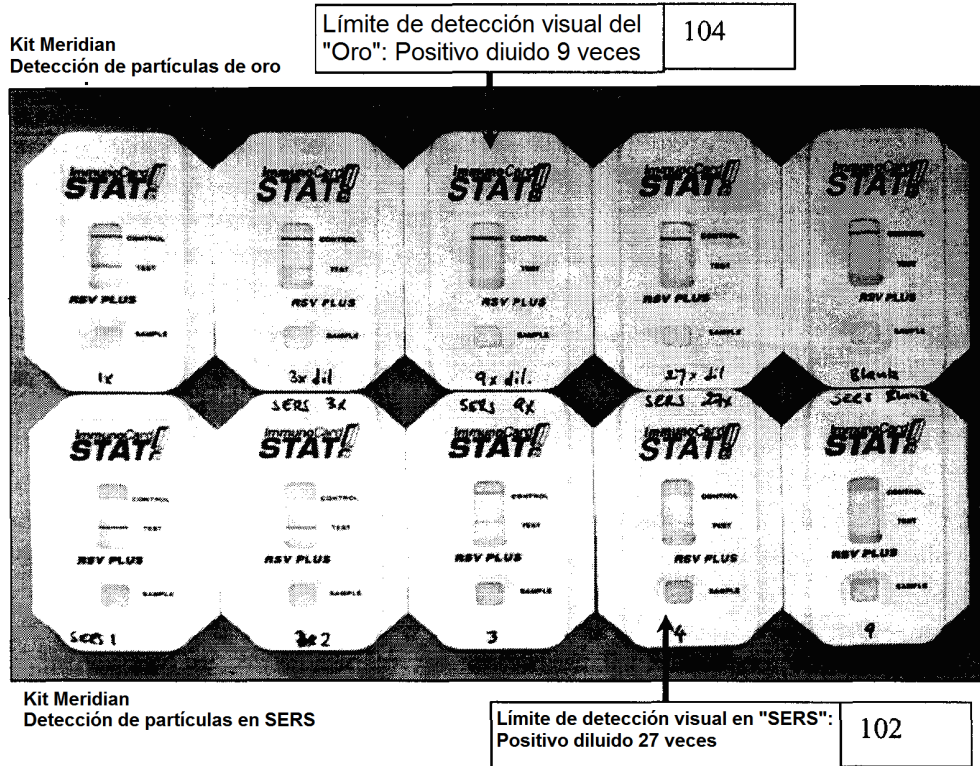


Figura 1: Fotografía de kits de VSR Meridian realizados sin modificación (fila superior) y usando nanoetiquetas SERS como modalidad de detección (fila inferior). De izquierda a derecha, las muestras se procesaron usando un control positivo seguido de diluciones seriadas 3 veces y comparadas con un blanco en el extremo derecho.

Fig. 1

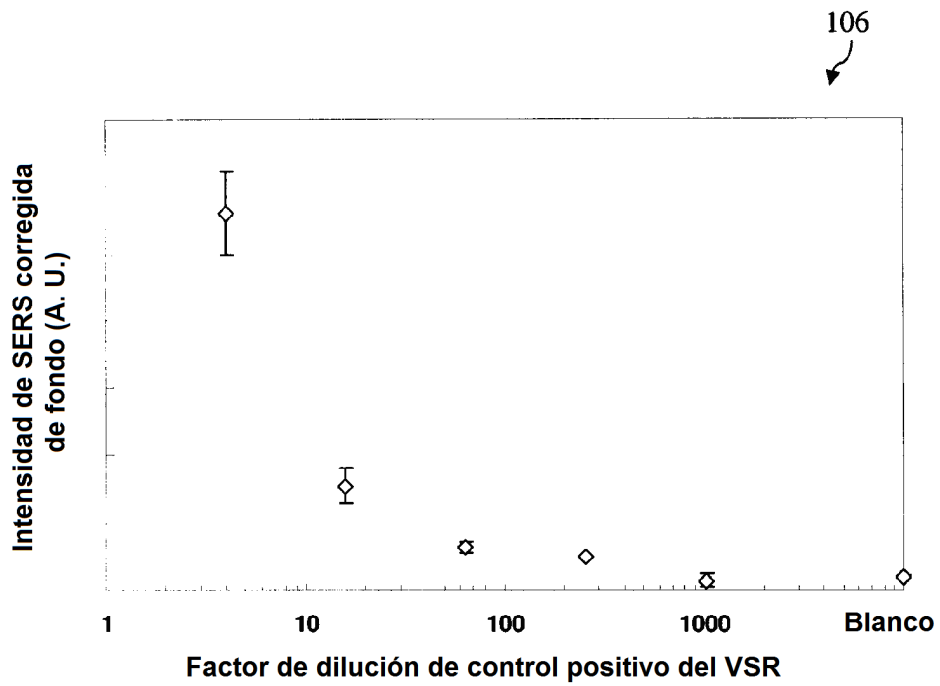


Figura 2: Representación de la intensidad de Raman obtenida de kits comerciales modificados con nanoetiquetas SERS. Los datos se restan de fondo y se determinan usando el software SENSERSee. Cada dilución se procesó en 3 kits separados, y las barras de error representan la desviación estándar entre los kits.

Fig. 2

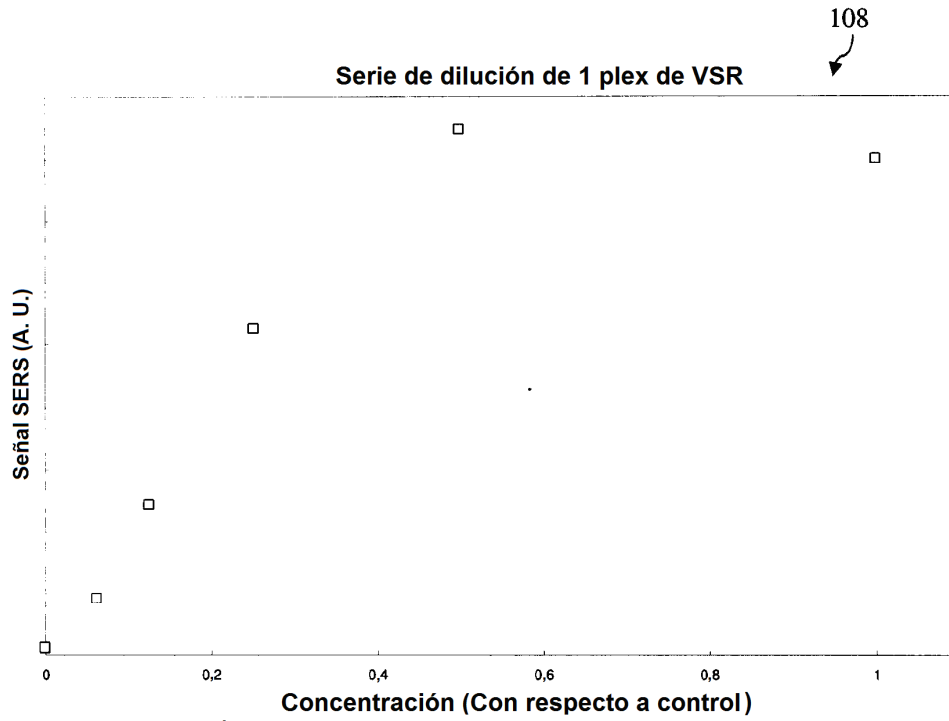


Figura 3: Representación de intensidad de Raman obtenida a partir de kits IFL realizados con diluciones de un control positivo para VSR.

Fig. 3

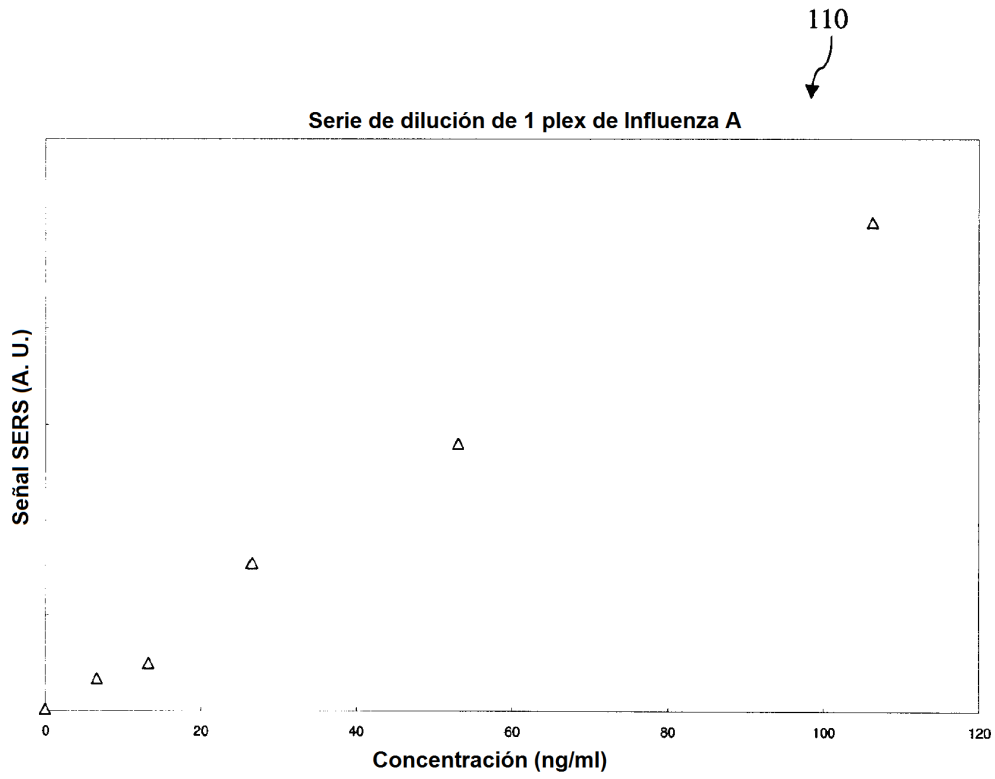


Figura 4: Representación de intensidad de Raman obtenida a partir de kits IFL realizados con diluciones de un control positivo para Gripe A.

Fig. 4

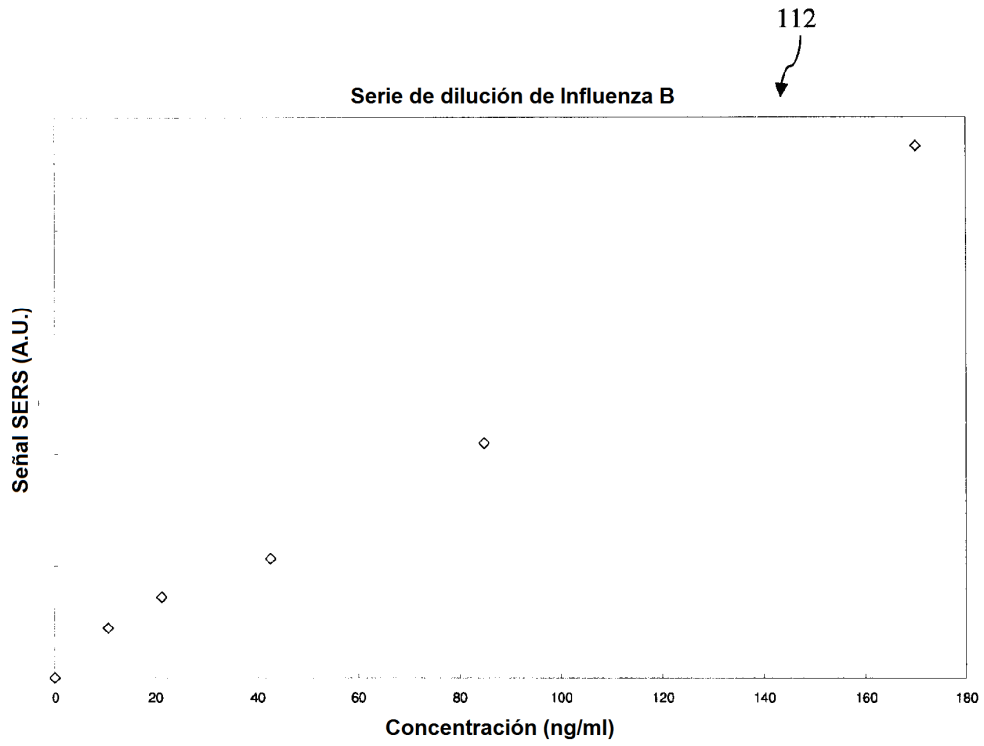


Figura 5: Representación de la intensidad de Raman obtenida a partir de kits IFL realizados con diluciones de un control positivo para Gripe B.

Fig. 5

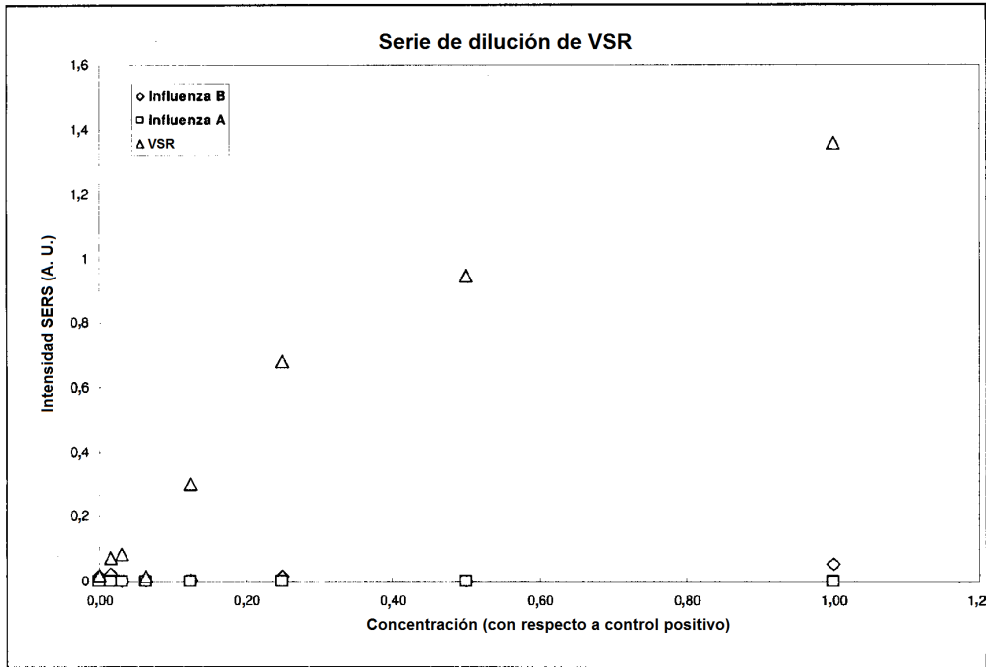


Fig. 6

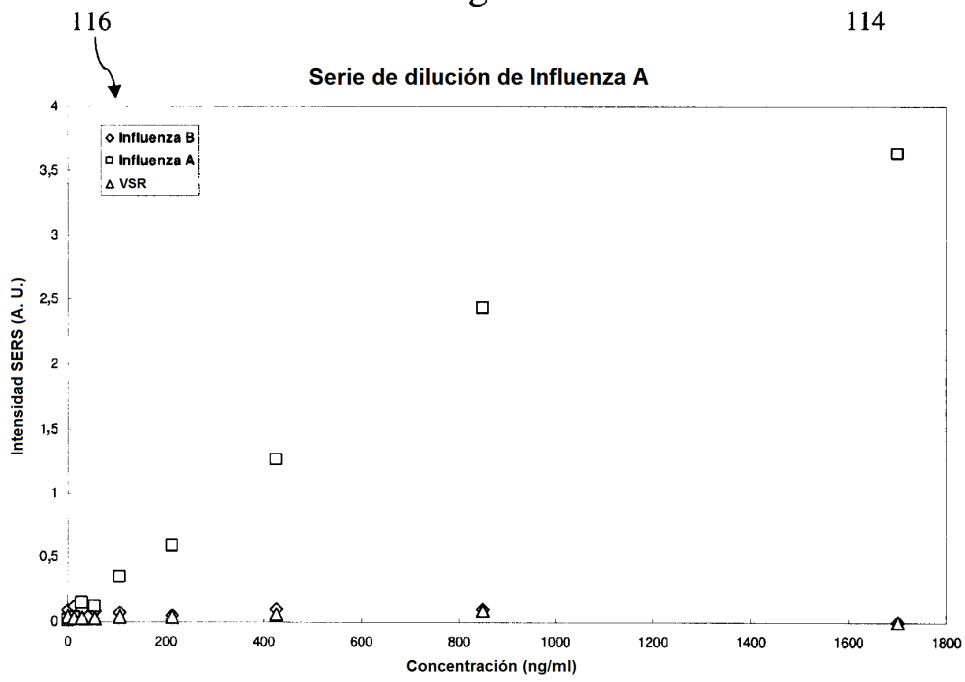


Fig. 7

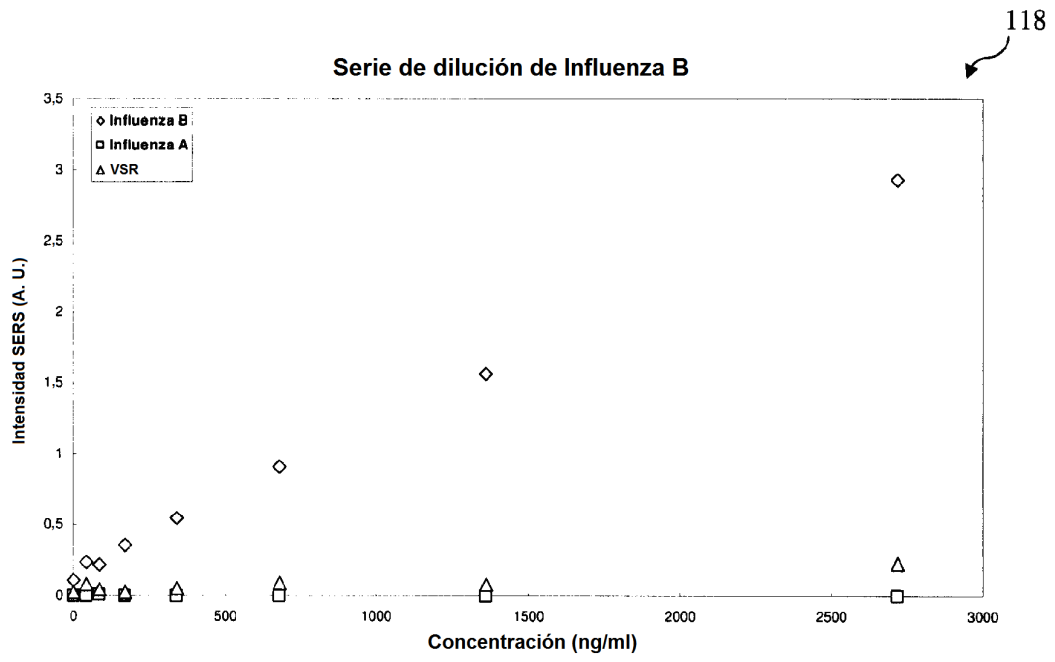


Fig. 8

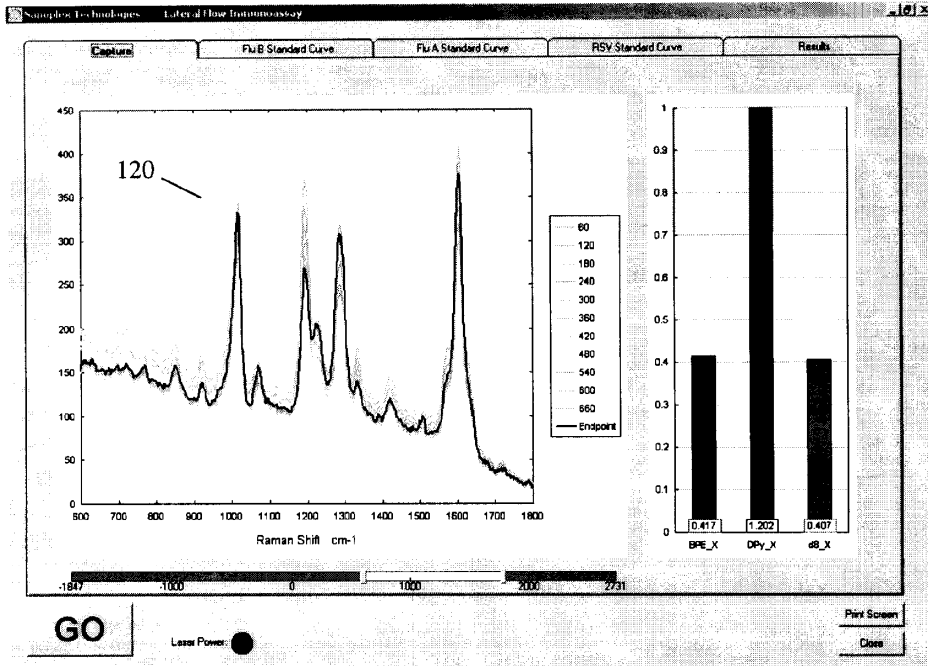


Fig. 9

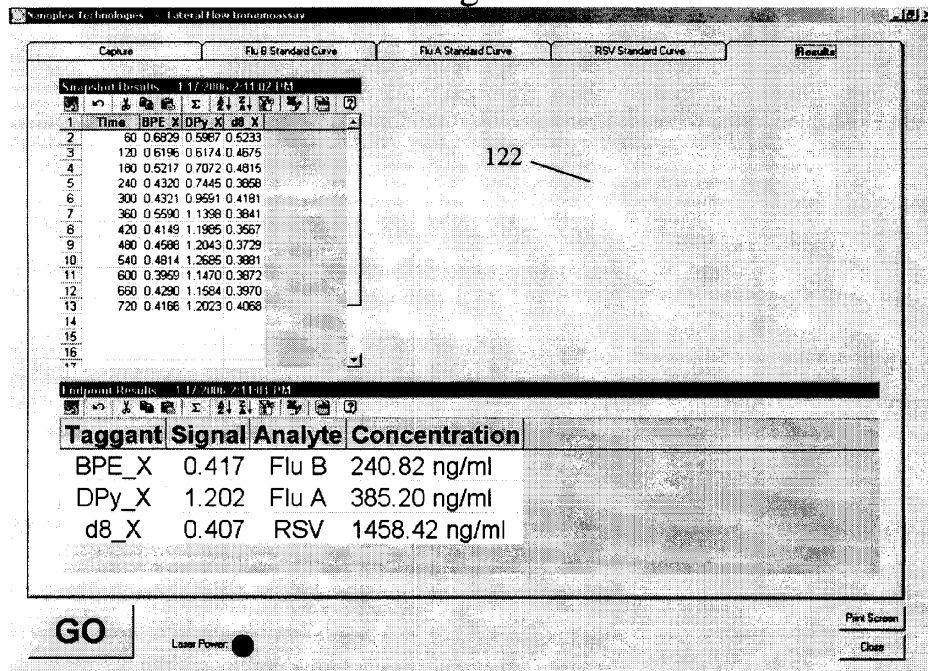


Fig. 10

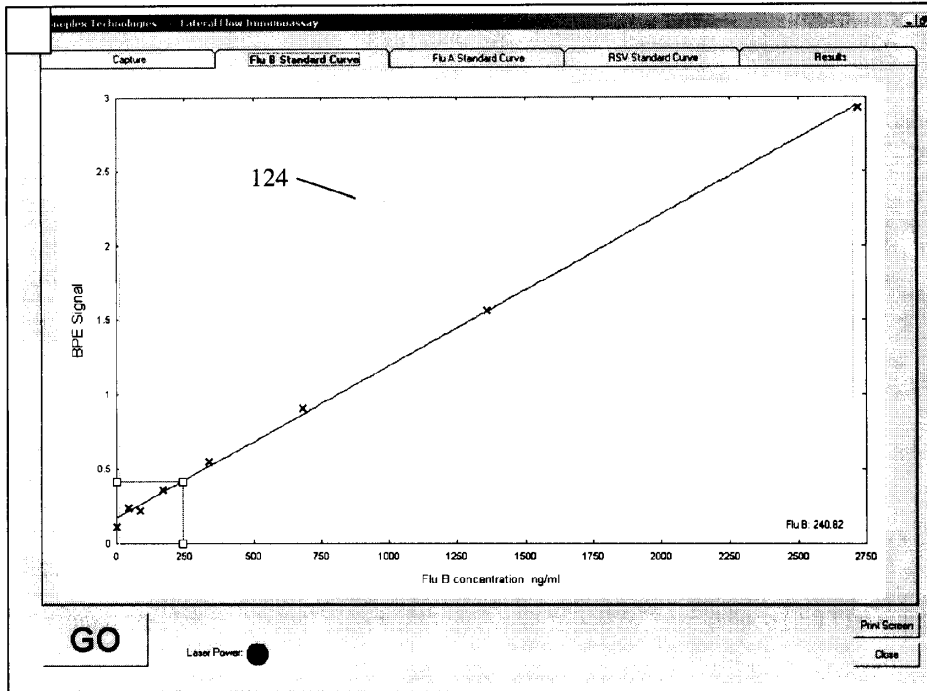


Fig. 11

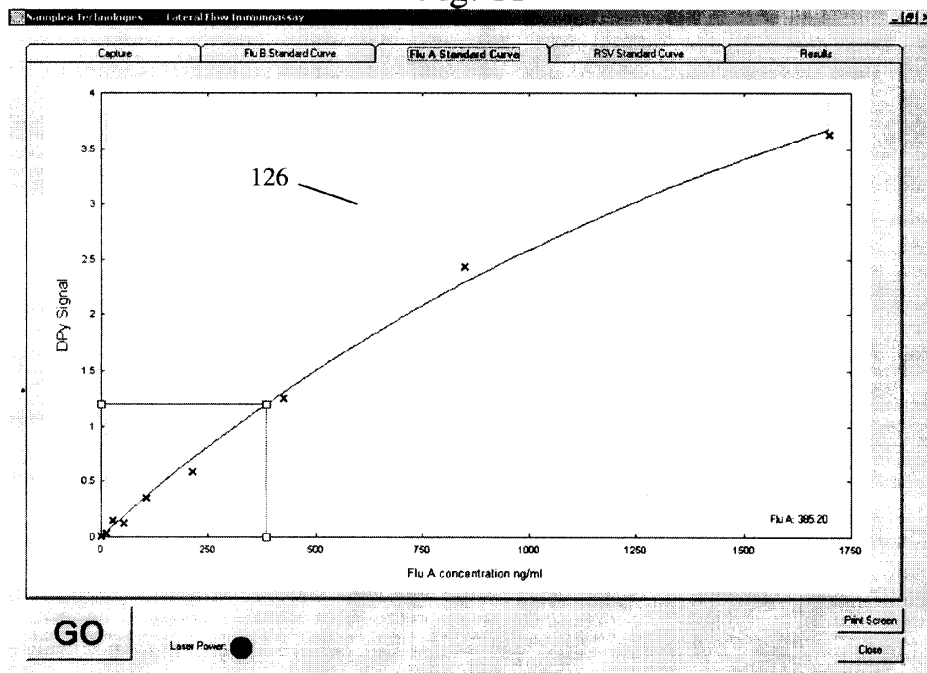


Fig. 12

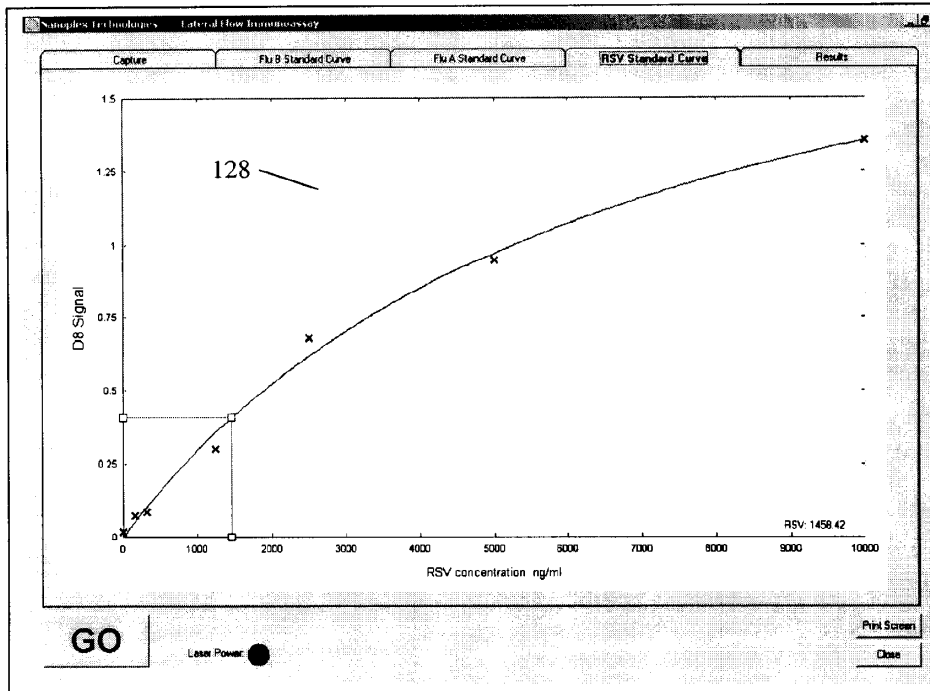


Fig. 13

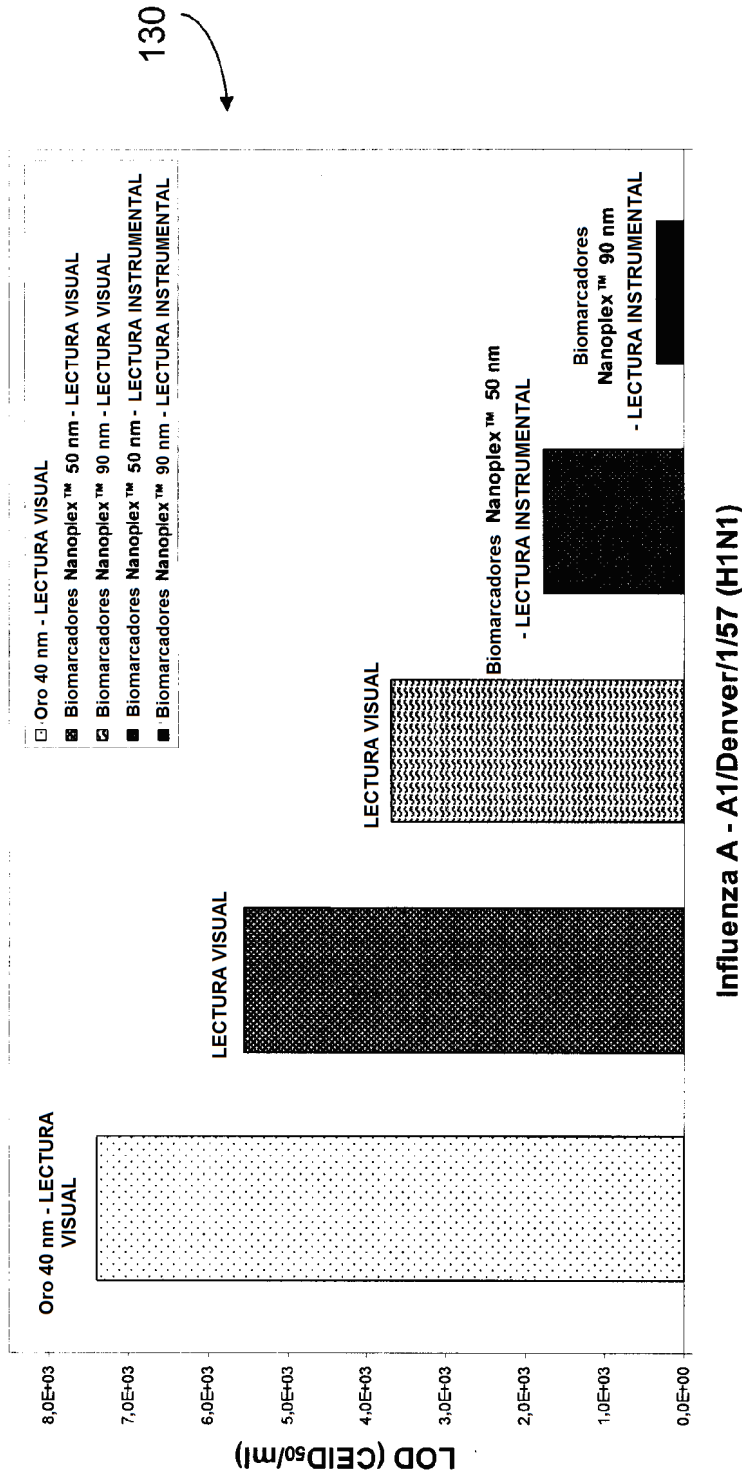
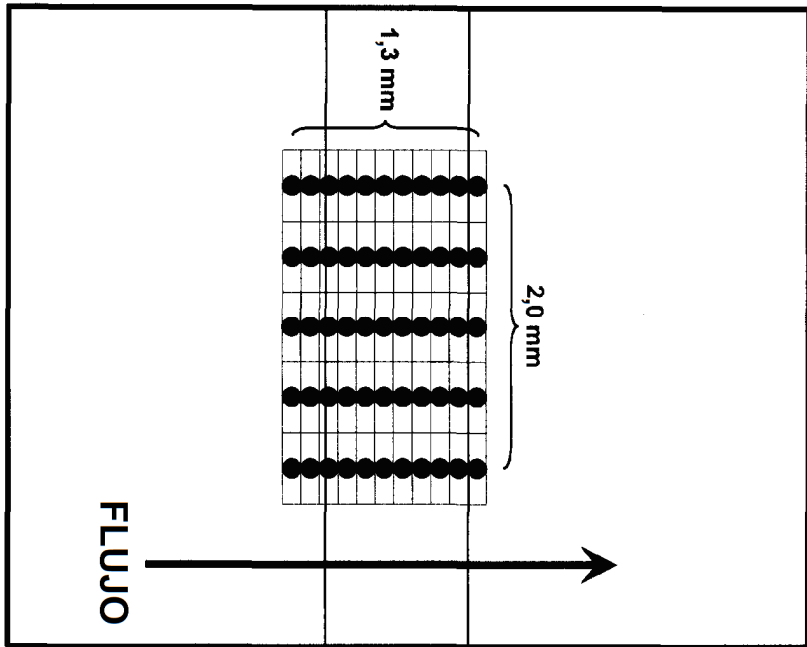


Fig. 14



132

Fig. 15

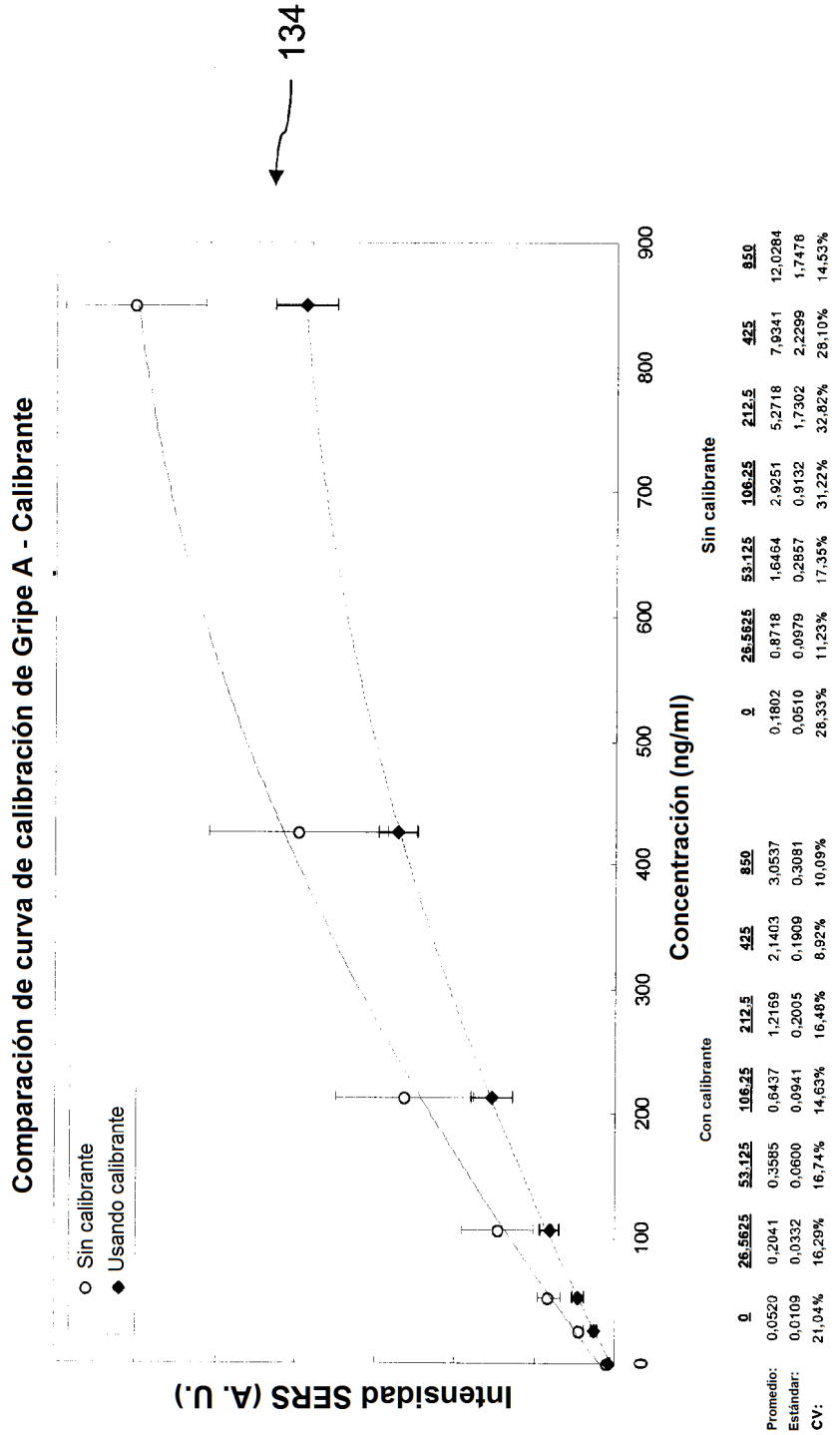


Fig. 16